

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450273

研究課題名(和文) 噛み合いによる減耗を低減する切歯低形成トラフグの作出基盤の開発

研究課題名(英文) Development of basic technology for production of tiger pufferfish with low teeth formation to prevent mutual bite.

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・増養殖研究所・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグ養殖における噛み合いを防ぐための歯切り作業軽減を目的として、歯の形成に関与する9つのSCPP遺伝子の機能抑制個体を作成するための基盤技術の開発を行った。約850個体のトラフグ変異導入集団から当該遺伝子群に変異を持つ個体を網羅的に探索したが、機能抑制が期待される変異体は得られなかった。一方ゲノム編集技術により、SCPP遺伝子の一つに変異を持つトラフグの作出に成功し、今後変異ホモ型個体を使った解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to reduce tooth cutting procedure to prevent mutual bite in tiger pufferfish farming, we developed the basic technology for creating individuals whose function of nine SCPP genes involved in tooth formation was suppressed. The mutants in the genes were comprehensively searched from about 850 individual which were raised from the mutagenesis treatment male, but mutants with the suppressed function were not obtained. On the other hand, by genomic editing technology we succeeded in producing pufferfish with mutations in one of SCPP genes, and the analysis using variant homozygote individuals is expected in the future.

研究分野：水産育種学

キーワード：トラフグ 切歯形成 突然変異 ゲノム編集

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歯切り作業を行う必要がある。しかしながら歯切り作業は大変煩雑なため、労働の軽減策が望まれる。硬骨魚類の歯と哺乳類の歯は、その最外層にエナメロイド(硬骨魚類)とエナメル質(哺乳類)という生物が作り出す組織で最も硬質の構造体を持ち、機能的にも形態的にもよく似た構造をとっている。これまでは両者の結晶構造が異なること、それぞれの由来となる結合組織が異なることなどの相違点から(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)、分子進化的解析により SCPP 遺伝子は、脊椎動物の歯の進化において普遍的な歯組織の無機質化に關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) 近年実験魚において、化学薬剤により魚類の精子に遺伝子変異(一塩基変異)を飽和的に導入し、変異導入集団の中から特定の遺伝子変異個体を塩基配列解析により見つける技術(TILLING法: Targeting Induced Local Lesions In Genomes)が開発された(文献4,5)。誘発された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阻害、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、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。突然変異育種は、農業分野では20世紀前半より育種目的に用いられ、これまでに米、オオムギ、綿などで作出された品種は世界的に実用化されている。水産分野では長い間、技術試験研究に留まり、実用化はほとんど行われなかった。しかし2011年に中国で筋肉倍増が期待されるソウギョの突然変異個体の作出が報告され(文献6)、世界においては変異育種技術の活用が始まっている。一方、特定の遺伝子への変異導入技術(ゲノム編集技術)であるZFN法、TALEN法またはCRISPR法において導入実績が大幅に改善され、実験魚でも成果が報告され始めている(文献7)。これらの手法は、新育種技術NBT(New Breeding Technology)として世界的に注目されている。

2. 研究の目的

(1) 新たに開発された変異導入技術を用いて切歯形成遺伝子の機能欠損個体の作出を行い、切歯形成遺伝子の機能を明らかにすることを旨す。

(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として利用する。

3. 研究の方法

(1) 突然変異(TILLING)法におけるSCPP遺伝子の機能欠損個体の作出・選抜について以下の試験を行った。変異剤(ENU)処理を行ったトラフグ雄由来の凍結精子(文献8)を用いて作出したトラフグ変異集団全個体(約850尾)のゲノムDNAを抽出した。

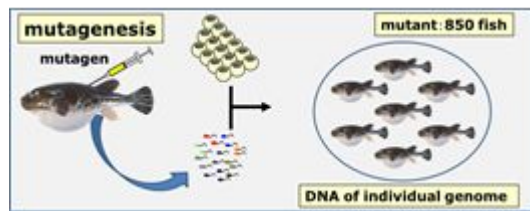


図1. トラフグ変異集団の作出

9つの分泌性カルシウム結合性リンタンパク質SCPP各遺伝子について、5'側から48領域(各約200bp/領域)、SPARC(Exon2,3,4,5,6:445塩基)、SPARCL1(Exon2,3,4:1145塩基)、SCPP1(Exon2,3,4,5,6,7,8,9:480塩基)、SCPP2(Exon2,3,4,5,6,7,8:661塩基)、SCPP3A(Exon2,3,4:259塩基)、SCPP3B(Exon2,3,4:289塩基)、SCPP3C(Exon2,3,4:277塩基)、SCPP4(Exon2,3,4,5,6:741塩基)、SCPP5(Exon2,3,4,5,6,7+8:409塩基)を設定し、それぞれを特異的に増幅するアンプリコン用プライマーを48組設計した。

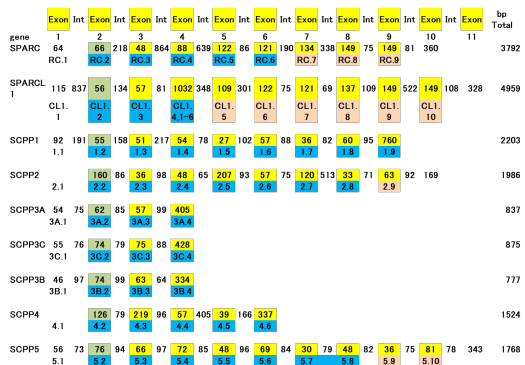


図2. 次世代シーケンサーで変異解析した9つのSCPP遺伝子の塩基配列領域(青色部分)

各個体より抽出したゲノムDNAについて4個体分をまとめてプールし、48領域(全4706塩基)に対してマルチアンプリコン作製システム(Access Array™)を用いて、サンプル識別用アダプターをつけアンプリコンの増幅を行った。このアンプリコンに対し、次世代シーケンサー(Ion PGM™)を用いて、塩基

配列データを取得した。得られたデータはゲノム解析ソフト（CLC ゲノミクスワークベンチ）を用いて変異塩基スクリーニングを実施し、変異塩基の同定ならびに変異体の選抜を行った。

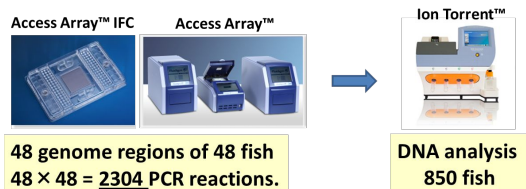


図 3. マルチアンプリコン作製システムと次世代シーケンシング解析

(2)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玉城庁舎に輸送し、人工授精により受精卵を得た。また、同上浦庁舎にて、雄 1 尾、雌 3 尾に対して早期催熟試験を実施し、1-3 月期に受精卵を得た。得られた卵はゲノム編集試験に供した。

(3)ゲノム編集（TALEN または CRISPR）法における SCPP 遺伝子の機能欠損個体の作出・選抜について以下の試験を行った。任意の標的遺伝子の機能を特異的に障害できる TALEN または CRISPR/Cas を用いた。TALEN については、広島大学から SPARCL1 に対する TALEN（SPARCL1-A および-B）のプラスミド DNA の提供を受け、mMESSAGE mMACHINE (SP6)（サーモフィッシャー）を用いて RNA を合成し、トラフグの受精卵に顕微注入を行った。一方、CRISPR で用いる、SCPP1、2、3A、3B、3C、4、5、SPARRC、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 上のフリーの設計ツール（<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。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。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。

4. 研究成果

(1)親魚のゲノム DNA 配列を参照配列とし、親配列と異なる子の塩基配列のうち、5%以下の存在頻度のものはシーケンサーの読み

取りエラー、また 10%以上については変異導入以外のエラーとみなし、さらに in/del について解析データから除いた結果、アミノ酸変異を持たない変異が 4 遺伝子（SCPP2、SCPP3A、SCPP3C、SPARC）に 9 カ所、アミノ酸変異を持つ変異が 2 遺伝子に 5 箇所（SCPP3A：1 カ所、SCPP3C：4 カ所）得られた。変異塩基により、SCPP3A ではシステインがトリプトファンに、SCPP3C 遺伝子ではスレオニンがアラニン（3 カ所）あるいはイソロイシン（1 カ所）にアミノ酸レベルで変異していた。但しいずれの遺伝子にも、停止（Stop）変異は見られなかった。この解析の結果、今回の SCPP 遺伝子群のゲノム領域内で検出された変異導入率は 0.0004%となり、これまでに別の遺伝子で調べた当初の予想（0.4%程度）より低い値となった。この理由としては、SCPP 遺伝子領域は変異が入りにくいゲノム領域である可能性が考えられた。一方、試験群全個体について、切歯形成が不全の個体は一尾も見られなかったことから、上記のアミノ酸変異型（ヘテロ型）では、切歯形成に大きな影響を与えないことが明らかになった。考えられる理由としては、上記の SCPP 遺伝子の変異は劣性形質である可能性、あるいは遺伝子機能に影響を与えない変異（タンパク機能に影響しない）であった可能性、あるいは変異を受けてない他の野生型の SCPP 遺伝子が変異アミノ酸を持つタンパクの機能補償している可能性が原因として考えられた。

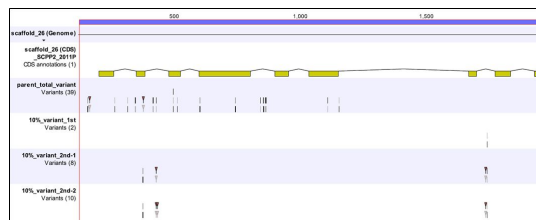


図 4. SCPP 遺伝子内に検出された変異箇所

(2) 多くの顕微注入の機会を複数回得るために、三重県尾鷲栽培漁業センターからトラフグ未受精卵の提供を受けたが、ゲノム編集試験魚の管理上の問題から研究所内の管理区域で試験を行う必要があったため、三重県尾鷲栽培漁業センターから車で一時間離れた玉城庁舎までトラフグ未受精卵を輸送し、人工授精により顕微注入が可能が調べた。未受精卵を水温 17 に維持して輸送した後（採卵 3-7 時間後）に人工授精してもふ化仔魚が得られることが分かった。また受精卵については約一時間にわたり顕微注入を実施した場合でも問題なくふ化仔魚が得られた。受精後 48 時間においてメチレンブルー染色による判定では生残率は 8-9 割であった。一方顕微注入した受精後 2 または 3 日の卵を 17.3-17.8 に保って車で輸送したところ、輸送翌日にメチレンブルー染色による判定で生残率は 9 割、うち GFP ポジ個体は 51.6%（n=281）であった。これらの結果から、遠

隔地でトラフグ未受精卵の提供を受けた場合でも、上記卵輸送、管理条件下においてゲノム編集試験が実施できることが明らかになった。

(3) 顕微注入の機会を増やすためトラフグの早期催熟を試みた。11月中旬に20から約10日間かけ15まで冷却し(-0.5/日)、16日間維持した後、12月上旬から0.5/2週間で温度を上げ、2月上旬から17を維持した。日長は自然日長とした。3月上旬に雌3尾に対し、カニューレにより卵径を確認したところ約800-1,000 μ mであった。各4-5kgの体重に対し、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを2,500IUで1ないし2回注射投与したところ、当初卵径1,034 μ mの個体では初投与から4日後、936 μ mの個体は12日後、857 μ mの個体は23日後に排卵が確認された。個体ごとに採卵時期はずれたものの全3尾で約1-2ヶ月早期採卵することができた。これにより顕微注入の機会を増やすことができた。

(4) 突然変異誘発による変異体の作出ができなかったことから、ゲノム編集技術の一つTALENにより変異個体の作出を試みた。尾鷲栽培漁業センターから輸送した未受精卵を用いて、玉城庁舎にて人工授精した受精卵に対し、SCPP遺伝子の一つSPARLCL1遺伝子に対するTALEN-RNA、SPARLCL1-TALEN-AおよびBペアをそれぞれ受精卵に顕微注入し、変異導入個体のスクリーニングをHMA解析で行った。およそ80尾のふ化仔魚に対して変異導入個体を探索したが、変異体に特徴的なバンドシフトは見られず、変異導入個体を得る事はできなかった。培養細胞を用いた切断試験では活性があったので、変異体が得られなかった原因については不明であった。

(5) CRISPR/CasはTALENより、RNAの分子量が小さく、一度に多くの遺伝子に対するRNAを一つの卵に顕微注入できる利点があるため、少ない実験材料、飼育スペースで効率的にゲノム編集を行うことができると考えられる。CRISPR/Casによってゲノム編集を行うために、必要なガイドRNAを9種のSCPP遺伝子に対して設計・合成を行った。全12種についてそれぞれ受精卵に顕微注入を行い、変異導入活性を調べた。受精2日後の卵からDNAを抽出し、各遺伝子のアンプリコンDNAに対してHMA解析を行った。各ガイドRNAの切断活性は、SCPP3A-2、3B-1、3B-2、3C-1、4、SPARCについては強く、SCPP1、2、3A-1、3C-2、5、SPARLCL1については弱かった。SCPP5に対するガイドおよび人工ヌクレアーゼRNAをトラフグ受精卵およそ500個に顕微注入を行った。ふ化直前の発生率は35.5%で、ふ化後2ヶ月齢において変異導入候補稚魚50尾が得られた。体長5-7cmでタグを打ち、HMA法により変異導入個体7尾を得ることができ

た。切歯の外部形態を目視で確認したが、明らかな形成不全は認められなかった。

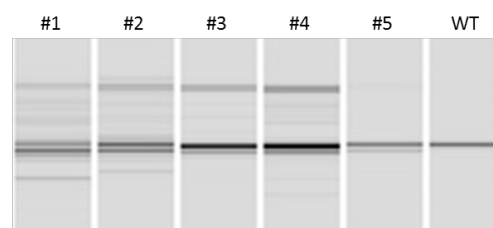


図5. 変異個体の確認(#1-4変異あり)

得られたゲノム編集F0個体では体細胞モザイクでヘテロ変異が導入されていると考えられ、機能欠損の表現型に対する効果は限定的であると考えられた。今後、次世代F1や次次世代F2を作出し、全細胞ホモ型変異個体で歯の形成について形質評価する必要がある。全細胞ホモ型変異個体を作出し、歯形成の分子メカニズムや関与する遺伝子の機能解析を進める事によって、将来トラフグ養殖における歯切り作業の低減につながる知見と成果が得られるものと期待される。

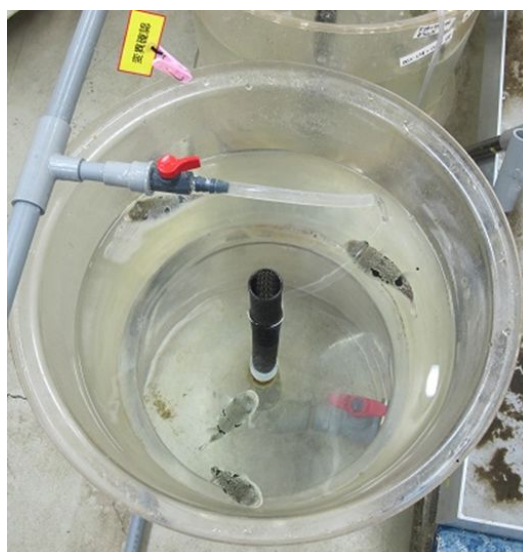


図6. SCPP遺伝子に変異が確認された稚魚

<引用文献>

- Y Kogaya and F Iwaku. (2004) Phylogenetic considerations of the origin of enameloid 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.
- E Wienholds *et al.* (2002) Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. Science 297, 99-102.

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.

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

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

H. Okamoto, Mutagenesis and genome editing for aquaculture fish species, The 44th Scientific Symposium of the UJNR Aquaculture Panel, 2016.11.1-2, シアトル (アメリカ)

H. Okamoto *et al.*, Application of mutant screening for multi-genes using next generation sequencing technology from mutagenized populations, International Symposium on Genetics in Aquaculture, 2015.6.21-27, サンチャゴ・デ・コンポステラ (スペイン)

岡本裕之 ゲノム編集によるトラフグの育種戦略, 2014.9.19, 九州大学 (福岡)

〔その他〕

機能性食材研究 第21回 トラフグ、日経バイオテク 2015.9.14、35-36

6. 研究組織

(1) 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・増養殖研究所・グループ長

研究者番号：50372040

(2) 研究分担者

藤原 篤志 (FUJIWARA, Atsushi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主幹研究員

研究者番号：30443352

木下 政人 (KINOSHITA, Masato)

京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：60263125

(3) 研究協力者

山本 卓 (YAMAMOTO, Takashi)

広島大学・大学院理学研究科・教授

佐久間 哲史 (SAKUMA, Tetsushi)

広島大学・大学院理学研究科・特任講師

石川 卓 (ISHIKAWA, Takashi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・研究支援職員

甲斐 渉 (KAI, Wataru)

元国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究支援職員

西木 一生 (NISHIKI, Issei)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究支援職員

岩崎 裕貴 (IWASAKI, Yuki)

元国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究支援職員

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

岡田 一宏 (OKADA, Kazuhiro)

三重県尾鷲栽培漁業センター・所長

糟谷 享 (KASUYA, Tohru)

三重県尾鷲栽培漁業センター・技師

杉山 昇平 (SUGIYAMA, Syouhei)

三重県尾鷲栽培漁業センター・技師