

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04965

研究課題名(和文) 遺伝子ノックアウト/インによる魚類精子形成のコントロール

研究課題名(英文) Control of fish spermatogenesis by genome editing

研究代表者

藤本 貴史 (FUJIMOTO, TAKAFUMI)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：10400003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュとドジョウにおいて、魚類の精子鞭毛運動と精子変態に関するそれぞれの遺伝子をCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による雄特異的な不妊化技術の開発を行った。各遺伝子で生殖細胞ゲノムにフレームシフト変異の導入に成功し、F0世代で当該遺伝子に変異をもつ精子の形成を確認した。これらは運動能を持ち、野生型との交配により変異をヘテロでもつF1世代が誘起された。しかしながら、精子変態関連遺伝子のホモ変異体では定型外翻訳あるいは重複遺伝子によると思われる機能的な精子の形成が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換え技術やゲノム編集技術により作出された個体の養殖利用において、不妊化技術は生物学的封じ込めのために必須である。現在の不妊化技術は1世代限りであるため不妊形質は遺伝しないが、本研究による不妊化は雄特異的であるため、人為的な単為発生が可能な魚類では雌による変異体の継代が可能である。そのため、精子形成に関する遺伝子機能解析のモデルとして有用であるとともに、全メス生産の養殖集団に適用することで、予期せぬオスの出現による遺伝的攪乱を未然に防ぐ不妊化技術として展開できる。

研究成果の概要(英文)：Artificial induction of infertile fish is necessary for application of transgenic and genome edited fish for aquaculture. In this study, mutation of genes associated with sperm flagellum movement and spermiogenesis were induced by genome editing using CRISPR/Cas9 in order to develop novel male specific sterilization in zebrafish *Danio rerio* and dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. We successfully induced frame shift mutations in the both genes in germ cells of F0 individuals, because the F0 males produced sperm with the mutations. The sperm showed motility as well as wild type and could fertilize to induce F1 generation. F2 generation with homozygous deficiency of spermiogenesis related gene was successfully produced by mating within F1 individuals of heterozygous mutation. But production of functional sperm was observed in the F2 generation. The unexpected functional sperm production might be caused by illegitimate translation and/or expression of orthologue genes.

研究分野：魚類育種遺伝学

キーワード：ゲノム編集 精子形成 不妊化

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子組換え魚の養殖利用が北米で認められ、予期せぬ自然界への逃亡による遺伝的汚染を未然に防止する技術として、個体の不妊化技術の開発が行われている。養殖魚への不妊化技術の利用は、遺伝子組換え魚に対してのみならず、遺伝的に均一な養殖集団の天然への逸散による遺伝的攪乱を未然に防げるため、遺伝的保全の一環からも重要である。また、実際の養殖集団における三倍体化による不妊化個体は、特に雌において卵巣の発達が見られず、卵巣の発達に使われるエネルギーが成長に回るとともに、成熟に伴う肉質低下が起こらないことから、一般的な技術として広く認識され、実用化されるに至っている。

一方、異種との交雑による雑種や染色体操作による三倍体では様々な配偶子形成のタイプが観察される。遺伝的に近縁な種間での交雑では雌雄ともに妊性をもつことが多いが、遠縁の種間では多くの場合が不妊となる。また、雌雄での妊性が異なる時は、雄は不妊で雌が妊性の場合が多く、これら妊性のある雌では非還元卵を形成することが複数の魚種で報告されている。妊性をもつ雌では卵巣が発達するが、不妊の雌の卵巣は全く発達せず退化する。このように、雌では両極端であるのに対して、不妊雄の精巣は二倍体とほぼ変わらない程度まで発達する。しかしながら、減数分裂や精子形成過程で異常が生じ、産出される精子には染色体の分離異常や、複数の鞭毛形成や運動性の低下が観察される。

これまで、研究代表者らはドジョウを材料に用いて、様々な倍数体の誘起や交雑を行い、配偶子形成には個体のゲノム構成が強く影響することを明らかにした。また、ドジョウには雌性発生によってクローン生殖を行うクローン系統が存在し、これらは遺伝的背景が異なるドジョウの系統間の交雑に起源し、異なる2種のゲノムによって構成されている。クローン系統は自然には雌のみが存在しており、正常な受精・発生能を有する非還元卵形成によって再生産しているが、人為的に性転換することによってクローン系統で雄個体(以下、クローン雄)を誘起することができる。クローン雄は、非還元配偶子形成によって自身と遺伝的に同一の二倍性クローン精子を産出するが、その精子は運動能をほとんど有さない。クローンドジョウと野生型ドジョウのトランスクリプトーム解析より、クローン雄では精子鞭毛形成関連のダイニン重鎖関連タンパク質(以下、dnaaf)が発現しておらず、このダイニン重鎖における異常がクローン雄由来二倍性精子の極度な運動性低下の原因であることが予想された。すなわち、クローン系統は非還元クローン配偶子の産出だけでなく、性転換した場合には精子形成に異常を示す変異体と捉えることができる。

このような雄に特異的な不妊現象は、マウスにおいて精子変態開始に関与する遺伝子(以下、CREM)の変異体において報告されているが、魚類では未だこのような変異体は知られていない。哺乳類では生殖細胞や配偶子に異常をきたす変異体は系統の維持が困難であるが、魚類では染色体操作による人為的な単為発生や、性ホルモンによる性統御技術により性転換が可能であることから、容易に変異系統の維持を行うことができる。しかしながら、この性の不安定さが魚類の不妊技術の危うさでもあり、全雌三倍体による不妊集団を誘起しても、一部に性転換個体が生じ、受精能を有する精子を形成する可能性がある。そのため、完全な生物学的封じ込めには複数の不妊技術を併用することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

既存の不妊化技術では、倍数体化や交雑によりゲノム構成を変化させることで減数分裂過程の対合不全などの利用や、配偶子に分化する大元の細胞である生殖幹細胞を欠損することを利用してきた。本研究では、クローンドジョウで見られるように、精子形成は起こるものの、形成された精子が機能を持たないことによる不妊や、精子形成で精子変態での以上による正常な機能を有する精子の形成不全による不妊に着目し、それらに関与する遺伝子の機能不全をゲノム編集技術により誘起し、雄特異的に不妊性を示す変異体を利用した新規の魚類不妊化技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

供試魚にはドジョウとゼブラフィッシュを用いた。ドジョウでは、遺伝的背景が異なる2系統(A,B)と、雌性発生によりクローン生殖するクローン系統に由来するクローン雄を用いた。ゼブラフィッシュは研究室での継代個体を用いた。

ゲノム編集を行うにあたり、対象となる遺伝子、dnaaf と CREM、の転写産物の塩基配列とゲノム上の塩基配列を調査した。そして、それぞれの遺伝子の各器官における遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR による発現量解析を行った。ゲノム編集は CRISPR/Cas9 により変異の誘起を行った。ガイド RNA は web 上の設計ツールによりデザインした。人工授精によって得られた受精卵の1細胞期胚に、ガイド RNA と Cas9 タンパク質の複合体、そして顕微注入の確認のための蛍光色素を共注入した。変異誘起の確認は、ヘテロ2本鎖移動度分析により行い、初代変異誘起個体(F0)の変異誘起率と変異個体の選抜を行った。成熟に至った選抜個体からは配偶子における変異伝達について、選抜個体と野生型との人為交配により得られた1世代目の子孫(F1)のジェノタイプングにより確認した。得られた変異については、シーケンス解析により変異が導入された塩基配列の確認を行った。また、F0が産出した精子は微分干涉顕微鏡による精子外部形態の観察と精子のDNA量をフローサイトメトリーにより測定するとともに、Computer assisted sperm analysis (CASA) による精子運動性の解析を行った。変異をヘテロ

で持つ F1 個体を選抜し、同じ変異を有する F1 個体との交配によって、変異をホモで持つ F2 個体を誘起し、その表現型を調査した。

4. 研究成果

(1) 精子鞭毛形成関連遺伝子のゲノム編集

ドジョウとゼブラフィッシュにおいて組織別の発現状態を比較し、dnaaf の生物学的機能を類推した。雌雄各 3 個体から生殖腺、消化管、肝臓、心臓、鰓、脳、筋肉を摘出し、各組織由来 RNA を用いて相対的な発現量をリアルタイム定量 PCR により解析した結果、両魚種ともに、dnaaf の発現量は精巣で他の組織と比べて、ドジョウでは 50~100 倍、ゼブラフィッシュでは 25~200 倍と特異的に高いことが明らかとなった。一方、卵巣では他の組織と同様に、低い発現量であった。また、得られた結果は哺乳類の各組織における発現様式と非常に類似していることから、哺乳類と魚類の dnaaf は生物学的機能が類似していることが考えられた。このことより、dnaaf のノックアウトにより精巣特異的に異常が生じる個体を作成できることが示唆された。

ドジョウにおいて、各系統 3 個体ずつの精巣由来 RNA を用いて、dnaaf の塩基配列を決定し、各系統の開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域 (CDS) を解析した結果、クローンからも野生型と高い類似性を示す塩基配列と演繹アミノ酸配列が得られた。演繹アミノ酸配列の系統内での相同性は 93.6~98.5%、系統間での相同性は 91.7~95.1% を示した。さらに、得られた B 系統の mRNA 塩基配列と研究室のデータベースに存在する B 系統ドジョウのゲノム配列を照合し、UTR を含む 2787 bp の塩基配列を決定した。この結果、遺伝子内におけるエキソンおよびイントロンの構造が明らかとなり、ドジョウの dnaaf におけるエキソンは 11 個存在することが明らかとなった。また、ドジョウの各系統 5 個体ずつの精巣を用いて相対的な発現量をリアルタイム定量 PCR により解析した結果、クローンは野生型に比べて dnaaf の発現量が約 10 倍高いことが明らかとなった。従って、dnaaf の配列は性転換クローンドジョウ雄の精子形成異常には関係しない、もしくは過剰発現による精子運動性の低下の可能性が示唆された。これらの結果から、野生型に由来する dnaaf の配列をゲノム編集によりクローンゲノムにノックインを施しても、クローンの精子運動性の回復には寄与しないことが示唆された。

ゲノム編集による dnaaf の変異誘起において、ドジョウではガイド RNA を第 1 エキソン、ゼブラフィッシュでは第 8 エキソンに設計した。孵化仔魚の DNA を用いた変異確認の結果、ドジョウ、ゼブラフィッシュともに、変異誘起群ではコントロールでは見られない電気泳動像が確認でき、ドジョウでは変異導入率が 95.8%、ゼブラフィッシュでは 31.3% であった。また、ドジョウ、ゼブラフィッシュともに、変異のスクリーニングによって選抜された F0 個体が成熟し、成熟個体から得られた精子の変異確認において、コントロールでは見られない電気泳動像が確認できた。すなわち、ゲノム編集によって生殖細胞で生じた変異が精子へと伝達されたことが明らかとなった。しかしながら、精子の運動率では野生型と違いは見られなかった。野生型との交配で得られた変異をヘテロでもつ F1 個体に由来する DNA を用いてシーケンス解析した結果、ドジョウでは 7 もしくは 8 bp 欠損が第一エキソン内で確認され、フレームシフト変異により終止コドンが形成されていた。一方、ゼブラフィッシュでは 6 bp 欠損であったため終止コドンの形成は生じていなかった。ドジョウでは、F1 世代の変異伝達率が 50% であったことから、変異導入精子は正常精子と同等の運動性を有することが考えられるが、F0 世代では変異がモザイク的に導入されているため、変異導入精子の運動性について結論付けることはできなかった。また、変異導入により運動性を失った精子からの F1 は生じないことが考えられる。そのため、F1 世代同士の交配により dnaaf に変異をホモ接合体で有する F2 世代を作成し、完全ノックアウト個体の表現型を調査する必要がある。

(2) 精子変態関連遺伝子のゲノム編集

ドジョウにおける CREM 転写産物の塩基配列を決定した結果、コイ *Cyprinus carpio* の CREM 様 mRNA と 87%、ゼブラフィッシュの CREM と 82% の相同性をもつ塩基配列が得られた。この転写物をドジョウ CREM mRNA と仮定し、当研究室で保有するドジョウゲノム参照配列上に整列した結果、3 本のコンティグに分かれて全塩基が整列され、8 つのエキソンから構成されることが明らかとなった。また第 3 エキソンから第 4 エキソンにかけてリン酸ジエステル化キナーゼをコードする pkID ドメイン、第 7 エキソンから第 8 エキソンにかけて DNA 結合ドメインの一つである bZIP_CREB1 ドメインが存在することが分かった。ドジョウ CREM の第 5、第 6 イントロンの一部にあたる配列は重複するゲノム断片が得られず、決定できなかった。

哺乳類における CREM は精子変態関連遺伝子の転写を制御しているが、魚類においてその働きは明らかにされていない。そこで CREM の機能解明にむけて、成熟した野生型ゼブラフィッシュとドジョウの生殖腺、消化管、肝臓、心臓、鰓、脳、筋肉における発現解析を行った。その結果、ゼブラフィッシュとドジョウでは精巣での CREM の発現量は他の器官と同程度、あるいは若干の高い発現はみられたが、精巣特異的な発現ではなかった。

ゲノム編集による CREM の変異誘起において、ドジョウではガイド RNA を第 2 エキソンと第 6 エキソン、ゼブラフィッシュでは第 2 エキソンに設計した。孵化仔魚の DNA を用いた変異確認の結果、ドジョウ、ゼブラフィッシュともに、変異誘起群ではコントロールでは見られない電気泳動像が確認でき、ドジョウでは変異導入率が 50.8% (第 2 エキソン) と 35.6% (第 6 エキ

ソン), ゼブラフィッシュでは 93.8%であった。また, ゼブラフィッシュでは, 変異のスクリーニングによって選抜された F0 個体が成熟し, 得られた精子の変異確認の結果, コントロールでは見られない電気移動像が確認できた。すなわち, ゲノム編集によって生殖細胞で変異が誘起され, それらが精子へと分化したことが明らかとなった。変異を持った精子を産出する F0 の雄と野生型の雌との交配では低い受精率を示した。この交配によって得られた F1 子孫の変異の有無の確認より, 変異をヘテロ接合でもつ F1 子孫を得ることに成功した。これらの子孫が有する変異が導入された塩基配列を調査した結果, 9 種類の変異が確認され, 8 種類でフレームシフト変異により終止コドンの形成が認められた。F0 の雄が産出した精子の外部形態は, 野生型個体では正常精子の割合が 63.6%と 89.2%を示したのに対し, F0 雄が産出した精子では正常精子は 46.0%に留まり, 鞭毛を有さない精子や異常な鞭毛をもつ精子, 精細胞様細胞が観察された。しかし, 精子の運動率では野生型個体が 43.81%~72.13%であるのに対し, F0 雄から得られた精子の運動率は 28.5%~56.15%と低い傾向を示した。精子の倍数性は, 野生型雄, F0 雄ともに半数性であった。得られた変異をヘテロもつ F1 子孫において 4 塩基挿入が観察された変異系統で成熟個体が得られた。そこで, この変異体系統を用い, 変異をホモ接合でもつ F2 個体を作成し, その表現型から CREM の機能を行った。CASA による解析において, 変異体精子の運動率には, ヘテロ接合変異体, ホモ接合変異体ともに野生型との間に有意差は見られなかった。また, F0 で見られたような外部形態における異常な鞭毛を持つ精子は F1 個体と F2 個体では観察されなかった。変異体が産出した精子の倍数性は, 野生型と同じ半数性であった。ホモ接合変異体の精子は受精能を持つことが確認された。また受精率は野生型よりとの低い傾向が見られたが, 群間に有意差は認められなかった。この受精実験により得られた F3 個体では変異の伝達が認められ, 4 塩基挿入による変異では精子は正常に形成されることが明らかとなった。この原因として, 定型外翻訳あるいは重複遺伝子による機能的な精子形成の回復が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

西原大樹・藤本貴史・山羽悦郎・荒井克俊 精子変態関連遺伝子のノックアウトによる雄特異的な不妊化技術開発の試み. 平成 31 年度日本水産学会 2019 年

山崎響・藤本貴史・山羽悦郎・荒井克俊 精子形成関連遺伝子欠損による雄特異的な不妊技術の試み. 平成 30 年度日本水産学会 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山羽 悦郎

ローマ字氏名: (YAMAHA, etsuro)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 北方生物圏フィールド科学センター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60191376

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 山崎 響

ローマ字氏名: (YAMAZAKI, kyo)

研究協力者氏名: 西原 大樹

ローマ字氏名: (NISHIHARA, Hiroki)

科研費による研究は, 研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため, 研究の実施や研究成果の公表等については, 国の要請等に基づくものではなく, その研究成果に関する見解や責任は, 研究者個人に帰属されます。