

養殖魚のゲノム編集と社会実装に向けて

岸本 謙太・木下 政人*

はじめに

現在、世界的な経済成長や人口増加に伴い、食料の不足（特にタンパク質源）が懸念されている。また、乱獲による天然資源の枯渇が危惧されていることから、近年では養殖業生産量が急激に増加しており、国連食糧農業機関（FAO）の推測によると、2021年には養殖生産量が漁獲量を上回るとされている¹⁾。

日本における水産業では、1980年代以前は「獲る」漁業が主流であり、その生産量は世界第1位であった。しかしながら、現在に至るまでの「獲る」漁業から「育てる」養殖業へ推移していく中で、水産生産量は1984年ピーク時の1/3にまで減少し、世界第7位まで後退した。また、1990年代以降、日本の養殖業は飼育魚種の増加や飼育技術の改良・発展を果たしてきたが、近年、その生産量は横ばいである。一方、中国やインドネシアなどのアジア新興国では養殖業が爆発的に発展し、その生産量は日本の生産量よりもはるかに多い。また、ノルウェーやチリなどではサケ養殖が大きく発展し、世界各国へ多量に輸出されるようになった。日本でもスーパーマーケットや寿司チェーン店で、海外で養殖された魚をよく目にするようになった。現在、日本は世界屈指の水産物輸入国であり、2016年の輸出額が21億ドルであるのに対し、輸入額は142億ドルにもなっている²⁾。

この状況下で、日本の水産養殖業が世界と渡り合うためには、海外養殖魚と差別化できる「高品質な養殖品種」の作出（品種改良）が必須である。たとえば、生産性や耐病性を向上させ生産コストを抑え、価格面で海外製品との競争力を持つ品種や、優れた栄養特性を持つなどの特徴的な品種が求められる。しかし、偶然生まれた有用変異体を見つけ継代飼育する従来の選抜育種法では、優良品種を樹立するまでに数十年という長期間を必要とし、また、望む品種が得られる保証もない。近年注目を集めているゲノム編集技術はこの点を打開できる強力なツールとして活用することが可能である。ゲノム編集技術を用いることで、狙った配列へ正確に、数塩基の挿入・置換あるいは新規な遺伝子の導入を行うなど、さまざまなゲノムの改変が可能である。その中でも、狙った遺伝子配列の一部を取り除く「欠失型遺伝子破壊」は外来遺

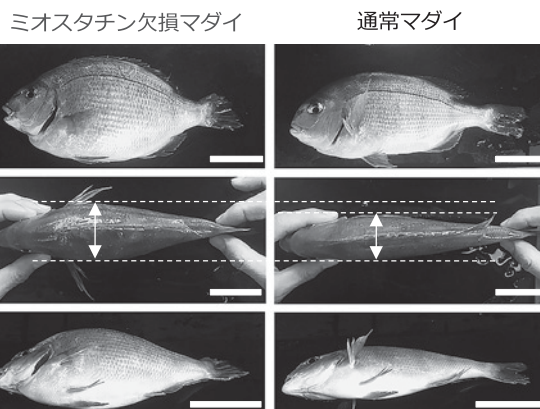


図1. ミオスタチン遺伝子欠損による高産肉性マダイ。ミオスタチン欠損マダイと通常マダイの11か月齢の外観。白線は5 cmを表す。

伝子を導入せず、自然界でも起こりうる現象である。そのため「欠失型遺伝子破壊」で作出されたゲノム編集食品生物は、従来の遺伝子導入法で作出された「組換え生物」とは区別され、社会受容が進んでいく可能性がある。

本稿では、筆者らがCRISPR/Cas9を用いて作出した高産肉性品種であるミオスタチン遺伝子破壊マダイ（図1）³⁾を例に、「欠失型遺伝子破壊」技術を用いたゲノム編集育種法を述べるとともに、国内外での研究例、今後の社会実装に向けた動きや課題について述べる。

ゲノム編集技術を活用した品種改良法

筆者らが作出したミオスタチン遺伝子破壊マダイ系統の作出フローを図2に示す。

(1)gRNAの選定 機能欠失を起こしたい遺伝子（標的遺伝子）に対して設計したすべてのguide RNA (gRNA) が高効率に変異を誘発するとは限らない。そこで、同一遺伝子内に複数（通常3か所以上）の配列をターゲットとしたgRNAを設計する。設計に際し、機能ドメインをコードする領域より上流であること、microhomology mediated endo joining (MMEJ) によりフレームシフト変異が生じやすい配列であることを考慮するのが良い。まず、少数の受精卵を用いて各gRNAの変異導入活性を評価し、もっとも変異導入率の高いgRNAを選定する。

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻（助教） E-mail: kinoshit@kais.kyoto-u.ac.jp

(2) マイクロインジェクション法 (MI法) によるゲノム編集ツールの導入 魚類でゲノム編集を行う場合、ゲノム編集ツールはRNAあるいはタンパク質として導入する。一般的に、それらの導入は受精直後の卵にMI法によって行う。魚種により受精卵の粘着性や透明性、卵膜硬化速度、卵膜の形状などの特徴が異なるため、魚種ごとに、受精卵の浸漬溶液やMIを行うタイミングなどの条件を最適化する必要がある。マダイの場合は一つの標的遺伝子に対して1000–2000粒の卵にゲノム編集処理を行うことにより、目的の変異導入魚を得ることができる⁴⁾。

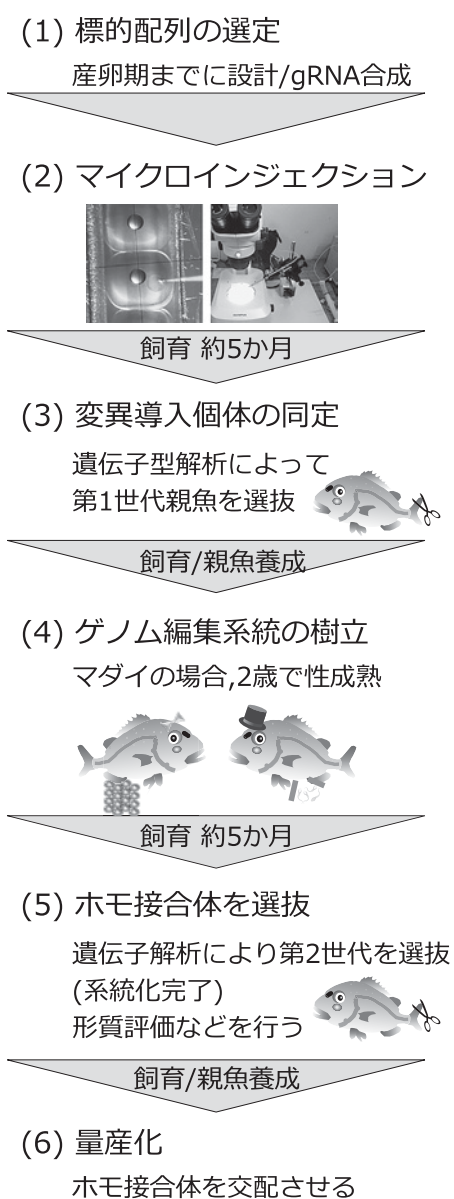


図2. ゲノム編集技術を活用した養殖魚における育種。図はマダイの例を示した。マダイは成熟年数が2年であるため、2年で系統化、4年目で量産化が可能である。

(3) 変異導入個体の同定 変異導入の有無は、ヒレの一部から調製したゲノムDNAを用いたPCRと、それに続くheteroduplex mobility assay (HMA)を用いた遺伝子型解析により検討する。魚類の場合は受精卵の卵割速度が早いため、ゲノム編集を施した世代の個体では、個体内で編集されていない細胞と編集された細胞が入り混じった状態(モザイク)となり、また、同一個体内で複数のタイプの変異が存在する。遺伝子破壊を目的とした場合、フレームシフト変異が高頻度に導入されている個体を第1世代親魚として選抜し、育成する。

(4) ゲノム編集システムの樹立 親魚として育成した第1世代の雌雄個体を交配し、第2世代を得る。

(5) ホモ接合体の選抜 第2世代を数百から千尾程度、体長約10 cmまで育成し、上述のようにPCRとHMA、塩基配列解析により遺伝子型解析を行う。両アレルに同一の目的変異を持つ個体(ホモ接合体)を雌雄について、それぞれ複数尾を第2世代の親魚として選抜する(系統化完了)。選抜した個体の表現型を観察し、目的形質が付与されていることを検証するとともに、オフターゲット変異の有無などを評価する。

(6) 量産化 品種として確立するためには、同一の変異を持ち、目的の形質が付与された個体を量産する必要がある。第2世代親魚を交配させることにより、量産化を図る。一般的に魚類の場合、1ペアが数万~数百万の受精卵を生むため、新規有用品種を第3世代で量産化することが可能である。

これまでに近畿大学では、選抜育種法により成長が早く耐病性に優れたマダイ系統を作出しているが、その確立に30年余りを必要とした。一方、ゲノム編集技術を用いることにより新品種が僅か2年で作出可能であり、本技術は今後の水産物の発展に大きく寄与すると思われる。

ミオスタチン遺伝子破壊マダイの性状

ミオスタチンは、骨格筋が肥大した自然突然変異肉牛から発見された遺伝子であり、その機能は骨格筋細胞の増殖・成長の抑制である⁵⁾。ミオスタチン機能欠損により骨格筋量の増加が期待される。筆者らはCRISPR/Cas9を用いてミオスタチン遺伝子欠失マダイを2系統(8および14塩基欠失)作出した。いずれの系統においても図1に示すように期待通り骨格筋量が増加(通常固体の約1.2倍)した。また、今回使用したgRNA配列との相違が2塩基以内の配列をオフターゲット候補としてマダイゲノムデータベースより抽出し、PCRと塩基配列解析により変異の有無を検討したが、いずれの配列においても変異は確認されなかった。

ゲノム編集による欠失変異と自然変異

今回筆者らが作出したマダイは、8および14塩基を欠失した系統である。自然界でもこのような欠失が起こりえるかを検討するため、非編集マダイ個体間での塩基の欠失数とその頻度を、全塩基配列を比較することにより検討した。その結果、個体間で1, 8, 14塩基欠失は、それぞれ約200,000, 約20,000, 約7,000か所存在することが明らかとなった。つまり、塩基の欠失は自然界の生物では一般的なことと言える。

国内外での研究例

筆者らのマダイやトラフグでの取組みに加え、論文発表があるものを表1に示した。すでに実施されているものは、可食部増加を目的とした高産肉性の他に、生育コスト削減を目的とした高成長、育種のスピード化を目的とした早期精子形成、自然界や他業者への品種の流出を防ぐことを目的とした不稔化などが標的の形質である。海外の動向を見ると、論文による成果発表はないが、アメリカのAquaBounty社が高生産性ティラピアを作出している⁶⁾。また、中国などによる淡水魚のコイやナマズ類、ノルウェーのタイセイヨウサケなどで報告がある。最近では、2019年に韓国で、筆者らと同様にミオスタチン遺伝子欠損品種のヒラメの作出が報告された。国内の学会発表ではクロマグロ、ブリ、マサバなどで変異導入の報告例がある。このように、養殖魚の育種分野でも技術浸透が著しく、今後さまざまな魚種および形質での実施が予想される。

表1. 養殖魚におけるゲノム編集の報告例

魚種	遺伝子, 形質/研究成果	系統化	文献
マダイ	<i>mstn</i> , 高肉産性	有	3
	<i>foxl3</i> , 早期精子形成	有	
トラフグ	<i>mstn</i> , 高肉産性	有	
	<i>mc4r</i> , 高成長	有	
	<i>foxl3</i> , 早期精子形成	有	
	<i>pstbp2</i> , 無毒化	無	7
ヒラメ	<i>mstn</i> , 高肉産性	有	8
カタクチイワシ	<i>mstn</i> , 海産魚のモデル	有	9
ニジマス	<i>sdv</i> , 性制御	有	10
	<i>igf-1</i> , 遺伝子の機能解析	無	11
タイセイヨウサケ	<i>dnd</i> , 不稔化	無	12
	<i>tyr</i> , 色制御	無	
コイ	<i>mstn</i> , 高肉産性	無	13
コウライギギ	<i>mstn</i> , 高肉産性	有	14
チャネルキャットフィッシュ	<i>mstn</i> , 高肉産性	無	14
	<i>lh</i> , 不稔化	無	
ナイルティラピア	性決定関連遺伝子	有	15

社会実装に向けて

現在、日本ではゲノム編集技術を活用して得られた農作物、家畜、水産物の扱い方が議論、整理されてきている。この中で、生物多様性への考慮、食品としての安全性の評価、食品表示などが重要な項目となっている。これらの要点を正しく評価・適用することにより、近い将来、ゲノム編集食品が実用化されるであろう。また、ゲノム編集育種が社会に受け入れられるためには、情報を正しく社会に発信していく必要がある。

また、今後のゲノム編集育種の技術発展のためには、さらなる基礎研究が重要である。ゲノム編集による養殖魚の品種改良は始まったばかりで、大きな可能性を有している。その発展のためには、各魚種の養殖技術の開発や、魚類のターゲットとなる遺伝子の機能解析を行うことが重要である。

謝 辞

本研究は、近畿大学(家戸敬太郎氏、鷺尾洋平氏)、水産研究・教育機構(吉浦康寿氏)との共同研究である。また、本研究は、文部科学省科学研究費補助金(基盤B:26292104, JSPS:17J10249)、総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創設技術」、厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進事業:30190401)などにより実施された。

文 献

- 1) FAO The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf> (2019/08/17).
- 2) 水産庁 平成30年度水産白書: <http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h30/index.html> (2019/08/14).
- 3) Kishimoto, K. *et al.*: *Aquaculture*, **495**, 415 (2018).
- 4) Kishimoto, K. *et al.*: *Fish. Sci.*, **85**, 217 (2019).
- 5) Kambadur, R. *et al.*: *Genome Res.*, **7**, 910 (1997).
- 6) Fishfarmingexpert: <https://www.fishfarmingexpert.com/article/aquabounty-gets-argentina-go-ahead-for-edited-tilapia/>(2019/08/14).
- 7) Kato-Unoki, Y. *et al.*: *Toxicol.*, **153**, 58 (2018).
- 8) Kim, J. *et al.*: *Aquaculture*, 734336 (2019).
- 9) Sakaguchi, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **9**, 4948 (2019).
- 10) Cleveland, B. M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **30**, 16054 (2018).
- 11) Yano, A. *et al.*: *Mar. Biotechnol.*, **16**, 243 (2014).
- 12) Wargelius, A. *et al.*: *Transgenic Res.*, **28**, 101 (2019).
- 13) Zhong, Z., *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 22953 (2016).
- 14) Dunham, R. A. and Elasmwad, A.: *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, **6**, 305 (2018).
- 15) Li, M. and Deshou, W.: *Sci. Bull.*, **62**, 165 (2017).