

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07923

研究課題名(和文) 噛み合い防除のため切歯形成遺伝子を多重低機能化したトラフグ切歯の形態解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of tiger pufferfish incisors with multiple hypofunctionalization of incisor-forming genes for bite prevention.

研究代表者

岡本 裕之 (Okamoto, Hiroyuki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・グループ長

研究者番号：50372040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグ切歯の形成と形状に関わる遺伝子を明らかにするため、9種のSCPP遺伝子12座に対する編集ツールを受精卵1602個に顕微注入し、体長7-10cmまで45個体を育成した。変異遺伝子数が4つが4個体、3つが11個体、2つが10個体、1つが16個体、未変異が4個体であった。各遺伝子の変異導入個体数は、SCPP1が36、SCPP2が0、SCPP3Aが4、SCPP3Bが13、SCPP3Cが7、SCPP4が9、SCPP5が0、SPARCが19、SPARCL1が1であった。いずれの個体の歯の形状には変化が認められず、SCPPタンパク量や発現細胞の減少は、歯の形成および形状に影響しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トラフグ養殖において、個体同士の噛み合いによる損耗やヒレの欠如を防ぐために、養殖現場では通常一個体に対して2回、人の手による「歯切り作業」が行われている。この作業は、手間がかかること、魚体への負担がかかることから、噛み合いしても減耗しない技術開発が望まれる。特定の遺伝子を改変でき、すでに養殖魚での産業利用が始まっているゲノム編集技術を使って、トラフグの切歯を低形成することができれば、本問題を解決でき、生産性の向上に資するものと考えられる。また、学術的にも魚類の歯の形成メカニズムはわかっていないことが多く、トラフグで実施することは学術的にも社会的にも意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify genes involved in the formation and shape of incisors in tiger pufferfish, editing tools for 12 loci of 9 different SCPP genes were microscopically injected into 1602 fertilized eggs, and 45 individuals were grown to 7-10 cm in length. Of these, 4 individuals had 4 mutated genes, 11 individuals had 3, 10 individuals had 2, 16 individuals had 1, and 4 individuals had 0. The number of mutant individuals for each gene was 36 for SCPP1, 0 for SCPP2, 4 for SCPP3A, 13 for SCPP3B, 7 for SCPP3C, 9 for SCPP4, 0 for SCPP5, 19 for SPARC and 1 for SPARCL1. There were no changes in tooth shape in any of the individuals, suggesting that reductions in SCPP protein levels or cells expressing SCPP did not affect tooth formation and shape.

研究分野：水産育種学

キーワード：歯形成 トラフグ ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) トラフグ養殖においては、噛み合いによる斃死やヒレの欠損による商品価値の低下を防ぐために、一頭あたり 1-2 回の歯切り作業を行う必要がある。歯切り作業は熟練した人の手で一頭ずつ実施するため、大変煩雑であるとともに、麻酔や作業後の口回りの傷の治癒など魚体への負担もあり、生産性だけでなく動物福祉の観点からも、本作業の軽減策の開発が望まれる。トラフグ養殖現場においては、エサとしてはペレット状の配合飼料をやるのが一般的であるため、貝殻を割ったり、肉を引きちぎるために必要な大型の歯は不要である。仮に歯が低形成であっても配合飼料は吸い込んで摂餌しているため、十分に成長することが可能と考えられる。一方、養殖トラフグが生け簀から海洋に逃亡した場合は、歯が低形成の個体は噛みちぎる力が低下することから、自然界で餌を捕食する能力は低下し、天然魚より生存能力は低下し、次世代を産出する力は低下すると考えられる。このことは、遺伝的に偏った養殖魚の遺伝子が自然界に拡散することを抑制することに働くと考えられるため、遺伝資源を守る観点からは有意に働くことが期待される。

硬骨魚類の歯と哺乳類の歯は生物が作り出す組織で最も硬質の構造体を持つとされている。どちらの歯もその最外層には、エナメロイド(硬骨魚類)とエナメル質(哺乳類)という機能的にも形態的にもよく似た構造をもっている。従来は両者の結晶構造が異なること、それぞれの歯の組織の由来が異なる結合組織であるという相違点から(文献 1)、硬骨魚類の歯と哺乳類の歯は形態的には似ているが、別々に進化した相似器官と考えられてきた。ところが、2005 年に米国でトラフグの切歯形成に關与する遺伝子群として分泌性カルシウム結合性リンタンパク遺伝子群 secretory calcium-binding phosphoprotein (SCPP) の存在が明らかにされ(文献 2)、その分子進化学的解析から、脊椎動物の歯の進化において、共通の普遍的な歯組織の無機質化に関わる主要遺伝子群であることが明らかとなった(文献 3)。

(2) 個体において、一塩基置換型の変異は、1. タンパクコード領域中への停止コドンの生成による遺伝子機能の障害、2. アミノ酸置換によるタンパク機能の低化・改変、3. 発現調節領域の変異による遺伝子発現量の増加/減少などを引き起こすと考えられる。このため、人為的に一塩基置換変異などを引き起こす技術は、遺伝子の機能解析に利用される技術の一つとなっている。

これまでに化学変異剤により一塩基置換変異を誘発させる TILLING 法について、小型養殖魚に適した従来手法(文献 4-7)から、水産養殖魚向けに精子及び卵への安全かつ実用的な変異導入技術(変異導入率 0.4%)を開発した(文献 7)。この技術を用いて、実際に変異トラフグ約 300 個体から 9 種の SCPP 遺伝子全てについて変異の有無を調べると、SCPP2 遺伝子においてアミノ酸置換による変異個体が数個体得られたが、歯の明確な不全等は認めることができなかった。近年、特定の遺伝子だけを狙って変異を導入することができる技術としてゲノム編集技術が育種分野でも注目されている。中でも CRISPR 法は、従来の ZFN 法、TALEN 法と比較して大幅に導入実績が改善されるだけでなく、使用方法も比較的簡便なため、現在では多くの分野で成果が報告され(文献 8)、我が国では世界で初めてゲノム編集養殖魚として、マダイ、トラフグが民間企業から上市された。ゲノム編集魚の養殖現場での活用は、今後広がることが予想される。そこで、特定の遺伝子の塩基配列を直接標的とすることができるゲノム編集技術のうち最も汎用性が高い CRISPR/Cas システムを使って、標的とする全 SCPP 遺伝子を一度に変異導入する方法が効率的であると考えられたため、本課題を実施した。

2. 研究の目的

(1) 変異導入技術である CRISPR/Cas システムを用いて、9 種類の切歯形成遺伝子に同時に様々な変異を導入し、各個体の切歯の形態解析により、トラフグの切歯の形成に主要な働きをする遺伝子を明らかにする。

(2) 将来トラフグ養殖における歯切り作業を軽減するため、遺伝子機能解析を通じて作出される切歯低形成個体は家系化を進め、切歯低形成トラフグ品種の作出基盤の開発を進める(図 1)。

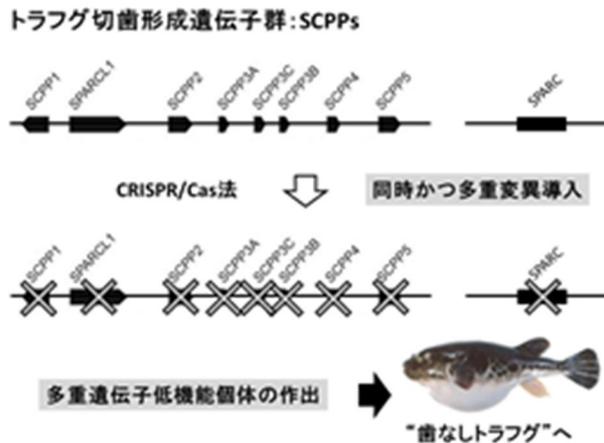


図 1. ゲノム編集個体の作出

3. 研究の方法

(1) 切歯形成遺伝子 (SCPP) 低機能個体の効率的作出

トラフグでゲノム編集を行うために必要な受精卵を得るために、三重県尾鷲栽培漁業センターで未受精卵および精液の譲渡を受け、水産研究・教育機構増養殖研究所 (現 水産技術研究所) 玉城庁舎に輸送し、人工授精により受精卵を得た。受精卵はゲノム編集のための顕微注入後、同南勢庁舎にて、卵管理し、ふ化後、定法に従い、ワムシ給餌、アルテミア給餌を経て、配合飼料に移行しながら育成した。

トラフグ分泌性カルシウム結合性リントタンパク遺伝子 (SCPP) 9 種 (SCPP 1, SCPP2, SCPP3A, SCPP3B, SCPP3C, SCPP4, SCPP5, SPARC, SPARCL1) (文献 3) について、CRISPR で用いる、SCPP1、2、3A、3B、3C、4、5、SPARC、SPARCL1 各遺伝子の塩基配列を標的とするガイド RNA の設計には、WEB 上のフリーツール

(<https://www.blueheronbio.com/external/tools/gRNASrc.jsp>) を用いた。設計した crRNA は、tracrRNA とともに合成 (ファスマック) した。DNA 切断酵素 Cas9 は、pCS2+hspCas9 (Addgene) のプラスミド DNA を NotI で制限消化し mMESSAGE mMACHINE (SP6) を用いて RNA を合成した。crRNA、tracrRNA、Cas9 RNA はそれぞれ 33、67、200 ng/μl の濃度に調整し、受精卵に顕微注入した。一部の卵には、胚体への遺伝子発現をモニターするため pCS2mt-GFP (Addgene) から合成した RNA を、SCPP に対する CRISPR/Cas9 RNA と共注入した。

変異個体の確認は MultiNa (島津製作所) を用いて、heteroduplex mobility assay (HMA) 解析を行った。ふ化仔魚あるいはその幼魚の鱗から DNA を抽出し、ゲノム中に変異導入が見られるか、変異 DNA の電気泳動の移動の仕方の違いにより変異導入の有無を調べた。

(2) ほ乳類の歯の発生に関わる遺伝子に対するゲノム編集個体の作出

(1) の SCPP 遺伝子の場合と同様の手法より、ほ乳類の胚体の発生期に発現し、歯の発生に関わることが知られている *Msx1*, *Msx2*, *Dlx1*, *Dlx3* に対してゲノム編集試験を実施し、トラフグの歯の形成に対する影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 2017 年にトラフグ受精卵 1602 個に顕微注入した。ふ化時期の生存率は 81% (n=31) であった。推定ふ化数は 1,200 尾であった。ふ化仔魚は体長 7-10cm 程度まで育成し、HMA 法により変異導入を確認した。45 個体について、9 遺伝子座に対して同時変異遺伝子数が 4 個のものは 4 個体 (8.9%)、3 個のものは 11 個体 (24.4%)、2 個のものは 10 個体 (22.2%)、1 個のものは 16 個体 (35.6%)、0 個のものは 4 個体 (8.9%) であった。また各遺伝子の変異導入個体数は、SCPP1 が 36 個体 (80.0%)、SCPP2 が 0 個体 (0%)、SCPP3A が 4 個体 (8.9%)、SCPP3B が 13 個体 (28.9%)、SCPP3C が 7 個体 (15.6%)、SCPP4 が 9 個体 (20.0%)、SCPP5 が 0 個体 (0%)、SPARC が 19 個体 (42.2%)、SPARCL1 が 1 個体 (2.2%) であった。受精卵を用いた切断活性の試験結果では、SCPP3B-1、SCPP3C-1、SCPP4、SPARC の crRNA の活性が高く残りは低い傾向だった。全個体において、目視では歯の形状に変化は認められなかった。この結果、部分的に一部の SCPP タンパク遺伝子が機能欠損しても、歯の形態に影響を与えないことが示唆された。編集遺伝子をモザイクにもつ F0 世代の一部が成熟したことが明らかとなり、編集遺伝子をヘテロあるいはホモに持つ F1 世代の作出が可能となった。

そこで 2019 年に、F2 ホモ個体の作出のため、これらのモザイク編集 F0 個体同士で交配を行った。2021 年度初めまでは成熟が期待される満 2 歳になった SCPP 編集 F1 群二十数尾が生存していたが、産卵期の 4-6 月に、水槽内でエラムシ病が発生し、エサ食いが悪くなり、雌の成熟に

至らず次世代を作出することはできなかった。また 7 月初期には白点病が疑われたため投薬治療を行ったが、半数ほど死亡し、9 尾のみ生残したが、その後も死亡が断続的に続いたのと、水槽清掃時の酸欠事故により、体調不良の 3 尾のみとなったため次世代の作出には至らなかった。

一方、2020 年度に再度、SCPP 編集 F0 兄妹間交配区 (F200312_001) の作出を行った。これらについては、満 1 歳となる 2021 年 4-6 月に、エラムシと白点病により減耗したため約 60 尾となった。満 2 歳となる 2022 年度に次世代の作出を試みたが、前年度病気が発生したことにより全体的に体サイズが小さく、F0 メスについては成熟しなかった。さらに野生型のメスの卵の入手ができなかったことに加えて、オス個体の肥育も十分でなく十分量の精液が確保できなかったため、次世代の作出および精子凍結には至らなかった。2023 年現在では F1 世代が 30 尾ほどとなり継続飼育しているが、2019 年度産の試験魚同様に、歯の形態はすべて野生型を示した。

(2) 2020 年度新たに歯形成誘導遺伝子 *Msx1,2* および *Dlx1A,2A,3A* 編集 F0 魚間交配区 (F200312_002、F200314_005、F200314_006) *Msx1,2* と *Dax1* を二重に編集した F0 魚兄妹間交配区 (F200314_007) を作出した。これらについては、満 1 歳となる 2021 年 4-6 月に、エラムシと白点病により減耗し、4 区は合わせて約 30 尾程度となった。これらいずれの交配区の個体についても、歯の形態はすべて野生型を示した。

(3) これまでに作出して得られたゲノム編集 F0 個体では体細胞モザイク状にヘテロ変異が導入されていると考えられ、表現型に対する当該遺伝子の機能欠損効果はほとんどなかったと考えられた。また、それらの兄妹交配による F1 世代においても歯の形態はすべて野生型を示したことから、ヘテロ変異では歯の低形成を引き起こすことはできないことが明らかになった。

一方、全細胞ホモ型変異個体である F2 個体の作出にはこれまで成功しておらず、今後各遺伝子のホモ型変異の影響について、歯の形質を評価していく必要がある。全細胞ホモ型変異個体の解析を通して、歯形成に関わる分子メカニズムや主要遺伝子の機能解析を進め、将来歯切り作業の低減につながる知見と成果が得られることが期待される。

< 引用文献 >

Y Kogaya and F Iwaku. (2004) Phylogenetic considerations of the origin of enamloid and enamel. J. Gifu Dent Soc 30, 45-53.

K Kawasaki, T Suzuki, KM Weiss. (2005) Phenogenetic drift in evolution: The changing genetics basis of vertebrate teeth. PNAS 102, 18063-18068.

K Kawasaki and KM Weiss. (2008) SCPP gene evolution and the dental mineralization continuum. J Dent Res 87, 520-531.

Y Taniguchi et al. (2006) Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. Genome Biol. 7, R116.

Jiang X-Y et al. (2011) ENU-Induced Mutagenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Treating Mature Sperm. Plos ONE 6(10), e26475.

M Kuroyanagi et al. (2013) New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: establishment of TILLING method in Fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis, BMC Genomics 14, 786

(特許) 岡本裕之 (2015) 突然変異養殖魚、特許第 5849305 号

S Ansai et al. (2012) Targeted mutagenesis in medaka using custom-designed TALENs. The 18th Japanese medaka and zebrafish meeting, p69

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 H. Okamoto et al	4. 巻 NMFS-F/SPO-175
2. 論文標題 Mutagenesis and genome editing for aquaculture fish species: modification of SCPP genes in Tiger Pufferfish (Takifugu rubripes)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the 44th Scientific Symposium of the UJNR Aquaculture Panel	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本裕之
2. 発表標題 トラフグの切歯形成に関する遺伝子の変異導入とその成熟
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 篤志 (Fujiwara Atushi) (30443352)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主幹研究員 (82708)	
研究分担者	木下 政人 (Kinoshita Masato) (60263125)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 卓 (Ishikawa Takashi)		
研究協力者	西木 一生 (Nishiki Issei)		
研究協力者	岩崎 裕貴 (Iwasaki Yuki)		
研究協力者	岸本 謙太 (Kishimoto Kenta)		
研究協力者	村上 悠 (Murakami Yu)		
研究協力者	岡田 一宏 (Okada Kazuhiro)		
研究協力者	糟谷 亨 (Kasuya Tohru)		
研究協力者	杉山 昇平 (Sugiyama Shohei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------