

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05836

研究課題名(和文) in vitro 生殖幹細胞ゲノム編集を介した代理親魚配偶子生産法の開発

研究課題名(英文) Development of the techniques for production of genome editing gametes with in vitro genome editing of germ line stem cells and surrogate broodstock technology

研究代表者

吉川 廣幸 (Yoshikawa, Hiroyuki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・助教

研究者番号：40733936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集ツールを導入された生殖細胞の移植を介して世代時間が短く、体サイズが小さい宿主からそれらの配偶子を代理生産する技術の開発は、ゲノム編集を利用した遺伝的に有用な養殖品種の樹立を加速することに繋がるものと考えられる。本研究課題では、CRISPR/Cas9 RNP複合体(Cas9タンパク質、crRNAおよび tracrRNAを含む)をエレクトロポレーションによりドナーの精巣細胞へ導入できる技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集を用いた遺伝形質の改良であっても、交配による有用遺伝子変異の固定は必須である。本研究で明らかにしたエレクトロポレーション処理による精巣細胞へのゲノム編集ツール導入法は、これら処理細胞を、小型近縁種へと移植する代理親魚技術とあわせることで、代理親体内での短期間かつ小飼育スペースなゲノム編集配偶子生産法の開発へと繋がり、将来、ゲノム編集によって海産魚の有用養殖品種を樹立する際に、役立てられていくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of a surrogate production through transplanting genome editing tool delivered germ cells into a recipient fish with a short generation time and a smaller body size can accelerate a creation of genetically improved aquaculture strain by genome editing. In this study, we developed an electroporation technique to deliver CRISPR/Cas9 RNP complex (containing Cas9 protein, crRNA and tracrRNA) into donor testicular cells.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：トラフグ 代理親魚 ゲノム編集 トランスフェクション 生殖幹細胞 クサフグ 借り腹 CRISPR/Cas9

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産有用品種を作出する育種の高速度・効率化のため、近年、ゲノム編集技術の活用が広がりつつあり、ゲノム編集ツールを細胞内へ導入するだけで、標的遺伝子の破壊が可能なCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集は、簡便に優良形質品種を作出できるスピード育種の切り札として期待されている。しかし、魚類の育種におけるゲノム編集ツールの導入は、一般的に受精卵への顕微注入によって行われていることから、導入されたゲノム編集ツールの働きは、初期卵割の過程で細胞ごとに異なり、変異導入初代(G0)は様々な変異や未変異な細胞をもつモザイク性を示し、有用変異の均一化は困難である。このため、多数の受精卵への顕微注入操作に加えて、有用変異を両対立遺伝子に持つホモ個体を得るためにG0世代の交配により次世代(F1)を得て、変異の分離と有用変異ホモ個体の選抜を行う必要がある。しかしながら、養殖対象の大型海産魚を成熟させてF1を得るのは容易ではなく、例えば、トラフグの雌が成熟するには一般に3年以上の養成期間が必要であり、さらに親魚の体サイズは大型(全長50cm以上)となるため、大規模な飼育スペース(一般に10,000L水槽以上)も必要となる。長期に渡る養成期間と大規模飼育環境の確保の必要性は、有用変異が固定された海産魚におけるゲノム編集品種樹立に向けた最大の障壁であり、これらの問題を解決できる新規技術の開発が求められている。

近年、生物種特有の世代時間の短縮と飼育の小スペース化に有効な技術として、異なる魚の卵や精子を代理親魚から生産する代理親魚技術が開発されている。本技術は、卵や精子のもととなるドナーの生殖幹細胞(分化初期の生殖細胞に含まれる)を宿主へと移植することにより、宿主からドナーの卵や精子を形成させ、それらの交配によりドナー由来の子孫を生産するものであり、我々は、これまでに成熟までの期間が短く(雄で1年、雌で2年)、成熟開始全長が12cmと小型のクサフグ(100L水槽で飼育可能)を宿主として、移植細胞に由来したトラフグ配偶子を短期かつ小飼育スペースに生産できることを明らかにしている。よって申請者らは、CRISPR/Cas9システムにより、トラフグ生殖幹細胞へとゲノム編集ツールを導入し、その細胞をクサフグへと移植すれば、理論上、クサフグを代理親としてゲノム編集されたトラフグ配偶子を短期間かつ小スペースに生産可能となることが期待できると着想した。

2. 研究の目的

本研究は、生殖幹細胞へのゲノム編集ツール導入技術とこれら導入細胞の代理親魚体内での配偶子生産法を開発することにより、世代時間が長期かつ大型の海産魚において効率的にゲノム編集配偶子生産できる技術体系を構築することを目的とし、*in vitro*(生体外)での生殖幹細胞に対するゲノム編集ツール導入技術を開発し、これら編集ツール導入細胞を直ちに代理親とする小型近縁種へと移植することによる代理親体内での短期間かつ小飼育スペースなゲノム編集配偶子生産法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1)生殖幹細胞への変異導入を評価するためのゲノム編集ツールを開発するため、黒色素合成関連遺伝子である *solute carrier family 45 member 2 (slc45a2)* を標的として crRNA を設計し、ATTO550 標識 tracrRNA および Cas9 タンパク質と共にゲノム編集ツールにあたる RNP 複合体を形成させ、既存の受精卵への顕微注入手法を用いてゲノム編集ツールの導入を行った。変異導入の成否を処理個体の黒色素形成の観察により評価した。また、T7 エンドヌクレアーゼ I (T7EI) 解析により標的遺伝子への変異導入の有無を確認した。

(2)ゲノム編集ツールを市販のリポフェクション kit またはエレクトロポレーターにより導入可能か検討した。1歳齢トラフグから精巣を摘出し、酵素分散することにより試験に用いる細胞溶液を調整した。分散された精巣細胞に対し、(1)により設計された RNP 複合体をリポフェクションまたはエレクトロポレーションにより導入可能か検討した。さらに、エレクトロポレーターを用いた導入手法については、ポアパルス電圧およびパルス幅の条件についても検討し、導入の最適条件を探索した。

(3)ゲノム編集ツールを導入された生殖細胞に由来した配偶子を効率的に代理生産するための宿主として、クサフグの生殖細胞欠損個体の作出を検討した。生殖細胞の生存に必須である *dead end (dnd)* 遺伝子のノックダウンを行うため、本遺伝子の翻訳開始領域にアンチセンスモルフォリノオリゴ(AMO)を設計し、クサフグ受精卵へと顕微注入した。作出された個体について、その生殖腺を組織学的に評価することで、宿主としての適性を検討した。

(4)ゲノム編集ツールの導入法として(2)において検討された最適条件に基づき処理されたトラフグ精巣細胞をクサフグ宿主へと移植した。移植された細胞の宿主生殖腺への着生能力を

評価した。さらに、飼育養成の後、成熟した宿主から配偶子を採取し、それらへの変異導入の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) トラフグゲノムデータベースの配列情報に基づき、黒色色素の発現に関与する *slc45a2* のエキソン領域に対応した crRNA を設計した。Cas9 タンパク質、tracrRNA と共に、本 crRNA により構成された RNP 複合体を顕微注入により受精卵へ導入した。受精 6 日目の受精卵では、未処理群において黒色色素の形成が観察されたのに対し、顕微注入した卵において、これらは確認されなかった(図1)。また、これらの胚から抽出された DNA サンプルについて実施した T7E1 解析では、処理胚において *slc45a2* への変異導入を示す T7E1 による酵素切断が確認された。よって、設計した crRNA を含む RNP 複合体により、標的とした *slc45a2* への変異導入が可能であることが明らかとなった。

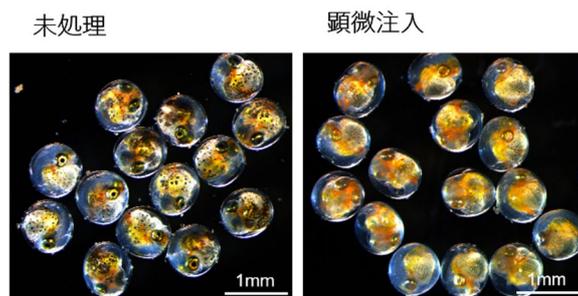


図1 *slc45a2* 遺伝子に対して設計したゲノム編集ツールの評価

(2) トラフグ精巢を酵素分散により調整した精巢細胞に対し、(1)で変異導入が可能であることを確認したゲノム編集ツールを市販のリポフェクション kit またはエレクトロポレーターにより導入可能か検討した。その結果、市販のリポフェクション kit による導入処理では観察されなかったものの、エレクトロポレーターを用いた導入法により RNP 複合体に含まれる ATTO550 の蛍光を有する細胞が観察された(図2)。

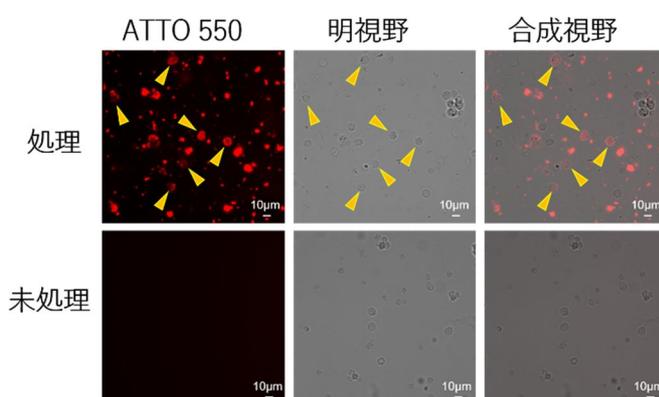


図2 エレクトロポレーション処理後のトラフグ精巢細胞

次に、エレクトロポレーションにおける導入条件の検討を行った(図3)。パルス幅 5ms では 100-150V の電圧条件下で、パルス幅 7.5ms では 100-125V の電圧条件下で非 EP 処理細胞と同等な細胞数および生存率が得られた。RNP 導入の成否を蛍光観察により評価したところ、電圧 125V パルス幅 7.5ms において最も高い陽性率(10.1%)が得られた。

(3) *dnd* に対して設計した AMO をクサフグ受精卵へと顕微注入することにより、クサフグ宿主の不妊化を試みた。成熟年齢まで飼育養成した AMO 導入個体の生殖腺を組織観察したところ、卵巣および精巢に特徴的な組織構造は観察されたものの、その生殖腺内に生殖細胞は確認されなかった。

(4) (2) により判明した最適条件によりエレクトロポレーション処理されたトラフグ精巢細胞をクサフグ宿主仔魚へと移植したところ、50%の1ヵ月齢宿主において宿主生殖腺内へのドナー細胞の生着が観察された(図4)。飼育養成の後、1歳齢のクサフグ宿主について成熟度合を調査したところ、一部の成熟した雄から精液が得られた。得られた精液から DNA を抽出し、トラフグ DNA の有無を検出できるプライマーを用いて PCR 解析したところ、それらのサンプルからトラフグ DNA が検出されたことから、これらのクサフグ宿主は移植されたドナー由来のトラフグ精子を生産していたことが判明した。一方で、これらクサフグ宿主が生産したトラフグ精子について T7E1

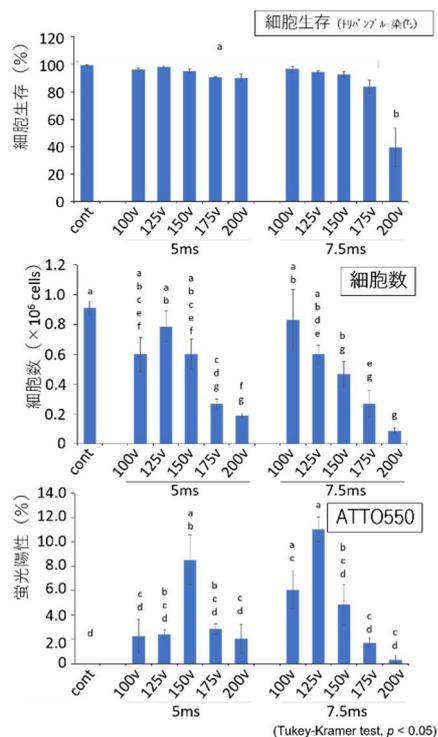


図3 エレクトロポレーション各条件下におけるトラフグ精巢細胞の生存率、細胞数、蛍光陽性率

解析により標的遺伝子への変異導入の有無を調査したものの、いずれのサンプルについても標的遺伝子への変異導入は認められなかった。今後、RNP 複合体を導入された細胞の分取・濃縮技術などについても検討していく必要がある。

本研究では結果として、代理親魚から標的遺伝子に変異がある配偶子を生産するには至らなかったものの、本研究で明らかにした電ポレーション処理による精巣細胞へのゲノム編集ツール導入法は、これら処理細胞を、小型近縁種へと移植する代理親魚技術とあわせること

で、代理親体内での短期間かつ小飼育スペースなゲノム編集配偶子生産法の開発へと繋がり、将来、ゲノム編集によって海産魚の有用養殖品種を樹立する際に、役立てられていくものと期待される。



図4 エレクトロポレーションされたトラフグ精巣細胞を移植した40日齢クサフグ宿主の生殖腺。生殖腺内にドナー細胞の生着が観察された。

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 Yoshikawa Hiroyuki, Ino Yasuko, Kishimoto Kenta, Koyakumar Hayato, Saito Taiju, Kinoshita Masato, Yoshiura Yasutoshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Induction of germ cell-deficiency in grass puffer by dead end 1 gene knockdown for use as a recipient in surrogate production of tiger puffer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 735385 ~ 735385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2020.735385	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 岸本謙太, 木下政人, 吉浦康寿
2. 発表標題 ILKカドレシオンによるトナリ精巢細胞のゲノム編集技術の検討
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 吉浦康寿
2. 発表標題 トナリ dead endノックアウト宿主を利用したトナリ配偶子生産
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 木下春哉, 小役丸隼人, 斎藤大樹, 岸本謙太, 木下政人, 吉浦康寿
2. 発表標題 遺伝子ノックダウンによる生殖細胞欠損クサフグ宿主の作出
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 酒井治也,池原強,石田武志,石丸恵理子,片町太輔,河邊真也,酒井一,椎木友朗,園山貴之,高橋洋,滝川裕子,辰野竜平,中村誠,濱田英嗣,古川澄昭,古川幸弘,宮崎泰幸,山野上祐介,山本義久,吉浦康寿,吉川廣幸,鷲尾圭司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 生物研究社	5. 総ページ数 200
3. 書名 フグ食の科学	

〔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
連携研究者	木下 政人 (Kinoshita Masato) (60263125)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	
連携研究者	吉浦 康寿 (Yoshiura Yasutoshi) (90372052)	水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員 (82708)	

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
---------	---------