

ゲノム編集による肉厚マダイの生産

近畿大学 水産研究所・教授

家戸 敬太郎

はじめに

マダイは海水養殖魚の中で生産量がブリに次いで2番目に多い重要な養殖魚種であり、人工種苗生産技術が古くから確立されておりその生産尾数が最も多く、海水養殖魚の中では最も育種が進んでいる魚である。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る^{1,2)}。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ある。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るが、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あった。

そこで我々は、より短期間で育種効果が得られることを期待してマダイのゲノム編集に2013年より取り組んでいる。本稿ではマダイを材料にしてゲノム編集によって可食部の割合を増加させた「肉厚マダイ」を作出した方法とその成果、さらに養殖産業への応用の展望について述べる。

1. マダイへのゲノム編集

1) マダイの親魚養成、採卵・採精および人工授精

ゲノム編集や遺伝子導入で行われる魚卵への注射(先端を可能な限り細く加工したガラス針を用いたマイクロインジェクション)が卵に及ぼすダメージは小さい。従って、これらの実験操作を成功させる鍵は卵質にあるといっても過言ではない。我々は無処理である場合の孵化率が90%以上のマダイの良質卵を実験に用いている。この卵にマイクロインジェクションすることによって孵化率は約半分の50%程度まで低下する。無処理の孵化率が50%程度である卵にマイクロインジェクションをすることで25%程度が孵化するかといえば決してそうではなく、孵化率は0%近くにまで低下することが多い。

採卵に用いる親魚群は海面の小割式網イケースで飼育している。和歌山県白浜町の近畿大学水産研究所白浜実験場では、産卵の開始は3月下旬、終了は6月上旬で夕刻に産卵する。産卵時刻に網イケースから腹部が膨らんだ産卵間近と思われる雌個体を取り上げて腹部を圧迫して採卵する。良質卵が得られると雄個体を取り上げて採精する。採卵に比べて採精

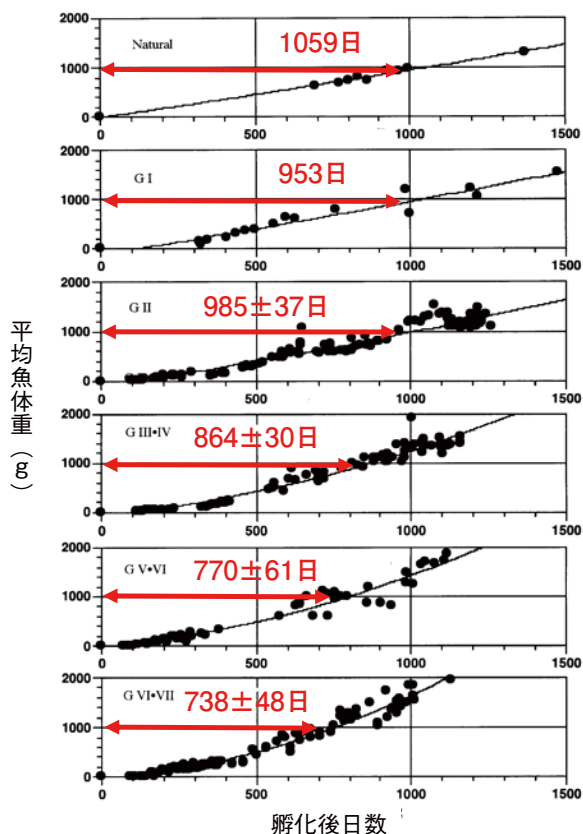


図1. 選抜育種マダイの継代に伴う成長の変化

の方が容易で、ほとんどの雄個体から採精可能である。

未受精卵に精液を加えて混合する。この時点では受精はしないが、ここに海水を加えて混ぜると精子が運動を開始して受精する。未受精卵は採卵後2時間程度までであれば人工授精可能であるが、マイクロインジェクションによる影響が時間の経過とともに大きくなって生残率は低下する傾向にある³⁾。

2) マイクロインジェクション

人工授精直後の卵は卵膜の硬化が進んでいないので柔らかく、ピペット操作などによって傷ついてやがて死んでしまうので授精後1分間は静置する。1分が経過すると茶こしなどのネット内で海水で卵を洗浄して余分な精液や卵巣腔液などを洗い流し、Leibovitz' s L-15培養液あるいは生理食塩水である岩松溶液に浸漬する³⁾。L-15あるいは岩松溶液とともにアクリルプレート上の溝にピペットを使って並べる(図2)。L-15あるいは岩松溶液を使う理由は2つあり、マダイの卵は分離浮性卵なので海水中では表面に浮上するため、アクリルプレートに並べる際に時間がかかることと、ガラス針を突き刺すことによるダメージがL-15あるいは岩松溶液中では軽減されるからである³⁾。実体顕微鏡で見ながら1粒ずつインジェクション操作を行う。人工授精後、5～10分経過すると卵膜の硬化が進んでガラス針が刺さりにくくなるため、5分毎に人工授精を繰り返して、硬化する前の卵へのインジェクションを繰り返す。この方法で、1人当たり1日に1000～3000粒の

卵へのマイクロインジェクションが可能である。

3) CRISPR/Cas9

我々はマダイのゲノム編集にCRISPR/Cas9を用いている⁴⁾。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る。そこで、体内で筋肉が増えすぎる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る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る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る。

マダイの*mstn*遺伝子の配列を調べ、CRISPR/Cas9システムで使用するsgRNAを設計し合成した。マダイの*mstn*遺伝子の翻訳領域の後半部分にミオスタチンタンパク質の機能ドメインである重要な配列が存在するので、その

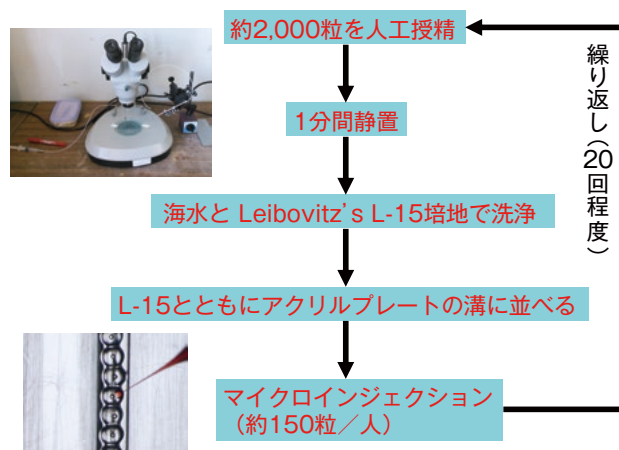


図2. マダイ受精卵へのマイクロインジェクション

配列の前半部分2箇所にsgRNAを設計した。別に合成したCas9 RNAと2種類のsgRNA (sgRNA1、sgRNA2) をそれぞれ混合してマダイ人工授精卵にマイクロインジェクションした。その結果、sgRNA1とCas9 RNAは966粒の卵にマイクロインジェクションし、孵化率は58.9%、52日齢の生残率は55.2%で314尾が得られた。sgRNA2とCas9 RNAは1、399粒の卵にマイクロインジェクションし、孵化率は44.9%で70日齢の生残率が30%以上であり、200尾程度が得られた。

2. 作出されたゲノム編集マダイ

1) ゲノム編集第一世代

sgRNAおよびCas9 RNAをマイクロインジェクションした授精卵内では、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る。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するが、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

が変異した状態の細胞(変異型)の両方が混在する状態で発生が進む。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る。

そこで、孵化後5ヵ月間程度飼育した段階で腹腔内に個体識別するためのIDタグ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を抽出した。このゲノムDNAのミオスタチン遺伝子の状態をPCR法などによって調べることで、その個体のミオスタチン遺伝子の変異の程度を知ることが可能になる。ミオスタチン遺伝子の変異を上記の方法で6ヵ月齢の段階で調べたところ、2種類のsgRNAの平均で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%であった。変異が高程度であった個体をまとめて飼育し、次世代の作出に用いた。

2)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になる。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全ての細胞で変異型の遺伝子をもつ魚が現れる。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、卵と精子の両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全身の全ての細胞で変異をもつ個体となるためである。

ミオスタチン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た。それらのマダイを飼育して、第一世代と同様にID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、両親から変異の入っていないミオスタチン遺伝子を受け継いだ完全な野生型の魚(野生型)、両親のいずれか片方から変異を受け継いだヘテロ型で変異を持った魚(ヘテロ型)、両親から変異を受け継いだホモ型で変異をもった魚(ホモ型)が現れた。ホモ型で変異をもった魚(変異体)は、孵化後数ヵ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った(図3)。変異体では、野生型と比べて体重に顕著な差はないが肥満度は高くなり、尾叉長は短いことが明らかになっており、筋肉量は約1.2倍に増加していた⁷⁾。

3)ゲノム編集第三世代

ゲノム編集第二世代では、卵や精子となる生殖細胞を含む全身の細胞で同じ変異を持つことになるので、第二世代で変異のタイプを調べておけば、その子供の遺伝子型が予想できると同時に、変



図3. ミオスタチン機能欠損個体(上)と通常個体(下)

異を持ったマダイの量産化が可能となる。マダイは多回産卵で1日に1個体の雌が数万粒以上の卵を産むためである。我々はヘテロ型2歳魚の雌雄各1尾から得た卵と精子を人工授精し第三世代を作出した。これによって野生型、ヘテロ型およびホモ型の全きょうだい(兄弟姉妹)が得られた。上述の通り第二世代のホモ型では筋肉量が約1.2倍に増加していたが、筋肉量が増加してもその分たくさんの飼料を食べようだと養殖コストは変わらないことになり筋肉量を増やした意味がなくなってしまう。そこで第三世代の全きょうだいの野生型稚魚とホモ型稚魚とを比較する飼育試験を実施した。その結果、ホモ型稚魚は、野生型稚魚と比べて日間摂餌率に差はなく同じように摂餌するが、摂餌した飼料を効率よく利用して野生型よりも大きく成長し、さらに摂取したタンパク質を蓄積する能力も高いことから、生産性の高い養殖魚であると考えられた(表1)⁸⁾。現在、出荷サイズに近いより大きな魚を用いて同様の試験を実施して解析しているところである。