

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2019～2021

課題番号：19KT0035

研究課題名(和文) 沿面放電を用いた魚卵に対して大量一括処理可能な遺伝子・分子導入技術の確立

研究課題名(英文) Development of gene and molecule introduction technology using surface discharge for mass batch treatment of fish eggs

研究代表者

池田 善久 (Yoshihisa, Ikeda)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・准教授

研究者番号：00735318

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)：スマとメダカ魚卵について、沿面放電による蛍光分子(FITC-Dextran: 10 kDa)導入を試みた結果、スマ魚卵に対しては沿面放電の電流値が70 mA付近で孵化率および導入率が最大となる傾向が確認された。また電流値や液量が孵化効率や導入率に影響を与えていることが明らかとなったことから、溶液や魚卵のインピーダンスが分子導入のための沿面放電処理条件に関係していることが示唆された。一方でメダカ魚卵に対しては、沿面放電処理により蛍光分子が卵膜を通過し、卵膜と胚の隙間である囲卵腔に到達していることを確認したが、胚への導入は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年遺伝子導入やゲノム編集技術が注目されており、養殖魚の品種改良にも用いられつつある。しかし魚卵初期胚へ遺伝子・分子導入は、マイクロインジェクション法と呼ばれる手作業による導入作業に頼っており、作業効率の低さと侵襲性の高さが問題となっている。本研究は、マイクロインジェクション法に換わる、汎用性が高く、大量処理可能で、高導入効率な遺伝子・分子導入法を実現するため、沿面放電を用いた遺伝子・分子導入法を提案している。学術的には沿面放電による電氣的、化学的刺激が魚卵の細胞応答の新たなメカニズムを明らかにすることが期待される。また社会的には、養殖魚の育種技術の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the introduction of fluorescent molecules (FITC-Dextran: 10 kDa) into fish eggs of suma and medaka by surface discharge. The hatchability and introduction rates of suma fish eggs tended to be maximized when the current value of surface discharge was around 70 mA. The current value and the amount of solution affected the hatching efficiency and the introduction rate. In other words, the impedance of the solution and fish eggs is related to the surface discharge treatment conditions for the molecular introduction.

For medaka fish eggs, we confirmed that the surface discharge treatment allowed fluorescent molecules to pass through the egg membrane and reach the enclosed egg cavity, the gap between the egg membrane and the embryo. On the other hand, introduction into the embryo was not confirmed.

研究分野：プラズマ応用

キーワード：沿面放電 魚卵 分子導入

### 1. 研究開始当初の背景

持続可能な水産業の確立には、養殖業の拡大が不可欠である一方、生産コストの増加という大きな問題がある。特に日本では、えさ代および種苗代は支出全体の 80 %以上を占めていると言われており[1]、養殖業の経営を圧迫している。一方で、例えば世界的商材になっているノルウェーのタイセイヨウサケ養殖では、えさ代及び種苗代がコストに占める割合は 66 %と日本と比べて低くなっている。ノルウェーでは、1970 年代からタイセイヨウサケの育種研究を行い、成長速度が在来種の 2 倍で、餌の摂取量が 25%少ない品種を作出し、平成 4 (1992) 年より商業養殖されている[2]。つまり、ノルウェーの例でも明らかのように、養殖業の発展には育種や品種改良による養殖に適した品種の作出が必要不可欠である。養殖魚の育種や品種改良が急務となっている。

養殖魚の育種や品種改良については、農業作物や家畜のように行われていない。これは養殖の対象となる魚種の性成熟には数年から十数年を要するため、農作物などで行われる世代を重ねる選抜育種は、時間がかかりすぎるためである。近年遺伝子導入やゲノム編集技術が注目されており、養殖魚の品種改良にも用いられつつある。しかし魚卵初期胚へ遺伝子・分子導入は、マイクロインジェクション法と呼ばれる手作業による導入作業に頼っており、作業効率の低さと侵襲性の高さが問題となっている。加えてメダカなどの小型魚類は実験モデル魚とし導入プロトコルが確立されているが、海産魚に関しては研究事例が少ないという問題もある。そのため、大量処理可能で高効率な遺伝子・分子導入技術の登場が待ち望まれているが、未だ実現していない。

申請者は、マイクロインジェクション法に換わる、汎用性が高く、大量処理可能で、高導入効率な遺伝子・分子導入法を実現するため、沿面放電を用いた遺伝子・分子導入法を提案している。本導入法は、既にスマ魚卵に対し蛍光分子(FITC-Dextran: 10 kDa)の導入に成功しており、原理的には 1 秒程度で数百個の魚卵に同時処理が可能となることが期待できる。申請者は、本導入法が技術的に、学術的に確立されれば、水産業の育種・品種改良における家内制手工業から工場制機械工業へ移行を実現する、まさに産業革命的な技術イノベーションとなると考えている。

[1]農林水産省：漁業経営調査報告

[2]農林水産省：平成 25 年度水産白書(2013)

### 2. 研究の目的

2016 年には愛媛県と愛媛大学南予水産研究センターが共同でスマ(サバ科スマ属)と呼ばれる種の完全養殖に成功し、実用化に向け更なる養殖技術開発に取り組んでいる。完全養殖の実用化には魚卵への DNA や RNA の導入による遺伝子組換えやゲノム編集による品種改良が必要不可欠である。現在はこれらの作業はマイクロインジェクション法により魚卵 1 個ずつに対して手作業で行われており、作業効率の低さと、手作業による侵襲が原因の生存率の低さが問題となっている。

この技術的問題を解決するため、本研究計画では動物細胞に対し実績がある沿面放電遺伝子導入法を魚卵に応用することで、大量一括処理可能な導入法を確立するとともに、その導入機序を解明することを目的とする。具体的な達成目標は、以下の通りである。

1. 簡便で大量処理可能な魚卵への遺伝子・分子導入に最適な沿面放電処理技術の確立
2. 沿面放電処理による魚卵卵膜を介した物質の膜輸送機構と導入機序の解明

### 3. 研究の方法

上記目標を達成するために、複数電極を備えたプラズマ照射装置により、電極間で液面を介した沿面放電によるプラズマを生成し、魚卵に照射することで刺激を与え、胚内部に分子が導入される条件を検討した。魚卵は愛媛県が完全養殖に成功したスマを用いた。また、スマの産卵期は 6 月から 9 月のため、それ以外の時期については、モデル生物として広く研究に用いられているメダカの魚卵を実験に用いた。導入物質は FITC-Dextran(蛍光分子)を用いて、蛍光観察により導入を判定した。図 1 に沿面放電処理装置の概略図を示す。

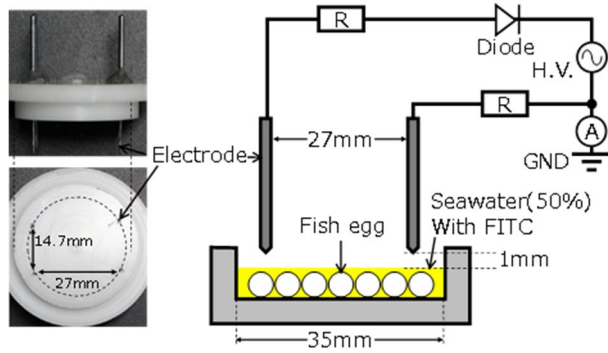


図1 沿面放電処理装置概略図

#### 4. 研究成果

スマ魚卵への蛍光分子導入の条件最適化について、FITC-Dextran (10 kDa) 溶液を含む50%海水の量を1080  $\mu$ lとして、印加電圧を6.5 kV、放電電流を100 mA、1回の照射時間を100 msとし、照射回数1回、2回と変化させたときの、沿面放電処理回数毎のスマ孵化稚魚蛍光観察結果を図2に示す。図より2回照射においてFITC-Dextranの導入が観察された。1回照射については、コントロールと比べて僅かに蛍光しているように見えたが、2回照射時の蛍光に比べると弱い蛍光であり、確認が困難であったため、未導入と判断した。2回照射で蛍光を確認できた稚魚は、胸部周辺が特に蛍光を発しており、続いて卵黄部分と体全体が薄く蛍光している。照射回数毎の孵化率はコントロールで57%、1回照射で24%、2回照射で37%であった。導入効率はコントロールで0%、1回照射で0%、2回照射で10%であった。

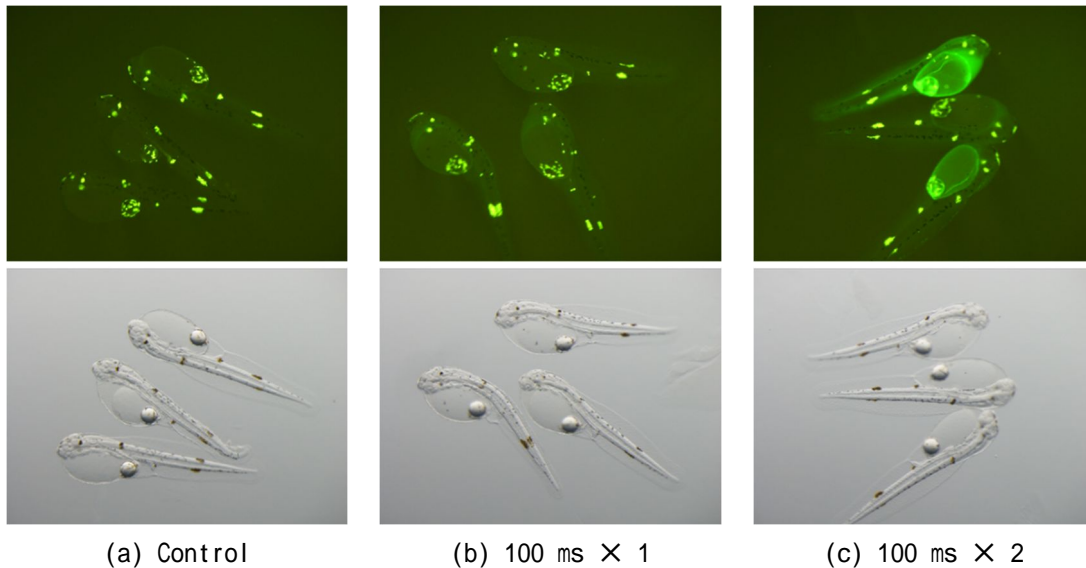


図2 沿面放電処理回数毎のスマ孵化稚魚蛍光観察結果

(上：暗視野、下：明視野)

上記の結果より、照射時間を100 ms、照射回数を2回とし、印加電圧を6.5 kV固定時において放電電流を50 mAから280 mAの範囲で変化させた場合の孵化率と導入効率を評価した。また液量についても1080、1550、2020  $\mu$ lの3種類の評価を行った。孵化率および導入効率の結果を図3に示す。導入率について、図より電流値70 mA付近で孵化率および導入率が最大となる傾向が確認された。70 mAより電流値が低くなると導入率は低下し、また70 mA以上高くしていくと、同様に導入率は低下している。溶液量については、2020  $\mu$ l時に導入率が高くなる傾向があり、溶液量が減少すると導入率も低下している。溶液量が最も少ない1080  $\mu$ lでは、ほとんどの電流値で導入していないことが確認された。孵化率については、電流値が80 mAまでほぼ一定の値であるが、それより電流値が大きくなると孵化率が減少している。導入率が最大となる条件は、溶液量2020  $\mu$ lで放電電流が70 mAのときの33%で、孵化率は79%であった。このときのコントロールの孵化率が80%であったことから、溶液量2020  $\mu$ lで放電電流が70 mAの処理条件は、魚卵に対し侵襲性が無いことが確認された。

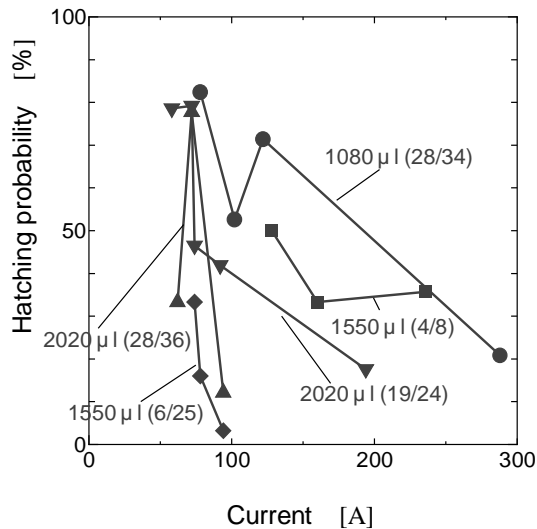


図3 孵化効率

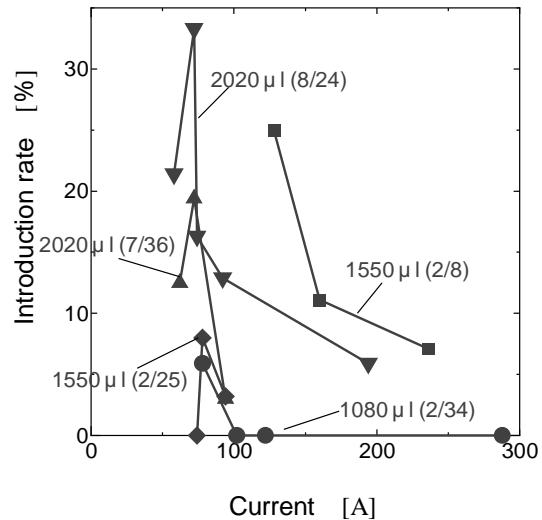


図4 蛍光分子の導入効率

沿面放電処理で生成する電氣的要因と溶液や魚卵の電氣的要因との関係性を明らかにするため、魚卵のインピーダンス評価を行った。溶液や魚卵のインピーダンスは、周波数に影響しない抵抗成分  $R$  と周波数に影響される容量性成分  $1/j\omega C$  で構成される。印加する電圧の周波数を変化させることで、導入に最適な周波数を探索し、さらにインピーダンスと周波数の関係より最適周波数を理論的に検証した。インピーダンスの測定はケミカルインピーダンスアナライザ(日置電機 IM3590)を用いた。

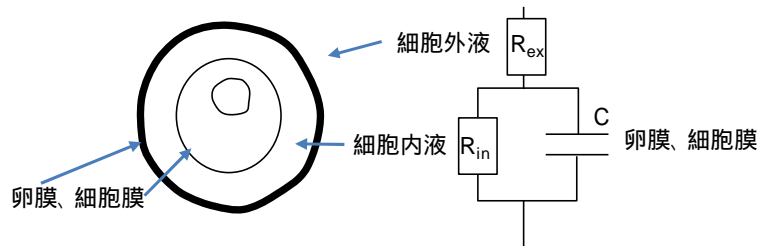


図5 魚卵のイメージ図と等価回路モデル

図5にスマ魚卵とメダカ魚卵のインピーダンス測定結果を示す。点線はスマ魚卵を50%k愛水に30分静置した後に測定したインピーダンスを示す。実線はメダカ魚卵のインピーダンス測定結果で、前処理の溶液を通常飼育に用いる淡水に加えて25%から100%濃度の海水を用いた場合で比較を行った。測定の結果、スマ魚卵とメダカ魚卵ともに各周波数のインピーダンスはcole-coleの円弧のようなプロットを描くことを確認した。メダカ魚卵は昨年までの水道水を用いた場合のインピーダンスは、導入が確認されているスマ魚卵のインピーダンスから大きく外れており、スマに比べて電氣的刺激が弱くなることが考えられた。メダカ魚卵のインピーダンスがスマ魚卵に近い値となる条件は、50%海水を用いた場合であることを確認した。加えてスマと同じインピーダンスとなる周波数は200Hzとなり、スマ魚卵の導入条件より低い周波数となることを確認した。

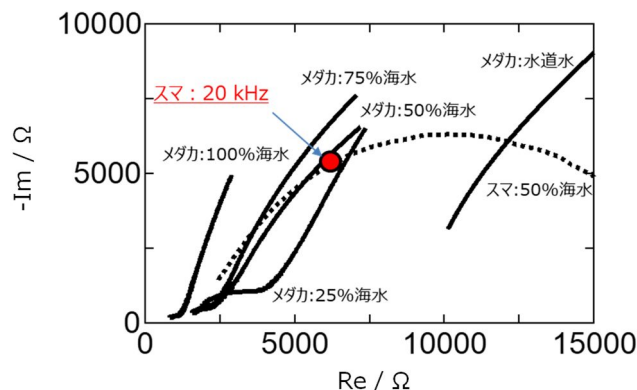


図6 スマ魚卵とメダカ魚卵のインピーダンス測定結果

スマ魚卵の実験と同様に、3.5 cm ディッシュに静置したメダカ魚卵に対し、沿面放電処理を行った。沿面放電処理条件は、メダカ魚卵のインピーダンスがスマ魚卵で分子導入が確認されたインピーダンスとほぼ同じとなる周波数 200 Hz とし、50 %海水に浸した状態で導入処理を行った。図 7 に導入処理したメダカ魚卵から孵化した稚魚の蛍光観察結果を示す。図より、沿面放電処理した個体とコントロールの個体ともに自家蛍光を発する箇所以外での緑色蛍光を確認することが出来なかった。図 8 にレーザ共焦点顕微鏡によるメダカ魚卵の蛍光観察結果を示す。囲卵腔と呼ばれる卵膜と胚の間の層が緑色蛍光を示しており、沿面放電処理することで FITC-Dextran が卵膜を透過し魚卵内部に導入されていることを確認した。一方で、胚は緑色蛍光を確認出来ず、細胞内に導入されていないことが明らかとなった。

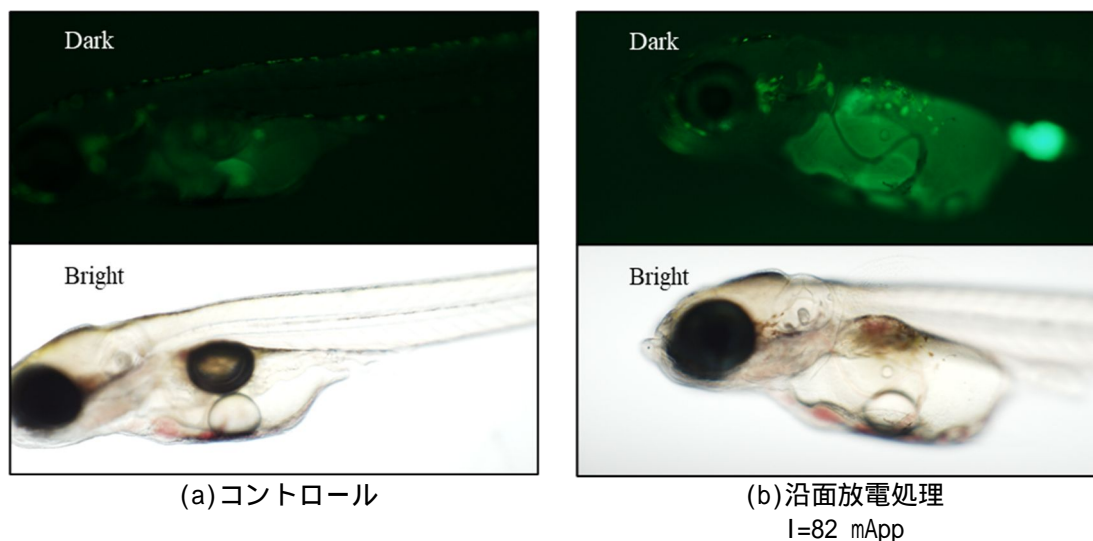


図 7 メダカ孵化稚魚蛍光観察結果

(上：暗視野、下：明視野)

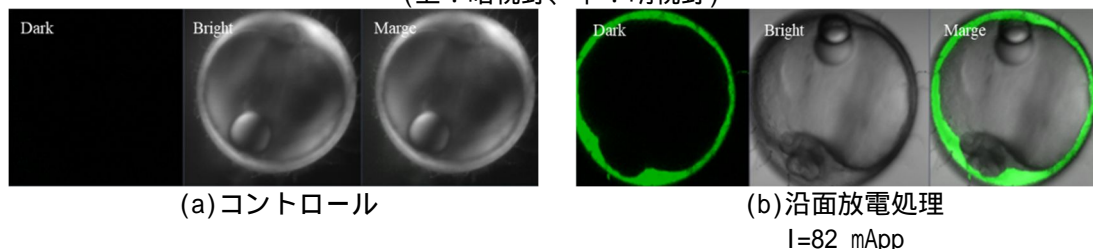


図 8 レーザ共焦点顕微鏡によるメダカ魚卵の蛍光観察結果

本研究により以下のことが明らかとなった。

スマとメダカ魚卵について、沿面放電による蛍光分子 (FITC-Dextran: 10 kDa) 導入を試みた結果、スマ魚卵に対しては沿面放電の電流値が 70 mA 付近で孵化率および導入率が最大となる傾向が確認された。また電流値や液量が孵化効率や導入率に影響を与えていることが明らかとなったことから、溶液や魚卵のインピーダンスが分子導入のための沿面放電処理条件に関係していることが示唆された。一方でメダカ魚卵に対しては、沿面放電処理により蛍光分子が卵膜を通過し、卵膜と胚の間である囲卵腔に到達していることを確認したが、胚への導入は確認されなかった。

上記考察に基づき、スマ魚卵およびメダカ魚卵のインピーダンス測定を実施した結果、分子導入が困難なメダカ魚卵のインピーダンスがスマより大きいことを確認した。本結果より魚卵のインピーダンスの把握がプラズマ条件の決定に重要であることを明らかにした。またインピーダンスの調整には、前処理液の導電率を変えること、または電源周波数を変えることが有効であることを見出した。メダカ魚卵に対しては、スマ魚卵と比べて卵膜の幅が厚いことより、卵膜の静電容量が小さいことが考えられる。そのため沿面放電処理による電流刺激が胚に伝わらず、細胞内に分子が導入されなかったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和田啓太郎, 池田善久, 木戸祐吾, 佐藤 晋, 斎藤大樹, 神野雅文
2. 発表標題 沿面放電処理によるメダカ魚卵への分子導入
3. 学会等名 第37回 プラズマ・核融合学会 年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Ikeda, K. Funakoshi, K. Wada, T. Saito, M. Jinno
2. 発表標題 Influence of electric field distribution on molecular introduction into SUMA fish eggs by surface discharge
3. 学会等名 XXXIV ICPIG & ICRP-10 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田善久, 和田啓太郎, 木戸祐吾, 佐藤晋, 斎藤大樹, 神野雅文
2. 発表標題 沿面放電処理による魚卵への分子導入時の電氣的要因の重要性
3. 学会等名 第36回 プラズマ・核融合学会 年会
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
研究協力者	松原 孝博  (Matsubara Takahiro)		

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	後藤 理恵  (Goto Rie)		
研究協力者	斎藤 大樹  (Saito Taiju)		

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