テクニカルノート

TILLING法によるレプチン受容体KO メダカの作製

黒川 忠英¹、谷口 善仁²、吉浦 康寿³(¹水研セ東北水研、²京大院医、³水研セ養殖研)

E-mail: kurokawa@fra.affrc.go.jp

はじめに

遺伝子の機能解析の手段の一つとして、マウスでは目的の遺伝子をノックアウト (KO) する手法が確立されている。しかし、魚類においてはES細胞が確立されていないため、マウスと同じ手法による遺伝子KO法は確立されていない。現在、魚類において遺伝子KOを行う手法としては、Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) 法と Zinc Finger Nucleases (ZFN) 法がある。ZFN法は、任意の位置でDNAをdouble strand breakするDNA結合タンパク質であるZFNを利用して、目的の位置でDNAが切断されるように設計したZFNをコードするmRNAを受精卵にマイクロインジェクションする手法である。ZFN法の魚類への応用は、2008年にゼブラフィッシュで初めて報告されたばかりで、その報告例もまだ多くない¹⁾。しかし、ZFN法はすでに商業ベースで受託販売が始まっている (SIGMA-ALDRICH 1セット約300万円程度)。一方、TILLING法は、ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) を雄に投与して精子に高頻度に変異を誘発させ、その子孫の精子とゲノムをセットでライブラリー化し、その中から目的の遺伝子にKO変異が入っている精子をスクリーニングするものである²⁾。

本稿では、TILLING法により食欲抑制ホルモンとして知られるレプチンの受容体 (LEPR) 遺伝子KOメダカの作製を試みたので、それについて紹介する。この、LEPR KOメダカの作製は、生研センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「突然変

異育種法を利用した養殖魚の効率的な新品種作出技術の開発」(http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/marumoto/inv_up/press080829/14yoshiura.htm) の一環として実施しているものである。本プロジェクトでは、遺伝子組換え (TG) 作物は食品としては社会的コンセンサスが得られていない現状にあるため、遺伝子組換えを伴わないTILLING法を利用した新しい養殖魚の育種技術の開発を目的としている。TILLING法は、もとは植物で開発された突然変異を利用した品種改良技術で、その生物のゲノムに存在しなかった遺伝子を持ち込まないため、作製品種はTG生物とは異なり農業分野で広く受け入れられている。本手法は技術的には動物にも応用できるが、産仔数の少ないほ乳類では困難である。しかし、魚類では産卵数も多いため応用可能と考えられ、本プロジェクトではトラフグなどの重要養殖対象種に応用可能な技術開発を目標としている。

TILLING法によるメダカミュータントライブラリーの作製

スクリーニング用メダカミュータントライブラリーの作製の概要を、図1に示した。メダカCab系統の約100匹の雄成魚 (G0) を3mMのENU溶液に3回 (1週間おき) 暴露し、1ヶ月後から未処理 (wt) 雌と交配し、約25,000個の受精卵 (F1) を得た。二次性徴に達した5,771のF1雄の精巢を摘出し、6本のキャピラリーに分け凍結保存し「精子ライブラリー」とした。同時に魚体からゲノムDNAを抽出して30本 (1.2μg/tube) に分注し

図1 メダカ変異体ライブラリーの作製

て、「ゲノムDNAライブラリー」とし、両セットでミュータントライブラリーとしている。

ライブラリーの質は、特定遺伝子座交配試験 (specific locus test: SLT) により検証されている。ENU 処理した G0 雄と tyrosinase 遺伝子 (約 1.6kb のコード領域を含む) を欠損したアルビノ系統である HeinoK との交配で、

1,358 胚から 5 胚がアルビノ性を示した。その結果から 435kb のコード領域あたり 1 つの機能欠損変異が入る計算となった。

LEPR KO メダカのスクリーニング

この実験系では、1 回のスクリーニングで約 6000 サンプルのシーケンスが必要となるため、最も費用がかかるのはシーケンス費用である。そのため、スクリーニングに際していくつかのポイントとなる条件がある。機能欠損変異を目指す場合には、できるだけ開始コドン寄りの領域で終止コドンに変異することが望ましい。また、イントロンが短くエクソンがままとまっている領域を選択する方が効率が良い。LEPR 遺伝子の変異体のスクリーニングに際しては、まず leptin-binding domain 内にシーケンス領域を設定した (図 2)。今回のスクリーニングでは、1 回目のシーケンスで 10 種類のアミノ酸置換を伴う変異が同定され、運良くそのうちの 하나가システインが終止コドンに変異した機能欠損変異であった。そこで、その凍結精子と wt 卵とを受精し、F2 を得た。この F2 世代では 50 % がヘテロ個体と予想されるので、シーケンスによりヘテロ個体を確認した。さらにヘテロと

図2 レプチン受容体 KO メダカの作製

確認されたF2の雄と雌を交配し、F3世代で機能欠損変異のホモ化を行った。ただし、この状態では目的以外の遺伝子にも多数の変異が入っていることが予想されるため、実験魚としては不完全と考えられる。そこで、再びwtと交配し、目的以外の遺伝子の変異の確率を下げる必要がある。通常、wtと3世代交配後にホモ化することが必要とされているので、現在LEPR KOメダカもwtとの交配を続けている。まだ個体数が少ないのではっきりした解析はできていないが、予想されたとおり食欲旺盛で成長がよい傾向が見られている。

運悪く1回目のスクリーニングで希望する変異が見つからなかった場合には、別の領域をシーケンスせねばならず、2倍の費用がかかることになる。これまで実績では、2回のスクリーニングで目的の変異が得られる確率は70%程度である。今のところ、TILLING法にしてもZFN法にしても、お金と幸運が必要な実験系であることには違いないのが現状ではある。しかし、ライブラリーのスクリーニングコスト低減のために、高解像度融解曲線解析 (High Resolution Melting analysis:

HRM解析) によるスクリーニングシステムの構築を本プロジェクトで実施している。これが完成すれば、1回のスクリーニングが10万円以下に抑えることが可能になると考えている。そうなれば、TILLING法による変異体あるいは品種の作製は、手間やコスト面からもより現実的なものになるであろう。

文 献

- 1) Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND & Wolfe SA, 2008. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, **26**, 650-651.
- 2) Taniguchi Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH, Cuppen E, 2006. Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. *Genome Biol*, **7**, R116.