

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03873

研究課題名(和文) 生殖系列キメラを用いた海産魚配偶子生産システム構築に向けた宿主開発

研究課題名(英文) Development of host strains for the production of gametes through germline chimera in marine fish

研究代表者

後藤 理恵(風藤理恵)(Goto, Rie)

愛媛大学・南予水産研究センター・准教授

研究者番号：70399997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：海産魚配偶子生産システムは、従来の選抜育種の難しいマグロ類の育種を可能にする新たな養殖用種苗生産技術である。このシステムは魚類の借腹生産を軸としており、優良個体(ドナー)の生殖細胞を他個体(宿主)の生殖腺を借りてドナー由来の配偶子を得るものである。本研究は、南方系小型マグロ類のスマを用い、宿主の不妊化誘導技術の開発を行った。まず、不妊化系統作出に向けての基盤的研究として、体色関連遺伝子のゲノム編集を行い、スマのゲノム改変が可能であることを確かめた。次に、ゲノム非改変技術として、遺伝子の発現抑制や強制発現による不妊化または低妊化方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産庁が掲げる「みどりの食料システム戦略」では、2050年までに主要養殖魚の人工種苗比率100%など環境負荷に配慮した養殖業への転換を目指している。これら目標を達成するには、育種完全養殖は不可欠である。借腹生産が可能になると、選抜育種の困難な魚種やあらゆる形質を考慮した育種が可能になる。このことから、海産魚配偶子生産システムの必要性は今後ますます高まると考えられる。借腹魚での効率的な配偶子生産の鍵となる宿主不妊化技術を本研究で確立できたことは、マグロ類育種にとって大きな前進である。また、育種技術の一つとしてゲノム編集に向けた基盤情報がスマで整備されたことは学術的意義が高いといえる。

研究成果の概要(英文)：A new system for fish seedling production through germline chimera will be able to breed tuna species which is believed to be difficult to perform a conventional selective breeding. This system is based on fish surrogate propagation that produce donor-derived gametes through host fish by transplanting donor germ cells. In this study, we aimed to develop methods for inducing sterilized host in small tuna species, kawakawa, *Euthynnus affinis*. First, we confirmed that genome editing using TALEN and CRISPR/Cas9 was able to edit body color related genes in kawakawa. Then, we developed methods for inducing a complete or partial sterilization by blocking translation of dead end gene or induction of exogenous gene expression in PGC as a method without gene-modified.

研究分野：魚類生殖生理学、魚類発生工学

キーワード：スマ ゲノム編集 次世代育種システム 不妊化 借腹

## 1. 研究開始当初の背景

“借腹生産”は次世代の養殖魚種苗生産技術として注目されている。“借腹生産”とは、宿主の生殖腺を借りて、目的魚(ドナー)の配偶子を生産させるシステムである。これまでの研究から、同種間でのドナーと宿主の組み合わせでは、ほとんどの場合、借腹魚(生殖系列キメラ)からドナー由来の配偶子を得る事ができることから、同種間の借腹生産であれば実用化を見据えた展開が期待できると考えた。しかし、次世代におけるドナー生殖細胞の寄与率は宿主の生殖腺の状態に大きく左右される。例えば、宿主が完全不妊の場合、次世代では100%ドナー由来の配偶子が得られるのに対し、不妊が完全でない場合と数%にも満たない。今後、借腹生産を産業技術として利用していくためには、確実に全ての配偶子をドナー由来にする必要がある。マグロ類では継代飼育に多大なコストと労力が必要となるが、このシステムを利用する事ができれば、有用形質を持つ個体を余す事なく保存でき、その管理コストは少なくすむと考えた。

また、研究当初、TALENやCRISPR/Cas9などのゲノム編集技術が格段に向上し、様々な生物でゲノム改編が可能となってきた。そのため、水産分野においても、ゲノム編集が新たな育種技術として期待されていた。我々は、クロマグロやスマを用いて、ゲノム編集育種に向けた基盤研究に着手しており、海産魚卵への顕微注入やマグロ類でのゲノム改編が可能であることを確かめていた(H26年度内閣府戦略的イノベーション創造プログラムの一環で実施)。しかし、スマを含むマグロ類は種苗生産が可能となっていたものの、難種苗に分類される極めて飼育の困難な魚種である。そのため、当初は、受精卵や孵化仔魚を用いた発生工学的研究をさらに進めるための基礎的知見に乏しく、飼育環境などの周辺技術についても十分とは言えなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、生殖系列キメラを用いたスマの配偶子生産システム構築に向けて、借腹生産に不可欠な宿主開発を行うことを目的とした。宿主には、個体およびDNAレベルで簡便かつ確実に判別するために、ゴールドンもしくはアルビノの形質をベースに持ち、さらに不妊となる系統の作出を行うこととしていた。ゴールドンやアルビノは、野生型と比べメラニン色素が少ないまたは欠損した形質で、様々な生物種において、自然界に存在する事が報告されている。これらの形質は、メラニン色素合成に関わる *tyrosinase* 遺伝子、メラニン色素を調節する *slc24a5* や *slc45a2* 遺伝子の機能欠失により引き起こされる。そこで本研究では、ゲノム編集と発生工学を駆使し、人為的にこれら遺伝子をコードするゲノムDNAを改変し、体色改変した宿主系統の樹立を試みた。また、不妊系統樹立に向けては、発生初期に生殖細胞の生存と維持に関わる遺伝子の探索および他魚種で報告されている不妊化に関わる既知遺伝子についても系統樹立に向けた基盤的研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

実験魚は愛媛大学南予水産研究センターの海面生簀または陸上飼育施設にて飼育し、ゲノム改変スマは愛媛大学の遺伝子組換え魚飼育規定に準じた施設で維持管理した。ゲノム編集には、体色関連遺伝子である *tyrosinase*、*slc24a5* および *slc45a2* 遺伝子を対象に、*tyrosinase* および *slc24a5* 遺伝子はTALEN法を、*slc45a2* はCRISPR/Cas9法を用いた。不妊化誘導には、これまで様々な魚種の不妊化を可能にしている *dead end (dnd)* 遺伝子を対象にモルフォリノオリゴヌクレオチド(MO)を用いた *dnd* 遺伝子の発現抑制を行った。また、発生初期の始原生殖細胞(PGC)を生殖腺に誘導するケモカイン *sdf1/cxcr4* シグナリングに着目し、PGCの生殖腺への移動ルート上で発現する *sdf1* 遺伝子をPGCで強制発現させる *sdf1-nanos* コンストラクトを作製した。TALEN RNA、CRISPR/Cas9 gRNA、*dnd* MO および *sdf1-nanos* RNAは、1-4細胞期の卵にそれぞれ顕微注入し、24で培養または飼育した。また、不妊化の検証には、胚発生期におけるPGCを生体観察するために *DsRed-nanos* RNAを共注入することにより蛍光で可視化し、蛍光実体顕微鏡を用いて観察した。さらに、変異体およびmorphantは組織学的に解析した。

## 4. 研究成果

体色関連遺伝子 *tyrosinase*、*slc24a5* および *slc45a2* の全ての実験群でF0におけるゲノムの改変がhetero-duplex mobility assayにより確認された。*tyrosinase* 変異体では、受精後16時間になるとメラニン色素の沈着が認められたが、受精後90時間前後になると網膜色素上皮、頭部背側および体部のメラニン色素がモザイク状に欠損しているのが確認された(図1)。一方、MOを用いて *tyrosinase* 遺伝子の発現抑制を行ったところ、morphantでは受精後16時間のメラニン色素の沈着は認められず、受精後72時間以降、徐々に網膜色素上皮のメラニン色素の沈着

が進んだ。これらのことから、*tyrosinase* 変異体で観察された受精後 72 時間後におけるメラニン色素の欠損はゲノム改変により自身の *tyrosinase* 遺伝子が破壊されたことに起因すると考えられた。同様に、*slc24a5* および *slc45a2* 変異体においてもメラニン色素の欠損が確認された。次に、これらの F0 変異体の長期間飼育を行ったところ、いずれの変異体も数ヶ月間しか生存させる事ができなかった。変異体を成長に合わせ、1t、7t および 30t 水槽に移し飼育したが、主な死因が正常個体の飼育でも多く見られる衝突死であったことから、スマの遊泳能力に合わせた屋内飼育が十分でなかった可能性が考えられる。また、より長く生存した変異体の多くが体部の部分的白化にとどまり、白化面積の広い変異体の生残は認められなかった(図 2)。一方、同様の実験を淡水モデル魚のゼブラフィッシュで行ったところ、白化面積の広い変異体が多数認められた。このことから、スマではアルビノまたはゴールドン形質をより多く出現していた個体は飼育初期段階で消失したと考えられた。

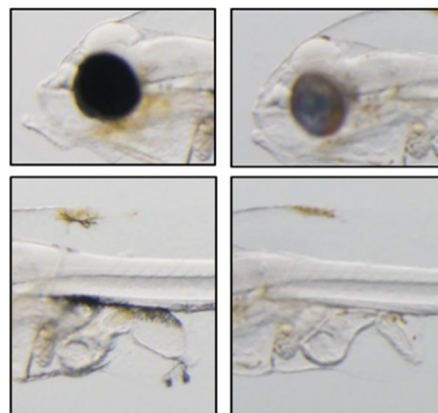


図 1 . TALEN により得られた *tyrosinase* F0 変異体のスマ仔魚 (受精後 90 時間). 左が対象個体、右が変異体.

*dnd* 遺伝子の発現抑制による不妊化誘導では、胚発生期の胚において PGCs の欠損が確認された。しかし、実験を重ねるうちに、受精卵のロットによっては PGCs が全く欠損していない胚も認められた。そこで、顕微注入に用いる受精卵の親魚約 70 個体の *dnd* 遺伝子の部分配列を調べたところ MO 標的配列に 2 か所の遺伝子多型 (SNP) が認められた。そこで、それぞれの SNP に対応した 4 種の MO を各 50 $\mu$ M 同時注入したところ、PGCs の欠損は誘導できたものの、正常な孵化仔魚を得る事ができなかった。これは MO の総量が 200 $\mu$ M となり、毒性により奇形が誘発されたと考えられた。そのため、*dnd* 配列をもとに親魚を選抜し、2 種の MO を混合して顕微注入に用いたところ正常発生し、生殖細胞を欠損した個体を誘導できることを確かめた(図 3)。このことから、スマのような養殖歴の短い魚種では、遺伝子の多型を考慮した分子ツールを用いる必要がある事が改めて認識された。そこで、SNP に左右されない、すなわちゲノム配列をターゲットとしない不妊化ツールの開発として、PGC における *sdf1* 遺伝子の強制発現を試みた。PGC は細胞膜で発現する *cxcr4* を受容体とし、リガンドである *sdf1* の発現ルート上を辿って生殖腺に向かって移動する。この *sdf1* 遺伝子を PGC で強制発現させると PGC の移動が攪乱される事が明らかになった。これら仔魚の腹腔を組織学的に観察したところ、受精後 6 日齢には *sdf1-nanos* RNA の注入濃度依存的に生殖細胞の欠損が確認され、最も高い濃度群において平均 8 割強の生殖細胞の減少が認められた。また、2 ヶ月半齢の *dnd*MO 個体の生殖腺を組織学的に解析したところ、卵巣腔の形成された雌であった。しかし、卵巣腔には生殖細胞は認められず、生殖細胞を包含するシスト構造の形成も認められなかった。



図 2 . TALEN により得られた *tyrosinase* F0 変異体のスマ幼魚 (2 ヶ月半齢).

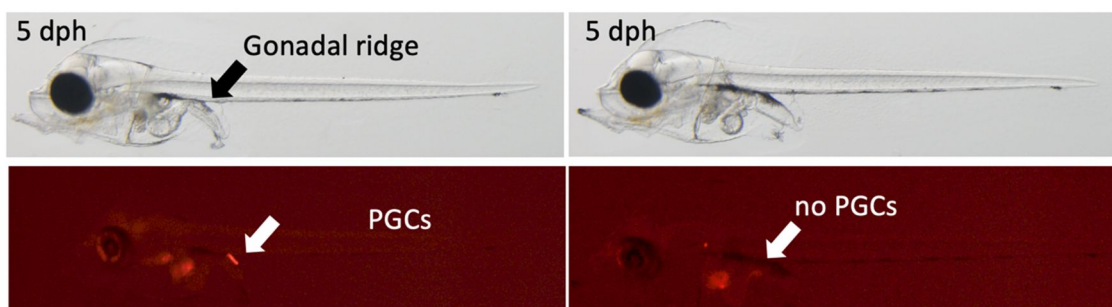


図 3 . *dead end* 遺伝子の発現抑制による始原生殖細胞欠損個体。受精後 5 日齢のスマ仔魚 . *DsRed-nanos* RNA を顕微注入して始原生殖細胞を赤色蛍光タンパク質で可視化した対象個体 (左) . *DsRed-nanos* RNA および *dead end* 遺伝子に対するモルフォリノオリゴ を共注入した個体 (右) . Gonadal ridge; 生殖腺隆起、PGCs; 始原生殖細胞 .

#### <まとめ>

本研究では、スマでゲノム編集が可能であることを明らかにした。しかし、当初計画していた系統樹立には至らなかった。この原因として、スマのような遊泳力の高い魚種では、発達段階に合わせた広い飼育スペースを必要とするが、ゲノム編集魚は陸上の閉鎖水槽で維持管理しなけ

ればならない。そのため、ゲノム編集魚を継代して解析するためには、マグロ類に適した陸上での小規模飼育の技術開発が不可欠であると考えられた。また、不妊化誘導に関しては、*dnd* 遺伝子発現抑制による不妊化および *sdf1* 強制発現による低妊化技術を確立した。上述のように、前者の方法はゲノム配列を標的とした分子ツールであり、種特異性の高い手法に位置づけられる。一方、後者の方法は、PGC で *sdf1* タンパク質を発現させることによって PGC の移動を攪乱し、結果的に生殖細胞を減少させる方法である。通常、PGC は生殖腺に取り込まれた後、しばらくすると分裂して数を増やすため、最初に取り込まれた生殖細胞が少ない場合でもその後の増殖で正常な生殖腺を形成することができる。しかし、ドナー生殖細胞を移植するタイミングで宿主の生殖細胞の数を減らしておく事ができれば、配偶子形成におけるドナー生殖細胞の寄与率を高める事が期待できる。また、後者の手法は種特異性が低い事が予想されるため、他魚種においても低妊化ツールとして使用できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kentaro Higuchi, Yukinori Kazeto, Yuichi Ozaki, Toshiya Yamaguchi, Yukinori Shimada, Yoshiaki Ina, Satoshi Soma, Yoshitaka Sakakura, Rie Goto, Takahiro Matsubara, et. al	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeted mutagenesis of the ryanodine receptor by Platinum TALENs causes slow swimming behaviour in Pacific bluefin tuna ( <i>Thunnus orientalis</i> )	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kentaro Higuchi, Rie Goto, Junpei Konishi, Yoshiaki Ina, Yukinori Kazeto, Koichiro Gen	4. 巻 131
2. 論文標題 Early development of primordial germ cells in Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 106-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Goto, R., and Saito, T.	4. 巻 133
2. 論文標題 A state-of the art review of surrogate propagation in fish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 216-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Higuchi Kentaro, Goto Rie, Konishi Junpei, Ina Yoshiaki, Kazeto Yukinori, Gen Koichiro	4. 巻 131
2. 論文標題 Early development of primordial germ cells in Pacific bluefin tuna <i>Thunnus orientalis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 106 ~ 112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2019.03.031	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Rie Goto, Taketo Hayakawa, Dipak Pandey, Kentaro Nakajima, Hirofumi Yamashita, Taiju Saito, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 Induction of sterilized host by knockdown of dead end gene in kawakawa, <i>Euthynnus affinis</i> for the surrogate propagation
3. 学会等名 Eighth International Symposium On Vertebrate Sex Determination (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Goto, Dipak Pandey, Ryoko Kawata, Taketo Hayakawa, Yukinori Kazeto, Koichiro Gen, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Taiju Saito, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 Genome-editing using TALENs in kawakawa, <i>Euthynnus affinis</i> .
3. 学会等名 3rd aquaculture conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tapas Chakraborty, Sipra Mohapatra, Eitaro Sawayama, Taiju Saito, Rie Goto, Motohiro Takagi, Yukinori Kazeto, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 Germ line stem cell and Generation-next breeding attempt in kawakawa, <i>Euthynnus affinis</i>
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dipak Pandey, Rie Goto, Taiju Saito, Yukinori Kazeto, Koichiro Gen, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 TALEN-mediated gene editing of <i>slc24a5</i> (solute carrier family 24, member 5) in kawakawa, <i>Euthynnus affinis</i>
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 嵩人・後藤理恵・斎藤大樹・Dipak Pandey・松原孝博
2. 発表標題 スマ <i>Euthynnus affinis</i> における不妊化個体の作出
3. 学会等名 日本水産増殖学会第16回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Milos Havelka, Eitaro Sawayama, Taiju Saito, Motohiro Takagi, Rie Goto, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 Construction of linkage map and genome-based chromosome build in a new marine aquaculture species kawakawa <i>Euthynnus affinis</i>
3. 学会等名 Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Milos Havelka, Eitaro Sawayama, Taiju Saito, Motohiro Takagi, Rie Goto, Takahiro Matsubara
2. 発表標題 Non-invasive method for DNA sampling in kawakawa, tuna-like species (スマをモデルとしたマグロ類の非侵襲的DNAサンプリング法)
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤理恵
2. 発表標題 スマの育種完全養殖が切り拓く未来
3. 学会等名 日本学術会議中国・四国地区会議主催学術講演会
4. 発表年 2020年

## 〔図書〕 計4件

1. 著者名 Yamaha, E., Goto, R., Saito, T., Takahashi, E., Matsubara, T., Arai, K	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 24
3. 書名 Development of Marine Fish: Several Procedures for the Observation of Embryonic Development, Kazuo Inaba and Jason M. Hall-Spencer ed., Japanese Marine Life, 125-148.	

1. 著者名 Saito T., Goto R., Rivers N., Yamaha E.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 15
3. 書名 Production of Germ-Line Chimeras in Zebrafish. In: Pelegri F. (eds) Vertebrate Embryogenesis	

1. 著者名 Goto R., Saito T., Matsubara T., Yamaha E	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 13
3. 書名 Microinjection of Marine Fish Eggs. In: Liu C., Du Y. (eds) Microinjection. Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 戸村道夫、斎藤大樹、後藤理恵、他57名	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 312
3. 書名 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A	

## 〔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	松原 孝博  (Matsubara Takahiro)  (60443389)	愛媛大学・南予水産研究センター・教授    (16301)	
研究分担者	斎藤 大樹  (Saito Taiju)  (90396309)	愛媛大学・南予水産研究センター・准教授(特定教員)    (16301)	

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