

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19156

研究課題名（和文）メラトニン・生殖腺刺激ホルモン抑制ホルモン関連遺伝子の破壊は初回成熟を早めるか？

研究課題名（英文）Does the knockout of melatonin- and gonadotropin-inhibitory-hormone-related genes induce early first maturity?

研究代表者

吉川 廣幸（Yoshikawa, Hiroyuki）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：40733936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：海産魚などでしばしばみられる長期の世代時間は、有用品種をつくりだす道のりを妨げる大きな障害である。対象魚種の配偶子を世代時間の短い近縁種から生産できる“代理親魚技術”は、これを解決できる一つの手段であるが、代理親魚に遺伝的改良を加え、早期成熟性を付与した事例はない。本研究では、遺伝的な早熟化技術を開発し、それを代理親技術の宿主の遺伝的改良に応用するため、哺乳類などで早熟化の報告があるメラトニンや生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン（GnIH）の遺伝子破壊をゲノム編集により行い、変異体の成熟特性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用品種の樹立には、始祖となる魚を交配し、遺伝的変異の固定と均一化をはかる必要があるが、世代時間が長く、体サイズが大型化する海産魚を成熟させて次世代を得るのは容易ではない。本研究では、哺乳類などで報告のあるメラトニンに誘導される生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン（GnIH）による成熟抑制機構について、その関連遺伝子の遺伝子破壊を行い、その変異体の成熟特性を評価することで、海産魚における成熟抑制作用の有無や初回成熟への影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Long generation time, which is often seen in marine fish, is a major obstacle that hinders the development of useful aquaculture strain. Surrogate bloodstock technology, which can produce target aquaculture fish with long generation time from surrogate parent fish (recipient), is a mean to solve this problem, but genetical improvement of recipient for precocious puberty has not been performed. In this study, in order to develop a genetic precocious technology and apply it to genetic improvement of recipient of the surrogate bloodstock technology, we conducted genome editing to produce knockout mutants related to melatonin and gonadotropin release-inhibiting hormone (GnIH), whose loss has been reported to cause premature maturation in mammals etc., and revealed their reproductive characteristics.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：メラトニン GnIH 代理親魚技術 クサフグ ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

有用品種をつくりだすには、有用形質を示す遺伝的変異の固定と均一化をはかることが必要となるため、どのような育種手法を用いたとしても、品種の始祖となる魚を交配する必要がある。しかし、世代時間が長く、それに伴い体サイズが大型化する海産魚を成熟させて次世代を得るのは容易ではない。この問題を解決する方法として、我々は“代理親魚技術”に着目し、これまでに世代時間が長く親魚が大型になるトラフグの配偶子を小型近縁種のクサフグから生産することに成功している。本技術は、卵や精子の元となるドナー(トラフグ)の生殖細胞を宿主(クサフグ)へ移植することによりドナー由来の子孫を生産するものである。代理親魚技術の利用により、トラフグから配偶子を得るまでに必要だった時間(雄で2年、雌で3年)は短縮されたものの、代理親のクサフグであっても依然として雄で1年、雌で2年の長期に渡る養成期間が必要となっていた。一般的に対象魚種の配偶子を代理生産可能な魚は、遺伝的に近縁である必要があるため、代理親となりうる魚種の選択肢は限定される。代理親魚として選定した魚種が持つ世代時間に依存するだけの従来の代理生産戦略では、養殖品種樹立までのスピードをさらに加速させることは難しいと考えられた。

近年、実験動物として利用されるマウスの系統の多くが、体内リズムに関連するメラトニンを合成する酵素である ASMT(アセチルセロトニン O-メチルトランスフェラーゼ)を機能欠損し、これに起因して早期成熟していることが分かってきている [Kasahara et al. (2010) PNAS, 107, 6412-6417]。メラトニンはトリプトファンからセロトニンを経て合成されるホルモンであり、脳の松果体から分泌され(暗期に高く明期に低い明瞭な日周リズムを示す)、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制する GnIH(生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン)の発現を誘導する(図1)。また、ヒトでは幼児期における夜更かしによるメラトニン低下が性的な早熟化を招くことも指摘されている。この成熟抑制機構は、哺乳類や鳥類で共通して確認されているものの、魚類においては情報が乏しく未だ明らかとなっていない。仮に、メラトニンを介した GnIH による成熟抑制機構が魚類において存在するならば、関連遺伝子の機能破壊により成熟抑制作用が解除され早熟化し、既存の代理親魚技術と組み合わせることで、早期に次世代を作出できる新たな育種戦略に繋がる可能性がある。

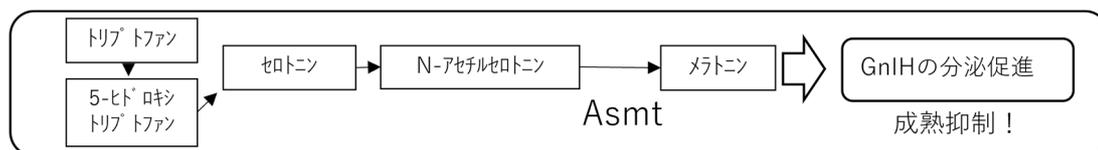


図1 哺乳類・鳥類におけるメラトニンの合成と成熟への影響

## 2. 研究の目的

本研究では、クサフグのメラトニン・GnIH 関連遺伝子の遺伝子破壊を行い、変異体の成熟特性を評価することで、これら遺伝子群の成熟抑制効果や初回成熟への影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子配列の単離：

クサフグ *asmt* の塩基配列を明らかにするため、クサフグの鱗および脳からそれぞれゲノム DNA および total RNA を抽出し、これらを鋳型として、トラフグゲノムデータベースの配列情報に基づき設計されたプライマーを用いて遺伝子断片の増幅を行った。増幅された遺伝子断片をクローニングし、シーケンス解析した。

### (2) 遺伝子破壊：

メラトニン合成酵素の *asmt*、GnIH とその受容体として同定されている *lpxrfa* および *lpxrfar* についてゲノム編集による遺伝子破壊を行った。各遺伝子配列に基づいて標的箇所を選定して crRNA を作成し、tracrRNA および Cas9 タンパク質と共にクサフグ受精卵へ顕微注入した。作出された変異導入初代 (F0) について、変異導入の有無を T7 エンドヌクレアーゼ I (T7EI) 解析により評価した。

### (3) 変異導入家系の作出：

(2)において作出した F0 を養成飼育し成熟させ、野生型個体との交配を行うことにより、次世代 (F1 世代) を作出した。T7E1 解析および DNA シーケンス解析により F1 における変異導入状況を評価した。さらに、ヘテロ変異を有する F1 雌雄を交配することにより F2 世代を作出した。F2 について遺伝子型を解析するとともに、それらの成熟度評価を行った。

(4) 成熟度評価:

F2 における遺伝子型ごとの成熟度評価を、生殖腺指数 (GSI: 生殖腺重量/体重 × 100) 測定などにより行った。また、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与することにより排卵を誘導し、その成否を調べた。

4. 研究成果

(1) クサフグ *asmt* の全アミノ酸翻訳領域を含む遺伝子配列を単離した (図2)。本配列から予測されるアミノ酸配列には *Asmt* に共通して存在する保存配列も確認された。



図2 クサフグ *asmt* の単離

(2) クサフグ *asmt* を標的として設計した crRNA を含むゲノム編集溶液をクサフグ受精卵へ顕微注入し F0 を作出した。T7E1 解析により、変異導入の有無を確認したところ、設計した各 crRNA において変異導入が認められた (図3)。また、*lpxrfa* および *lpxrfar* についても同様に、設計した crRNA を用いることにより、変異導入が可能であることが確認された。

F0 (ふ化仔魚) の T7E1 解析

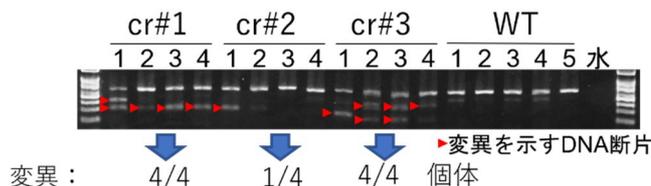


図3 ゲノム編集処理を施したクサフグ *asmt* への変異導入評価

(3) *asmt*、*lpxrfa* および *lpxrfar* について作出された F0 を成熟するまで飼育し、野生型個体と交配することにより、F1 を作出した。*asmt* では、得られた F1 について T7E1 解析を行ったところ、各 crRNA を含むゲノム編集溶液を導入した実験群に由来して、30% から 100% の範囲で変異個体が検出された (表1)。さらに、遺伝子の DNA 配列についてシーケンス解析したところ、遺伝子の標的箇所に突然変異が確認され、それらは遺伝子機能の欠損が予測される突然変異であった (表1)。同様に *lpxrfa* および *lpxrfar* でも遺伝子機能の欠損が予測される突然変異体が得られた。

表1. F0と野生型の交配により誕生したF1の持つ *asmt* のヘテロ変異の配列と出現頻度

掛け合わせ	解析数	変異保有 (%)	配列	type	出現数
WT1♀ × cr#3-3♂	10	10(100%)	GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC	WT	
			GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC	-22+6	6
cr#3-1♀ × WT1♂	10	3(30%)	GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC		4
			GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC	-28	2
cr#3-2♀ × WT1♂	10	4(40%)	GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC		1
			GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC	-49	3
			GGGTGCAGAGCGCCCTATCGGCAGAGGATCAGCCAGGCCCTTGGCCACCAAGTGTGGACGGCACAAAGGCTGCTGGCTGCTTTCGGGCC	-2	1

(4) *asmt* にヘテロ変異を有する F1 の雌雄を交配させることにより、F2 を作出した。F2 の DNA

解析を通し、F2におけるホモ変異、ヘテロ変異および野生型の遺伝子型の出現が確認された。これらF2を1歳齢まで飼育し、その成熟特性を調査したものの、雌雄において生殖腺の外観、GSIなどについて遺伝子型に応じた特性の違いは確認できなかった(図4)。一方、*lpxrfa*にヘテロ変異を有するF1の雌雄を交配させることにより作出したF2については、雄では遺伝子型による違いは見られなかったものの、雌ではホモ変異体のGSIが他の遺伝子型よりも有為に低い値を示し卵巣発達が劣っていた。

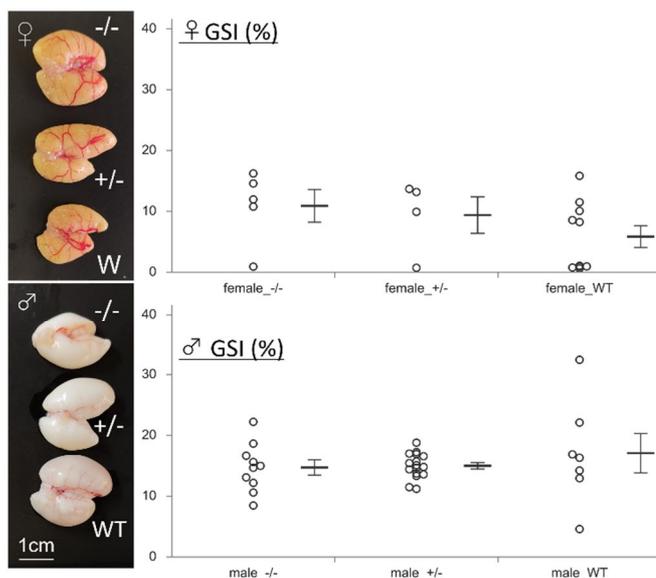


図4 ゲノム編集処理を施したクサフグ *asmt* のF2における生殖腺とGSI

本研究では、初回成熟に影響することが報告されているメラトニンや GnIH について、関連遺伝子の破壊を行い、各種遺伝子の早熟化への影響を調査した。ゲノム編集技術により、各遺伝子の破壊とホモ変異個体の獲得は可能であったものの、いずれの遺伝子についても遺伝子破壊により早熟化を誘導することは実現できなかった。遺伝子破壊が成熟度合に影響した遺伝子もあったことから、今後、初回成熟に関連する遺伝子についてさらに研究が進展していくことが期待される。本研究で対象としたクサフグはトラフグ代理親魚技術における重要な宿主対象種であることから、水産育種の高速化に向けて、本種の遺伝的改良が進められていくことが期待される。

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 Yoshikawa Hiroyuki, Ino Yasuko, Shigematsu Atsushi, Yoshiura Yasutoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Enrichment of spermatogonia by density gradient centrifugation for use as a donor of surrogate production of tiger puffer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 4032 ~ 4044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.15905	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 吉浦康寿
2. 発表標題 密度勾配遠心によるトラフグ精原細胞の濃縮と代理親技術への利用
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshikawa H
2. 発表標題 Studies on surrogate broodstock technology in tiger puffer and its application for breeding program
3. 学会等名 The 27th Joint International Symposium between Pukyong National University and National Fisheries University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 岸本謙太, 木下政人, 吉浦康寿
2. 発表標題 遺伝子破壊による生殖細胞欠損クサフグ宿主の作出
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸
2. 発表標題 代理親魚技術によるトラフグ生産と遺伝資源の保存管理技術の開発
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム「トラフグ養殖研究の最前線～次世代のトラフグ生産を科学する～」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子
2. 発表標題 クサフグasmt の単離と遺伝子破壊技術の開発
3. 学会等名 令和4 年度日本水産学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022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