

ゲノム編集による有害外来魚の駆除と 養殖魚の生育区域外での繁殖防止

山梨大学 大学院総合研究部
基礎医学系(医学教育センター)

教授 川原敦雄

2019年12月19日

新技術の基盤となった研究内容

klf17遺伝子を破壊したゼブラフィッシュは孵化できず死滅



プレスリリース

令和元年9月17日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

川原敦雄教授らの研究グループが
『魚類の孵化腺や側線の発生に重要な遺伝子の機能』の解明に成功

山梨大学大学院総合研究部発生生物学の川原敦雄教授の研究グループは、脊椎動物間で保存されている転写因子 klf17 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 により破壊したゼブラフィッシュ変異体を作製しその機能解析を行った結果、klf17 遺伝子が孵化腺と側線の発生に重要な役割を担っていることを明らかにしました(別紙参照)。

魚類の個体数をコントロールすることに応用が可能

klf17 変異体



孵化できず死滅

新技術の基盤となった研究内容

*klf17*遺伝子は発表者が発見した転写制御因子

biklf: blood island enriched krüppel-like factor

Expression of the Krüppel-like zinc finger gene *biklf* during zebrafish development



Atsuo Kawahara, Igor B. Dawid* *Mechanism of Development* (2000)

Critical role of *biklf* in erythroid cell differentiation in zebrafish

Atsuo Kawahara and Igor B. Dawid

Current biology (2001)

Characterization of *biklf/klf17*-deficient zebrafish in posterior lateral line neuromast and hatching gland development

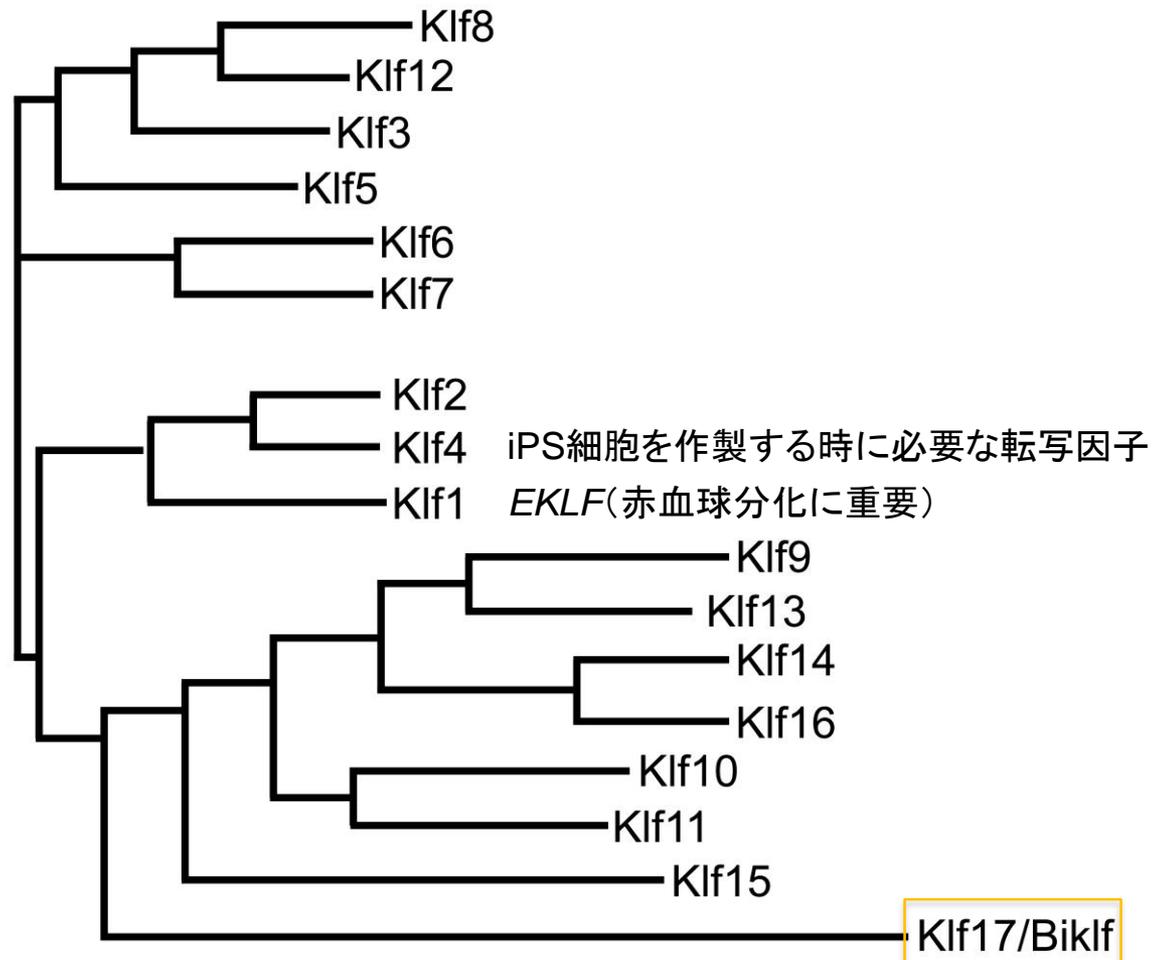
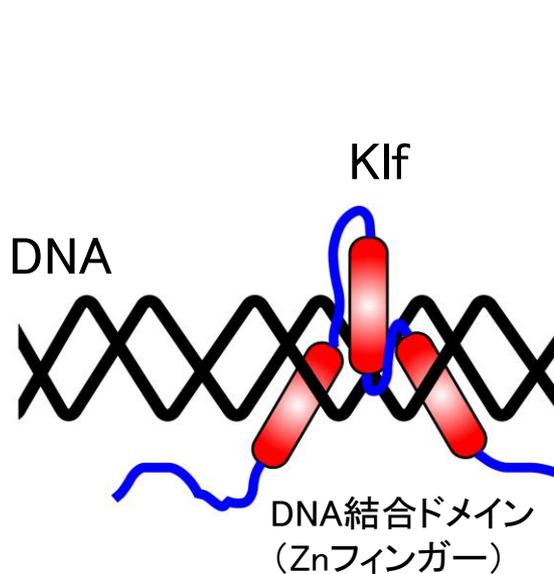
Hiroaki Suzuki¹, Tomoe Ishizaka¹, Kanoko Yanagi¹, Ryota Sone¹, Yuto Sunaga², Rie Ohga¹ & Atsuo Kawahara¹

Scientific Reports (2019)

ゲノム編集技術を用い*klf17*遺伝子を破壊

新技術の基盤となった研究内容

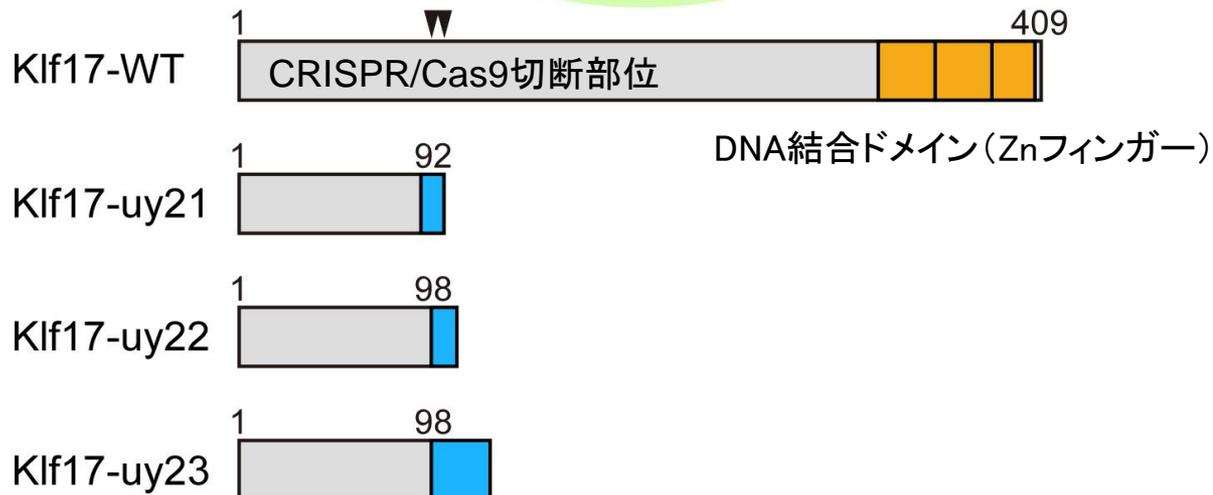
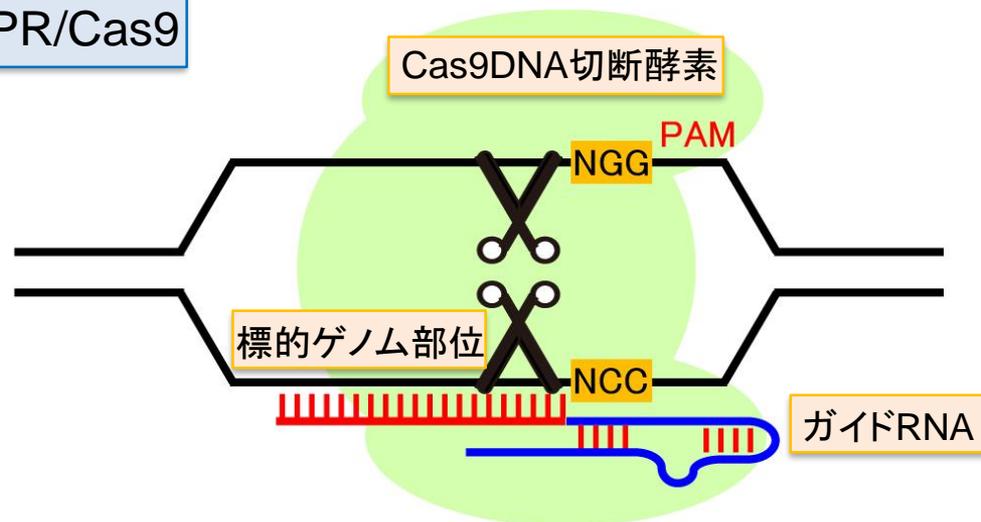
転写制御因子である*klf17*遺伝子はDNAに結合する能力がある



新技術の基盤となった研究内容

*klf17*遺伝子においてDNAの結合に必要な領域を欠損させた

CRISPR/Cas9



klf17変異体は孵化できない

klf17遺伝子を破壊したゼブラフィッシュは孵化できず死滅

A

野生型



15日胚

B

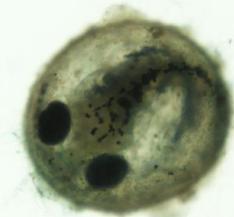
卵膜を剥がした klf17 変異体



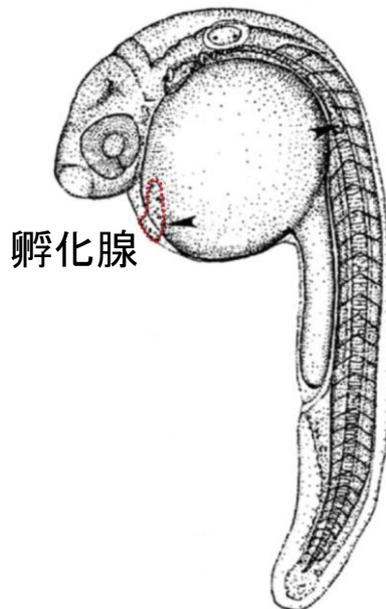
卵膜を剥がすと生存

C

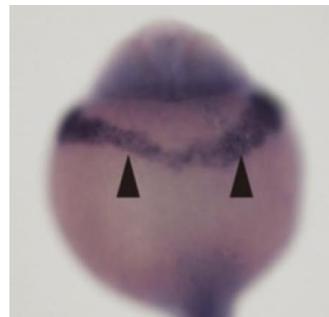
klf17 変異体



孵化できず死滅



孵化腺細胞: 孵化酵素を産生・分泌して、孵化を促す

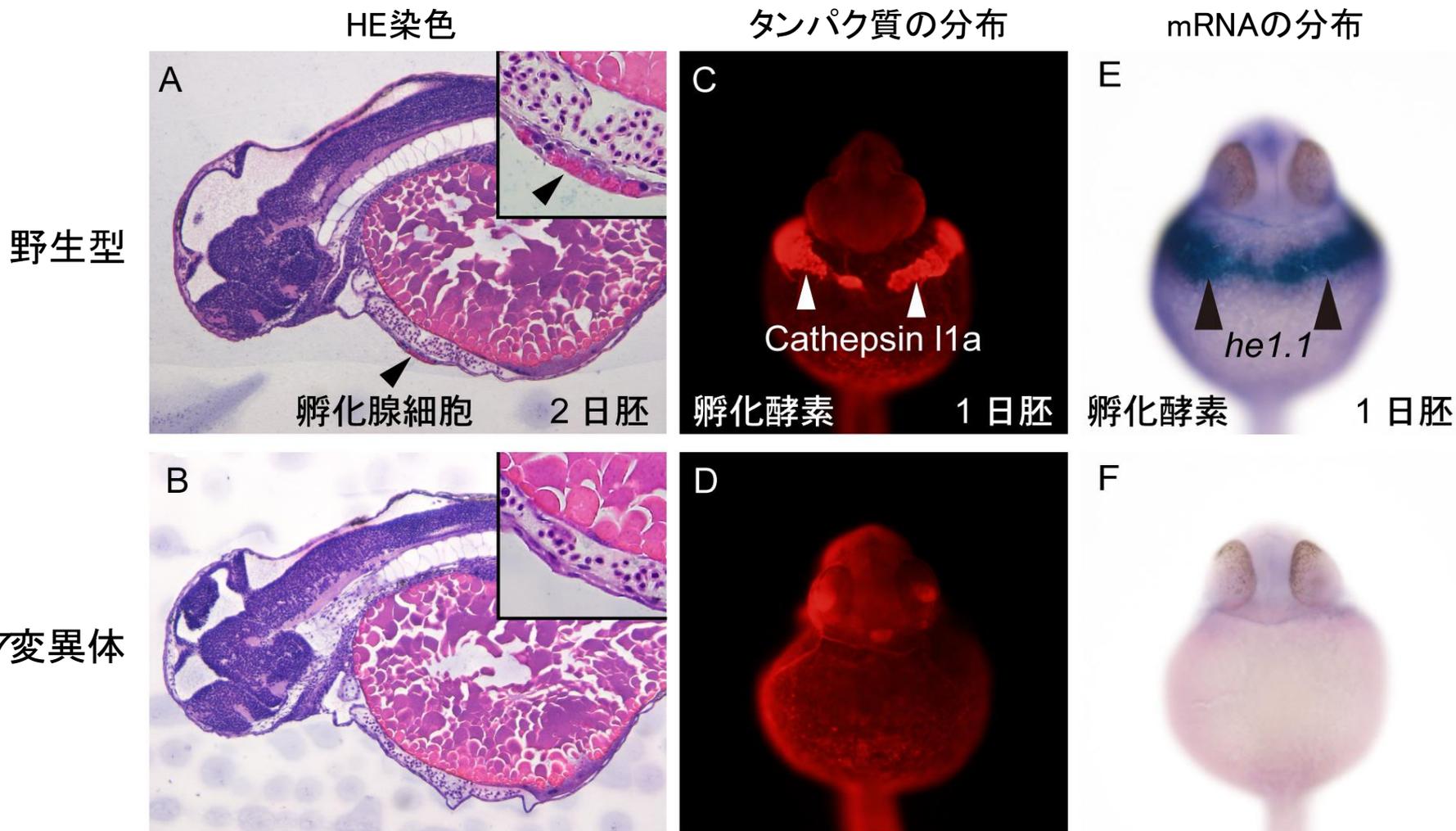


klf17遺伝子は、孵化腺に発現している

Suzuki H et al. *Scientific Reports* (2019)

*klf17*変異体は孵化腺細胞がない

*klf17*遺伝子を破壊したゼブラフィッシュは孵化腺細胞を欠失する



研究成果と想定される用途

*klf17*変異体は孵化できず卵膜の中で死滅する

魚類で*klf17*遺伝子を破壊すれば孵化不全となるのでは？

有害外来魚の個体数をコントロールすることに応用

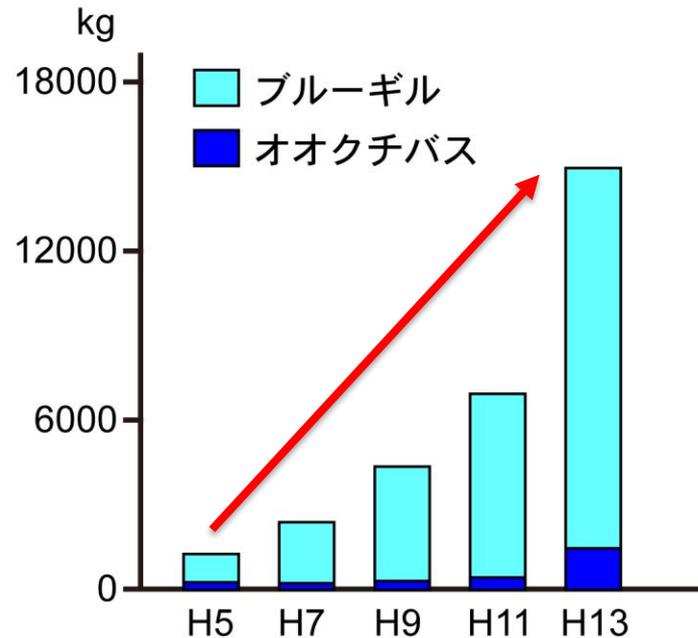
養殖魚の生育区域外での繁殖防止

	Score	Expect Method	Identities	Positives	Gaps	
	726 bits(1873)	0.0	Compositional matrix adjust.	341/386(88%)	362/386(93%)	5/386(1%)
ゼブラフィッシュ	29	RDWKVDIAKTNPRAGDVRPLIEVEFSIVESPPLAKDEDDLSKFLDLEF ILSNTVTSNDNDN			88	
コイ	3	+DWKVD KT GDVRPLIEVEFSIVESPPLA+DEDDLSKFLDLEF ILSN+ TSDNDN			62	
ゼブラフィッシュ	89	QDWKVDPTKTGATVGDVRPLIEVEFSIVESPPLARDEDDLSKFLDLEF ILSNSFTSDNDN			62	
ゼブラフィッシュ	89	TSA-PPPAYSLPESPECSSTVYDSDGCHPTPNAYCGTNFNSRPGHSLVAELFTPDMNYQG			147	
コイ	63	SA PPPAYSLPESPECSSTVYDSDGCHP+PNAYCGTNFN+RPGHSLVAELFTPDMNY G			122	
ゼブラフィッシュ	148	NSAQPPPAYSLPESPECSSTVYDSDGCHPSPNAYCGTNFNARPGHSLVAELFTPDMNYHG			122	
ゼブラフィッシュ	148	---EYNLKGHLDRLEYTELRLALNTRNQHLTNSNAGYKIKTENQEQSCMMVNDYMGHY			204	
コイ	123	EY+LKGHLDRLEYTELRLALN+RNQ H++NSNN GYKIK+EN EQSCMMVNDY GHY+			182	
ゼブラフィッシュ	205	DSHEYSLKGHLDRLEYTELRLALNSRNQAHVSNNSNVGYKIKSENHEQSCMMVNDYAGHYF			182	
ゼブラフィッシュ	205	AQEPQRMQ-HQTYGHHVQDVRDILGRKDCILTEMNTQHHIDISHQQQFINNAHFPPQ			263	
コイ	183	QEPQRMQ HQ YGHHVQDVRDILGRKDCILTE+N+ HH+DI+HQQQF+N+ FPPQ			242	
ゼブラフィッシュ	264	GQEPQRMQQHQAQYGHVQDVRDILGRKDCILTEVNSHHHVDIAHQQQFMNSEFPFPQ			242	
ゼブラフィッシュ	264	YAQHQQYHGHNMFSEPLRANHPAMPGVMLTPPSSPLLGFSPEDSKPKRGRRSWARKRT			323	
コイ	243	YAQHQ YHGH+NMFSEPLRANHP++PGVMLTPPSSPLLGF+PEDSKPKRGRRSWARKRT			302	
ゼブラフィッシュ	264	YAQHQQYHGHNMFSEPLRANHPSIPGVMLTPPSSPLLGFNPEDSKPKRGRRSWARKRT			302	
ゼブラフィッシュ	324	ATHSCEFPGCCKTYTKSSHLKAHMRTHTGEKPYHCSWEGCGWKFARSDDELTRHYRKHTGH			383	
コイ	303	ATHSCEFPGCCKTYTKSSHLKAHMRTHTGEKPYHCSWEGCGWKFARSDDELTRHYRKHTGH			362	
ゼブラフィッシュ	384	ATHSCEFPGCCKTYTKSSHLKAHMRTHTGEKPYHCSWEGCGWKFARSDDELTRHYRKHTGH			362	
ゼブラフィッシュ	384	RPFQCHLCERAFSRSDHLALHMKRHM	409			
コイ	363	RPFQCHLCERAFSRSDHLALHMKRHM	388			

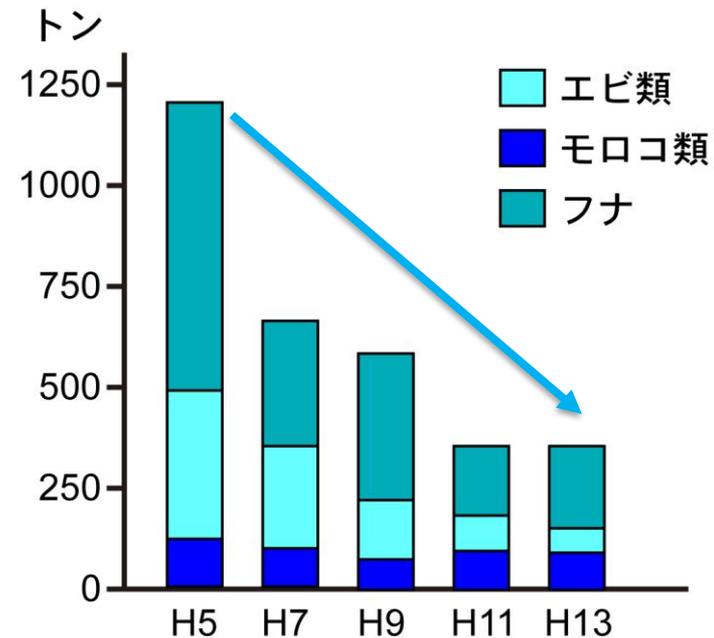
*klf17*遺伝子は魚類間で非常に相同性が高い

外来有害魚の問題

琵琶湖の定置網による外来魚漁獲量の推移



琵琶湖における重要魚介類の漁獲量の推移



滋賀県水産課の公表をもとに作図

有害外来魚が在来魚の卵・稚魚の捕食やエビなど餌の競合

外来有害魚の問題

朝日新聞(2010年12月15日)
クニマス絶滅していない さかなクンが一役

山梨日日新聞(2018年9月9日)
ブラックバス削減に転換 西湖漁協が方針

日本固有の魚クニマスが西湖で生き残っていたことが確認された。クニマスは秋田県田沢湖に生息する固有種だったが玉川の酸性の水が入り死滅した。以前クニマスの卵が西湖に放流された記録があり、その子孫をさかなクンがを見つけ、京都大学の中坊教授が解析を行い再発見となった。

西湖漁協が、肉食性の外来魚ブラックバスの漁業権を返上する方針を固めた。絶滅したとされながら再発見されたクニマスを保護するのが目的。返上後は産卵床の設置などブラックバス増殖への取り組みを中止し、削減する方向に転換する。2023年に控える免許更新の際に漁業権魚種から外す。



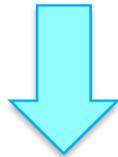
ヒメマス、クニマスの保護

従来技術とその問題点

漁協と共同で定置網による捕獲：琵琶湖

定置網で外来有害魚を捕獲する

網にかかる魚を選別できず在来種が捕獲される
体長1cm前後の稚魚は網にかからず、手作業の玉網すくいに頼っている



外来有害魚のみをゲノム編集で標的

電気ショッカーボートの導入：琵琶湖

電気ショックで外来有害魚を気絶させる
浮いてきた魚の中で外来魚を捕獲する
有効範囲は幅3m、深さ2m

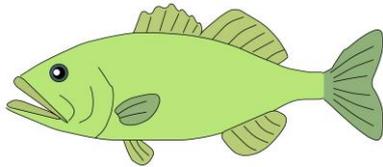
電気ショッカーボートの価格：600万円
職員4名で作業、有効範囲が狭い



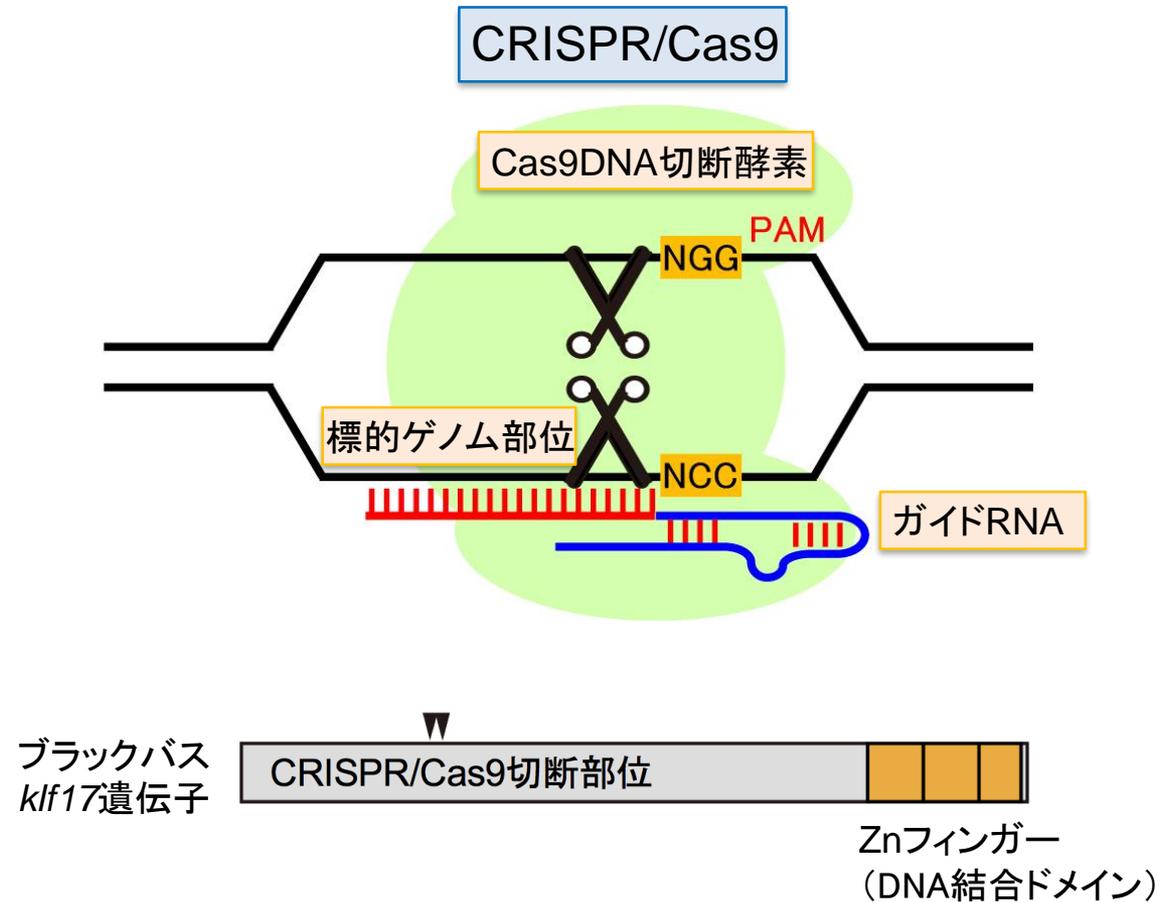
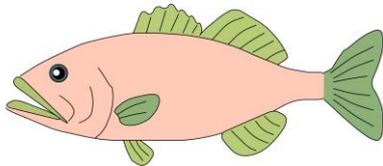
*klf17*変異体ブラックバスの交配が基盤

klf17ブラックバス変異体の作製

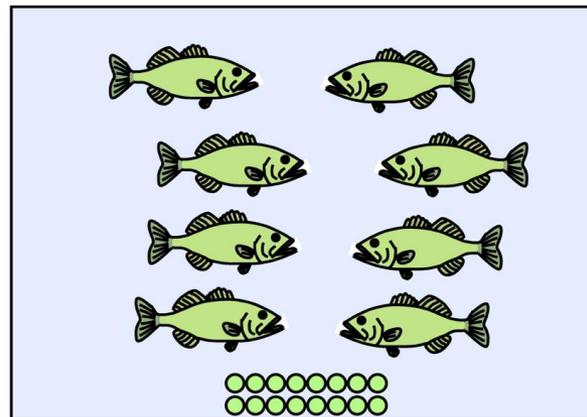
野生型



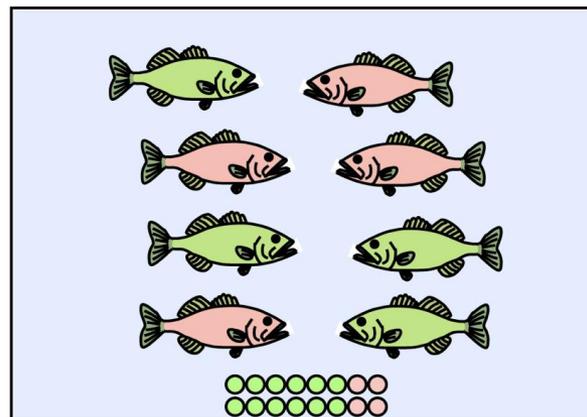
klf17変異体 ブラックバスを作製



klf17ブラックバス変異体の作製



klf17変異体(ヘテロ型)
の割合が増える



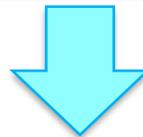
孵化不全の受精卵
klf17変異体(ホモ型)
の割合が増える

↓
個体数の減少

養殖魚に対する $klf17$ 変異体の作製

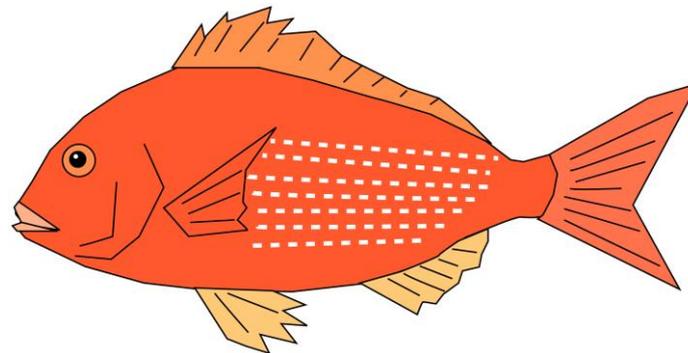
養殖魚の $klf17$ 遺伝子をゲノム編集技術で破壊する

$klf17$ 遺伝子を両方のアレルで破壊した養殖魚を成魚まで育てる



$klf17$ 遺伝子を両方のアレルで破壊した養殖魚の交配では孵化できる受精卵は生まれない

$klf17$ 変異体 マダイを作製(両方のアレルを破壊)



想定される用途

本研究の応用

湖沼などにおける有害外来魚の個体数をコントロールすることに応用が可能



*klf17*遺伝子を破壊したブラックバスを作製し湖沼に放流する→この遺伝子座が次世代に伝播する過程でブラックバスだけの個体数を減らすことができる

養殖魚の生育区域外での繁殖防止



*klf17*遺伝子を両方のアレルで破壊した養殖魚を育てる

実用化に向けた課題

外来有害魚の受精卵にゲノム編集を行う技術を確立する

*klf17*遺伝子を破壊した魚において孵化腺細胞が形成されないことを確認する

*klf17*遺伝子を両方のアレルで破壊した魚が成魚となるか、生殖が可能かを確認する



生殖細胞の形成に重要な遺伝子の破壊との併用による協調作用が期待できる

知的財産権と問い合わせ先

発明の名称: klf17遺伝子が欠損した魚類乃至両生類、
その製造方法、及び魚類乃至両生類の繁殖制御方法

出番番号: 特願 2019-018132

出願者: 山梨大学

発明者: 川原敦雄

問い合わせ先

山梨大学 研究推進・社会連携機構

社会連携・知財管理センター

TEL: 055-220-8759 FAX: 055-220-8757

e-mail: renkei-as@yamanashi.ac.jp