

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292104

研究課題名(和文)人工制限酵素を用いた水産有用魚種スピード育種法の開発

研究課題名(英文)Development of new aquaculture using designated nuclease

研究代表者

木下 政人(Kinoshita, Masato)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60263125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：養殖魚の育種はほとんど行われていないのが現状である。伝統的な選抜育種法による育種は、長期間を要するという欠点があった。そこで、ゲノム編集法の一つであるCRISPR/Cas9を用いて、マダイとトラフグにおいてミオスタチン遺伝子を破壊することで筋肉増量品種作製を試みた。ミオスタチン遺伝子のエクソン1内の配列をターゲットを設定し、single guideRNAおよび Cas9 RNA を人工授精した1細胞期の受精卵にマイクロインジェクション法により導入した。その結果、いずれの魚種においても高効率でミオスタチン遺伝子破壊に成功し、筋肉量を増加した個体の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：In aquaculture, selective breeding has not developed yet. The selective breeding takes much time to establish a new breed, so it is not adequate for aquaculture where new breeds are required immediately. We tried to develop new breeding method for aquaculture using genome editing technology, CRISPR/Cas9. With red sea bream and tiger puffer, the single guide RNAs were designated on the genome sequence in exon 1 of myostatin gene and microinjected into the one-cell stage eggs which are artificially inseminated. As results, the myostatin gene of both fish has successfully disrupted and new breeds with enhanced muscle mass have established.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：ゲノム編集 マダイ トラフグ ミオスタチン CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

世界的な健康食ブームと日本食への関心の高まりから、魚食が見直されている。これまでの水産業は、漁獲（獲る漁業）種であった。近年、作る漁業（養殖漁業）が盛んになってきた。しかしながら、養殖では水中での作業が多大な量力を要すること、個体の観察が困難であることなどの理由から、魚類は家畜や家禽に比べ、育種/品種改良が進んでいないのが現状である。養殖魚の品種作製に、古典的な選抜育種法を用いたらば長期間・多大な労力を必要とする。このような状況から、短期間の品種作製技術が求められていた。1980年代に遺伝子導入法が開発され、当時は、品種作製の強力なツールとして注目を集めたが、外来遺伝子を導入するため、食品としては好意的には受け入れられなかった。

2. 研究の目的

ここ数年のゲノム編集技術は目覚ましい進歩を遂げている。中でも特筆すべきものにTALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) と CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas system) がある。これらは、人工制限酵素 (Engineered Nuclease) と呼ばれ、任意の塩基配列を認識する DNA 結合部位とそこでゲノムの二重鎖切断を引き起こすヌクレアーゼ部位からなる。ゲノム中の二重鎖切断が引き起こされた細胞では、Homology-Directed Repair あるいは Non-Homologous End Joining (NHEJ) 機構によりゲノムの修復が行われるが、NHEJ により修復された場合、時として塩基の欠失や付加が伴い、結果としてゲノムが改変される。当該部位が機能を有する部位の場合は、その機能を失うことになる。魚類でも、ゲノム編集技術を用いれば、外来遺伝子を導入することなく、目的の遺伝子を狙い撃ちして編集することが可能であると考えられた。そこで、この技術を用いて、遺伝子を破壊し短期間で魚類の品種を作製する技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 近畿大学で飼育されているマダイ、および、水産研究・教育機構屋島庁舎で飼育されているトラフグを研究材料に用いた。その理由は、これらの施設では、マダイ・トラフグの計画的な生産が確立されており、実験に必要な受精卵が計画的に入手可能であり、かつ、それらを親魚まで高効率で育て上げることが可能であるからである。筋肉細胞増殖・成長の抑制因子であるミオスタチン遺伝子をターゲットとし、そのエキソン1の配列中に CRISPR/Cas9 システムに用いる single guide RNA (sgRNA) を設計・作製した (図1)。この sgRNA を Cas9 RNA と共にマダイおよび

トラフグの 細胞期の受精卵にマイクロ

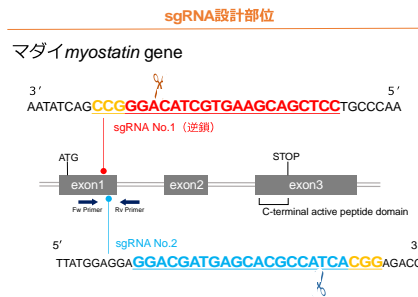


図1 マダイミオスタチン遺伝子上の標的部位と sgRNA 配列

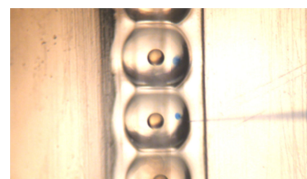


図2 マダイ受精卵へのマイクロインジェクション

これらを培養・飼育し、ピットタグを導入することにより個体識別を行いながら、成長過程を観察した。標的遺伝子の破壊の成否は、まず、自動電気泳動装置を用いた Heteroduplex Mobility Assay (HMA) により変異の誘導を検討した。また、これらを親魚まで育て、交配により第2世代を得ることを目指した。

(2) 上述同様に、食欲関連遺伝子をターゲットとして、sgRNA を作製した。マダイおよびトラフグの受精卵にマイクロインジェクション法により導入し、上述のように飼育を行い、ピットタグによる個体識別 (図3) と



ヒレより調製したゲノム DNA を用いた HMA により目的領域への変異導入の有無の検討を行った。

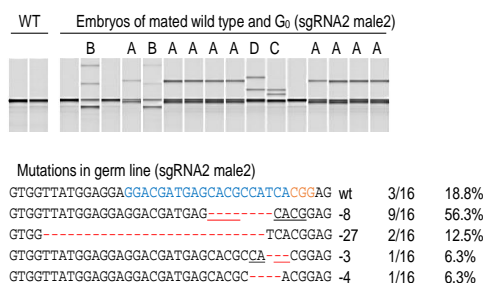
図3 ピットタグによる標識化

なお、いずれの魚種も陸上に設置した水槽で飼育を行い、環境中へのゲノム編集魚の流出はない。

4. 研究成果

(1) ヒレより抽出したゲノム DNA を用いてミオスタチン遺伝子の変異の有無を検討したところ、個体ごとにその比率は変動したが、高効率で変異が導入された個体が多く得られた。マダイにおいては、受精卵 2365 粒にマイクロインジェクションを行い、6ヶ月後に 430尾が生じた。そのうち、高頻度に変異の変異が見られた個体を 182尾選抜し、飼育を継続した。受精から2年後にこれら雌雄ともに性成熟を完了した。7トン水槽

でこれらをまとめて飼育することで、産卵を行わせ、第2世代の受精卵を得ることに成功した。第2世代の受精卵を約1000粒回収し、培養・飼育を行った。約6ヶ月齢時に、ピットタグによる個体識別とヒレから抽出



したゲノムの解析を行った。その結果、標的遺伝子領域に8塩基の欠失を両方のアレルに持つ個体が存在することが明らかになった(図4)。

図4 マダイミオスタチン遺伝子破壊魚の変異配列第2世代の個体で観察された変異配列を示す。8塩基欠失(-8)など、フレームシフト変異が観察された。

現在、これらを飼育中である。これらの個体は、野生型遺伝子を持つ個体に比べ、明らかに体高が高く、また、体幅も広く、筋肉量が増大していることが示された。

トラフグについては、受精卵5920粒にマイクロインジェクションを施した。孵化数は1570尾(27%)、孵化後4ヶ月での生残は486尾(8.2%)であった。孵化後4ヶ月でピットタグによる個体識別とヒレから抽出したゲノムDNAを用いた変異導入解析を行った。高効率に変異が導入されている個体を101尾選抜し、飼育を継続した。これらの個体は、野生型に比べ、明らかに体高が高く、また、体幅も広く、筋肉量が増大していることが示された(図5)。

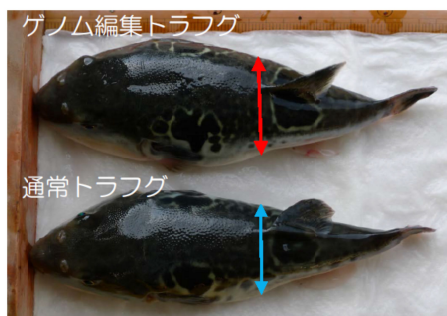


図5 ミオスタチン遺伝子破壊により筋肉量が増加したトラフグ(第1世代)

このうち、75個体が1年後まで生育し、その多くが2年後まで生育した。この2歳魚のオスは性成熟に達し、排精に至った。排精された精子を野生型の未受精卵に媒精し、得られた胚を用いて、標的遺伝子の変異の有無を検討したところ、複数の胚に変異が見られた。以上のように、ミオスタチン遺伝子を高効

率に破壊することに成功し、高効率に破壊された個体では、骨格筋量の増大が観察された。また、導入された変異は、次世代へも受け継がれることが明らかとなった。

(2) 食欲関連遺伝子破壊に関しては、マダイでは、高効率に標的遺伝子が破壊されたものの、成長の促進や個体の大型化は、観察されなかった。しかしながら、トラフグにおいては、ヒレから抽出したゲノムの解析により高効率で標的配列に変異が導入されている個体は、野生型のものに比べて明らかに成長速度が早く、同じ飼育期間で1.5倍以上の体重を示した。これらの個体を2年まで飼育した結果、雌雄ともに通常、性成熟するサイズまでに成長した。今後、これら雌雄から、それぞれ採卵、採精を行い、人工授精を施し、第2世代を獲得することを目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 10件)

- 岸本健太、安齋賢、豊田敦、吉浦康寿、家戸啓太郎、木下政人：ゲノム編集技術の水産業への応用、ゲノム編集学会、2016.9.6-7, 広島国際会議場(広島)
K Kato, K Kishimoto, Y Washio, A Toyoda, M Kinoshita: Increment of skeletal muscle mass by CRISPR/Cas9 genome editing system in red sea bream (*Pagrus major*), Aquaculture Europe 16, 2016.9.21-23, エジンバラ(英国、スコットランド)
- 岸本健太、鷲尾洋平、豊田敦、吉浦康寿、家戸啓太郎、木下政人：ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いた筋肉増量マダイ系統の作出、日本水産学会近畿支部会、2016.12.18, 京都大学(京都)
K Kato, K Kishimoto, Y Washio, A Toyoda, Y Yoshiura, M Kinoshita: Increment of skeletal muscle mass by CRISPR/Cas9 genome editing system in red sea bream (*Pagrus major*), 12th Japan-Korea Korea-Japan joint symposium on aquaculture, 2016.11.3-5, 三重大学(三重)
- 木下政人：水産育種におけるゲノム編集技術の利用、DNA鑑定学会第9回大会2016.11.10-11, 発明会館(東京)
- 木下政人、岸本健太、安齋賢、豊田敦、吉浦康寿、家戸啓太郎：ゲノム編集技術の養殖魚への応用、日本水産学会秋季大会、2016.9.8-11, 近畿大学農学部(奈良キャンパス)(奈良)
- 岸本健太、鷲尾洋平、豊田敦、吉浦康寿、家戸啓太郎、木下政人：ゲノム編集マダイの生殖細胞の変異、日本水産学会秋季大

会, 2016.9.8-11, 近畿大学農学部 (奈良キャンパス)(奈良)

家戸啓太郎、鷺尾洋平、安齋賢、豊田敦、吉浦康寿、黒柳美和、片山貴士、今井正、岸本健太、村上悠、木下政人：ゲノム編集による水産養殖魚の品種改良とその産業化に向けた課題、日本水産学会秋季大会, 2016.9.8-11, 近畿大学農学部 (奈良キャンパス)(奈良)

吉浦康寿、岸本健太、鷺尾洋平、上野智弘、家戸啓太郎、木下政人：ゲノム編集技術を用いたダブルマッスルトラフグの作出、日本水産学会秋季大会, 2016.9.8-11, 近畿大学農学部 (奈良キャンパス)(奈良)

鷺尾洋平、大浜光希、岸本健太、豊田敦、吉浦康寿、木下政人、家戸啓太郎：ゲノム編集マダいのF1作出、日本水産学会秋季大会, 2016.9.8-11, 近畿大学農学部 (奈良キャンパス)(奈良)

〔図書〕(計 1 件)

木下政人、フォトサイエンス生物図録(数研出版) 生物学の最前線3、2016、100
木下政人、化学と生物(日本農芸化学会) 水産生物へのゲノム編集技術活用に向けて、2015、53: 449-454

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.mbf.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/kinoshita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 政人 (KINOSHITA, Masato)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号：6 0 2 6 3 1 2 5

(2) 研究分担者

豊田 敦 (TOYODA, Atsushi)
国立遺伝学研究所・特任教授
研究者番号：1 0 2 6 7 4 9 5

家戸 啓太郎 (KATO Keitaro)
近畿大学・水産研究所・教授
研究者番号：9 0 3 3 0 2 4 0

吉浦 康寿 (YOSHIYRA Yasutoshi)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・主任研究員
研究者番号：9 0 3 7 2 0 5 2

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

岸本 謙太 (KISHIMOTO, Kenta)
京都大学・大学院農学研究科

村上 悠 (Murakami, Yu)
京都大学・大学院農学研究科

片山 貴士 (KATAYAMA, Takashi)
国立研究開発法人水産研究・教育機構

鷺尾 洋平 (WASHIO Yohei)
近畿大学・水産研究所