

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14805

研究課題名(和文) 真に実用的な海産魚由来のモデル生物を創生するための基礎基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of the foundation for a new model organism derived from marine teleosts

研究代表者

坂口 圭史 (Sakaguchi, Keishi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50396280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、新しい魚類由来モデル生物の候補として、海産魚カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) に着目した。本種の飼育法は確立されているが、モデル生物として活用するためには、遺伝情報や遺伝子操作システムの整備が必要である。そこで本研究では、カタクチイワシ受精卵に対するマイクロインジェクション法を構築し、次いで、ゲノム編集による高効率な遺伝子破壊法、および外来遺伝子発現系を開発した。

研究成果の概要(英文)：We focused on marine fish, the Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*), as a candidate of a new model organism derived from teleosts. The breeding method of this species has been established. However, in order to utilize it as model organism, developing a system of genetic information and genetic manipulation is required. In this research, we established a microinjection system for the fertilized eggs and developed methods for high efficiency gene disruption via genome editing and foreign gene expression.

研究分野：分子生物学、生化学、生物工学

キーワード：モデル生物 カタクチイワシ ゲノム編集 外来遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

普遍的な生命現象の解析には、実験環境が確立されたモデル生物が有用である。一方、多様な生命現象の解析には、対象を抽象化し論理的に捉え易い生物を選択する必要が生じるが、既存のモデル生物では対応が難しいことが多い。そこで本研究では、実験魚として確立された淡水魚ゼブラフィッシュ及びメダカに次ぐ第三の魚類由来モデル生物として、海産魚カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) に着目した。カタクチイワシは入手が容易で、小規模水槽での飼育法が確立されている。卵膜は透明で胚発生過程を観察することができ、孵化後約75日という短期間で産卵親魚に成長する。すなわち、カタクチイワシはモデル生物に求められる資質をほぼ全て備えており、本研究対象として最適である。

2. 研究の目的

海産魚カタクチイワシを、魚類由来の新しいモデル生物として確立するための基礎基盤の構築を目的とする。本種の飼育法はすでに確立されているが、モデル生物として活用するためには、遺伝情報や遺伝子組換え技術などの基礎基盤の充実が不可欠である。そこで本研究では、周年採卵技術の確立、外来遺伝子発現系の構築、ゲノム編集による遺伝子破壊法などの網羅的な技術開発を行うことで、モデル生物としての本種の有用性を提言する。

3. 研究の方法

(1) 周年採卵技術の開発

暗室内に円形水槽を設置し、水面照度約500ルクスの人工照明下(明期13時間:暗期11時間)において、年間を通じて水温20~22でカタクチイワシ成魚を飼育した。また、水槽の排水口に目の細かいネットを設置し、飼育水中に産卵されたカタクチイワシ受精卵を採取した。

(2) マイクロインジェクション法の開発

マイクロインジェクションに使用する受精卵は、産卵直後の初期発生段階(1~2細胞期まで)である必要がある。そこで、1細胞期の受精卵を様々な温度で処理することで、生残に影響せず、かつその初期発生を遅らせるインキュベーション温度を決定した。同様に、様々な溶液中でインジェクション操作を行い、生残に影響しないインジェクション培地を選択した。また、インジェクション部位による導入の差異を比較するために、蛍光色素ローダミン標識デキストラン溶液を卵黄部に注入し、受精後24及び48時間後の初期胚のローダミン蛍光を観察した。続いて、オワンクラゲ由来蛍光色素GFPのmRNAをマイクロインジェクションし、受精後24及び48時間後の初期胚のGFP蛍光を観察することで、本法の有用性を検討した。

(3) 外来遺伝子発現系の開発

5'及び3'RACEによって、カタクチイワシ由来ペプチド伸長因子1 α (EF-1 α)遺伝子、アクチン遺伝子、及びポリユビキチン遺伝子cDNAを決定した。続いて、当該遺伝子群のプロモーター配列をゲノムウォーキング法によって取得し、それらの配列を利用したカタクチイワシGFP遺伝子発現ベクターを構築した。次に、マイクロインジェクション法を用いてカタクチイワシ受精卵にベクターを導入し、受精後24及び48時間後の初期胚のGFP蛍光を観察した。

(4) ゲノム編集による遺伝子破壊法の開発

5'及び3'RACEによって、カタクチイワシ由来ミオスタチン-1遺伝子(*mstn-1*)及びミオスタチン-2遺伝子(*mstn-2*)を単離した。続いて、マイクロインジェクション法を用いてゲノム編集技術TALEN及びCRISPR-Cas9法をカタクチイワシ受精卵に適用し、*mstn-2*に対する変異導入を試みた。変異導入活性の見積もりには、ヘテロ二本鎖移動度分析(HMA: Heteroduplex Mobility Assay)を用いた。

続いて、*mstn-2*に対する変異導入活性が高いTALENを導入したF0世代を作出した。次に、F1世代の遺伝子型解析を行い、*mstn-2*の両アリル共にフレームシフト変異を起こした個体を選別した。さらに、それらを選択的に掛け合わせることで、F2世代における*mstn-2*完全ノックアウト系統の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) 周年採卵技術の開発

日照時間が減少し水温が低下する冬季は、カタクチイワシは産卵を停止する。また受精卵への、マイクロインジェクションは受精直後に行う必要があるが、自然日長での産卵は日没後の深夜帯であり実験が困難である。

そこで、年間を通じて水温20~22に制御し、明期13時間、暗期11時間とする人工光周期条件下での飼育を試みた(図1)。その結果、周年採卵が可能であり、かつ実験に適した受精直後の卵を、任意の時間帯に採取することが可能な飼育環境の構築に成功した。

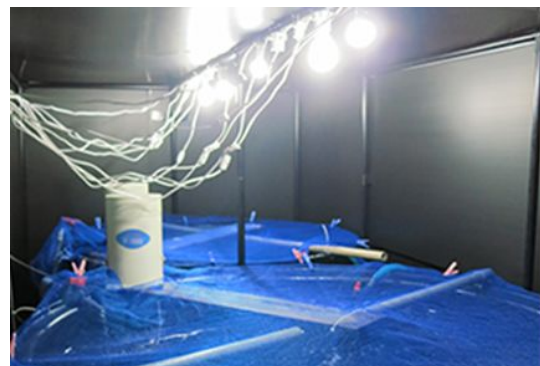


図1. 人工光周期下での飼育

(2) マイクロインジェクション法の開発

1 細胞期の受精卵を 4, 10, 13, 15, 20 で 1 時間インキュベートし、24 及び 48 時間後の生残を調べたところ、15 処理区では 20 処理区 (コントロール) と比較して変化しないが、他の低温処理区では生存率が低下した。そこで、15 及び 20 処理区における胚発生の経過を観察したところ、マイクロインジェクションに不適な 4 細胞期胚の出現時間は、20 処理区の受精後 40 分に対して 15 処理区では 70 分と、2 倍程度にまで遅延させることが可能と判明した。また、ラグビーボール状のカタクチイワシ卵において、卵黄及び胚盤へのインジェクションを可能とする寒天上で卵固定法を決定した。一方、インジェクションを行うピペットは、先端径 2 ミクロン程度に研磨しスパイク加工を施すことで容易に卵膜を穿孔したが、海水中では全ての卵が死滅した。そこで、細胞培養用の Leibovitz's L-15 培地中で穿孔し、かつ浸漬時間を 15 分以内とすることで、無処理の卵と比較して生存率が変化しないことを見出した。続いて、卵黄部分にインジェクションした蛍光色素ローダミン標識デキストランは速やかに胚盤へと移行し、その胚発生は正常に進行することを確認した。さらに、*gfp* mRNA を卵黄部にマイクロインジェクションした初期胚には、強度の GFP 蛍光が観察された (図 2)。以上の結果から、カタクチイワシ受精卵に対するマイクロインジェクション法を開発したことが示された。

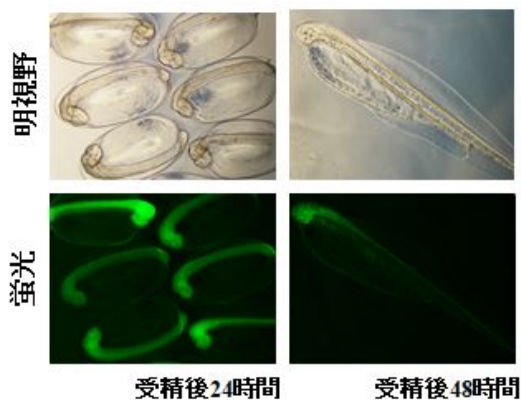


図 2. *gfp* mRNA を導入した初期胚

(3) 外来遺伝子発現系の開発

カタクチイワシ由来 EF-1 α 遺伝子、アクチン遺伝子、ポリユビキチン遺伝子 cDNA を単離した。それらの配列情報を基にして、ゲノムウォーキング法によって約 3 kb の EF-1 α プロモーター配列、約 1.3 kbp のアクチンプロモーター配列、約 1.3 kbp のポリユビキチンプロモーター配列を取得した。続いて、EF-1 α プロモーターによって *gfp* を駆動するカタクチイワシ発現ベクターを構築し、1 細胞期のカタクチイワシ受精卵にマイクロインジェクションした。その結果、受精後 24

及び 48 時間後の初期胚に GFP 蛍光が観察され、カタクチイワシ外来遺伝子発現系の基盤構築に成功したことが示された。

(4) ゲノム編集による遺伝子破壊法の開発

本研究項目では、筋肉の成長を抑制するタンパク質であるミオスタチン遺伝子 (*mstn*) に着目した。本遺伝子の破壊は筋肉の増大が予想されることから、養殖魚育種モデルの構築に有用である。そこで、カタクチイワシ由来 *mstn-1* 及び *mstn-2* の cDNA 及びゲノム配列を同定した。*mstn-2* において、当該遺伝子の第 1 エキソンを標的とした TALEN を 3 種、CRISPR-Cas9 を 3 種構築し、それらを 1 細胞期の受精卵の卵黄部にマイクロインジェクションした。その結果、HMA によって TALEN 2 種、CRISPR-Cas9 3 種に変異導入活性が見いだされ、配列解析によって、最も効率的なものに関しては 96.9% と高い効率で indel 変異を誘発していることが分かった。続いて、F0 ファウンダー同士の交配を行い、得た F1 世代の遺伝子型を調べたところ、個体レベルで 95.7% (44 / 46 個体) に導入変異が伝達されており、うち 2 割強程度の個体は、*mstn-2* の両アリル共にフレームシフト変異を有する *mstn-2* 完全ノックアウト個体であることが判明した。そこで、それらの *mstn-2* 完全ノックアウト個体を選択的に掛け合わせた F2 世代を作出し、遺伝子型解析を行ったところ、*mstn-2* 完全ノックアウト系統を樹立したことが示された。

現在、上述の成果を基にした学術論文を執筆中である。

本研究のさらなる進展によって、海産魚に特有の遺伝子機能の解析、高成長・高肉質などの有用な形質を示す養殖魚作出の基盤技術の開発、産出卵にバイオ医薬品などを大量生産させる魚工場の構築など、様々な応用例が期待される。

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)

なし

〔学会発表〕(計 4 件)

坂口 圭史、長野 直樹、北野 載、松山 倫也

カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) における外来遺伝子発現系の構築

日本農芸化学会 2016 年度大会・2016 年 3 月 27 日~31 日・札幌、札幌コンベンションセンター

坂口 圭史、中島 奏子、長野 直樹、北

野 載、松山 倫也

日本産力タクチイワシを対象としたゲノム編集技術の適用 - 養殖魚育種モデルの構築を目指して -

平成 28 年度日本水産学会春季大会・2016 年 3 月 26 日～30 日・東京、東京海洋大学

Sakaguchi K, Nakashima K, Kitano H, Nagano N, Matsuyama M.

Production of myostatin-knockout Japanese anchovies (*Engraulis japonicus*) using TALEN-based genome editing.

United States-Japan Natural Resources Panel on Aquaculture (UJNR) 43rd Scientific Symposium・2015 年 11 月 10 日～11 日・Nagasaki, Nagasaki university

坂口 圭史、中島 奏子、北野 載、長野直樹、松山 倫也

実用的な海産魚由来モデル生物を創生する試み

第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会・2015 年 5 月 30 日～31 日・東京、東京海洋大学

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 圭史 (SAKAGUCHI, Keishi)

九州大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：50396280

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

北野 載 (KITANO, Hajime)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30635008

松山 倫也 (MATSUYAMA, Michiya)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00183955

長野 直樹 (NAGANO, Naoki)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：50437943

(4) 研究協力者

なし