

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07919

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた寄生虫フリーなトラフグの作出

研究課題名(英文) Production of a parasite-free pufferfish with a genome-editing technology

研究代表者

筒井 繁行 (Tsutsui, Shigeyuki)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：20406911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：感染症対策は水産増養殖における最も重要な課題のひとつである。水産重要種であるトラフグの養殖場においては、ヘテロボツリウム症による大量死がしばしば問題となっている。本症は単生綱多後吸盤類吸虫 *Heterobothrium okamotoi* (以下ヘテロボツリウムと称す) がトラフグの鰓に寄生し、吸血することにより発症する。

これまでに我々は、ヘテロボツリウムの幼生が、トラフグ粘液中のIgMを目印として宿主を認識することを明らかにした。この知見を応用し、本研究ではゲノム編集によりIgMをノックアウトした個体を作成し、攻撃試験により感受性の有無を検証することで、本寄生虫に感染しないトラフグの作出を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トラフグゲノムデータベースからIgM重鎖定常領域の遺伝子配列を抽出し、ガイドRNAを設計した。人為促熟したトラフグから、人工授精により受精卵を得た後、ただちにガイドRNAおよびCas9を実体顕微鏡下でマイクロインジェクションした。ランダムに選出した一部の受精卵からゲノムDNAを抽出し、IgM重鎖定常領域の配列を解読したところ、約6割の個体で変異が確認された。しかしながら、残りの個体は全て仔魚の段階で死亡したため、これらノックアウト個体がヘテロボツリウムに感染しないという確証は得られなかった。

研究成果の概要(英文)： *Heterobothrium okamotoi* is a blood-feeding parasite that infects the branchial cavity wall of *Takifugu rubripes*, and often terminates the life of the host in aquaculture. In our previous study, it was revealed that IgM in the body mucus of *T. rubripes* was utilized by the parasite as an entrance receptor for infection. This finding suggests that IgM knock out *T. rubripes* can escape the parasite infection. In the current study, we attempt to produce IgM knock out *T. rubripes* by genome editing.

研究分野：魚病および魚類免疫

キーワード：寄生虫 ゲノム編集 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症対策は水産増養殖における最も重要な課題のひとつである。トラフグ *Takifugu rubripes* は我が国における水産重要種のひとつであり、1980年代における種苗生産技術の確立後、西日本を中心に養殖も盛んに行われている。そのトラフグ養殖場における死因の上位に、ヘテロボツリウム症が挙げられる。この疾病は単生類ヘテロボツリウム *Heterobothrium okamotoi* (写真) の寄生によるものであり、本種が宿主の鰓に寄生し、吸血することで感染魚は貧血に陥る。さらに、感染部位から海水が浸入することによる組織の壊死や、寄生虫の卵塊が鰓腔に詰まることによる窒息などの二次的被害も甚大であり、トラフグ養殖の現場で大きな問題となっている。その対策として、かつてはホルマリン水浴による物理的駆除が行われていたが、廃液の海への流入による環境汚染が問題視され、現在では薬事法によりその使用が禁止されている。近年、フェバンテルを有効成分とする経口剤が水産用医薬品として承認され、本寄生虫の駆除に一定の効果を収めているが、極めて単価が高く、養殖業者に金銭的負担を強いているのが実情である。

ヘテロボツリウムはトラフグへの宿主特異性が極めて高く、マダイやヒラメなどの魚種はもとより、近縁種のクサフグにさえ寄生しないとされている。卵から孵化したヘテロボツリウム幼生は体表に繊毛細胞を有し、この細胞表面にある繊毛を用いて自由遊泳を行うが、宿主に到達するとこの細胞を脱落させ、すみやかに寄生期へと移行する。この現象、すなわち脱繊毛は、トラフグの体表を覆う粘液中の何らかの分子をヘテロボツリウムが探知することで生じると考えられてきた。

これまでに我々は、トラフグの抗体のうち、特にマンノースに親和性を有する IgM をヘテロボツリウム幼生に曝露すると、すみやかに脱繊毛が生じることを見出している。さらにトラフグの鰓には、脱繊毛を誘導するのに十分な濃度のマンノース特異的 IgM が存在することから、ヘテロボツリウム幼生が本分子を認識することで寄生に移行することを明らかにした。



写真：トラフグの鰓に寄生する *H. okamotoi*

2. 研究の目的

ヘテロボツリウムによって宿主認識分子として利用される IgM を持たないトラフグが存在すれば、その個体はヘテロボツリウムに感染しないものと考えられる。CRISPR/Cas システムは 2012 年に実用化されたゲノム編集技術であり、比較的迅速かつ容易に標的遺伝子をノックアウトすることが可能である。本研究ではこのゲノム編集技術を用いて IgM ノックアウトトラフグを作出し、ヘテロボツリウムへの感受性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、トラフグにゲノム編集を施し、IgM 欠損個体を作成することを第一の目的としている。具体的にはトラフグ受精卵に IgM 遺伝子配列に相補的なガイド RNA およびゲノム DNA 切断酵素 Cas9 をインジェクションし、IgM 遺伝子のノックアウトを目指している。しかしながら、トラフグの産卵期が初年度研究開始前の春季(3月中旬~4月中旬)に限定されること、かつインジェクションにはある程度の技術が求められることから、初年度は、年中人為的に産卵を誘発でき、かつ成長も早いゼブラフィッシュを用い、IgM のゲノム編集を行うこととした。

まず、ゼブラフィッシュゲノムデータベースから IgM 重鎖定常領域の第一エクソン配列を抽出し、制限酵素認識部位 (Bam HI) を含むようにガイド RNA を設計した。次に自然産卵によって得たゼブラフィッシュ受精卵約 100 個に対し、ガイド RNA および Cas9 を顕微鏡下でインジェクションした。受精卵を 28 度で飼育し、ある程度の大きさに育った個体をランダムに 16 個体選別し、ゲノム DNA を抽出した。その後、これを鋳型とし、ガイド RNA 認識部位を含む領域約 250bp を増幅させるように設計したプライマーで PCR を行った。その後、PCR 産物を 2 等分し、一方を制限酵素 Bam HI で処理した。制限酵素処理区および未処理区の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、切断の有無を確認することで、ゲノム編集された個体の 1 次スクリーニングを行った。

2 年目には、トラフグゲノムデータベースより免疫グロブリン M (ミュー) 鎖の塩基配列を抽出し、第二エクソンを標的とするガイド RNA を作製した。次に長崎県総合水産試験場の協力を得て、トラフグの産卵期である 4 月に同場にて約 300 個の受精卵にガイド RNA、Cas9、およびスクリーニング用の蛍光色素を実体顕微鏡下でマイクロインジェクションした。ゼブラフィッシュの場合と同様に、ランダムに選んだ受精卵からゲノム DNA を抽出し、免疫グロブリン M (ミュー) 鎖の塩基配列を解析した。

最終年度も 4 月に長崎県水産総合試験場の協力の下、人為催熟した親魚 3 ペア由来の受精卵を提供していただいた。北里大学海洋生命科学部まで輸送し、実験に供したものの、全ての個体が孵化後約 1 週間で死亡した。そのため、ヘテロボツリウム幼生による攻撃試験を行うことが出来ず、IgM ノックアウトトラフグがヘテロボツリウムに感染しないかどうかは明らかにできなかった。そこで当初の方針を変更し、寄生虫ヘテロボツリウムの宿主認識因子であるマンノース結合 IgM に関して、トラフグ発生初期における発現解析を行った。未受精卵および受精後 1 時間後 ~ 150 時間後までの胚計 11 ステージ、および孵化後 0, 2, 3, 4, 5 日後の仔魚から、mRNA およびタンパク質を抽出し、RT-PCR およびウエスタンブロッティングによる IgM の検出を試みた。加えて、水産研究・教育機構増養殖研究所南伊豆庁舎より供与いただいた孵化後 8 日目の仔魚および 57 日目の稚魚についても同様の解析を行った。

4 . 研究成果

ゼブラフィッシュにインジェクションを行い、ランダムに選んだ 16 個体のゲノムを解析したところ、6 個体において、制限酵素処理後の PCR 産物のバンドサイズが未処理区と変化が見られなかったことから、ゲノム編集の導入が示唆された。そこで次に、これら 6 個体由来の PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析し、正常個体のそれと比較した。その結果、全ての個体で塩基の欠損が認められた。アミノ酸配列に翻訳したところ、6 個体中 4 個体でフレームシフトが生じており、IgM の欠損が示された。

2 年目に、トラフグ受精卵にインジェクションを行ったところ、インジェクション成功率は約 60% であった。ランダムに解析した 10 個体のうち、実に 6 個体の IgM 遺伝子に欠損が生じており、ゲノム編集による IgM ノックアウト個体の作出は十分可能であることが示された。しかしながら、インジェクションした個体を孵化させ、継続して飼育を試みたものの、約 1 ヶ月後に全滅してしまい、IgM を欠損した成魚を得ることは出来なかった。

IgM の mRNA は、孵化後 57 日目の稚魚においてのみ検出された。一方、コイやニジマスなど、多くの魚種の卵中に存在することが知られている IgM タンパク質は、トラフグ未受精卵からはもとより、解析に供した全てのサンプルから検出されなかった。このことから、

トラフグのヘテロポツリウム感受性は、少なくとも受精後 57 日後の稚魚期までは獲得されないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shigeyuki Tsutsui, Kento Igarashi, Shintaro Matsui, Osamu Nakamura
2. 発表標題 Mannose-specific IgM in the mucus of fugu Takifugu rubripes is utilized by a monogenean parasite Heterobothrium okamotoi for host recognition
3. 学会等名 American Fisheries Society & The Wildlife Society 2019 Joint Annual Conference, Reno, Nevada, USA.
4. 発表年 2019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	細谷 将 (Hosoya Sho) (60526466)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	