TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

サケ科魚類の生殖系列における遺伝子操作技術の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-07-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 片山, 直人 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1288

［課程博士・論文博士共通］

博士学位論文内容要旨
Abstract

専　攻 Major	応用生命科学専攻	氏　名 Name	片山　直人
論文題目 Title	サケ科魚類の生殖系列における遺伝子操作技術の開発		

脊椎動物の精巣では、精原幹細胞が自己複製と分化をし続けることで、生涯を通して大量の精子が生産される。魚類では、ニジマスにおいて、精原細胞移植を用いた幹細胞アッセイ系が確立されたことにより、形態学的には均一な A 型精原細胞集団のうち、一部の細胞のみが精原幹細胞であることが機能的に証明された。魚類の生殖細胞研究において、精巣内で精原幹細胞の幹細胞能がどのように維持されているのか、その分子基盤を明らかにすることは重要な課題であるものの、分子生物学的方法論のアプローチの困難さから、未だ多くの謎が残されている。すなわち、精巣構造を維持したまま、精原幹細胞と分化型 A 型精原細胞を判別する技術や、遺伝子の機能を解析する技術が不足していることから、精原幹細胞に焦点を絞った遺伝子の発現ならびに機能を解析することは困難であった。そこで、本研究では、生殖細胞研究に有用な遺伝子工学的手法の中でも、特に精原幹細胞の研究に必須であると考えられる遺伝子操作技術をサケ科魚類において確立することを目的とした。第一章では、幹細胞やその娘細胞の追跡が可能な Cre/*loxP* 系を用いたパルス標識法の構築、第二章では、遺伝子の機能解析に必須な遺伝子ノックアウト法をサケ科魚類で確立することを最終目標とした。

まず第一章では、Cre/*loxP* 系を用いたパルス標識法を構築するにあたり、Cre/*loxP* 系がニジマスの生殖細胞特異的に稼働しうるかを検討した。まず、ユビキタスプロモーターの下流に 2 つの *loxP* 配列で挟んだ *DsRed* 遺伝子を接続し、その下流に *Egfp* 遺伝子を接続したコンストラクト導入した Tg(*hsc:LRLG*)を樹立した。なお、Tg(*hsc:LRLG*)は全身で赤色蛍光を発するが、Cre 酵素が生産された細胞では、2 つの loxP 配列で挟まれた *DsRed* 遺伝子が切り出されることで *Egfp* 遺伝子が発現し、緑色蛍光を発すると期待される。また、生殖細胞特異的な *vasa* 遺伝子の発現制御領域に *cre* 遺伝子を接続したコンストラクトを導入した Tg(*vasa-cre*)を樹立した。次に、Tg(*hsc:LRLG*)の雌個体と Tg(*vasa-cre*)の雄個体を交配することで、二重 Tg(wTg)個体を作出した。得られた wTg 個体の生殖腺ならびに精子の *Egfp* 遺伝子発現細胞を同定した結果、雄では、A 型精原細胞、一次精母細胞、二次精母細胞、ならびに精子細胞であり、雌では、卵原細胞および卵母細胞であった。さらに、wTg 個体の各組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 解析を行った結果、生殖腺以外の組織において *DsRed* 遺伝子の切り出しは起きていないことが確認された。以上の結果から、Cre 酵素による *DsRed* 遺伝子の切り出しが生殖細胞特異的に起こり、抑制されていた *Egfp* 遺伝子の発現をユビキタスプロモーターの制御により誘起できることを証明した。また、雄性生殖系列では、*vasa* 遺伝子は、精母細胞以降に発現が著しく減少するため、*vasa* 遺伝子の発現制御領域により制御される *cre* 遺伝子は、精原細胞のみで強発現していたと考えられる。したがって、*DsRed* 遺伝子は、精原細胞のみで Cre 酵素により切り出され、緑色蛍光を発していた精母細胞ならびに精子細胞は、*DsRed* 遺伝子が切り出された精原細胞が分化したことにより生じた細胞であったことが示唆された。このことは、未分化な *vasa* 遺伝子発現細胞である精原細胞の発生を、最も分化した精子細胞まで緑色蛍光により追跡できたことを示している。以上のように、ニジマス生殖細胞においても Cre/*loxP* 系が機能し、これを用いたパルス標識法の利用が可能であることが示唆された。

第二章では、遺伝子ノックアウト法により、生殖系列で特異的に発現している遺伝子の機能解析をサケ科魚類で行うことを目指し、その第一歩として CRISPR/Cas 系を用いたゲノム編集がヤマメ、ニジマス、ヒメマスにおいて可能であるかを検討した。まず、未分化な生殖細胞で特異的に発現する *dnd*

遺伝子の RNA 認識モチーフ 1 に設計した gRNA と Cas9 mRNA をそれぞれ 12.5、300ng/µl の濃度で混合し、各魚種の受精卵へ 2nl ずつ顕微注入し、Founder 個体を作製した。次に、これら処理卵から孵化した稚魚、あるいは幼魚の鰭より全 DNA を抽出し、変異解析に供した。稚魚各 8 尾の変異解析の結果、ヤマメでは 6 尾、ニジマスでは 7 尾、ヒメマスでは 6 尾で *dnd* 遺伝子に変異が認められた。また、変異が認められたニジマス 7 尾における変異アリルの出現頻度は、3.1%から 23.3%であった。なお、これらの変異は、7 あるいは 8 塩基の欠損、1 塩基の挿入および 1 塩基の置換であった。さらに、成熟したヤマメおよびニジマス Founder 雄それぞれ 2 個体と 4 個体を野生型雌個体と交配し、F1 世代を得た。F1 世代のうち、*dnd* 遺伝子ヘテロ変異体を探索した結果、ヤマメではそれぞれ 6.8％と 13.3%、ニジマスではそれぞれ 0.8%、0.9%、1.9%、3.7%の F1 個体が *dnd* 遺伝子ヘテロ変異体であった。したがって、CRISPR/Cas 系を用い、サケ科魚類の *dnd* 遺伝子の編集に成功した。また、*dnd* 遺伝子の変異は生殖細胞系列でも認められ、次世代に *dnd* 遺伝子ヘテロ変異体が得られた。今後、*dnd* 遺伝子ヘテロ変異体同士を交配することで、*dnd* 遺伝子ノックアウト個体が得られると期待される。以上のように、CRISPR/Cas 系を用いて生殖細胞関連遺伝子をノックアウトすることが可能であることが示唆され、各遺伝子の機能解明に役立つことが期待される。

これまで、サケ科魚類では、精原幹細胞を同定あるいは追跡する技術、また、生殖系列で発現する遺伝子の機能解析を行うツールは存在しなかった。本研究により樹立した生殖細胞特異的な Cre/*loxP* 系ならびに CRISPR/Cas 系によるゲノム編集の基盤技術は、精原幹細胞を含む生殖系列の分子基盤を解明するうえで役立つと期待される。