

である筋電図測定では、4症例中1症例で下部腹直筋、傍脊柱筋と大腿筋膜筋張筋で筋電図波形が出現し、別の1症例では下部腹直筋の筋電図波形の出現を認めている。またもう1症例では大腿四頭筋で筋電図波形の出現を認めている。これらの結果より自家嗅粘膜移植法は、2011年末に国の先進医療の認定を受けている。

Limaらは嗅粘膜移植と同時に、長期にわたるリハビリテーションの重要性を強調している。嗅粘膜移植単独またはリハビリテーション単独では回復を期待できず、骨格筋、血管さらに神経の再構築のためのリハビリテーションが必要であるとしている。どのようなリハビリテーションが理想的であるかはまだ不明としながらも、特に重力をかけた歩行リハビリテーションが重要で、これをBIONT (Brain-initiated overground nonrobotic/nonweight supported training) として提唱している¹⁰⁾。

おわりに

脊髄損傷においては、細胞療法等の単独の移植療法より他の因子等とのコンビネーション療法の方が効果的であるとの知見が発表されており、特定の細胞等の単一因子で成功を収めることは困難であろう。嗅粘膜は、細胞、軸索伸長因子、再生のための足場という3因子を兼ね備えており、現在のところ理想的な移植材料の1つと考えられる。また移植によって獲得される神経系の再構築は生来のものではなく、骨格筋、血管そして神経ネットワーク構築のリモデリングが必要であり、そのためのリハビリテーションが移植と並んで重要であるといえよう。

表 1 嗅粘膜移植 (OMA) 4 症例の患者背景と手術背景

症例 番号	OMA時 年齢	性別	脊髄損傷後 期間 (月)	脊髄損傷 レベル	損傷の長さ (cm)	AIS
1	40	男	300	T4-5	2.2	A
2	19	女	30	T7-9	2.3	A
3	26	男	17	T12	1.55	A
4	36	女	36	T7-8	2.94	A

AIS : ASIA impairment scale

参考文献

- 1) Anderson DK, Howland DR, Reier PJ : Fetal neural grafts and repair of the injured spinal cord. *Brain Pathol* 5 : 451-457, 1995
- 2) Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, et al. : Spinal cord injury : emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *Int J Biochem Cell Biol* 40 : 1649-1653, 2008
- 3) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. : Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25 : 1015-1024, 2007
- 4) Samadikuchaksaraei A : An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries. *J Neuroeng Rehabil* 4 : 15, 2007
- 5) Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, et al. : Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies : promise on the horizon. *Neurosurg Focus* 25 : E2, 2008
- 6) Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM, et al. : Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 220 : 71-81, 2009
- 7) Yamane J, Nakamura M, Iwanami A, et al. : Transplantation of galectin-1-expressing human neural stem cells into the injured spinal cord of adult common marmosets. *J Neurosci Res* 88 : 1394-1405, 2010
- 8) Filbin MT : Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4 : 703-713, 2003
- 9) Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, et al. : A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13 : 757-767, 1994
- 10) Lima C, Escada P, Pratas-Vital J, et al. : Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 24 : 10-22, 2009
- 11) Cheng H, Cao Y, Olson L : Spinal cord repair in adult paraplegic rats : partial restoration of hind limb function. *Science* 273 : 510-513, 1996
- 12) Okada S, Ishii K, Yamane J, et al. : In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 19 : 1839-1841, 2005
- 13) Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, et al. : Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137 : 257-273, 2002
- 14) Han SS, Kang DY, Mujtaba T, et al. : Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord. *Exp Neurol* 177 : 360-375, 2002
- 15) Farbman AI : Developmental biology of olfactory sensory neurons. *Semin Cell Biol* 5 : 3-10, 1994
- 16) Raisman G : Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons. *Neuroscience* 14 : 237-254, 1985
- 17) Mackay-Sim A, Féron F, Cochrane J, et al. : Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia : a 3-year clinical trial. *Brain* 131 : 2376-2386, 2008
- 18) Doucette R : Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3 : 433-449, 1990
- 19) Leaver SG, Harvey AR, Plant GW : Adult olfactory ensheathing glia promote the long-distance growth of adult retinal ganglion cell neurites in vitro. *Glia* 53 : 467-476, 2006
- 20) van den Pol AN, Santarelli JG : Olfactory ensheathing cells : time lapse imaging of cellular interactions, axonal support, rapid morphologic shifts, and mitosis. *J Comp Neurol* 458 : 175-194, 2003
- 21) Kafitz KW, Greer CA : Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25 : 99-110, 1999
- 22) Smith PM, Lakatos A, Barnett SC : Cryopreserved cells isolated from the adult canine olfactory bulb are capable of extensive remyelination following transplantation into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 176 : 402-406, 2002
- 23) Iwatsuki K, Yoshimine T, Kishima H, et al. : Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats. *Neuroreport* 19 : 1249-1252, 2008
- 24) Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, et al. : Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury : a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med* 29 : 191-203, 2006

第4章 ▶ 発生・再生研究を支える基盤技術

④ 新しいゲノム編集技術(TALEN および CRISPR/Cas9 システム)とその可能性

■ はじめに

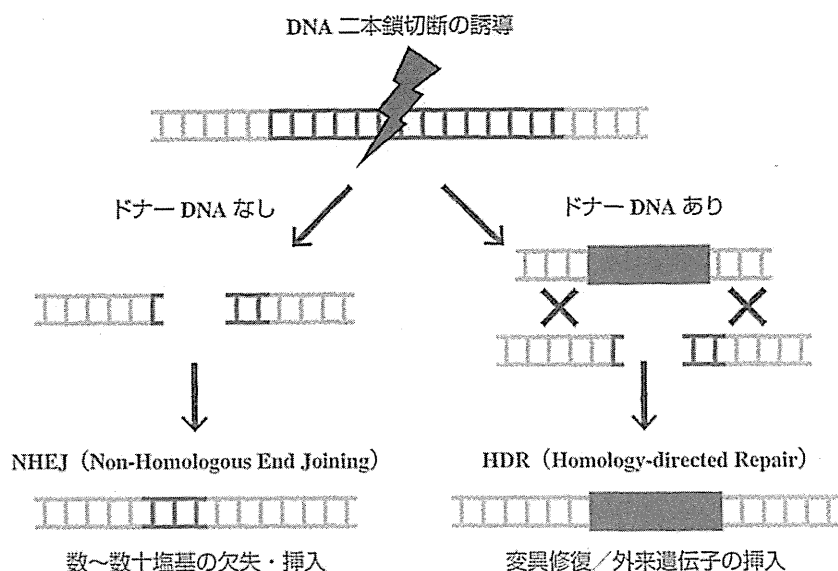
神経細胞の発生過程と回路網の形成メカニズム、さらには損傷時の修復過程を知ることは、基礎生物学の発展のみならず再生医療・臨床応用へとつながる重要な課題である。しかしながら脳は生体内で最も複雑な臓器であり、その詳細を明らかにするには優れた技術が必要となる。ノックアウトマウスをはじめとする遺伝子改変技術はこれまで脳神経科学に大きな発展をもたらしてきたが、マウス以外の生物種においては必ずしも容易ではなかった。特に新たな実験モデルとして、ヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)あるいはマモセットなどの中・大型動物種が登場するに至り、これらのターゲティングを可能にする何らかの技術革新が求められていた。

近年、多様な生物/細胞種における標的遺伝子の改変を可能にする技術として、zinc finger nuclease(ZFN) および TALE nuclease(TALEN)、さらには CRISPR/Cas9 システムが次々と開発され、これらは総称して‘ゲノム編集技術’とよばれている。この技術は Nature Methods 誌‘Method of the Year 2011’、Science 誌‘Top 10 Breakthroughs of 2012/2013’と、革新的技術の一つとして毎年のように選ばれ、大きな注目を集めている。なによりもこの技術が評価されるべき点は、その高い効率性に加えて、‘だれでもはじめることができる’という簡便さにある。

本稿では、この新しいツールでありながら急速に進歩し続けているゲノム編集技術について概説し、その応用と注意点について紹介したい。

1 ゲノム編集の基本原則

従来の遺伝子ターゲティングは、ES 細胞において自然に、ランダムに起こる DNA の相同組換えを利用している。そのため生殖系列に寄与できるような ES 細胞が樹立されていない、あるいは相同組換え頻度が極端に低い細胞/動物種では、この技術を用いることができず、またその効率も極めて低い。これに対しゲノム編集技術では「ゲノム上の特定の領域を狙って DNA 二本鎖切断(double strand break: DSB)を引き起こし、その位置で特異的に起こる DNA 修復メカニズムを利用して遺伝子改変を行う」ことを基本原則としている(図 1)。DSB はゲノム不安定性や発がん、細胞死などにつながる重篤な損傷であるため、その部位に非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)あるいは相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)とよばれる修復機構が活発に引き起こされる。非相同末端結合とは、切断されたゲノムの末端同士が配列欠失を伴ったまま結合する反応であり、この反応を利用することによって目的の遺伝子配列内に数~数十塩基対の欠失や挿入を誘導することができる。一方、相同組換え修復とは、姉妹染色体の相同領域を鋳型として組換えを起こすことで切断部位を元どおりに修復しようとする反応であり、相同配列をもつターゲティングベクターを導入しておくことで標的部位への外来遺伝子の挿入が可能となる。惹起されるこれらの作用は強く、以下に述べる ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 のいずれであれ切断効率の高いものさえ合成できれば、これまで困難であった細胞種において単一遺伝子改変はもち



■図1 ゲノム編集技術のメカニズム

ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9を細胞内に導入すると、DNA結合部位がゲノム上の標的部位を認識し、その部位でDSBを起こす。ドナーDNAが存在しなければNHEJによる塩基欠失・挿入が起こり、相同領域をもったドナーDNAの存在下ではHDRによる変異修復あるいは外来遺伝子の挿入が可能となる。

ろん、複数の遺伝子あるいは同一遺伝子の両方のアレルへの改変が、いずれもワンステップで行えるなどすばらしい効果が期待できる。

2 三つのゲノム編集技術

配列特異的なDSBを効率よく引き起こす試みとして最初に開発され、大きなインパクトを与えたのがZFNである¹⁾。しかし作製に多大な労力と経験が必要であったこと、市販のZFNが高額であったことなどから大きな広がりは見られず、ごく一部の研究者に使われるにとどまった。代わって開発されたTALENは、基本的なキットさえ手に入ればだれにでも簡便に合成可能な系が確立され、またたく間に広まった。このTALENの登場によってゲノム編集技術ははじめて市民権を得るに至ったといえよう。

ZFNとTALENはいずれも、配列特異的に結合する「DNA結合ドメイン」と、タイプIIs制限酵素FokI由来の非特異的「DNA切断ドメイン」をつなぎ合わせたキメラ蛋白からなり、「人工ヌクレアーゼ」とよばれる。ゲノム上の近接する二つの標的配列を認識する人工ヌクレアーゼ1組を導入すると、近づいたFokIが二量体を形成することによって切断活性をもち、ゲノム上にDSBを引き起こす。ZFNとTALENのDNA切断ドメインは共通であり、両者の違いはDNA結合ドメインにある。

1) Zinc Finger Nuclease (ZFN)

ZFNのDNA結合ドメインは、 C_2H_2 型 zinc finger モジュールが3〜6個つなぎ合わされたものである(図2)。Zinc finger モジュール1個がDNA配列の3塩基対を認識するが、並べた zinc finger モジュールは相互に強く影響し合うため、標的配列から想定されるモジュールを単純に並べるだけでは十分な活性は得られない。3個の zinc finger をランダムにつなぎ合わせた zinc finger アレイ・ライブラリーの中から最適な組み合わせをバクテリア・ツーハイブリッド法によってセレクトする方法(OPEN法)なども開発されたが、要した時間と労力(そして研究費)に見合うような十分な効果はみられなかった。

2) TALE Nuclease (TALEN)

大きな期待と注目を集めながら、ZFNが一部のコアユーザーによる利用にとどまるなか、新しいタイプの人工ヌクレアーゼとしてTALENが発表された²⁾。植物病原細菌であるキサントモナス属細菌は自身の転写活性因子様蛋白質(Transcription Activator-like Effector: TALEs)を植物細胞内へ注入し、これが宿主のDNAに結合してその遺伝子制御を変えることによって攻撃する。このTALEsのDNA結合ドメインを利用し、ZFNと同様にFokIの非特異的切断ドメインをつなぎ合わせたものがTALENである(図3)。

TALENの利点の一つは、標的配列に対応する

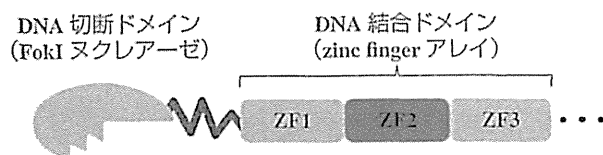


図2 Zinc finger nuclease (ZFN)

ZFN は制限酵素 FokI の非特異的切断部位にリンカーを介して zinc finger 3 ~ 6 個(図中では 3 個)つながったもので構成される。DNA 切断ドメインが DSB を起こすには二量体を形成しなくてはならず、そのため標的部位において左右一組の ZFN を導入する必要がある。

TALE 配列をほぼ 1 対 1 で決めることができ、デザインが容易であることである。またこの技術が大きく広まった最大の理由は、初心者でも自作可能な TALEN 作製用の基本キットが開発され、Addgene(<http://www.addgene.org/>) から安価に入手できる点にある。現在すでに開発されている TALEN 作製キットは複数あるが、そのなかでも特筆すべきは 'Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0' であろう。わずかな時間と労力で、ほんの数日のうちに目的の TALEN を作製できるという優れたキットである³⁾。使用する細胞とベクターとの組み合わせによっては切断効率/特異性などが大きく変化するため、バックボーンベクターの選択に注意が必要である。すでに様々な付属プラスミドが Addgene から提供されており、自分の細胞系や用いたい FokI のタイプに応じて最適なセットを選ぶことができる。

広島大学の佐久間・山本らは、TALEN の DNA 結合モジュール内に改変を加えることでさらに改変効率の高い TALEN 作製キット (Platinum Gate TALEN Kit; Addgene #1000000043) を開発した⁴⁾。作製の容易さはこれまでどおり、しかしその活性は数倍以上という優れたもので、従来の TALEN ではうまくいかなかったようなゲノム編集がこの系を用いると見事に成功した、という事例をすでに多く経験している。これから TALEN を導入しようと考えてい

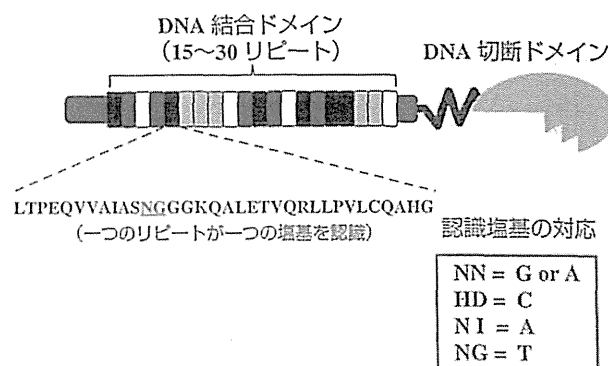


図3 TALE nuclease (TALEN)

TALEN は、FokI 非特異的切断部位と TALE effectors の DNA 結合ドメイン (15 ~ 30 リピート) を連結したものである。各リピートは通常 34 個のアミノ酸配列からなり、12, 13 位の残基配列の組み合わせにより、各リピートにつき一つの塩基が認識される (例として図中のリピートは T を認識する)。

る方には特におすすめである。

3) CRISPR/Cas9 システム

TALEN が注目を集めるなかで、さらに次世代の技術として開発されたものが CRISPR/Cas9 システムである。細菌や古細菌の一部にみられる獲得免疫機構の一つを応用したもので、TALEN よりもさらに迅速かつ簡便にゲノム編集が可能となった⁵⁻⁷⁾。これらの細菌は CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) とよばれる 24 ~ 48 bp の短い反復クラスターと、その近傍に Cas (CRISPR-associated) genes という遺伝子群をもっている。まず外部から侵入したウイルスなどの外来性 DNA は、Cas 蛋白の一つによって断片化され、CRISPR 座位に挿入される。これらの挿入配列は免疫的な記憶となり、再感染時には挿入配列を含んだ crRNA (CRISPR RNA) と tracrRNA (trans-activating crRNA) という二つの小分子 RNA が生成される。この crRNA/ tracrRNA は侵入してきた外来 DNA を配列特異的に認識するガイド役となり、Cas9 スクレアーゼを誘導することで標的配列を切断・除去する。

ゲノム編集に用いられる CRISPR/Cas9 システムでは、crRNA と tracrRNA をキメラとした sgRNA (single guide RNA) が標的を認識し、Cas9 スクレアーゼが DSB を行うことになる (図

4). TALENと同様、すでに多くの発現ベクターがAddgeneに寄託されているが、特に多く使用されているのはpX330(pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9; Addgene #42230)であろう。このベクターにはsgRNAとCas9の両方の発現カセットが搭載されているため、「標的配列20塩基を含む合成オリゴヌクレオチドをオーダーし、それをpX330ベクターに挿入する」、ただそれだけで目的のCRISPR/Cas9ができあがってしまうことになる。標的配列の設定から目的のクローンを得るのに3日しかかからない、しかも準備に必要なマテリアルはベクタープラスミド一つだけ、という驚くべき簡便さである⁸⁾。わずかに制限があるとすれば、Cas9が標的配列を切断するにはPAM(proto-spacer adjacent motif)配列とよばれる特定の短い配列が必要であるため、標的配列を選択する際に留意しなくてはいけないという点であろうか。たとえば現在広く用いられている化膿連鎖球菌由来のCas9を用いる場合には、5'-NGG-3'という配列のすぐ上流の20bpを選ぶ必要がある。しかしこの技術の圧倒的な利点の前にはそれほど大きな制約ともいえないし、今後の改変によってはこのような制限もなくなるかもしれない。

3 ゲノム編集技術の留意点

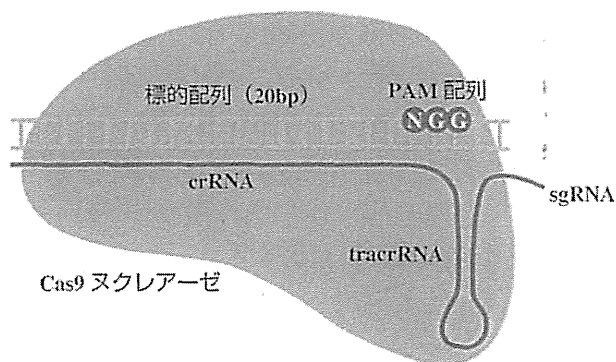


図4 CRISPR/Cas9 システム

CRISPR/Cas9 システムは、sgRNA(crRNA と tracrRNA のキメラ)と Cas9 スクレアーゼとからなる。PAM 配列直前の 20bp を認識する sgRNA が Cas9 タンパクと複合体を形成し、DSB を起こす。

1) オフターゲット作用

ゲノム編集を用いるときに大きな注意が必要なのは、非特異的切断の可能性についてであり、これをオフターゲット作用とよぶ。このような想定外のゲノム切断は遺伝子機能解析を困難にするばかりか、細胞あるいは個体の死を引き起こす場合すらある。マウスならば戻し交配を繰り返すことによって修復可能であるが、培養細胞系では重大な問題となろう。したがってオフターゲット作用を回避するために、あらかじめゲノム内に類似した部位がない特異性の高い配列をターゲットとして選ぶことが大切である。そのほかには、異なる FokI ドメインによってのみ二量体が形成される‘ヘテロダイマー型ヌクレアーゼ’をTALENに用いたり⁹⁾、標的部位にDSBでなく一本鎖だけの切断(ニック)を引き起こす‘double nickase’を用いる方法も報告されている^{10,11)}。

2) ツールの選択：TALENかCRISPR/Cas9か？

では実際にはじめて使用する場合、どのゲノム編集ツールを選ぶべきだろうか。ZFNは多くの実績があり、市販されているもののなかには確かな活性が保証されているものもある。したがって費用の点で問題なければ、このような市販品を購入するのもよいだろう。しかし今後研究室で自作する予定であれば、いまZFNを選択するメリットは見出しがたい。

自作の簡便さを第一とするならば、CRISPR/Cas9 システムにまさるものはない。また複数の部位を同時に改変したい場合も、やはりCRISPR/Cas9に一日の長があるように思われる。ただしこのシステムでは(double nickaseを用いない限り)ゲノム認識配列が20bpと短いため、ペア一組で使用するTALENと比較するとオフターゲット作用が起こる危険性が高い。

切断効率についてはZFN、TALEN、CRISPR/Cas9のあいだに大きな差はない。ただしPlatinum Gate TALENは別格で、これらの数倍の効率を期待できるであろう。こちらまたただか5日間で合成可能な優れたキットであり、その高い効率を考えるとCRISPR/Cas9システムにま

さるとも劣らない。

もし複数遺伝子の同時ノックアウトが必要であったり、オフターゲットが発生しても戻し交配などで修正可能な場合などは、とりあえず CRISPR/Cas9 の系を立ち上げればよいだろう。しかし CRISPR/Cas9 で改変がうまくいかない遺伝子の場合や、将来的にゲノム編集技術を本格的に使っていきたいと考えているならば、Platinum Gate TALEN を alternative な方法としてもっておくと非常に心強いし、オフターゲットについて考慮しても安心感がある。CRISPR/Cas9 と Platinum TALEN はどちらか片方を選ぶべきものではなく、その両方を備えておいて用途に応じて使い分けるべきであろう。

4 ゲノム編集技術の応用

1) ノックアウトマウス作製への応用

ゲノム編集技術は、テクノロジーとしてはすでに十分確立していたはずのノックアウトマウスの作製にも大きな影響を及ぼしつつある。従来の作製法では、ターゲティングコンストラクトの作製(数か月)、ES 細胞でのスクリーニング(1 か月)、胚盤胞への注入とキメラ作製(1 か月)、野生型との交配による生殖系列への寄与の確認(6 か月)、兄妹交配によるホモ化(6 か月)、さらに C57BL/6 系統への戻し交配(2 年)、と最低でも数年の年月が必要であった。挙げ句の果てに表現型がみられず、最終学年になって途方に暮れる大学院生もみられたものである。

しかし現在では、マウス受精卵の細胞質へ TALEN あるいは CRISPR/Cas9 プラスミドをそのまま注入すれば、3 週間後には F0 世代が生まれ、非常に高い確率で変異マウスが得られる。しかもある一定の確率で両アレルでの変異導入が認められ、驚くべきことに F0 世代で早くもホモ欠損マウスを得ることができてしまうのである。CRISPR/Cas9 システムと C57BL/6 マウス受精卵の組み合わせで行ったとすれば、合成オリゴヌクレオチドをオーダーしてから最短で 1 か月以内に、'C57BL/6 系統のホモ欠損マウス' が得られてしまうのである。同時に二か所・三か所の遺伝

子破壊すら可能であり¹²⁾、'夢のような'という形容詞こそふさわしい。

2) ヒト iPS 細胞への応用

ヒト ES/iPS 細胞においてもゲノム編集は威力を発揮する。Puromycin / neomycin などの薬剤選択マーカーを用いた場合、ピックアップしたコロニーの 8 割以上で標的部位への正確な遺伝子挿入が認められ、しかも 2~3 割で両アレルへの挿入がみられる。また Platinum Gate TALEN のように活性の高いものを利用すれば、薬剤選択を経ずに NHEJ による数塩基欠失株を得ることも可能である。われわれの研究室では遺伝子ノックアウトはもちろん、数塩基欠失モデルの作製、20kb の外来遺伝子の挿入、染色体そのものの欠失、同一染色体上での 5Mb の領域欠失など、多彩なゲノム/染色体改変に成功しており、このツールを用いることでヒト疾患の病態解析が大きく進むであろうということを強く感じている。

5 今後の展望

ゲノム編集技術は短期間に大幅な技術開発がなされ、多くの動物種でノックアウトモデルが樹立された。なかでも行動実験や薬理・生理学実験におけるデータが豊富に蓄積されているラットでの遺伝子改変が可能になったことや^{13,14)}、マーマセツトなど非ヒト霊長類でのノックアウト作製が進みつつあることなどから、今後ヒト神経疾患の病態解析・再生医療、高次脳機能解析、創薬研究などへと広く利用されていくだろう。またスクリーニングとしての機能にとどまらず、異なる生理活性ドメインや蛍光分子などをつなぐ技術も報告され^{10,15,16)}、さらに革新的な応用法が出現すると期待されており、注目に値する。

(北畠康司)

◎文献

- 1) Le Provost F. et al. : Trends Biotechnol 28 : 134-141, 2010
- 2) Christian M. et al. : Genetics 186 : 757-761, 2010
- 3) Cermak T. et al. : Nucleic Acids Res 39 : e82, 2011
- 4) Sakuma T. et al. : Sci. Rep 3 : 3379, 2013
- 5) Cong L. et al. : Science 339 : 819-823, 2013

- 6) Mali P, et al. : Science **339** : 823-826, 2013
- 7) Jinek M, et al. : Science **337** : 816-821, 2012
- 8) Ran FA, et al. : Nat. Protoc **8** : 2281-2308, 2013
- 9) Doyon Y, et al. : Nature methods **8** : 74-79, 2011
- 10) Mali P, et al. : Nat. Biotechnol **31** : 833-838, 2013
- 11) Ran FA, et al. : Cell **154** : 1380-1389, 2013
- 12) Wang H, et al. : Cell **153** : 910-918, 2013
- 13) Geurts AM, et al. : Science **325** : 433, 2009
- 14) Mashimo T, et al. : Sci. Rep **3** : 1253, 2013
- 15) Chen B, et al. : Cell **155** : 1479-1491, 2013
- 16) Miyanari Y, et al. : Nat. Struct. Mol. Biol **20** : 1321-1324, 2013

