

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03056

研究課題名(和文) 遺伝子交雑を防ぐ「不妊魚」の作出とその大量生産技術の開発

研究課題名(英文) Generation of "infertile fish" to prevent genetic pollution and development of its mass production technology

研究代表者

吉浦 康寿 (Yoshiura, Yasutoshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(廿日市)・主任研究員

研究者番号：90372052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的不妊魚の作出を目指し、CRISPR/Cas9法によりFSH受容体欠損トラフグを作出した。雌の卵巣を解析した結果、すべて未熟な状態であり、FSH受容体欠損によりトラフグ雌の不妊化が明らかになった。ゲノム編集により生殖細胞のないDEAD END欠損クサフグを作出し、トラフグ生殖細胞を移植したところ、このクサフグからトラフグ精子の生産が認められ、代理親魚として利用可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の不妊化については、その原因遺伝子が特定されてるものは少ない。本研究においてFSH受容体欠損がトラフグでも、雌の不妊化を引き起こし、魚類の雌の不妊化遺伝子として特定できたことは、魚類の生殖生理学において学術的意義は高い。また、不妊化技術は養殖魚の権利保護として産業に貢献する他、逃亡による遺伝子交雑を防ぐため環境保全にもつながる重要な技術であることから、その社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：FSH receptor-deficient tiger pufferfish were generated by the CRISPR/Cas9 method with the aim of producing genetically infertile fish. Analysis of female ovaries revealed that all were immature, indicating that FSH receptor deficiency causes infertility in female tiger pufferfish. The DEAD END-deficient grass pufferfish without germ cells was created by genome editing, and then when tiger pufferfish germ cells were transplanted into the DEAD END-deficient grass pufferfish, tiger pufferfish sperm production was observed from these grass pufferfish, indicating that they can be used as surrogate parent fish.

研究分野：魚類育種学、魚類生理学

キーワード：ゲノム編集 代理親魚法 不妊化 生殖腺刺激ホルモン受容体 全雌生産 トラフグ クサフグ メダカ

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。

1. 研究開始時の背景

標的遺伝子を効率よく改変するゲノム編集技術を水産分野に導入することで、高品質な優良品種が短時間で作出可能となってきた。現在、この技術による養殖魚の品種改良が注目されているが、実用化した場合、自然環境や品種の保護の観点において、ゲノム編集魚の逃亡による野性魚との遺伝子交雑問題は避けられない。そこで、養殖魚の不妊化に着目した。魚類では、三倍体化や放射線処理等の不妊化技術はあるものの、いずれの方法も実用化にあたり確実性が乏しい。

2. 研究目的

より確実な不妊化技術として遺伝的不妊魚の作出し、その大量生産技術の開発を目的とする。そこで本研究では、ゲノム編集技術を用いて100%の不妊化が可能な遺伝的不妊魚の作出を目指す。しかし、この不妊魚は次世代を作出できないため、大量生産が難しい。この課題を克服するため、代理親魚技術を利用して、これらの遺伝的不妊魚を簡便かつ大量生産する技術を開発する。

3. 研究方法

ゲノム編集を用いて、卵を全く作らない遺伝的不妊魚の作出を目指す。具体的には、卵形成の卵黄蓄積に必須なる胞刺激ホルモン受容体（FSHR）を標的として欠損体を作製する。メダカではFSHR欠損は卵を作らないことを既に確認している(図1)。

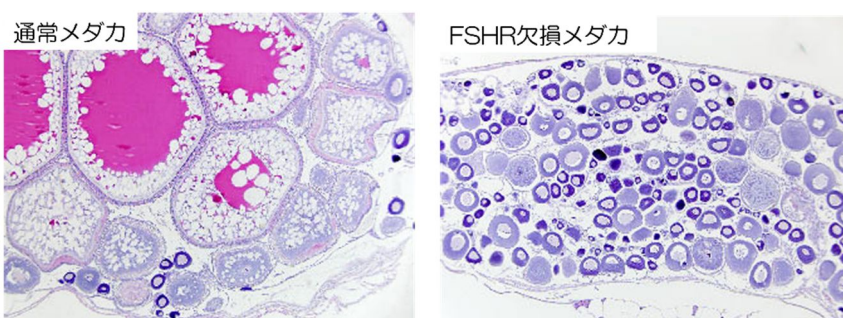


図1. FSHR欠損メダカの卵巢の組織像（左：通常メダカ、右：FSHR欠損メダカ）

そこで、養殖魚のトラフグでCRISPR/Cas9法によりFSHR欠損を作出し、雌の不妊化状態を確認する。また、ゲノム編集でFSHRを欠損した場合、当然、通常の交配による大量生産は

できない。そこで、我々は代理親魚法を用いることで、雌の不妊個体でも全雌の遺伝的不妊化魚だけを大量生産できる方法を考案し、東京海洋大学・吉崎らとの共同研究により、メダカFSHR欠損体（ホモ不妊個体）の生殖細胞を代理親魚へ移植し、ホモ不妊個体の大

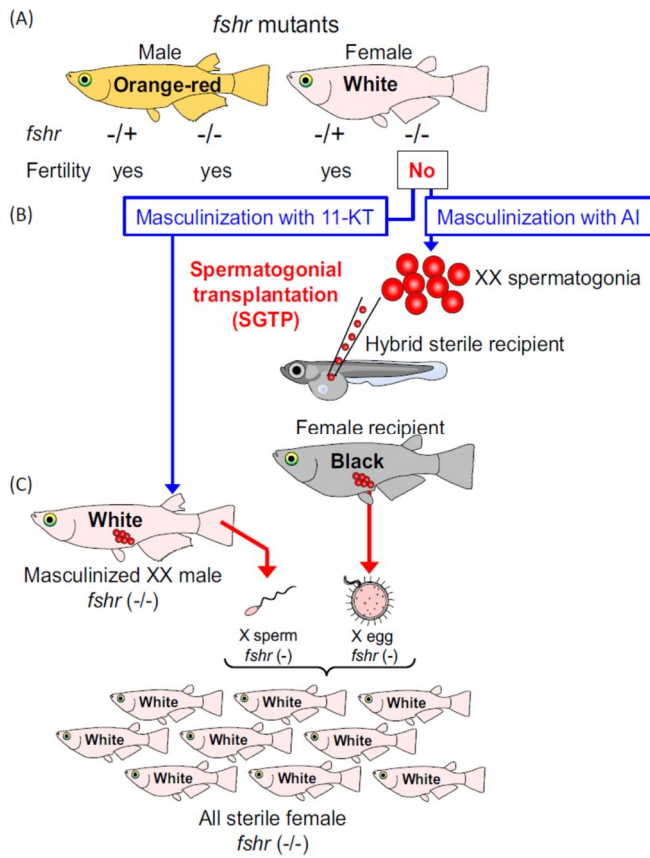


図2. 雌の遺伝的不妊化メダカ (FSHR 欠損) の大量生産 Nagasawa *et al.*, *Biology of Reproduction* 2019 より引用

不妊化状態を確認した。

4. 研究成果

(1) FSHR 欠損トラフグの作出と表現型解析

CRISPR/Cas9 法により作製した第1世代の FSHR 欠損変異トラフグの雌雄を交配し、5塩基欠失をホモに持つ FSHR 欠損トラフグを作出することができた。これらを3歳の成熟

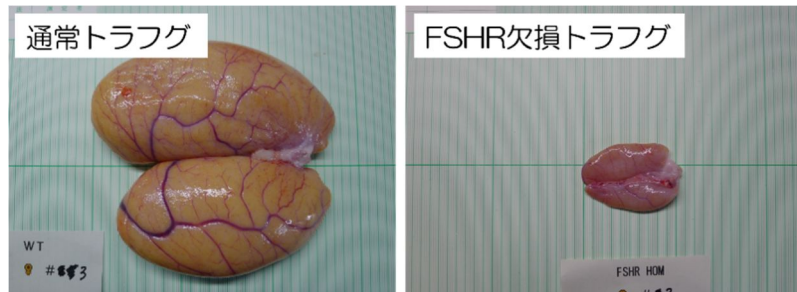


図3. FSHR 欠損トラフグの卵巢 (左: 通常トラフグ、右: FSHR 欠損トラフグ)

量生産技術を確認した (図2: Nagasawa *et al.*, *Biology of Reproduction* 2019)。本研究では、前述の系をトラフグに導入するため、まずトラフグの偽雄作出技術を開発する。偽雄の作製には、アロマトラーゼ阻害剤を経口投与し、生殖腺の雄化を誘導する。また、トラフグの代理親となるクサフグについて、トラフグ生産の効率をあげるため、生殖細胞の発生に必須な DEAD END (*dnd*) 遺伝子をゲノム編集で欠損させた生殖細胞のないクサフグを代理親に用いる。そこで、ゲノム編集により *dnd* 欠損クサフグを作出し、トラフグ生殖細胞を移植し、クサフグからトラフグ配偶子が得られるかを確認した。さらに、新規の不妊化遺伝子の候補として、卵膜タンパク質の1つであるコリオゲニン H (*ChgH*) 遺伝子に変異を導入し、*ChgH* 欠損メダカを作出し、雌の不妊化状態を確認した。

年齢まで飼育し、卵巢の発達状態を確認したところ、すべて未熟な状態であった (図3)。卵巢腔は形成されており、卵巢への分化は確認できたものの、卵黄

の蓄積は認められなかったことから、FSHR 欠損によりトラフグ雌の不妊化が明らかになった。

(2) トラフグの偽雄作出技術の開発

トラフグのふ化後（3日目）から生殖腺の性分化時期（100日目）までアロマターゼインヒビター（レトロゾール）を 500ug/kg, 1000ug/kg の濃度で含むの配合飼料を経口投与した。100日後、遺伝的な雌の生殖腺を調べたところ、すべて精巢に誘導されていた。さらに、成熟まで飼育を続け、遺伝的な雌（偽雄）から得られた精子を用いて、通常の雌由来の卵と交配したところ、すべての個体が遺伝的な雌（XX型）であることを確認した（図4）。このことから偽雄によるトラフグの全雌生産技術が確立できた。

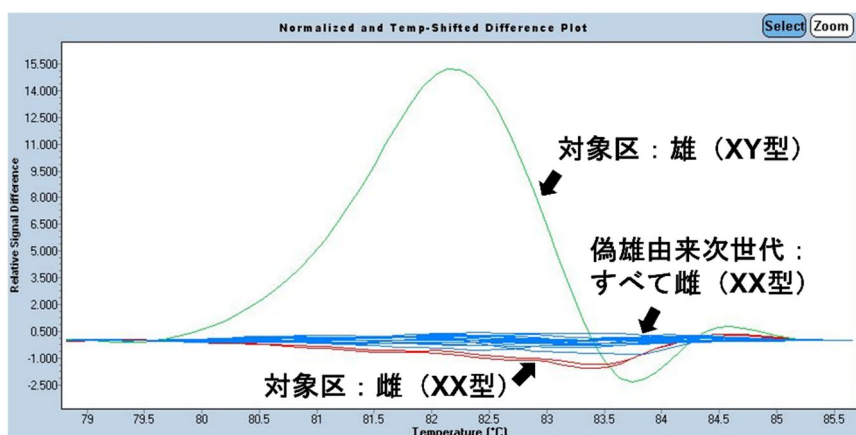


図4. 偽雄由来の次世代の性決定遺伝子の遺伝子型判別

偽雄由来次世代：すべて雌（XX型、青線） 対象区：雌（XX型、赤線） 対象区：雄（XY型、緑線）

(3) 生殖細胞のないクサフグの作出と代理親魚としての利用

生殖細胞の発生に不可欠な dnd 遺伝子をゲノム編集で欠損し、生殖細胞がないクサフグを作出した。dnd 欠損をヘテロに持つクサフグ F1 の交配で F2 を作出し、25%の頻度で出現する dnd 欠損（ホモ）クサフグの生殖腺を組織学的に調べ、生殖細胞がないことを確認した。さらに、トラフグの生殖細胞を移植したところ、トラフグの精子を得ることができ、dnd 欠損クサフグの代理親魚として利用可能であることが示された。今後は、不妊化トラフグの大量生産のため、FSHR 欠損トラフグの生殖細胞（精原細胞）を移植し、これらの個体から本来得られない FSHR 欠損トラフグ卵が得られるかを明らかにする。

(4) 新規不妊化遺伝子の探索

メダカを用いて不妊化につながる候補遺伝子を探索した。ゲノム編集によりメダカの卵膜タンパク質の1つであるコリオゲニン H (ChgH) 遺伝子に変異を導入し、ChgH 欠損メダカを作出した。ChgH 欠損メダカ雌は、卵の卵殻（卵膜）が非常に薄く、脆弱であり排卵時あるいは排卵腔から体外に放出される際に卵が壊れ受精卵を作出することができなかった。このように卵膜タンパク質遺伝子を欠損することで雌の不妊化が確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1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 -

1. 著者名 Murata Kenji, Kinoshita Masato	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeted deletion of liver-expressed Choriogenin L results in the production of soft eggs and infertility in medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-021-00185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshikawa Hiroyuki, Ino Yasuko, Shigematsu Atsushi, Yoshiura Yasutoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Enrichment of spermatogonia by density gradient centrifugation for use as a donor of surrogate production of tiger puffer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.15905	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉浦康寿、木下政人、吉川廣幸
2. 発表標題 代理親魚技術を用いた遺伝的不妊化魚の大量生産技術の開発
3. 学会等名 令和元年日本水産学会秋季大会ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒柳美和、岸本謙太、荻野哲也、木下政人、吉浦康寿
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた遺伝的不妊化トラフグ作出の試み
3. 学会等名 令和2年日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川廣幸、井野靖子、吉浦康寿
2. 発表標題 密度勾配遠心によるトラフグ精原細胞の濃縮
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021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	吉川 廣幸 (Yoshikawa Hiroyuki) (40733936)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師 (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)	

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