

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	岸 本 謙 太
論文題目	Application of genome editing to marine aquaculture as a new breeding technology (ゲノム編集技術を用いた海産養殖魚の品種改良法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>水産魚の育種は作物や家畜と比較して歴史が浅く、有用品種の作出が遅れている。近年、水産養殖の拡大に伴い、特色ある品種作出(育種)の重要性が指摘され、育種を加速させる技術開発が求められている。古典的な選抜育種法では、有用形質の出現は不確実であるため、迅速な育種が困難である。また、外来遺伝子導入による遺伝子組替え技術を用いた育種法では、明瞭な形質の付与を可能にする迅速な育種が期待できるが、消費者は組換え生物に対して食材としての安全性を不安視し、広く受け入れられていない。近年、外来DNA導入に依存せず、正確かつ迅速に標的遺伝子の機能を欠損させることが可能なゲノム編集技術が開発され、農林水産業への応用が期待されている。魚類においても当技術の開発が行われ、逆遺伝学的解析が行われてきた。しかし、従来、魚類に対するゲノム編集はモデル生物であるメダカ等の淡水魚を対象としたものであり、本研究以前は海産養殖魚ではゲノム編集を用いた育種の実施例はなかった。本研究論文はマダイ <i>Pagrus major</i> およびトラフグ <i>Takifugu rubripes</i> にゲノム編集技術を用いて、特定の狙った形質を迅速かつ正確に発現させる品種改良法の開発、および有用品種の作出を目指したもので以下のように要約される。</p>			
1. 海産養殖魚へのゲノム編集はこれまで行われていないため、ゲノム編集ツール導入法であるマイクロインジェクション (MI) 法の開発を行った。高生残率かつ多量の卵に処理可能な手法を確立するために、MI時の(1)卵の浸漬溶液、(2)授精後の経過時間、(3)採卵後の経過時間の最適化を検討した。その結果、マダイでは浸漬溶液に細胞培養液 Leibovitz's L-15溶液または生理食塩水の岩松溶液を用い、10分間隔で人工授精を繰り返し、採卵後150分までの処理を行うことで高生残率を得た。トラフグでは浸漬溶液に岩松溶液または希釈海水を用い、15分間隔で人工授精を繰り返し、採卵後 150分までの処理が最適であることを明らかにした。これらの知見を基にゲノム編集魚を作出するために十分量である約6000粒/日の卵に処理可能な手法を確立した。			
2. 骨格筋の肥大抑制因子ミオスタチン遺伝子 ( <i>mstn</i> ) をゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 によってマダイにおいて機能欠損を行い、可食部が増大した骨格筋肥大品種の作出を試みた。まず始めに、効率的に標的遺伝子を欠損させるために、マイクロホモロジー媒介修復による変異誘発の利用による1世代交配法を考案した。2014年春季にマダイ受精卵に上記の条件でゲノム編集を行い、生殖細胞で高率に変異を有する第1世代を選抜した。その後、第2世代を取得し、塩基配列解析によってミオスタチン欠損マダイ( <i>mstn</i> <sup>-/-</sup> ) 個体をスクリーニングした。 <i>mstn</i> <sup>-/-</sup> は通常個体と比較して、高肥満度および骨格筋量増大を呈するが、椎体が小さいことにより体長が短くなることを明らかにした。 <i>mstn</i> <sup>-/-</sup> は通常個体と比較して、骨格筋の断面図は34%増大し、骨格筋体積は16%増大しているため、ミオスタチン欠損マダイ品種は計画通りの可食部増加形質が付与されたことが示された。			
3. マダイと同様にミオスタチン欠損トラフグの作出を試みた。2015年春季に受精卵に対してゲノム編集を行い、マダイと同様の手法で 2018年に第2世代の <i>mstn</i> <sup>-/-</sup> 個			

体を作成した。マダイのミオスタチン欠損品種と同様に、*mstn*<sup>-/-</sup>個体は通常個体と比較して、高肥満度および骨格筋量増大を呈すること、椎体が小さくなることにより体長が短くなることを明らかにした。*mstn*<sup>-/-</sup>個体は通常個体と比較して、骨格筋の断面図は20-32%増大しているため、ミオスタチン欠損トラフグ品種は計画通りの可食部増加形質を付与されたことが示された。

以上のように、本研究により、ゲノム編集技術を用いると、わずか2世代 (マダイ: 2年、トラフグ: 3年) で期待した有用形質を示す品種を作成可能であることが初めて示された。通常の変種育種では不確実な要素を含むため、目的品種の作成は最低でも5世代 (マダイ: 10年、トラフグ15年) 以上必要とされているため、本技術による海産養殖魚の育種は大幅な時間短縮が期待される。また、古典的な変種育種とは異なり、偶然に頼らない計画的な育種が可能である。本研究で作成した骨格筋肥大品種は高肉産生であるため、歩留まり(1尾あたりの可食部割合)が向上している。つまり、骨格筋肥大品種は生産者及び消費者に利点があり、商業価値が高い。また、本研究で解明されたように、他の動物(哺乳類、魚類)では*mstn*欠損個体は椎体肥大に伴う体長の増加が報告されている一方、マダイ、トラフグでは椎体が小さくなることに伴い体長が減少することが明らかとなった。本研究による技術開発によって、マダイやトラフグといった海産養殖魚でも逆遺伝学的解析が可能になるため、本技術は育種だけでなく非モデル生物である海産養殖魚の遺伝子の機能の解明にも大きく貢献するものである。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

水産魚の迅速な育種法の開発が求められており、外来DNA導入に依存せず、正確かつ迅速に標的遺伝子の機能を欠損させることが可能なゲノム編集技術の応用が期待されている。しかし、これまでの魚類に対するゲノム編集技術はモデル生物であるメダカ等の淡水魚を対象としたものがほとんどであり、海産養殖魚への応用例はほとんどなかった。本論文は、海産養殖魚の重要魚種であるマダイ、トラフグ受精卵に対するゲノム編集ツール導入法であるマイクロインジェクション法を確立し、さらにゲノム編集技術を用いて、特定の狙った形質を迅速かつ正確に発現させる魚類の品種改良が可能であることを示したものである。成果として評価できる点は以下の通りである。

1. マダイ、トラフグに対してマイクロインジェクション時の卵の浸漬溶液、授精後の経過時間、採卵後の経過時間の最適化を行い、海水より生理食塩水・希釈海水が受精卵浸漬溶液として適していることを示した。さらに受精後10-15分以内、採卵後150分までの処理を行うことで高効率と高生存率を得ることができることを明らかにした。これらの知見を基にゲノム編集魚の作出のために十分量である約6000粒/日の卵に処理可能な手法を確立した。

2. マダイおよびトラフグにおいてCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により骨格筋の肥大抑制因子ミオスタチン遺伝子 (*mstn*) の機能欠損を行い、生殖細胞で高率に変異を有する第1世代を選抜した。第2世代においてミオスタチン欠損個体 (*mstn*<sup>-/-</sup>) を得ている (マダイ: 2年、トラフグ: 3年)。 *mstn*<sup>-/-</sup> 個体は通常個体と比較して、骨格筋の断面図が 20-34%増大しており、両魚種において目的の形質を発現させることに成功している。本研究により、ゲノム編集技術を用い、わずか2世代で海産養殖魚に期待した有用形質を示す品種を作出可能であることが初めて示された。

以上のように、本論文の成果はゲノム編集技術を用い特定の形質を海産養殖魚に迅速かつ正確に発現させることが可能であることを示し、海洋生物機能学、海洋増殖学、魚類育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)