

NEXT

ThermoFisher
SCIENTIFIC

No. **61**

2022 / March

Science, Products and Information

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフサイエンス情報誌

NEXT Interview

新型コロナウイルス感染増強抗体の発見

免疫システムと病原体との相互作用と進化の分子機構を解析

荒瀬 尚 氏(大阪大学 免疫学フロンティア研究センター/微生物病研究所教授)

- P. 04 Bigfoot Spectral Cell Sorter
- P. 08 AAV-MAX Helper-Free AAV Production System
- P. 09 TrueCut Cas9 Protein シリーズ
- P. 10 KingFisher Purification Systemシリーズ
- P. 11 Ion GeneStudio S5 システム シリーズ
- P. 12 Platinum Direct PCR Universal Master Mix
- P. 13 SuperScript IV Single Cell/Low-Input cDNA PreAmp kit
- P. 15 PowerTrack SYBR Green Master Mix



新型コロナウイルス感染増強抗体の発見

免疫システムと病原体との相互作用と進化の分子機構を解析

荒瀬 尚 氏 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター／微生物病研究所教授

2021年6月、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染増強抗体の発見をCell誌に発表した大阪大学微生物病研究所教授の荒瀬尚氏。「SARS-CoV-2のスパイクタンパク質に対する抗体の中には中和抗体ばかりでなく、スパイクタンパク質の構造に影響を与えて感染性を高める感染増強抗体が存在することを発見しました。解析の結果、この抗体がスパイクタンパク質のN末領域(NTD)の特定の部位に結合すると、受容体結合部位(RBD)の構造が変化してACE2との結合性が高まり、その結果、感染性が高まることがわかりました。さらにこの

感染増強抗体が中和抗体の作用を弱めることを確認し、感染増強抗体の過剰な産生が重症化に関与する可能性を示しました」と語ります。これまでデングウイルスなど、他のウイルスに対する感染増強抗体が報告されていますが、それらはFc受容体とある種の免疫細胞を介していました。今回発見した抗体は、Fc受容体非依存性に感染を増強するという、これまでにないメカニズムで作用します。荒瀬氏にSARS-CoV-2に対する感染増強抗体の発見と免疫システムと病原体の相互作用の研究について伺いました。

感染増強抗体の発見まで

「私が所属する微生物病研究所はウイルスや細菌などの微生物に関する日本を代表する研究機関であり、国内でのSARS-CoV-2の感染が始まって間もない2020年3月には研究所全体でこのウイルスの研究に取り組んできました。世界的なパンデミックが予想されるSARS-CoV-2の研究は急を要する、重要な研究だからです。部門を超えて2週間に1度集まって研究テーマや各部門の進捗を共有する機会を設け、その活動は今も続いています」と荒瀬氏は研究のきっかけを振り返ります。「私は、なぜ感染者の一部の患者だけが肺炎を起こして重症化するのか、そのメカニズムを解析することにしました。そこで過去の感染等が重症化に関与している可能性を解析するために、患者由来のモノクローナル抗体を詳細に調べることから始めました」と続けます。「すでに世界中の研究機関から、患者由来抗体に対する多くの配列データが発表されており、その中からスパイクタンパク質に対する76種類モノクローナル抗体を情報に基づいて人工遺伝子合成を行い、作製しました。そしてスパイクタンパク質とACE2受容体の結合への影響を調べてみると、RBDに対する抗体には確かに中和抗体が含まれていましたが、NTDに対する抗体の中に結合を増強する6種類の抗体が存在することに気づきました」と荒瀬氏。「さらにこれらの増強抗体は、中和抗体によるACE2結合阻害能を減弱させること、さらにSARS-CoV-2のヒト細胞への感染性を顕著に増加させることを確認しました。またすべての増強抗体はNTD

の特定部位をエピトープとして認識し、クライオ電子顕微鏡法で抗体とスパイクタンパク質との複合体の構造解析を行った結果、抗体がNTDの下面に結合していることを明らかにしました」と荒瀬氏は研究過程を語ります。「ACE2はスパイクタンパク質のRBD構造が開いた構造を取ると結合しやすくなり、感染性が高まることが知られています。そこで、開いたRBDに特異的な抗体を用いて増強抗体の影響を解析したところ、抗体がNTDの下面の感染増強部位に結合するとスパイクタンパク質のRBDが開いた構造をとりACE2と結合しやすくなることがわかりました。またNTD同士がこの抗体で架橋されることでNTDが引っ張られ、その結果、RBDが開いた構造をとることを突き止め、感染増強抗体の機能メカニズムを明らかにしました」（荒瀬氏）。

免疫システムと病原体の攻防は進化の源

「医学部在学中から研究者を目指し、免疫学研究室で研究に取り組んできました。留学から帰国して微生物病研究所で研究室を主宰することになり、多様な微生物による感染機構や免疫系の機能分子と病原体との相互作用、そしてMHCによる自己免疫疾患発症機序の解析を通して、免疫機能の全容理解を目指して研究を進めてきました」と荒瀬氏。そして研究内容の詳細を次のように語ります。「免疫細胞は、抑制化レセプターと活性化レセプターという免疫反応に対して相反する機能を有するレセプターがペアになっているペア型レセプターを発現しており、両レセプターの細胞外ドメインは非常に高いホモロジーがあります。抑制化レセプターはMHC分子などの自己分子を認識し、自己成分を攻撃することなく免疫反応を抑制します。もし免疫反応に関わるレセプターの存在が自己免疫回避のためであれば、抑制化レセプターだけで十分なはず。なぜ活性化レセプターが存在するのでしょうか。実は、ウイルスやマラリア原虫といった病原微生物の中には二セのMHC分子などを発現させて抑制化レセプターを介して宿主の免疫系を抑制し、宿主内で生き残る術を獲得しています。一方、抑制化レセプターと酷似する構造を持つ活性化レセプターは自己分子を認識せず、その機能の多くは不明でし

た。私たちは、この活性化レセプターが、ウイルスの二セMHC分子を認識して免疫反応を活性化すること、さらに別の微生物では免疫回避に関わる細菌プロテアーゼによって分解された抗体を認識して同じく免疫反応を活性化することを見出しました。これらのことより病原微生物が抑制化レセプターを利用して免疫反応を回避することに対抗して、宿主側が戦術的に活性化レセプターを獲得したと考えられます。感染性病原菌は、私たちの免疫システムを逆手に取って免疫系をかいくぐりますが、宿主もその対抗処置をシステム化して備えてきました。もともと感染症から体を守るために作られた生体防御機構である免疫システムは、病原体と共に進化してきたと言っても過言ではありません」と荒瀬氏は語ります。

リアルタイムでウイルスと宿主の相互作用を解析する

「SARS-CoV-2は新たな変異株が次々と出現し、感染流行を繰り返しています。研究の観点からは、宿主とウイルスの相互作用をリアルタイムで観察できる貴重な機会となります。今後、このウイルスの変異と宿主との関係、さらに持続感染や後遺症のメカニズム、また新たな変異株に対するワクチンや治療薬に対する感染増強抗体の影響など、多方面からアプローチしていきたいと思っています。さらに他のウイルス感染においても抗体が中和以外にどのような作用を持っているのかを調べていきたい」と荒瀬氏は今後の取り組みを語ります。

若い研究者の方へ

「研究はオリジナリティーが重要だと思います。若い方には独自性の高いユニークなことに挑戦してもらいたいと思います。これまでの技術の進歩を振り返ると、以前には全く考えられなかった研究アプローチが可能になってきました。例えば今回の研究では、数十種類の患者由来モノクローナル抗体を人工遺伝子合成で短期間に作製して、3カ月後には感染増強抗体の存在を発見できました。患者血液中のB細胞をシングルセルシーケンス解析できる次世代シーケンス技術を中心にした技術的進歩があったからです。最新技術の活用も視野に入れ、独自性の高い研究に取り組んでほしい」と荒瀬氏は若い研究者にエールを送ります。



荒瀬 尚(あらせ ひさし)

1990年北海道大学医学部医学科卒業後、大学院博士課程に進学(北海道大学免疫科学研究所)。94年より千葉大学医学部附属高次機能制御研究センター遺伝子情報分野助手、2000年カリフォルニア大学サンフランシスコ校研究員を経て、02年千葉大学医学部大学院医学研究科助教授。その後、大阪大学微生物病研究所免疫化学分野助教授を経て06年より同教授、07年より大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授を兼任。

Bigfoot Spectral Cell Sorter

高速、高精度、高い安全性、フレキシビリティを実現

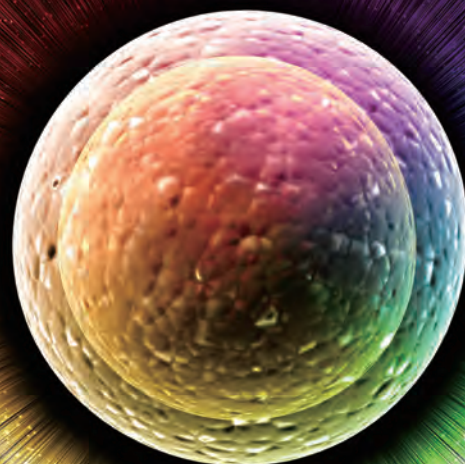
POINT

滴を持してハイエンドのスペクトルセルソーター、Invitrogen™ Bigfoot Spectral Cell Sorterを4月販売開始予定です。Bigfoot Spectral Cell Sorter は、ラボの多様なニーズに即座に、そして将来にわたって対応する、革新的で使いやすい高速セルソーターです。

- 最大9本のレーザー／60個のPMTを搭載
- 最大70,000イベント／secの高速ソーティング
- バイオセーフティキャビネットを内蔵

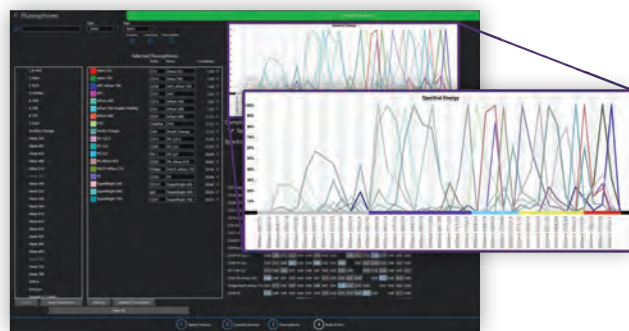


COMING
SOON!



▶ ソーティングおよび解析のためのライブスペクトルアンミキシング

- **多彩な構成**：多数のレーザーおよび検出器が搭載されたハイエンドモデルのBigfoot Spectral Cell Sorter は、解析およびソーティングの両方でリアルタイムのスペクトルアンミキシング（個別スペクトル表示）が可能です（右図参照）。
- **シンプル**：ウィザード形式のソフトウェアにより、コントロールのラン、潜在的な問題の同定、アンミキシングアルゴリズムの適用をサポートし、高品質のデータを作成します。
- **フレキシブル**：スペクトルアンミキシングデータまたは従来のコンペンセーションを行ったデータの取得やソーティングが行えるため、パネル構築から高速ソーティングまでのワークフローを簡素化できます。



▶ バイオセーフティ

- **統合された機能**：Bigfoot Spectral Cell Sorter本体と統合されたバイオセーフティキャビネット(BSC)とエアロゾル管理システム(AMS)により、封じ込め警告や、目詰まりが検出された際は、保護機能を維持するために風量を増加させることができます。
- **コンパクト**：バイオセーフティキャビネット形式の機器では最小クラスの設置面積で、サンプルポルテックス、プレート収納エリア、チューブラックおよびバイオハザードバッグを内蔵し、ワークフローの効率化を実現します。
- **容易なアクセス**：スライド式のサッシがバイオコンテインメントを維持しながらノズルおよびサンプル／ソーティング領域へのアクセスを容易にするため、常にユーザーが保護されます。

製品名	サイズ	製品番号	価格
Bigfoot Spectral Cell Sorter, 9 lasers, 60 parameters	1 式	PL00285	お問い合わせ
Bigfoot Spectral Cell Sorter, 7 lasers, 60 parameters	1 式	PL00299	お問い合わせ
Bigfoot Spectral Cell Sorter, 6 lasers, 57 parameters	1 式	PL00300	お問い合わせ
Bigfoot Spectral Cell Sorter, 6 lasers, 56 parameters	1 式	PL00301	お問い合わせ
Bigfoot Spectral Cell Sorter, 5 lasers, 53 parameters	1 式	PL00302	お問い合わせ

Lineup of Solution for SARS-CoV-2 Research

SARS-CoV-2 研究のためのNGS解析ソリューション

Ion Torrent™ 次世代シーケンサ (NGS) は SARS-CoV-2 研究に焦点を当て、ウイルス同定、疫学的調査、サーベイランス、ウイルスタイピング、免疫応答、ワクチン開発研究などのさまざまな目的に適したソリューションを提供しています。

[Ion Torrent ターゲットNGSの利点]

- 短い所要時間
- 自動ワークフロー
- 変異解析の優れた精度
- 少ないサンプル量



Ion Torrent NGS ソリューションによるSARS-CoV2 研究に関する多様なアプリケーション

ウイルス同定・タイピング、系統解析・疫学研究	免疫応答、作用機序	ワクチン研究
<ul style="list-style-type: none"> ● ウイルスゲノム配列決定 ● 新たな変異株の同定、分類 ● 系統解析、疫学的調査 ● 感染経路の追跡 	<ul style="list-style-type: none"> ● 宿主応答 ● T細胞やB細胞のクローン解析 ● マイクロバイオーム解析 	<ul style="list-style-type: none"> ● ワクチン応答の評価 ● 有害作用の予測 ● 有効性に関するバイオマーカー
対応するアプリケーション		
<ul style="list-style-type: none"> ● Ion AmpliSeq™ SARS-CoV-2 Insight Research Panel 	<ul style="list-style-type: none"> ● Oncomine™ Immune Response Research Assay ● Oncomine™ BCR IGH LR, SR Assa ● Oncomine™ TCR Beta LR, SR Assay ● Ion AmpliSeq™ Microbiome Health Research Kit 	<ul style="list-style-type: none"> ● Oncomine BCR IGH LR, SR Assay ● Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression

製品名	サイズ	製品番号	価格
SARS-CoV-2 ゲノム研究			
Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Panel GS, manual	96 反応	A51305	¥1,590,000
Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Panel GS, Chef-ready	32 反応	A51306	¥610,000
Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Insight Research Panel GX	32 反応	A51307	¥680,000
免疫反応、ワクチン研究			
Oncomine Immune Response Research Assay - Automated	32 反応	A32928	¥1,390,000
Oncomine BCR IGH LR Assay	24 反応	A45485	¥756,000
Oncomine BCR IGH SR Assay, RNA	24 反応	A45484	¥756,000
Oncomine TCR Beta LR Assay	24 反応	A35386	¥833,900
Oncomine TCR Beta SR Assay, RNA	24 反応	A39359	¥893,400
Ion AmpliSeq Microbiome Health Research Kit	48 反応	A46495	¥1,900,000
Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Express Kit Chef-Ready Kit	32 反応	A31446	¥535,500
Ion Torrent 次世代シーケンサ機器			
Ion GeneStudio S5 システム	1 式	A38194	お問い合わせ
Ion Chef システム	1 式	4484177	お問い合わせ
Genexus Integrated シーケンサ	1 式	A45727	お問い合わせ

細胞培養の歴史とともに60年!

Gibco 60th Anniversary



1962年、米国ニューヨーク州グランドアイランドのファーガソン夫妻の農場から誕生したGibco™ ブランドは、おかげさまで2022年に60周年を迎えます。

培地や血清などの細胞培養関連製品のゴールドスタンダードとして、世界中の研究者に愛されてきたGibco ブランドは、技術革新、製造・流通プロセスの安全性、製品改良を重ね、すべての製品において妥協のない品質の高さを追求してきました。今では世界約160カ国のライフサイエンス研究者の方々に広くご利用いただき、最新の再生医学研究や遺伝子治療などの研究開発に役立つ製品も次々と開発・提供しています。Gibcoはこれからも信頼のブランドとして、皆様の研究をサポートしてまいります。

60周年という節目の年を記念して、サーモフィッシャーサイエンティフィックではさまざまなイベントやセミナーを企画しています。順次ご案内をいたしますので、引き続き当社からの案内にご注目ください!

Gibcoの名前の由来をご存じですか?

1962年にファーガソン夫妻が、創業の地名に因んで
Grand Island Biological Companyと
会社名を名付けたことが由来です。



Gibco 60年の歩み

1960s

1970s

1980s

1990s

1962

Grand Island Biological Company (Gibco) が設立

1964

幹細胞が初めて培養される

1965

血清とドライパウダー培地が Grand Island で製造開始

1975

モノクローナル抗体が発明される

1981

Gibco™ Geneticin™ 発売

1981

ES 細胞が初めて培養される

1985

細胞培養用のFBSの継続生産を開始

1989

ニュージーランド血清生産施設を購入
Insect Cell Culture、Cell Culture Freezing 培地発売

1993

神経細胞の無血清培養用にGibco™ B-27™ Serum-Free Supplement発売

FBS 供給者として世界最大に
ニューヨークやニュージーランドの施設がISO-9001を取得

1994

リキッドメディアの濃縮技術が大量生産に初めて応用される

環境に配慮した包装を始める

ドライパウダー培地のcGMP 生産を増強

1996

リサイクル可能なPET ボトルを使用開始



Gibco glass bottle
1962–1986



Gibco square plastics
1987–1996



Gibco round plastics
1996–2007



Gibco boxy bottle
2008–present



Gibco One Shot 50 mL bottle
2016–present



B-27 Serum-Free Supplement

基礎研究の成果を臨床応用へ、 多くの人へ届けたい

岡野栄之 氏 (慶應義塾大学医学部生理学教室教授)

「中枢神経系の発生と再生」の研究を軸に臨床応用を目指す岡野栄之氏。臨床研究の進展や今後の予定、そしてGibcoへのコメントを伺いました。

研究人生におけるハイライトを3つ教えてください。

1つめはショウジョウバエの神経発生に異常を示す変異体の中から、1991年にRNA結合タンパク質 Musashi 変異体を同定し、1998年にはMusashiを指標にヒト成体脳に神経幹細胞が存在することを世界で初めて明らかにしたこと。2つめは遺伝子改変マウスセットの作製。パーキンソン病や自閉症スペクトラム障害のモデルを作製し、現在論文を準備中です。3つめはiPS細胞を使った脊髄損傷の治療法開発。亜急性期を始め、慢性期や急性期の脊髄損傷に対する臨床研究を進めています。

現在、細胞を使った研究で最も力を入れていることを教えてください。

私たちにあって細胞培養はあらゆる研究の基盤であり、目的に合わせた培養技術の開発が重要です。例えば再生医療では脊髄損傷の患者さんに神経前駆細胞を移植しますが、最初にiPS細胞を増やして神経前

駆細胞に誘導し、さらにこの神経前駆細胞を移植に必要な量にまで拡大培養します。また創薬では、ALSの患者さんからiPS細胞を作製して運動ニューロンに誘導後、ドラッグスクリーニングでロピニロールが病態を改善する可能性を見出し、臨床研究を進めています。さらに晩発性の認知症の研究では120日間という長期にわたって細胞を脳オルガノイドとして培養しています。*in vitro*でも病態を再現するための細胞培養技術の開発に力を入れています。

Gibco製品について印象に残っていることや思い出を教えてください。

数年前に発売されたB-27 Plus Neuronal Culture Systemが印象的でした。この系で神経細胞を培養すると成熟度が向上し、*in vitro*で初めて電気生理学的なデータを取得できました。iPS細胞は、発生学的に非常に未熟な細胞であり、そこから誘導した神経細胞を*in vitro*で成熟させることは至難の業。特にヒトの神経細胞はマウスよりも成熟に時間がかかり、長期間にわたる培養でも健やかに成熟させる必要がありました。

細胞研究にける今後10年の展望についてお聞かせください。

ニューロンとグリア細胞の相互作用によって私たちの脳は高次機能を維持し、その破綻が疾患につながります。神経系に特異的な相互作用解明のために、今後は生体内を模した細胞培養の技術開発が重要だと

思います。すでに3D培養や共培養、さらにマイクロ流路と組み合わせた共培養技術などが開発されていますが、まだ生体内の環境をすべて反映しているとは言えません。共培養でニューロンとグリア細胞を培養する場合、個別の至適な培養条件を共培養ではどのように調整していくのか、新たな至適条件を開発する必要もあります。またニューロンやグリア細胞と異なり、中胚葉から発生するミクログリアとの共培養も必要であり、私たちも力を入れていく予定です。

Gibcoへ一言お願いします。

私たちにあって細胞培養はあらゆる研究の基盤となるので、製品価格をできる限り抑えてほしい。また新製品は常に臨床応用を前提に開発してほしいと思います。研究段階で成功しても臨床応用に使えなければ、新たに臨床用の培養系を検証する必要があります。基礎研究の成果を迅速に臨床応用につなげ、新しい治療法を一刻も早く患者さんに届けたいですね。



2000s

2002

Gibco™ Advanced Granulation Technology™ (AGT)、Gibco™ Advanced D-MEMとMEMを発売

2005

Gibco™ PD-Direct™ Bioprocess サービスをスタート、培地の開発工程を細かくスタマイズ可能に

2006

iPS細胞が初めて開発される

2008

世界初の人工気道の移植にGibco™ 細胞培養製品が使用される

2009

Gibco™ OptiCHO™ Protein Express Kitをパイオ製剤開発用の無血清セルラインソリューションとして発売

2010

Gibco™ CD FortiCHO™ 培地を発売

2011

ES細胞から人工網膜組織の3次元形成に成功

2012

哺乳類細胞による組み換えタンパク質発現システムのGibco™ Expi™ Expression System発売

多能性幹細胞培養のための8成分からなるGibco™ Essential 8™ 培地を発売

2017

神経細胞の生存率と成熟度を高めるGibco™ B-27™ Plus Neuronal Culture Systemを発売

2018

室温保存可能なGibco™ BenchStable™ 培地を発売

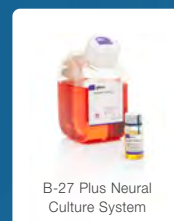
2020

閉鎖系の細胞処理システムのGibco™ CTS™ Rotea™ Counterflow Centrifugation Systemを発売

2021

多能性幹細胞の浮遊培地としてGibco™ StemScale™ PSC Suspension 培地を発売

アデノ随伴ウイルス産生システムGibco™ AAV-MAX Production Systemを発売



卜部 匡司 氏 (自治医科大学医学部遺伝子治療研究部講師)

遺伝子治療への応用を目指し、AAVベクターの基礎研究を推進

AAV-MAXトータルシステムの浮遊培養系でタイターを維持しつつコスト削減へ



有効な治療法がなかった遺伝性疾患に対する先進的な治療法として期待される遺伝子治療。近年、非病原性で神経細胞のような非分裂細胞に効率良く遺伝子導入できる治療用ベクターとしてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターが注目されています。自治医科大学医学部の遺伝子治療研究部は、遺伝子治療テクノロジーの開発とその応用研究に取り組み、卜部氏はその一環としてAAVベクターシステムの開発と改良、さらにAAVベクターのカプシドの性状に関する基礎研究に取り組んでいます。「AAVベクターの作製は、研究室レベルではHEK293細胞の接着培養が標準的ですが、治療薬への応用を考えると大量培養に適した浮遊培養法が必要です。今回、新しい浮遊培養系を試したところ、ウイルスタイターを維持しつつ、培養スケールやコスト、作業量を削減できることを確認しました。今後、従来法への置き換えも視野にいれながら、さらに詳細な検証を続ける予定です」と語ります。卜部氏に、使用中のGibco™ AAV-MAX Helper-Free AAV Production System Kit (AAV-MAXシステム) の使用感や評価を伺いました。

浮遊培養で培養液を10分の1に削減

「AAVベクター作製のための浮遊培養系は、すでに複数の論文で報告されていますが、想定されるタイターに達しなかったり、継代を重ねると細胞の増殖度が落ちたりするという問題点があり普及してい

ませんでした。ところが今回AAV-MAXシステムによる浮遊培養系をAAV8型で試したところ、 10×10^{11} vg/mlというタイターでウイルスが産生され、ほぼカタログ通りの値になったことが印象的でした。接着培養では、ウイルス産生用に約 3×10^6 個のHEK293細胞を10cmディッシュに10mlの培地を用い、リン酸カルシウム法でプラスミドをトランスフェクションします。これに対してAAV-MAXシステムでは同等の細胞数を1mlの培地で培養でき、専用試薬でトランスフェクションします。高密度培養でもウイルス産生には支障なく、しかもリン酸カルシウム法では後に培地交換が必要ですが、このシステムではその必要もありません。さらにAAV-MAXシステムは10-20回ほど継代しても増殖スピードが落ちずに安定している点や、継代も培養液の一部を取り出して新しい培地に加えるだけなので、接着培養のようにトリプシンで細胞をはがす必要がなく作業が楽で、細胞へのダメージも少なく済みます」と卜部氏はこのシステムの使用感を語ります。

応用を想定してコストを確認

「臨床応用では製造コストも重要です。AAV-MAXシステムはトータルシステムなので、専用の培地やトランスフェクション試薬などがコスト面で最初は気になりました。しかし接着培養よりも10分の1の培地で培養でき、それに伴ってトランスフェクション用プラスミドも少なく済みます。例えば私たち

は多段培養容器の接着培養系では1000マイクログラムのプラスミドを使いますが、AAV-MAXシステムでは同等のウイルスベクターを得るためには、換算すると80マイクログラム程度の使用で済みます。全体コストを試算すると3分の1程度になりました」と卜部氏とコメントします。

さらなる進展を目指して

「今後、AAV-MAXシステムで産生されたウイルスのパッケージング効率や標的細胞などへの感染性を確認していく予定です。ただしこのシステムの細胞も293細胞由来なので、大きな変化はないと予想しています。また今回はAAV8型を使用しましたが、他の血清型でも試していく予定です」と卜部氏は語ります。AAVには、表面抗原が異なる血清型が10種類ほどあり、ウイルスとしての性質や感染細胞への指向性が異なります。「例えば脊髄性筋萎縮症の遺伝子治療薬はAAV9型で神経細胞に高い指向性があり、静脈注射で投与できるので、低侵襲性の治療法としても期待されています。また遺伝子治療薬の製造では、例えば1ロットあたり 10^{14} から 10^{16} 程度のウイルスタイターが必要な場合、バイオリアクターで数百リットルスケールの浮遊培養を行うこととなります。基礎研究の段階から安定な浮遊培養ができれば、スケールアップもスムーズに行えそうです。常に応用を想定して基礎研究に取り組むことで、遺伝子治療の可能性を上げていきたい」と卜部氏は語ります。

AAV-MAX Helper-Free AAV Production System 高効率なAAV産生のためのトータルシステム

Gibco™ AAV-MAX Helper-Free AAV Production System (AAV-MAXシステム) は、高力価で費用対効果に優れたアデノ随伴ウイルス (AAV) 産生システムです。スケーラブルな浮遊システムにより、研究から臨床スケールへ効率的に移行できます。

- 高力価のAAVを産生：培養量あたりの産生ウイルス粒子が多く、製造コストを削減
- スケーラビリティ：シェーカーフラスコからバイオリアクターまで、スケーラブルなプロトコルによる浮遊システム
- 簡便なワークフロー：ヘルパーウイルスフリーの効率的なトリプルトランスフェクションプロトコル
- 動物由来成分不含 (AOF)：動物およびヒト由来成分不含で原材料の安全性リスクを低減
- クローナル293F由来産生細胞：高産生クローン細胞株、ドキュメント整備、cGMPバンク*

*cGMPバンク化細胞は、Gibco™ CTS™ AAV-MAX Production System (2022年発売予定) でご利用可能になります。



製品名	サイズ	製品番号	価格
AAV-MAX Helper-Free AAV Production System スターターキット*	1 キット	A51217	¥224,500

*浮遊培養系に最適化された細胞、培地、トランスフェクション用試薬、細胞溶解液が含まれています。

CRISPR編集効率を最大限に高める次世代Cas9タンパク質

POINT

2種類のInvitrogen™ TrueCut™ Cas9 ProteinとGibco™ TrueCut™ Cas9 Proteinは、幅広い遺伝子ターゲットと細胞種において一貫して高い編集効率を提供するように設計されています。ゲノム編集の目的に合わせて、3つのバージョンから選択できます。



▶ 実験の目的や細胞種、ターゲットに合わせて3製品から適した製品を選択できます。

	Invitrogen™ TrueCut™ Cas9 Protein v2	Invitrogen™ TrueCut™ HiFi Cas9 Protein	Gibco™ TrueCut™ Cas9 Protein (Prototype)
用途	最も一般的な研究用途	オフターゲット効果の影響を受けやすい実験	より厳しい規格で製造されたCas9タンパク質を必要とする前臨床研究
製品構成	最大限の編集効率を得ることを目的とする次世代型Cas9タンパク質	高い編集効率を維持しつつオフターゲット効果を大幅に低減させることで特異性が向上したCas9 タンパク質変異体	従来と同じ野生型Cas9タンパク質で、ラージスケール対応およびGibco™ CTS™ 製品の処方に対応
主な特徴	<ul style="list-style-type: none"> ● 卓越した編集効率 — 一般的な細胞、初代細胞、幹細胞および免疫細胞など、試験を行った全ての細胞で一貫して高いオンターゲット編集効率を実現 (T細胞では >90%の編集) ● 優れた性能 — 難しい標的の場合も、競合製品と比べて最大で2倍高い編集効率 (当社比) ● 高品質 — 厳密なISO 13485品質基準の下で製造 	<ul style="list-style-type: none"> ● 特異性の向上 — 初代細胞、幹細胞および免疫細胞などのさまざまな細胞種でオフターゲット効果を大幅に低減 ● 高い編集効率 — TrueCut Cas9 Protein v2 (野生型) の高いオンターゲット編集効率を維持 ● 高品質 — 厳密なISO 13485品質基準の下で製造 	<ul style="list-style-type: none"> ● 高性能 — すべての試験細胞株で高い性能を維持 (T細胞で90%超の編集) ● より厳密な製造 — FDA登録製造施設で21 CFR Part 820の原則に従い、代表的なUSP <1043>、欧州薬局方第5.2.12章、ISO 20399 -1、-2、-3の細胞と組織ベースの製品補助材料基準を満たして製造 ● トレーサビリティの文書化 — バイオパージン、エンドトキシン、マイコプラズマ、残留宿主核酸、およびタンパク質などの幅広い安全性試験

製品名	サイズ	濃度	製品番号	価格
TrueCut Cas9 Protein v2	10 µg	1 mg/mL	A36496	¥9,700
	25 µg	1 mg/mL	A36497	¥12,300
	100 µg	5 mg/mL	A36498	¥25,900
TrueCut HiFi Cas9 Protein	10 µg	1 mg/mL	A50574	¥10,200
	25 µg	1 mg/mL	A50575	¥12,900
	100 µg	5 mg/mL	A50576	¥27,500
TrueCut Cas9 Protein (Prototype)	2.5 mg	10 mg/mL	A45220P	お問い合わせ
	5.0 mg	10 mg/mL	A45221P	お問い合わせ

北澤淳一 氏 (青森県立中央病院臨床検査部・臨床遺伝科部長)

薬剤耐性菌の管理研究やがんの臨床研究を次世代シーケンスで加速

核酸精製を自動化し、臨床と研究を滞りなく進める



薬剤耐性菌の病院内での流行株特定や青森県のがん患者におけるドライバー遺伝子変異に関わる臨床研究を進める青森県立中央病院臨床検査部・臨床遺伝科部長の北澤淳一氏。「2020年6月に一連の遺伝子解析関連機器を整備し、核酸精製から次世代シーケンス(NGS)、そして解析レポートまでのワークフローを自動化システム中心に構築しました。使いやすくシームレスなフローですが、途中で中断して、時間があるときに再スタートするなど柔軟に運用できます。このフローであれば、長時間実験に拘束されず、少人数でも複数の臨床研究に同時に取り組みます」と語ります。

薬剤耐性菌の遺伝子を網羅的にNGSで解析

「薬剤耐性菌による院内感染は深刻な状況をもたらし、感染状況の把握や抗生物質の適正な使用が求められています。世界的にも大きな問題であり、将来的にはがんよりも多くの方が亡くなるとも言われています。私たちは院内で過去に流行したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の耐性遺伝子を網羅的にNGS解析し、菌種や株、そして薬剤耐性遺伝子を特定する研究に取り組んでいます。例えば黄色ブドウ球菌ではどんな株がどのようなペースで増減するか、またどんな薬剤耐性遺伝子が存在するか、サルモネラ菌では食中毒を起こした株がすべて同じかどうかなど、Ion AmpliSeq™ Pan-Bacterial Research Panelを使って調べています。標準的な細菌検査では培養や生化学



北澤氏と共に遺伝子解析関係の研究を進める馬場千華子さん(右)と野坂知加さん(左)

的検査、またPCRベースの簡易検査が主流ですが、NGS解析をおこなうことで正確で詳細な遺伝子関連情報が得られます。実験フローもシンプルなので、前日までに菌株を培養で増やしておけば、自動化システムを使って1時間程度で核酸を精製できます。また精製サンプルを保管しておけば、1-2時間ほど時間が取れる時にNGS用のライブラリを調製してIon GeneStudio™ S5 Plus NGSシステムにセットし、結果は自分のデスクで確認しています。Ion Reporter™ ソフトウェアの表示もわかりやすく助かっています」

と北澤氏。Pan-Bacterial Research Panelは属および種レベル、さらに異なる抗生物質クラスで細菌を検出するためのパネルであり、21種類の特定種検出用の269アンプリコンと364個の抗生物質耐性(AMR)遺伝子の存在を評価するための716アンプリコン用のプール、さらに公共のGreengenesデータベースに登録されている最大約400,000の16S配列から16Sプロファイリングを行うための24アンプリコン用のプールに分かれています。「この研究を通して、院内での過去の感染状況の傾向を把握し、今後の対策に生

KingFisher Purification System シリーズ

DNA、RNA、タンパク質、細胞を磁性ビーズで自動精製



Thermo Scientific™ KingFisher™ Purification System シリーズは、核酸やタンパク質や細胞の単離を自動化し、マニュアル操作時間を最小限に抑える精製システムです。Applied Biosystems™ MagMAX™ シリーズなどの磁性ビーズによる精製キットを使用し、用途やスループットに合わせて機種を選択できます。

※処理できる容量範囲は、選択するプレートやチューブとTip Combの組み合わせで異なります。

	KingFisher Apex	KingFisher Flex	KingFisher Duo Prime
サイズ	ベンチトップ	ベンチトップ	小型ベンチトップ
スループット	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	中～高スループット、 1回あたり 24 / 96 サンプル	低～中スループット、 1回あたり 6 / 12 サンプル
処理容量*	10 – 5000 µL	10 – 5000 µL	30 – 5000 µL
加熱	あり	あり	あり
冷却	あり	なし	あり
UV ランプ	あり	なし	あり
バーコードリーダー	あり(内蔵)	あり	オプション(外付け)

かしていきたい」と北澤氏は語ります。

質の高い核酸精製を自動化システムで

「私は、1995年から2年ほど米国に留学して分子生物学をベースに医学研究に携わりました。当時は核酸をマニュアルで精製したり、ゲル板でシーケンス解析を行う時代。RNA精製ではコンタミしないように神経を使い、それでも失敗することがありました。近年、医療分野では、感染症やがんの病態理解に遺伝子情報が役立つようになってきましたが、煩雑な核酸精製や馴染みがないNGSになかなか取り組むきっかけがつかめないうちに、遺伝子解析システムを整備するにあたり、核酸精製は自動化システムのThermo Scientific™ KingFisher™ Duo Primeシステムを導入しました。このシステムは、サンプルと試薬をセットするだけ

で質の高い核酸を精製します。ビーズ法で同時に複数サンプルを処理でき、カラム法のように手間がかかる吸引や煩雑さがなく操作が非常に簡便です。2021年夏のCOVID-19の第5波では検査部全体がウイルス検査で忙しくなりましたが、私たちが取り組んでいる臨床研究は自動化システムを活用することで滞りなく進められました」と北澤氏は続けます。細菌からの核酸精製には、Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kitを使用しているそうです。

青森県のがん患者におけるドライバー遺伝子の変異解析

「青森県は、昭和40年代から都道府県の平均寿命ランキングでほぼ最下位を続け、日本人の死因トップであるがんの検診率も低く、すでに進行がんになって受診する方が多いためか、治療の奏効率も低い状態です。私たちは、がん克服のために地域に沿った臨床研究として『青森県のがん患者におけるがんドライバー遺伝子変異の横断的研究』を倫理委員会の承認を得て実施することにしました。この研究では、がん患者さんの中で希望する方に自由診療として52種類のがん関連遺伝子をIon Torrent™ OncoPrint™ Focus Assayを使ってNGS解析します。がんの発症には生活習慣や地域性が関わるとも言われているので、客観的なデータを集めて検証し、青森県民に合わせた改善案を提案したいと思っています。この時のワークフローでは、生検や手術試料の凍結サンプルやFFPEサンプルからDNAと

RNAを精製してNGS解析を行います。そして体細胞に特異的な変異を検出するために、血液細胞中の生殖細胞変異と比較しつつ解析を進めます。解析データはIon Reporterソフトウェアで確認しますが、生殖細胞変異と体細胞変異がベン図としてわかりやすく表示されるので、重なりのない体細胞変異のみを迅速に解析できます。この結果をIon Torrent™ OncoPrint™ Reporter ソフトウェアで検証すれば、遺伝子変異と国外の治験状況も検索できます。核酸精製にはKingFisher Duo Primeシステムを使用し、FFPEからのDNAとRNAの精製はApplied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kitを、血液からのDNA精製にはApplied Biosystems™ MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitを使っています」と北澤氏は語ります。

非小細胞肺がんに関する臨床研究

「当院では非小細胞肺がんの治療薬の適応判定の補助を目的にNGSによるマルチプレックス遺伝子検査を実施しています。保険適応は5遺伝子だけですが、このシステムを使うと参考情報を含むがん関連遺伝子46遺伝子を同時に解析できます。そこで患者さんの同意を得て、保険適応外の遺伝子変異を調査する臨床研究を実施しています。院内で解析することですべてのデータを有効に活用できるメリットがあります」と北澤氏。「最新の遺伝子解析技術をベースに地域に根差した臨床研究を進め、青森県民の健康増進に寄与していきたい」と北澤氏は最後に言葉を結びます。



Ion GeneStudio S5 システム シリーズ 柔軟な次世代シーケンス解析を実現

Ion GeneStudio™ S5 システムシリーズは、解析スピードと柔軟なスケールで次世代シーケンスの幅広いアプリケーションに対応します。スループットが異なるチップを使い分け、1チップあたり2M-80M(S5 システム)、2M-130M(S5 Plus/S5 Prime システム)のシーケンスリードが得られます。またライブラリ作製にIon AmpliSeq™ テクノロジーを活用することで、マルチプレックスPCRによりターゲット領域を効率的に濃縮し、がんや遺伝性疾患、微生物に対応する多様な解析を幅広く行えます。この技術をベースに各種Ion AmpliSeq™ Panelや Ion Torrent™ OncoPrint™ Assayを提供しています。



製品名	サイズ	製品番号	価格
Ion GeneStudio S5 Plus システム	1 式	A38195	お問い合わせ

広橋教貴 氏(島根大学生物資源科学部教授)

ダイオウイカやホタルイカの繁殖様式を遺伝子解析で明らかに 個体識別のためのマイクロサテライト解析をダイレクトPCRで簡便化



「知名度が高く、子供にも人気のダイオウイカは世界中の海に生息しますが、水深600mに及ぶ深海に棲むため、その生態の大部分は謎に包まれています。日本海沿岸の各地には冬期にダイオウイカが漂着したり、漁網に混入したりすることがあります。昨年、私たちはダイオウイカの成熟したメスの標本から、体表面に広く散在する精子塊を複数採取して父性解析を行い、すべて単一個体のオスに由来することを報告しました^{*1}」と島根大学教授の広橋教貴氏は語ります。広橋氏は、2020年にホタルイカの繁殖様式を解析し、ホタルイカが生物界では珍しい単婚であることを報告しています^{*2}。広橋氏にイカ研究の魅力や実験操作の効率化を伺いました。

*1 Deep-Sea Research Part I, Volume 175 (2021)
*2 Scientific Reports 10, 10962 (2020)

イカの繁殖様式の解明へ

「頭足類(イカやタコの仲間)の寿命は1年程度で、寿命が尽きる少し前に生殖し、そのほとんどの種が乱婚です。一般的にメスにとっての乱婚のメリットは、オスから直接的な恩恵(例えば子の保護や食物の供与、敵からの護衛など)を受けること、間接的には子の遺伝的多様性を担保できることが考えられます。イカやタコは、繁殖時にメスが精子の入ったカプセル(精莢)をオスから受け取るという風変わった交尾(交接)行動をとります。今回、ダイオウイカの表面に付着した精子塊の個体識別を行うために、4種類のマイクロサテライトマーカーを開発しました。そして異なる5か所から精子を採取し、そのうち66サンプルの解析に成功し、すべて単一個体に由来することを確認しました。出会いの少ない深海では遺伝的多様性よりも、オスとの非

常に貴重な出会いを最大限に生かすために単婚という生殖様式を取るのかもしれませんが、しかし生物種の単婚か乱婚かは、種によって予め決まっている場合や状況に応じて適応的に変更する場合があります。今回明らかになった単婚がそのどちらであるか今後明らかにしていく予定です。さらにダイオウイカが日本海で繁殖しているかどうか、また日本海以外の海域のダイオウイカとの関りなどを集団遺伝学的に調べていきたい」と広橋氏は語ります。

ダイレクトPCRで個体識別を簡便化

「ホタルイカの研究では、個体識別用に4か所のマイクロサテライトマーカーを開発しました。日本海でのホタルイカの繁殖時期は2月中の2週間に集中しますが、オスが繁殖フィールドからすぐに姿を消すのに対し、メスは7月頃まで留まって体内に貯蔵した精莢を使って受精します。私たちは、メスが貯蔵している精子塊の父性解析から、すべて単一個体のオスに由来することを確認しました。具体的には、20個体から12サンプルの精子と各メスの筋肉から全部で約150サンプルを採取し、解析しました。精子のゲノムDNAはタイトなクロマチン構造を取って溶けにくいので、CTABとフェノール/クロロホルム混合液を組み合わせることで精製しましたが、操作が煩雑で時には失敗することもありました。もっと多くの個体を調べたかったのですが、実験操作を考えると20個体が限界でした」と広橋氏。「現在、ホタルイカとの比較のために近縁のホタルイカモドキの繁殖様式を解析中ですが、貯蔵する精子塊の数も多く、さらにサンプル数が増えそうです。そこでダイレクトPCR用のInvitrogen™ Platinum™

Direct PCR Universal Master Mixを試したところ、実験操作が格段と簡便化できました。この試薬を使うと、サンプルを溶液に浸して1分ほど加温すれば、あとはそこから1μLを取り出して直接PCRが行えます。解析結果も問題なく、しかもプライマーのアニーリング温度がすべて60℃なので、Tm値の測定や最適化をする必要がありません。数百サンプルを解析でき、データの信頼性も確保できそうです。さらにマイクロサテライトのマルチプレックス解析も検討したい」と広橋氏は語ります。「またこの試薬を生命科学系以外の理工学部の実習などで使ってみました。失敗がなく短時間でゲノムDNAが抽出できるので重宝しました。2コマ、3時間の実習でゲノムDNA抽出からPCR、電気泳動、染色まで行え、なおかつPCR反応中に原理説明やインフォームド・コンセント、パッチテストができるので実習パッケージとしてよくフィットします」と話します。

イカの繁殖様式から進化の考察へ

「今後、さらに研究を進め、彼らの行動様式や生態を解明していく予定です。イカ・タコは無脊椎動物の中では最も脳が大きく、高い知性を有する魅力的な研究対象です。ヒトとは異なる進化の過程で、どのように彼ら特有の知性を成熟させてきたのか、興味を尽きません。この研究を通して、進化の過程における彼らの生存戦略にも迫っていきたい」と今後の研究について広橋氏は語ります。

広橋氏(左上)と研究室の皆さん：ブラインシュリンブの発光性を研究中の橋本依風希さん(学部4年・右上)、ホタルイカモドキの繁殖様式を研究中の森脇優さん(学部4年・右下)と山根杏梨さん(学部4年・左下)

Platinum Direct PCR Universal Master Mix DNA精製なしに、直接PCRを実施!

Invitrogen™ Platinum™ Direct PCR Universal Master Mixは、さまざまなサンプルから、DNAを精製せずに直接増幅するために設計されたマスターミックスです。高性能なInvitrogen™ Platinum™ II Taq Hot-Start DNA PolymeraseとdNTPs、そしてダイレクトPCRで優れた性能を発揮するユニバーサルプライマーアニーリング(60℃でのアニーリング)が可能な革新的なバッファーを含んでいます。

製品名	サイズ	製品番号	価格
Platinum Direct PCR Universal Master Mix	100 反応	A44647100	¥14,100
	500 反応	A44647500	¥58,400

SuperScript IV Single Cell/Low-Input cDNA PreAmp kit

優れた感度と短時間でのcDNA増幅を実現

POINT

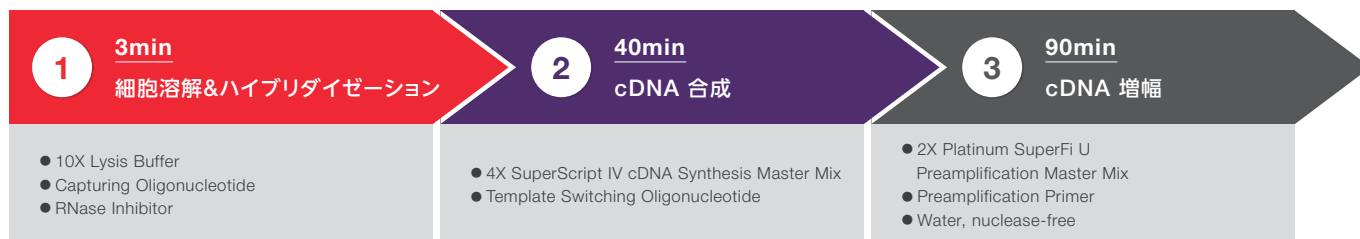
Invitrogen™ SuperScript IV Single Cell/Low-Input cDNA PreAmp Kit は、シングルセル (1-1,000個) または少量のトータルRNA (2pg-10ng) から、直接、効率的にcDNAを合成・増幅するキットです。キットには、細胞溶解、逆転写 (RT)、PCR増幅に必要なすべてのコンポーネントが含まれています。SuperScript IV Reverse TranscriptaseとPlatinum SuperFi U DNA Polymeraseの組み合わせにより、高効率、高感度、高精度なcDNA合成・増幅が可能となります。

- シンプルなワークフロー: 1チューブのプロトコルで、溶解時間と逆転写時間を短縮
- 優れた感度: シングルセルやわずか2pgのトータルRNAからcDNAを調製
- 高品質cDNA: 均一なカバレッジにより、完全長転写物の情報を取得可能
- ユニバーサルな増幅: NGSまたはqPCR解析に対応した増幅



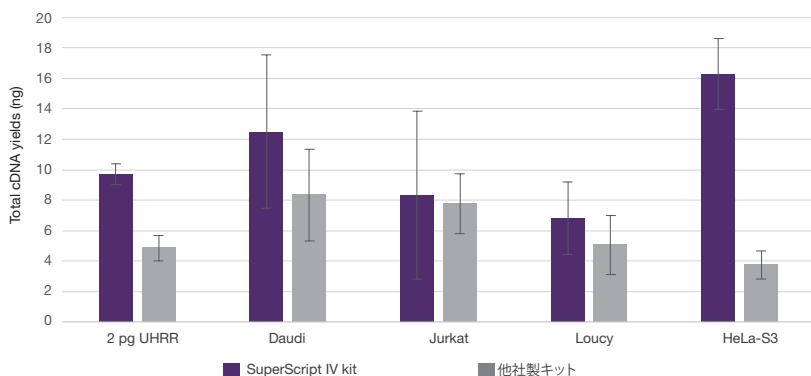
▶ シンプルで迅速なワークフローを実現

混合済みのマスターミックス試薬でRT-PCRを実施するので、ピペティングの手間を省き、優れた逆転写酵素とPCR酵素の組み合わせで、実験時間を約2時間10分に短縮できます。



▶ 優れた感度・高収量

わずかな量 (2pg) またはシングルセルからのRNAを用いて、高収量でcDNAを合成します。既存製品と比較しても同等かそれ以上の収量が得られます。



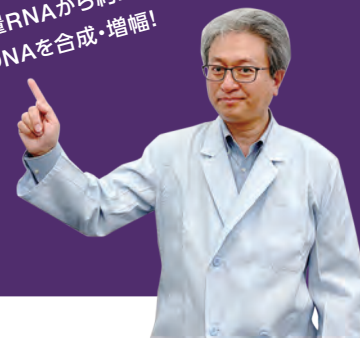
さまざまなサンプルからのcDNA収量の比較

cDNA合成とプレ増幅は、2pgの総UHRR RNAまたはインタクトなシングルセルのいずれかを用いて実施。cDNA 収量の算出には、Agilent 2100 BioAnalyzer System と Agilent High Sensitivity DNA Kit (Cat No. 5067-4626) を使用。

テクニカルスペシャリストから一言

シングルセルや微量トータルRNAサンプルからの発現解析において、Poly A 配列側からの10kb程度の逆転写が効果的に行えます。NGSやリアルタイム定量PCRにおける幅広い遺伝子領域に対する発現解析にお使いください!

微量RNAから約2時間で
cDNAを合成・増幅!



製品名	サイズ	製品番号	価格
SuperScript IV Single Cell/Low Input cDNA Preamp Kit	48 反応	11752048	¥154,000
	96 反応	11752096	¥270,000
	192 反応	11752192	¥470,000
	384 反応	11752384	¥820,000
	480 反応	11752480	¥870,000

QuantStudio MAP16 デジタルPCRプレートを用いて デュプレックスBCR-ABLアッセイを高いフレキシビリティで実行

Applied Biosystems™ QuantStudio™ Absolute Q™ デジタルPCR システムは、マイクロ流体アレイパーティショニング (MAP) テクノロジーにより、同一プレートを最大4回まで繰り返し使用できる高いフレキシビリティを備えています。ここでは、BCR-ABL1融合遺伝子の検出アッセイに適した伸長時間を検討するために、1枚のMAP16プレートを用いて4回の反復試験を実施し、最適化できた実験を紹介します。



方法

BCR-ABL1遺伝子とABL1遺伝子の両ターゲット配列を含むプラスミド (BCR-ABL pDNA Calibrant, Sigma社: 製品番号ERMAD623) を標準物質として使用し、1枚のMAP16プレートで伸長時間0秒、15秒、30秒、45秒と4回連続でQuantStudio Absolute QデジタルPCR システムを用いて解析しました。



図1 消耗品であるMAP16プレートを1実験ごとに1列ずつ4回使用して、FAM/HEXマルチプレックスアッセイのアニーリング/伸長時間を最適化しました。

結果

4通りの伸長時間において、BCR-ABL1 (FAM色素) およびABL1 (HEX色素) ターゲットに対する定量結果を図2に示します。その結果、15秒以上で正確な定量が得られました。図3は、プレート全体での解析可能なパーティション数の平均とその標準偏差、およびランごとの平均値を示します。同一のMAP16プレートを繰り返し使用しても定量性が一貫していること、さらに1ユニットあたりの解析可能なパーティション数が一貫して標準的な基準である20,000を十分に上回っていることが確認されました。本アッセイの最後に使用された列のパーティションは4回のランで合計160回の熱変化に暴露されても問題なく結果が得られたことが示されました。

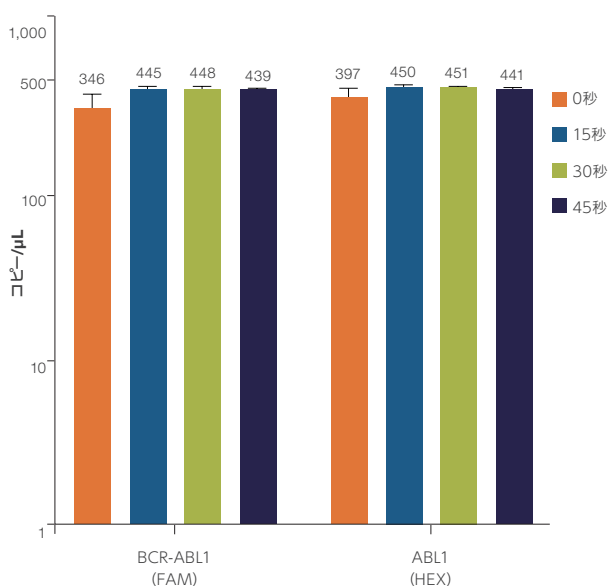


図2 異なる伸長時間における定量結果の比較

FAMおよびHEXチャンネルにおけるマルチプレックスアッセイターゲットの濃度を示します。エラーバーは標準偏差、平均値を棒グラフ上方に表示。

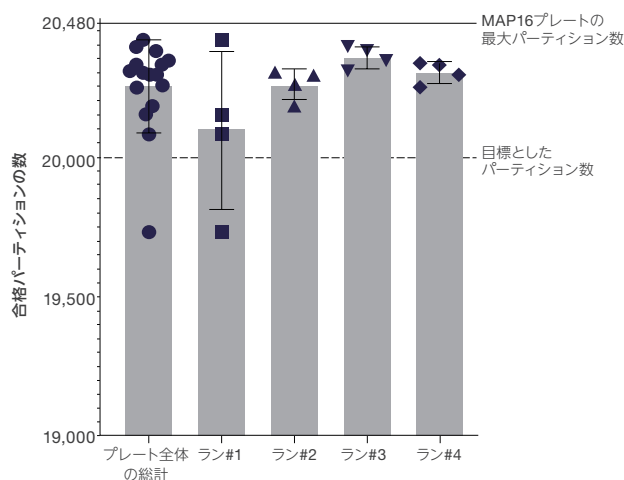


図3 1枚のMAP16プレート上の列ごとに連続ランを実行する場合の解析可能なパーティション数の比較

4回独立してランを実行し、dPCR アッセイのパフォーマンスに及ぼす伸長時間の影響を調べました。4回のランすべての平均値を一番左の棒グラフにまとめ、各ランの結果をその右側の棒グラフに個別表示しました。各点は1つのデジタルPCR アレイから得られた合計パーティション数を表します。

上野山賀久 氏(名古屋大学大学院生命農学研究所動物科学専攻准教授)

哺乳類の生殖機能を制御する脳内メカニズムの解明へ 神経ペプチド、キスペプチンの作用機序を探る



「私たちの研究室は、動物の性と生殖について『ホルモン』をキーワードとして研究を展開しています。具体的には畜産学の基礎として哺乳類の繁殖生理学、神経内分泌学に取り組み、その応用をめざしています。特に2001年に発見されたキスペプチンという神経ペプチドを発現するニューロンが、どのような機序で視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンを上位から制御するかを検証する研究を進め、生殖機能制御の中核メカニズムの解明に迫っています」と名古屋大学生命農学研究科准教授の上野山賀久氏は語ります。

GnRH分泌の2つのモードを司る キスペプチンニューロン

「下垂体前葉から分泌される2つの性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)である黄体形成ホルモン(LH)と卵胞刺激ホルモン(FSH)は協調して卵巣に働きかけ、卵胞の発育と排卵を促し、発情周期をコントロールします。ゴナドトロピン分泌はGnRHで制御され、雌の発情周期はGnRHを頂点に、「視床下部(GnRH)―下垂体(ゴナドトロピン)―卵巣(エストロゲン)軸」によって内分泌的に制御されます。GnRHの分泌にはパルス状とサージ状の2つのモードがあり、基底レベルではGnRHがパルス状に分泌され、下垂体前葉のLHとFSHの基底レベルの分泌が維持され、卵巣での卵胞発育を刺激します。LH分泌はGnRHパルスに同期した明瞭なパルス状を示します。発育過程の卵胞が分泌するエストロジェンは視床下部にフィードバックし、GnRHのパルス状分泌を抑制することでフィッシュンニングし、LHとFSHの血中レベルを適切に維持します。この作用をエストロジェンの負のフィードバック作用と言います。一方、排卵前にはGnRHの

一過性の大量放出が、LHの大量放出(LHサージ)を引き起こし、排卵を誘発します。GnRH/LHのサージ状分泌は、成熟卵胞から分泌される大量のエストロゲンによって誘起されます。この作用をエストロジェンの正のフィードバック作用と言います。このように、卵巣から分泌されるエストロジェンは正と負のフィードバック作用を介して、GnRHひいてはゴナドトロピン分泌を巧妙に制御します。これまで20年間の研究から、GnRH分泌を上位から制御するキスペプチンニューロン群は視床下部の前方と後方の2か所に局在し、前者がGnRHのサージ状分泌を、後者がGnRHのパルス状分泌をコントロールすることがわかってきました。私たちは、キスペプチン遺伝子ノックアウトラットの作製に成功し、この遺伝子改変ラットでは生殖機能を消失することを明らかにしました。また、視床下部前方のキスペプチンニューロンがGnRHサージ中枢、すなわち排卵中枢であることを示すとともに、エストロジェンの正のフィードバック作用におけるキスペプチン遺伝子発現のエピジェネティック制御機構を解明しました。さらに最近では、視床下部後方のキスペプチンニューロンがGnRHのパルス状分泌を制御する本体、すなわちGnRHパルスジェネレータであり、卵胞発育中枢であることを証明しました*」と上野山氏はこれまでの研究成果を語ります。

* PNAS February 2, 118 (5) e2009156118 (2021)

高感度な実験系の構築へ

「私たちのラボでは、古くから無拘束無麻酔のラットから数分おきに何時間も血液を採取できる手法を開発し、微量の血中LH濃度の測定には高感度のラジオイムノアッセイを使っています。この方法により、ラッ

トにおいて30分程度の間隔で起きるパルス状のLH分泌を正確に解析できます。またキスペプチン遺伝子ノックアウトラットにおける視床下部や卵巣での遺伝子発現定量は、柔軟性が高いSYBR Green色素を使って定量PCRで実施しています。一方、キスペプチン遺伝子発現は組織サンプルでは測定できても、培養細胞では発現量が低いめかうまくいきません。そこでApplied Biosystems™ PowerTrack™ SYBR Green Master Mixを試してみたところ、初期実験では良い結果を得ました。今後、再現性の確認やリアルタイムPCR専用の逆転写酵素の使用を含め、さらに感度の高い実験系を構築していく予定です。また最近、長く使用してきたApplied Biosystems™ 7500 リアルタイムPCRシステムに加え、操作性に優れたApplied Biosystems™ QuantStudio™ 3 リアルタイムPCRシステムを導入したので、実験の幅も広げていきたい」と上野山氏は語ります。

今後の展望

「近年、乳用牛および肉用牛の生産現場では、人工授精対象牛の微弱発情や、それにとともなう交配適期の見逃しなどによる受胎成績の低下が問題となっています。乳用・肉用牛の初回受胎率は年々低下しており、受胎成績の低下は乳肉の生産性の低下に直結します。畜産は動物性タンパク質を供給し、ヒトのQOLを上げるために重要な産業です。家畜を含む哺乳類の生殖制御メカニズムの解析を進め、畜産物の安定供給や農作物被害をもたらすような野生害獣の個体数管理、さらにはヒトの不妊治療への応用など、様々な形で研究成果を社会に還元していきたい」と上野山氏は話します。

PowerTrack SYBR Green Master Mix 溶液の色の変化で添加ミスを抑制



Applied Biosystems™ PowerTrack™ SYBR Green Master Mixは、使いやすい遺伝子発現解析用のリアルタイム PCR マスターミックスです。青いマスターミックスと黄色のサンプルバッファを混ぜると緑色に変化するので、添加ステップを目視で確認でき、ミスを防ぎます。

製品名	サイズ	製品番号	希望小売価格
PowerTrack SYBR Green Master Mix	1 mL	A46012	¥9,800
	5 mL	A46109	¥37,900

Attune CytPix Flow Cytometer

高精度・高速のイメージングフローサイトメーター

COMING
SOON!

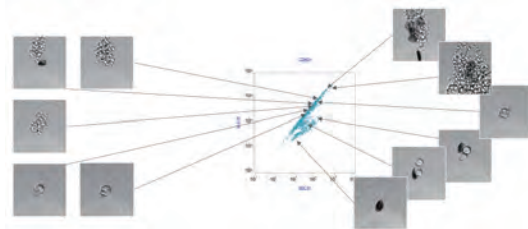


POINT

Invitrogen™ Attune™ CytPix Flow Cytometerは、高精度と高速化を同時に実現するフローサイトメーターである Invitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometer の基本性能に加え、画像情報を同時に取得できるハイスピードカメラを搭載した新しいモデルです。

- 最大1,000 $\mu\text{L}/\text{min}$ の高いサンプル処理能力
- データ精度を犠牲にすることなく、最大35,000イベント/secで測定可能
- 最大5,000 イベント/secで明視野画像を取得可能

製品詳細はこちらから → thermofisher.com/attune



希釈血液を25 $\mu\text{L}/\text{min}$ で流し、CD45+細胞の画像をハイスピードカメラで取得。FCSファイルのイベントとバックゲーティングによる画像を関連付けられます。

NEXT 3月号はいかがでしたか?

特集インタビューは、大阪大学微生物病研究所教授の荒瀬尚氏。社会的関心も高い「新型コロナウイルス感染増強抗体の発見」を中心に患者由来モノクローナル抗体のスクリーニングや免疫システムと病原体の相互作用と進化について伺いました。ユーザーボイスでは、ダイオウイカの繁殖様式、アデノ随伴ウイルスベクターの開発、遺伝子解析による臨床研究の推進や哺乳類の繁殖機構と脳内メカニズムの研究を紹介しています。新製品のセルソーターやCas9 Proteinの情報も掲載しています。そして今年Gibco™ 設立60周年。慶應義塾大学教授の岡野栄之氏に特別インタビューで今後の細胞研究の進展やGibcoへのコメントを伺いました。

読書アンケートでご感想やご意見をお寄せください。→ thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT_reader



写真提供: 名古屋港水族館 春日井隆、(株)ドキュメンタリーチャンネル 藤原英史(p.01)
photographs: ryoichi morikawa (p.02-03) / art direction & design: opportune design inc. / editing: yuko hashimoto

NEXT バックナンバーは、こちらから → thermofisher.com/NEXT

研究用にも使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

記載の価格は2021年3月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。●実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

●価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。●標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc LSG098-A2202HS

サーモフィッシャーサイエンティフィック
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jpotech@thermofisher.com
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan) [@thermofisherjp](https://twitter.com/thermofisherjp)
thermofisher.com

販売店