

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660169

研究課題名(和文) フグ毒結合タンパク質遺伝子ノックアウトによるトラフグ毒化機構の証明

研究課題名(英文) Knock out of pufferfish Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin binding protein gene

研究代表者

大嶋 雄治 (Oshima, Yuji)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70176874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トラフグ毒化におけるフグ毒結合タンパク質の関与を証明するため、トラフグのフグ毒結合タンパク質遺伝子(TrubPSTBP2)に対するノックアウト系をCRISPER/Cas9システムを用いて構築した。まず PSTBP2のホモログであるメダカTBT-bp1,2の遺伝子破壊をメダカ胚で成功した(変異導入率～33%)。次に、PSTBP2-CRISPER/Cas9を用いて、トラフグPSTBP2遺伝子の破壊を行い、処理したトラフグ胚(3日目)について、HMA法およびクローニングを行い、変異導入を確認した。その結果、50%以上の胚で変異が確認出来た。よってTrubPSTBP2の遺伝子破壊に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the contribution of Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin binding protein (TrubPSTBP2) on TTX poisoning mechanism of Tiger pufferfish (Takifugu rubripes). In first, gene destruction system to tributyltin binding protein (TBT-bp1,2) which are homolog of PSTBP2 in medaka (*Olyzias latipes*), and TrubPSTBP2 was constructed using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR associated proteins(Cas9)system. As results, less than 33% of TBT-bp1,2 genes in medaka embryo were distracted by the TBT-bp1,2-CRIPER/Cas9 system. Further, over 50% of TrubPSTBP gene in the embryo of *T. rubripes* was destroyed by PSTBP2-CRISPER/Cas9 system. Thus, we could show that the TrubPSTBP2-CRISPER/Cas9 system might be available for elucidate the role of PSTBP2 in TTX poisoning of pufferfish.

研究分野：水産化学

キーワード：テトロドトキシン 毒化機構 フグ毒結合タンパク質 遺伝子破壊

## 1. 研究開始当初の背景

水産上重要なトラフグ(*Takifugu rubripes*)は、テトロドトキシン(TTX)を餌から吸収して蓄積・毒化し、成長に伴い TTX を肝臓から生殖腺に移行させることが知られている。またヒガンフグ等他のトラフグ属魚類からトラフグ毒結合タンパク質(以下 PSTBPs)が報告されている (Hashiguchi, 2015)。

さら申請者らは、PSTBPs が広く魚類に存在する毒結合タンパク質(トリプチルスズ結合タンパク質、TBT-bps)が 2 回繰り返した配列を有することを解明した(Satone, 2009)。

PSTBPs はリポカリンタンパク質に属し、中でも疎水性低分子と結合し輸送する性質を持つ  $\alpha 1$  酸性糖タンパク質 (AGP) に最も類似していることから、薬物と結合して標的器官に輸送する能力をもつと推定される。つまり PSTBPs は TTX と結合し、組織間を輸送することで毒化に関与していると予想した。

申請者は、カイコガで発現させたトラフグの PSTBPs 遺伝子組換え体(rトラフグ PSTBP1, 2)を発現・大量分取し、rトラフグ PSTBP2 が TTX と結合することを *in vitro* で証明した (H23 年度日本水産学会秋季大会学会発表・論文投稿準備中)。

よって申請者は、トラフグ PSTBP2 をノックアウトした際に TTX に対する耐性の低下、TTX 蓄積濃度の低下、TTX 蓄積部位等の変化を確認できれば、トラフグ PSTBP2 による TTX 毒化機構解明が証明されると発想した。

本研究は将来 PSTBP2 遺伝子ノックアウトによる無毒トラフグの品種作出につながる基礎実験となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、トラフグの毒化に対するフグ毒結合タンパク質の寄与を証明するため、ト

ラフグのフグ毒結合タンパク質遺伝子(トラフグ PSTBP2) に対する Transcription Activator-like Effector Nucleases (トラフグ PSTBP2-TALEN)もしくは Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (トラフグ PSTBP2-CRISPER/Cas9) を用いて遺伝子をノックアウトする

## 3. 研究の方法

- (1)フグ毒結合タンパク質遺伝子(トラフグ PSTBP2) に対するトラフグ PSTBP2-TALEN およびトラフグ PSTBP2-CRISPR/Cas9 を作製する。
- (2)トラフグ PSTBP2 遺伝子ノックアウトのために、トラフグ PSTBP2 ヒートショック発現型メダカ (pDs-8xHSE-PSTBP2-myc-IRES-hrGFP2 系統メダカ (以下 HSE-PSTBP2-medaka) のホモ接合型系統を作出する。
- (3)メダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 を用いてトラフグ PSTBP2 のホモログであるメダカメダカ TBT-bp1,2 をノックアウトする。
- (4)トラフグ PSTBP2- CRISPR/Cas9 を用いてトラフグトラフグ PSTBP2 遺伝子をノックアウトする。

## 4. 研究成果

- (1)トラフグ PSTBP2 に対するトラフグ PSTBP2- TALEN およびトラフグ PSTBP2-CRISPR/Cas9 の作製

トラフグのフグ毒結合タンパク質遺伝子(トラフグ PSTBP2)に対するノックアウト系の構築を試みた。当初計画に従いトラフグ PSTBP2- TALEN を用いた破壊系の構築を試みた。しかし技術の飛躍的進歩によりより簡便にノックアウトできるメダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 およびトラフグ PSTBP2- CRISPER/Cas9 システムノックアウ

ト系構築に変更し、構築に成功した。

メダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 の配列情報より、オフターゲットのない標的配列を決定し gRNA 合成した。合成ターゲット遺伝子断片を用いてメダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 *in vitro* での反応を行った結果、今回作製したメダカ TBT-bp1 target1、target2 及びメダカ TBT-bp2 target1、target2 の gRNA すべてにおいて切断活性を泳動像で確認した。

同様にトラフグ PSTBP2-CRISPER/Cas9 の配列情報より、オフターゲットのない標的配列を決定し gRNA 合成した。合成ターゲット遺伝子断片を用いてトラフグ PSTBP2-CRISPER/Cas9 を *in vitro* で反応させ、gRNA の切断活性を電気泳動像で確認した。

### (2) HSE-PSTPB2-medaka ホモ接合型メダカ系統の作製

HSE-PSTPB2-medaka 系を用いて、トラフグ PSTBP2 発現型メダカのホモ接合型メダカ系統の作製を行った。本トランスジーン発現は熱誘導性である。熱処理(37~40 °C により本遺伝子と GFP が発現する。しかし熱処理の温度・時間・発生段階を 1 年かけて詳細に検討したが、GFP 発現量 (=PSTBP2 の発現量) が弱く、かつ強い熱処理ではへい死率が高くなりホモ化ができなかった。

よってターゲットをメダカに存在している PSTBP2 のホモログ(メダカ TBT-bp1、メダカ TBT-bp2)に変更し、メダカ TBT-bp1,2-CRIPR/Cas9 系を用いて遺伝子破壊に成功した。よってトラフグ PSTBP2 をターゲットにし、トラフグ PSTBP2-CRISPER/Cas9 の構築を行った。

### (3) メダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 によるメダカ胚の遺伝子破壊

授精 1 時間以内のメダカ胚にメダカ TBT-bp1,2-CRISPER/Cas9 mRNA をマイクロインジェクションし、インジェクションより 24 時間後の卵からゲノム DNA を抽出し、Heteroduplex Mobility Assay (HMA)及び PCR 産物のダイレクトシーケンス (HMA-seq)により変異の有無を確認し、さらに、一部の変異個体についてサブクローニングし変異配列を決定した。標的配列ごとの解析数、変異個体数及び変異導入率を表-1 に示す。メダカ TBT-bp1 target1、target2 及びメダカ TBT-bp2 target2 の標的配列において変異の導入が確認されたが、メダカ TBT-bp2 target1 では変異が導入されていないかった。

表-1 メダカ TBT-bp1,2 遺伝子破壊の結果

	変異個体数 / 解析個体数	変異導入率 (%)
メダカ TBT-bp1 target1	9 / 27	33.3
メダカ TBT-bp1 target2	2 / 11	18.1
メダカ TBT-bp2 target1	0 / 12	0
メダカ TBT-bp2 target2	1 / 6	16.7

メダカ TBT-bp1 target1 のシーケシング結果を表-2 に、またメダカ TBT-bp2 target2 のシーケシング結果を表-3 に示した。

メダカ TBT-bp1 は第 1、第 5 エキソンからそれぞれ 1 箇所(bp1-target 1,-target3)、メダカ TBT-bp2 は第 2 エキソンから 2 箇所を選定し、メダカ TBT-bp1、bp2 において変異導入に成功した。一部の変異個体の配列を確認したところ、変異個体内出現効率は bp1-target1 で 4.6%、bp2-target2 で 23%であった。bp1-target1 では microhomology-mediated end-joining (MMEJ)依存的な 7 塩基欠損の特定の変異パ

ターンが優位に出現しており、フレームシフトによりメダカ TBT-bp1 の機能をノックアウトできていると考えられ、MMEJ を利用した特定変異誘発の可能性が示唆された。また、メダカ TBT-bp2-target2 の変異個体においても 7 塩基欠損、5 塩基挿入の有効的な変異を得ることができた。メダカ TBT-bp2 target2 では 13 クローンの解析を行った。メダカ TBT-bp1 target1 で 6, 7 塩基欠失が検出された。

表-2 メダカ TBT-bp1-target1 変異個体シーケンス結果

シーケンス結果	遺伝子型	出現頻度
GACGCCTGAAGA ATGCCAGCTGCTG GTCA	非変異	34 / 37
GACGCCTGAAGA A-----TGCTG GTCA	7 塩基欠損	2.5 / 37
GACGCCTGAAGA ATGCCAG----- GTCA	6 塩基欠損	0.5 / 37

----- : 欠損

表-3 メダカ TBT-bp2 target2 変異個体シーケンス結果

シーケンス結果	遺伝子型	出現頻度
CGTACAACGAG AGGAACGTGTA CCGGTG	非変異	10 / 13
CGTACAACGAG AGGAAC----- CGGTG	6 塩基欠損	1 / 13
CGTACAACGAG AGGAACG----- --GGTG	7 塩基欠損	1 / 13
CGTACAACGAG AGGAACGTIGT ACGTGAAGGGT	5 塩基挿入	1 / 13

G

----- : 欠損,   : 挿入,      : 置換

(4) トラフグ PSTBP2- CRISPR/Cas9 を用いてトラフグトラフグ PSTBP2 遺伝子をノックアウト

CRISPR/Cas9 システムをもちいて、メダカにおいて PSTBP2 のホモログであるメダカ TBT-bp1 およびメダカ TBT-bp2 の遺伝子破壊に成功した。

よって、トラフグ授精胚を用いて PSTBP2-CRISPR/Cas9 を用いて、PSTBP2 遺伝子の破壊を試みた。乾導法により人工授精させたトラフグ受精卵にトラフグ PSTBP2-CRISPR/Cas9 mRNA をマイクロインジェクションした。インジェクション後 72 時間の受精卵からゲノム DNA を抽出し、HMA により変異の有無を確認した後に変異個体について TA クローニングを行い、変異配列を決定した。変異導入効率を表-4 に示す。結果、22 検体中 13 と約 50%以上の胚で変異が確認出来た。

表-4 トラフグ PSTBP2 遺伝子破壊の結果

	変異個体数 / 解析個体数	変異導入効率 (%)
トラフグ PSTBP2 target1	4 / 7	57.4
トラフグ PSTBP2 target2	4 / 7	57.4
トラフグ PSTBP2 target3	5 / 8	62.5

トラフグ PSTBP2 target1 のシーケンス

グ結果を表-5 に示した。トラフグ PSTBP2 target1 の変異個体において4塩基欠損7/20、2塩基欠損の変異を4/20 確認することができた。

表-5 トラフグ PSTBP2 変異個体シーケンス結果

シーケンス結果	遺伝子型	出現頻度
GGAGTGGTTCTACTGCTGAT	非変異	9 / 20
GGAGTGG----ACTGCTGAT	4塩基欠損	7 / 20
GGAGTGG--CTACTGCTGAT	2塩基欠損	4 / 20

本研究の結果、メダカに存在するフグ毒結合タンパク質のホモログ(メダカ TBT-bp1,2)の遺伝子破壊に成功した。さらにトラフグに対するフグ毒結合タンパク質遺伝子破壊の成功まで一挙に進んだ。今後は、トラフグ PSTBP2-遺伝子破壊トラフグをを成長させ、毒化の有無を確認することにより TTX の毒化機構解明、さらに無毒トラフグの品種作出につながる事が期待される。

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

(日本水産学会投稿準備中)

〔学会発表〕(計0件)

(H27 年度日本水産学会秋季大会発表予定)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/mes/index.html>

### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

大嶋雄治 (OSHIMA Yuji)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 70176874

(2)研究分担者

島崎洋平 (SHIMASAKI Yohei)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号: 40363329

(3)連携研究者

(0)

研究者番号: