

BioResource Now!

Issue Number 12 (9) 2016

国内外のバイオリソースを巡る様々な問題や取り組みについて、毎月ホットな話題をこのニュースレターで紹介していきます。

研究と
バイオリソース
No.30

佐々木えりか (公益財団法人 実験動物中央研究所)

コモンマーモセットのゲノム編集

P1-2

じょうほう通信:
No.109

バイオ系ツールはどうやって開発されているの?

P2

NewsLetter に掲載されているあらゆる内容の無断転載・複製を禁じます。すべての内容は日本の著作権法、及び国際条約により保護されています。

ニュースレターのダウンロード先

URL: www.shigen.nig.ac.jp/shigen/news/

研究とバイオリソース (NO.30)

コモンマーモセットのゲノム編集

佐々木 えりか

公益財団法人 実験動物中央研究所

マーモセット研究部 部長

慶應大学 先端研究センター 特任教授

はじめに

今を遡ること 7 年前の 2009 年、小型霊長類のコモンマーモセット (以下マーモセット) の胚にレンチウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、緑色に光るトランスジェニックマーモセットを作製したことを本誌に寄稿させていただいた [1]。遺伝子改変マウスでは、標的遺伝子ノックアウト技術により有用なモデルが最も多く作製されており、マーモセットでも標的遺伝子ノックアウトモデルの作製が必要と考えられた。しかしながら標的遺伝子ノックアウト技術によるモデル作製には、生殖細胞系列キメラが作製可能な胚性幹 (ES) 細胞が必要であるが、マウス、ラット以外の動物では、キメラ形成能を持つ ES 細胞が樹立されていないため、標的遺伝子ノックアウトモデルの作製ができなかった。それがゲノム編集技術の登場によって、キメラ形成能を持つ ES 細胞がない生物でも標的遺伝子ノックアウトモデルの作製が可能になった。

ゲノム編集による免疫不全マーモセットの開発

マーモセットの実験動物としての有用性と特徴については、前稿をご参照いただきたい [1]。我々の研究室では、遺伝子改変技術を用いたヒト疾患モデルマーモセット作製技術の開発を行っており、トランスジェニックマーモセット作製技術を確認した後、標的遺伝子ノックアウトマーモセット作製に向けて様々な研究を継続していたが、なかなか結果に直結する成果が得られていなかった。そこで、ゲノム編集技術が哺乳類の受精卵でも有用である事が報告された直後より、マーモセット受精卵のゲノム編集により標的遺伝子ノックアウトモデル作製に向けた検討を開始した。

我々は、マーモセットゲノム編集技術の開発のため Interleukin 2 receptor common γ chain (IL2rg) 遺伝子をターゲット遺伝子として選択した。

その理由として、IL2rg 遺伝子は、X 染色体上にあり、片アレルのみのノックアウトでもオスでは免疫不全となること、免疫不全マーモセットが作製できれば、再生医療、血液学、腫瘍学、移植免疫学など様々な研究領域のモデルとなり得ること、出生時から免疫不全となるためゲノム編集がマーモセットで有効かどうかは早期に明らかにできるからである。

ライフサイクルが長い霊長類では、ファウンダー世代で目的の表現型を示し、改変遺伝子が次世代に伝達することが望まれる。そこで我々は、単に標的遺伝子をノックアウトするだけではなく、改変遺伝子が個体の体内で均一になるようにモザイク状態がない状態の個体を作製することを目指した。産まれた個体の改変遺伝子がモザイクとなって野生型の遺伝子が残存すると目的の表現型がファウンダー世代*1では示されなくなる可能性が高いためである。

また霊長類の動物実験では、より動物生命倫理に配慮する必要がある、できるだけ目的の遺伝子改変に失敗した動物を作製しないことが重要な課題となる。

そこで我々は、繊維芽細胞を用いて最も切断効率の良い人工ヌクレアーゼを選択し、更にマーモセット受精卵を用いて in vitro でゲノム編集によるノックアウト動物の獲得率および得られる個体のモザイク率を予想する方法を確立した (図 1)。この方法で予想される効率率は、実際の個体作出率、個体のモザイク率とほぼ相関する、もしくは実際の成功率の方が若干高い事が示された。また、現在このスクリーニング法により、別の遺伝子のノックアウトにも成功していることから、本方法は霊長類のゲノム編集を行う際に有用であると考えている。

次ページへ続く

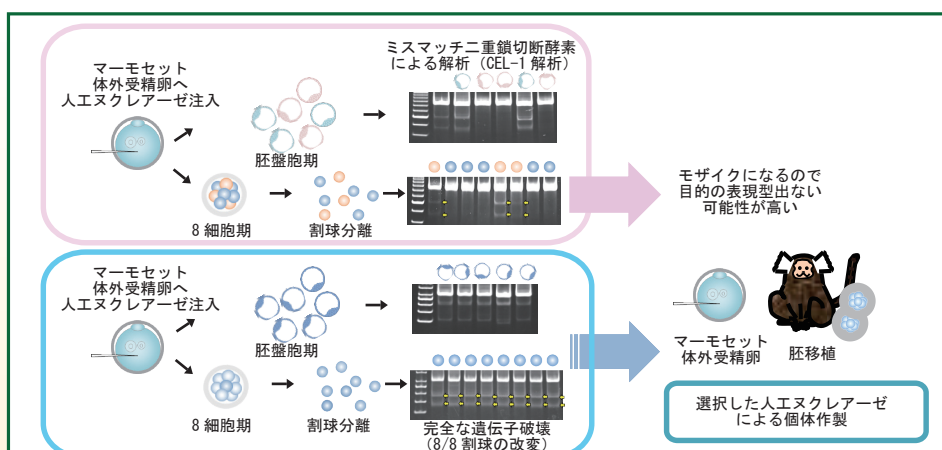


図 1. 標的遺伝子ノックアウトマーモセットの作製における人工ヌクレアーゼの評価法

標的遺伝子ノックアウトマーモセットの作製に、最も重要なのは in vitro におけるモザイクになりにくい人工ヌクレアーゼをスクリーニングすることである。上段: マーモセットの受精卵へ人工ヌクレアーゼを導入して胚盤期まで培養し、遺伝子改変を調べると 5 個中 2 個に遺伝子改変が認められており、ノックアウト個体の作出効率率は、40%と予想される (上)。また同様に人工ヌクレアーゼを導入した受精卵を 8 細胞期まで培養し、分割を 1 つずつ分離し、それぞれについて CEL-1 解析を行なうと、8 分割球中 3 分割球に改変が認められ、モザイクとなっていることが予想される (下)。下段: 上段と同様の解析により、全ての受精卵で改変が認められ (上)、また全ての分割球で標的遺伝子の改変が認められ、モザイクにならないことが予想される (下)。このような人工ヌクレアーゼを選択することにより、ファウンダー世代で目的の表現型を示す標的遺伝子ノックアウト個体が得られると期待される。

*1 ファウンダー世代: 受精卵に遺伝子を注入し、仮親に導入して生まれた子供の世代。F1 はファウンダー個体から生まれた子供。

今回我々は、IL2rg 遺伝子をターゲットとした人工ヌクレアーゼである eHiFi-ZFN および platinum TALEN を 1 細胞期のマーマーモセット体外受精卵に注入することにより、個体の全ての細胞が同一の改変遺伝子配列を持つ IL2rg 遺伝子ノックアウトマーマーモセットを作製した(図 2) [2]。これらの個体の臍帯血では、T 細胞と NK 細胞が欠失していること、一方 B 細胞数は正常でありヒトの X-SCID*2 の患者と類似していること(マウスでは B 細胞も著減する)、死亡した個体の剖検の結果、胸腺が認められないことから免疫不全マーマーモセットであることが示された。当初、これらの個体の長期飼育は困難であったが、帝王切開時の麻酔、生後直後の酸素濃度、などの改善により 2 年以上の長期飼育が可能となった。

性成熟に至ったオスの個体の精子を調べたところ、精子でも体細胞と同一の改変された遺伝子配列が認められ、ライン化の可能性も示された。

一方で、成体になったこれらの個体では、出生時には認められなかった T 細胞が出現し、B 細胞が欠失する事が明らかになった。これら増加した T 細胞では、IL2rg が機能しないことは確認されており、生後の T 細胞の増殖には IL2rg が関与しないシグナル伝達機構の存在が示唆されている。同様の現象は、一部のヒトの X-SCID の患者でも報告されている。生後の T 細胞の増殖の新たなシグナル伝達機構の解明は、今後の興味深い研究テーマであり、IL2rg ノックアウトマーマーモセットがモデルとして有用となると考えている。■

*2 X-SCID : X 染色体連鎖重症複合免疫不全症



図 2. ゲノム編集によって作製された IL2rg ノックアウトマーマーモセット
IL2rg ノックアウトによって免疫不全マーマーモセットが作製された。飼育に關する様々な条件を改善することで長期飼育が可能となった。(佐藤賢哉撮影)

- [1] 佐々木えりか, 実験動物としてのコモンマーマーモセット, BioResource now !, 2009. 5(9).
[2] Sato, K., et al., *Cell Stem Cell*, 2016. 19(1): p. 127-38.

バイオ系ツールはどうやって開発されているの？

今は生物学の研究においてコンピュータは欠かせない時代になっています。ウェット研究しかしていない場合でも、Blast (1) や Primer3 (2) といったツールは使ったことがあるのではないのでしょうか。今回は、これらのツールの開発の舞台裏をのぞいてみたいと思います。

オープンソースソフトウェア

オープンソースソフトウェアは文字通りソースコード(プログラム言語で記述されたテキスト)が公開されているソフトウェアです。プログラムを公開することで、ソフトウェアの利用者がバグを修正し、それを作成者に還元するなどのメリットがあります。バイオ系ツールにもソースが公開されているソフトウェアは多く存在します。例えば前回紹介した TopHat (3) もソースコードが公開されています。

- (1) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
(2) <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
(3) <https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>

GitHub

GitHub とは、ソフトウェア開発プロジェクトのバージョン管理システム (Git) を使用した共有ウェブサービスであり、ソースコードの閲覧やバグ管理などを行うことができます。以下は TopHat の GitHub ページです(図 1)。ページ上部左には「作成者または組織名 / プロジェクト名」が表示されています(図 1A)。

続いてプロジェクト説明の下に、いくつかのステータスが表示されています(図 1B)。commits は、プロジェクトに加えられた変更の数です。プログラムをよりよくするために何度も更新されていることが分かります。releases は任意のタイミングのプログラムをダウンロードできるようにしたものです(図 2)。ツールを利用した解析の再現性は重要なのでバージョンはぜひ記述しましょう。また contributors はプロジェクトに貢献している人々です。TopHat は 5 人の開発者によって 4,346 回の変更が重ねられているようです(2016.09.01 現在)。

色がついている部分(図 1B)をクリックすると、プロジェクトで使われているプログラミング言語の割合がわかるようになっていきます。TopHat は主に C++ で記述されていることが分かりました(図 3)。

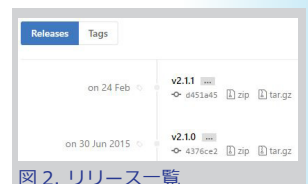


図 2. リリース一覧

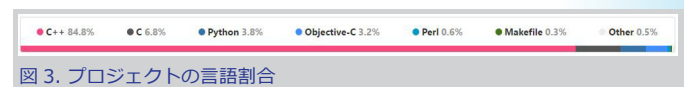


図 3. プロジェクトの言語割合

バグを報告しよう

GitHub は開発者だけのサービスではありません。利用者也ツールに貢献することができます。プロジェクトページの [Issues] タブ(図 1C)をクリックすると、現在報告されている問題や要望などの一覧を見ることができます。一覧の Issue をクリックするとやり取りを見ることができ(図 4)。バグを報告した場合、図 4 のように開発者から返信がある場合もあります。また、[New issue] ボタンから新しい Issue を登録することができます。Issue を登録する場合は GitHub アカウントを作成する必要があります。バグを Issue に登録する場合は開発者の手助けとなるよう、OS、プログラムのバージョンなど、バグを再現できる情報とログを記述するよう心がけましょう。また、報告する場合のルールなどが設けられている場合がありますのでプロジェクトの README をあらかじめ見ておきましょう。README は、プロジェクトのルートフォルダに README ファイルがある場合、GitHub ページ(図 1)の下部に表示されます。

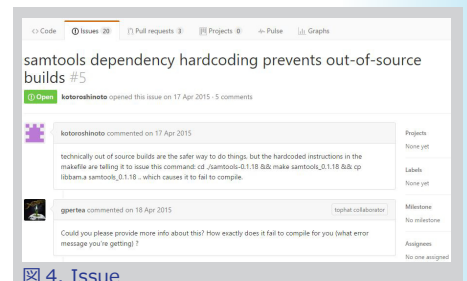


図 4. Issue

今回は開発の舞台裏として利用されることが多い、GitHub を紹介しました。GitHub は開発者と利用者をつなぐツールです。普段お使いのツールなどが GitHub 上で開発されている場合は、ぜひチェックしてみたいと思います。(前田 隼輔)

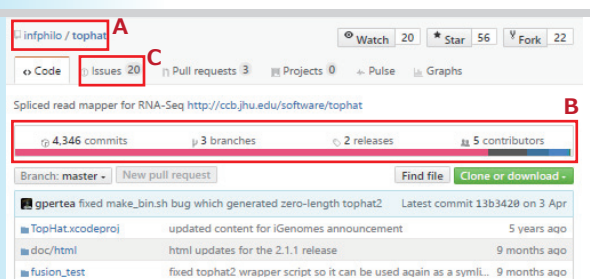


図 1. TopHat の GitHub ページ

Contact Address

連絡先 〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111
国立遺伝学研究所 生物遺伝資源センター
TEL 055-981-6885 (山崎)
E-mail : brnews@shigen.info

バイオリソース情報

(NBRP) www.nbrp.jp/
(SHIGEN) www.shigen.nig.ac.jp/indexja.htm
(WGR) www.shigen.nig.ac.jp/wgr/
(JGR) www.shigen.nig.ac.jp/wgr/jgr/jgrUrlList.jsp

Editor's Note

トランスジェニックマーマーモセットを世界に先駆けて作られた佐々木先生が、今度は最新のゲノム編集技術を使って、ついに免疫不全マーマーモセットの作製に成功されました。効率のよい人工ヌクレアーゼの選抜方法の確立と、出来上がった免疫不全個体の長期飼育に向けた条件検討などの御苦労が実を結んだのだですね。今回作出されたノックアウトマーマーモセットは、モデル生物として今後大いに利用されることでしょうか。ご研究の今後の発展が楽しみです。ご寄稿ありがとうございました。(Y.Y.)