

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03860

研究課題名(和文) 顕微注入法を用いない全卵ゲノム編集方法の開発

研究課題名(英文) Genome Editing without microinjection into eggs

研究代表者

木下 政人 (Kinoshita, Masato)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60263125

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)：魚類や甲殻類へのゲノム編集を行うには、通常、受精卵へのマイクロインジェクション法(MI)を用いる。しかしながら、魚類、甲殻類ではモデル生物として確立されている種は少なく、モデル生物以外では計画的に受精卵を得ることが難しい。そこで受精卵へのMIを用いないゲノム編集方法の開発に取り組んだ。

多くの魚類では肝臓で作られたビテロゲニンが卵内に蓄積される。このシステムを用いて肝臓で発現させたCas9タンパク質を卵に蓄積させ、ゲノム編集を完成させることを考えた。ビテロゲニンの卵への輸送シグナルと緑色蛍光タンパク質を融合させると、肝臓から卵黄への輸送は成功したが、卵の細胞質への輸送は成功しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究でマイクロインジェクション法を用いないゲノム編集法の開発には成功しなかった。しかし、肝臓で作られたタンパク質を卵黄に蓄積することに成功した。

魚類の受精卵の生残率は、卵質、つまり、発生に必須あるいは優位な物質がどれだけ卵に蓄積されているか、により大きく異なる。

今回開発したビテロゲニンシステムを活用することにより、卵質を高め、養殖業に活用することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To perform genome editing on fish and crustaceans, the microinjection method (MI) on fertilized eggs is usually used. However, few species of fish and crustaceans have been established as model organisms, and it is difficult to systematically obtain fertilized eggs in non-model organisms. Therefore, we tried to develop a genome editing method without MI for fertilized eggs.

We focused Vitellogenin system. In this system, proteins generated in liver are brought into eggs via blood system. We could bring GFP from liver into yolk-sac in eggs, but failed into cytoplasm of eggs.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：ビテロゲニン メダカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年急速に発展したゲノム編集技術は、非実験モデル生物においても自在にゲノムの改変を可能にし、基礎科学のみならず応用科学にも大きな改革をもたらした。そして、我々が平成26 - 28年度に実施した基盤研究B「人工制限酵素を用いた水産有用魚種スピード育種法の開発」において、ゲノム編集技術ツールの1つであるCRSSPR/Cas9を用いたミオスタチン遺伝子破壊により、わずか2年でマダイとトラフグの筋肉量(可食部)を約1.5倍に増量することに成功した。この結果は、魚類の育種(品種作製)にゲノム編集技術が極めて際だって有効であることを示した。

しかしながら、計画的に受精直後の卵を確保する必要がある点と作製世代(G0)でのモザイク性が大きな問題であった。

2. 研究の目的

産卵される前の卵ですでにゲノム編集が完了していれば、上記の問題が解決できる。魚類を始め卵生の生物では、メス体内で卵が成熟していく段階で、メス個体内(例えば肝臓など)で作られた卵黄蓄積物質が血流を介して未受精卵に蓄積される。

卵黄蓄積物質として最も一般的なものはビテロジェニンタンパク質(Vtg)であり、メダカでは肝臓で合成された後、卵巣内の卵母細胞に蓄積される。

本課題では、このVtg輸送システムを利用し、レポータータンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)または、ルシフェラーゼ(Luc)をメダカまたはヌマエビの卵巣以外の組織で合成させ、未受精卵に蓄積させることを目的とした。加えて、卵巣以外の組織でこれらのタンパク質を合成させるために骨格筋への遺伝子導入方法も検討した。

3. 研究の方法

1) ビテロジェニン卵輸送シグナルの探索: メダカビテロジェニン遺伝子のN末端の300アミノ酸をコードする配列(900塩基)(Vtgシグナル)にGFP遺伝子を融合させた遺伝子をエストロゲンの刺激により肝臓で発現を誘導するChgH promoterの支配下においたコンストラクト(ChgH:Vtg-GFP)をメダカ受精卵に顕微注入し遺伝子導入メダカの作出を行った。導入の確認は、孵化仔魚をエストロゲン溶液に暴露したのち肝臓の緑色蛍光を蛍光顕微鏡で観察することにより行った。

2) 高分子タンパク質のVtgシグナルによる輸送の検討: 上述VtgシグナルとGFP遺伝子およびLuc遺伝子を連結した遺伝子を、ChgH promoterの支配下においたコンストラクト(ChgH:Vtg-Luc-GFP)(図1)をメダカ受精卵に顕微注入し遺伝子導入メダカの作出を行った。



図1 ChgH:Vtg-Luc-GFP ベクター

導入の確認は、孵化仔魚をエストロゲン溶液に暴露したのち肝臓の緑色蛍光を蛍光顕微鏡で観察することにより行った。LucはGFPに比べ分子量が大きいいため、将来利用するCas9タンパク質のモデルとして用いた。

3) ヌマエビへの遺伝子導入法の検討: CAG promoterに連結したGFP遺伝子(図2)の導入を試みた。このコンストラクト(約2μg)をヌマエビ卵巣部分にインシュリン注射用のシリンジ(図3)を用いて注入したのち、エレクトロポレーション装置(ネッパージーン社製)を用いて30V+6Vの条件で行った。

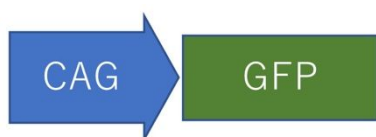


図2 CAG:GFP ベクター

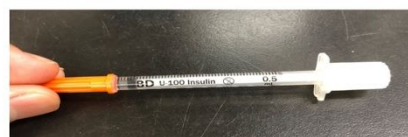


図3 ヌマエビへの注入シリンジ

4. 研究成果

- 1) ChgH:Vtg-GFP を有するメダカ系統では、肝臓および卵に緑色蛍光が観察された。一方、対象に用いた Vtg シグナルを含まないコンストラクト (ChgH:GFP) を有するメダカでは肝臓のみに緑色蛍光が観察された (図 4)。以上のことから、メダカビテロジェニンタンパク質の N 末端の 300 アミノ酸が肝臓から卵巣へのタンパク質輸送に十分であることが明らかとなった。

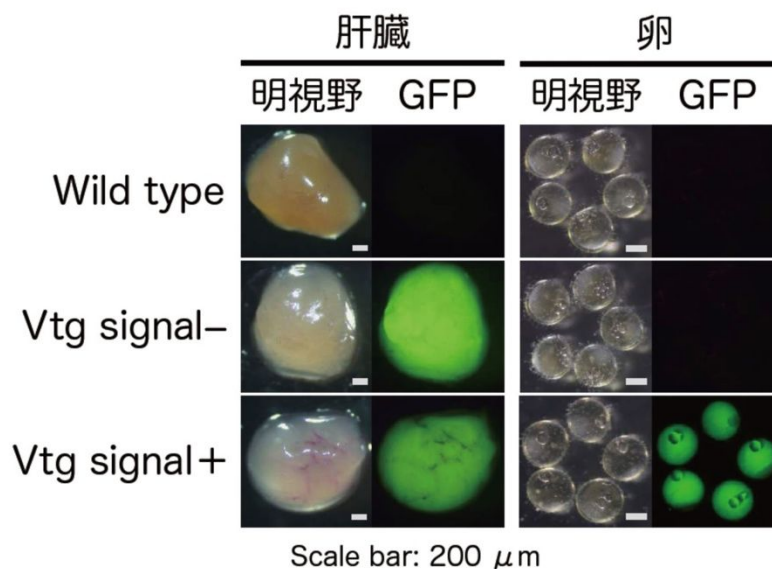


図 4 ビテロジェニンシグナルによる
肝臓から卵へのGFPタンパク質の輸送

- 2) GFP タンパク質より高分子のタンパク質輸送が Vtg シグナルにより可能か否かを検討するため Luc の輸送を検討した。現在のところ、エストロゲン刺激により肝臓に緑色蛍光が観察される個体 (遺伝子導入が成功した個体) が得られておらず、高分子タンパク質の輸送の検証は行っていない。GFP タンパク質に比べ、Luc タンパク質の分子量が大きいため、ビテロジェニンレセプターの認識、取り込みに障害が存在する可能性もあると考えられた。
- 3) 複数のヌマエビを用いてエレクトロポレーションを行ったが、明確な緑色蛍光は観察されなかった。この原因として、脊椎動物で汎用されているプロモーターが無脊椎動物には無効であったことが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yu Murakami, Tomohisa Horibe, Masato Kinoshita	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of an efficient bioreactor system for delivering foreign proteins secreted from liver into eggs with a vitellogenin signal in medaka <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 677-685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s12562-019-01320-4	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上悠、堀部智久、木下政人
2. 発表標題 卵内物質輸送を可能とするモデルメダカの作出
3. 学会等名 平成30年度 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 悠、木下政人
2. 発表標題 卵内物質輸送を可能とするモデルメダカの作出
3. 学会等名 平成29年度 日本水産学会近畿支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上 悠、木下政人
2. 発表標題 卵内物質輸送を可能とするモデルメダカの作出
3. 学会等名 平成30年度 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	堀部 智久 (Horibe Tomohisa) (20467468)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	鷺尾 洋平 (Washio Youhei) (60771681)	近畿大学・水産研究所・助教 (34419)	
研究分担者	家戸 敬太郎 (Kato Keitaro) (90330240)	近畿大学・水産研究所・教授 (34419)	
研究分担者	有馬 祐介 (Arima Yusuke) (90402792)	九州大学・先導物質化学研究所・准教授 (17102)	