

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14980

研究課題名(和文) 親魚への腹腔内注射でゲノム編集する新技術の開発 - 多様な養殖魚への応用を目指して -

研究課題名(英文) Development of efficient delivery method for genome editing in aquaculture fish

研究代表者

鈴木 徹 (Suzuki, Tohru)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：70344330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集の養殖魚への応用を目指して、雌親魚への腹腔内注入で、CRISPR/Cas9を卵母細胞に導入してゲノム編集する技術開発を行った。卵黄蛋白質(Vg)は、Vg受容体結合配列(HLTKTKDL)を使って、卵母細胞に取り込まれる。HLTKTKDLを結合することで、腹腔内注射した外来蛋白質が卵母細胞に取り込まれることが分かった。取り込まれた蛋白質は卵黄から細胞質に移行せず、ゲノム編集に利用するためには改良が必要である。成体用脂質キャリアとベクターの複合物を腹腔内注射すると、卵母細胞内でベクターから蛋白質が合成されることが分かった。この方法を使えば、腹腔内注射によるゲノム編集が可能だと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集は新品種を短時間のうちに作製できることから、水産業への応用も期待されている。私達が開発した技術は、雌親魚への腹腔内注射により、受精卵の段階でゲノム編集することを可能としている。この方法を使えば、従来の受精卵への顕微注入によるゲノム編集よりも、編集作業が格段に容易かつ系統樹立までの期間も短縮化される。開発された技術により、多様な養殖魚にゲノム編集を応用することが可能となり、産業的な波及効果は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To apply genome editing to aquaculture fish, this study aimed at development of delivery method of CRISPR/Cas9 into oocytes by injection into female abdominal cavity. It is known that yolk protein (Vg) is taken into the oocytes by using Vg receptor binding sequence, HLTKTKDL. We found that by binding with HLTKTKDL, exogenous protein injected into the female abdominal cavity is taken into the oocytes. However, since the protein was not transferred from yolk to embryonic cytoplasm, further improvement is required for applying this method to genome editing. We also found that when conjugate of plasmid vector and lipid carrier for in vivo usage was injected into female, protein is synthesized from injected vector in the oocytes. We expect that this method would enable the genome editing by injection into female.

研究分野：水産学

キーワード：ゲノム編集 遺伝子導入 腹腔内注射 魚類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 法は、ゲノム編集とも呼ばれ、医学のみならず農林水産業への応用が期待されている革新的技術である。特に、遺伝子ノックアウト (KO) の場合、狙った遺伝子を確実に KO できる (図 1)。私達も、ゼブラフィッシュで *r-spondin2* を KO し、この遺伝子が骨形成と始原生殖細胞の増殖制御に機能することを発見し、その有効性を実感した (引用 1)。KO により高成長や筋肉量増加など養殖に望ましい形質を示す遺伝子があり、水産分野でも応用が期待されている (引用 2)。

CRISPR/Cas9 法では、通常、標的配列に対するガイド RNA と Cas9 (ガイド RNA 依存-DNA 切断酵素) のタンパク体あるいはプラスミド DNA を受精卵へ顕微注入する (図 2 左)。養殖への応用の障害は、以下の 2 点である。

- (1) 卵への顕微注入が難しい魚種が多い
- (2) 種苗供給まで 4 世代かかる

2. 研究の目的

申請課題は、これら問題を克服するため、「雌親魚への腹腔内注入により卵母細胞に CRISPR/Cas9 を送り込み、ゲノム編集する新技術を開発し、ゲノム編集技術を広く養殖対象魚種に応用可能にする」ことを目標とする (図 2 右)。期間内の研究目標は、以下の 3 点である。

- (1) 腹腔内注射による卵母細胞への DNA・タンパク質導入技術の開発
- (2) それを使ったゲノム編集
- (3) 海産魚のササウシノシタで導入効果の判定

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ雌の腹腔内に CMV-GFP (緑色蛍光タンパク質遺伝子) プラスミドを注射し、エレクトロポレーターを使って電気穿孔を施したあと、卵巢からの GFP の発光により DNA 導入効果を判定した。

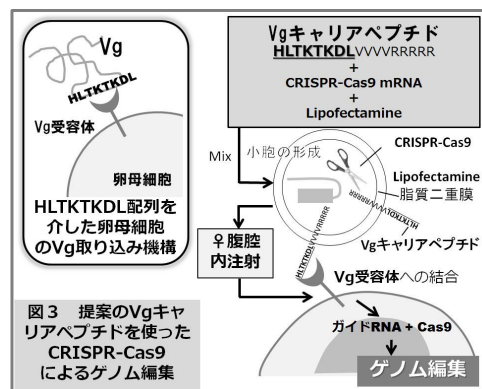
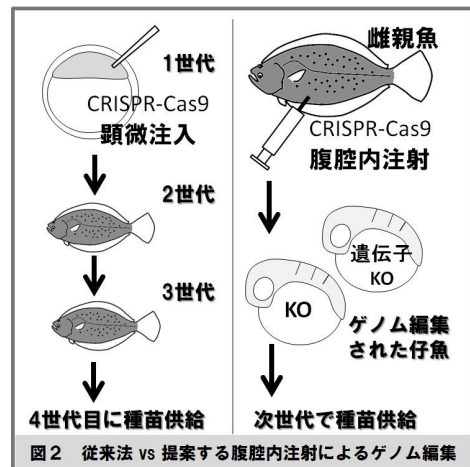
(2) 卵黄タンパク質ビテロゲニン (Vg) は内部のペプチド配列 HLTGTKDL で Vg 受容体と結合し、卵母細胞に取り込まれる (図 3)。このペプチドを利用して、タンパク質を卵母細胞に導入する方法を開発する。

(3) CRISPR/Cas9 を卵母細胞に導入する目的で、HLTGTKDL を連結した Cas9 ヌクレアーゼを試験内合成し、標的 DNA の切断活性を試験した。

(4) 成体用に市販されている脂質複合体と CMV-ルシフェラーゼプラスミドを混合し、雌親魚の腹腔に注射後、卵巢のルシフェラーゼ活性を測定することで、プラスミド DNA を卵母細胞に導入できるかを試験した。

(5) 上記の研究はゼブラフィッシュをモデルとして用いたので、海産魚であるササウシノシタを使って、腹腔内注射による卵母細胞へのタンパク質の導入効果を試験する。

4. 研究成果



(1) 卵巣から強い GFP の発光が検出された。卵巣をパラフィン切片に作製して、GFP 蛍光の局在を観察したところ、蛍光は卵母細胞を覆う濾法細胞にのみ検出され、卵母細胞からは検出されなかった。電気穿孔を使った導入法では、DNA は、濾法細胞にトラップされ、目的の卵母細胞には導入することは困難だと判断された。

(2) 図 3 中に示した HLTKTCDLVVVVRRRRR ペプチドを蛍光物質 (5FAM) で標識し、雌親魚の腹腔に注射したところ、HLTKTCDL を介して卵母細胞に取り込まれることが分かった。また HLTKTCDL を接続した GFP を合成して、腹腔に注射しても、GFP 蛍光が卵母細胞と生まれた受精卵からも検出された (図 4)。従って、HLTKTCDL 配列を使えば、外来タンパク質を効率よく卵母細胞に導入できることが分かった。この手法を使えば、卵母細胞に CRISPR/Cas9 複合物を卵母細胞に導入することが可能である。ただし蛍光は卵黄に強く、胚を形成する細胞質からは検出できていない。腹腔内注射による CRISPR/Cas9 でのゲノム編集を実現化するためには、さらに卵黄に取り込まれたタンパク質を細胞質に移動させる技術開発が必要である。方法としては、エンドソーム破壊ペプチドが考えられ、現在効果を試験している。

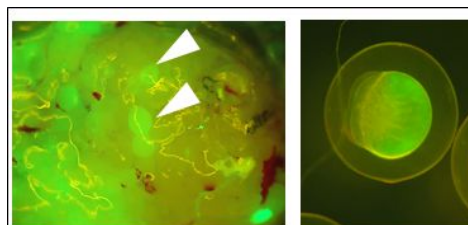


図4 (左) HLTKTCDLペプチドを連結したGFPタンパクをゼブラフィッシュ雌に腹腔内注射すると、卵巣内の卵母細胞 (白矢頭)に取り込まれる。(右)生まれた受精卵からも蛍光が検出された。

(3) HLTKTCDL を連結したことで高次構造が変化したためと考えられるが、合成した Cas9ヌクレアーゼは切断活性を示さなかった。今回はペプチドを N 末端に結合したが、C 末端に結合して活性が改善されるかを検討する必要がある。

(4) 腹腔内に注射後 5 日目に、卵巣と肝臓等のルシフェラーゼ活性を測定した結果、他の臓器に比べて 1,000 倍程度の強度で卵母細胞から活性が検出された。この結果は、脂質複合物と結合したプラスミド DNA が卵母細胞に取り込まれ、さらに核に移行して、プラスミドにコードされている遺伝子からタンパク質が合成されることを示している。これは、腹腔内注射によるゲノム編集に向けての最大の発見である。すなわち、ガイド RNA と Cas9ヌクレアーゼを発現するプラスミドベクターを、この方法で卵母細胞に導入すれば、ゲノム編集できる可能性が高い。この発見は、研究期間の最後に得られたので、現在、CRISPR/Cas9 プラスミドベクターを作製中であり、早急に効果を判定する計画である。

(5) ササウシノシタの近縁種のシタビラメのゲノムが公開されているので、データベースを使ってシタビラメの Vg 結合配列を取得し、実験 (2) と同様に、5FAM で標識したペプチドを合成し、雌親魚に腹腔内注射した。得られた受精卵からは、蛍光は検出されず、ゼブラフィッシュで見られたような卵母細胞への取り込みは起こっていないと判断された。シタビラメの Vg の結合配列ではササウシノシタの卵母細胞に取り込まれない可能性が考えられた。ササウシノシタでゲノム編集する場合には、(4)の方法を用いるのがよいと考える。

引用文献

Tatsumi Y, 他 2 名, Suzuki T, Yokoi H (2014) TALEN-mediated mutagenesis in zebrafish reveals a role of *r-spondin2* in fin ray and vertebral development. *FEBS Letter*. 588 巻、4543-4550

鈴木 徹 (2015) TALEN および CRISPR-Cas9 法によるゲノム改変技術の応用. 日本水産学会誌. 81 巻、884

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

陳 其然、高木 雅子、茂木 惇、菊池 美希、齋藤 雄大、中村 峻也、横井 勇人、青海 忠、宇治 督、鈴木 徹、External asymmetry and pectoral fin loss in the bamboo sole (*Heteromycteris japonica*): small-sized sole with potential as a Pleuronectiformes Experimental Model, *Zoological Science*, 査読有、34 巻、2017 年、377-385
doi:10.2108/zs170021

[学会発表] (計 7 件)

岩泉 雅樹、横井 勇人、鈴木 徹、ゲノム編集による養殖有用系統作出の効率化に向けた技術展開研究、平成 31 年度ゲノム編集学会、2019 年 6 月 5 日、タワーホール船堀 (東京都)
岩泉 雅樹、関根通陽、横井 勇人、鈴木 徹、エレクトロポレーションを用いた魚類への遺伝子導入効果の検討、平成 31 年度日本水産学会春季大会、2019 年 3 月 27 日、東京海洋大学 (東京都)
菊池 美希、齋藤 雄大、遠藤 優女、陳 其然、横井 勇人、宇治 督、鈴木 徹、ササウシノシタ (*Heteromycteris japonica*) 仔魚における鰭神経回路の発生と色素前駆細胞の局在、

日本動物学会第 89 回大会、2018 年 9 月 15 日、札幌コンベンションホール(北海道札幌市)
岩泉 雅樹、横井 勇人、鈴木 徹、Application of electroporation to zebrafish and
bubble-eye goldfish for exogenous protein synthesis in the ovary and skeletal muscle,
23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting、2017 年 8 月 30 日、山梨県立図書館(山
梨県、甲府市)
岩泉 雅樹、横井 勇人、鈴木 徹、エレクトロポレーション法による成体へのプラスミド導
入とタンパク合成誘導効果の検討、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 29 日、
東京海洋大学(東京都)

〔図書〕(計 2 件)

鈴木 徹、恒星社厚生閣、魚類発生学の基礎、2018 年、12 ページ(pp. 117-129)
鈴木 徹、岩泉 雅樹、横井 勇人、北隆館、アグリバイオ 4 月号：特集 魚類の育種・養殖
技術、2018 年、2 ページ(pp. 380-381)、

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/jp/about/organization/graduate/bioinfor/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：横井 勇人

ローマ字氏名：(Yokoi, Hayato)

所属研究機関名：東北大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：40569729

研究分担者氏名：宇治 督

ローマ字氏名：(Uji, Susumu)

所属研究機関名：国立研究開発法人水産研究・教育機構

部局名：増養殖研究所

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：40732049

研究分担者氏名：木下 政人

ローマ字氏名：(Kinoshita, Masato)

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：60263125

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。