

ゲノム編集による養殖魚の品種改良—筋肉増量マダイの作出—

家戸敬太郎 (近畿大学水産研究所)

最近、狙った特定の遺伝子のみを改変できる画期的な「ゲノム編集」という技術が開発されました¹⁾。ゲノム編集について、京都大学iPS細胞研究所所長の山中伸弥教授は、「この25年の中でおそらくもっとも画期的な生命科学技術」と述べられています。本稿では、この新しい技術を海水養殖魚であるマダイの品種改良に応用するための研究について解説します。

海水養殖魚における従来の品種改良

近畿大学水産研究所では、1960年代前半から成長の早い養殖用マダイの選抜育種による品種改良に着手し、現在では10世代を超える選抜を経た成長の早い品種が生み出されています^{2,3)}。用いた手法は、集団選抜と呼ばれるもので、養殖集団の中から成長の早い複数個体を選抜して次世代を生産するための親とするものです。これにより養殖期間が約半分に短縮されるという大きな効果が得られていますが、その効果が現れ始めたのは開始から15年ほど経過した3世代目頃からであり、さらに

顕著な効果が得られるようになったのは20年以上経過した5世代目以降で(図1)、長い時間を要するのが問題点でした。

遺伝子操作による品種改良

上記のような選抜育種とは異なり、より短期間で大きく改良しようとする遺伝子を操作する技術があります。魚類では、2015年11月に、FDA(米国食品医薬品局)が成長ホルモン遺伝子を導入して成長が劇的に改善された遺伝子組換えサーモンを食品として認可したことが大きなニュースとなりました⁴⁾。養殖魚では初めてで唯一の例ですが、現在のところ、わが国には輸入されていません。魚類における遺伝子組換え技術は、導入しようとする遺伝子を染色体上のどの位置にどれだけ導入するかという制御がきわめて困難であるので効率が悪いうえに、どこにどれだけ遺伝子が導入されるか予想できないことから安全性に対する問題が指摘されています。

ゲノム編集技術の登場 そうした中、最近、狙った特定の遺伝子のみを改変できる画期的な「ゲノム編集」という技術が開発されました¹⁾。ゲノム編集は、染色体上の任意の配列を認識して、2本鎖DNAを切断することが基本です(図2)。切断されたDNAが修復される際に欠失や挿入が起こることを利用する、あるいは切断された部位に目的の配列を挿入することによりターゲットとなる遺伝子の機能を欠損させたり、高めたりするものです。最初の報告は1996年に発表されたジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)によるもので2010年には

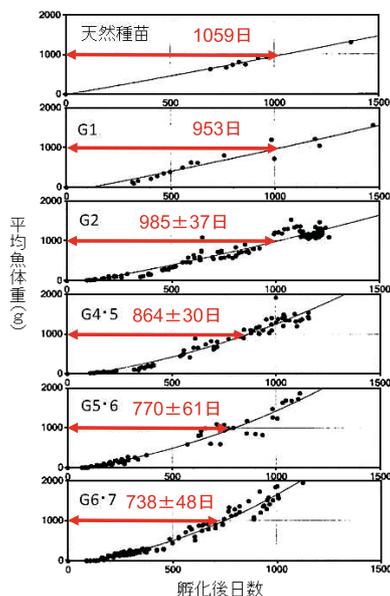


図1. 選抜育種マダイの継代に伴う成長の変化

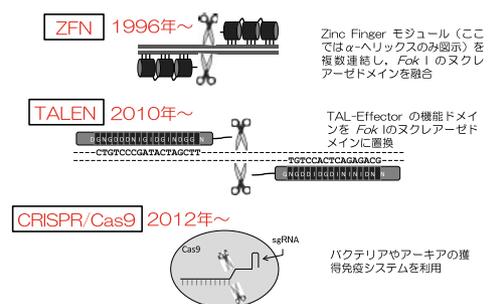


図2. これまでに開発されたゲノム編集ツール



TALENと呼ばれる新しいゲノム編集のためのヌクレアーゼが開発されました。2013年には改良型のPlatinum TALENが広島大学のグループによって開発されて、より効率の高いゲノム編集ツールとして現在でも使用されています。TALENやZFNは狙う配列に合わせた高分子のRNAあるいはタンパク質の合成が必要であるために、時間と労力を要する方法でした。2012年になって、バクテリアやアーキアの獲得免疫システムを利用した、まったく新しいゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9が報告されました。このツールは低分子のガイドRNAとCas9という二つの別々の分子で構成され、ガイドRNAがターゲットのDNA配列を認識して特異的に結合し、そこにCas9タンパク質が結合してDNAを切断します。Cas9はすべての配列で共通に用いることができ、ガイドRNAを配列に合わせるだけで良いために、ZFNやTALENとは異なり汎用性が高いのが特徴です。CRISPR/Cas9はZFNやTALENよりもややターゲットのDNA配列認識の正確さに欠けるものの、上記で述べたガイドRNA合成の容易さに加え、複数のターゲットを同時に切断できること、実験費用が安く応用可能な生物種が多いことなど、モデル生物以外にもすぐに応用できるものでした。

マダイでのゲノム編集のターゲット遺伝子「ミオスタチン」 マダイは魚体重に占める可食部の割合が4割以下と少なく、それが6割以上あるブリに比べて加工した場合のコストが高くなるという欠点があります。そこで、体内で筋肉が増えすぎのを抑える働きをしているミオスタチン (*mstn*) という遺伝子に着目しました。この*mstn* 遺伝子の突然変異体が多く動物で知られており、肉牛ではベルジアンブルー種やピエモンテ種、国内でも短角牛の一部で*mstn* 遺伝子が機能しておらず、その結果「ダブルマッスル」と呼ばれて通常の牛よりも筋肉量が圧倒的に多いことが知られています⁵⁾。魚類もこの*mstn* 遺伝子を有しており、人為的に*mstn* 遺伝子を機能欠損させたメダカにおいて筋肉量が増大することが報告されています⁶⁾。マダイにおいてこの遺伝子を機能欠損させることができれば、可食部割合を増加させることが期待できます。

ゲノム編集の実際 (マイクロインジェクション)
そこで我々はCRISPR/Cas9によるゲノム編集によってこの*mstn* 遺伝子の機能を抑えようと考えました。まず、マダイの*mstn* 遺伝子のDNA配列を調べてガイドRNAを設計してそのRNAとCas9 RNAも合成しました。ガイドRNAとCas9 RNAはマダイの受精卵にマイクロインジェクションという方法で注入します(図3)。マダイ受精卵へのマイクロインジェクション法については、すでに外来遺伝子の導入を目的に開発済みであり⁷⁾、この

方法をそのまま利用できました。まず成熟したマダイ雌雄より、排卵済みの未受精卵および精子をそれぞれ腹部圧迫による搾出法によって得ました。未受精卵に精子を混ぜて海水を加えて授精し、1分間放置後に受精卵を海水とLeibovitz's L-15培地で洗浄してL-15とともにアクリルプレートの溝に並べ、これに実体顕微鏡下で1粒ずつ、マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーをセットしたインジェクション装置を用いてRNA溶液を注入(マイクロインジェクション)しました。2014年4月に実際にミオスタチン遺伝子をターゲットに設計したガイドRNAおよびCas9 RNAをマダイ受精卵にマイクロインジェクションした例では、966粒にマイクロインジェクションして569尾の仔魚が孵化し、52日齢までに314尾が生残しました。つまり、32.5%が稚魚まで生き残ったことになります。このようにしてゲノム編集処理を施したマダイを飼育しました。

ゲノム編集第一世代 ガイドRNAおよびCas9 RNAをマイクロインジェクションした受精卵では、細胞分裂を繰り返しながらCRISPR/Cas9システムによるターゲット遺伝子の切断と細胞自身による修復が繰り返されることになります。やがて、注入されたRNAおよびそのRNAから翻訳・生成されたCas9タンパク質は分解されて消失しますが、それまでの過程でターゲット遺伝子が元通りに修復された細胞(野生型)と修復に失敗して数塩基のDNAが欠失した状態の細胞(変異型)の両方が混在する状態で発生が進みます。したがって、マイクロインジェクションにより作出したゲノム編集第一世代では、野生型と変異型のターゲット遺伝子を体内でモザイク状にもった魚と、マイクロインジェクションが適切に行われなかったか注入したRNA量が少なかったなどの理由により野生型のみをもつゲノム編集に失敗した魚が混在することになります。そこで、孵化後5か月間程度飼育した段階で腹腔内に個体識別するためのPit

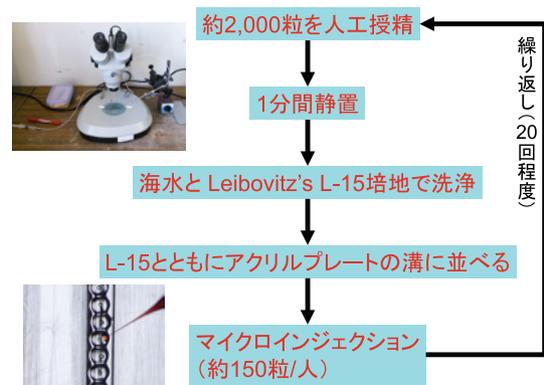


図3. マダイ受精卵へのマイクロインジェクション

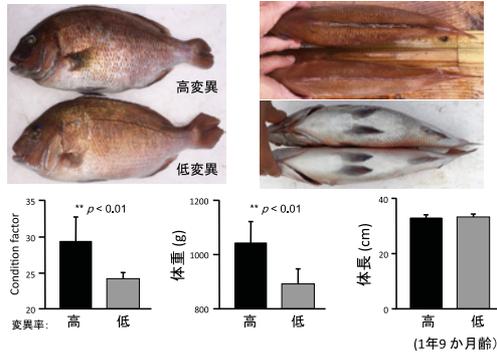


図4. ミオスタチン遺伝子をゲノム編集した第一世代のマダイの測定結果

タグ (BIOMARK社製, 直径2.1 mm, 長さ9あるいは12 mmの円筒状) を埋め込むと同時に鰭の一部をサンプリングして鰭からゲノムDNAを抽出しました。このゲノムDNAの*mstn*遺伝子の状態をPCR法などによって調べることで、その個体の*mstn*遺伝子の変異の程度を調べることが可能です。今回*mstn*遺伝子の変異を上記の方法で6か月齢の段階で調べたところ、変異が高程度であった個体は全体の42%、中程度の変異個体が10%、変異がないかその程度が低い個体が48%でした。それらの魚を1年9か月齢まで引き続き飼育して、変異が高程度の個体と低程度の個体の魚体を測定した結果、両者の体長に有意差はありませんでしたが、肥満度 (condition factor) および魚体重は高程度の変異個体で有意に高くなりました (図4)。このように*mstn*遺伝子へのゲノム編集は、驚くべきことにその第一世代から大きな変化として現れました。

ゲノム編集第二世代 上述の通り、ゲノム編集第一世代は野生型と変異型のターゲット遺伝子を体内でモザイク状にもつこととなります。しかし、その第一世代同士を交配して第二世代を得ることができれば、第二世代の中には全身のすべての細胞で変異型の遺伝子をもつ魚が現れます。その理由は、第一世代が成熟して次世代を産むときに作られる配偶子 (卵, 精子) は、それぞれ一つの生殖細胞からなるため、その生殖細胞に変異が入っていればそのまま次世代に伝わることになり、卵と精子の方が変異を持っている場合にはその卵と精子が受精してできた子供は完全な変異個体となるためです。*mstn*遺伝子をゲノム編集した高程度に変異を持ったマダイ第一世代を飼育していたところ、2歳魚となった2016年4月に水槽内で自然産卵してゲノム編集第二世代を得ることに成功しました⁸⁾。それらのマダイを飼育して、第一世代と同様にPitタグで標識して鰭の一部をサンプリングして調べた結果、予想された通り、*mstn*遺伝子に変異の入っていない完全な野生型の魚、両親のいずれか片

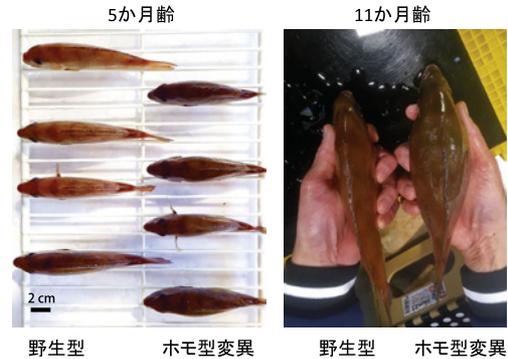


図5. ミオスタチン遺伝子をゲノム編集した第二世代のマダイ

方から変異を受け継いだヘテロ型で変異を持った魚、両親から変異を受け継いだホモ型で変異をもった魚が現れました。ホモ型で変異をもった魚は、孵化後数か月で明らかに体形が野生型の魚とは異なり、筋肉量の増大が肉眼でも容易に分かるようになりました (図5)。これらの魚は第三世代を作るために必要であるため、現在も大切に飼育していて、2018年の6月には第三世代を得ることに成功しました。変異個体の詳細な解析はこの第三世代で行う予定です。

おわりに

今回、マダイへのゲノム編集技術の応用について紹介しました。CRISPR/Cas9の論文が発表されたのが2012年で、我々が実験を開始したのが2014年4月、2016年にゲノム編集第二世代が誕生し、2018年には第三世代が量産できました。このようにCRISPR/Cas9法は、従来の品種改良技術に比べると驚くべき速度で品種改良を可能にする技術です。ゲノム編集した魚を実際に養殖魚として流通させるためには、飼料効率や成長速度などの養殖魚としての特性だけでなく、食品としての安全性や環境への影響などを明らかにし、その上でどのように扱うかということを決める法整備など、まだまだ実用化に向けた多くの仕事が残っています。しかし、冒頭で紹介した山中伸弥教授のコメントにある通り、きわめて画期的な技術であることから、人類にメリットとなるような応用を期待し、研究を進めたいと考えています。

本研究は、中心的な役割を果たしておられる京都大学の木下政人助教、同大学院博士課程の岸本謙太氏、近畿大学水産研究所の鷲尾洋平助教をはじめ、国立研究開発法人水産研究・教育機構の吉浦康寿主任研究員、国立遺伝学研究所の豊田敦教授らとの共同研究です。皆様の精力的な研究活動に敬意と謝意を表します。



文 献

- 1) NHK 「ゲノム編集」取材班：ゲノム編集の衝撃「神の領域」に迫るテクノロジー，NHK出版(2016).
- 2) Murata, O. *et al.*: *Fish. Sci.*, **62**, 845 (1996).
- 3) 家戸敬太郎, 村田 修：養殖, **47**, 34 (2010).
- 4) The New York Times: <https://www.nytimes.com/2015/11/20/business/genetically-engineered-salmon-approved-for-consumption.html> (2018/11/19).
- 5) 鈴木暁之ら：岩手県農業研究センター研究報告, **4**, 11 (2004).
- 6) Chisada, S. *et al.*: *Dev. Biol.*, **359**, 82 (2011).
- 7) Kato, K. *et al.*: *Fish. Sci.*, **73**, 440 (2007).
- 8) Kishimoto, K. *et al.*: *Aquaculture*, **495**, 415 (2018).