

平成 31 年 2 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14802

研究課題名(和文) RNA干渉法を用いた母性mRNAノックダウンによる不稔化エゾアワビ種苗の作出

研究課題名(英文) Development of maternal mRNA knock-down system using double-strand RNA in abalone embryos

研究代表者

竹内 裕 (TAKEUCHI, Yutaka)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教

研究者番号：70418680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉法による不妊化アワビの種苗生産するための基盤技術の開発を行った。RNA干渉法に着目し、アワビの初期胚内で生殖細胞の発生に必須な母性因子を一時的に減少させた状態で発生させる条件を決定した。標的遺伝子として、vasa遺伝子を選定し、約300bpのdouble strand RNA (ds-RNA)を合成し、産卵直前のアワビ卵巣へ注入した。ds-RNAには、あらかじめDIG標識を施し、注入後のds-RNAの挙動を調べたところ、注入後3時間以降で、卵母細胞内に移行することが明らかとなった。さらに、このアワビを産卵させることで、受精卵内で母性vasa mRNA量を減少させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The sterilization of artificial seeds of abalone is an ideal strategy to promote faster growth and to avoid sexual precocity. Recently, RNA interference (RNAi) is the popular method for the production of sterile animals in vertebrates and invertebrates, and identification of target gene for this technology is a crucial step to the production of sterilization. To evaluate effects of vasa gene knockdown, the dispersion and inhibitor effect of vasa dsRNA in ovary were examined. After 12 hours post-injection, dsRNA with vasa DIG-labelled delivered to full-grown oocytes of female. Expression levels of vasa in RNAi group using 3 different dose of dsRNA were significantly lower than control group at 7 days post-injection (dpi) and 14 dpi. Similar inhibitor effects were observed in unfertilized eggs and 8-cell stage of embryos. The results suggest that RNAi of vasa gene can be effectively utilized in oocytes and early embryos of pacific abalone to reduce amount of mRNA level.

研究分野：水産養殖学、発生・生殖工学、水産繁殖学

キーワード：アワビ 胚発生 vasa RNA干渉 qPCR 卵巣 卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

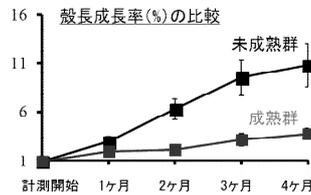
韓国・中国ではエゾアワビの大規模な海面養殖事業が行われており安価な輸入アワビは、国内のアワビ生産地に対する脅威となっている。国内では、エゾアワビの陸上養殖について水処理や廃熱利用等のハード面での陸上養殖技術開発が進む一方、ソフト面すなわち養殖に適したアワビ品種の開発はほとんど行われていない。アワビ養殖においては、春・秋の産卵期が鬼門であり、2歳(殻長7cm)以上の個体では、産卵期は身痩せしハンドリングに弱くなるうえ、水揚げ後に卵巣が肥大化し大量斃死する例が知られている。さらに、アワビ人工稚貝は、天然稚貝とは異なり、1歳(殻長4cm)でも排卵・排精が可能なまでに成熟する。そこで、本研究では、性成熟に起因する成長停滞や斃死を回避することで高成長・高生残な養殖用品種を開発するため、RNA 干渉法を用いたアワビ不稔化技術の開発を行なった。

アワビ養殖が抱える産卵期のリスク

①水揚げ後に卵巣が急激に肥大し斃死した養殖エゾアワビ(殻長7cm)



②稚貝(殻長3cm)でも、未成熟個体のほうが成熟個体より成長が早い



RNA干渉法の利用により、不稔化エゾアワビ品種を開発

産卵期の斃死や成長停滞を回避する!

・養殖用種苗として利用

・本不稔化技術をマガキ等の他の海産無脊椎動物に応用

2. 研究の目的

本研究では、標的 mRNA のみを選択的に破壊する RNA 干渉系をアワビへ応用し、不稔化アワビの作出およびその量産化を目指した。生殖細胞の分化に必須の遺伝子として *vasa*、*nanos* が知られている。ショウジョウバエでは、これらの遺伝子を母性 mRNA として蓄えることができない変異卵は、生殖細胞を欠損する不稔化個体となる。これを人為的に再現できれば不稔化アワビが作出できると考えた。

解放血管系を有する無脊椎動物では、RNA 干渉に用いる 2 本鎖合成 RNA を筋肉注射によって容易に全身の細胞に導入できるため、アコヤガイの真珠層形成に参与するタンパク質の機能解析や、オニテナガエビのインスリン様遺伝子の破壊による性転換誘導(♂から♀へ)などに利用されている。本研究では、産卵直前のアワビ母貝卵巣へ、*vasa*、*nanos*

に特異的に結合する 2 本鎖合成 RNA を注射し、それらを卵母細胞内に浸透させ、標的母性 mRNA への結合・分解を誘起する。その後産卵誘発し、*vasa*、*nanos* の各 mRNA を一時的に欠損させた受精卵を生産させる(母性 mRNA ノックダウン法と命名)(図 1)。本法で得られた稚貝は、性成熟にエネルギーを費やすことがないため成長が早く、身痩せや卵巣肥大化などによる産卵期の斃死も起こらないことが期待される。

3. 研究の方法

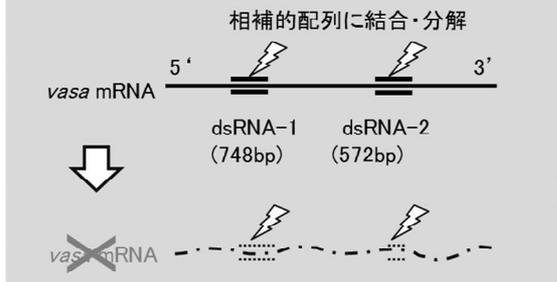
アワビ受精卵内に蓄積される母性 mRNA のなかから、生殖細胞の形成に参与することが予想される *vasa* および *nanos* を単離し、これらを標的とした RNA 干渉を実施した。そのほか、アワビ生殖腺および未受精卵を用いたトランスクリプトーム解析から、RNA 干渉によるアワビ不稔化を達成するための新たな標的遺伝子(生殖細胞関連遺伝子)の候補を探索した。特に、無脊椎動物ではこれまで同定されていない *dead end* 遺伝子(*dnd*)の単離を試みた。また、減数分裂マーカーである抗ヒト DMC1 抗体を用いて、アワビ生殖細胞の免疫染色方法を開発した。

4. 研究成果

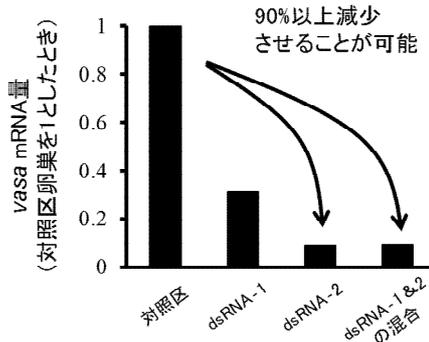
まず、RNA シークエンス法による網羅的遺伝子発現解析を行い、クロアワビの受精卵に母性 RNA として存在し、生殖細胞の発生に参与すると予想される候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子について、RT-PCR および *in situ hybridization* 法を用いて、アワビの各体組織および初期胚における詳細な発現解析を行った(図 1)。

続いて、近年、海産無脊椎動物への適用例が多数報告されている RNA 干渉法に着目し、アワビの初期胚内で生殖細胞の発生に必須な母性因子を一時的に消滅あるいは減少させた状態で発生させる技術の最適条件を決定した。ノックダウンの標的遺伝子として、エゾアワビの生殖細胞で発現する *vasa* 遺伝子を選定した。*vasa* 遺伝子に対する約 300bp の double strand RNA (ds-RNA) を合成し、産卵直前のアワビ卵巣へ注入した。double strand RNA には、あらかじめ DIG 標識を施し、注入後の ds-RNA の挙動を調べたところ、注入後 3 時間以降で、卵母細胞内に移行することが明らかとなった。具体的には、dsRNA を注入した母貝に対し、注入後 6 時間以降に産卵誘発を行い、得られた受精卵で標的遺伝子の mRNA 量が 50~90% 減少することを確かめた。さらに、このアワビを産卵させることで、受精卵内で母性 *vasa* mRNA 量を減少させることに成功した。これらの受精卵は、正常に成長することを確認したが、生殖細胞欠損の表現系を示すかについては、現在継続して調査を行っている。本研究の前半部分については Marine Biotechnology に受理された。

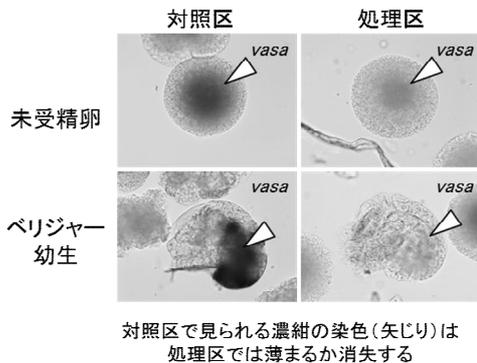
エゾアワビ *vasa* 遺伝子のRNA干渉の標的部(2か所)



RNA干渉処理3日後の卵巣での *vasa* 発現量の比較(定量的PCR)



RNA干渉処理後の母貝から得られた未受精卵・幼生での *vasa* 発現量の比較 (In situ hybridization)



対照区で見られる濃紺の染色(矢じり)は 処理区では薄まるか消失する

アワビ幼生・稚貝における不稔化の確認方法

vasa mRNAノックダウン幼生では始原生殖細胞の分化が阻害され、不稔化が達成されるか？

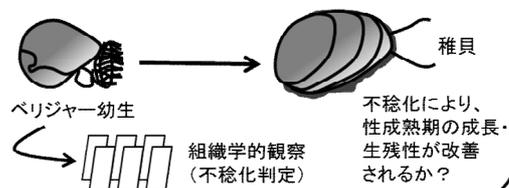


図1. 2本鎖合成RNAによる *vasa* mRNA の分解と効果判定に用いる定量的PCR法およびIn situ hybridization法

しかしながら、RNA 干渉を経て生産した稚貝において、期待される表現型(すなわち、生殖細胞の欠損)を確認するまでには至って

いない。これを解決するために次項に示す 3つの対策(1.免疫染色による生殖細胞欠損型の早期判定法、2.RNA 干渉の標的遺伝子の変更、3.ゲノム編集技術の利用)を立て研究を推進している。

(1)免疫染色による生殖細胞欠損型の早期判定法:抗ヒト DMC1 抗体を用いた蛍光免疫染色によりアワビの精原細胞を識別可能であることを示した。ウニでは、同抗体を用いて、初期胚内で生殖細胞の起源となる細胞を標識できることが報告されている。今後、アワビにおいても初期胚を用いて同様の実験を行い、始原生殖細胞あるいはその起源となる細胞の局在および数を把握できるようにすることで、生殖細胞欠損型の早期判定法を達成する。

(2)RNA 干渉の標的遺伝子の変更:これまで RNA 干渉の標的として用いてきた *vasa* 遺伝子は、広範の動物種において生殖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が、無脊椎動物および魚類の初期胚では腹側の分化に関与することも知られており、本研究における RNA 干渉の効果がアワビ胚の形態形成異常を引き起こし、生残性の不稔化個体を得られにくい状況を生み出している可能性がある。そこで、RNA 干渉の標的遺伝子を母性 mRNA のみに限定することなく、より生殖細胞に限局して発現する遺伝子を標的とすることで、不稔化個体の生産効率の向上を実現したい。新たな候補遺伝子として、*dnd* 遺伝子および *dmc1* 遺伝子のアワビホモログに対する RNA 干渉試験を実施し、その効果を判定する。

(3)ゲノム編集技術の利用:これまでの実験で、アワビ成熟卵巣内に注入した 2 本鎖合成 RNA は、卵母細胞内に取り込まれることが確認されている。そこで、同様に合成 RNA の細胞内への注入により、目的遺伝子の改変あるいは機能阻害が可能な CRISPR/CAS9 法を用いて、生殖細胞の分化形成に必須な遺伝子を改変可能であるかを調査する。ゲノム編集による改変の標的遺伝子は、減数分裂に必須と考えられる *dmc1* 遺伝子とする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Lingyun Yu, Dongdong Xu, Huan Ye, Huamei Yue, Shioh Ooka, Hidehiro Kondo, Ryosuke Yazawa, Yutaka Takeuchi, Gonadal transcriptome analysis of pacific abalone *Haliotis discus discus*: identification of genes involved in germ cell development, Marine Biotechnology、査読

有、2018、DOI: 10.1007/s10126-018-9809-5

〔学会発表〕(計 2 件)

1 . Lingyun Yu, Shioh Ooka, Huan Ye, Dongdong Xu, Hidehiro Kondo, Ryosuke Yazawa, Yutaka Takeuchi, Expression pattern of vasa gene in germ cells and vasa-dsRNA mediated RNA interference in oocytes and early embryos of pacific abalone (*Haliotis discus discus*), International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017 年

2 . Lingyun Yu, Huamei Yue, Shioh Ooka, Yasuko Ino, Ryosuke Yazawa, Yutaka Takeuchi, Gonadal transcriptome analysis of abalone (*Haliotis discus discus*): identification of genes involved in germ cell development, 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学水産学部 水産資源科学分野
(増養殖学コース) 竹内裕研究室
<https://www.facebook.com/Kagoshima.Univ.Takeuchi.Lab/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹内 裕 (TAKEUCHI, Yutaka)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教
研究者番号： 70418680

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

ウ リョウウン (YU, Lingyun)