

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年10月2日 (02.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/117813 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/055650
- (22) 国際出願日: 2008年3月26日 (26.03.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-085369 2007年3月28日 (28.03.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学 (HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP). 財団法人ひろしま産業振興機構 (HIROSHIMA INDUSTRIAL PROMOTION ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒7300052 広島県広島市中区千田町三丁目7番47号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀内 浩幸 (HORIUCHI, Hiroyuki). 松田 治男 (MATSUDA, Haruo). 古澤 修一 (FURUSAWA, Shuichi). 中野 幹治 (NAKANO, Mikiharu). 山下 裕輔 (YAMASHITA, Yusuke). 西本 真樹 (NISHIMOTO, Maki).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能



WO 2008/117813 A1

(54) Title: CHICKEN EMBRYONIC STEM CELL AND METHOD FOR EVALUATION THEREOF

(54) 発明の名称: ニワトリ胚性幹細胞およびその評価方法

(57) Abstract: A chicken embryonic stem cell is established, which steadily has a pluripotency and an ability of being differentiated into a germ cell. For evaluating on whether or not the chicken embryonic stem cell can be applied to gene modification technique, detection is made on a protein which serves as a measure of the ability of being differentiated into a germ cell. It becomes possible to provide a chicken embryonic stem cell applicable to genetic modification technique and a method for evaluation of the chicken embryonic stem cell.

(57) 要約: 多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリ胚性幹細胞を樹立する。このようなニワトリ胚性幹細胞を遺伝子改変技術に応用可能な細胞であることを評価するために、生殖細胞分化能の指標となるタンパク質を検出する。これにより、遺伝子改変技術に応用可能なニワトリ胚性幹細胞およびその評価方法を提供する。

明 細 書

ニワトリ胚性幹細胞およびその評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、ニワトリ胚性幹細胞およびその評価方法に関するものであり、より詳細には、遺伝子改変技術に応用可能なニワトリ胚性幹細胞、および遺伝子改変技術に応用可能なニワトリ胚性幹細胞であることを適切に評価する評価方法に関するものである。

背景技術

[0002] 胚性幹細胞(embryonic stem cell;ES細胞)は、初期胚から分離された、多分化能を有する未分化な細胞であり、多分化能(三胚葉に分化し得る能力)だけでなく自己複製能を有していることが知られている。このようなES細胞は、再生医療分野等においてさかんに研究されている。また、マウスES細胞は、遺伝子ターゲティング法を用いて特定遺伝子を改変したマウスの作製等に広く利用されている。

[0003] 近年、生物固有の遺伝子の機能解析は、特定の遺伝子が導入された動物、または特定の遺伝子がノックアウトされた動物を作出することによって、飛躍的に進歩した。このような動物、すなわち、遺伝子改変動物は、医学生物学だけでなく広範な研究領域において使用されており、各領域における研究開発に大きな進歩をもたらしている。

[0004] 遺伝子改変技術に応用するためには、ES細胞が生殖細胞へ分化し得ることがさらに必要である。しかし、多能性を有しかつ生殖細胞へ分化可能であるES細胞は、マウス以外では報告されておらず、マウス以外の動物種ではその細胞樹立方法および評価方法の開発が必要である。

[0005] ニワトリES細胞を樹立したという報告がこれまでになされている(非特許文献1～3参照)。これらの報告では、多能性を維持させる培地添加因子としてマウス由来の白血病阻害因子(LIF)およびそのファミリーファクターを使用している。また、非特許文献2および3では、Buffalo Rat Liver(BRL)細胞の培養上清を用いることによってES細胞を樹立したと報告されている。

特許文献1:日本国公開特許公報「特開2003-9869号公報(公開日:平成15年1月14日)

特許文献2:WO2006/054666A1パンフレット(国際公開日:2006(平成18)年5月26日)

非特許文献1:Pain B. et al. Development 122(8): 2339-2348 (1996)

非特許文献2:van de Lavoie MC. et al. Mech. Dev. 123(1): 31-41 (2005)

非特許文献3:van de Lavoie MC. and Mather-Love C. Methods Enzymol. 418: 38-64 (2006)

非特許文献4:Horiuchi H. et al. J. Biol. Chem. 279(23): 24514-24520 (2004)

非特許文献5:Yamashita Y. et al. Dev. Comp. Immunol. 30(5): 513-22 (2006)

非特許文献6:Mitsui K. et al. Cell 113(5): 631-642 (2003)

非特許文献7:Chambers I. et al. Cell 113(5): 643-655 (2003)

非特許文献8:van de Lavoie MC. et al. Nature 441: 766-769 (2006)。

発明の開示

[0006] しかし、非特許文献1に記載のニワトリES細胞は長期継代培養(10日以上)すると多能性が消失する(非特許文献4および5、ならびに特許文献1参照)。また、非特許文献2および3に記載のBRL培養上清の具体的な効果は明らかではなく、さらに、この方法で作出されたES細胞は、CVH(chicken Vasa homologue;生殖系列細胞に特異的に発現し、生殖細胞分化能を有するか否かの指標となる分子)の発現が認められていないので、生殖細胞への分化能を欠失している(非特許文献8参照)。このように、これまでに報告されたニワトリES細胞は、「多能性を有しかつ生殖細胞へ分化可能である」という特長を有していないので、遺伝子改変技術に応用することができない。

[0007] 本発明は、上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、遺伝子改変技術に応用可能なニワトリES細胞を樹立するとともに、遺伝子改変技術に応用可能なニワトリES細胞であるか否かを評価する方法を提供することにある。

[0008] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞は、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを特徴としている。上記構成を有していることにより、本発明は遺伝子

改変ニワトリ作出に利用可能である。

- [0009] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞は、Sachi-1タンパク質およびCVHタンパク質の両方が安定的に発現されていることが好ましい。Sachi-1タンパク質としては、(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図され、CVHタンパク質としては、(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図される。
- [0010] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞は、chiwiタンパク質が安定的にさらに発現されていることがより好ましい。chiwiタンパク質としては、(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図される。
- [0011] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞は、Sachi-1のmRNAおよびCVHのmRNAの両方が安定的に発現されていることが好ましい。Sachi-1のmRNAは、配列番号1に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図され、CVHのmRNAは配列番号5に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図される。
- [0012] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞はまた、chiwiのmRNAが安定的にさらに発現されていることがより好ましい。chiwiのmRNAは、配列番号3に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図される。
- [0013] 本発明に係るニワトリ胚性幹細胞を評価する方法は、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを検出する検出工程を包含することを特徴としている。上記構成を有することにより、本発明は、胚性幹細胞が遺伝子改変ニワトリ作出に利用可能であるか否かを評価することができる。
- [0014] 本発明に係る評価方法において、上記検出工程は少なくとも10日にわたって行われることが好ましい。これにより、胚性幹細胞が多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを確認することができる。
- [0015] また、本発明に係る評価方法において、上記検出工程は、Sachi-1タンパク質およびCVHタンパク質の両方の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましく、より詳細には、(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、および(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の両方の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましい。

[0016] なお、本発明に係る評価方法において、上記検出工程は、Sachi-1のmRNAおよびCVHのmRNAの安定的な発現を検出することによって行われてもよく、より詳細には、(a')配列番号1に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチド、および(b')配列番号5に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドの安定的な発現を検出することによって行われてもよい。

[0017] 本発明に係る評価方法において、上記検出工程はさらに、chiwiタンパク質の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましく、より詳細には、(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましい。

[0018] なお、本発明に係る評価方法において、上記検出工程は、chiwiのmRNAの安定的な発現を検出することによって行われてもよく、より詳細には、(c')配列番号3に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドの安定的な発現を検出することによって行われてもよい。

[0019] 本発明に係るキットは、上記ニワトリ胚性幹細胞が備えられていることを特徴としている。上述したように、本発明に係るニワトリ胚性幹細胞は、遺伝子改変ニワトリ作出に利用可能な細胞である。本発明に係るキットは、ニワトリLIFタンパク質がさらに備えられていてもよい。

[0020] 本発明に係る遺伝子改変ニワトリの作出方法は、上記ニワトリ胚性幹細胞をニワトリLIFタンパク質とともに培養する工程を包含することを特徴としている。上記構成を有していることにより、ニワトリ胚性幹細胞を分化させることなく遺伝子操作(ターゲティング)し得る。

[0021] 本発明の他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、添付図面を参照した次の説明によって明白になるであろう。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は、培養3日後における胚盤葉細胞のコロニーの形態を示した図である。

[図2]図2は、継代培養後においても安定して増殖するニワトリES細胞を示した図であり、(b)は(a)の強拡大像である。

[図3]図3は、樹立したニワトリES細胞(2系統)を凍結保存した後に再融解して培養した様子を示す((a)樹立後1年以上経過した細胞、(b)樹立後半年以上経過した細胞)。

[図4]図4は、Sachi-1のアミノ酸配列と哺乳類Nanogのアミノ酸配列とのアラインメント(a)およびホメオドメインにおけるSachi-1のアミノ酸配列と哺乳類Nanogのアミノ酸配列との同一性を調べた結果(b)を示す図である。

[図5]図5は、Sachi-1 mRNAの定量的発現解析を、real-time PCRを用いて行った結果を示す図である。

[図6]図6は、ニワトリの各種組織および細胞を用いた発現解析を、real-time PCRを用いて行った結果を示す図である。

[図7]図7は、胚盤葉細胞(胚盤葉明域)を用いた蛍光抗体法の結果を示す図であり、(a)は細胞の透過像を示し、(b)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(c)は抗CVH抗体による免疫染色像を示す。

[図8]図8は、胚盤葉細胞(胚盤葉明域)を用いた蛍光抗体法の結果を示す図であり、(a)は細胞の透過像を示し、(b)はDAPI染色像を示し、(c)は抗chiwi抗体による免疫染色像を示す。

[図9]図9は、蛍光抗体法によって始原生殖細胞(PGC)を用いた蛍光抗体法の結果を示す図であり、(a)および(e)は細胞の透過像を示し、(b)および(f)はDAPI染色像を示し、(c)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(d)は抗chiwi抗体による免疫染色像を示し、(g)は抗CVH抗体による免疫染色像を示す。なお、(a)~(d)および(e)~(g)はそれぞれ同じ視野を観察した結果である。

[図10]図10は、蛍光抗体法によって精巣切片を用いた蛍光抗体法の結果を示す図であり、(a)はCVH陽性細胞を観察した図であり、(b)はchiwi陽性細胞を観察した図(いずれも上段が低倍率、下段が高倍率)である。

[図11]図11は、樹立したニワトリES細胞のうちの異なる2系統についての蛍光抗体法の結果を示す図であり、(a)は細胞の透過像を示し、(b)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(c)は抗chiwi抗体による免疫染色像を示す。

[図12]図12は、樹立したニワトリES細胞の遺伝子発現を、多能性および生殖細胞分

可能を有している胚盤葉細胞と比較して調べた結果を示す図である。

[図13]図13は、樹立したニワトリES細胞株が遺伝子導入を行った後も多能性および生殖細胞分化能を維持していることを示す図であり、(a)は明視野像を示し、(b)はEGFPの蛍光像を示し、(c)はCVHの抗体染色像を示す。

[図14]図14は、EGFP導入後でありかつCVH陽性のニワトリES細胞株をレシピエント胚へ移植し、孵卵2～3日後に回収した胚血液を観察した結果を示す図であり、(a)は明視野像を示し、(b)EGFPの蛍光像を示す。

[図15]図15は、EGFP導入後でありかつCVH陽性のニワトリES細胞株をレシピエント胚へ移植し、孵卵して得られたキメラ体の生殖巣からのゲノムDNAに存在するEGFPを検出した結果を示す図である。

[図16]図16は、樹立/評価したニワトリES細胞が生殖系列に寄与することを実証した図である。(a)はES細胞を移植することによって誕生した第一世代キメラニワトリ(G0)の雛(上段)および性成熟した個体(下段)を示し、(b)は(a)に示したニワトリから人工授精により誕生したG1世代の雛(黒色羽毛)を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0023] [1. ニワトリ胚性幹細胞]

本発明に係るニワトリ胚性幹(ES)細胞は、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを特徴としている。多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリES細胞は、これまでには存在しない。上記構成を有していることにより、本発明に係るニワトリES細胞は遺伝子改変ニワトリ作出に利用可能である。

[0024] 1つの局面において、本発明に係るニワトリES細胞は、Sachi-1タンパク質およびCVHタンパク質の両方が安定的に発現されていることが好ましく、chiwiタンパク質が安定的にさらに発現されていることがより好ましい。

[0025] Sachi-1タンパク質としては、(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図され、CVHタンパク質としては、(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図される。また、chiwiタンパク質としては、(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質が意図される。

[0026] 本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」は、「ペプチド」または「ポリペプ

チド」と交換可能に使用される。また、タンパク質の「フラグメント」は、当該タンパク質の部分断片が意図される。本明細書中で使用される場合、タンパク質は、天然供給源より単離されても、化学合成されてもよい。

[0027] 用語「単離された」タンパク質は、その天然の環境から取り出されたタンパク質が意図される。例えば、宿主細胞中で発現された組換え産生されたタンパク質は、任意の適切な技術によって実質的に精製されている天然または組換えのタンパク質と同様に、単離されていると考えられる。

[0028] 他の局面において、本発明に係るニワトリES細胞は、Sachi-1のmRNAおよびCVHのmRNAの両方が安定的に発現されていることが好ましく、chiwiのmRNAが安定的にさらに発現されていることがより好ましい。

[0029] Sachi-1のmRNAは、配列番号1に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図され、CVHのmRNAは配列番号5に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図される。また、chiwiのmRNAは、配列番号3に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドが意図される。

[0030] 本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」は、「遺伝子」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用され、ヌクレオチドの重合体が意図される。本明細書中で使用される場合、用語「塩基配列」は、「核酸配列」または「ヌクレオチド配列」と交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド(A、G、CおよびTと省略される)の配列として示される。また、ポリヌクレオチドの「フラグメント」は、その断片部分が意図される。本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドは、天然供給源より単離されても、組換え的に生成されても、化学合成されてもよい。

[0031] 本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)の形態、またはDNAの形態(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)で存在し得る。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得る。一本鎖DNAまたはRNAは、コード鎖(センス鎖としても知られる)であり得るか、または、非コード鎖(アンチセンス鎖としても知られる)であり得る。

[0032] 用語「単離された」ポリヌクレオチドは、その天然の環境から取り出されたポリヌクレオチドが意図される。例えば、宿主細胞中で発現されたポリヌクレオチドは、任意の

適切な技術によって実質的に精製されている天然または組換えのポリヌクレオチドと同様に、単離されていると考えられる。

- [0033] 本発明に係るニワトリES細胞(多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリES細胞)を樹立するために用いる培地としては、EmbryoMax DMEM(CH EMICON社製)が好ましいがこれらに限定されない。
- [0034] 本発明に係るニワトリES細胞を樹立するために用いる支持細胞(フィーダー細胞)としては、STO細胞またはニワトリ胚線維芽(CEF)細胞が好ましいがこれらに限定されない。なお、当業者は、CEF細胞をニワトリ組織から容易に調製し得るが、細胞がウイルス等により癌化することを防ぐために、specific pathogen free (SPF; 特定病原体を含まない)受精卵胚を使用することが望ましい。
- [0035] 本発明に係るニワトリES細胞を樹立するために用いるニワトリ受精卵としては、放卵直後の可能な限り新鮮なものであれば特に限定されない。細胞樹立後に細胞の多能性を羽毛色で確認するためには、黒色羽毛の品種(例えば、黄斑プリマスロック種)を利用することが望ましい。なお、羽毛色は一つの目安であり、羽毛色キメラではなくても生殖系キメラであることもあるので、ニワトリ種も特に限定されない。
- [0036] ニワトリ受精卵から回収する胚盤葉は、Eyal-Giladi H. および Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. Dev Biol. 49(2): 321-37 (1976) に記載の発生段階表におけるステージXであることが好ましく、発生が進んでいるものは排除されるべきである。胚盤葉の回収にはリング回収が好ましいがこれに限定されない。回収した細胞を分散し、支持細胞上に播種し、コロニーが形成するまで(培養開始から2~3日間)培養する。形成されるコロニーの直径は50~1000 μ mが好ましく、100~500 μ mがより好ましく、200~500 μ mがさらに好ましい。なお、この時期の細胞(コロニー)を継代することが好ましく、さらなる2~3日間で上記直径を有するコロニーが形成されるように継代する。
- [0037] このような手順を経ることによって、本発明に係るニワトリES細胞を樹立することができる。さらに、本発明に係るニワトリES細胞は凍結保存した後に解凍して用いても、機能を喪失することなく増殖し得る。

[0038] [2. ニワトリ胚性幹細胞の評価方法]

このように、本発明に係るニワトリ胚性幹(ES)細胞は、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているので、遺伝子改変技術に応用し得る。多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリES細胞は、これまでには存在しない。

[0039] 本明細書を読んだ当業者は、ニワトリES細胞が遺伝子改変技術に応用し得るか否かを評価するために、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているか否かを確認すればよいことを、容易に理解する。すなわち、本発明はさらに、ニワトリES細胞の評価方法を提供する。

[0040] 本発明に係るニワトリES細胞を評価する方法は、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを検出する検出工程を包含することを特徴としている。上記構成を有することにより、本発明は、ES細胞が遺伝子改変ニワトリ作出に利用可能であるか否かを評価することができる。

[0041] 1つの局面において、本発明に係る評価方法は、上記検出工程が、Sachi-1タンパク質およびCVHタンパク質の両方の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましく、より詳細には、(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、および(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の両方の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましい。

[0042] 上述したタンパク質の発現は、それぞれに対する特異的抗体を用いて確認すればよい。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン(IgA、IgD、IgE、IgG、IgMおよびこれらのFabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fcフラグメント)を意味し、例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、抗イデオタイプ抗体およびヒト化抗体が挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、Sachi-1タンパク質、CVHタンパク質またはChiwiタンパク質に対する抗体は、それぞれのタンパク質に対する特異的抗体であればよく、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。本明細書を読んだ当業者は、これらのタンパク質のアミノ酸配列を把握し得るので、それぞれのリコンビナントタンパク質を容易に作製し、動物を免疫することにより、目的の抗体を作製し得る。

[0043] 抗体を用いた目的のタンパク質の検出には、当該分野において周知の種々の技術

を用いればよい。

[0044] 他の局面において、本発明に係る評価方法は、上記検出工程が、Sachi-1のmRNAおよびCVHのmRNAの安定的な発現を検出することによって行われてもよく、より詳細には、(a')配列番号1に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチド、および(b')配列番号5に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドの安定的な発現を検出することによって行われてもよい。

[0045] 本発明に係る評価方法において、上記検出工程はさらに、chiwiタンパク質の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましく、より詳細には、(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の安定的な発現を検出することによって行われることが好ましい。

[0046] なお、本発明に係る評価方法において、上記検出工程は、chiwiのmRNAの安定的な発現を検出することによって行われてもよく、より詳細には、(c')配列番号3に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドの安定的な発現を検出することによって行われてもよい。

[0047] 上述したmRNAの発現は、それぞれのmRNAの発現をRT-PCRなどの技術を用いて確認すればよい。mRNAの発現を確認するためには、配列番号1、3または5に示される塩基配列に基づいて、増幅用のオリゴヌクレオチド(プライマー)を設計して用いればよい。本明細書中で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチドが数個ないし数十個結合したものが意図され、「ポリヌクレオチド」と交換可能に使用される。オリゴヌクレオチドは、短いものはジヌクレオチド、トリヌクレオチドといわれ、長いものは30塩基または100塩基というように重合しているヌクレオチドの数で表される。オリゴヌクレオチドはより長いポリヌクレオチドのフラグメントとして生成されても、化学合成されてもよい。なお、プライマーとして用いる場合、オリゴヌクレオチドの長さは15~40塩基が好ましく、15~30塩基がより好ましく、20~30塩基がさらに好ましい。なお、プライマーの長さは、用途、条件などに応じて当業者が適宜設計し得る。

[0048] 配列番号1、3または5に示される塩基配列の相補配列からなるポリヌクレオチドを検出するためのオリゴヌクレオチドが、それぞれ配列番号1、3または5に示される塩

基配列の全長または一部分として合成され得る。得られたオリゴヌクレオチドは、次いで、放射性核種、酵素、ビオチン、蛍光試薬などで標識されて使用される。このようなオリゴヌクレオチドはまた、その5'側または3'側でタグ標識(タグ配列またはマーカ配列)をコードするポリヌクレオチドに融合されてもよい。また、配列番号2、4または6に示されるアミノ酸配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行ってもよい。

[0049] 本発明に係る評価方法において、上記検出工程は少なくとも10日にわたって行われることが好ましい。これにより、ES細胞が多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを確認することができる。

[0050] 従来のニワトリES細胞は長期継代培養(10日以上)すると多能性が消失することが知られている。ES細胞が多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているか否かは、上述したようなタンパク質またはmRNAが安定的に発現しているか否かによって知ることができる。すなわち、対象とする細胞の継代培養開始から10日間にわたって上述したようなタンパク質またはmRNAの発現を検出することにより、その細胞が多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているか否かを知ることができる。

[0051] 本明細書中において用いられる場合、「タンパク質が安定的に発現している」は「mRNAが安定的に発現している」を包含し、「タンパク質の安定的な発現」は「mRNAの安定的な発現」を包含する。

[0052] 本明細書中において用いられる場合、「(検出を)10日間にわたって行う」は、10日間の少なくとも最初と最後において目的の検出を行うことが意図され、検出が毎日行われても行われなくてもよい。よって、「(検出を)少なくとも10日にわたって行う」は、10日以上の上記の期間の少なくとも最初と最後において目的の検出を行うことが意図される。

[0053] [3. 遺伝子改変ニワトリ作出方法およびキット]

遺伝子改変ニワトリを作出するためには、ニワトリの胚性幹(ES)細胞を首尾よく継代培養しなければならない。ニワトリES様細胞について、従来の培養方法は、遺伝子改変ニワトリを作製するには大きな問題点を有する。具体的には、ES様細胞につ

いて、公知のいずれの培養方法を用いて培養しても全能性(生殖系列(精子または卵子)に分化する能力)を維持しているのは初代培養時のみであり、継代培養後は全能性を消失している。このことは、ES様細胞へ遺伝子を導入した後、継代培養を経て遺伝子改変ニワトリを作出することが不可能であることを示す。

[0054] 本発明は、ニワトリLIFタンパク質を備える遺伝子改変ニワトリを作出するためのキットを提供する。本発明に係るキットは、多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリES細胞を単独で備えても、必要に応じて他の試薬(例えば、培地、さらなる増殖因子など)をさらに備えていてもよい。

[0055] 遺伝子改変ニワトリを作出するためには、遺伝子を導入した後少なくとも4~5代の継代が可能なニワトリES様細胞を得る必要がある。また、ES細胞の遺伝子操作を行う際には、細胞分化を抑制することが重要である。これらに関して、ニワトリLIFタンパク質(rchLIF)は、マウスLIFタンパク質(rmLIF)よりも効果が明らかに高い。

[0056] 好ましい実施形態において、本発明に係るキットは、ニワトリLIFタンパク質(rchLIF)をさらに備えている。なお、ニワトリLIFタンパク質については、特許文献1および2を参照のこと。これらの文献は、本発明者らによる特許文献であり、本明細書中に参考として援用される。本実施形態において用いられるニワトリLIFタンパク質は、原核生物宿主にて作製したリコンビナント(原核型)でも真核生物宿主にて作製したリコンビナント(真核型)でもよいが、真核型であることがより好ましい。好ましい実施形態において、本発明に係るキットは、真核型ニワトリLIFタンパク質として精製タンパク質を備えていても、真核型ニワトリLIFタンパク質を安定に供給することができる細胞を備えていてもよい。このような細胞としては、受託番号[FERM BP-10199](受託機関名:独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名:日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、受託日:平成17年1月5日)によって示される細胞が好ましい。また、本実施形態に係るキットは、このような細胞を培養して得られた馴化培地を真核型ニワトリLIFタンパク質として備えていてもよい。

[0057] 上記細胞より分泌された成熟形態のrchLIFは、シグナルペプチドが切断されており、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる(コードする塩基配列は配列番号7に

示される塩基配列からなる)。上述した真核型ニワトリLIFタンパク質は、特定の糖鎖が付加されていることによって、物理化学的に安定でありかつ生物活性が高い。真核型ニワトリLIFタンパク質は、ハイマンノース型N結合、バイセクティングGlcNAc、シアル酸、または β 結合ガラクトースを糖鎖として有していることが好ましく、ハイマンノース型N結合の糖鎖、バイセクティングGlcNAc、およびシアル酸の側鎖を有していることがより好ましい。

[0058] 本発明に係る遺伝子改変ニワトリの作出方法は、上述したキットを用いる態様であれば特に限定されず、具体的には、上記ニワトリES細胞をニワトリLIFタンパク質とともに培養する工程を包含していればよい。

[0059] 本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能である。すなわち、請求項に示した範囲で適宜変更した技術的手段を組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[0060] また、本明細書中に列挙された学術論文および特許文献は、その全てが本明細書中に参考として援用される。

実施例

[0061] [1. ニワトリES細胞の樹立]

[1-1. ニワトリES細胞培養用培地]

以下に示す組成を有する培地(Chicken Embryonic Stem cell Medium (CESM))を用いて、ES細胞の培養および継代を行った。

•EmbryoMax DMEM (CHEMICON)	764 mL
•Knockout serum replacement (KSR, GIBCO)	200 mL
•chicken serum (GIBCO)	20 mL
•100 mM sodium pyruvate solution (和光)	1 mL
•MEM non-essential amino acid (GIBCO)	5 mL
•nucleoside stock solution	10 mL
(合計)	1000 mL

なお、nucleoside stock solutionとして、adenosineを80 mg、guanosineを85 mg、cytidineを73 mg、thymidineを24 mg、uridineを73 mg(試薬は全てSigma社)を100 mlの蒸

留水に溶解した後、ろ過滅菌して使用した。また、CESMに、使用直前に β -mercaptorthanol希釈液 (CESM培地1mLに7 μ Lの β -mercaptorthanolを添加した)を1 μ L/mLの濃度で添加した。また天然型ニワトリLIFタンパク質を20ng/mLの濃度で同時に添加した。天然型ニワトリLIFタンパク質は受託番号[FERM BP-10199]で示されるニワトリ胚線維芽細胞株(OU2)にニワトリLIF遺伝子を導入して産生させたタンパク質を精製した(特許文献2参照)。

[0062] [1-2. 支持細胞]

CEF細胞またはSTO細胞をコンフルエントになるまで10% FBS-DMEM中で培養した。CEF細胞には、公知の手順に従って、SPF受精卵を10日間孵卵した胚から調製したものをを用いた。また、STO細胞は、American Type Culture Collection (ATCC)から分譲を受けた。

[0063] コンフルエントになった細胞に、1mg/mLのマイトマイシンC-PBSを培地に添加(最終濃度10 μ g/mL)した。2時間培養した後に、細胞をPBSで3回洗浄し、新鮮な培地に交換した後に数時間～一晩培養した。

[0064] オートクレイブで溶解滅菌した0.1% gelatin(Sigma:typeA, G-2625)-DWを、予め24ウェルプレートに200 μ L添加して1時間静置しておいた。上記のように培養した細胞をPBSで3回洗浄した後に、細胞をtrypsin処理により回収し、細胞数を計測した。

[0065] 10% FBS-DMEM中に 1×10^5 cells/mLとなるように懸濁し、24ウェルプレートに 4×10^4 cells/well(2×10^4 cells/cm²)となるように、細胞を播種した。全ての細胞が接着した後に支持細胞として利用可能である(なお、播種5日後までに使用することが好ましい)。

[0066] [1-3. ニワトリES細胞]

ステージXの胚盤葉をリング回収した。回収した明域を、1mLのLIF添加CESMを加えたチューブに浮遊させ、ピペッティングによって細胞を分散させた。上述した支持細胞から培地を除去し、分散させた細胞を添加した。細胞を、3%O₂、5%CO₂インキュベーター内にて37°Cで培養した。培養した胚盤葉細胞は、2~3日後には100~500 μ m(直径)の円形のコロニーを形成した。図1には、培養3日後における胚

盤葉細胞のコロニーの形態を示した。このコロニーを回収し、上記方法で培養しておいた6ウェルプレート(または35mm培養ディッシュ)内の支持細胞上で3~5日間培養した。培地を毎日半量ずつ交換した。200~500 μ m(直径)に増大したコロニーを、同様に継代した。同様の方法で2~3日の間隔で継代培養した。図2には、継代培養後においても安定して増殖するニワトリES細胞を示した。(b)は(a)の強拡大像であり、細胞質中の核および明瞭な核小体が観察される。

[0067] [1-4. ニワトリES細胞の凍結保存]

6cm培養ディッシュで継代培養した2日目のES細胞に対して1mLの細胞凍結保存液(セルバンカー1;十慈フィールド株式会社)に、回収したコロニーを再浮遊させた。1. 5mL凍結用チューブに1mLの細胞浮遊凍結保存液を加え、凍結保存用コンテナ(NALGENE Cryo 1°C)に入れて-85°Cのディープフリーザーにて保存した(必要に応じて液体窒素や-150°Cフリーザーを利用する)。

[0068] 加温しておいた培地を添加して、凍結細胞を迅速に解凍した。解凍後は37°Cに加温しておいたES細胞培養用培地を用いて遠心分離することにより細胞を洗浄し、継代培養と同様の手順に従って細胞を培養した。なお、培養に使用する培地類を、予め37°Cに加温して使用した。

[0069] 図3には、樹立したニワトリES細胞(2系統)を凍結保存した後に再融解して培養した様子を示す。いずれの系統の細胞も樹立直後のコロニー形態を維持していることがわかる((a):樹立後1年以上経過、(b):樹立後半年以上経過)。

[0070] [2. ニワトリES細胞のマーカー]

[2-1. ニワトリES細胞の多能性維持に寄与する分子Sachi-1]

[I] Sachi-1のcDNAクローニング

ES細胞であるか否かを評価する従来法は、抗体によるSSEA-1の検出またはアルカリフォスファターゼ活性の検出によって行われている。近年、マウスES細胞や霊長類ES細胞では、ES細胞の多能性維持に関わるいくつかの分子が明らかになっている。例えば、マウスES細胞から発見されたNanogは、ES細胞がin vitroで多能性を維持するために必須であることが報告されており(非特許文献6および7参照)、このような遺伝子またはタンパク質の発現がES細胞の多能性維持についての新規

マーカーとして利用されている。しかし、ニワトリではこのような有用マーカーは見出されていない。

[0071] 本発明者らは独自の着眼点および解析によって、ニワトリES細胞の評価に有用な遺伝子を見出した。具体的には、ヒトおよびマウスのNanog遺伝子が、ヒトでは12番染色体、マウスでは6番染色体上でvon Willebrand factorに近接してコードされていることに着目し、ニワトリにおいてvon Willebrand factorがコードされている1番染色体のゲノム配列の中から哺乳類Nanog遺伝子と相同性を有するいくつかの遺伝子断片を見出し、これらの遺伝子断片配列に基づいてNanog様相同分子(Sachi-1)の全mRNA配列を決定した。

[0072] クローニングしたSachi-1 mRNAは、全長3130bp(予想されるCDSは930bp)であり、309アミノ酸をコードする(それぞれ、配列番号1および2)。推定のアミノ酸配列では、哺乳類Nanogの特徴とされているホメオドメインのC末側に存在するトリプトファン(W)リピートがSachi-1には見出されなかった(図4の(a)中矢印)。また、Sachi-1とNanogとの同一性を調べると、ヒトNanogおよびマウスNanogとはそれぞれ24.3%および24.6%しかなかった。また、ヒトNanogおよびマウスNanogの間に高度に保存されているホメオドメイン(図4の(a)中ボックス)が保存されていたことを除くと、その他の領域はSachi-1ではほとんど保存されていない。

[0073] しかし、ホメオドメインに限定すると、ヒトNanogおよびマウスNanogとそれぞれ65%の同一性を有することがわかった(図4の(b))。Blastp検索にて得られるホメオタンパク質のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成すると、Sachi-1はヒトNanogおよびマウスNanogと最も近縁であり、これらのホメオドメインのみの系統樹比較でも同様にSachi-1はヒトNanogおよびマウスNanogと最も近縁であった(示さず)。

[0074] [II] Sachi-1 mRNAの遺伝子発現

Sachi-1が、マウスNanogおよびヒトNanogと同様にES細胞の多能性マーカーに利用し得るか否かを調べるために、Sachi-1 mRNAの定量的発現解析を、real-time PCRを用いて行った。Sachi-1 mRNAの発現確認に用いたプライマーの塩基配列は、順方向プライマーが5'-ATGACAGCTTGCAGGCAGAAG-3'(配列番号9)であり、逆方向プライマーが5'-CGTACAGGAGAGCTCGAG

AACTG-3' (配列番号10)である。その結果、Sachi-1 mRNAは、ニワトリES細胞の基となる放卵直後の胚盤葉細胞でその発現が最も高く、次いで始原生殖細胞で高く発現していることがわかった。また、卵巣でわずかな発現が認められるものの、その他の体細胞では全く発現が認められなかった(図5)。これらの結果は、Sachi-1 mRNAが多能性を有した細胞または生殖系列細胞でのみ転写されていることを示している。

[0075] [2-2. 生殖系列細胞で発現する分子chiwi]

[I]chiwiのcDNAクローニング

ショウジョウバエの生殖系細胞からクローニングされたPiwi遺伝子は、ショウジョウバエにおいて生殖系列の細胞に特異的に発現する遺伝子であることが知られている。その主要な機能は現在も不明であるが、ヒトおよびマウスにおいてその相同遺伝子(ヒトではHiwi、マウスではMiwi)が次々にクローニングされ、ショウジョウバエと同様に生殖系列の細胞に特異的に発現する遺伝子であることが知られている。本発明者らは、ニワトリにPiwi相同遺伝子が存在することを見出し、初めてクローニングを行った。

[0076] クローニングしたchiwi cDNA(3363bp:配列番号3)は867アミノ酸をコードし(配列番号4)、アミノ酸レベルでの同一性がPiwiと65%、HiwiやMiwiと77%であることがわかった。また、Piwiファミリーのアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成したところ、chiwiはHiwiやMiwiに最も近縁であることがわかった(示さず)。なお、chiwiとPiwiファミリー分子とのアミノ酸レベルでの同一性および類似性を表1に示す。

[0077] [表1]

	Piwi	Hiwi	Miwi	Seawi	Hili	Mili
Chiwi identity (%)	65.1	77.4	77.4	46.5	38.9	39.4
Chiwi similarity (%)	90.9	96.0	95.9	82.5	78.8	81.7

[0078] [II]chiwi mRNAの遺伝子発現

chiwi mRNAが生殖系細胞に特異的に発現しているか否かを調べるために、ニ

ワトリの各種組織および細胞を用いた発現解析を、real-time PCRを用いて行った。chiwi mRNAの発現確認に用いたプライマーの塩基配列は、順方向プライマーが5'-CCAGGATTCACAAGTTCTATTC-3' (配列番号11)であり、逆方向プライマーが5'-GCACAGGCATCTCTAAATCTTC-3' (配列番号12)である。その結果、chiwi mRNAは、精巣で最も強く発現し、次いで始原生殖細胞(PGC)、胚盤葉細胞、卵巣で発現していることがわかった。このように、Piwi、Hiwi、Miwiと同様に、chiwiは、生殖系列の細胞に特異的に発現する遺伝子であることがわかった(図6)。

[0079] [3. 生殖細胞への分化能の評価]

[3-1. 抗体によるES細胞の評価]

生殖系列細胞で発現するVasa相同分子(CVH:配列番号5および6)が既に知られている。本発明者らは、Sachi-1、chiwi、CVHのリコンビナントタンパク質をそれぞれ作製した。具体的には、Sachi-1については、配列番号2に示されるアミノ酸配列全長からなるタンパク質、chiwiについては、配列番号4に示されるアミノ酸配列の第246~504位(配列番号15)からなるタンパク質、CVHについては、配列番号6に示されるアミノ酸配列の第116~464位(配列番号16)からなるタンパク質をそれぞれ構築した。これらを用いてウサギを免疫することにより各々のポリクローナル抗体を作製した。ポリクローナル抗体は、抗原結合カラムを用いて特異抗体のみを精製した。また、それぞれのリコンビナントタンパク質を用いてマウスを免疫し、細胞融合法により特異抗体産生性ハイブリドーマを樹立し、各々のタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。

[0080] これらの抗体の特異性を解析した。最初に、多能性を維持しかつ生殖細胞への分化能を保持した胚盤葉細胞(胚盤葉明域)を用いた蛍光抗体法を実施した(図7)。(a)は細胞の透過像を示し、(b)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(c)は抗CVH抗体による免疫染色像を示す。示すように、胚盤葉細胞は全てSachi-1陽性細胞(発現部位は核)であり、その中に少数のCVH陽性細胞が確認された。CVH陽性細胞はSachi-1陽性細胞でもあり、この細胞が始原生殖細胞(PGC)または生殖細胞へ分化する。この結果は既報の結果と一致している。すなわち、CVH陽性細胞

胞を含むようにES細胞を樹立しなければならないし、CVH陽性細胞がES細胞樹立過程に消失してはならない。

[0081] また、胚盤葉細胞(胚盤葉明域)を用いた蛍光抗体法によって、chiwi陽性細胞も胚盤葉明域細胞中に確認された(図8)。(a)は細胞の透過像を示し、(b)はDAPI染色像を示し、(c)は抗chiwi抗体による免疫染色像を示す。DAPIは全ての細胞の核を染色するので、chiwi陽性細胞は、CVH陽性細胞と同様に、胚盤葉細胞の全てにおいて観察されるわけではないことがわかる。

[0082] 同様に、蛍光抗体法によって始原生殖細胞(PGC)を評価したところ、PGCはSachi-1、CVH、chiwiの全てが陽性であることがわかった(図9)。(a)および(e)は細胞の透過像を示し、(b)および(f)はDAPI染色像を示し、(c)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(d)は抗chiwi抗体による免疫染色像を示し、(g)は抗CVH抗体による免疫染色像を示す。なお、(a)～(d)および(e)～(g)はそれぞれ同じ視野を観察した結果である。図中矢印は、それぞれの抗体に対して陽性である細胞を示す。試料には、血流中を循環するcPGCを用いているので、PGC以外に赤血球が混入している(図中、矢尻)。

[0083] 精巣切片を評価した結果を、図10に示す。Sachi-1陽性細胞(示さず)は検出されず、CVH陽性細胞(a)およびchiwi陽性細胞(b)が観察された。上段が低倍率で観察した像であり、下段が高倍率で観察した像である。いずれも黒い部分が陽性を示す。CVHは、精原細胞から精母細胞に至る減数分裂前の雄性生殖細胞において認められるが、精子細胞、精子には認められなかった。これに対して、chiwiは精子細胞以外の生殖細胞において認められる。

[0084] 多能性を有している細胞の全てが生殖細胞分化能を有しているわけではない。しかし、上記の特異抗体を用いた免疫染色法を用いてin vitroのタンパク質発現を評価すれば、ニワトリES細胞が多能性を有し、かつ生殖細胞分化能を保持していることを、簡便に調べることができる。本発明において樹立したニワトリES細胞の半数以上が多能性と生殖細胞分化能の両方を有している。図11には、樹立したニワトリES細胞のうちの異なる2系統についての蛍光抗体法の結果を示した。(a)は細胞の透過像を示し、(b)は抗Sachi-1抗体による免疫染色像を示し、(c)は抗chiwi抗体によ

る免疫染色像を示す。上述したように、遺伝子改変ニワトリの作出に利用可能なニワトリES細胞は、抗Sachi-1抗体強陽性(核のみ)であり、かつ抗CVH抗体強陽性(細胞質のみ)であることが必要条件であり、評価の信憑性をより高めるためには抗chiwi抗体弱陽性(細胞全体)の特徴を有していることがより好ましいといえる。

[0085] [3-2. 遺伝子発現によるES細胞の評価]

ニワトリES細胞が多能性を有し、かつ生殖細胞分化能を保持していることを、*in vitro*の遺伝子発現レベルで評価するためには、Sachi-1およびCVHのmRNAが同時に発現されていることが必要であり、評価の信憑性をより高めるためにはChiwiのmRNAが同時に発現されていることがより好ましい。この評価は、RT-PCRやreal-time PCRで簡便に調べることが可能である。CVH mRNAの発現確認に用いたプライマーの塩基配列は、順方向プライマーが5'-CGTGGCAGCCCTTTTGC-3' (配列番号13)であり、逆方向プライマーが5'-TTCAGAGCGTCCTTTGAGAATC-3' (配列番号14)である。樹立したニワトリES細胞の遺伝子発現を調べた結果を図12に示した。樹立したES細胞1および2は、多能性および生殖細胞分化能を有している胚盤葉細胞と同様の遺伝子発現様式を示している。しかし、樹立したES細胞の中には、細胞3のようにある遺伝子発現を欠失するものが認められた。このように、Sachi-1、chiwiおよびCVHを用いれば、樹立したニワトリES細胞の性状を遺伝子発現によって簡便に評価することができる。

[0086] [4. 遺伝子改変技術に利用可能なニワトリES細胞]

遺伝子改変ニワトリの作出に利用可能なニワトリES細胞は、(1)細胞が自然状態で長期境内培養可能とならなければならない、(2)細胞はコロニーを形成し、マウスや霊長類のES細胞と同様に、細胞質に占める核の割合が高くかつ明瞭な核小体を保持していることが必要である。また、樹立されたニワトリES細胞は、(3)凍結保存した細胞の融解後に再度培養しても、多能性および生殖細胞分化能を維持しなければならない、(4)遺伝子改変後も多能性および生殖細胞分化能を維持しなければならない。

[0087] 上記結果により、これらの条件を満たすニワトリES細胞を得るためには、以下のような条件が好ましいと結論付けられた：(I)ニワトリ胚の発生段階ステージXまでの細胞を用いる；(II)胚盤葉細胞(ステージX)を用いる場合には、生殖細胞の前駆細胞を

含む明域の細胞のみを用いる; (III) 生化学的、遺伝子発現的な特徴は、従来報告されていたSSEA-1発現やアルカリフォスファターゼ活性の有無とは無関係であり、Sachi-1およびCVHのmRNAが同時に発現されていること(好ましくは、chiwiのmRNAも同時に発現されていること)、または、これらの遺伝子産物(タンパク質)が所定の細胞内器官に検出されることが必要である。

[0088] 多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有しているニワトリES細胞を得ることができ、遺伝子改変ニワトリ技術に応用し得る。また、本発明を用いれば、遺伝子改変ニワトリ技術に応用し得る細胞であるか否かを評価することができる。

[0089] 発明の詳細な説明の項においてなされた具体的な実施形態または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する請求の範囲内において、いろいろと変更して実施することができるものである。

[0090] 樹立したニワトリES細胞は遺伝子導入を行った後も多能性および生殖細胞分化能を維持しているのか否かを確認した。樹立したニワトリES細胞にEGFPを導入し、0.025% trypsin、1mM EGTA-PBSを用いてこの細胞を37°Cで5分間処理することによりコロニーを単一細胞に分散させた。上述したニワトリES細胞の培養用培地に、終濃度10mMとなるようにY-27632(ROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ)阻害剤)を添加した。この培養用培地中に、単一細胞に分散したES細胞を50 cells/10mLとなるように懸濁した。支持細胞(STO)を予め培養しておいた96ウエルプレート上に、懸濁した細胞を、ウエル当たり100μLずつ播種した。これにより、理論上、0.5 cell/wellとなり、必ずウエルに1個の細胞が入る箇所ができる。培地交換を行うことにより培養を継続し、1ウエルに1つのコロニーが形成されるものを選抜した。継代方法は上述した手順に従った。安定に増殖した細胞に対して抗CVH抗体による染色を行い、EGFPを発現しているコロニー、CVHを発現しているコロニーを選抜した。

[0091] このように、遺伝子導入後にも単一細胞に分散し得るということは、ニワトリES細胞の株化が可能であることを示す。また、図13の(a)~(b)に示すように、導入したEGFPがコロニー全体で発現しているニワトリES細胞を得ることができた。また、図13の(

c)に示すように、それらのほとんどが生殖細胞分化能を示すCVH陽性細胞であることがわかる。これらの結果は、本発明にかかる技術が、生殖系列キメラニワトリの作出を高頻度を実現させることを示すだけでなく、高度な遺伝子改変技術(ノックイン/ノックアウト)へ応用することも可能であることを示す。

[0092] 上記のニワトリES細胞株(EGFP導入後でありかつCVH陽性の細胞)をレシピエント胚へ移植し、孵卵2~3日後に胚血液を回収した。この時期の胚血液中には一時的に始原生殖細胞(PGC)が胚血流中を循環しているが、この時期のPGCは赤血球と形態が異なるため光学顕微鏡の明視野で容易に区別することができる。また、ES細胞株由来のPGCはレシピエント胚由来のPGCとEGFPの有無に従って識別し得る。

[0093] 図14において矢印で示すように、PGCはその細胞内に多くの顆粒を有しており、胚赤血球よりも大型の細胞として顕微鏡下で観察される(図14の(a)-(b)左図)。この視野を、蛍光顕微鏡で観察すると、この視野に存在するPGCはEGFP陽性であり、移植したCVH陽性のEGFP導入ES細胞株から派生したPGCであることがわかる(図14の(a)-(b)右図)。この結果は、作出したES細胞株が生殖細胞に分化することを早期に確認することが可能であることを示すとともに、作出したES細胞株が確実に生殖細胞へ分化することを示している。

[0094] 同様に、ニワトリES細胞株(EGFP導入後でありかつCVH陽性の細胞)をレシピエント胚へ移植し、孵卵して得られたキメラ体(10日胚以降、一部孵化した雛)から生殖巣を摘出した。摘出した生殖巣からゲノムDNA(30検体)を調製し、このゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行ってEGFPを検出した。使用したプライマー配列は、順方向プライマーが5'-gtaaacggccacaagttcag-3'(EGFP-SF:配列番号17)であり、逆方向プライマーが5'-cttgtacagctcgtccatgc-3'(EGFP-SR:配列番号18)である。結果を図15に示す。

[0095] 図中、Mはマーカーを示し、1は、EGFP遺伝子を鋳型にしてPCRを行った陽性コントロールを示し、2は、鋳型なしでPCRを行った陰性コントロール、3-32は、摘出した生殖巣から調製したゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行った結果を示す。

[0096] 図15に示すように、30検体中14検体の生殖巣においてEGFP遺伝子が検出され

、EGFP導入後でありかつCVH陽性の細胞が高頻度(約47%)で生殖巣にて分化していることが確認された。

[0097] このように選抜したニワトリES細胞をレシピエント胚へ移植し、そのレシピエントを孵化させることによって、第一世代のキメラニワトリを誕生させた。図16は、樹立/評価したニワトリES細胞が生殖系列に寄与することを実証した図である。図16の(a)はES細胞を移植することによって誕生した第一世代キメラニワトリ(G0)の雛(上段)および性成熟した個体(下段)を示す。移植したES細胞は、黄斑プリマスロック種(黒色羽毛)由来であるので、第一世代のキメラニワトリは、(a)に示したように、黒色および白色が混ざり合った羽毛として識別することができる。さらに、上述した第一世代のキメラニワトリ(G0)を性成熟させることによって、約3%の確率で黒色羽毛の第二世代のニワトリ(G1)を確実に誕生させることができた。図16の(b)は(a)に示したニワトリから人工授精により誕生したG1世代の雛(黒色羽毛)を示す。

[0098] ニワトリの羽毛色遺伝子は、白色が優性であるため、黒色羽毛ニワトリ由来ES細胞が生殖細胞に分化しない限り、黒色羽毛のニワトリをG1として誕生させることができない。例えば、G0が雄の場合、G0のニワトリの精子を黒色羽毛の雌に人工授精する。また、G0が雌の場合、雄の黒色羽毛のニワトリの精子を人工授精する。いずれの場合も黒色羽毛ニワトリ由来ES細胞が生殖細胞に分化しない限り、G1では黒色羽毛のニワトリを誕生させることができない。すなわち、上記の手法によって黒色羽毛のG1世代が誕生することは、本発明に係るニワトリES細胞が生殖細胞に分化できることの最終証明となり、得られたG1世代の個体がES細胞由来の遺伝子を受け継いだ個体であることを実証しているということを、当業者は容易に理解する。

[0099] このように、本発明に係るニワトリES細胞は、確実に生殖細胞分化能を有しており、遺伝子改変ニワトリの作出に好適であることが実証された。また、このようなニワトリES細胞を評価する、本発明に係る評価方法は、遺伝子改変ニワトリの作出に貢献する、優れた評価方法であることが実証された。

産業上の利用可能性

[0100] 生殖細胞分化能を有しているニワトリ胚性幹細胞株を樹立したことによって、遺伝子改変ニワトリの作出を現実的にした。すなわち、本発明を用いれば、所望の遺伝子

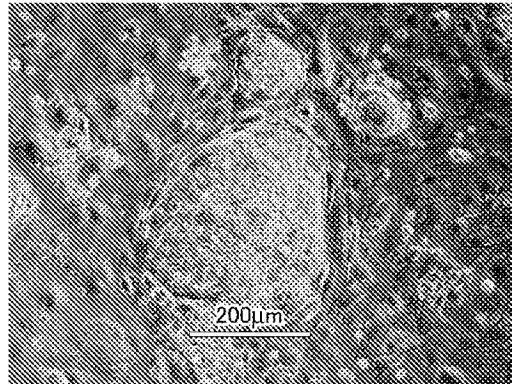
改変ニワトリを容易に作出することができる。得られた遺伝子改変ニワトリは、動物工場として種々の局面において有用に活用され得る。

請求の範囲

- [1] 多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを特徴とするニワトリ胚性幹細胞。
- [2] 請求の範囲1に記載のニワトリ胚性幹細胞であって、
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、および
(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
が安定的に発現していることを特徴とするニワトリ胚性幹細胞。
- [3] 請求の範囲2に記載のニワトリ胚性幹細胞であって、
(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
が安定的にさらに発現していることを特徴とするニワトリ胚性幹細胞。
- [4] 多分化能および生殖細胞分化能を安定的に有していることを検出する検出工程を
包含することを特徴とするニワトリ胚性幹細胞を評価する方法。
- [5] 前記検出工程が少なくとも10日にわたって行われることを特徴とする請求の範囲4
に記載の方法。
- [6] 請求の範囲4に記載の方法であって、
前記検出工程が、
(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、および
(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
の安定的な発現を検出することによって行われることを特徴とする方法。
- [7] 請求の範囲6に記載の方法であって、
前記検出工程が、
(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
の安定的な発現をさらに検出することによって行われることを特徴とする方法。
- [8] 請求の範囲1に記載のニワトリ胚性幹細胞が備えられていることを特徴とする遺伝
子改変ニワトリを作出するためのキット。
- [9] ニワトリLIFタンパク質がさらに備えられていることを特徴とする請求の範囲8に記載
のキット。
- [10] 請求の範囲1に記載のニワトリ胚性幹細胞をニワトリLIFタンパク質とともに培養する

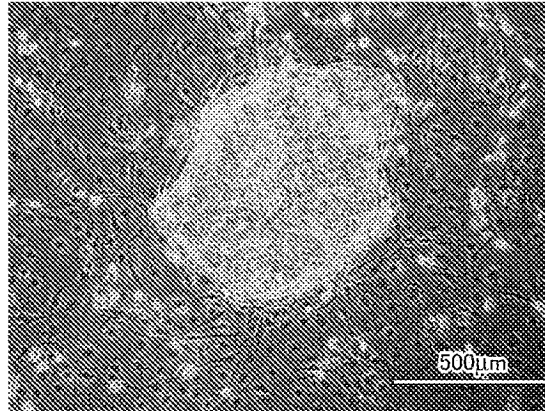
工程を包含することを特徴とする遺伝子改変ニワトリの作出方法。

[図1]

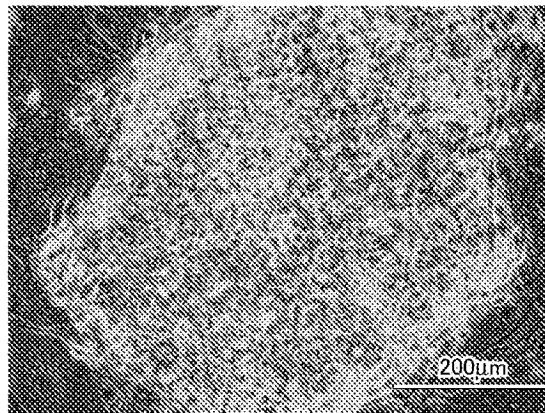


[図2]

(a)

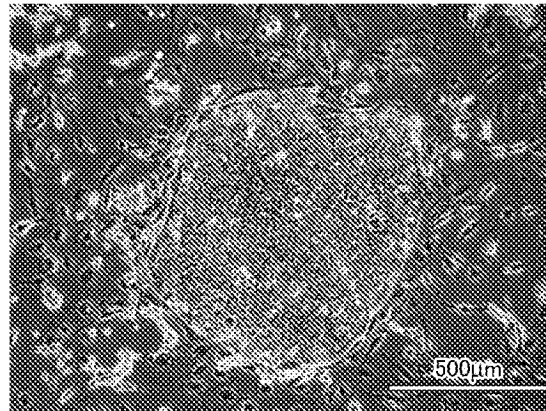


(b)

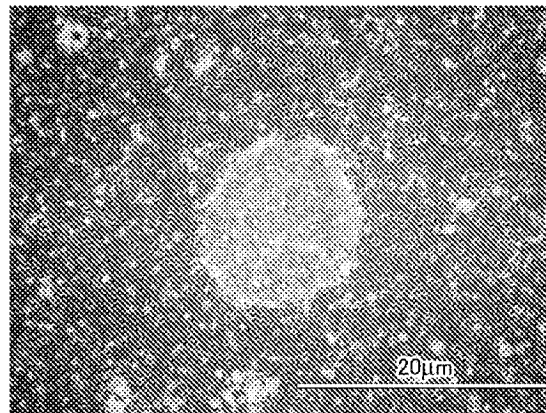


[図3]

(a)



(b)



[図4]

(a)

```

Human   MSVDPACPQSLP-CFEASDCKESSMPVICGPEENYPQLQMS-SAEMPHTETVSPLPSSM 58
Mouse   MSVGLPGPHSLPSSEEASNSGNASSMPAVFHP-ENYSCLQGS-ATEMLCTEAASPRPSSE 58
Chicken MSAHLAMPSYGSVRCGHYYWPSPGSMDSASAAEAPAADLSLTTEQKTPCHPDASPSSSS 60
      ** . * . . . . * . . . * : : . ** **

Human   DLLIQDSPDSSTSPKQKQPTS-AENSVAKKEDKVPVKKQKTRTVFSSTQLCVLNDRFQRQ 117
Mouse   DLPLOQSPDSSTSPKQKLSSEADKGPPEEEENKVLARKQKMRVFSQAQLCALKDRFQKQ 118
Chicken GTLIQYTPDSATSPTADHPSHRPTFQKVKDKGESGTRKAKSRTAFSQEQLQTLHQRFQSQ 120
      . : * : *** : *** . . : . . : : : : . : * * ** : ** * * : *** *

Human   KYLSLQQMQELSNILNLSYKQVKTWFQNRQMKSKRWQK-NNWPKNNGVTQKASAP-TYP 175
Mouse   KYLSLQQMQELSSILNLSYKQVKTWFQNRVKCKRWQK-NQWLKTSNGLIQKGSAPVEYP 177
Chicken KYLSPHQIRELAAALGLTYKQVKTWFQNRQMKFKRCQKESQWVDKGIYLPQNGFHOAAYL 180
      **** : * : *** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

      ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
Human   SLYSSYHQGLVNP TGNLPMWSNQTWNNSTWS-----NQTONIQSWSNHSWNTQTWCTQS 230
Mouse   SIHCSYPQGYLVNASGSLSMWGSQTWTNPTWSSQTWTNPTWNNQTWTNPTWSSQAWTAQS 237
Chicken DMTPTFHQGFVAVANRNLQAVTSAHQAYSSGQ-----TYGNGQGLYPFMAVEDEGFFG 233
      . : : * * * . . * . . . . * . . . : . .

      ↓ ↓
Human   WNNQAWN-SPFYNCGEESLQSCMQFQPNSPASDLEAALEAAGEGLNVIQQTTRYFSTPQT 289
Mouse   WNGQPWNAAPLHNFGEDEFLOPYVQLQQNFASDLEVNLEAT-----RESHAHFSTPQA 290
Chicken KGGTSCNTQQAMGLLSQQMNFYHGYSTNVVDYDSLQAEDTYS---FQSTSDSITQFSSSPV 290
      . . . * . . : : : . * . . * : : . . : : * : . .

Human   MDLFLNYSMMNPEDV--- 305
Mouse   LELFLNYSVTP-PGEI--- 305
Chicken RHQYQAPWHTLGTQNGYET 309
      . : . . . :
    
```

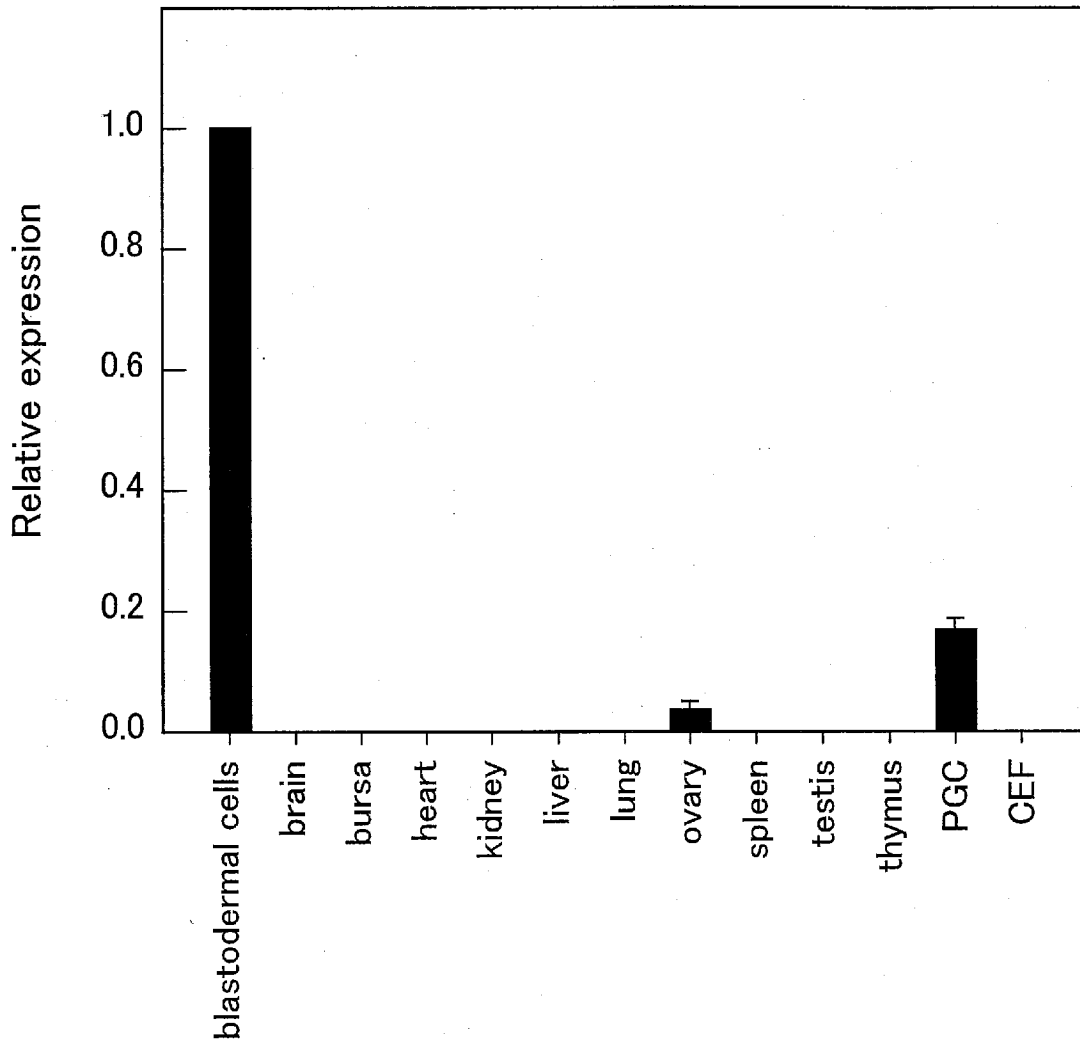
(b)

	Chicken	Human	Mouse
Chicken	/	24.3 (65.0)	24.6 (65.0)
Human	65.1 (90.0)	/	59.1 (85.0)
Mouse	63.9 (90.0)	89.9 (96.7)	/

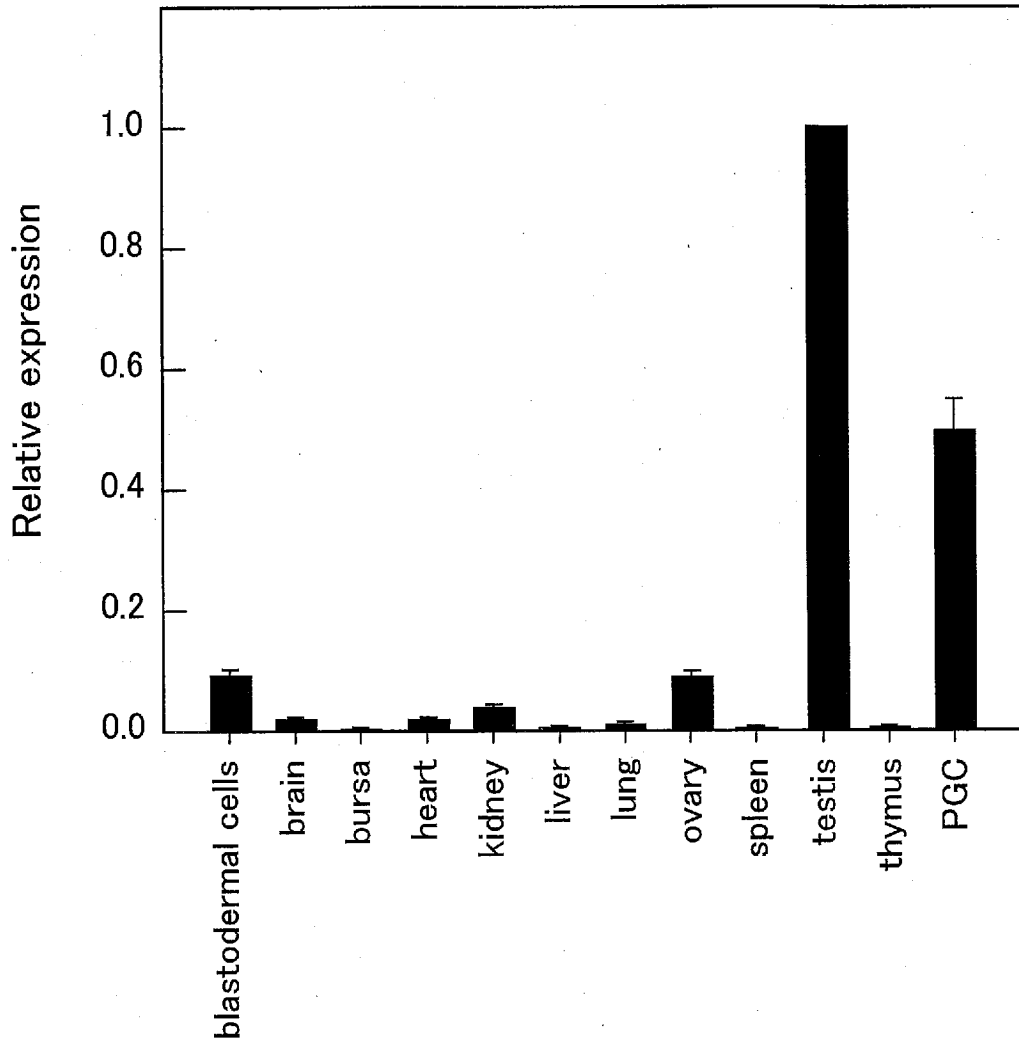
similarity (%)

identity (%)

[図5]

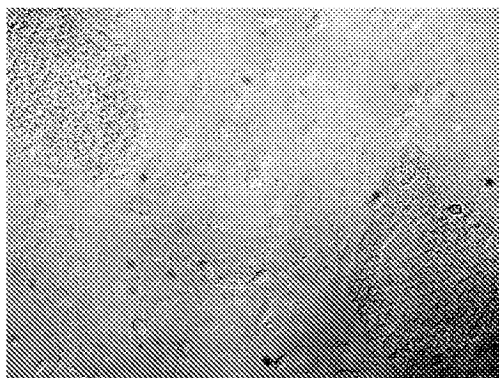


[図6]

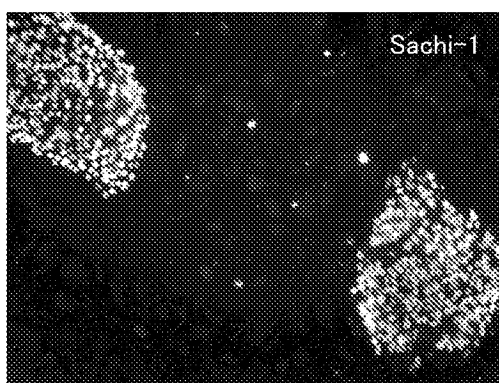


[図7]

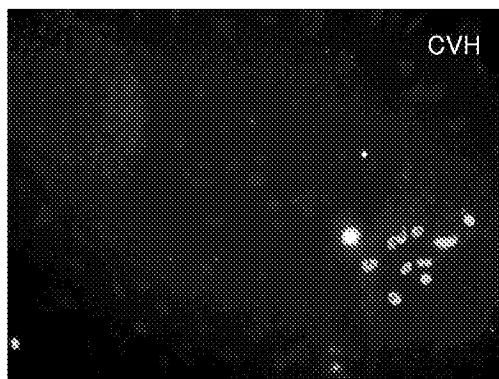
(a)



(b)

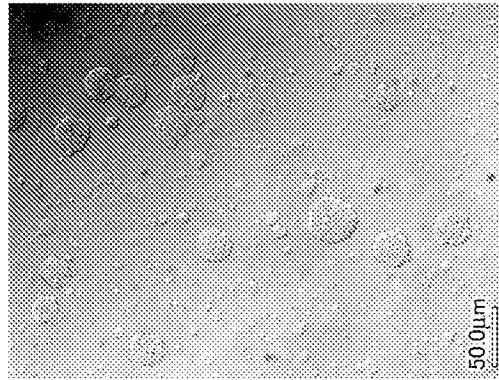


(c)

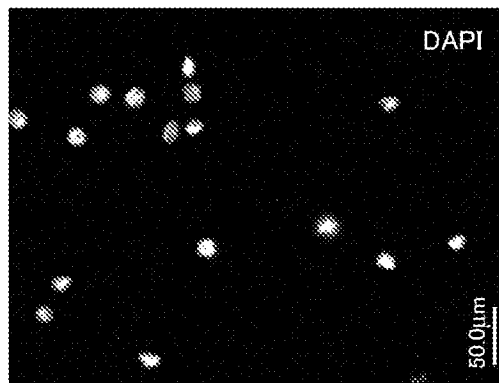


[図8]

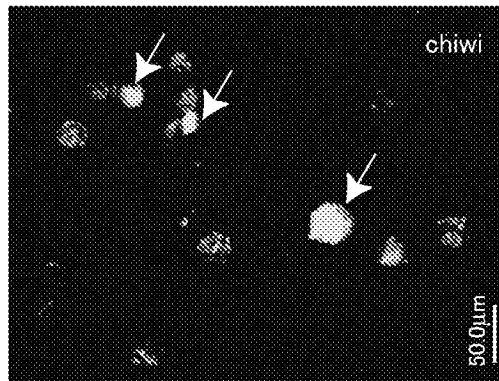
(a)



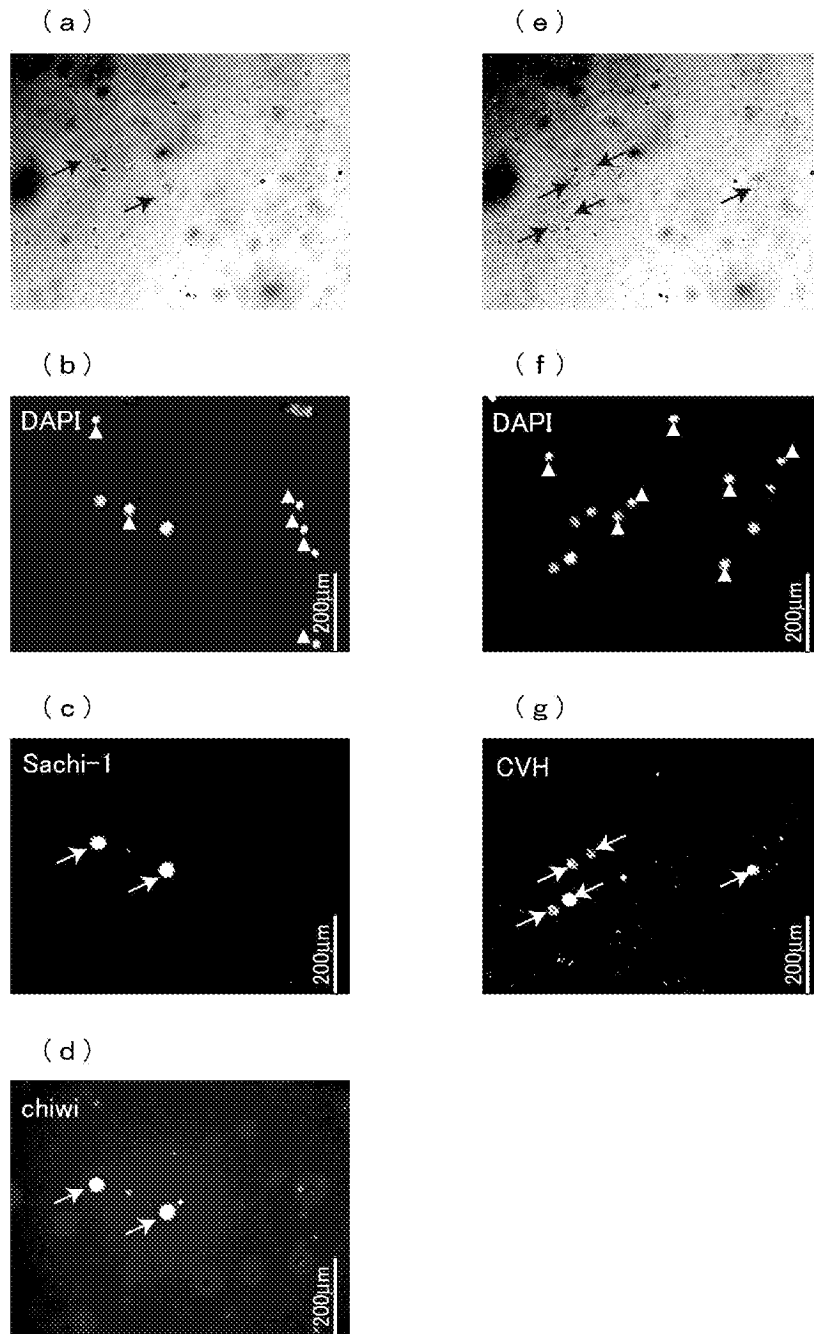
(b)



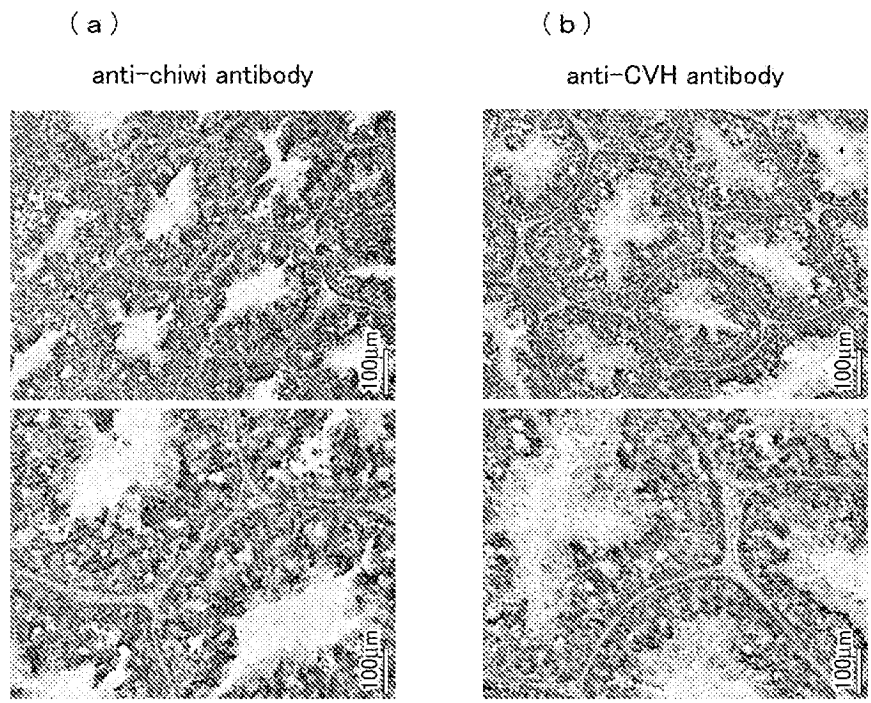
(c)



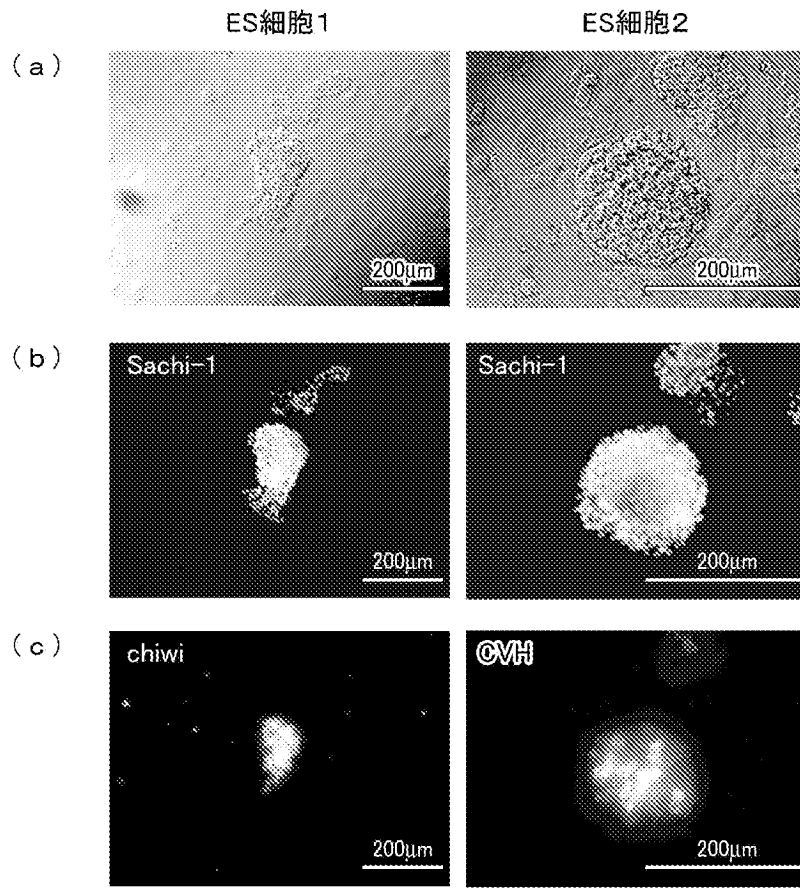
[図9]



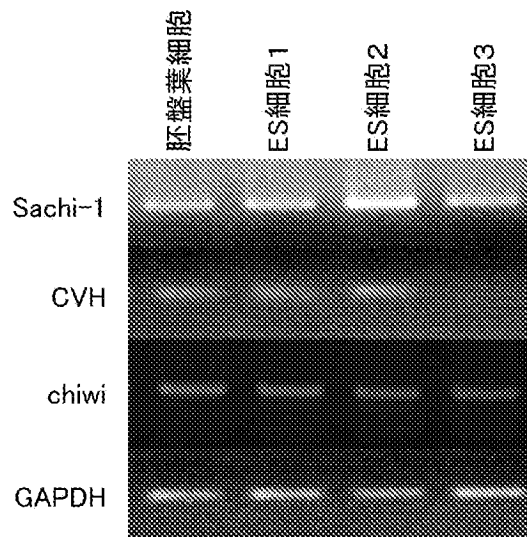
[図10]



[図11]

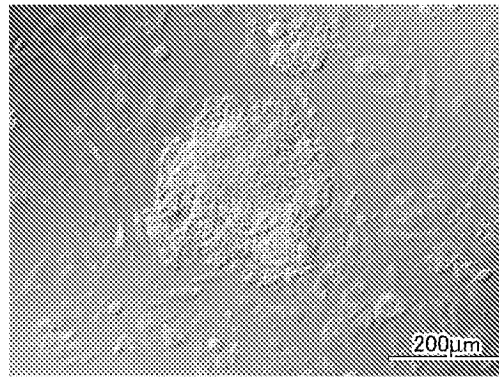


[図12]

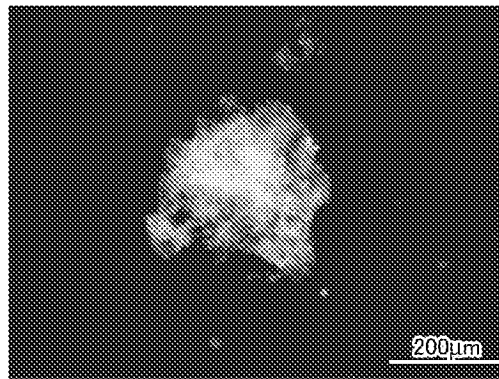


[図13]

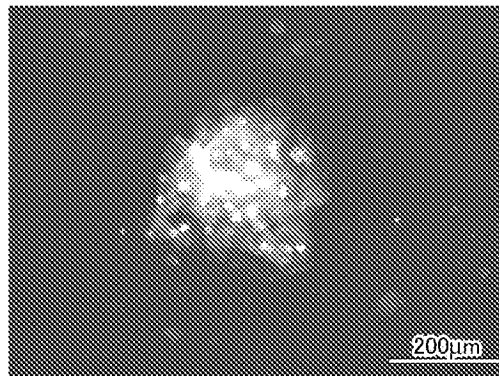
(a)



(b)

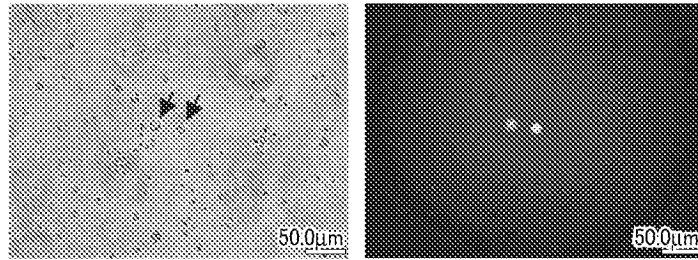


(c)

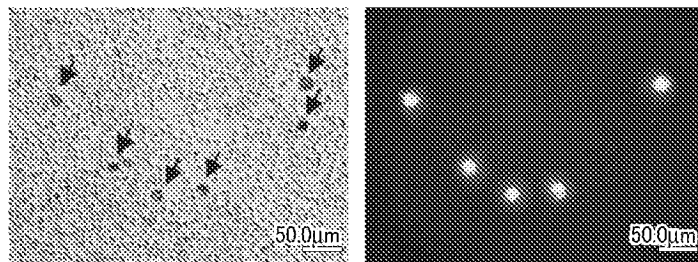


[図14]

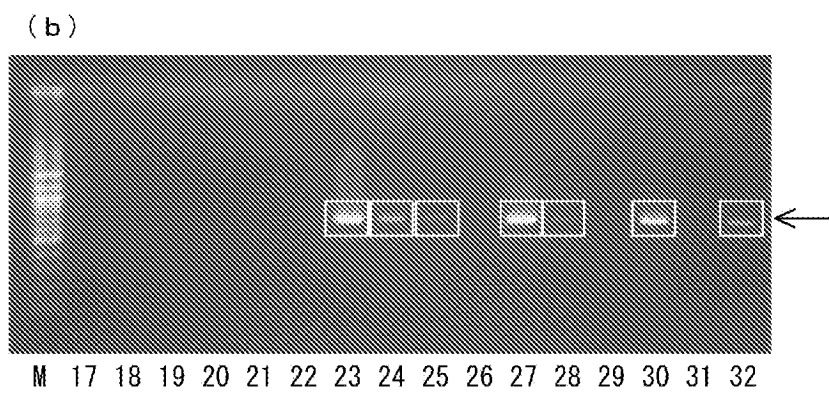
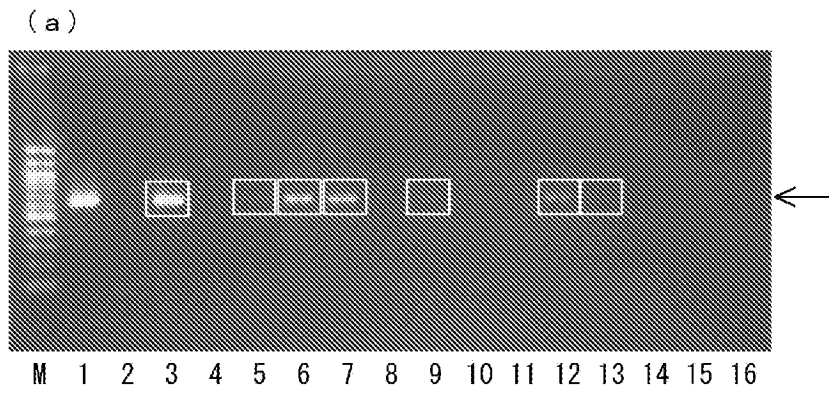
(a)



(b)

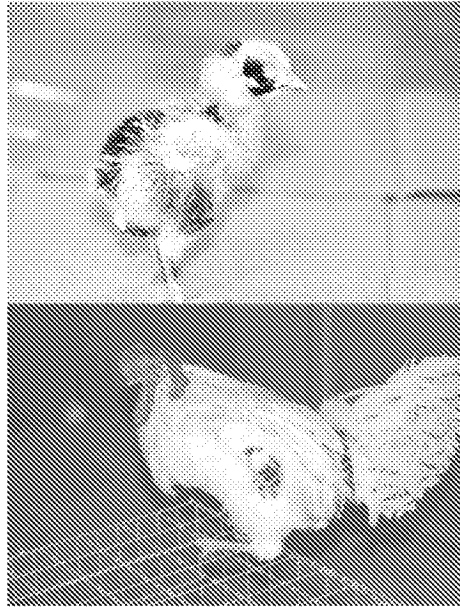


[図15]



[図16]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, A01K67/027, C12N1/00-7/08, C12Q1/00-1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2004/065558 A2 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY), 05 August, 2004 (05.08.04), Page 48; Seq, No.1 & US 2006/0095980 A1 & EP 1590435 A2 & CA 2513744 A & CN 1761756 A	1-3/4-10
Y	Hiroyuki HORIUCHI et al., "Niwatori ni Okeru Kotai Engineering to Transgenic Technology", Food & Food Ingredients J.Jpn, 2006, Vol.211, No.11, pages 948 to 955	1-10
Y	WO 2007/010287 A1 (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM), 25 January, 2007 (25.01.07), Page 44; Fig. 9 & GB 515006 D	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 May, 2008 (23.05.08)

Date of mailing of the international search report
03 June, 2008 (03.06.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TSUNEKAWA, N., et al., "Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells" Development, 2000, Vol.127, p.2741-2750	1-10
Y	TERAMURA, T., et al., "Derivation of presumptive gonocytes in vitro from primate embryonic stem cells" Reproduction Fer. Develop. 2007.01.05, Vol.19, No.1, p.231	1-10
Y	WO 00/32039 A1 (DUKE UNIVERSITY), 08 June, 2000 (08.06.00), Abstract; Fig. 2 & US 2002/0076797 A1 & US 2004/0248175 A1 & EP 1170992 A & AU 1750800 A	1-10
Y	JP 2003-9869 A (President of Hiroshima University), 14 January, 2003 (14.01.03), Full text; sequence Nos. 1, 2 & US 2003/0056241 A1 & US 2005/0186626 A1 & EP 1264889 A1 & DE 60120370 T & AT 329029 T	1-10
P,X	Masaki NISHIMOTO et al., "Shinki Niwatori ES Saibokabugun no Tanosei Hyoka", Dai 80 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Dai 30 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Godo Taikai Koen Yoshishu, 2007.12, 2P-1182	1-10
A	Hiroyuki HORIUCHI et al., "Transgenic Niwatori no Sakushutsu ni Mukete", BRAIN techno news, 15 March, 2002 (15.03.02), Vol.90, Sosetsu 1-4	1-10

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i</p>		
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01K67/027, C12N1/00-7/08, C12Q1/00-1/68</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 2004/065558 A2 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 2004. 08. 05, p. 48, Seq, No. 1 & US 2006/0095980 A1 & EP 1590435 A2 & CA 2513744 A & CN 1761756 A	1-3/4-10
Y	堀内浩幸 他, “ニワトリにおける抗体エンジニアリングとトランスジェニックテクノロジー” Food & Food Ingredients J. Jpn, 2006, Vol. 211, No. 11, p. 948-955	1-10
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	23. 05. 2008	国際調査報告の発送日
		03. 06. 2008
国際調査機関の名称及びびあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 水落 登希子	4B 3541
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2007/010287 A1 (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 2007.01.25, p.44, Figure 9 & GB 515006 D	1-10
Y	TSUNEKAWA, N., et al., " Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells" Development, 2000, Vol.127, p.2741-2750	1-10
Y	TERAMURA, T., et al., " Derivation of presumptive gonocytes in vitro from primate embryonic stem cells" Reproduction Fer. Develop. 2007.01.05, Vol.19, No.1, p.231	1-10
Y	WO 00/32039 A1 (DUKE UNIVERSITY) 2000.06.08, Abstract, Fig.2 & US 2002/0076797 A1 & US 2004/0248175 A1 & EP 1170992 A & AU 1750800 A	1-10
Y	JP 2003-9869 A (広島大学長) 2003.01.14, 全文、配列番号1, 2 & US 2003/0056241 A1 & US 2005/0186626 A1 & EP 1264889 A1 & DE 60120370 T & AT 329029 T	1-10
P X	西本真樹 他, "新規ニワトリES細胞株群の多能性評価" 第80回日本生化学会大会 第30回日本分子生物学会年会合同大 会講演要旨集, 2007.12, 2P-1182	1-10
A	堀内浩幸 他, "トランスジェニック・ニワトリの作出に向けて" ブレインテクノニュース, 2002.03.15, Vol.90, 総説1-4	1-10