

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14987

研究課題名(和文)水産魚種におけるF0ノックアウト技術の開発

研究課題名(英文)Generation of F0 knockout fish

研究代表者

北野 健 (KITANO, TAKESHI)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：40336219

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):近年、ゲノム編集技術が急速に発展しているが、多くの水産魚種は次世代までのライフサイクルが長いため、この品種改良にゲノム編集を応用することが困難な状況にある。そこで本研究では、まずメダカを用いて、簡易型ゲノム編集システムによるF0世代でのノックアウト個体の作製に成功した。次に、養殖魚種であるヒラメ、ニジマス、マサバを用いて、このシステムの効果を検証したところ、高効率で変異を導入できることが分かった。このように、このシステムはF0ノックアウト魚の作製に大変有効であり、水産魚種の品種改良にも応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Producing complete knockout fish quickly is a great advantage in the breed improvement. This study investigated the generation of F0 knockout medaka using the CRISPR/Cas9 system. To determine whether this editing system induced mutations in the medaka genome at the one-cell stage, recombinant Cas9 protein, tracrRNA and crRNA for dead end (dnd), which is essential for germ cell development, were injected into one-cell stage embryos. Predictably, biallelic mutated sequence patterns in the target sites of dnd were found in the injected embryos. To investigate the phenotypes of the mutated fish, histological observation of germ cells was carried out using fry and adults. The mutations resulted in a complete loss of germ cells, suggesting loss of function of dnd in the injected medaka. Moreover, this system was also functional for the rainbow trout, chub mackerel and Japanese flounder. Thus, this system appears to be extremely effective for the production of F0 knockout fish.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ゲノム編集 メダカ ヒラメ ニジマス マサバ CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

農林水産業においては、生産性の向上を目指して高品質な品種を作出するために、以前から選抜育種を利用してきた。この方法は、数世代に渡って高品質な個体を選抜して兄弟交配を続けることから、長い年月と多大な労力を要した。その上、重大な問題として、度重なる近親交配により近交弱勢の影響が強くなり、有用形質は維持されても病気に弱い、奇形が多いなどのデメリットを併せ持つ品種ができるケースが多かった。一方、TALENやCRISPR/Cas9等のゲノム編集による遺伝子ノックアウト法は、早期にノックアウトホモ個体を得ることができるため、有用形質を保持しながら近交弱勢の影響が出ない優良品種を作出することが可能である。この方法は、ゲノムDNAの特定の部位を切断・変異する方法であるため、誘導する切断・変異は自然界に見られる変異と同質で外来遺伝子を挿入しないことから、作製したノックアウト生物は遺伝子組換え生物には当たらないと考えられている。このように、ゲノム編集を利用した品種改良法は、新たな優良品種作出法として農林水産業界全体に広まる可能性を秘めている。

一方、多くの水産魚種は次世代までのライフサイクルが数年以上と大変長い場合、ゲノム編集によるF3世代でのノックアウト法でも、新たな品種が確立されるまでに数年以上を要することが予想される。したがって、高効率に変異を導入できる技術を確立し、F0世代でのノックアウトホモ個体を作製することができれば、画期的な早期品種改良法として水産業界に貢献できるのは間違いない。

2. 研究の目的

本研究では、まずメダカを用いて、簡易型CRISPR/Cas9システムによるF0世代でのノックアウト個体の作製を試みる。次に、養殖魚種であるヒラメ、ニジマス、マサバを用いて、簡易型CRISPR/Cas9システムの効果を検証する。

3. 研究の方法

簡易型CRISPR/Cas9システムとは、ベクター構築することなく、設計したCRISPR RNA (crRNA)、trans-activating crRNA (tracrRNA)、Cas9タンパク質を業者から購入し、それらを混ぜて受精卵へと顕微注入する大変簡便な方法である(Sawamura et al., 2017)。メダカ及びヒラメの標的遺伝子としては、生殖細胞特異的に発現するデッドエンド(dnd)遺伝子を使い、対照実験としてバソトシン(avt)遺伝子を使用した。一方、ニジマス及びマサバの標的遺伝子としては、メラニン合成に関わるslc45a2遺伝子に対するcrRNAを作製し、このcrRNAとともにtracrRNA、Cas9タンパク質を魚胚に顕微注入した。

メダカ1細胞期胚及び孵化仔魚における

変異パターンを調べるため、ゲノムPCR及びシーケンス解析を実施した(Sawamura et al., 2017)。

具体的には、1細胞期胚については、dndまたはavt遺伝子に特異的なプライマーを用い(dnd: 5'-AGGTGGTGAACCTGGAGCGG-3' and 5'-CTGCAGCAGCTCCTCCTGC-3', avt: 5'-CGTCCACACCGACAGCCTGC-3' and 5'-CAGCAGCTCTGCAGCGCAGC-3'), KOD FX Neo (Toyobo)を使用してfirst PCRを行った(preheating at 95 for 10 min, 45 cycles of PCR at 94 for 30 s, 67 for 30 s, 72 for 1 min and a final extension at 72 for 5 min)。次に、dndまたはavt遺伝子に特異的なプライマーを用い(dnd: 5'-GGAGCGGGTCCAGGCACTTC-3' and 5'-TGGTGAAGCTGGCAGGTTC-3', avt: 5'-CCGACAGCCTGCAGCGATGC-3' and 5'-GCGTCCTCCCTCTGATCCAC-3')、AmpliAq Gold(Applied Biosystems)を使用してnested PCRを行った(preheating at 95 for 10 min, 45 cycles of PCR at 94 for 30 s, 59 for 30 s, 72 for 1 min and a final extension at 72 for 5 min)。孵化仔魚については、dndまたはavt遺伝子に特異的なプライマーを用い(dnd: 5'-AGGTGGTGAACCTGGAGCGG-3' and 5'-CTGCAGCAGCTCCTCCTGC-3', avt: 5'-CCGACAGCCTGCAGCGATGC-3' and 5'-GCGTCCTCCCTCTGATCCAC-3')、AmpliAq Goldを使用してPCRを行った(preheating at 95 for 10 min, 35 cycles of PCR at 94 for 30 s, 67 for 30 s, 72 for 1 min and a final extension at 72 for 5 min)。一方、シーケンスについては、PCR生成物をpT7Blue vector (Novagen)にサブクローニングし、GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter)を用いて解析を行った。

メダカ孵化仔魚における生殖細胞数を計数するため、仔魚を一晩ブアン固定した後、脱水してパラフィンに包埋し、連続切片を作製した。その後、この切片をヘマトキシレン・エオシン染色し、正立顕微鏡下で生殖細胞数を計数した。

4. 研究成果

メダカにおいて簡易型CRISPR/Cas9システムによるF0世代でのノックアウト技術を確立するため、生殖細胞形成に關与するdnd遺伝子に対するcrRNAを作製してメダカ胚に顕微注入した。その結果、顕微注入した個体の生殖細胞数を計数したところ、調べた全ての個体で生殖細胞が完全に欠失していた(図1、図2)。また、顕微注入した個体における遺伝子変異パターンをゲノムPCR及びシーケンス解析したところ、調べた全ての個体で変異が検出された(図3)。以上の結果から、本研究条件により、高効率でF0ノックアウトメダカを作製できることが明らかとなった。

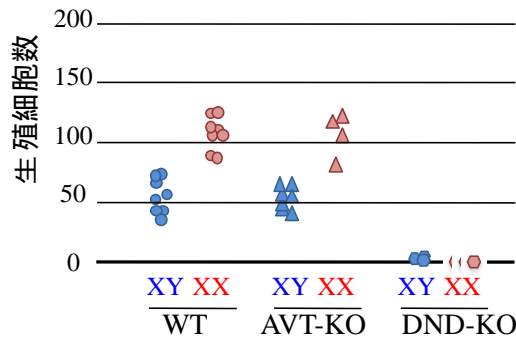


図1 孵化直後のメダカ仔魚の生殖細胞数

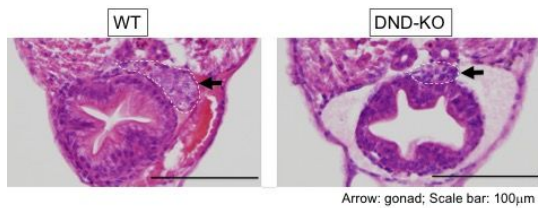


図2 孵化直後のメダカ仔魚の生殖腺組織像 (矢印: 生殖腺領域)

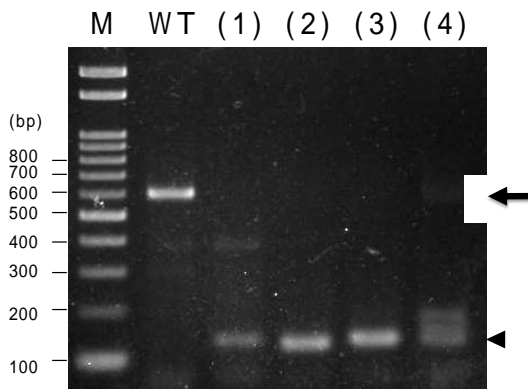


図3 孵化直後のメダカ仔魚における *dnd* 遺伝子のPCR電気泳動像 (M: DNA マーカー、WT: 非注入個体、(1)~(4): 注入個体、矢印: 野生バンド、矢頭: 変異バンド)

次に、養殖魚種におけるこのシステムを確立するため、まず、ヒラメ遺伝子に対して合成した crRNA を顕微注入して遺伝子変異パターンをゲノム PCR 及びシーケンス解析したところ、メダカと同様、高効率で変異を導入できることが明らかとなった。また、ニジマスのメラニン合成に関わる *slc45a2* 遺伝子に対する crRNA を作製してニジマス胚に顕微注入した。その結果、得られた胚で高効率に黒色素の欠損が確認された。これらの個体について T7 ヌクレアーゼを用いて突然変異の有無を解析したところ、体色変異を示した全ての個体で遺伝子配列の欠損、あるいは挿入が確認された。さらに、マサバに対しても変異導入実験を行った。ニジマスと同様、合成し

た crRNA を tracrRNA、Cas9 タンパク質とともに受精卵へと顕微注入した。その結果、得られた仔魚の一部で網膜及び体表のメラニン色素の欠損が確認された。しかし、これらの個体はシオミズツボワムシの摂餌能力が著しく低く、稚魚期に達する前にすべての個体が斃死した。アルビノ個体は視覚が著しく低下することが一部の動物種で報告されており、本結果も同様の原因によるものであると推測された。

このように、メダカだけでなく、養殖魚種であるヒラメ、ニジマス、マサバにおいても、簡易型 CRISPR/Cas9 システムは機能的であることが明らかとなった。

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1件)(査読有)

Sawamura R, Osafune N, Murakami T, Furukawa F, Kitano T.

Generation of biallelic F0 mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system.

Genes to Cells, 22, 756-763 (2017).

DOI: 10.1111/gtc.12511

〔学会発表〕(計5件)

長谷川二己, 川村 亘, 山内章弘, 矢澤良輔, 吉崎悟朗

ゲノム編集により作出したアルビノスマは仔魚期におけるワムシ摂餌能が低い. 平成 30 年度日本水産学会春季大会(東京海洋大学), 平成 30 年 3 月 27 日.

藤原亮, 片山直人, 藤井渉, 内藤邦彦, 吉崎悟朗

生殖細胞欠損ニジマスの作出とその代理親魚への応用. 平成 30 年度日本水産学会春季大会(東京海洋大学), 平成 30 年 3 月 27 日.

Qian L, Fujii W, Naito K, Yoshizaki G. Application of dead end-knockout zebrafish to recipients of germ cell transplantation.

Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017) (国際生殖生物学会)

Okinawa, Japan (Okinawa Convention Center), 平成 29 年 9 月 28 日.

Qian L, Digmayer M, Kitano T, Yoshizaki G.

Targeted mutagenesis using the "INSTANT" CRISPR/Cas9 system in rainbow trout. 平成 28 年度日本水産学会春季大会(近畿大学), 平成 28 年 9 月 10 日.

Kitano T, Takenaka T, Murozumi, Hara S. Gonadotropins and their roles on sexual development in medaka.

8th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (Korea), 21 June (2016).

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 健 (KITANO, Takeshi)
熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授
研究者番号：40336219

(2)研究分担者

吉崎 悟郎 (YOSHIZAKI Goro)
東京海洋大学・学術研究院・教授
研究者番号：70281003