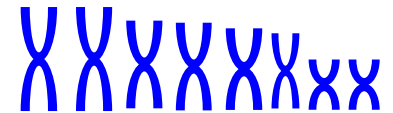


突然変異とゲノム編集

遺伝子 → DNA

ゲノム → 染色体の一組
遺伝子の総体
「生命の設計図」



ゲノム編集：DNAの一部に変更を加える

⇔ 突然変異：DNAの一部の違い（変異）

自然突然変異：紫外線、環境放射線など



人為突然変異：放射線、薬剤など
遺伝子にランダムに変異

農作物の育種に
利用されている

ゲノム編集
狙った遺伝子に変異

様々な生物で
育種への利用が
検討されている

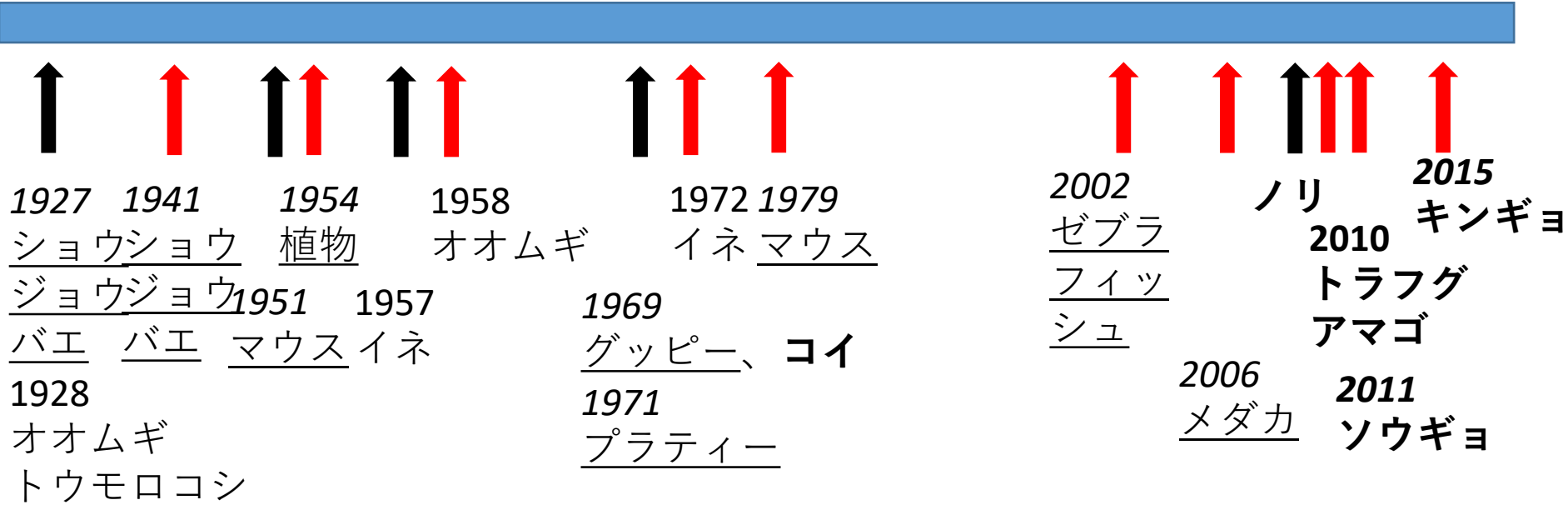
農水産物の突然変異研究



ガンマ
フィールド
茨城、Est. 1961

突然変異誘発 1927
 子嚢菌抵抗性 1942
 多収性 1947
 ウイルス抵抗性 1961
 早熟成分 1962
 細菌抵抗性 1971
 虫害抵抗性 1980

増肉性 2011
 成長



放射線 ↑
 薬剤 ↑
 下線：実験生物

水産物で産業利用されているものはない（研究開発段階）

突然変異育種とは

- 放射線照射や化学変異剤などで、人為的に遺伝的変異を誘発させ、有用形質を持つものを選抜する育種法

農業では、世界で1928年頃、国内で1950年頃から開始

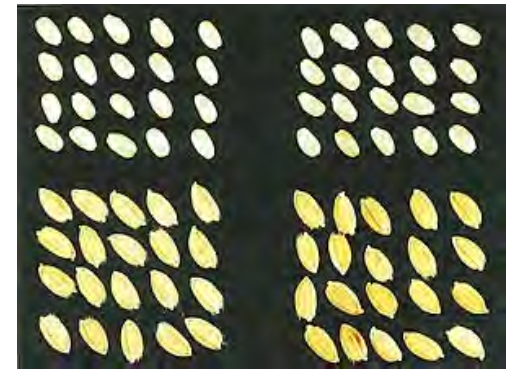
パキスタンの綿、ベトナムの稲、チェコの大麦、日本の低アミロース米（H10年品種登録）等

→ 外来遺伝子は含まず、遺伝子組換えとは異なる

畜産・水産分野ではごくわずか

多数の後代（卵）がとれる生物で効果的

→ 養殖魚に適している(数百から数万の卵／尾)

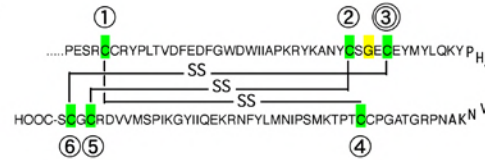
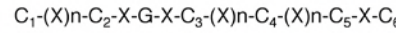
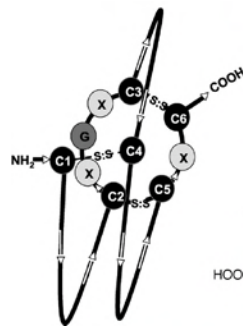


左：低アミロース米、
右：コシヒカリ

社団法人農林水産技術情報協会
ホームページより

2002年に 新たな方法(TILLING)が魚類で開発された。

Myostatin (GDF8)



Double –muscle

Developmental Biology 359 (2011) 82–94



ELSEVIER

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect)

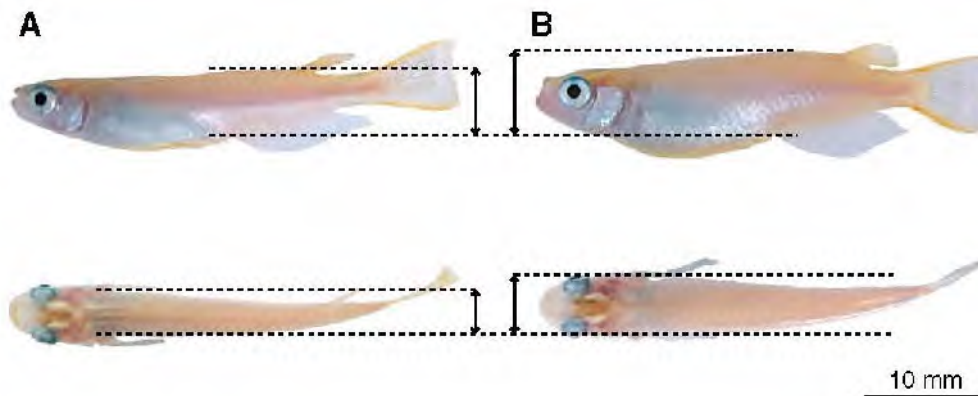
Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/developmentalbiology

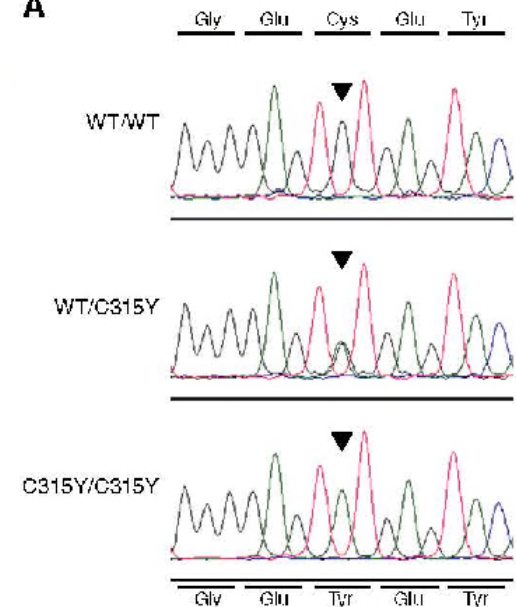


Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development

Shin-ichi Chisada ^{a,*}, Hiroyuki Okamoto ^b, Yoshihito Taniguchi ^{c,1}, Yoshitaka Kimori ^d, Atsushi Toyoda ^{c,2}, Yoshiyuki Sakaki ^{c,3}, Shunichi Takeda ^c, Yasutoshi Yoshiura ^{a,*}



A

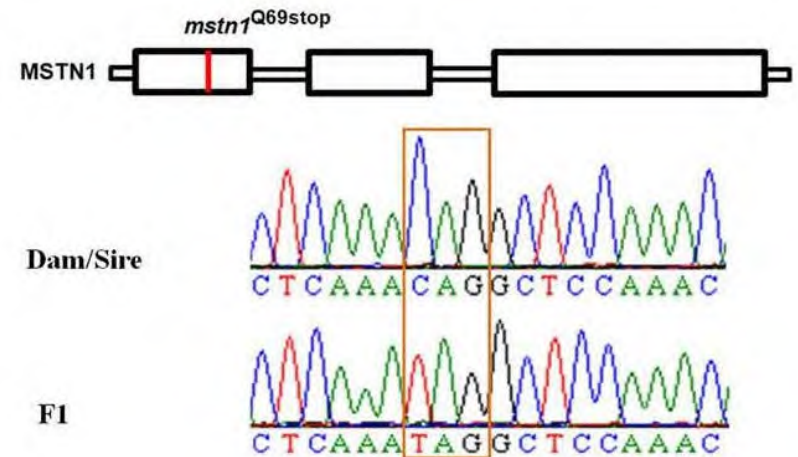
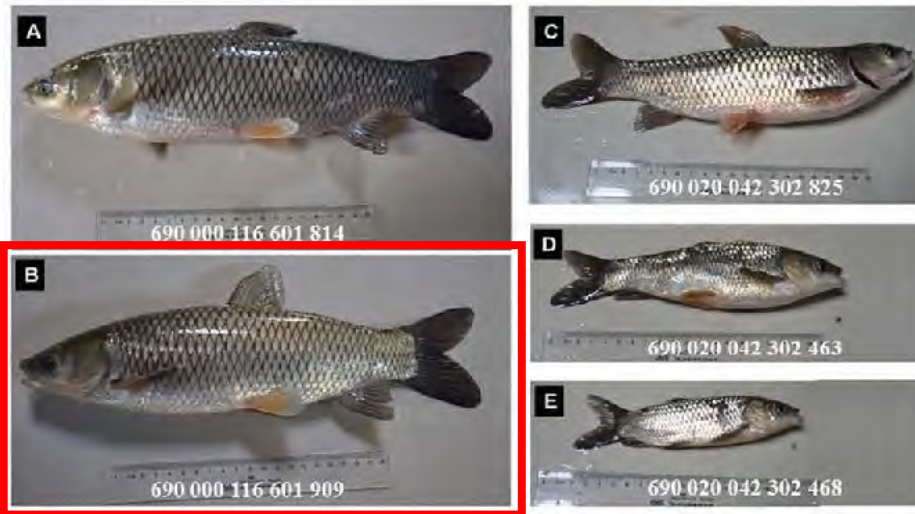


ENU-Induced Mutagenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Treating Mature Sperm

Xia-Yun Jiang, Cheng-Fei Sun, Quan-Gen Zhang, Shu-Ming Zou*

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Shanghai Ocean University, Shanghai, China

Citation: Jiang X-Y, Sun C-F, Zhang Q-G, Zou S-M (2011) ENU-Induced Mutagenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Treating Mature Sperm. PLoS ONE 6(10): e26475. doi:10.1371/journal.pone.0026475



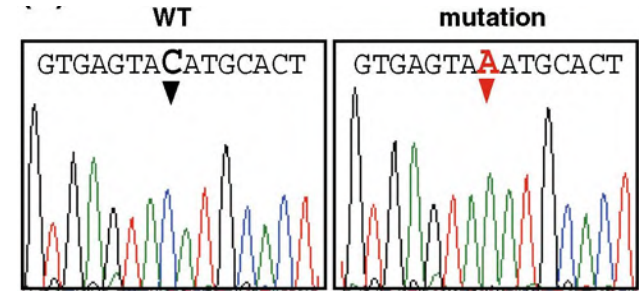


METHODOLOGY ARTICLE

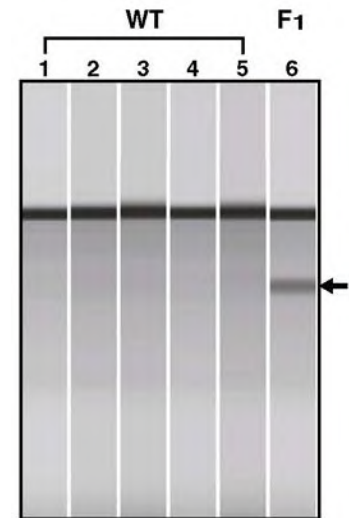
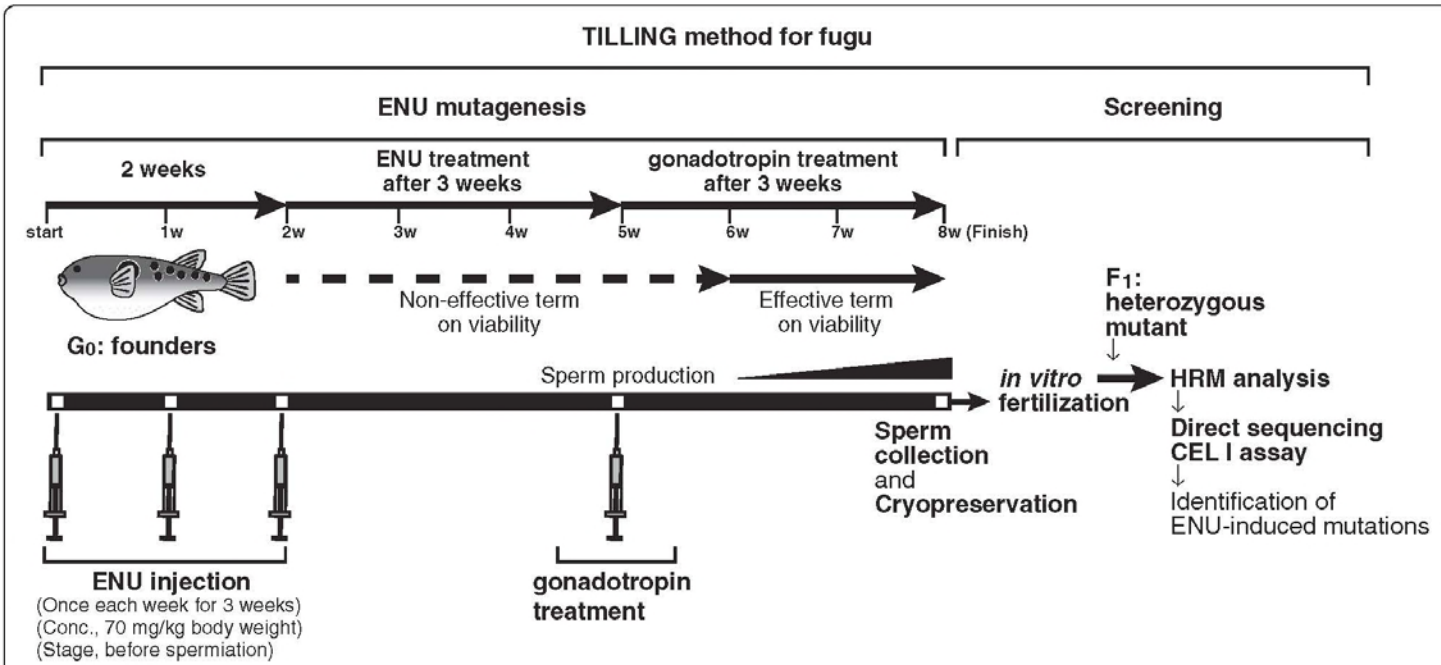
Open Access

New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: establishment of TILLING method in fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis

Miwa Kuroyanagi¹, Takashi Katayama², Tadashi Imai², Yoshitisa Yamamoto², Shir-ichi Chisada³, Yasuzoshi Yoshitane⁴, Tomokazu Ushijima¹, Tomonao Matsushita¹, Masashi Fujita¹, Aoi Nozawa¹, Yuzuru Suzuki¹, Kiyoshi Kikuchi^{1*} and Hiroyuki Okamoto^{5**}



QPFMEVKISEGPRRVRRDLGLDCDENSPESRCCRYPLTVDFEDFGW
 APKRYKANYCSGECCEYMLHQKYPHTHLVNVKANPRGTAGPCCPTPKM
 MLYFNQEQQIIYGKIPSMVVDRCGCL



Cel I assay

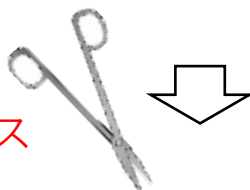
ゲノム編集のしくみ

ゲノム編集：クリスパーキャス

性質に関わる遺伝子



クリスパー・キャス



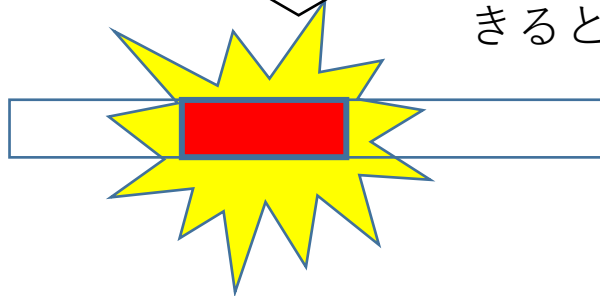
任意の場所で切断

切断された遺伝子



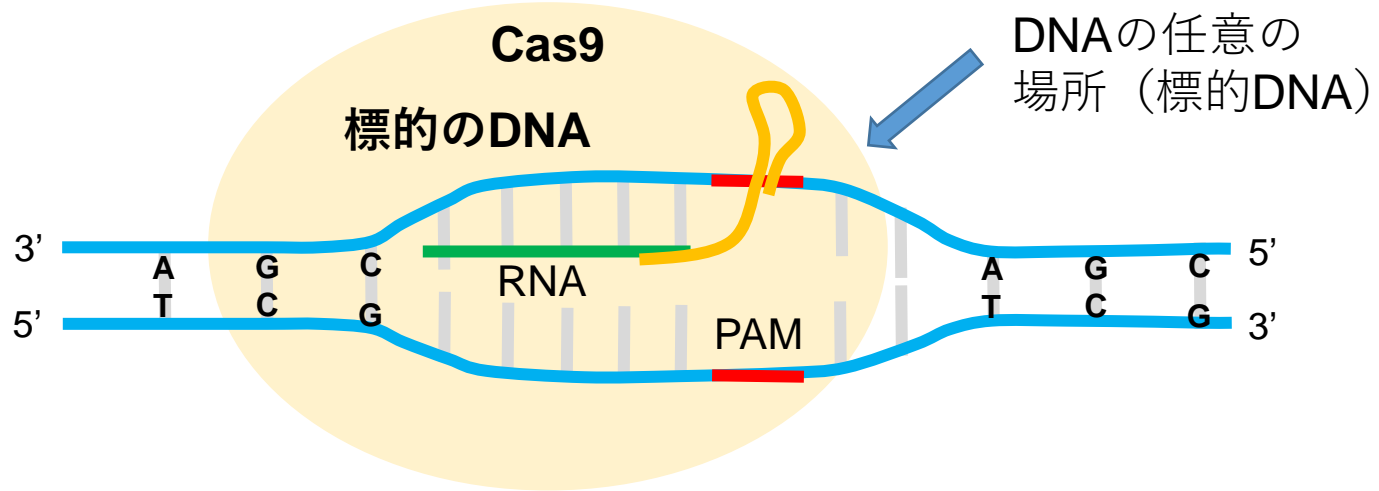
自然修復のときにミスが起
きると、、

働きが変わった遺伝子



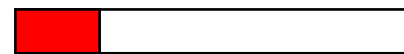
筋肉量、色、成熟などの遺伝子の働きを変えることができる

→ 有用な遺伝子の働きを調べたり、育種への利用が考えられている

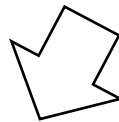


切断

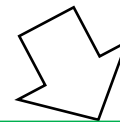
DNA (遺伝子)



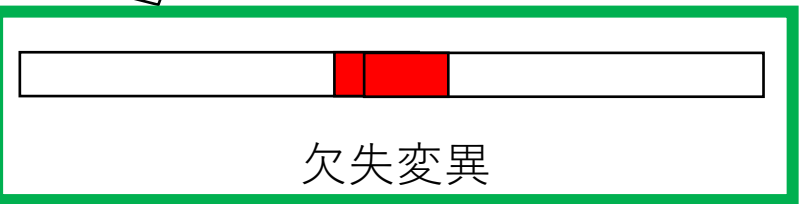
自己修復



自己修復のエラー



変異なし



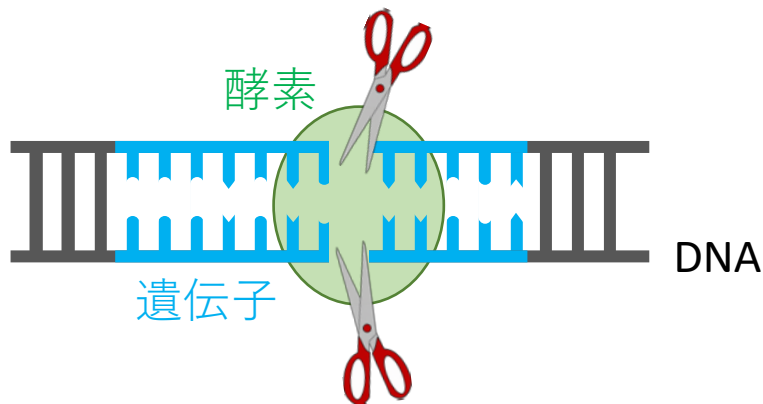
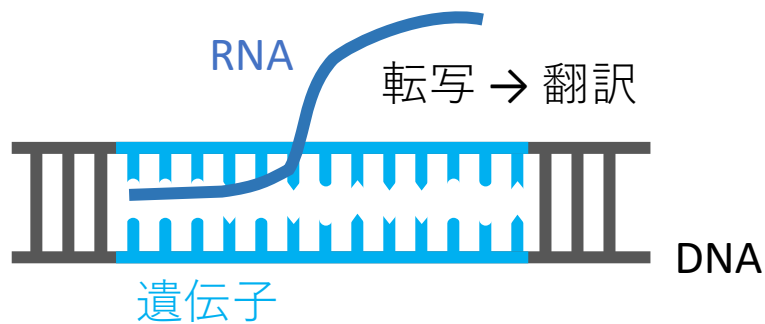
欠失変異

有用形質を持つ個体! ?

クリスパー・キャスの標的DNAの切断

DNAとRNAがくっついたところが切断。修復のエラーによって欠失変異がおきる

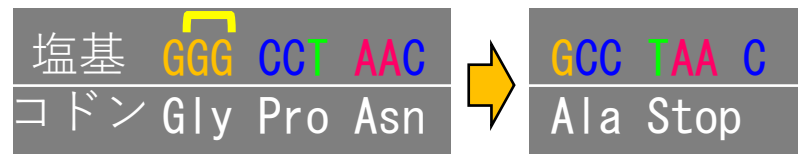
編集によるタンパクの変化



遺伝子が欠損・正常に転写されない



例：塩基が2つ欠損



- ・合成停止信号に変わる
- ・アミノ酸が変わる
- ・タンパクの立体構造が変わる

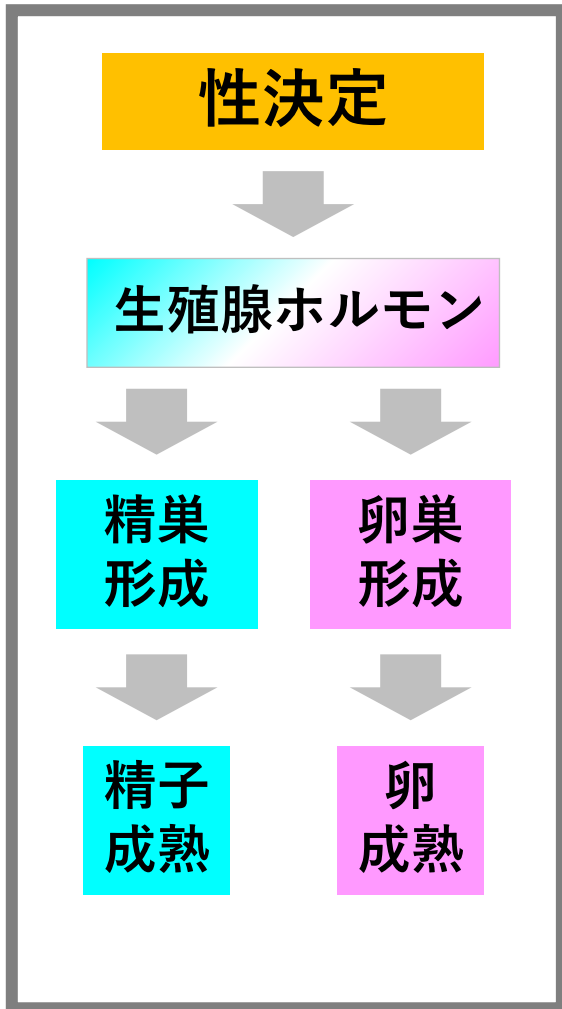
DNAの変異（編集）がタンパクの変異へ
⇒ 性質の変化

目的の変異を持つ個体を選別

魚のゲノム編集

例：魚を不妊化させる：外来魚の駆除

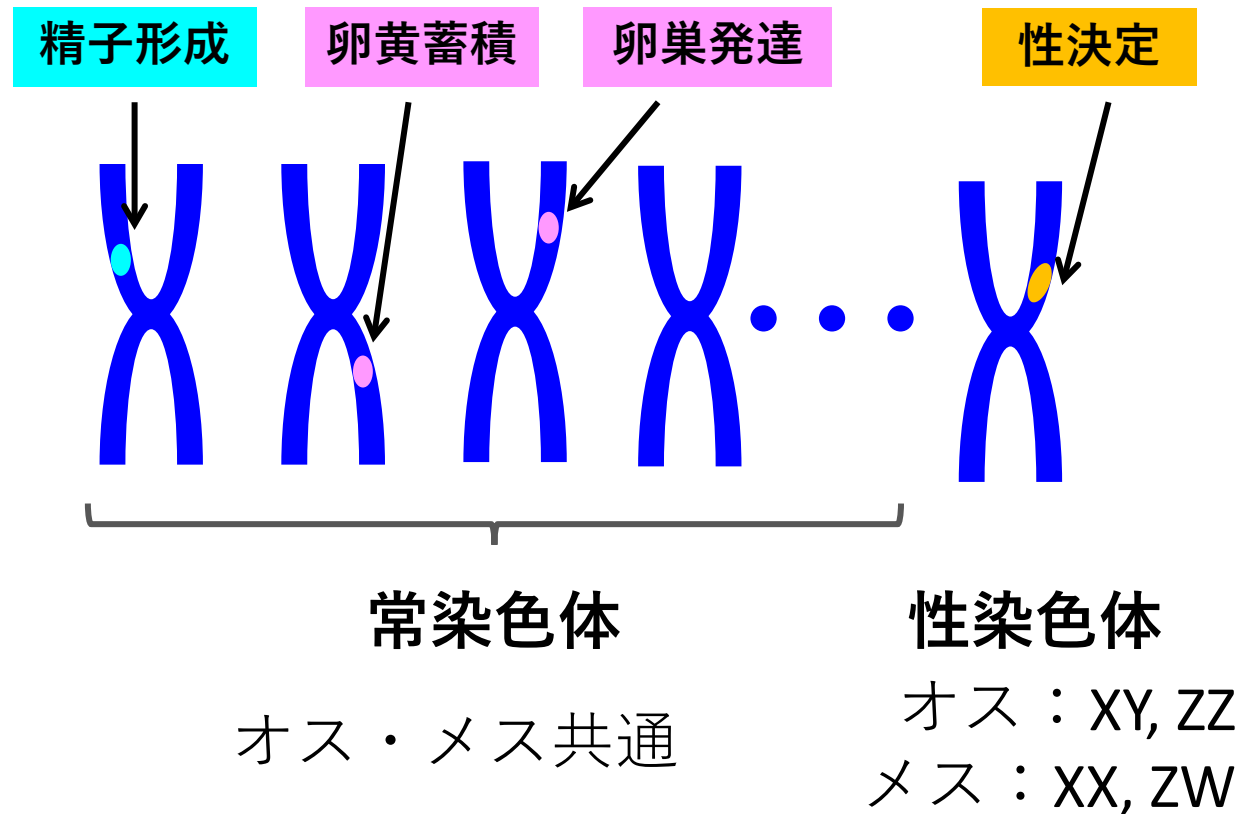
精子・卵形成

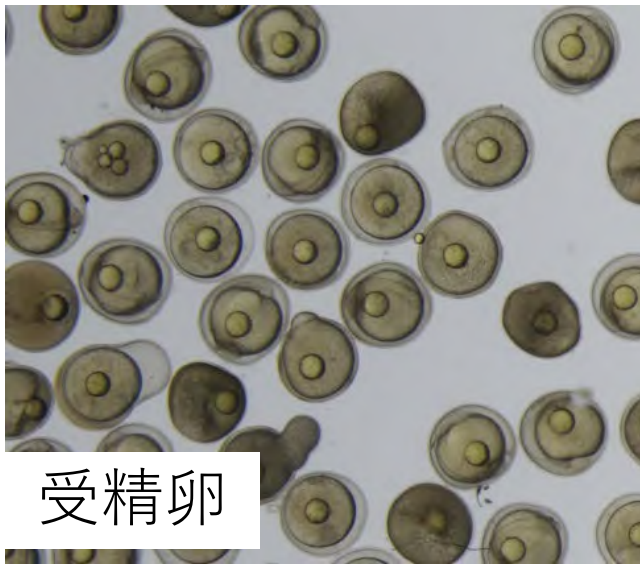


卵や精子の形成に働く
遺伝子を編集

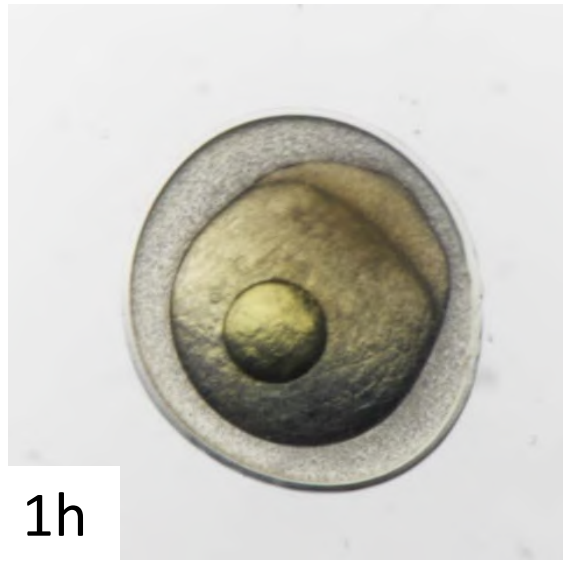


卵や精子が形成
できなくなる

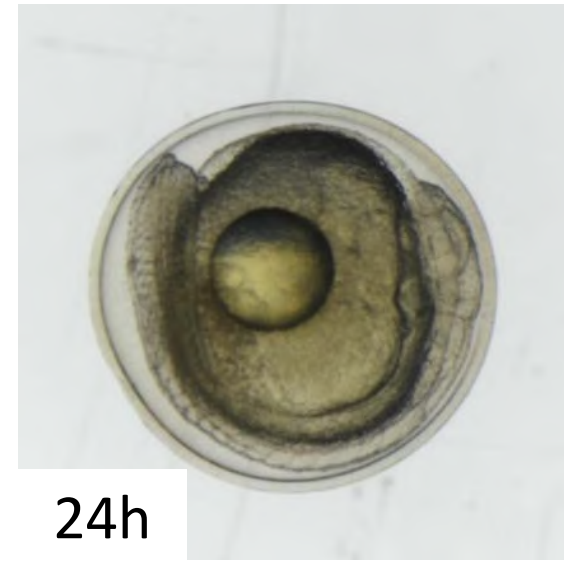




受精卵



1h



24h



ふ化(38h)



2日



1日



4日

ブルーギルの発生 (水温26°C)

例：ブルーギルのゲノム編集

卵を作れなくする？

卵巣の発達や卵成熟に関わる遺伝子



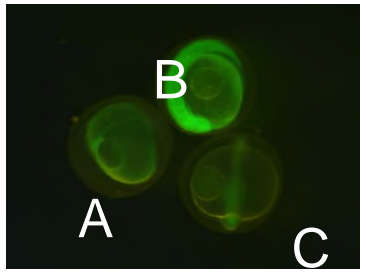
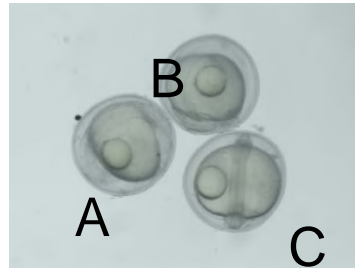
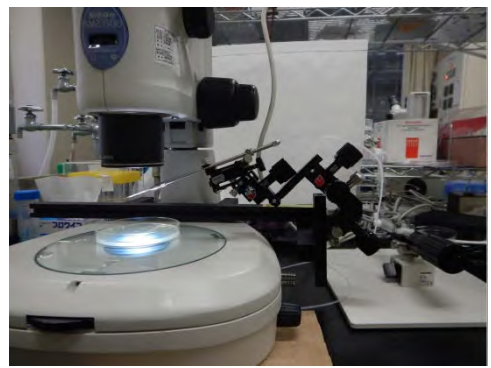
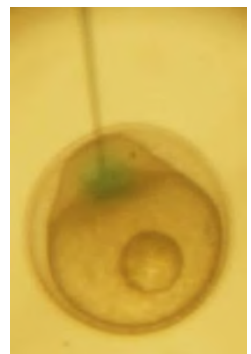
機能を抑える

1) 目的遺伝子用のRNAの設計

野生型	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
遺伝子編集	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	CGGGC -	- - - - -	A GG	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT
	TGGG CCGGCT	CCTCTTT -GG	GTTCGCTCTTT	CTCCTTGGT

遺伝子の編集を確認

2) クリッパーキャスの顕微注入



編集時期のイメージ図

3) 選抜と交配：編集モザイク

⇒ 編集ヘテロ ⇒ 編集ホモ

編集モザイク
F0世代

編集ヘテロ
F1世代

編集ホモ
F2世代

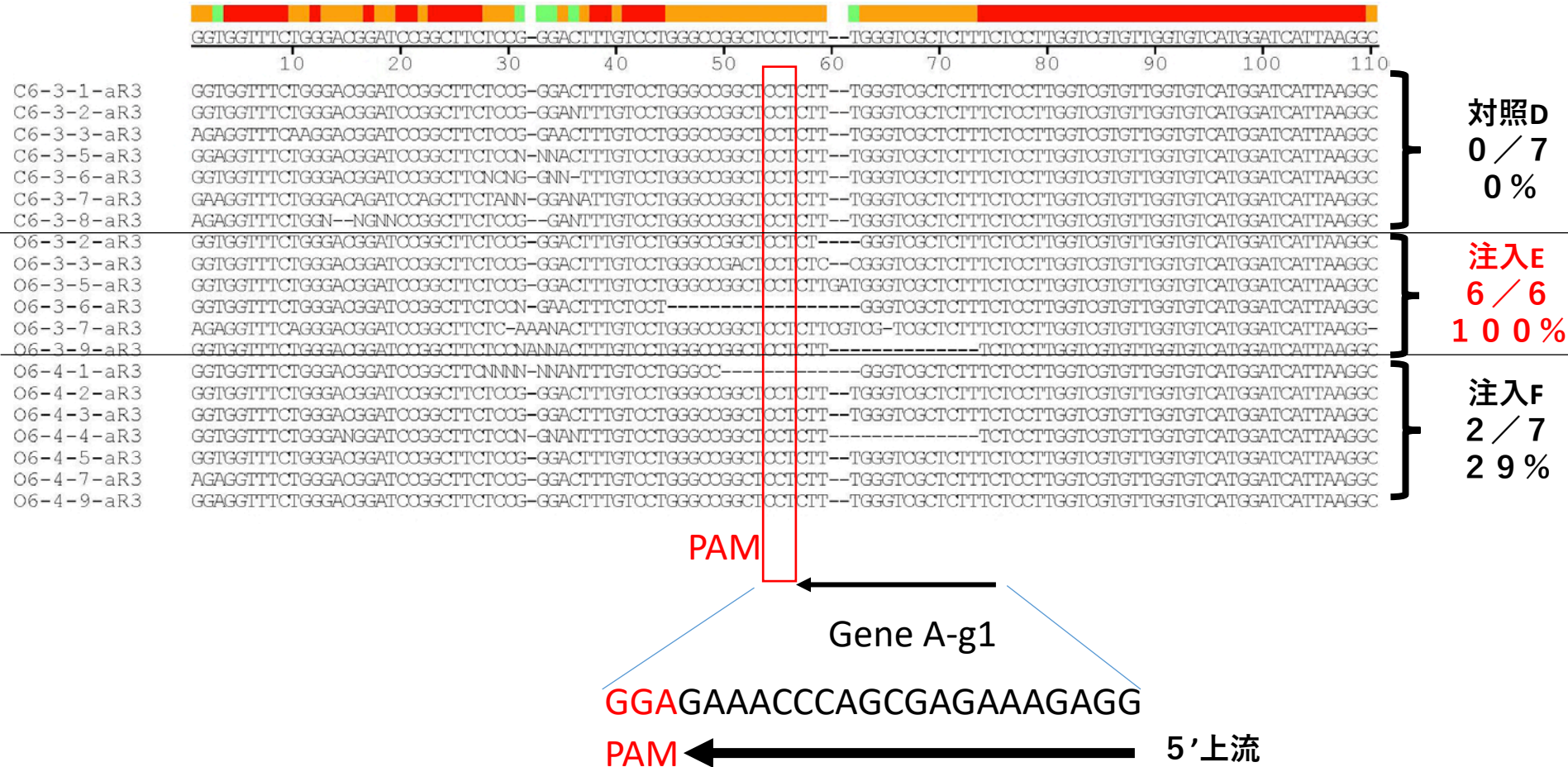


編集ヘテロ：
野生型と編集型

編集ホモ：
編集型のみ

例：ブルーギルF0の個体内の変異導入

個体あたりの
変異／非変異

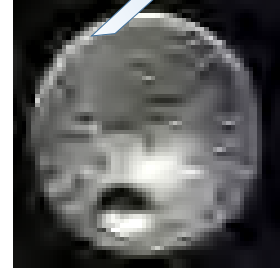


編集導入世代F0は、様々な変異が一個体に混じっている

例：ブリのゲノム編集

受精卵に顕微注入

約3000粒に顕微注入



ふ化前の生存率

77.4 ± 15.9 % (平均 ± SD) : 胚軸形成時



ふ化後6週齢の生存率

84尾が生残： 注入した卵の 2.5%

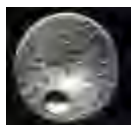


注入区の魚の変異の確認を行った

採卵



クリスパー
キャス注入



注入なし



クリスパーキャス
注入



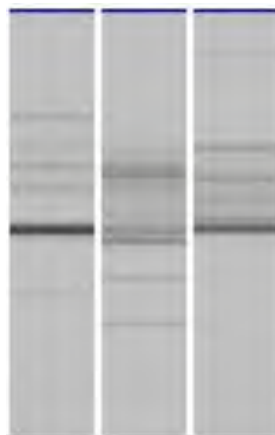
DNA採取



変異の確認



変異なし



変異あり

Heteroduplex Mobility Assay (HMA)

	ゲノム編集		個体数
	+	-	
クリスパー キャス注入区	56 (68.3%)	26	82
未注入区	0	36	36

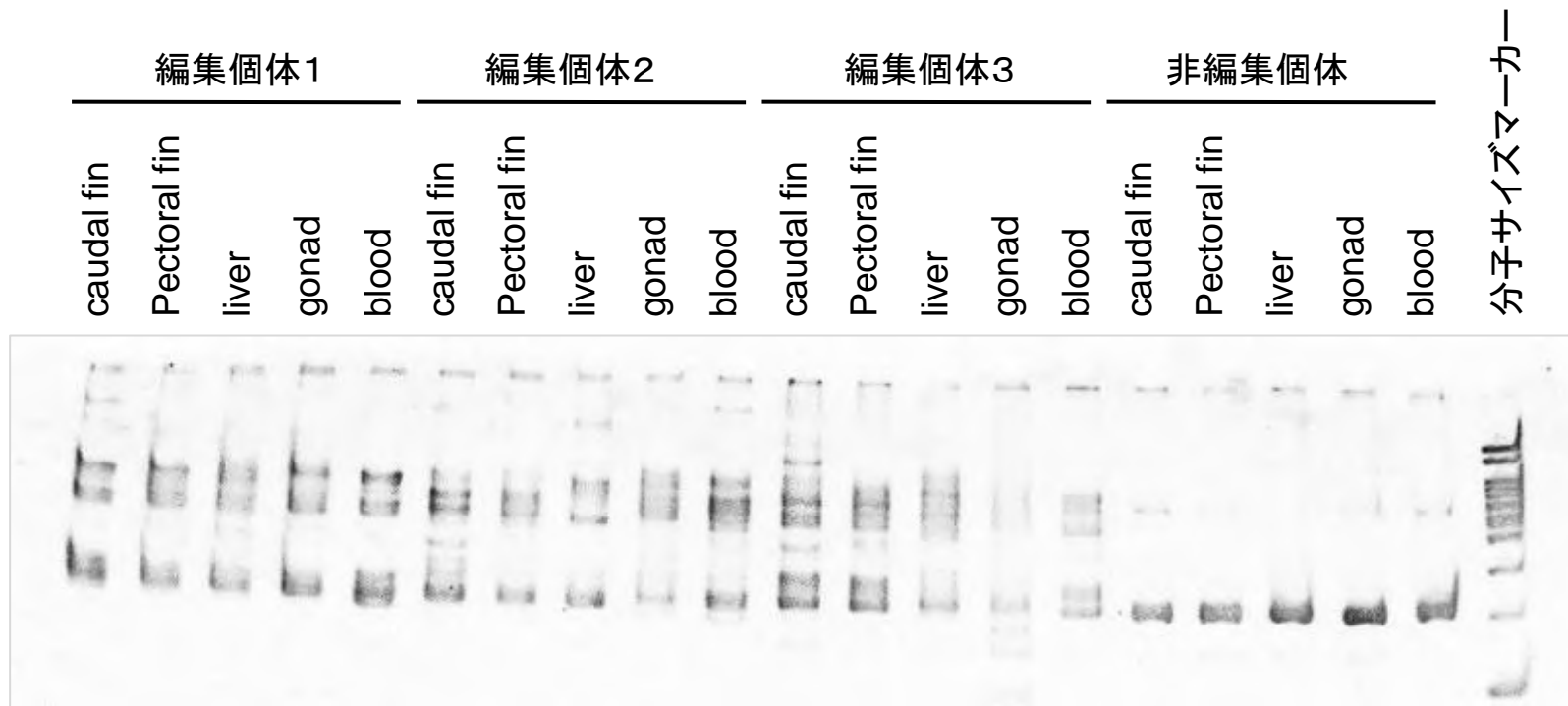
ゲノム編集個体の確認

- ・ 個体ごとに、変異の入り方が違う
- ・ 細胞ごとに、変異の入り方が違う



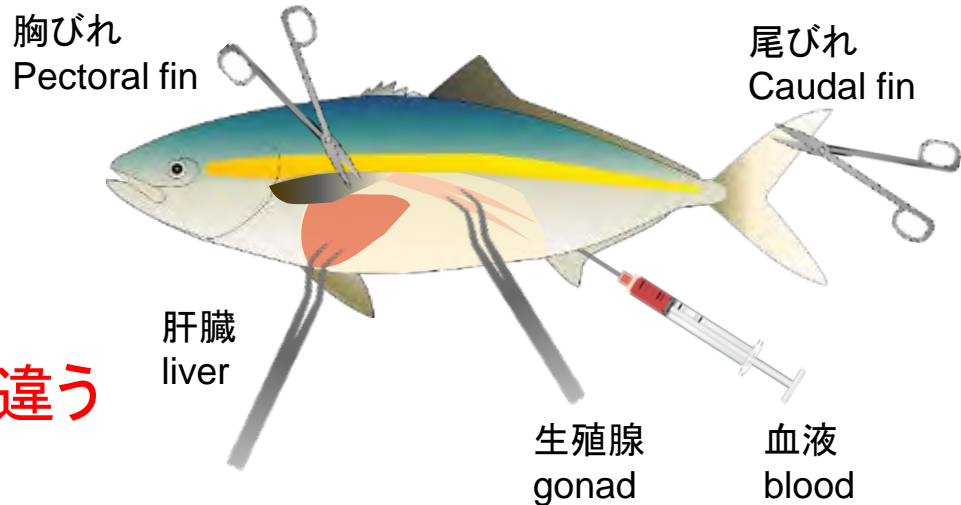
一種類の変異に、そろえる必要がある

臓器別の編集の確認

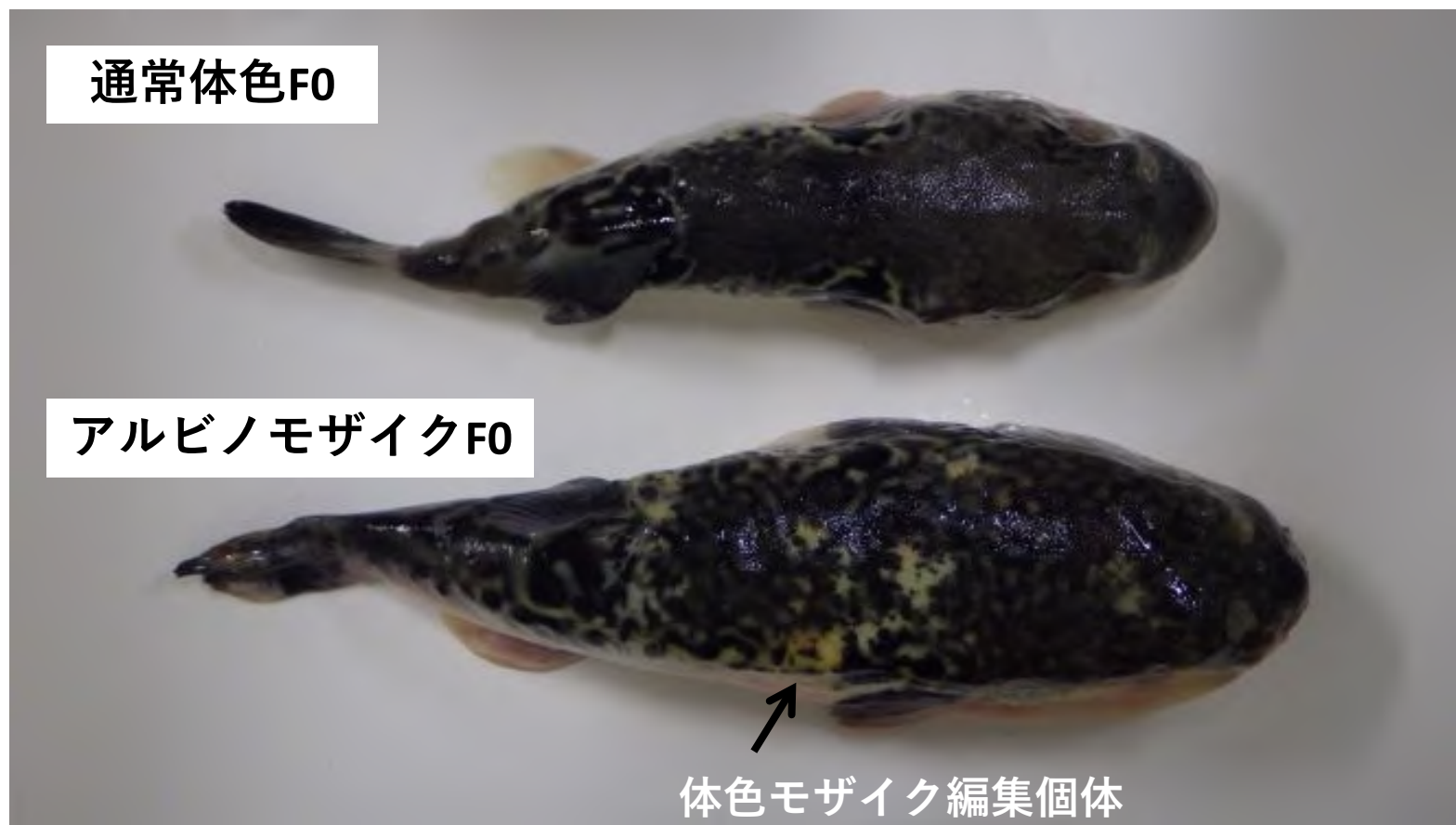


どの組織においても
編集を確認

但し、変異の入り方は細胞ごとに違う
(モザイク変異)



例：フグの例 ゲノム編集 F0（編集モザイク）



編集導入世代F0は、様々な変異が一個体に混じっている

例：アマゴ卵の薬剤突然変異モザイクの遺伝

変異導入個体 (モザイクアルビノ)

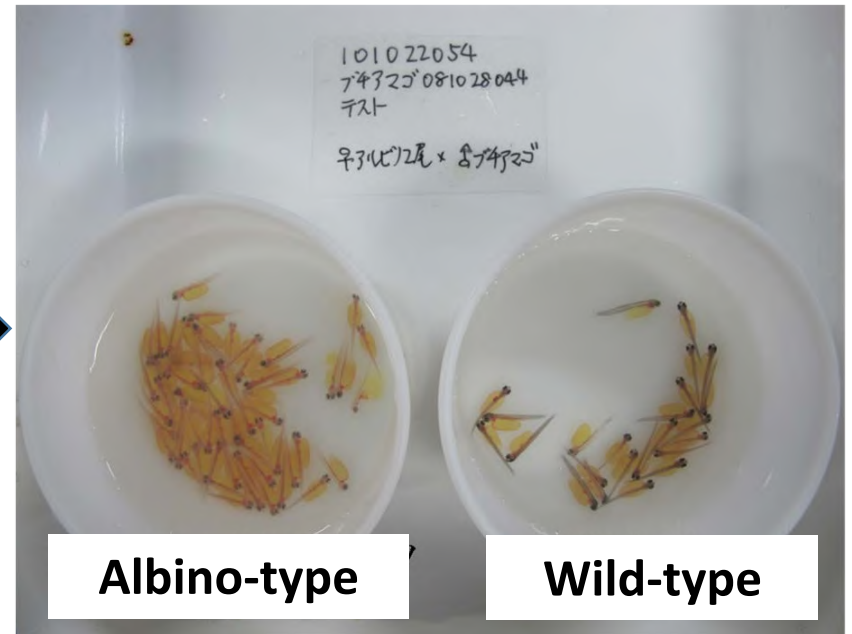


薬剤による
突然変異導入率
 $1/869 = 0.0012$

モザイク変異導入♂
X
アルビノ♀

アルビノ : 野生型 = 59 : 26

次世代F1は変異ヘテロとなる
モザイクにならない



魚のゲノム編集 まとめ

- 魚のゲノム編集は、受精卵にクリスパーキャスを顕微注入することが一般的
- ゲノム編集の難しさ（生存性、編集効率など）は、魚種によって異なる
- ゲノム編集導入世代（F0）には、個体ごとに、また細胞ごとに様々な編集変異が入っている
- 編集変異を系統（品種）として安定化するには、選抜と交配を何度か繰り返す必要がある
- 突然変異の導入に比べて、目的の遺伝子に効率的に変異を与えることができる
- 魚の場合、系統化されていない魚種（野生集団）を対象とする場合もある