

全身で蛍光タンパク質を発現する非ヒト霊長類を 非ウイルス性の遺伝子導入手法を用いて作出することに 世界で初めて成功

国立大学法人滋賀医科大学の築山智之特任准教授（京都大学ヒト生物学高等研究拠点（WPI-ASHBi）霊長類ゲノム工学開発コアコア長）らの研究グループは、全身で蛍光タンパク質を発現する遺伝子導入トランスジェニック（Tg）動物^{*1}を、非ウイルス性の遺伝子導入手法の一つである piggyBac トランスポゾン法^{*2}を用いて作出することに、非ヒト霊長類において世界で初めて成功しました。本研究により、マウス等の小動物では再現できなかった様々なヒトの疾患の発症機構の解明に係る研究をより強力に推進できると考えられ、今後、複数の遺伝子の同時発現・人為的発現制御等、より高度な設計を必要とする複雑な遺伝子操作が非ヒト霊長類においても可能となることが期待されます。

本研究成果は、2025年3月24日に、国際学術誌「Nature Communications」にオンライン掲載されました。

一 研究の概要とポイント 一

（本研究の概要）

- ・非ヒト霊長類において外来遺伝子を強制発現させたトランスジェニック（Tg）動物を作出する際、従来はレンチウイルスベクター法^{*3}を用いていたが、この手法は、導入できる遺伝子のサイズに上限があるなどの欠点を有していた。
- ・レンチウイルスベクター法が有する欠点を克服するため、本研究では非ウイルス性の遺伝子導入手法である piggyBac トランスポゾン法を用い、トランスジェニック（Tg）動物の作出を試みた。

（本研究のポイント）

- ・全身で蛍光タンパク質を発現する非ヒト霊長類（遺伝子導入トランスジェニック（Tg）カニクイザル）を、非ウイルス性の遺伝子導入手法を用いて作出することに世界で初めて成功した。
- ・本研究により、非ヒト霊長類において遺伝子導入動物を作出する実用的な非ウイルス性手法が確立し、今後、複数の遺伝子の同時発現・人為的発現制御など、より高度な設計を必要とする複雑な遺伝子改変が非ヒト霊長類においても可能になると考えられる。
- ・マウスなど、小型の動物では再現できなかった様々な疾患の発症機構の解明に係る研究を、より強力に推進できるとともに、非ヒト霊長類を用いた医学研究の発展に寄与することが期待される。

一 研究成果の詳細 一

研究の背景

感染症や精神神経疾患など、小動物では病態を再現できないヒトの疾患があることから、非ヒト霊長類における研究は注目を集めていましたが、2020年1月にわが国で最初の感染者が確認された新型コロナウイルス（COVID-19）の世界的な流行を経て、非ヒト霊長類を用いた研究の重要性がより高まっています。

滋賀医科大学動物生命科学センターは、非ヒト霊長類の一つであるカニクイザルを用いた高度な発生工学が可能な世界でも数少ない研究施設の一つで、WPI（世界トップレベル研究拠点プログラム）やAMED-SCARDA（先進的研究開発戦略センター）のサテライト拠点としても指定されています。同センターでは、これまでに先端的な遺伝子改変技術を用いて、様々な疾患モデルザルの作出等を行ってきました。

しかし、非ヒト霊長類における遺伝子改変は未だ発展途上にあります。CRISPR/Cas9 技術^{*4}の開発により、特定の遺伝子が欠損したノックアウト動物は非ヒト霊長類においても比較的容易に作出が可能となりましたが、

外来遺伝子を強制発現したトランスジェニック (Tg) 動物の作出については未だに効率が悪く、非ヒト霊長類ではレンチウイルスベクターなどのウイルスを用いた手法が必要です。

レンチウイルスベクター法により、カニクイザルにおいても外来遺伝子を強制発現したトランスジェニック (Tg) 動物の作出が可能ですが、特別な施設・機器・手技が必要である、胚移植前の遺伝子改変胚の選抜が難しい場合がある、導入できる遺伝子のサイズに上限がある、等の欠点があります。

研究手法・成果

本研究では、レンチウイルスベクター法の欠点を克服するため、非ウイルス性の遺伝子導入手法の一つである piggyBac トランスポゾン法を用いて、トランスジェニック (Tg) 動物の作出を試みました。加えて、非ヒト霊長類の一種であるカニクイザルに本手法を適用するにあたって最適化を行い、新規の発生工学的手法を用いました。その結果、全身で蛍光タンパク質を発現する非ヒト霊長類を、非ウイルス性の遺伝子導入手法を用いて作出することに世界で初めて成功しました。

本研究で作出した遺伝子導入トランスジェニック (Tg) カニクイザルは、全身の組織への遺伝子 (膜局在型の赤色蛍光タンパク質、核局在型の緑色蛍光タンパク質) 導入ならびに遺伝子発現が確認され、さらに生殖細胞における導入遺伝子の発現も確認されました。

なお、遺伝子挿入位置解析の結果、遺伝子挿入パターンに大きな組織間の差は無かった一方、遺伝子発現のレベルは組織によって異なることが明らかとなったことから、発現させたい組織によって、適切なプロモーター^{※5}を選択することが重要であることが示唆されました。

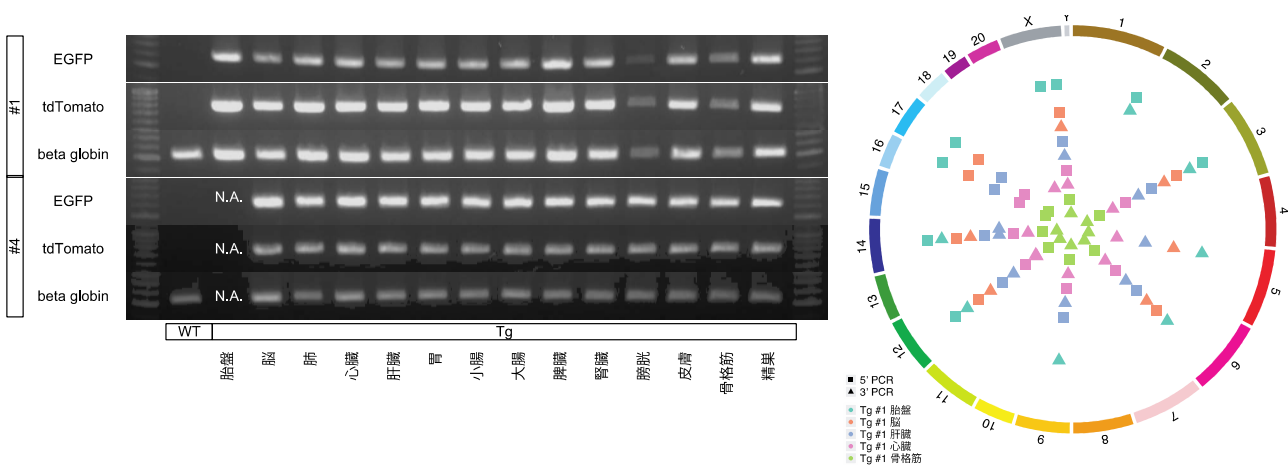


図 1：遺伝子導入 (Tg) カニクイザルの各組織における遺伝子導入の確認 (EGFP:緑色蛍光タンパク質、tdTomato:赤色蛍光タンパク質、beta globin:内在性コントロール、WT:野生型) と、どの染色体に遺伝子導入されたのかの解析

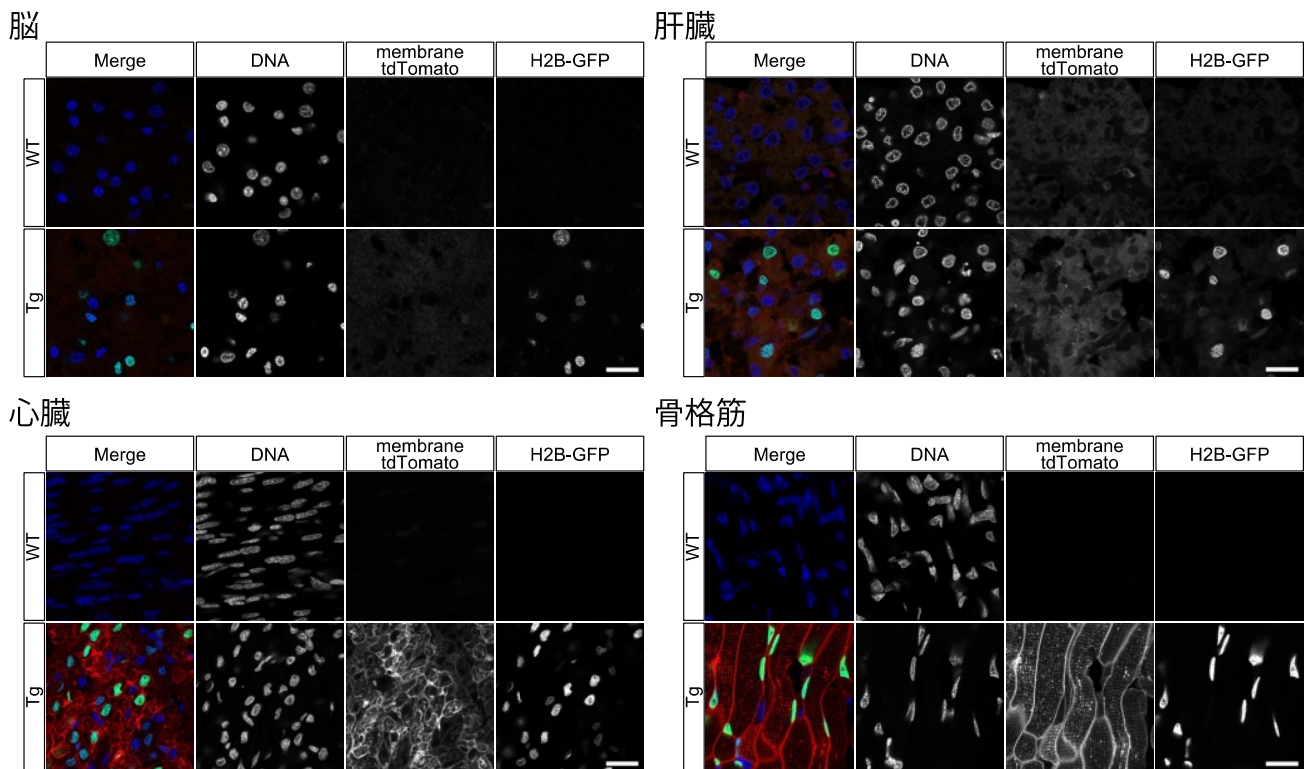


図 2：遺伝子導入 (Tg) カニクイザルの各組織における導入遺伝子発現の拡大像。赤色蛍光タンパク質 (membrane tdTomato) は膜局在型、緑色蛍光タンパク質 (H2B-GFP) は核局在型を使用しており、確かに局所的な発現を確認した。スケールバー：20 μm

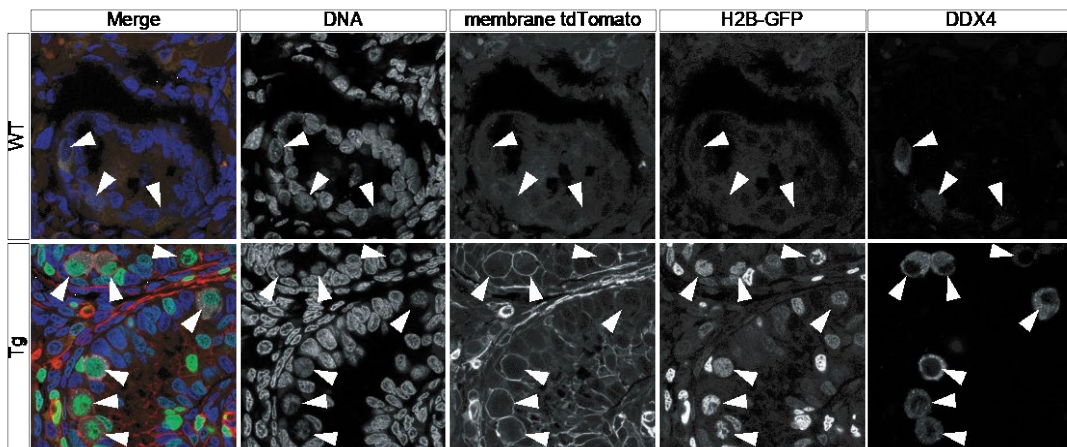


図 3：遺伝子導入 (Tg) カニクイザルの精巣における導入遺伝子発現の拡大像。生殖細胞特異的遺伝子 (DDX4) を発現している矢印で示された生殖細胞においても導入遺伝子の発現を確認した。

今後の展望

本研究により、非ヒト霊長類において遺伝子導入動物を作出する、より実用的な非ウイルス性の遺伝子導入手法を確立できたと考えており、今後、複数の遺伝子の同時発現・人為的発現制御など、より高度な設計を必要とする複雑な遺伝子改変が、非ヒト霊長類においても可能になることが期待されます。

さらに、マウスなど、小型の動物では再現できなかった様々な疾患の発症機構の解明に係る研究をより強力に推進できると考えられます。

研究支援

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（JP20H05763, JP20B302, JP20K21370, JP21H05038, JP22H02529, JP22K19246, JP23K23794, JP24K21915）、武田科学振興財団、持田記念医学薬学振興財団の支援を受けて実施されました。

発表論文

雑誌名：Nature Communications

タイトル：Non-viral generation of transgenic non-human primates via the piggyBac transposon system

著者：Masataka Nakaya, Chizuru Iwatani, Setsuko Tsukiyama-Fujii, Ai Mieda, Shoko Tarumoto, Taro Tsujimura, Takuya Yamamoto, Takafumi Ichikawa, Tomonori Nakamura, Ichiro Terakado, Ikuo Kawamoto, Takahiro Nakagawa, Iori Itagaki, Mitinori Saitou, Hideaki Tsuchiya and Tomoyuki Tsukiyama

DOI：10.1038/s41467-025-57365-w

用語解説

※1 トランスジェニック (Tg) 動物

外部から特定の遺伝子を人為的に導入した動物。

※2 piggyBac トランスポゾン法

ガの一種であるイラクサギンウワバに由来するトランスポゾンである piggyBac を利用することで、ウイルスを用いずに遺伝子を細胞に導入できる手法の一つ。本手法はウイルスを使った遺伝子導入に比べて技術的に簡単であり、ゲノム DNA に発現させたい遺伝子を恒久的に組み込むことができる。

※3 レンチウイルスベクター法

トランスジェニック動物を作出する手法の一つ。レンチウイルスは分裂中でない細胞にも感染しやすいという特徴を持つ。

※4 CRISPR/Cas9 技術

DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる遺伝子改変技術。

※5 プロモーター

遺伝子の発現を制御する DNA の領域。

【参考】滋賀医科大学では、動物実験等について、科学的合理性、動物愛護への配慮、環境の保全及び教職員・学生等の安全確保のため、動物実験等の実施に当たっては、動物愛護法及び飼養保管基準に則し、動物実験等の原則である代替法の利用、使用数の削減及び苦痛の軽減の 3R (Replacement, Reduction, Refinement) に基づき、適正に実施することを規程に定めています。動物実験委員会の審査を受けて承認されて実施しています。また、動物実験認定制度を全国に先駆けて導入し、講習会の受講、実習を経て認定試験に合格しないと実験することができないライセンス制度となっています。