



令和元年7月31日

ノックアウトウニの成体の作出に成功！

【本研究成果のポイント】

- CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集により、ウニにおける高効率なゲノム編集法を確立しました。
- 色素合成に関与するポリケチド合成酵素をコードする *Pks1* 遺伝子をノックアウトし、これを研究室内の環境で飼育することにより、アルビノ表現型を示すノックアウトウニの成体の作出に成功しました。

【概要】

広島大学大学院統合生命科学研究科 数理生命科学プログラムの坂本尚昭准教授と同大学大学院博士課程後期学生劉大明らの研究グループは、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により、ノックアウトウニの成体の作出に成功しました。

バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) (図1) は、日本に広く分布しているウニであり、発生生物学の研究においても用いられる動物です。本研究では、バフンウニの幼生の色素合成に重要なポリケチド合成酵素をコードする *Pks1* 遺伝子を標的とし、CRISPR-Cas9 システム (図2) による遺伝子ノックアウト (注1) を行いました。その結果、変異導入効率 100% の高効率な変異導入に成功し、すべてのノックアウト胚が色素をもたないアルビノ表現型を示すプルテウス幼生へと発生しました。また、このプルテウス幼生をさらに飼育し続けたところ、色素合成以外は正常に発生し、変態後には真っ白なアルビノウニへと成長しました。これは、ゲノム編集によって生まれた世界初のノックアウトウニの成体です。

本研究の成果は 2019 年 7 月 29 日付で日本発生生物学会の機関誌「Development Growth & Differentiation」のウェブサイトにて先行公開されました。

《論文情報》

掲載雑誌 : Development Growth and Differentiation

論文タイトル : Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system.

著 者 : Daming Liu*, Akinori Awazu, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Naoaki Sakamoto# (*筆頭著者、#責任著者)

DOI 番号 : 10.1111/dgd.12624

【背景】

ウニの発生は高校の生物学の教科書でも紹介されており、ウニの分類学的位置づけがヒトに近いことから、ウニは発生学の研究のモデル生物として扱われてきました。

また、遺伝子ノックダウン（注2）の手法も確立されていることから、現在でも初期発生をつかさどる遺伝子を解析するための実験動物として使われています。我々の研究グループは、日本国内では食材として知られ、研究材料としてもよく使われるバフンウニ（*Hemicentrotus pulcherrimus*）を用いて、初期発生の分子機構の解析を行ってきました。

ウニの発生では、16細胞期の大割球に由来する細胞から色素細胞が形成され、色素細胞はプルテウス幼生の表層にある外胚葉に埋め込まれます。そのためプルテウス幼生では、赤い色素をもつ色素細胞が表層に観察されます（図3）。一方、プルテウス幼生の体内には一対の体腔のうが作られますが、左側の体腔のうのみが成体原基（ウニ原基）となり、変態を経て成体のウニになります（図4）。

ウニの発生に関わる遺伝子の機能解析を行うためには、モルフォリノアンチセンスオリゴ（MASO）を用いた遺伝子ノックダウンが行われてきました（注3）。しかし、MASOの効果は長時間持続できず、またウニ胚を成体まで飼育するのは難しいため、後期発生から変態後の成体までの遺伝子の解析には利用できませんでした。

近年のゲノム編集技術の発展により、さまざまな生物での遺伝子可変が可能となりました。ゲノム編集技術では、部位特異的DNA切断酵素を細胞に導入し、目的の遺伝子座に導入されたDNA二重鎖切断が修復される過程で、その部位の塩基配列が改変されます。これまでに、Zinc-Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)、CRISPR-Cas9といった部位特異的DNA切断酵素が開発されてきました。

ウニでも、Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator Like Effector (TALEN)による遺伝子改変が可能なのがバフンウニを用いた研究において示されていました。また、CRISPR-Cas9による遺伝子改変が可能とも、近縁種のアメリカムラサキウニ（*Strongylocentrotus purpuratus*）で示されていました。本研究では、バフンウニを用いてCRISPR-Cas9システムによるゲノム編集を行い、バフンウニにおける高効率な遺伝子改変技術の確立を目指しました。

【研究成果の内容】

CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集により、ウニの受精卵を用いて、幼生の色素合成に必要な *Pks1* 遺伝子を標的とした遺伝子ノックアウトを行いました。アメリカムラサキウニを用いた研究では、この遺伝子を標的としたMASOによる遺伝子ノックダウンやゲノム編集により色素をもたないアルビノ表現型の幼生を生じることが示されていました。我々はバフンウニに3種類のsgRNA（#1～#3）を導入し、sgRNA#2と#3で変異の導入が可能であることを明らかにしました。さらに、sgRNA#2によるゲノム編集では100%の変異導入効率の実現され、解析したすべての *Pks1* 遺伝子で欠失/挿入変異が起きていました。また、sgRNA#2を導入されたすべてのプルテウス幼生がまったく色素をもたないアルビノ表現型を示しました。

我々は、このアルビノ表現型を示すプルテウス幼生をさらに培養しました。その結果、*Pks1* ノックアウト幼生は、色素合成以外は正常に発生・成長し、受精から約55日後に正常に変態しました。この変態後の稚ウニをさらに培養したところ、*Pks1* ノックアウト個体はまったく色素をもたない真っ白なアルビノウニへと成長し、少なくとも1年は生存しました（図5）。すべてサンプリングに用いたため、現在はアルビノの成体はいませんが、次の実験によるノックアウト幼生が育ちつつあります。この結果は、*Pks1* が幼生の色素合成に関与するだけでなく、成体のウニの色素合成にも関与することを示しています。自然界でもアルビノのウニが発見されることはありま

すが、これらも Pks1 遺伝子に突然変異をもっている可能性が考えられます。

本研究においては、変態後の稚ウニの飼育方法が重要な鍵となりました。我々はさまざまな試行錯誤の結果、研究室内で牡蠣の殻の表面で付着珪藻を培養する方法を確立し、これをエサとすることで、海から遠く離れた広島大学東広島キャンパスでもウニを成体まで育てることが可能となりました。

2018年7月の西日本豪雨災害により広島県の沿岸部でも多くの被害が出ており、海水の入手が一時困難となりましたが、このノックアウトウニは無事に成長することができました。

【今後の展開】

CRISPR-Cas9 システムを利用した高効率なゲノム編集により、遺伝子ノックアウトされた成体ウニの確立に初めて成功しました。今後、この CRISPR-Cas9 システムを使って、ウニの後期発生～成体までの形づくりのメカニズムを解明していきたいと思います。また、養殖業等における品種改良にも容易に利用できるよう、ゲノム編集のさらなる効率化を目指したいと思います。

【参考資料】



図1 バフンウニ

バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) は、日本に広く分布しており、国内における発生学の研究材料としても使われます。

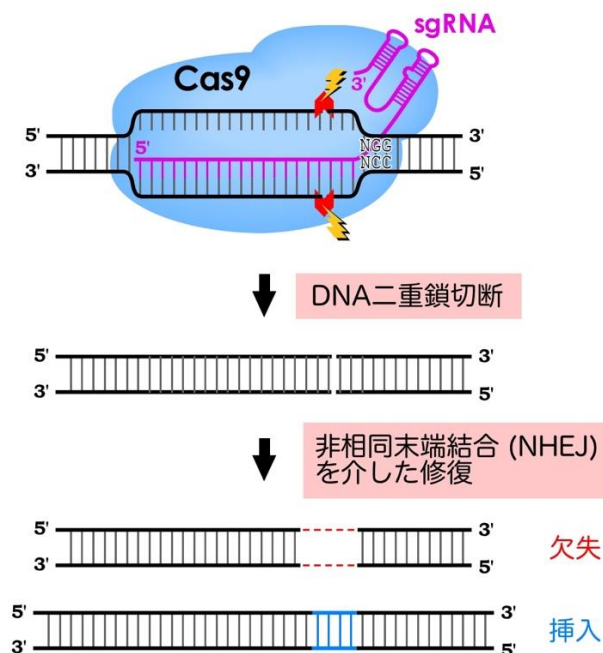


図2 CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集

CRISPR-Cas9 システムでは、ガイド RNA (sgRNA) と Cas9 ヌクレアーゼを細胞に導入すると、sgRNA が Cas9 ヌクレアーゼを相補的な塩基配列をもつ標的部位へと先導し、Cas9 ヌクレアーゼが標的部位に DNA 二重鎖切断を導入します。この切断部位が修復される過程で、欠失／挿入などの変異が導入されます。



図3 ウニの初期発生

ウニの発生は1つの細胞である受精卵からスタートします。16細胞期には中割球・大割球・小割球の3層の割球が形成され、大割球に由来する部分（オレンジ色）が二次間充織細胞（SMC）となり、SMC に由来する色素細胞がプルテウス幼生の外胚葉に埋め込まれ、赤い色素を合成します。

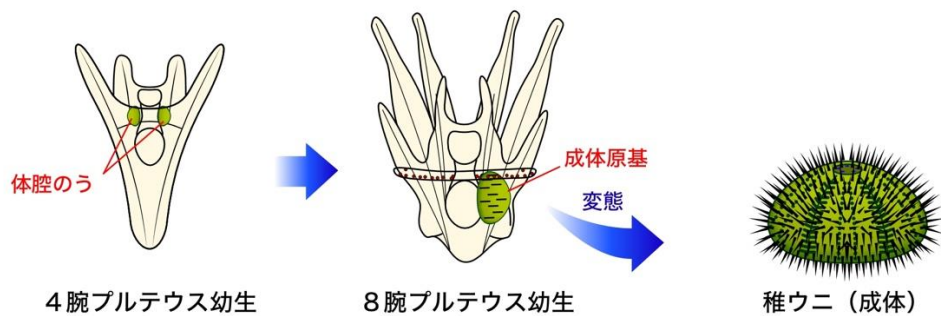


図4 ウニの後期発生

プルテウス幼生の原腸先端部に一対の体腔のうが作られます。8腕プルテウス幼生期には、左側の体腔のうから成体原基（ウニ原基）が形成され、これが成長して成体のウニが形作られていきます。そして変態を経て、左右相称なプルテウス幼生は、五放射相称な成体のウニになります。

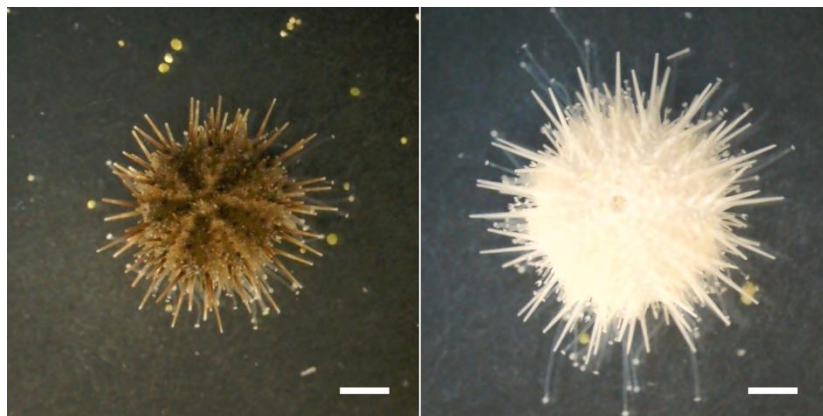


図5 Pks1 ノックアウト成体ウニ

Cas9 ヌクレアーゼのみを導入されたウニ(左)と、Cas9 ヌクレアーゼと sgRNA#2 を共導入されたウニ(右)。受精後5ヶ月の写真で、スケールバーは2 mmを示している。

【用語解説】

注1. 遺伝子ノックアウト

遺伝子(DNA)の塩基配列を改変し、遺伝子そのものを破壊する研究手法。

注2. 遺伝子ノックダウン

遺伝子(DNA)の塩基配列を変化させることなく、特定の遺伝子の発現を抑制する研究手法。

注3. モルフォリノアンチセンスオリゴ(MASO)

DNA や RNA といった核酸と類似した構造をもつ化合物であり、分子の骨格構造が違うものの、核酸と同様に塩基をもつことができます。遺伝子の mRNA と特異的に結合する MASO をウニ胚に導入することによって、目的の遺伝子の発現を特異的に阻害することができます。

【お問い合わせ先】

大学院統合生命科学研究科 数理生命科学プログラム 准教授 坂本尚昭 Tel : 082-424-7447 FAX : 082-424-7327 E-mail : naosaka@hiroshima-u.ac.jp

発信枚数：A4版 5枚(本票含む)