

魚の精巣・卵巣がみんな空っぽに！？

～汎用性の高い魚類の不妊化技術を開発～

ポイント

- ・ CRISPR-Cas13d システムを利用した汎用性の高い魚類の不妊化技術を開発。
- ・ 実験モデル魚であるメダカと産業重要魚種であるニジマスを高効率で不妊化させることに成功。
- ・ 外来魚や養殖魚の迅速かつ確実な不妊化に期待。

概要

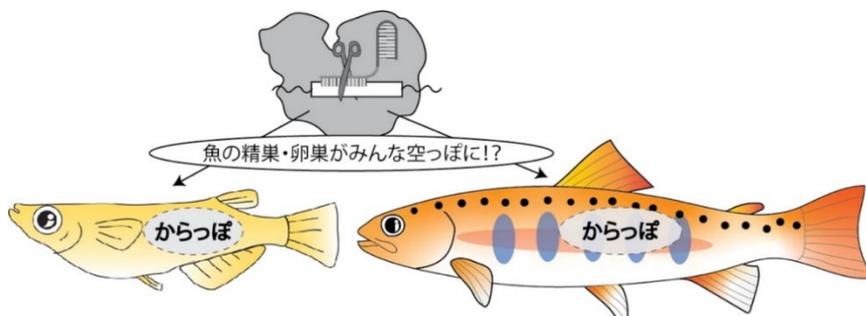
北海道大学大学院水産科学研究所の西村俊哉助教、藤本貴史教授、同大学北方生物圏フィールド科学センターの高橋英佑技術専門職員らの研究グループは、幅広い魚種で不妊化可能な技術の開発に成功しました。魚類の不妊化は、外来魚種の繁殖や遺伝子改変魚の逃亡による自然集団への遺伝子汚染を防ぐだけでなく、養殖魚の高成長・高肉質が期待できます。確実に魚を不妊化する方法として、精子と卵の元となる生殖細胞を欠損させ、精巣・卵巣を空っぽにする方法が有効ですが、幅広い魚類で汎用的に利用可能な不妊化技術は開発されていませんでした。

研究グループは、近年開発された CRISPR-Cas13d システムに着目しました。ゲノム編集技術として知られる CRISPR-Cas9 システムでは、狙った DNA (ゲノム) を切断し変異を導入できるのに対し、CRISPR-Cas13d システムでは、狙った RNA を切断し分解させることが可能です。標的となる RNA に結合するガイド RNA (gRNA^{*}) の設計に制約が小さいため、生殖細胞形成に必要な遺伝子の魚類共通配列を標的とした gRNA を設計することで、汎用的に魚類の不妊化が可能なのではないかと考えました。

そこで、ゲノムデータベース上に登録されている 70 魚種から取得した *dnd1* 遺伝子 (生殖細胞に必須の遺伝子) 配列をアライメントし、配列共通性の高い領域を同定しました。残念ながら全魚種で 100% 一致する標的配列は無かったため、産業重要魚種や鑑賞魚 (マグロ、サケ、ブリ、フグ、ティラピア、コイ、グッピー)、実験モデル魚 (メダカ、ゼブラフィッシュ、トゲウオ) に代表される魚種グループの配列をもとに gRNA を設計しました。その結果、サケ専用 gRNA をはじめ、マグロやブリ、フグ、ティラピア、コイ専用の gRNA でメダカを完全に不妊化できることが分かりました。さらにサケ専用 gRNA によってニジマスの効率的な不妊化にも成功しました。

従来、魚種ごとに遺伝子の DNA 配列を調べてから gRNA を設計する必要がありました。本研究で開発した共通 gRNA は、全魚種の半分以上に適用できる可能性があります。そのため、本研究成果は、DNA 配列が不明な外来魚や新規導入する養殖魚を迅速かつ確実に不妊化できる技術につながります。

なお、本研究成果は、2024 年 6 月 26 日 (水) 公開の *Aquaculture* 誌に掲載されました。



本研究の概念図

【背景】

近年、海水温の上昇により各地域で漁獲できる魚種に変化が見られ、名産品とされる漁獲量の低下が問題となっています。その一方で、魚介類への需要は世界的に高いことから、養殖技術やゲノム編集技術を駆使した生産性の向上を目指した研究が進められています。魚類の不妊化技術は、外来魚の繁殖や遺伝子改変したゲノム編集魚の逃亡による遺伝子汚染を防ぐだけでなく、養殖魚の高成長化や肉質の向上にもつながるため、今後ますます重要な技術として期待されています。確実に魚類を不妊化する方法として、精子と卵の元となる生殖細胞を欠損させ、精巣と卵巣（生殖腺）を空っぽにする方法が有効ですが、汎用的に魚類を不妊化できる技術は開発されていませんでした。

研究グループは、新規不妊化技術の確立のために RNA 編集技術として知られる CRISPR-Cas13d システムに着目しました。本システムでは、gRNA に誘導されたタンパク質の Cas13d によって標的 RNA を切断・分解することで、遺伝子の働き^{*2}を阻害できます（図 1）。ゼブラフィッシュを用いた研究で、生殖細胞に必要な *dnd1* 遺伝子の機能を阻害すると生殖細胞の欠損が起こることが報告されています。RNA 全体が gRNA の標的になり得るため、*dnd1* 遺伝子の魚類共通配列を標的とした gRNA を設計すれば（図 1）、汎用性の高い不妊化技術につながるのではないかと考えました。

【研究手法】

ゲノムデータベース上に登録されている 70 魚種から取得した *dnd1* 遺伝子配列を似ている部分が同じ位置になるように並べ、配列共通性の高い領域を同定しました（図 2A）。残念ながら全魚種で 100%一致する標的配列は無かったため、産業重要魚種や鑑賞魚（マグロ、サケ、ブリ、フグ、ティラピア、コイ、グッピー）、実験モデル魚（メダカ、ゼブラフィッシュ、トゲウオ）に代表される魚種グループの配列をもとに共通 gRNA を設計しました。Cas13d mRNA とそれぞれの共通 gRNA をマイクロインジェクションによってメダカとニジマスの受精卵に導入し、生殖細胞が欠損し生殖腺が空っぽになるかを指標に不妊化を検証しました。

【研究成果】

サケ専用共通 gRNA をはじめ、マグロ、ブリ、フグ、ティラピア、コイ専用の共通 gRNA でメダカの生殖細胞が完全に欠損したため、不妊化できることが分かりました（図 2）。さらにサケ専用 gRNA によってニジマスの生殖腺を効率的に空っぽにさせることにも成功しました（図 3）。サケ専用 gRNA の標的配列は、サケ属（ニジマス、マスノスケ、シロサケ、サクラマスなど）、サルモ属（ブラウントラウト、タイセイヨウサケ）やイワナ属において 100%一致しているため、幅広いサケ科魚類の不妊化が可能と考えられます（図 3A）。

【今後への期待】

従来、遺伝子の機能を阻害するためには、魚種ごとに遺伝子の DNA 配列を調べてから gRNA を設計する必要がありました。本研究で開発した共通 gRNA は、幅広い魚種グループに属する 70 種のうち 55 種の *dnd1* 配列と 100%一致しているため、全魚種の半分以上に適用できる可能性があります。そのため、本研究成果は、DNA 配列が不明な外来魚や新規導入する養殖魚を迅速かつ確実に不妊化できる技術につながります。

近年、マグロのような大型で飼育が困難な産業重要魚種の配偶子（精子と卵）を飼育が容易なサバなどの魚に作らせる「借腹生産技術（代理親魚技術）」の研究が進められています。効率的にドナー魚種由来の配偶子を得るためには、ホスト種の生殖腺をあらかじめ空っぽにさせる必要があります。本

研究により開発した魚類共通 gRNA は、様々なホスト魚種の不妊化に役立つため、借腹生産技術の社会実装の加速が期待されます。

【謝辞】

本研究成果は、日本学術振興会科学研究費助成事業基盤研究 B（課題番号：JP21H02277）、公益財団法人北水協会研究助成、函館マリカルチャープロジェクト（内閣府「地方大学・地域産業創生交付金事業」）の支援を受けて実施されました。

論文情報

論文名	Sterilization of fish through adaptable gRNAs targeting <i>dnd1</i> using CRISPR-Cas13d System (CRISPR-Cas13d システムにおける <i>dnd1</i> 遺伝子に対する共通 gRNA を用いた魚類の不妊化)
著者名	西村俊哉 ¹ 、高橋英佑 ² 、藤本貴史 ¹ （ ¹ 北海道大学大学院水産科学研究院育種生物学分野、 ² 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所）
雑誌名	Aquaculture（水産養殖学の専門誌）
DOI	10.1016/j.aquaculture.2024.741269
公表日	2024年6月26日（水）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学大学院水産科学研究院 助教 西村俊哉（にしむらとしや）

T E L 0138-40-5535 メール tnishi@fish.hokudai.ac.jp

U R L <https://www2.fish.hokudai.ac.jp/faculty-member/nishimura-toshiya/?key=jp>
<https://researchmap.jp/tnishimedaka>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

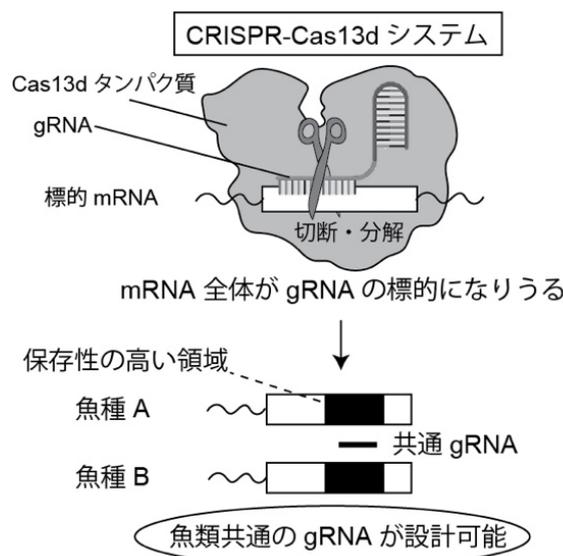


図 1. CRISPR-Cas13d システム

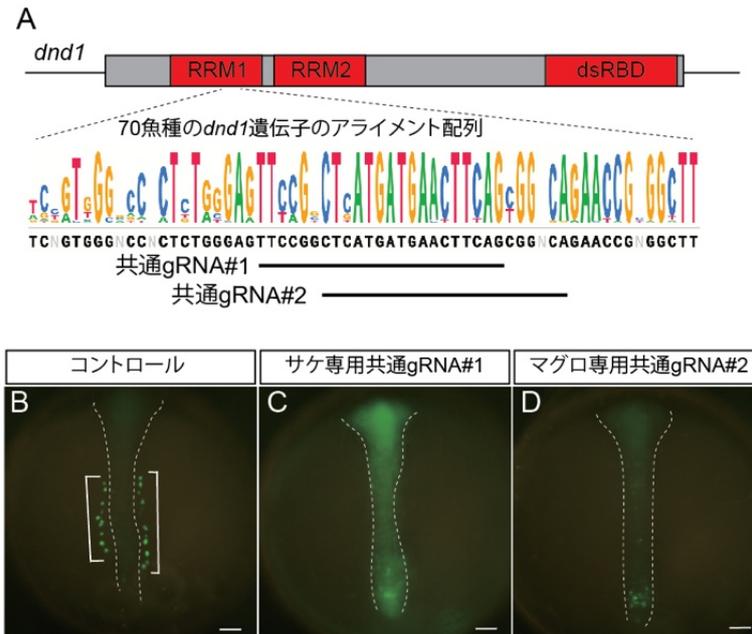


図 2. 共通 gRNA によるメダカの不妊化

(A) 70 魚種の *dnd1* 遺伝子配列をアライメントし、共通 gRNA を 2 箇所設計した。(B) コントロールメダカ胚。四角括弧で示す緑の粒々が生殖細胞。(C) サケ専用共通 gRNA、(D) マグロ専用共通 gRNA をインジェクションした生殖細胞欠損メダカ胚。白色点線部でメダカ胚を取り囲み、それ以外の領域は卵黄である。(本論文より抜粋・改変)

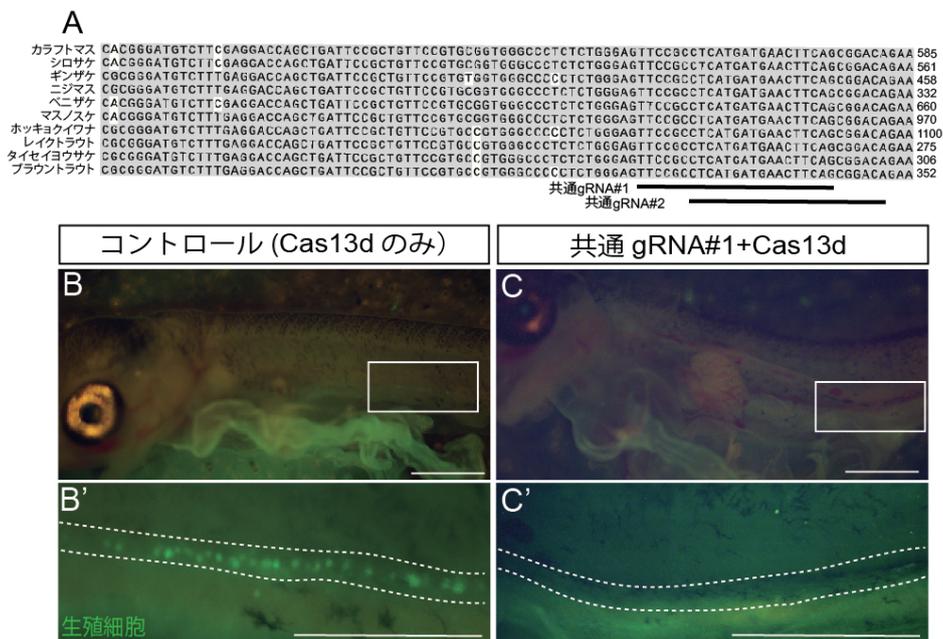


図 3. サケ専用共通 gRNA によるニジマスの不妊化

(A) サケ科魚類における *dnd1* 遺伝子配列のアライメント。共通 gRNA はサケ科魚類で 100% 一致している。(B) コントロールニジマス胚。B' は白四角の生殖腺領域を拡大。生殖腺 (白色点線部) の中に生殖細胞 (緑の粒々) が存在している。(C) 共通 gRNA をインジェクションしたニジマス胚。生殖腺領域 (C'、白色点線部) の生殖細胞が完全に欠損し、生殖腺は空っぽになった。(本論文より抜粋・改変)

【用語解説】

- *1 ガイド RNA (gRNA) … Cas13d タンパク質の切断場所を決める「ガイド」の役割があることから gRNA と呼ばれる。60 塩基程度の短い RNA であり、標的結合部位と Cas13d タンパク質結合部位から構成されている。標的となる遺伝子の配列をもとに 23～25 塩基程度の標的結合部位を設計する。gRNA によって標的 RNA に Cas13d タンパク質がリクルートされると、その RNA が切断される。
- *2 遺伝子の働き … DNA にコードされた遺伝子は、RNA に転写され、その後タンパク質に翻訳されてから機能を発揮する。CRISPR-Cas13d システムでは、RNA を切断・分解することで標的遺伝子の機能を阻害する。