

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05834

研究課題名（和文）アコヤガイの貝殻白色化原因遺伝子の同定とゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Identification of genes responsible for white shell phenotype in the pearl oyster and development of genome editing technology

研究代表者

竹内 猛（Takeuchi, Takeshi）

沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：60599231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アコヤガイによって作られる養殖真珠は日本でもっとも重要な水産資源の一つである。アコヤガイには白い貝殻を作る突然変異が知られており、白色貝は純白の養殖真珠をつくるために利用される。本研究では、貝殻白色化の原因遺伝子をさぐるため、アコヤガイの高精度ゲノムアセンブリの構築やトランスクリプトーム、プロテオーム解析を行った。これらの結果から、白色貝突然変異の原因遺伝子候補を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ゲノム編集に必要な、高分子をアコヤガイ生体に導入するための様々な手法を試行した。実験によって得られた知見は今後のアコヤガイゲノム編集技術の確立にむけて有用な情報となる。また、アコヤガイ外套膜における網羅的な遺伝子発現データ、産出されるタンパク質データや、染色体スケールの高精度ゲノムデータは、アコヤガイのあらゆる生物学的機能を研究する上で極めて重要なデータベースとなる。これらのデータベースはインターネットで公開し研究コミュニティに提供することで、アコヤガイおよび軟体動物研究の活性化に役立てる。

研究成果の概要（英文）：Cultured pearls produced by pearl oysters are one of the most important fishery resources in Japan. There is a known mutation in the pearl oysters that produce white shells, and the mutants are used to produce pure white cultured pearls. In this study, we constructed a high-precision genome assembly and analyzed the transcriptome and proteome of the pearl oyster to identify the genes responsible for the white shell phenotype. We identified several candidate genes responsible for the white shell mutation based on these results.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：アコヤガイ 真珠養殖 ゲノム編集 トランスクリプトーム プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

アコヤガイ (*Pinctada fucata*) によってつくられる真珠は、明治時代に養殖技術が確立して以来、現在でも日本の農林水産物・食品輸出額の第3位(339億円)を占める、重要な水産資源である。ところが、南洋真珠や淡水真珠といった海外の真珠生産の急激な増加により、過去には世界に流通する真珠生産額の約9割を占めた日本産アコヤガイ真珠は、現在では2割を占めるにすぎない。このような世界規模の真珠生産の拡大にともなう、真珠の希少価値の低下と価格競争の激化に打ち勝つために、日本産アコヤガイ真珠の商品価値および品質の向上が求められている。

アコヤガイの貝殻は外側の稜柱層と、内側の真珠層からなる。通常、稜柱層は黒褐色であるが、まれに稜柱層が白い突然変異体が見つかる(以下、白色貝と呼ぶ)。白色貝は真珠層への色素沈着も少ないことから、純白の真珠の生産に適している。純白な真珠はブランドとして商品価値に優れている為、白色貝は養殖業者の間でも需要が高い。しかし、貝殻白色化の分子メカニズムは不明である。

2012年、アコヤガイの全ゲノム解読が行われ、遺伝子情報を活用した養殖真珠の高品質化への道筋が切り拓かれた。この成果を発展させるために、真珠生産に有用な遺伝子を特定することや、高品質な真珠をつくるアコヤガイ系統を作出するゲノム編集技術を確立することが、強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、貝殻白色化の原因遺伝子を特定し、その遺伝子のゲノム配列を編集して白色貝を作出する技術を確立することを目指した。これまでにアコヤガイの全ゲノムを解読し、さらに白色貝系統の連鎖解析を行った結果から、白色化原因遺伝子候補が30個に絞り込まれている。そこで本研究では、遺伝子ノックダウン法を用いて、これら候補遺伝子の機能を個別に抑制し、貝殻色への影響を調べることで、貝殻白色化の原因遺伝子を特定する。さらに、特定した白色化原因遺伝子を標的として、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集を実施する。これにより、二枚貝で初となるゲノム編集技術を確立するとともに、人為的に白色のアコヤガイ系統を作出する。

3. 研究の方法

アコヤガイでの遺伝子機能解析の実験系を確立するため、*vivo morpholino*による遺伝子ノックダウン実験や、ゲノム編集による遺伝子ノックアウト実験の条件検討を行った。*Vivo morpholino*では、アコヤガイ受精卵を *morpholino* 試薬とリポフェクション試薬を含む海水で24時間飼育し、発生への影響を調査した。CRISPR/Cas9導入実験では、アコヤガイの産卵時期(3-5月)に卵巣にガイドRNA・Cas9 Nuclease複合体をリポフェクション試薬とともに注入し、処理した卵を用いて人工受精を行い、飼育を行った。そして、様々な実験条件下における生存率や表現型の変化の有無を観察した。

2020年度以降は社会情勢上の理由から、飼育実験施設へのアクセスが不可能であったため、遺伝子機能解析実験を行うことができなかった。そこで、当初の計画を変更し、ゲノム情報解析を中心に行なった。貝殻白色化原因遺伝子の候補をより絞りこむため、またゲノム編集におけるオフターゲットの影響を減らすため、アコヤガイの高精度ゲノムアセンブリを構

築した。アコヤガイ 1 個体の閉殻筋から高品質ゲノム DNA を抽出し、PacBio および Omni-C シーケンス用ライブラリを作成した。ライブラリを PacBio Sequel II および Illumina シーケンサーにより解析し、得られた配列を用いてコンティグ、スキファールドを構築した。さらに、正常貝および白色貝の外殻膜で発現する遺伝子・タンパク質を網羅的に同定するため、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行った。

4 . 研究成果

アコヤガイ幼生での vivo morpholino 実験では、一定濃度の存在下では発生の遅延が生じることがわかり、遺伝子機能解析の実験系を確立するにはさらなる条件検討が必要であることが示唆された。受精卵を用いたゲノム編集実験においてもゲノム編集の効果が確認できなかったため、引き続き実験条件の検討が必要である。

アコヤガイゲノムを高精度ロングリードでシーケンスし、軟体動物で世界初となる、ハプロタイプ別染色体スケールの高精度ゲノムアセンブリを構築に成功した。高精度ゲノムアセンブリに加え、外殻膜トランスクリプトームや貝殻プロテオームは、今後のアコヤガイおよび軟体動物研究に極めて有用なデータベースとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeuchi Takeshi, Masaoka Tetsuji, Aoki Hideo, Koyanagi Ryo, Fujie Manabu, Satoh Noriyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Divergent northern and southern populations and demographic history of the pearl oyster in the western Pacific revealed with genomic SNPs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolutionary Applications	6. 最初と最後の頁 837 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/eva.12905	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 Takeshi Takeuchi, Manabu Fujie, Ryo Koyanagi, Laurent Plasseraud, Isabelle Ziegler-Devin, Nicolas Brosse, Cedric Broussard, Noriyuki Satoh and Frederic Marin	4. 巻 12
2. 論文標題 The 'Shellome' of the Crocus Clam <i>Tridacna crocea</i> Emphasizes Essential Components of Mollusk Shell Biomineralization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.674539	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内 猛
2. 発表標題 ヒメジャコ(<i>Tridacna crocea</i>)貝殻プロテオーム解析から明らかになった貝殻基質タンパク質の保存性と多様性
3. 学会等名 バイオミネラリゼーションワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田大樹、木下滋晴、吉武和敏、浅川修一、竹内猛、佐藤矩行、前山薫、永井清仁、渡部終五
2. 発表標題 貝殻に色素を蓄積しないアコヤガイ突然変異体の原因遺伝子の探索
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Takeuchi
2. 発表標題 The pearl oyster genome: evolutionary origin of the shells and pearls
3. 学会等名 The Symposium of Recent Activity in Marine Genome Biology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内猛, 正岡哲治, 青木秀夫, 永井清仁, 佐藤矩行
2. 発表標題 アコヤガイの全ゲノム解読と水産育種への利用
3. 学会等名 日本水産学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内猛, 藤江学, 小柳亮, 小田原和史, 吉武和敏, 木下滋晴, 浅川修一, 渡部終五, 佐藤矩行
2. 発表標題 アコヤガイの全ゲノム情報を利用した貝殻白色化原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田大樹, 木下滋晴, 吉武和敏, 浅川修一, 竹内猛, 佐藤矩行, 前山薫, 永井清仁, 渡部終五
2. 発表標題 貝殻に色素を蓄積しないアコヤガイ変異体の原因遺伝子探索
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下滋晴, 堀田大樹, 篠原幹拓, 吉武和敏, 浅川修一, 船原大輔, 柿沼誠, 竹内猛, 佐藤矩行, 淡路雅彦, 前山薫, 永井清仁, 渡部終五
2. 発表標題 アコヤガイ真珠品質関連遺伝子の探索
3. 学会等名 日本水産学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------