

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02277

研究課題名(和文) 魚類における生殖細胞形成に必要な分子基盤の解明と汎用的な不妊化技術の開発

研究課題名(英文) The molecular basis for germ cell development in teleost fish

研究代表者

西村 俊哉 (Nishimura, Toshiya)

北海道大学・水産科学研究院・助教

研究者番号：10758056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生殖細胞形成に必要な分子基盤を明らかにし、幅広い魚類において不妊化可能な技術開発を行うことである。そのために、生殖細胞形成に必要なdnd1遺伝子の下流因子の探索と機能解析を実施し、生殖細胞の数が減少する因子を同定した。また、CRISPR-Cas13dシステムを用いて、dnd1遺伝子の魚類共通配列を標的とするgRNAによってノックダウンを行い、モデル魚であるメダカと産業重要種であるニジマスにおいて生殖細胞を欠損させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖魚の不妊化は、遺伝的封じ込めだけでなく、高成長化や肉質の高品質化も期待できるため、養殖需要が高まる現代において汎用性の高い不妊化技術の開発の重要性は増している。本研究では、CRISPR-Cas13dシステムを用いて、生殖細胞形成に必要なdnd1遺伝子の魚類共通配列を標的とするgRNAによってノックダウンを行い、メダカ及びニジマスにおいて生殖細胞を欠損させることに成功した。これは、CRISPR-Cas13dシステムを用いた遺伝子ノックダウンが、モデル魚だけでなく、産業重要種における不妊化に有用であることを示す初めての成果であり、本システムによって汎用性の高い不妊化技術の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the molecular basis for germ cell formation and to develop sterile techniques applicable to a wide range of fish species. To achieve this, we conducted exploration and functional analysis of downstream factors of dnd1 gene, which is essential for germ cell formation, and identified factors that reduce the number of germ cells. Additionally, using the CRISPR-Cas13d system, we successfully generated germ cell-deficient sterile fish by knockdown with gRNAs targeting the conserved sequences of the dnd1 gene using experimental model fish, medaka, and economically important species, rainbow trout.

研究分野：生殖生物学

キーワード：不妊化技術 CRISPR-Cas13d 生殖細胞 メダカ ニジマス

1. 研究開始当初の背景

魚類における不妊化技術は、日本固有種の生存を脅かす外来魚種の駆除や養殖魚の逃亡による遺伝的攪乱を防ぐ手段として有用である。また、水産養殖分野の借腹生産技術において、マグロのような付加価値の高いドナー魚種の配偶子を純度高く得るためにホスト魚種の不妊化が重要である。さらに不妊化技術を利用して水産生物の高成長化や肉質の高品質化を誘導する試みも進められている。このように不妊化技術は生態系の維持だけでなく、資源の有効利用に貢献でき、不妊化個体を汎用性が高い方法で、かつ、効率的に作出することが現在の課題である。

確実に不妊化魚を作出するためには、精子と卵の元となる生殖細胞を欠損させる方法が有効である。魚類では、卵が作られる過程において、生殖細胞形成に必要な成分である生殖質 (mRNA やタンパク質の複合体) が蓄積し、初期発生においてこの生殖質を取り込んだ細胞が生殖細胞へと分化する。生殖細胞形成の仕組みを理解するためには、生殖質構成因子 (生殖顆粒因子) を知ることが重要となるが、魚類において包括的にそれらを調べた研究はほとんどない。

従来では、生殖細胞を欠損させるために人工合成ヌクレオチドオリゴであるモルフォリノを用いて、生殖細胞形成に必要な生殖顆粒因子をノックダウンする方法が用いられてきた。しかし、標的となる遺伝子サイトは DNA 配列の保存性が低い 5' 非翻訳領域から翻訳開始点であるため、魚種ごとに標的遺伝子をシーケンス解析し、モルフォリノを設計する必要があった (図 1 B 左)。またモルフォリノは細胞毒性やオフターゲット効果が高く、免疫・ストレス応答も誘起するため、設計部位によっては効率的に不妊化することが困難な場合がある。さらに、モルフォリノは高価であり (多くの研究者にとって死活問題である)、気軽に複数箇所を設計することが阻まれる。以上のようにモルフォリノを用いた方法では、新規導入する養殖魚や新たな外来魚などを速やかに不妊化させることが困難と言える。

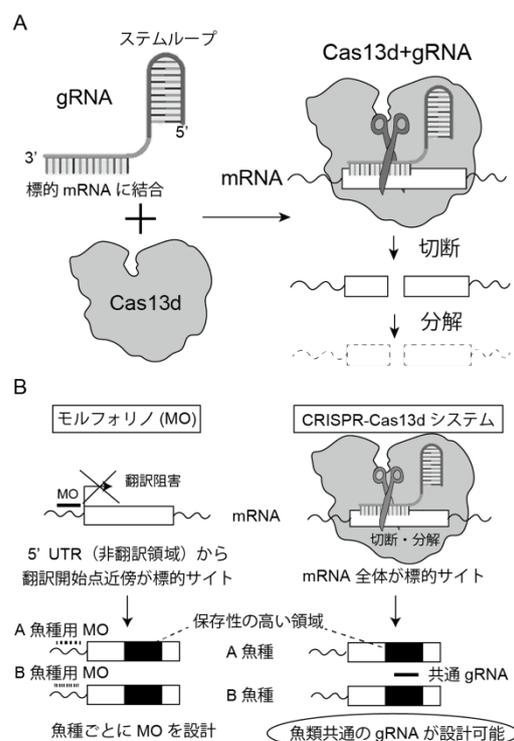


図 1 : CRISPR-Cas13d システムとモルフォリノの比較

CRISPR-Cas RNA エンドヌクレアーゼである Cas13 は RNA を標的としゲノムを改変することなく、標的遺伝子をノックダウンできる (図 1 A)。ゼブラフィッシュやメダカを用いた研究で、Cas13d と標的遺伝子の mRNA に相補的に結合可能な gRNA を受精卵へインジェクションすることで、効果的に母性因子をノックダウンできることが明らかとなった (Kushawah et al., 2020)。CRISPR-Cas13d システムは、細胞毒性が低く、免疫・ストレス応答の誘起もほとんどないと考えられている。また gRNA の合成は比較的安価 (モルフォリノの 10 分の 1 以下) であるため、多数ある候補遺伝子のノックダウンによるスクリーニングも可能となる。さらに、モルフォリノのようにノックダウンの標的サイトが限定されず、mRNA 全体が標的になり得る (図 1 B 右)。すなわち、生殖細胞形成に必要な遺伝子において魚種を超えて保存された共通配列を gRNA の標的とすることで、魚類共通 gRNA の設計が可能である。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR-Cas13d システムを用いて、①ノックダウンスクリーニングにより魚類における生殖細胞形成に必要な分子基盤を明らかにし、さらに②たった一つの共通試薬(mRNA もしくは mRNA/タンパク複合体)を受精卵にインジェクションすることで、幅広い魚類を汎用的に不妊化できる技術の開発が目的である。

3. 研究の方法

・材料

北海道大学大学院水産科学研究院で飼育している野生型メダカ (Cab 系統)、及び、生殖細胞を EGFP で標識した *ovas*-EGFP トランスジェニックメダカを用いた。北海道大学七飯淡水実験所より提供されたニジマスの受精卵を用いた。

・ CRISPR-Cas13d システムにおける gRNA の設計・合成

メダカ *dnd1* (NM_001164516) 及び *nanos3* (AB306931) の全長配列を *cas13design tool* (<https://cas13design.nygenome.org/>) (Wessels et al., 2020) にアップロードし、スコアの高い gRNA 選定した。gRNA の合成は先行論文(Kushawah et al., 2020)に従ったが、RNA 合成試薬は、ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit(TOYOBO)を用いた。魚類共通 gRNA を設計するために、ensembl 及び NCBI に登録されている 70 魚種から 81 個の *dnd1* 遺伝子をアライメントし、配列保存性が高い領域を標的とする gRNA を設計・合成した。

・ Cas13d mRNA の合成

pT3TS-RfxCas13d-HA (Kushawah et al., 2020)(Addgene plasmid # 141320)を XbaI で線状化した後に、mMESSAGE mMACHINE™ T3 Transcription Kit (Invitrogen™)を用いて合成した。

・メダカ卵へのインジェクション

200ng/μl Cas13d mRNA 及び 100ng/μl の *dnd1* gRNA を 40ng/μl EGFP-*nanos3* 3'UTR mRNA (生殖細胞を標識) とともに、自然交配により得られた受精卵の 1 細胞期に電動マイクロインジェクター(IM-400, NARISHIGE)を用いてインジェクションした。

・ニジマス卵へのインジェクション

約 200 ~ 300 粒の未受精卵に対し、人工精漿 (100mM NaCl, 40mM KCl, 3mM CaCl₂, 1.5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, pH8.5) で 20 倍希釈した精子を 1ml 加え人工授精を行った。卵膜硬化抑制のために、得られた受精卵を 2mM 還元型グルタチオン(pH8.0)溶液中にて 10°C で培養した。マイクロインジェクションは受精後 3 時間 ~ 4 時間後に電動マイクロインジェクター(IM-400, NARISHIGE)を用いて行った。キャピラリーは GD-1(NARISHIGE)を用いた。*dnd1* をノックダウンするために 300ng/μl Cas13d mRNA 及び 100ng/μl の *dnd1* gRNA を 200ng/μl EGFP-*rt-vasa* 3'UTR mRNA とともに、1 細胞期ニジマス胚にインジェクションした。

・生殖細胞形成に必要な候補因子の同定

ovas-EGFP メダカ胚を用いて、生殖細胞が生殖腺へ到達する前(st.30)の EGFP 陽性の生殖細胞 (PGC)をセルソーター (SH800S Sony) で分取し、NucleoSpin RNA Plus XS を用いて Total RNA を抽出した。また、20ng/μl *dnd1* mRNA をインジェクションした胞胚期のメダカ胚と未処理コントロールメダカ胚から Total RNA を抽出した。cDNA ライブラリーの合成及びシーケンス解析は、次世代シーケンス受託サービス (NipponGenetics) に依頼した。PGC で発現 (リードカウント 1000 以上) し、かつ、*dnd1* の強制発現によって 2 倍以上発現上昇する遺伝子を探索した。

4. 研究成果

dnd1 及び nanos3 のノックダウンによる効率的な不妊化魚の作出

哺乳類の研究を元に開発された gRNA 設計ツールである Cas13 design(<https://cas13design.nygenome.org/>)を用いて、生殖顆粒因子である *dnd1* 及び *nanos3* をターゲットする gRNA を設計し、メダカにおいて効果的にノックダウンが可能か検証した。その結果、*dnd1* 及び *nanos3* gRNA によってそれぞれ 100%の効率で生殖細胞を欠損できることが分かった (図 2)。

gRNA と標的配列間のミスマッチの許容を調べるために、gRNA の標的配列結合部位(23nt)の 5'側から 3'側にかけて 2nt ずつの変異を加えノックダウン効率を調査した。その結果、stem-loop 側から 1~2 及び 21~23 番目に 2 塩基のミスマッチを入れても、ノックダウン効率の減少はなかったが、17~20 番目の塩基に 2 塩基のミスマッチを入れると著しくノックダウン効率が落ちた (図 3 A)。3~16 番目におけるミスマッチは gRNA によってノックダウン効率が異なっていた。以上のことから、23nt の標的配列結合部位を有する gRNA を用いた場合、17~20 番目領域にシード配列があると考えられる (図 3 B)。

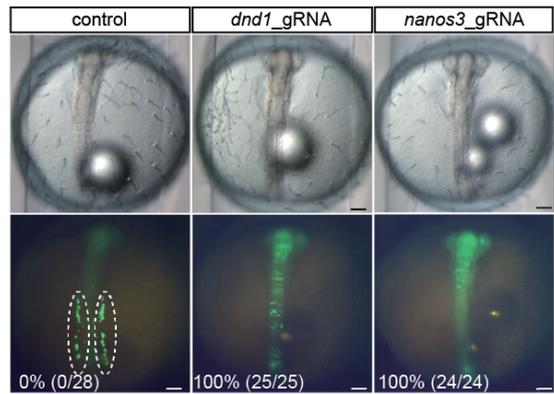


図2. *dnd1*及び*nanos3*ノックダウンによる効率的な不妊化魚の作出 controlの点線領域は生殖細胞の位置を示す。左下の数値は生殖細胞が欠損した個体の割合を示す。

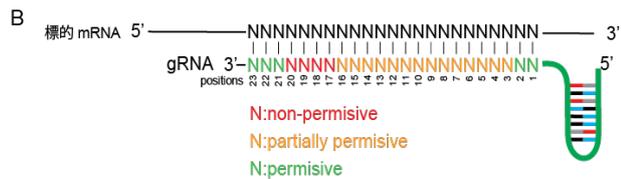
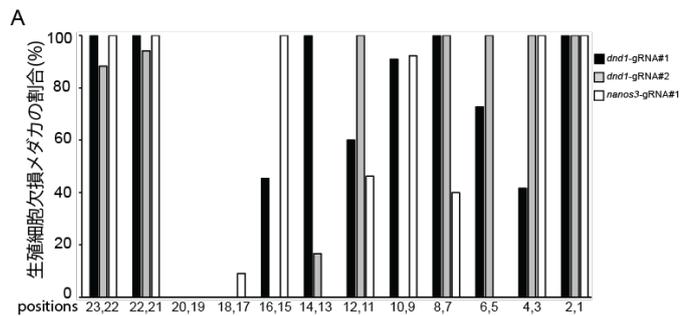


図3. gRNAの標的結合部位におけるミスマッチの許容 A. 2ntのミスマッチを導入したgRNAによるノックダウン効率。 B. gRNAのミスマッチ許容部位。赤色塩基はシード配列と考えられる。

魚類で汎用的に利用可能な gRNA の開発

生殖細胞形成に必須な *dnd1* 遺伝子の共通性の高い配列をターゲットとする gRNA を設計し、CRISPR-Cas13d システムを用いたノックダウンにより汎用性高く魚類の不妊化が可能か検証した。魚類 *dnd1* 遺伝子(70種81遺伝子)において 100%マッチした標的配列は存在しなかったため、配列保存性の高い領域を選択し、魚種グループごと(例、サケ科魚類)の配列をもとに共通 gRNA を設計した。そして、

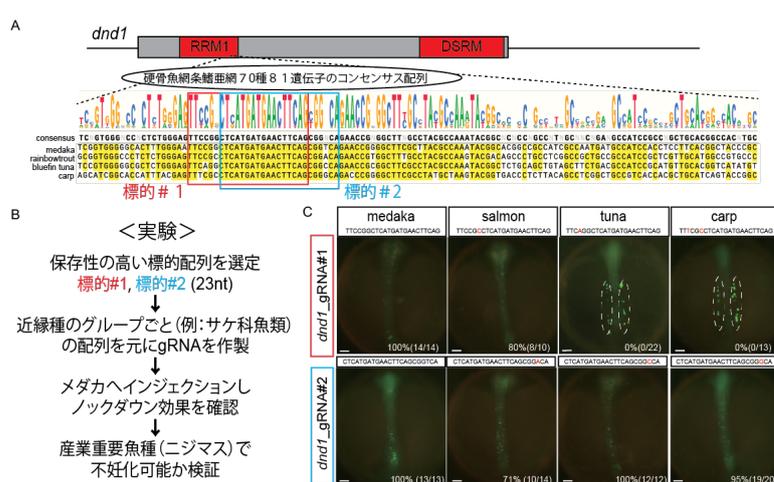


図4. 魚類で汎用的に利用可能なgRNAの開発 A. 70魚種由来の*dnd1*遺伝子(81)のアライメントとコンセンサス配列。標的#1(赤枠)と標的#2(青枠)に対するgRNAを設計した。 B. 実験デザイン。 C. メダカ胚におけるノックダウン効果の確認。白い点線領域は生殖細胞の位置を示す。右下の数値は生殖細胞が欠損した割合を示す。

それらをメダカ受精卵にインジェクションし、生殖細胞の欠損を指標にノックダウンが可能か調査した。メダカ *dnd1* に対して、1 塩基のミスマッチがある魚種グループ(サケ科、マグロ属)の gRNA では、ノックダウン効率は減少するものの、メダカの生殖細胞の完全欠損を確認できたが、2 塩基のミスマッチ(コイ科)がある gRNA ではノックダウンを確認できなかった (図 4 C)。

産業重要種であるニジマスにおいて、CRISPR-Cas13d システムを用いたノックダウンにより不妊化が可能か検証するために、上記の gRNA (標的#1, #2) の他に、*Oncorhynchus* 属 (カラフトマス、シロザケ、ギンザケ、ニジマス、ヒメマス、マスノスケ)、*salvelinus* 属

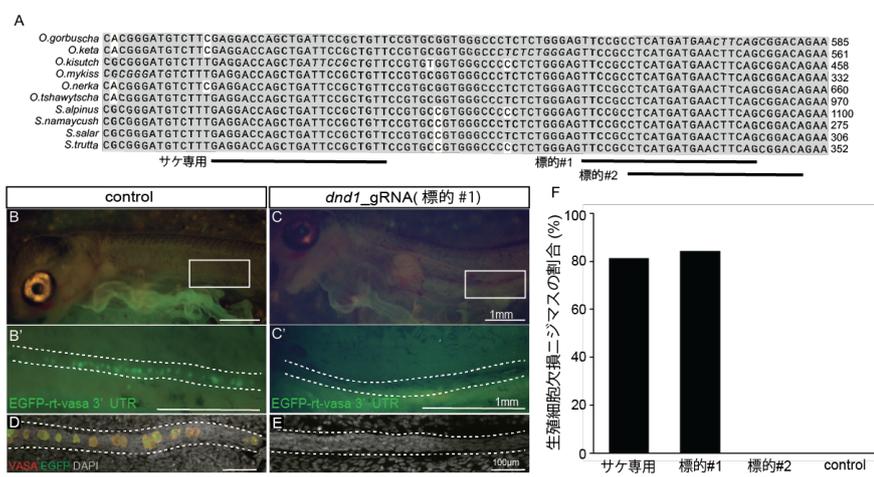


図5. サケ科魚類共通gRNAを用いたニジマスの不妊化
A. サケ科魚類(*Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Salmo*属)*dnd1*配列のアライメントとgRNAの設計部位(アンダーバー)。サケ専用は、サケ科魚類の共通配列をもとに設計。標的#1, 2は図4と同一の標的サイト。B. コントロールのニジマス孵化胚。白四角はB'に拡大。C. gRNA(標的#1)によって*dnd1*をノックダウンしたニジマス孵化胚。白四角はC'に拡大。白い点線領域は生殖腺を示す。D, E. VASA抗体(赤)とEGFP抗体(緑)によって免疫組織化学染色を施した生殖腺。核はDAPI染色した。白い点線部は生殖腺を示す。F. 生殖細胞が欠損したニジマス胚の割合。

(イワナ、レイクトラウト)、*Salmo* 属 (ブラウントラウト、タイセイヨウサ) で共通の gRNA(サケ専用)を設計し (図 5A)、ニジマス受精卵へ *Cas13d* mRNA と EGFP-*vasa* 3'UTR mRNA(生殖細胞標識)とともにインジェクションした。その結果、標的#1 とサケ専用 gRNA において、80%以上の効率でEGFP陽性の生殖細胞が欠損した(図 5B, C, F)。さらに生殖細胞マーカーである VASA 抗体を用いた免疫組織化学染色により生殖細胞の完全欠損を確認できた (図 5D, E)。以上の結果から CRISPR-Cas13d システムによる *dnd1* のノックダウンが養殖魚の不妊化に有効であり、さらに、本研究で設計した共通 gRNA により幅広い魚種での不妊化が可能であることを示唆する。

サケ科魚類の *nanos3* について

nanos3 は生殖細胞形成に必要な因子として知られているが、ニジマスを始めとするサケ科魚類において複数のパラログが存在する。Ensembl ゲノムデータベース上を探索したところ、ニジマスには、9 個の *nanos3* 遺伝子見つかり、そのうち、q-PCR と *in situ* hybridization によって卵巣と精巣において顕著に発現量の高い *rt_nanos3* を同定した。発現量の低い *nanos3* の多くは、機能ドメインである、zinc finger 上に変異が蓄積していたことから、偽遺伝子化しつつある可能性が示唆された。今後、*rt_nanos3* を CRISPR-Cas13d によってノックダウンし、ニジマス生殖細胞の欠損を確認できれば、サケ科魚類の新たな不妊化技術の確立に貢献できる。

新規生殖顆粒因子の探索

生殖細胞形成に必要な分子基盤を明らかにするために、生殖細胞形成に必要・十分な *dnd1* 遺伝子を強制発現させたメダカ胚と野生型胚 (胞胚期)、及び、生殖腺到達前の生殖細胞 (PGC) の RNAseq 解析を行い、*dnd1* 遺伝子の下流で働く遺伝子を探索した。*dnd1* の強制発現によって 2 倍以上発現上昇した 514 個の遺伝子のうち、生殖細胞で発現している (リードカウント 100 以上の) 161 個の遺伝子を同定した。特に発現上昇が顕著であった候補因子を CRISPR-Cas9 によってノックアウトしたところ、生殖細胞の数の減少が見られた。本研究によって得られたトランスクリプトームは、生殖細胞形成の分子基盤解明の基礎データとなるため、さらなるスクリーニングを通して生殖細胞形成に必要な因子の同定を目指す。

参考文献

Kushawah et al. 2020. Dev Cell 54, 805-817.e7. Wessels, H.-H., et al. 2020. Nat Biotechnol 38, 722-727.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Generation of Self-Fertilizing Hermaphroditic Fish from Gonochoristic Fish, Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000526073	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 Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru	4. 巻 39
2. 論文標題 Zygotic nanos3 Mutant Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) Displays Gradual Loss of Germ Cells and Precocious Spermatogenesis During Gonadal Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210123	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 Sumita Ruka, Nishimura Toshiya, Tanaka Minoru	4. 巻 38
2. 論文標題 Dynamics of Spermatogenesis and Change in Testicular Morphology under 'Mating' and 'Non-Mating' Conditions in Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 436-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs210025	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 Fujimoto Takafumi, Nishimura Toshiya	4. 巻 68
2. 論文標題 Chromosome Set Manipulation and Genome Manipulation in Aquaculture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 277 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/nskkk.68.277	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村俊哉・飯野菜帆・藤本貴史・高橋英佑・山羽悦郎
2. 発表標題 CRISPR-Cas13d システムを用いた汎用性の高い不妊化技術の確立
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村風歌・藤本貴史・西村俊哉
2. 発表標題 クローン系統ドジョウにおける生殖細胞可視化系統の樹立
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内萌・山羽悦郎・藤本貴史・西村俊哉
2. 発表標題 メダカ半数性生殖細胞はクローン配偶子を産生するか？
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤本貴史・柴田季子・川村祥史・西村俊哉・荒井克俊
2. 発表標題 ドジョウ系統間雑種四倍体の産する精子の遺伝的特性
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川村祥史・西村俊哉・藤本貴史
2. 発表標題 クロードジョウの非還元卵形成におけるゲノム倍加ステージの特定
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田季子・西村俊哉・藤本貴史
2. 発表標題 ドジョウ系統間雑種における非還元配偶子形成の遺伝性
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村俊哉
2. 発表標題 精子になるか、卵になるか? ~生殖細胞の性のスイッチ機構の解明とその応用~
3. 学会等名 日本農芸化学会 北海道・東北支部 合同若手の会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内萌、川村祥史、荒井那允、山羽悦郎、藤本貴史、西村俊哉
2. 発表標題 雄も重要なメダカの雌性発生
3. 学会等名 公益社団法人 日本動物学会 北海道支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村俊哉・飯野菜帆・藤本貴史・高橋英佑・山羽悦郎
2. 発表標題 CRISPR-Cas13dシステムにおける魚類共通gRNAを用いたdnd1遺伝子のノックダウン
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 會田有未, 西村俊哉
2. 発表標題 メダカにおけるBalbiani bodyと生殖顆粒の動態解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 始原生殖細胞が富化された胚を調整する方法	発明者 西村俊哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-214948	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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