

4-1703

遺伝子制圧技術による外来魚の根絶のための実証魚の開発



Fshb 欠損ホモ
編集ブルーギル

国立研究開発法人 水産研究・教育機構

共同実施機関：三重大学、いであ株式会社



国立研究開発法人
水産研究・教育機構

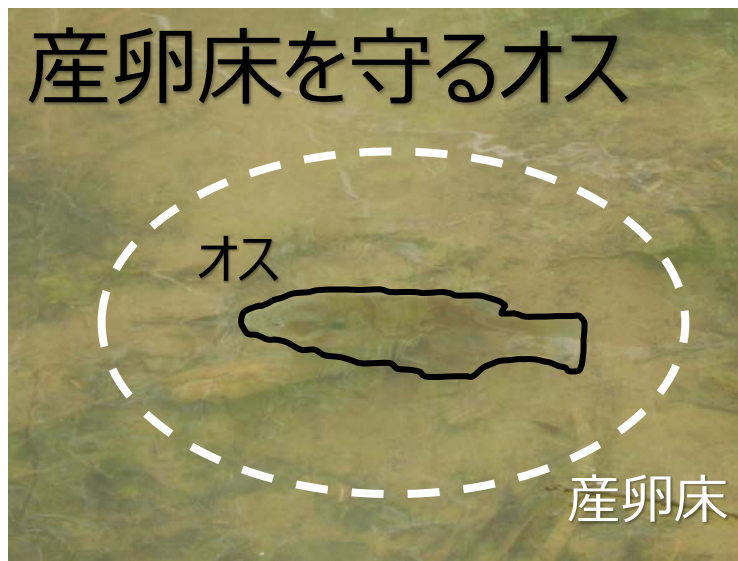


いであ株式会社

平成29-令和元年度 累積予算額:119,539千円

1. 侵略的外来魚ブルーギル

ブルーギル *Lepomis macrochirus*



同じサンフィッシュ科

オオクチバス
Micropterus salmoides



1. 侵略的外来魚ブルーギル

分布



✓北米に分布

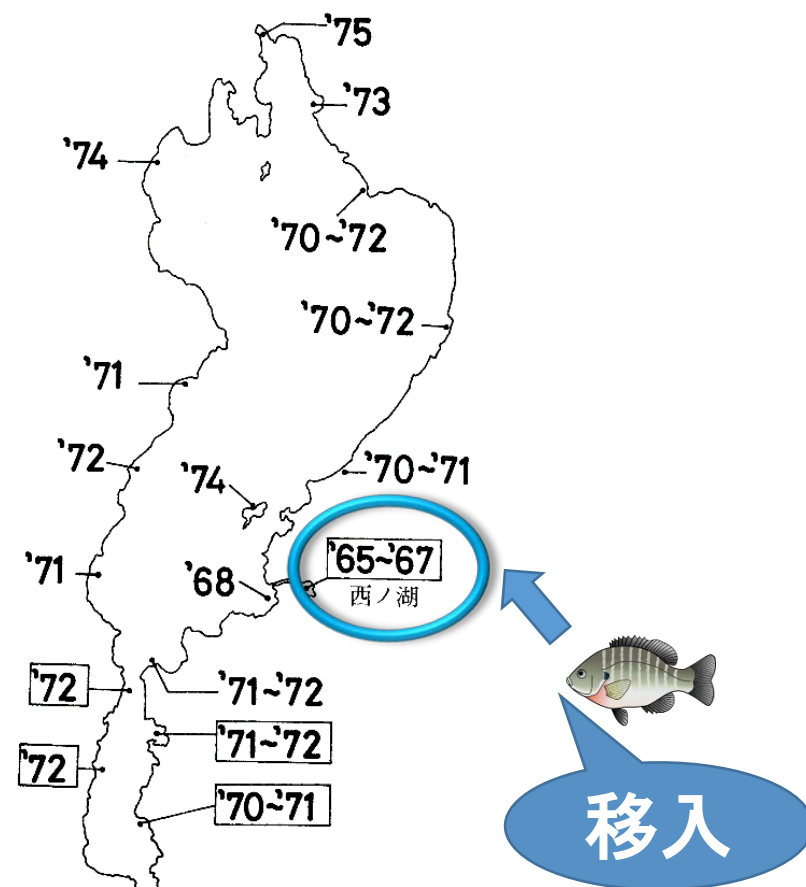
- 主な分布域は東南部

✓日本には1960年に移入。米国内でも生息域を拡大中。

1. 侵略的外来魚ブルーギル

全国への拡散と駆除

- ✓ 琵琶湖には1965年に移入
- ✓ 10年で水域全体に拡散
- ✓ 食用と期待されるも成長が遅く、高密度で矮小化するため、産業種として定着せず
- ✓ 全国に拡散し、定着

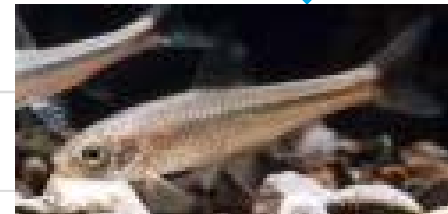


数字は確認年度, □ は生息密度の高い地点を表す(寺島, 1977)

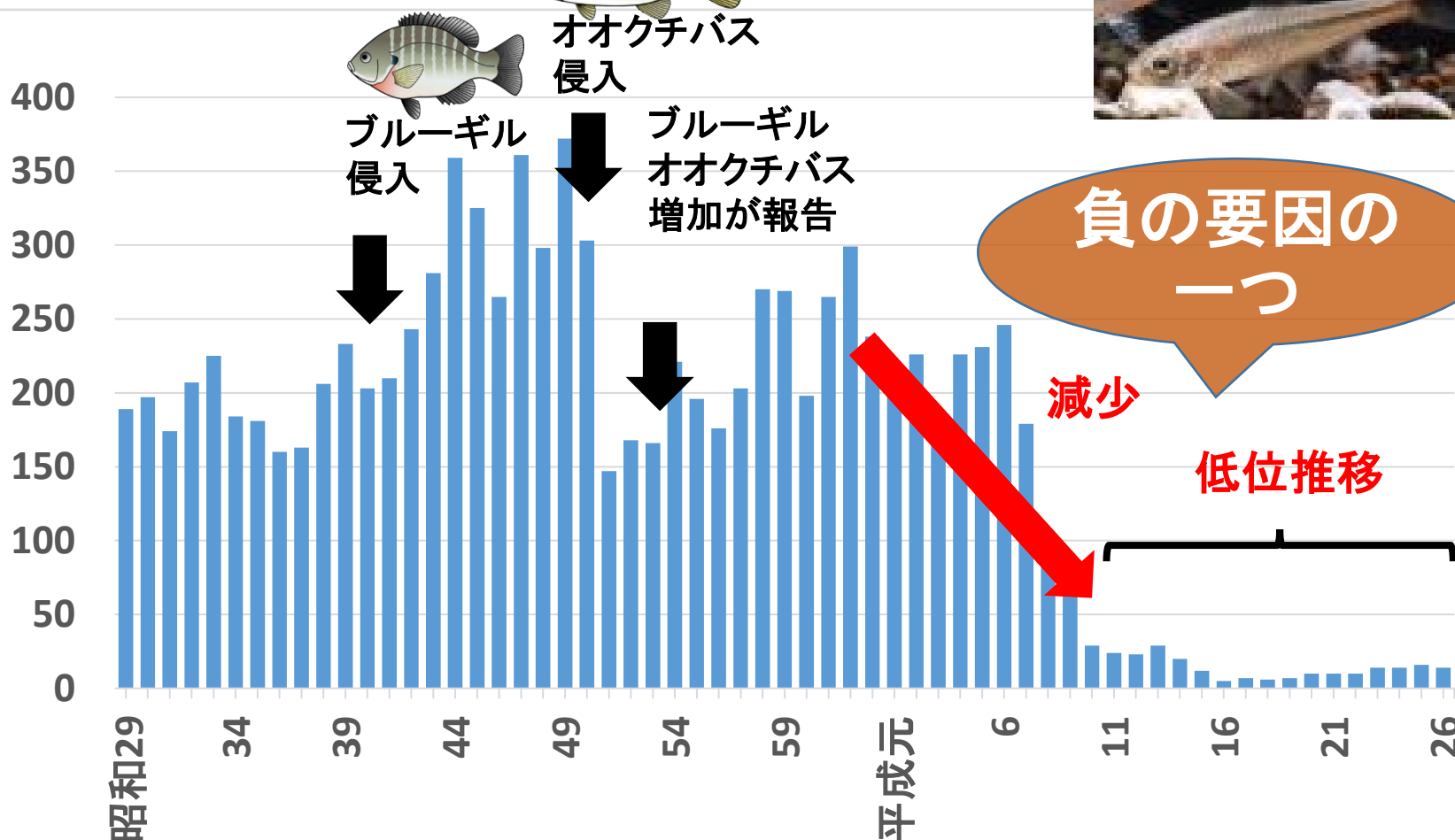
1. 侵略的外来魚ブルーギル

琵琶湖のホンモロコ漁獲量

ホンモロコ



漁獲量(トン)



S29-H21 滋賀県農林水産統計年報(近畿農政局 滋賀農政事務所)
H22-H26 内水面漁業生産統計調査(農林水産省)より

2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

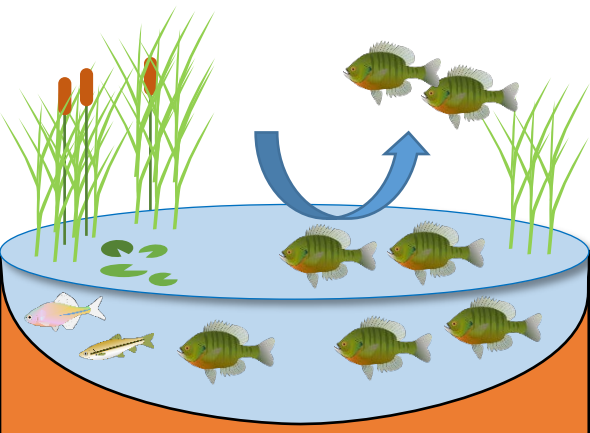
物理的な方法だけで、

- 根絶するには、
 - ✓ 最後の一尾まで取りきることが必要
 - ⇒ 取り残しがあると、再増加のおそれ

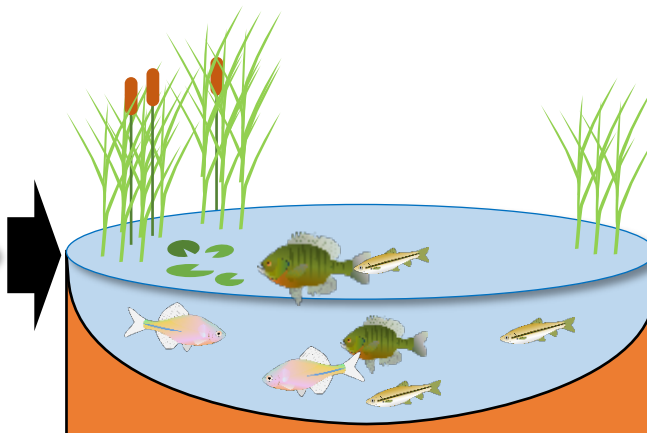
取りきり
は困難

残すと
リバウンド

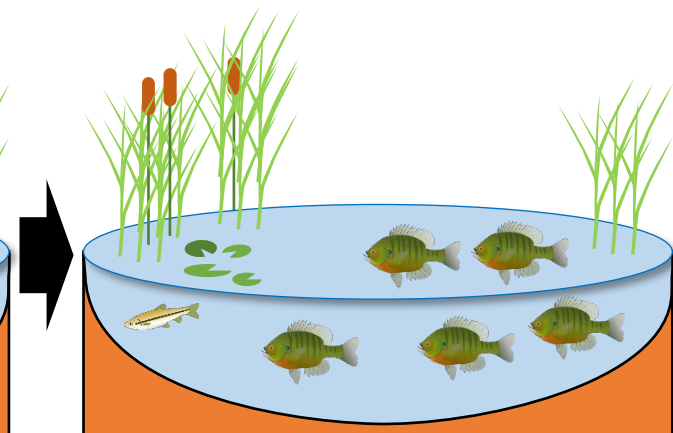
捕獲だけで減らしても



取り残しがあると・・・



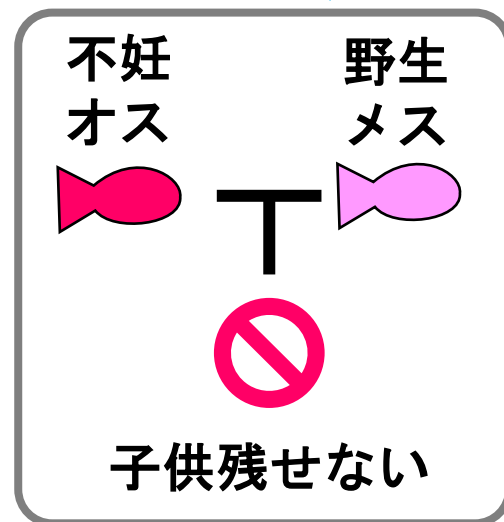
数年後、再増加！



2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

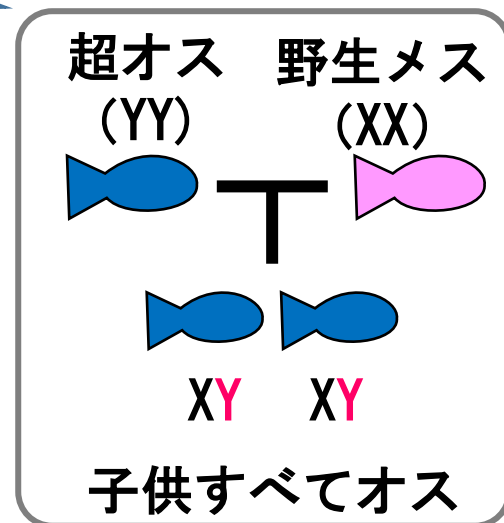
従来考案された方法

- 不妊オス（ウリミバエ）方式
 - ✓ 不妊オスの放出
 - ⇒ 交配時に子供が残せない



効果は一代

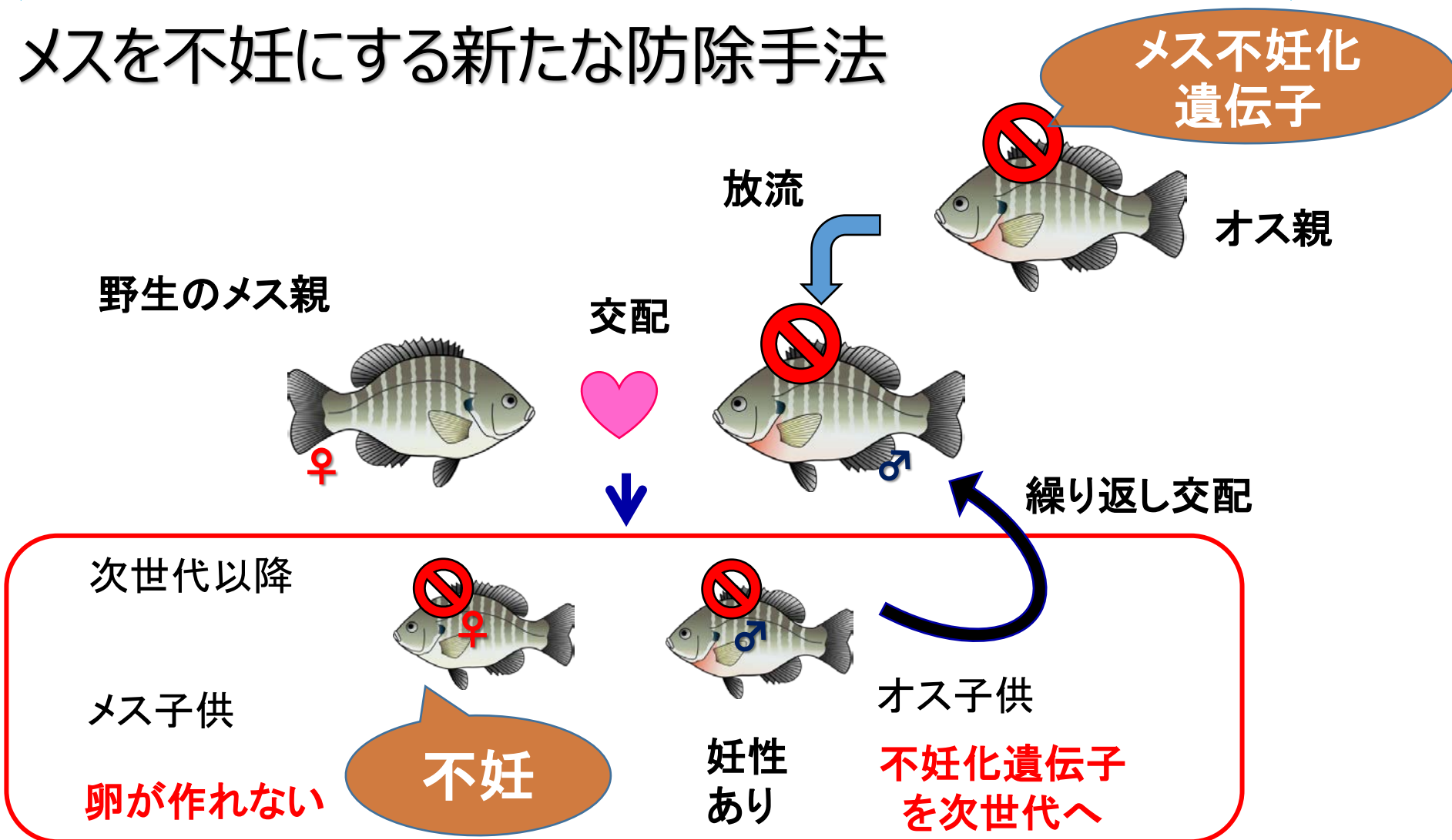
- トロイ染色体方式
 - ✓ YYオスやYYメスの放出
 - ⇒ 交配時にメスが生まれない
 - ⇒ オスばかりになり子供が減少



総数増加、再増加の懸念

2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

メスを不妊にする新たな防除手法



2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

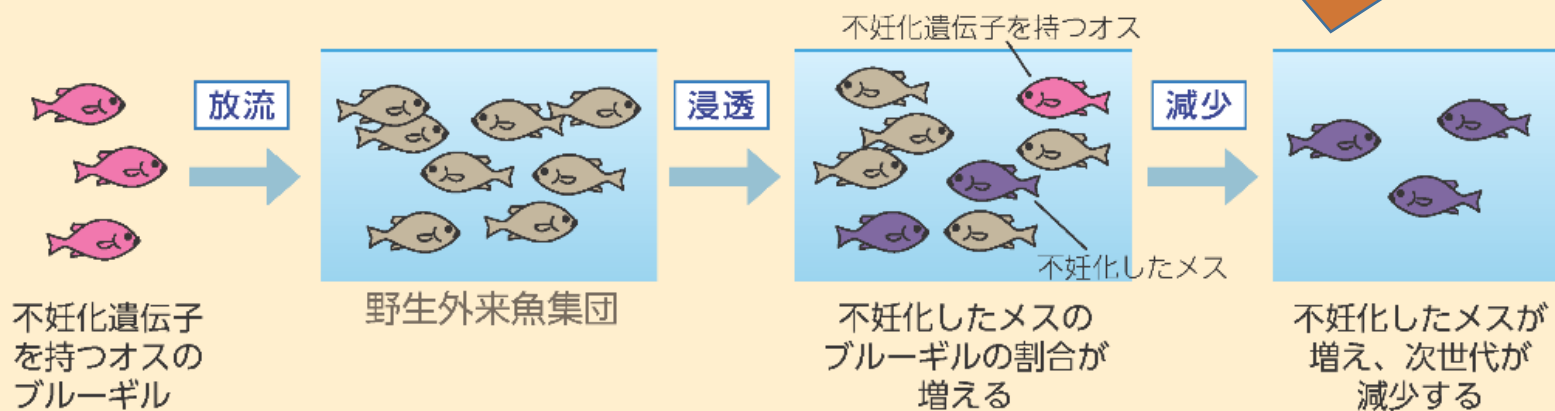
メスを不妊にする新たな防除手法

➤ 遺伝子制圧法の考案 (特願2016-54558)

✓ 卵を作る遺伝子を抑制

⇒ メス特異的不妊化遺伝子

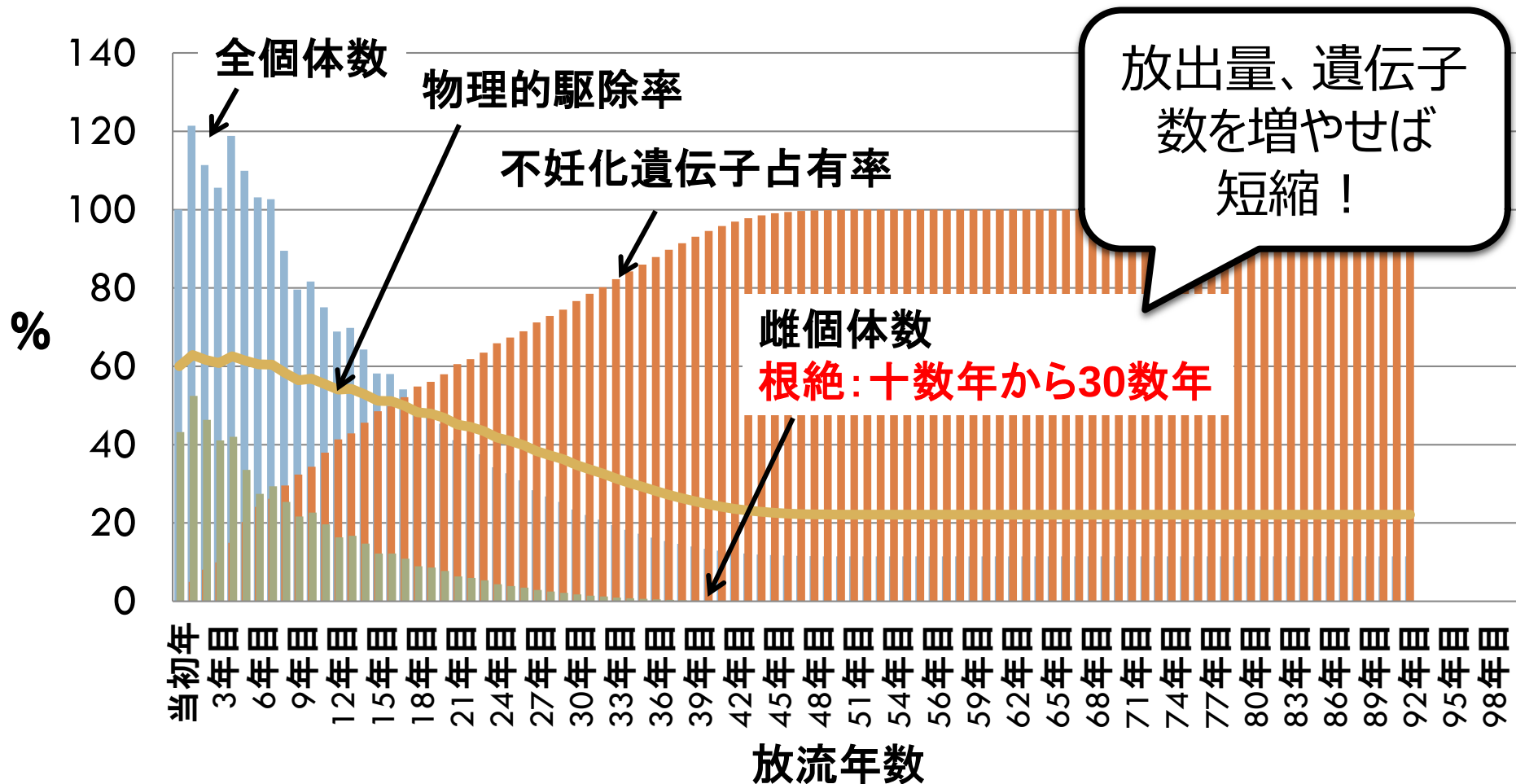
不妊化遺伝子で
集団増殖率を
抑制



⇒ 大量放出不要、再増加防止 が可能

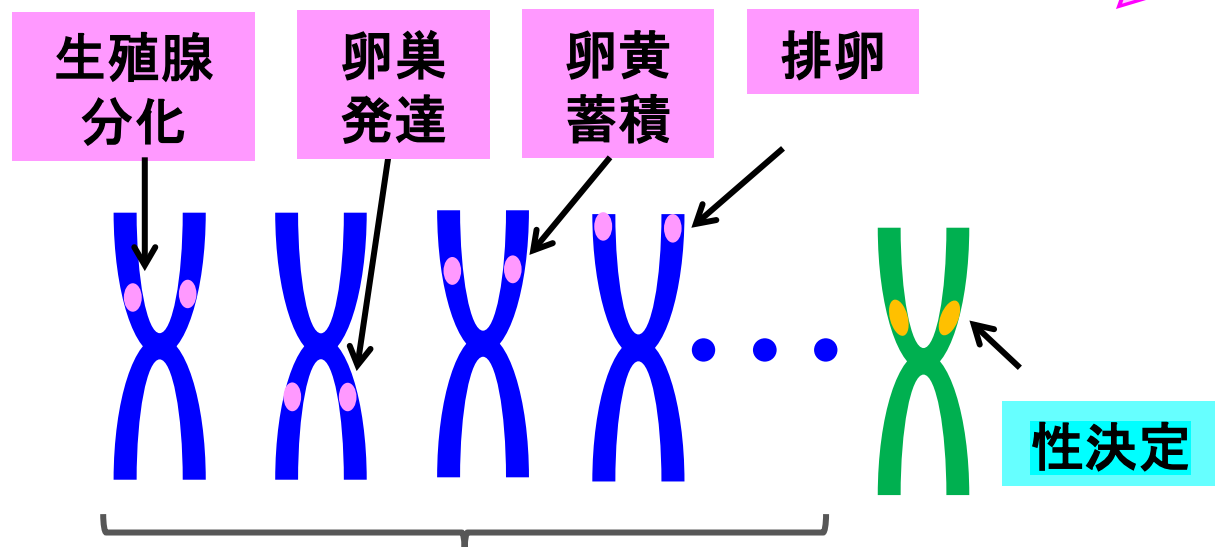
2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

2 不妊化遺伝子の根絶シミュレーション (YY6%放出)



2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

メス不妊化遺伝子の作出



常染色体
オス・メス共通

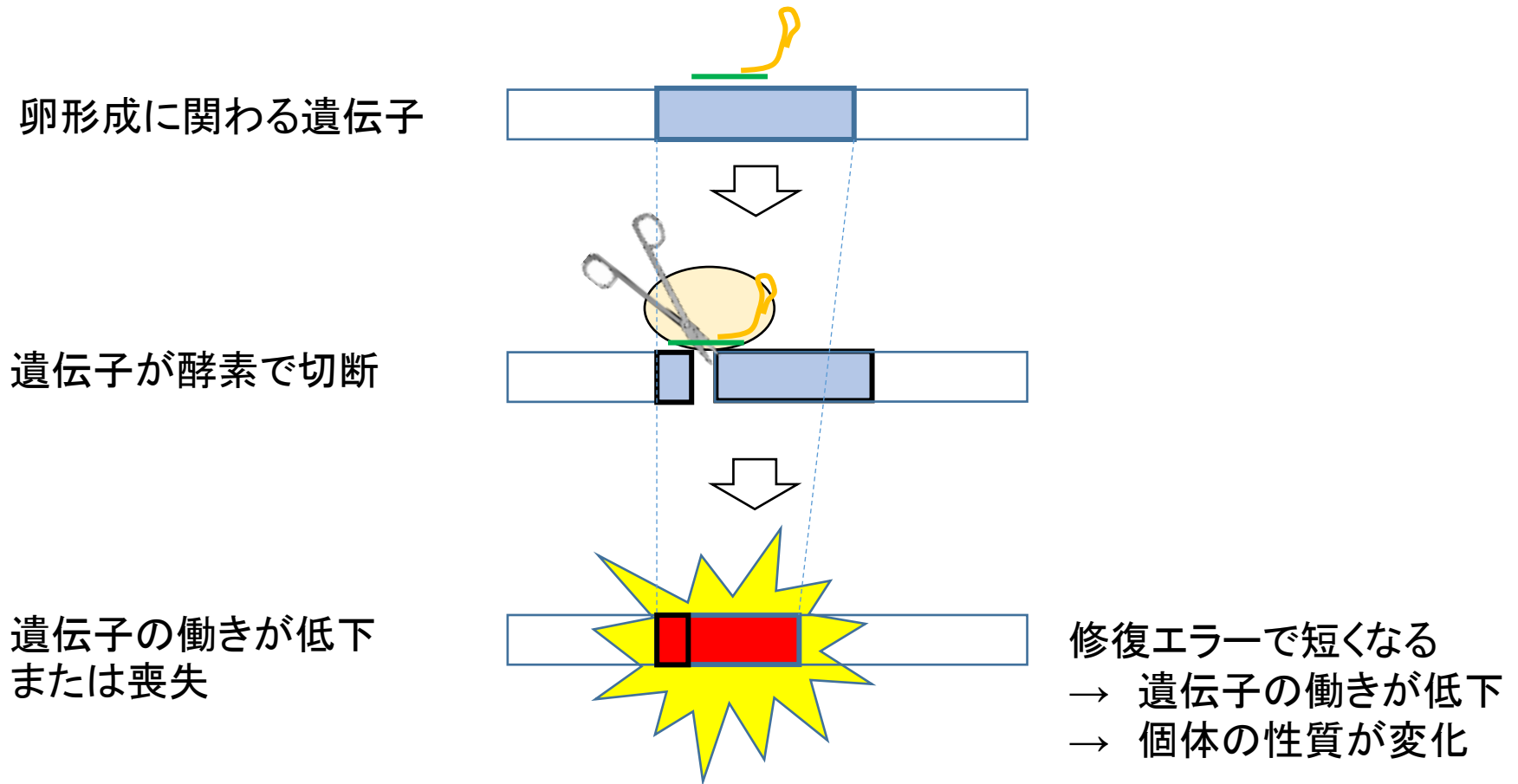
性染色体
オス : Y or Z
メス : X or W

遺伝子の一部を
取り除く : 欠損
(遺伝子編集)

機能しない
遺伝子
= **不妊化遺伝子**

何も足さない

CRISPR/Cas9 によるメス特異的不妊化遺伝子の生成

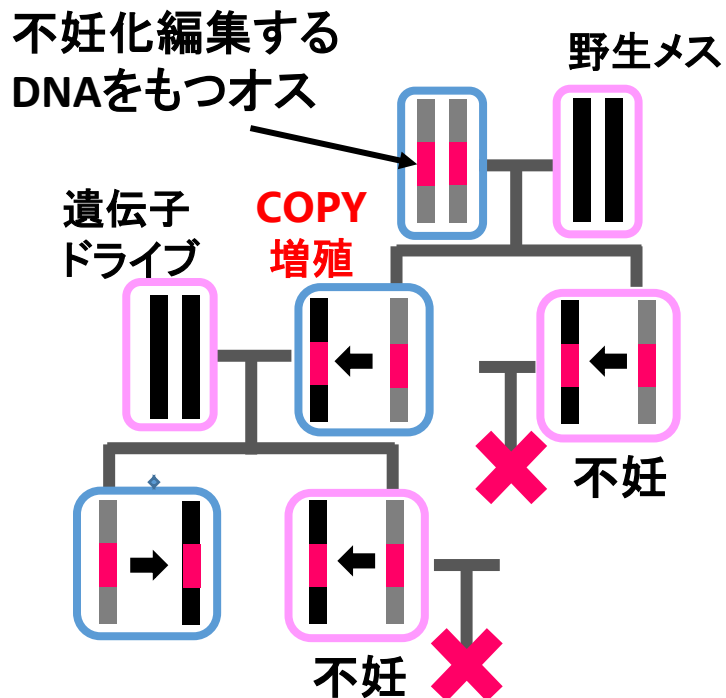


- メスの妊性(卵形成、発生)に関わる機能が失われる
- メス特異的不妊化遺伝子として機能する

2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

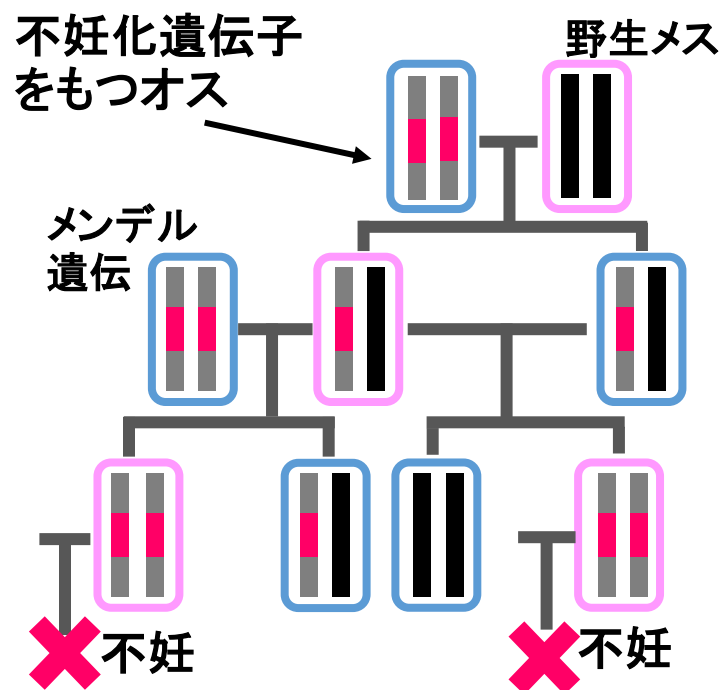
遺伝子ドライブ（マラリア、ジカ熱媒介蚊）との違い

遺伝子ドライブ



不妊化編集DNAが自己複製
種が絶滅する危険性

本法（遺伝子制圧）



継続的な放出がなければ
不妊化遺伝子は自然消失

大きな
違い



“遺伝子制圧法”の開発行程

実証試験の実施

基盤技術開発

実証魚の開発
と実証試験の準備

H26年

環境研究総合推進費
4-1408

H29年

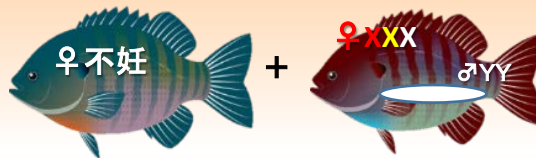
環境研究総合推進費
4-1703

H32年

H35年

雌不妊化

借り腹技術



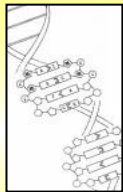
メス特異的不妊化遺伝子搭載魚の
開発基盤の確立

実証魚
の開発

不妊化遺伝子
搭載魚

遺伝子制圧実証魚の開発と生物
特性の知見の集積

分子マーカー

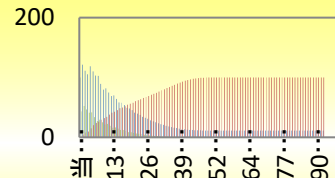


資源量
生命表
繁殖様式
行動範囲

メス特異的不妊化魚を用いた効果
的な放流手法の開発

根絶シミュレーションの適正化

データ



実証試験候補地の選定と社会合
意形成の着手

“遺伝子制圧”
技術の実証

実証池での自然交配による不妊化
遺伝子の伝播確認



2020年の試験開始を目標
遺伝子制圧技術の完成!

3年間の研究計画

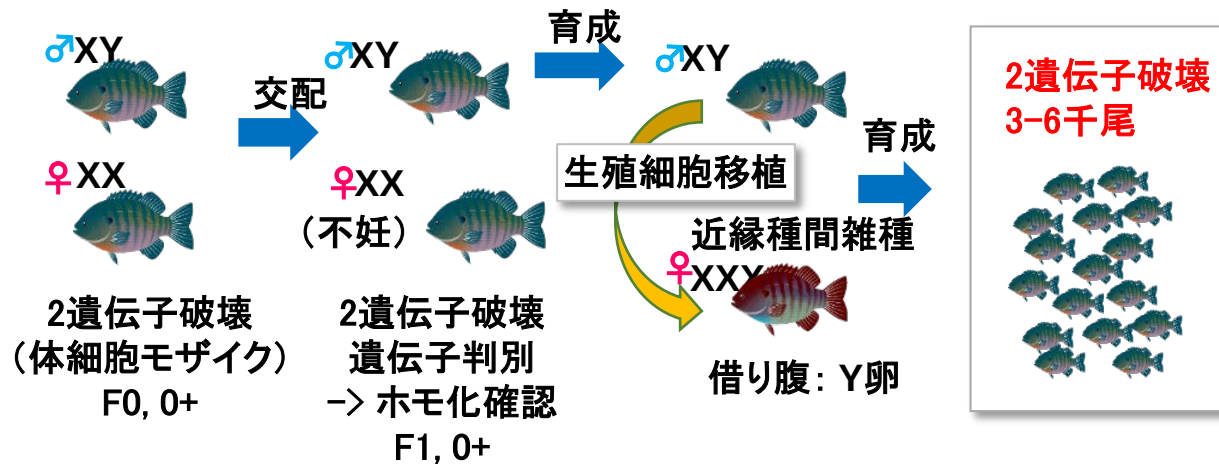
H28年度まで

H29年度

H30年度

H31年度

当初、H32年度から



実証試験を目指す
予定であったが
しかし、..



駆除・根絶試験



生物多様性影響評価試験

達成目標1 放流魚の予備生産・生産体制の構築

達成目標2 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握

達成目標3 放流試験候補地の検討と予備選定

達成目標4 社会合意形成手続きの明確化

- 生物相への影響(一次)
- 駆除の影響(二次)

3年間の研究実績と今後の展開

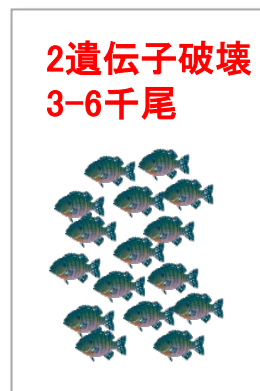
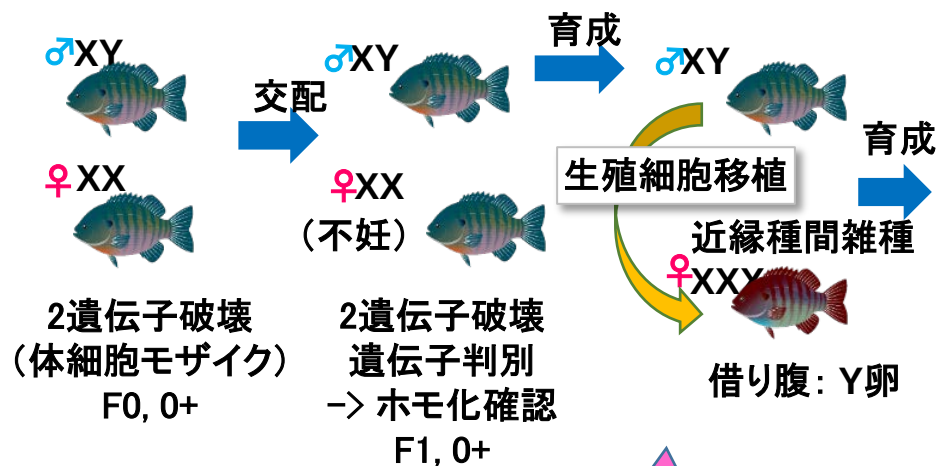
H28年度まで

H29年度

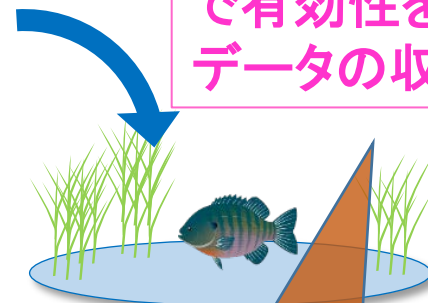
H30年度

H31年度

R2年度から



閉鎖管理区域
で有効性を示す
データの収集へ



行政からの
指摘

生物多様性影響評価試験

- 生物相への影響(一次)
- 放流の影響(二次)

1遺伝子破壊
ホモ化に成功

性決定様式
↓
ZW型と判明

試験候補地の
生息量
↓
必要数は
2-3百尾程度

野外での実施審査に必要な
駆除効果の実証および環境影
響評価データの取得が優先

- ・ 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性とそのゲノム解析
- ・ 放流試験候補地の生物相データの取得等

達成状況

達成目標1 放流魚の予備生産・生産体制の構築

不妊化遺伝子搭載F1作出

増産支援体制・設備を整えた

→ 遺伝子編集ホモ個体の作出

→ コスト計算実施

達成目標2 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握

特性把握のための試験魚を生産

行動試験を開始

→ F0編集オスの交配行動・産卵誘導を確認

達成目標3 放流試験候補地の検討と予備選定

放流試験候補地(勝田小池、幸神池)を選定

資源量調査について管理者等の承諾を得た

→ 年級群データを蓄積し、生息数を推定

達成目標4 社会合意形成手続きの明確化

ステークホルダーの洗い出し方法を決定

説明・理解醸成の方針を検討

→ 市民の疑問点についてQ&A案を作成

→ 放流試験の実施に必要な評価項目の検討の開始

研究体制（課題連携）

1. ゲノム情報解析と 不妊化遺伝子多重搭載魚の作出

水産研究・教育機構



編集魚
の提供

不妊化遺伝子
モザイク・ヘテロ



F0



交配

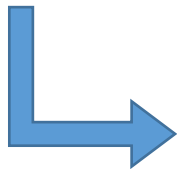
不妊化遺伝子
ホモ



F1

2. 不妊化遺伝子搭載魚の 増殖技術の実証

水産研究・教育機構



編集魚
の生産



3倍体ホスト



生殖細胞移植



代理母
→ 編集卵

4. 放流候補地の検討と 生産支援体制の構築

いであ株式会社

編集魚
の提供

生物特性の把握
競合性試験

不妊化遺伝子搭載魚 野生個体



3. 不妊化遺伝子搭載魚の生物特性の把握 と野生資源の評価

三重大学

候補地検討
と予備選定

候補地
リスト



生息数
評価

社会合意形成手続き
の明確化

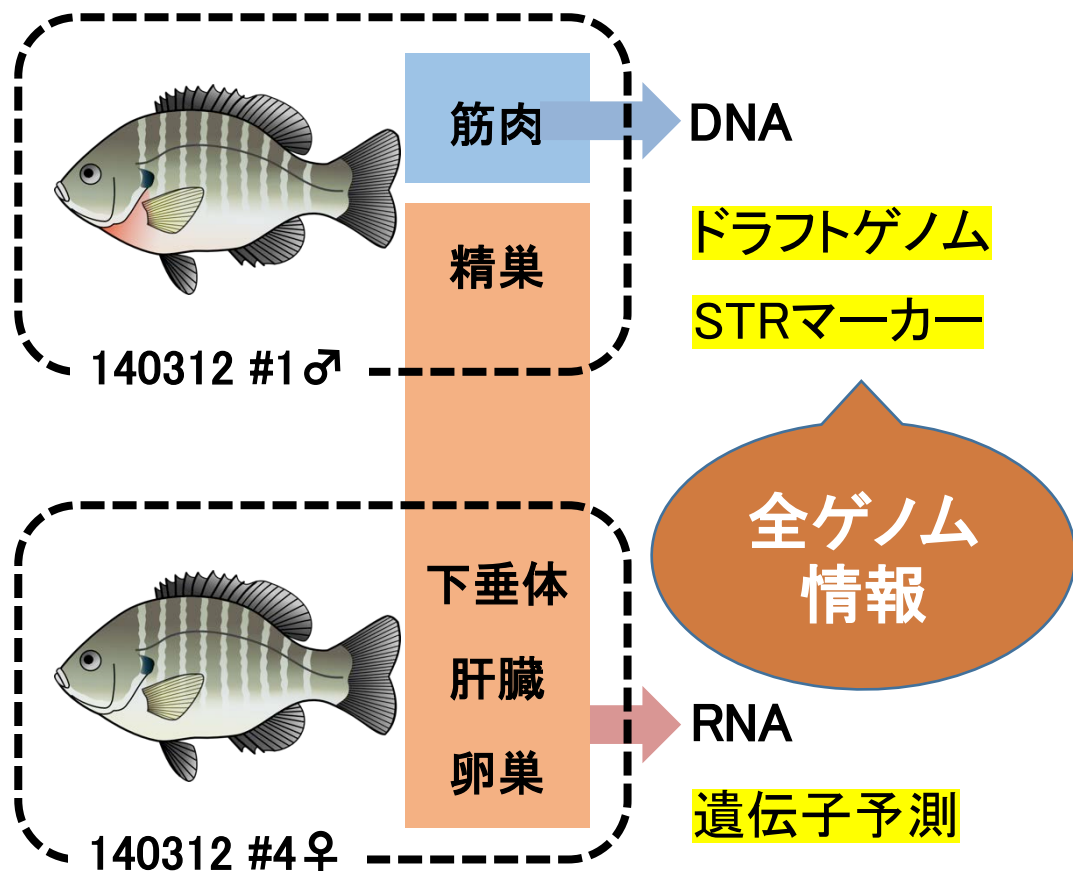


実証試験魚の予備生産・生産体制の構築

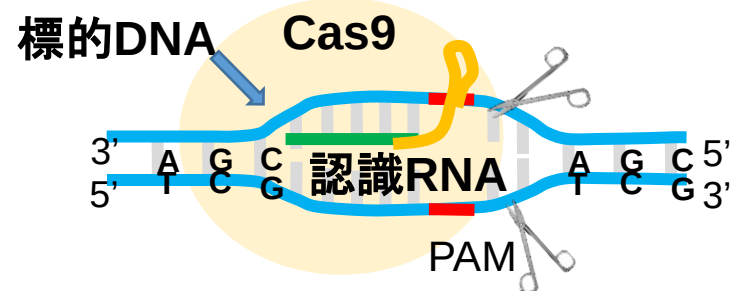
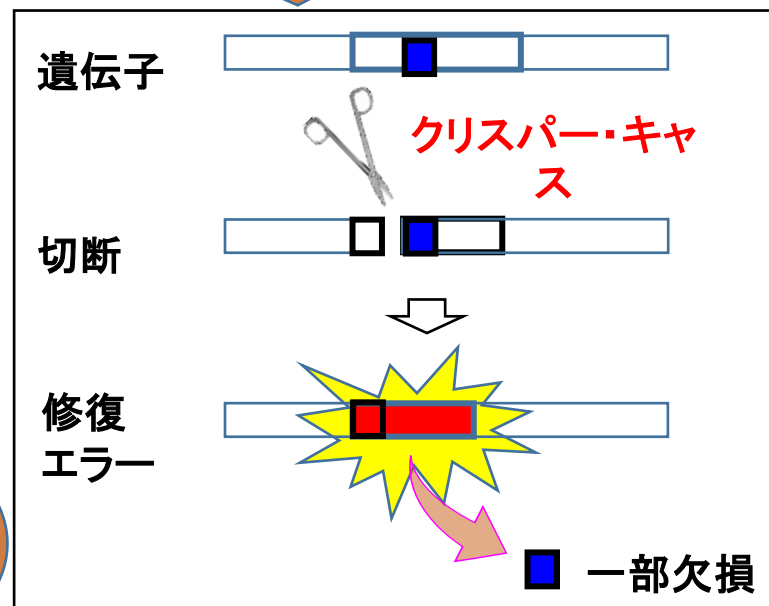


2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

全ゲノム情報と遺伝子編集



遺伝子編集

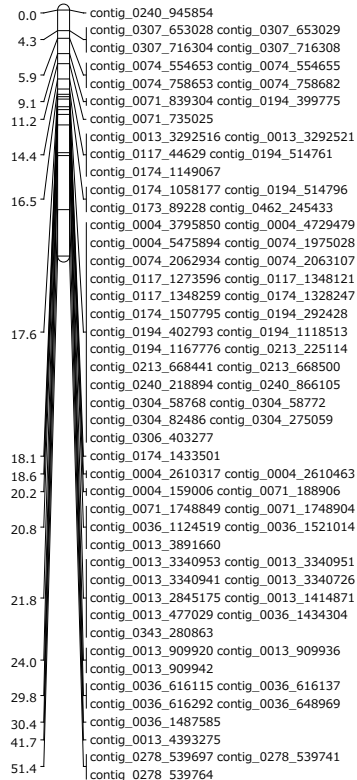


ブルーギル性判別マーカーの探索 1

連鎖地図構築・ゲノム配列の統合

オスメス統合地図		
LG	マーカー数	遺伝距離 (cM)
1	161	92.0
2	134	44.3
3	109	93.5
4	105	71.8
5	100	53.4
6	99	57.6
7	94	83.6
8	93	76.5
9	86	34.1
10	84	51.7
11	80	57.2
12	77	51.4
13	72	42.2
14	69	48.0
15	63	53.8
16	62	44.3
17	60	55.1
18	57	63.5
19	57	45.6
20	52	59.9
21	32	34.2
22	26	30.5
23	12	5.9
24	8	0.5
合計	1,792	1,251
平均	74.7	52.1

連鎖地図の例 (連鎖群12)



連鎖群の左側に遺伝距離を、右側にSNPマーカーを示す。

ゲノム情報を
24連鎖群に配置

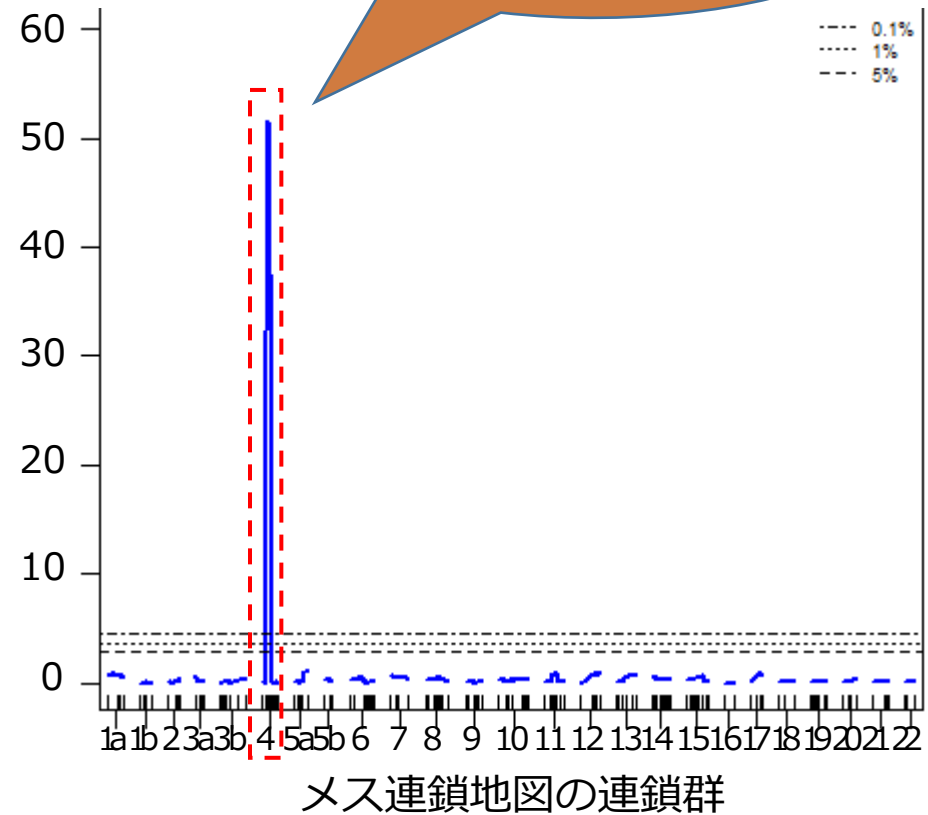
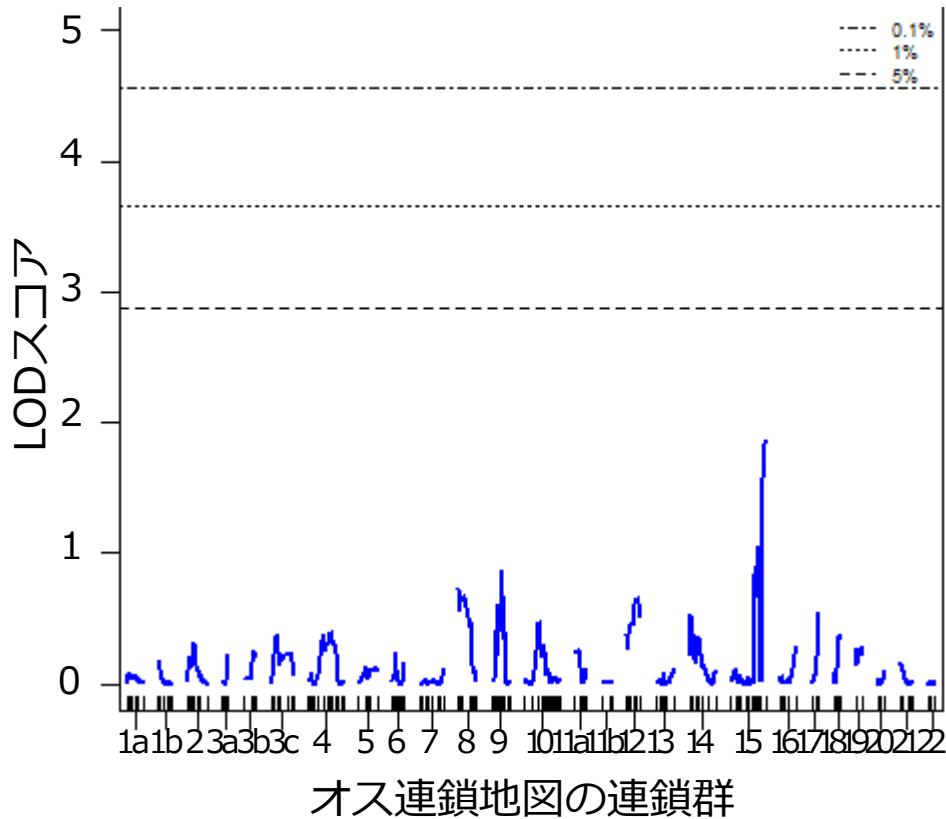
連鎖地図とゲノム配列の統合				
分類		コンティグ数	総塩基数	
			bp	%
配置	方向性有り	81	193,250,625	23
	方向性無し	368	440,539,837	52
未配置		2,049	212,298,714	25
合計		2,498	846,089,176	100

計1,792座位のSNPマーカーを配置した24連鎖群を構築

ブルーギル性判別マーカーの探索 2

性決定遺伝子座の探索

性決定様式は
ZW型と決定！

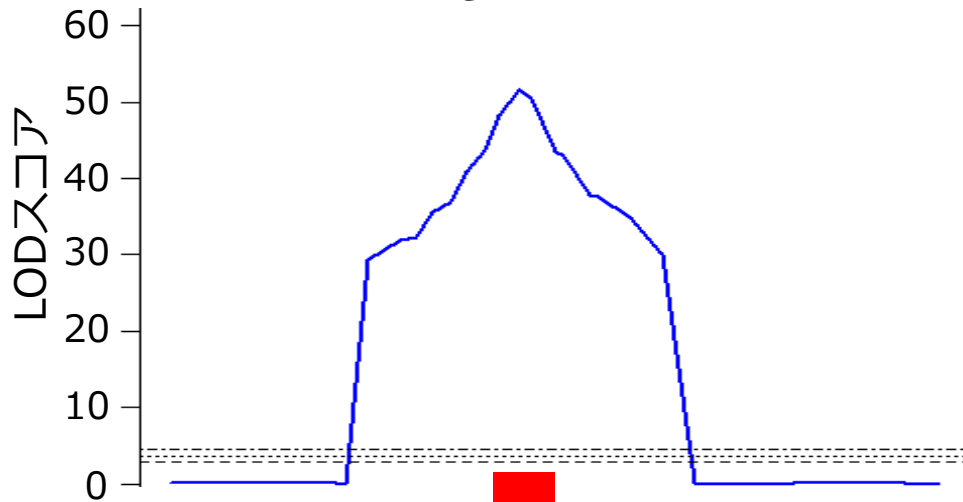


※有意水準：permutation testを1,000回行い算出。

メス連鎖地図（メス親ヘテロSNP）の連鎖群4に性決定遺伝子座を検出

ブルーギル性判別マーカーの探索 3

メス地図連鎖群4のQTL



95%信賴区間

遺伝距離 (cM)

0 5 10 15 20

contig 0064 1300868
 contig 0064 1300893
 contig 0064 1863486
 contig 0064 28792
 contig 0293 827372
 contig 0293 828502
 contig 0293 827435
 contig 0140 1334948
 contig 0195 454803
 contig 0845 62546
 contig 0034 1445455
 contig 0034 1581214
 contig 0034 1622534
 contig 0034 1622557
 contig 0034 16201397
 contig 0556 56608
 contig 0556 56617
 contig 0597 185026
 contig 0740 91353
 contig 0153 497977
 contig 0153 497990
 contig 0153 499697
 contig 0153 500624
 contig 0248 396911
 contig 0248 701528
 contig 0248 942137
 contig 0248 942149
 contig 0412 491146
 contig 0132 1440951
 contig 0516 59378
 contig 0784 6558
 contig 0126 1318984
 contig 0395 41453
 contig 0520 190019
 contig 0395 41453
 contig 1006 39296
 contig 0106 1166337
 contig 0106 1166357
 contig 0106 1166408
 contig 0529 69942
 contig 0600 28134
 contig 0550 259247
 contig 0550 259267
 contig 0550 259279
 contig 0831 45839
 contig 2364 4409
 contig 0184 789089
 contig 0184 789098
 contig 0477 152714
 contig 1125 36224
 contig 0225 185099
 contig 0607 98977
 contig 0607 99009
 contig 0529 69957
 contig 0106 1166397
 contig 0106 1166371
 contig 0595 67636
 contig 0595 67589

性判別マーカー 2候補

QTLの95%信頼区間

遺伝距離 (cM)	マーカー数	コンティグ 数
10.0 - 11.7	2	2

性決定遺伝子座はメス地図連鎖群4の10.0 - 11.7 cM付近に存在

オオクチバス全ゲノム情報の取得

アセンブリ結果

高品質なドラフト
ゲノム

アセンブリ	ゲノム解読 個体の性別	総塩基長 (bp)	コンティグ数 (本)	コンティグ長 (bp)		
				平均	最大	N50
merged	オス	842,865,859	482	1,748,684	34,362,233	13,330,889

NCBIデータベースの硬骨魚25種のアセンブリに比べ（Chromosome level assembly）、コンティグ数は4番目に少なく、N50長は最長。

コンティグ数482本、N50長13.3 Mbpのコンティグを構築した

2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

遺伝子編集ホモ個体の作出

標的配列 TGGAGAACCTGAGTCCCCGG

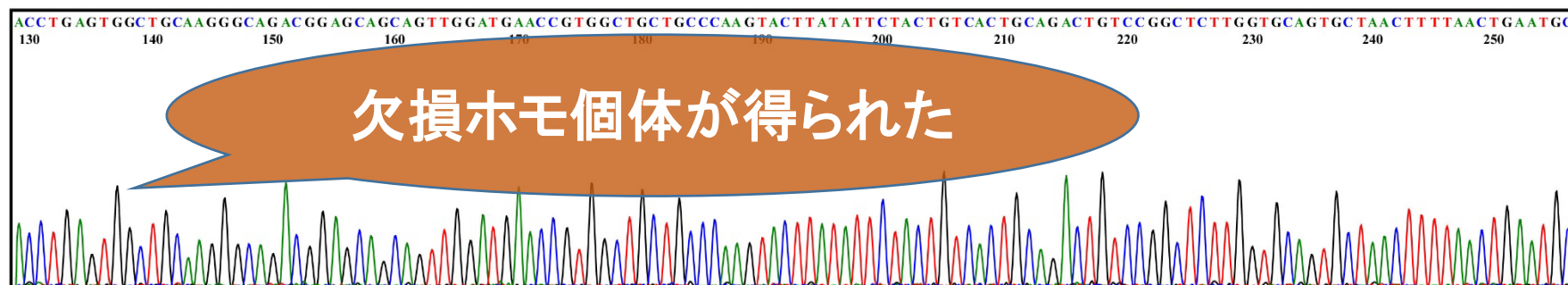


ホモ: 2つある遺伝子の型が揃った状態

—— 野生型個体: 塩基の欠損なし 個体出現率 $11/48=23\%$

—— ヘテロ変異個体: agtccccg : 8塩基欠損 $2/48=4\%$

—— ホモ変異個体: ccccggt : 7塩基欠損 $3/48=6\%$



—— ヘテロ変異個体: 同上欠損 $3/48=6\%$

2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発

遺伝子編集ホモ個体の作出

FSHb: メス成熟関連タンパクのアミノ酸配列

MLENLSRWLQGQTEQQLDEPWLLPKRKGLEPLALPKLLREKDHDFPGGLSRRLYCTRQRM
QLVVMAAVLALVRVGQGCSFGCHLTNISIPVESCISIETIYTTICEGQCYPYHEDPVYIGYHDWAE
QKICNGDWTYEVKHIEGCPVGVTPVARNCECTACNAGNTYCGRFPGYISSCLSF



04-15: ccccggt がホモで欠損した個体のアミノ酸配列

MLENLSGCKGRRSSSWMNRGCCPSTYILLSLQTVRLLVQC*



7塩基抜け、タンパクが
短くなった

今後メスが不妊になって
いるか確認予定



Bluegill-FSHb

MLENLSRWLQGQTEQQLDEPWLLPKRKGLEPLALPKLLREKDH
DFPGGLSRRLYCTRQRMQLVVMMAAVLALVRVGQGCSFGCHLTNI
SIPVESCISIETIYTTICEGQCYHEDPVYIGYHDWAEQKICNGDWT
YEVKHIEGCPVGVTPVARNCECTACNAGNTYCGRFPGYISSCLSF

04-13,17,41 (ccccgga^gttggaatに置換ホモ)

MLENLS**LECGCKGRRSSSWMNRGCCPSTYILLSLQTVRLLVHCRLSGSWCSANF***



04-15,21,25 (ccccggt の欠損ホモ)、22 (ヘテロ)

MLENLS**GCKGRRSSSWMNRGCCPSTYILLSLQTVRLLVQC***



04-37 (cの一塩基欠損ホモ)、24,28,48 (ヘテロ)

MLENLS**PGGCKGRRSSSWMNRGCCPSTYILLSLQTVRLLVQC***



*: stop codon

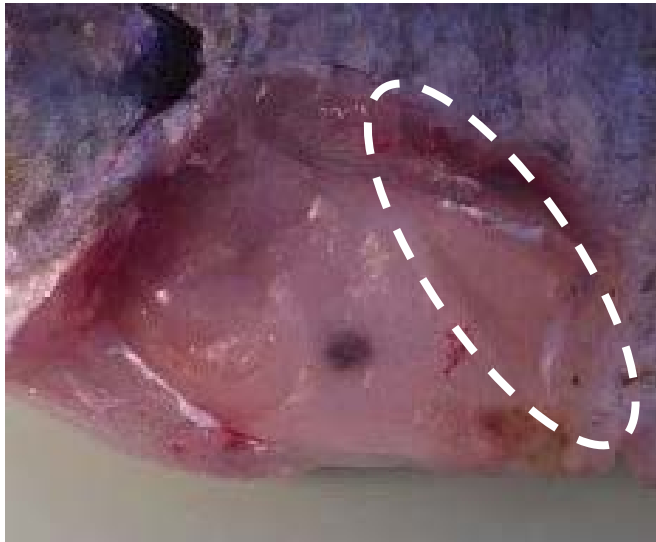
置換変異個体
雄雌の生殖腺
を観察

欠損変異個体
R2交配準備中

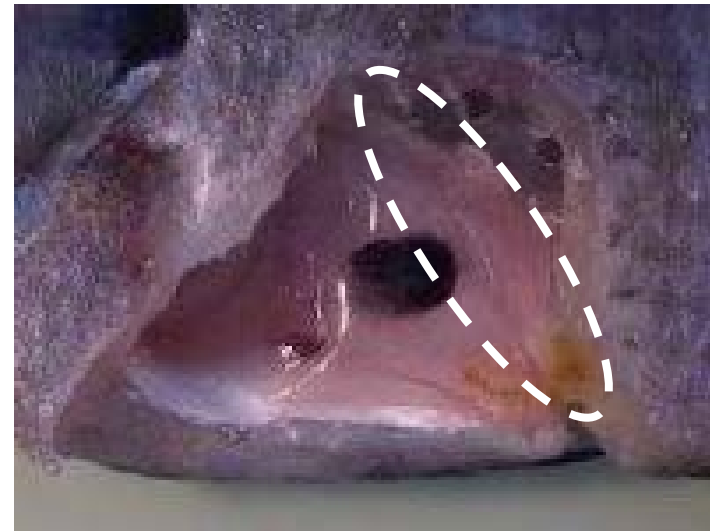


Fshbホモ欠損編集オス

Homo substitution 配列置換ホモ (ccccggがttggaatgに置換、04-13, 17, 41)



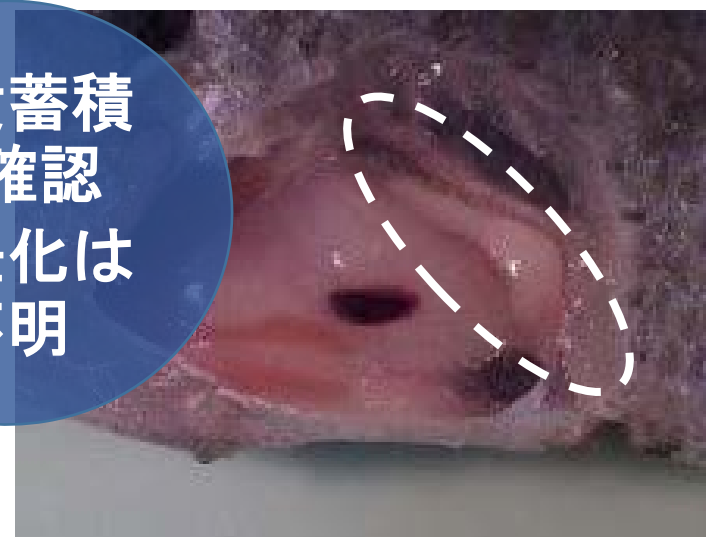
Bluegill-FSHb_04-1 non-edited , ovary



Bluegill-FSHb_04-2 non-edited , testis

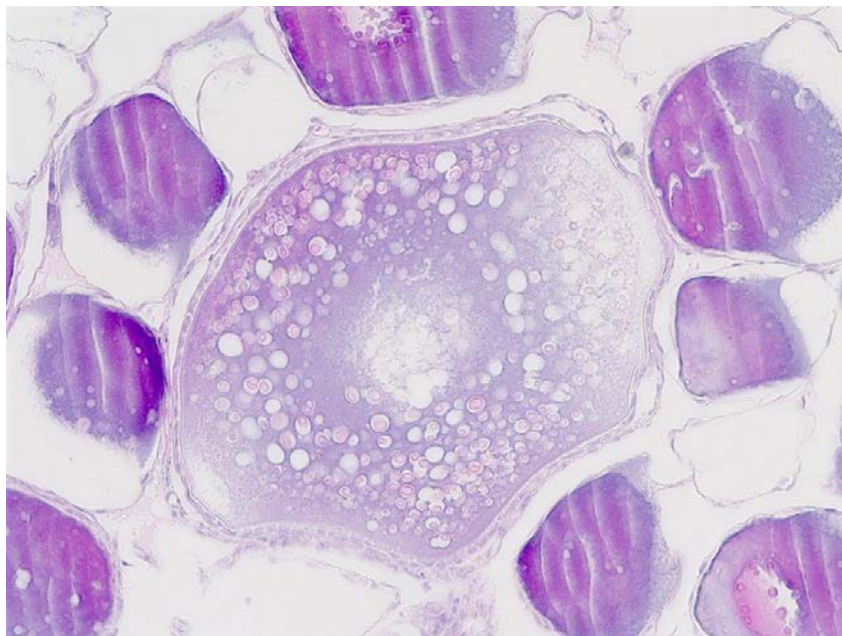


Bluegill-FSHb_04-13 edited, ovary

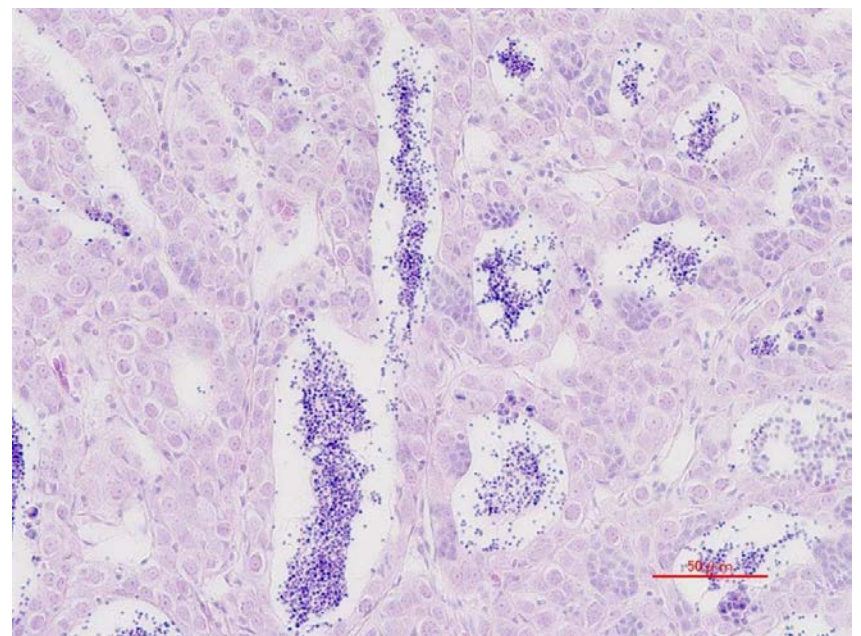


Bluegill-FSHb_04-17 edited, testis

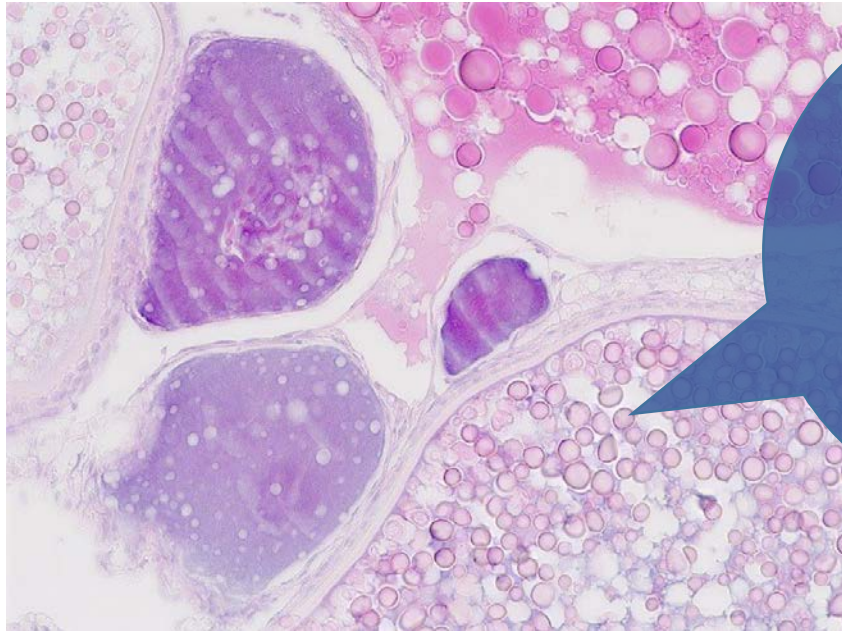
卵黄蓄積
が確認
不妊化は
不明



Bluegill-FSHb_04-1 non-edited , ovary

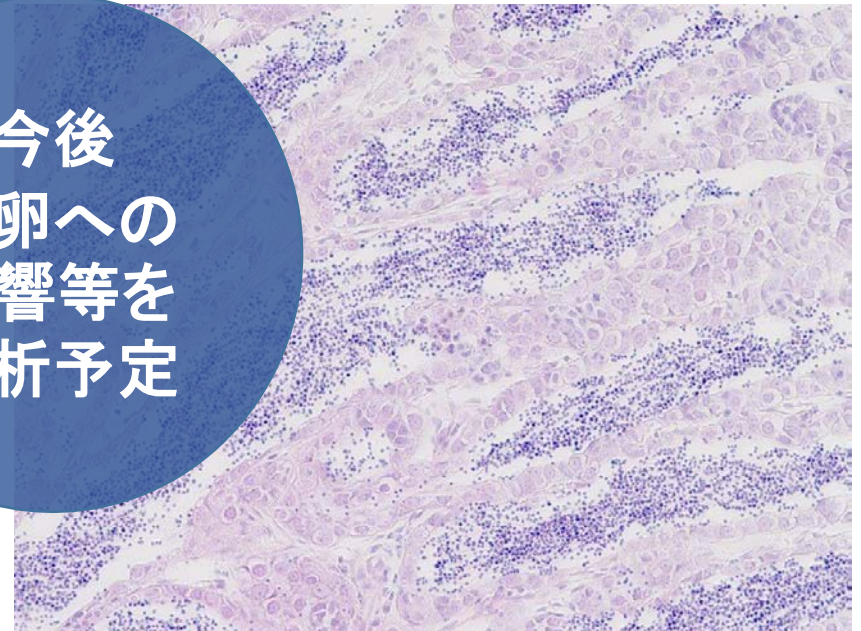


Bluegill-FSHb_04-2 non-edited , testis



Bluegill-FSHb_04-13 edited, ovary

今後
排卵への
影響等を
解析予定



Bluegill-FSHb_04-17 edited, testis

遺伝子	ガイドRNA	F0の作出	F1および遺伝子の多重化・ホモ化状況
fshr	3種作成済	作出選抜済	ポジF0育成中
foxl2	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1作出(稚魚育成中)
fsh-β	2種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→ホモ/ヘテロポジF1作出(親魚) →20春ホモ/ヘテロF2大量種苗生産予定
VgA	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1作出(稚魚育成中)
VgB	3種作成済	作出選抜済	F0兄妹交配→F1作出(稚魚育成中)
VgC	2種作成済	作出選抜済	同上
chg H	2種作成済	作出選抜済	WTと交配→ヘテロ+WT集団(稚魚育成中)
CYP19a	2種作成済	作出選抜済	WTと交配→ヘテロ+WT集団

1) fshb: 18夏ホモ化F1 →19夏ホモ選抜 →20春ホモ大量生産F2

2) foxl2、VgA or BC: 19秋ホモ化F1 →20夏ホモ選抜 →21春ホモ大量生産F2

3) fshr: 19冬ホモ化F1 →20冬ホモ選抜 →21春ホモ大量生産F2

黒字: 実施済、赤字: 予定

不妊化個体を
効率よく増やす
工夫

借り腹技術による卵の生産

不妊化遺伝子搭載魚
(サブテーマ①)



始原生殖細胞は作れるが、
卵を育てる能力は欠損

生殖細胞を供給

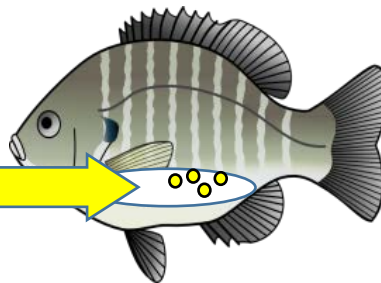
代理親魚(全雌三倍体)



母体を提供

代理親魚(メス)に
不妊化魚の卵を育てさせる。

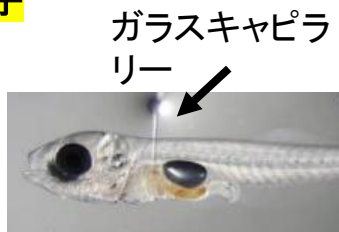
精原細胞を調製し、
顕微注入



ブルーギル 生殖細胞の移植

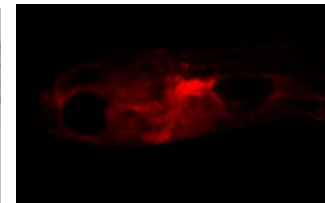
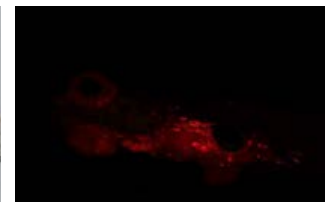
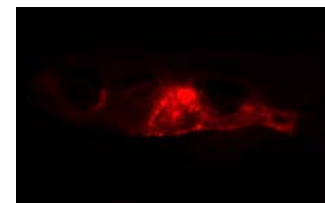
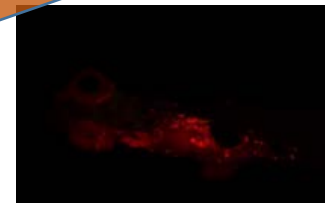
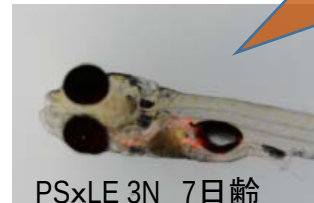
- ・雑種等を親魚として使用。
- ・低温処理による極体放出阻止により三倍体化。
- ・孵化7日目または9日目に移植。

移植の様子



作製自体は前身プロにて報告済み

別の個体の
細胞を移植

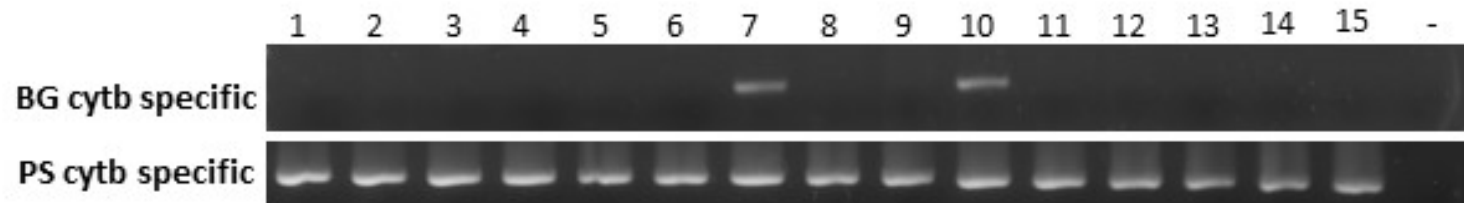


移植の確認(赤色蛍光が移植した細胞)

生殖腺PCR(cytb)によるBG遺伝子の確認(例)

長期(一年間)
生存確認⇒移植成功

PS3Nへの9日目移植。一年後でもBG遺伝子の存在確認＝移植成功



各15個体での移植の成功率

Recipient	7dph	9dph
PS3N	1/15	2/15
PSxLE	3/15	0/15
PSxLE2	0/15	N.E.
PSxBG	0/15	N.E.

N.E.: Not examined

PS3NとPSxLEでは移植成功。
ただし成功率は低い。

但し、成功率は要改善

ZWではYY方式は
使えない

但し、ZWでも
全オス生産は可能

超オス(YY)の利用

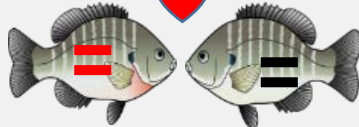
・性比を偏らせて繁殖集団サイズを
減少させる(YY方式)

YYオスの放流

放流オス



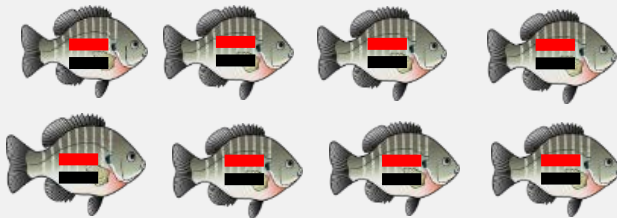
天然メス



YY

XX

次世代



オス(XY)

オス:メス=1:0

編集魚の量産および再生産

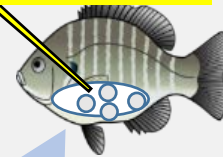
借り腹による放流魚生産

超オス



生殖細胞
YY

借り腹移植



超オス



Y卵のみ

生まれる子供は
YYのみ

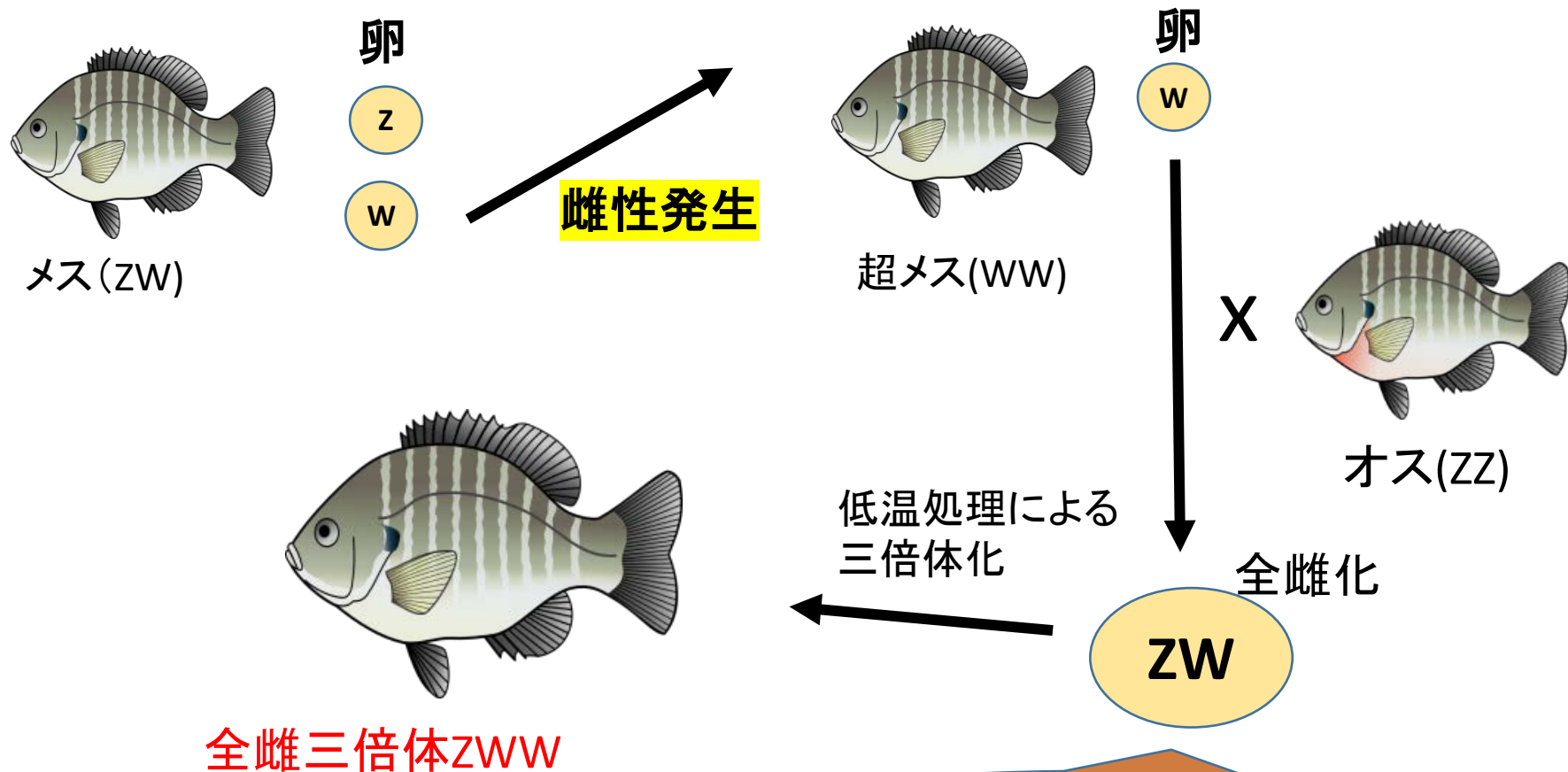
すべて放流に使用可能

ZWでは使えない

YがZに代わるだけで特に影響なし

YY方式が併用できなくて
も根絶は可能

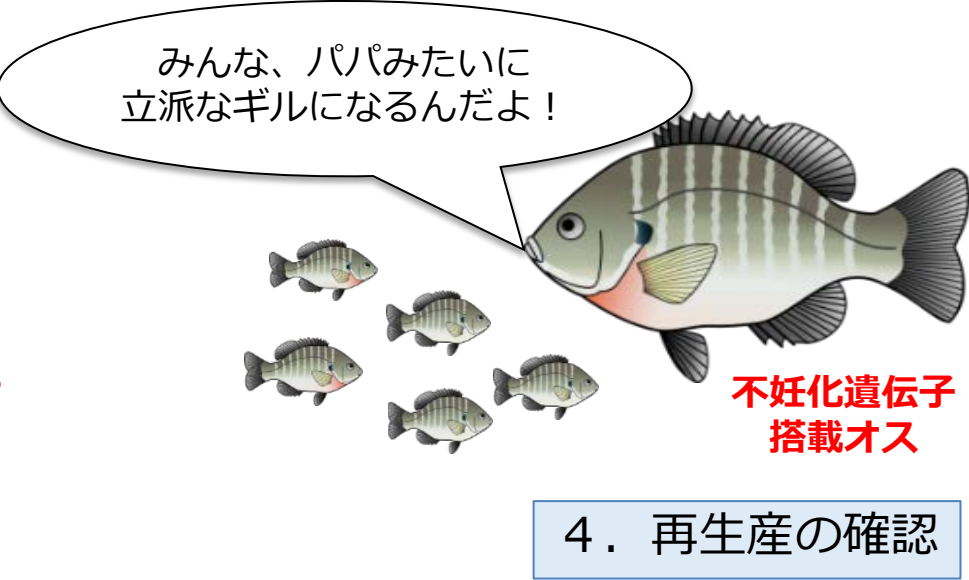
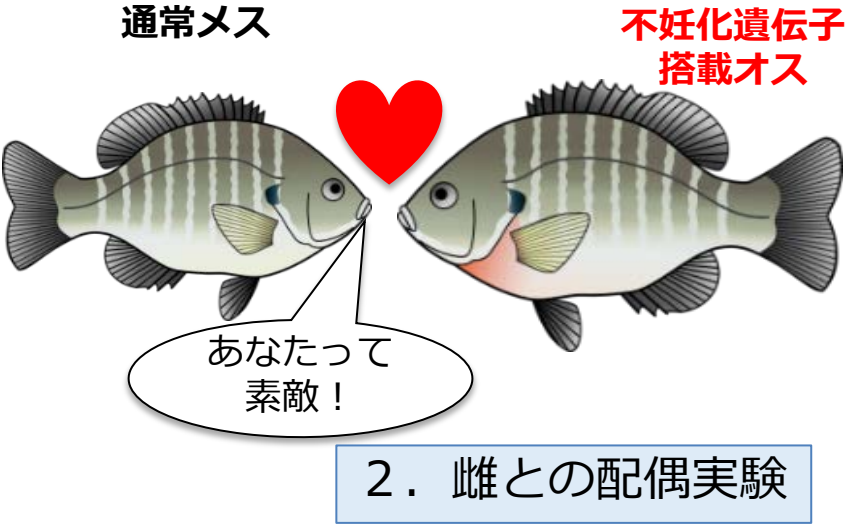
借り腹用全雌三倍体(例: 雌性発生の利用)



代理母の生産は近縁種
PS3N の利用が有望か

不妊化遺伝子搭載魚の繁殖行動特性の把握

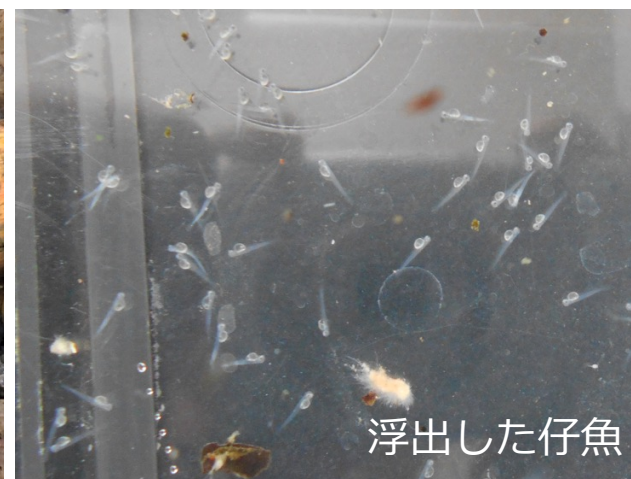
特定飼育区画
(二種使用)



遺伝子編集魚（雄）の配偶行動の観察（営巣から産卵・孵化まで）



遺伝子編集魚（雄）と通常魚（雌）の間で営巣から産卵までを確認



今回は
モザイク変異
で行動確認！
次はホモ変異
体を予定

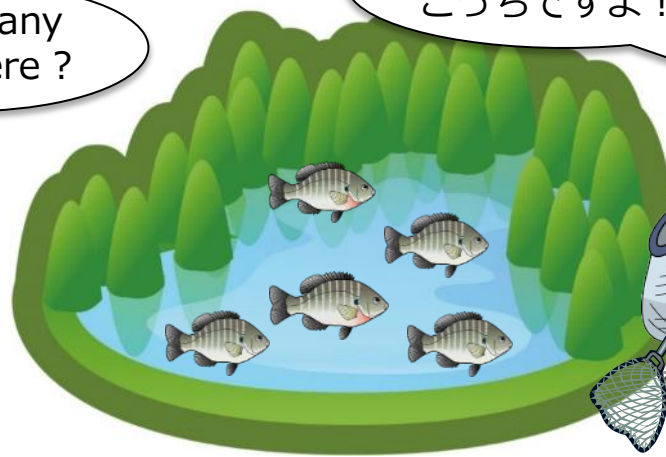
本研究におけるブルーギル遺伝子編集魚は行動を含めて正常な繁殖能力を有することが判明。

実証試験候補地における資源量（個体数）の推定



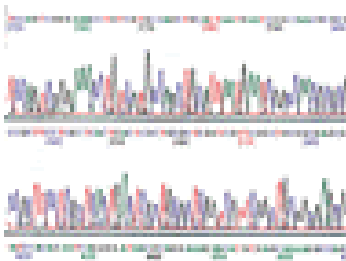
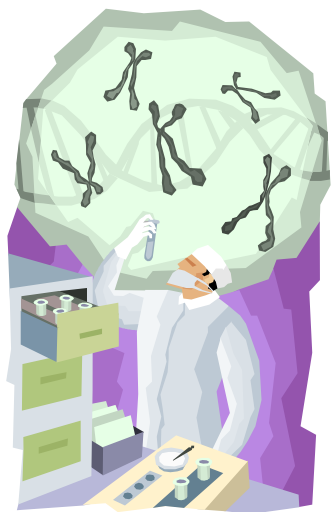
How many
ギル, here ?

1. 実験候補地の選定



よい子の皆さん、
こっちですよ！

2. 野外サンプリング

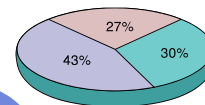
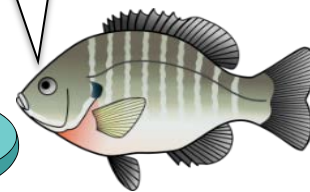


3. DNA分析



生息数は1万匹
ぐらいかな？

That's
right!



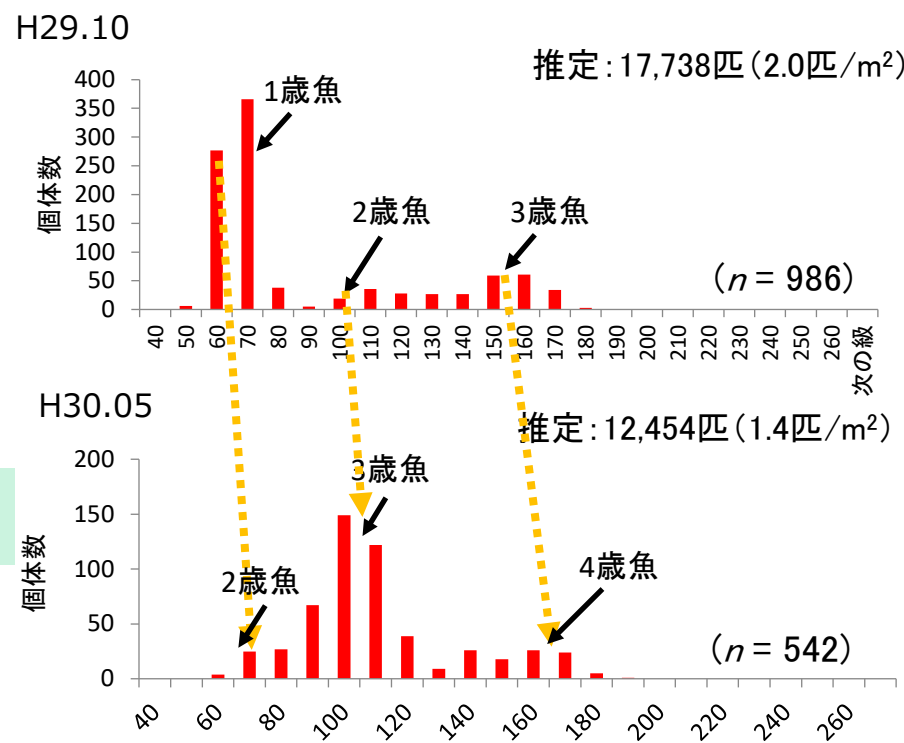
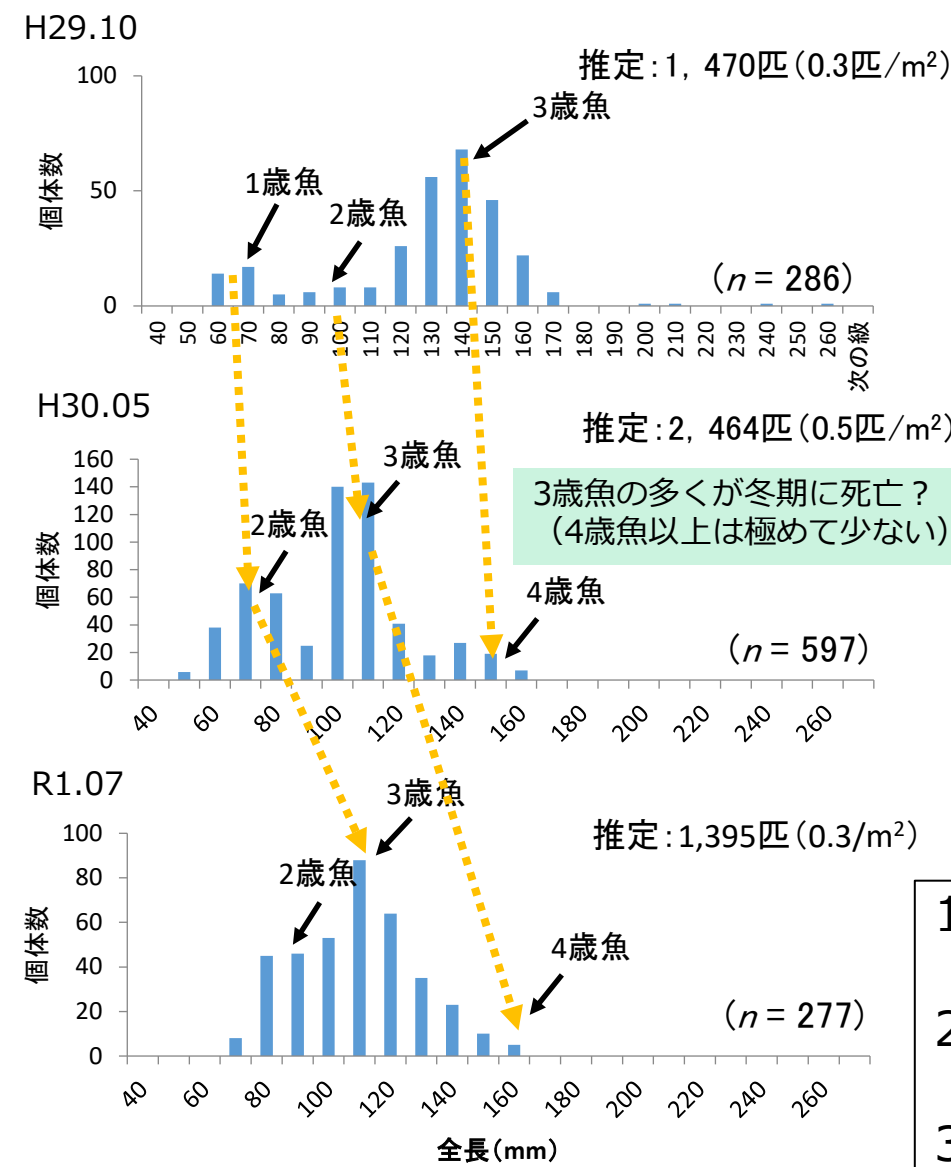
4. データ解析による資源量推定

仮想候補池A、Bにおける個体数推定と年齢組成

繁殖期: 5-7月と想定

候補池A

候補池B



- 1. 繁殖の中心は3歳個体
(琵琶湖を含めて、他の生息地も同様?)
- 2. 3歳魚は冬期に死亡率が高い可能性
(理由不明)
- 3. 冬期は殆ど成長しない

有効集団サイズならびに繁殖貢献度の推定

1. 有効集団サイズ（LD法）

A池		B池	
0歳魚	26.0	0歳魚	Infinite
3歳魚	116.3	3歳魚	28.9
4歳魚	67.4	4歳魚	98.4

2. 繁殖貢献度（Temporal法）

A池		
親魚の年級	0歳魚に対する親魚の有効 集団サイズ (N_E)	繁殖貢献度
3歳	28.6	0.9
4歳	46.2	0.563

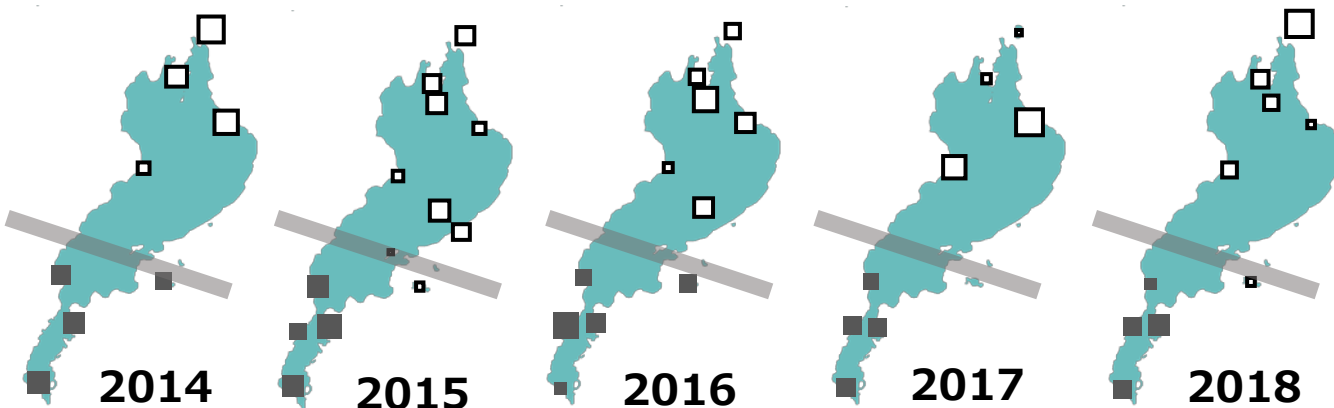
貢献度から
3歳で放流
するのが
効果的

※何れも各年齢につき15個体を分析

繁殖貢献度で見ると3歳魚は4歳魚の1.6倍（繁殖貢献度は3歳魚が高い）

琵琶湖に生息するブルーギルの遺伝的交流様式

琵琶湖における遺伝的クライン (空間主成分分析)



→ 南北間で遺伝子組成に違いが存在？

琵琶湖各集団間の F_{st} (2018年採集個体より算出)

	菅浦	竹生島	姉川	安曇川	西の湖	和邇	守山	雄琴	膳所
余呉湖	0.013	0.006	0.016	0.001	0.018	0.000	0.015	0.016	0.016
菅浦		0.008	0.009	-0.004	0.014	-0.006	0.001	0.003	0.003
竹生島			0.021	-0.008	0.018	-0.002	0.011	0.002	-0.007
姉川				0.010	0.011	-0.005	-0.007	-0.011	0.014
安曇川					0.009	-0.006	-0.004	0.001	0.000
西の湖						0.012	0.008	-0.001	0.021
和邇							-0.008	-0.004	-0.003
守山								-0.012	0.010
雄琴									0.003

内湖や離島などの
隔離性の高い地域は遺伝的分化の
程度が高く交流が少ない傾向にある



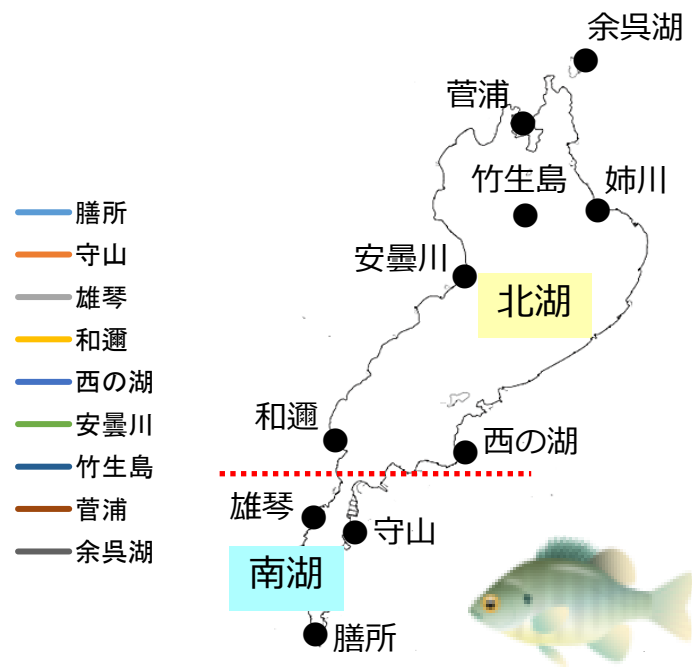
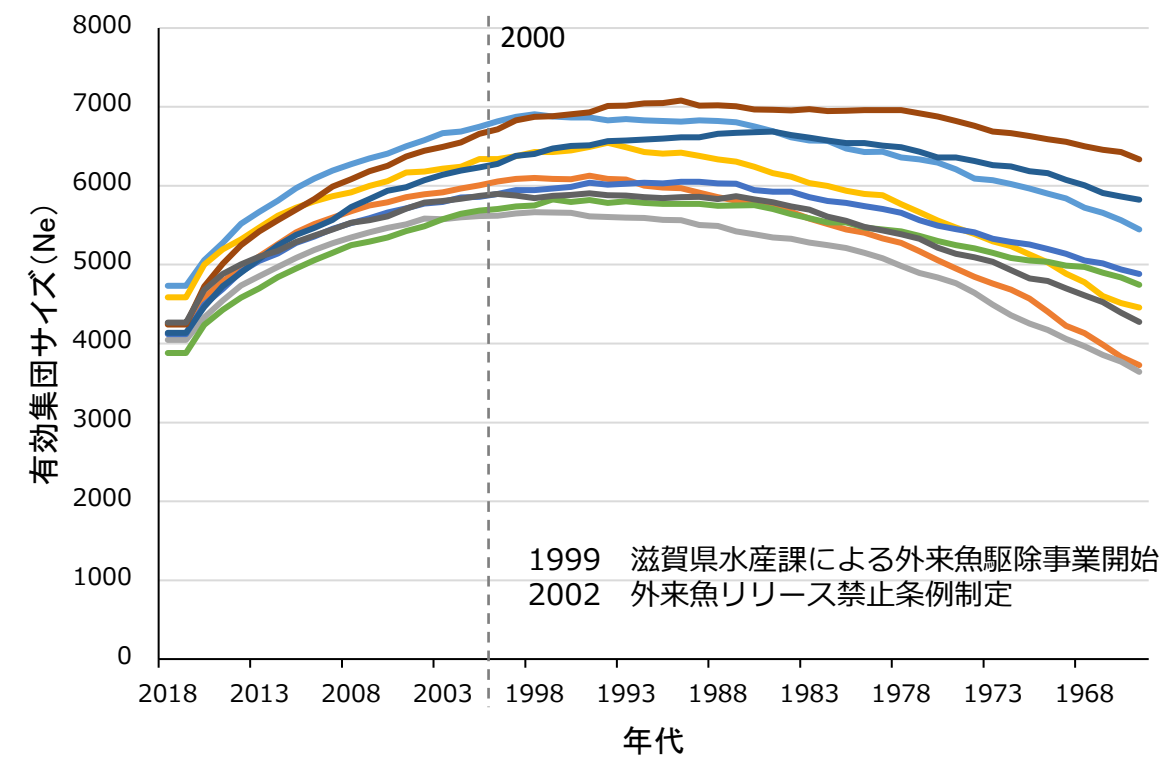
北澤・熊谷 (2007)
を基に作成。

- 湖内では沖合にも生息
- 沿岸の水生植物帯を好む習性 (寺島 1989)

→ 地形・湖流が遺伝的交流の制限に関与？

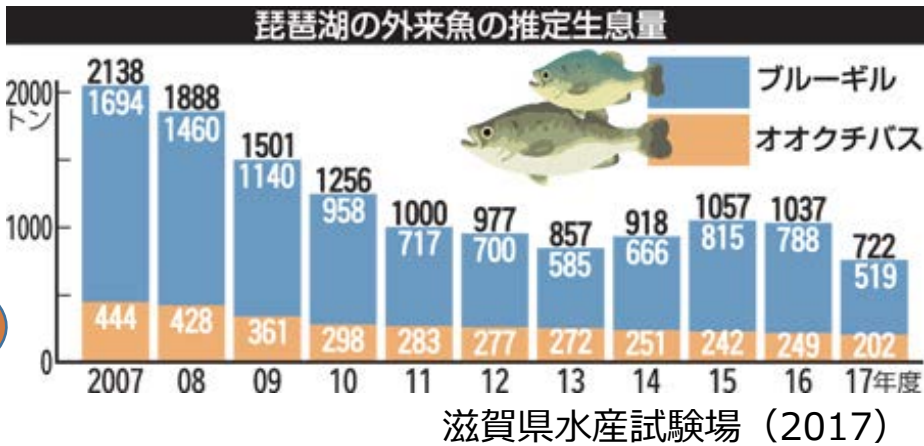
過去における琵琶湖産ブルーギルの有効集団サイズの変動の推定

マイクロサテライト情報を用いたVarEff (Nikolic & Chevalet, 2014) によるシミュレーションの結果



何れの生息地においても2000年頃から
継続して減少傾向

琵琶湖での減少を
遺伝学的に証明！



2. ブルーギルの不妊化防除技術の開発



主要成果

- ✓ ブルーギルの性決定様式を決定
 - ・ メスヘテロ（ZW）型であることを、ゲノム情報から証明
 - ・ 遺伝子制圧法の駆除理論に影響なし
 - ・ YY方式による駆除効果の加算はできない
- ✓ メスの繁殖に関わる遺伝子の欠損ホモ個体の作出達成
 - ・ 生殖腺の形成・成熟解析が可能に
 - ・ 実証試験魚の生産が可能に
- ✓ 編集オスの配偶行動の確認
 - ・ 配偶行動の試験方法を確立

実証・
安全性
研究へ

実証研究に向けて

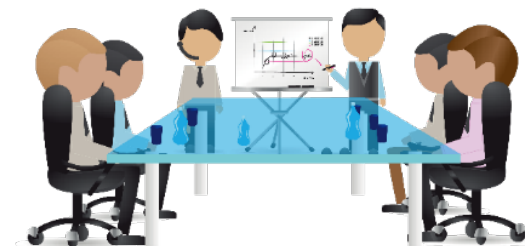
- ✓ どのように活用するか（いつごろ？どの規模で？）
 - ・ 漁協等の防除活動の方々の高齢化、後継者不足

喫緊の
問題

- ✓ 侵略的外来種の防除には、市民の理解、協力が必要
 - ・ 科学的な情報の発信
 - ・ 行政、地域、民間等、様々な立場の方との意見交換

2017-19年度 特別授業3件、市民講座・シンポジウム13件

正確な情報発信と
十分な理解・協力が必要



新しい外来魚の防除技術の開発について



マスコミでの紹介

17.2.15 産経新聞
遺伝子制圧法
ゲノム編集でブルーギルを
根絶へ

19.7.31 毎日新聞
遺伝子操作で外来魚駆除
ブルーギルを不妊化
琵琶湖で実用目指す

17.7.1 びわ湖放送

19.8.24 CBCラジオ
外来魚を駆除する遺伝子
操作の実験すすむ

19.9.27 朝日新聞
ゲノム編集って何？
生命の設計 慎重さが必要

19.10.27 NHKニュース
ゲノム編集で遺伝子操作
外来魚「ブルーギル」駆除に
可能性も

遺伝子
(ゲノム)編集



外来魚問題



放流候補地の選定と地域理解の醸成

背景：ゲノム編集生物について社会的受容が進んでいるとは言えない中、放流試験の実施には地域理解の醸成が必須である。ゲノム編集魚の放流及びそれに伴う合意形成の前例はなく、本研究において社会的合意形成手続きの明確化が必要

目的：放流試験候補地の選定
社会的合意形成手続きの明確化

方法：候補地の現地踏査、聞き取り調査等を行い、情報を収集整理

- ・ 候補地としての必要要件を検討・評価
- ・ ステークホルダーを洗い出し、一覧表として整理
- ・ 説明・理解醸成の実施方針のとりまとめ

放流試験候補地としての主要な要件

- ✓ 生息密度が高い
- ✓ 適度な大きさ
- ✓ 逸出防止管理が容易
- ✓ 立ち入り制限が容易
- ✓ 駆除事業が行われていない
- ✓ 希少種、貴重種等が分布していないか、生息密度が低い



多くの
実施要件

ケーススタディとしての検討実施例

- ・試験候補地の条件に適していると考えられるため池について、管理者等の承諾を得て資源量調査を実施した。
- ・県農林水産部と意見交換を行い、放流試験候補地の希少種・重要種、遺伝子のかく乱、特定外来生物の放流、ため池での魚介類採捕調査等について助言を得た。
- ・ステークホルダーの一覧表を、ケーススタディ例に当てはめ試作した。

説明・理解醸成の方針

- ✓説明会・意見交換会を開催
- ✓既存組織（自治会等）を利用
- ✓プロジェクトの段階やステークホルダーによって説明の方法・内容（重点項目）を変える
- ✓説明の主な内容：プロジェクトの意義、目的、目標、手法、スケジュール、安全・安心に関する事項、外来種問題、プロジェクトにより制限される行為、等

- ・ステークホルダーのニーズを把握するため、コミュニケーションツールとして、本研究・技術に関するFAQを作成した。（次ページ）

「遺伝子制圧技術」の実証放流試験について

FAQ

本研究・技術に関して、皆様がお持ちになるであろう疑問等について Q&A 形式でまとめました。ただし、この資料だけで皆様の全ての関心事にお答えし、全ての懸念を払拭できるとは考えていません。意見交換の際、皆様のご意見等を掘り起こすきっかけになればと考えて作成した資料です。

Q この研究の目的・概要など

A 【研究の名称】

環境研究総合推進費「遺伝子制圧技術による外来魚の根絶のための実証魚の開発」

【目的】

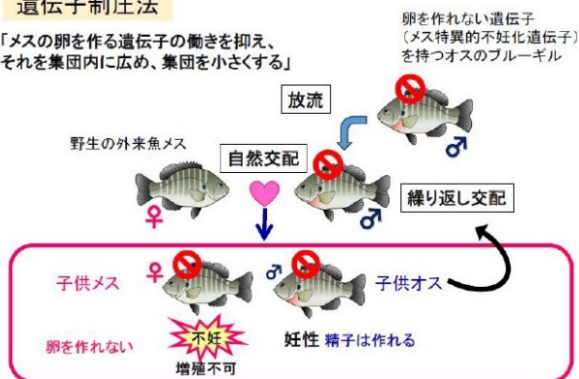
侵略的外来魚による生物多様性の損失を止めるため、その根絶を目的として「遺伝子制圧法」を開発し、技術の確立を目指しています。この技術は、従来の物理的駆除（捕獲、池干し等）が難しい場所にも適用できる利点があります。また、現在は、外来魚としてブルーギルを対象とした研究を行っていますが、この技術はブラックバスやスモールマウスバス等にも汎用できるため大きな波及効果が期待できます。

【概要】

ゲノム編集技術を用い、編集魚「卵を作れない遺伝子を持つオスのブルーギル」（精子は作れます）を作成、放流します。放流されたそのオス（編集魚）は野生のメスと交配し、仔魚が産まれます。産まれた仔魚のうち、メスは成長しても不妊のため産卵しません。オスは「卵を作れない遺伝子」を持って成長、精子を形成、交配に参加し、再び「卵を作れない遺伝子」を持った仔魚が産まれます。これが繰り返されることによって「卵を作れない遺伝子」が個体群に広がり、いずれ根絶に至ります。もちろん、この研究の中で、様々な観点から編集魚の特性や安全性等について確認・検証します。

遺伝子制圧法

「メスの卵を作る遺伝子の働きを抑え、それを集団内に広め、集団を小さくする」



Q 人が遺伝子进行操作することについて

A 人は生物を自分達の食料として都合の良い性質、人が望む優良な性質を持つよう遺伝的に改良して農作物や家畜を作ってきました。これらは偶然によるものですが、優良な性質を持つよう生物の DNA（遺伝子）の情報を変えた、とも言えます。このような生物の改良（育種）のおかげで食料が増産でき、人は繁栄してきました。

近年は、遺伝に関与する DNA の情報が増えたため、これをもとに生物の性質を把握したり、改良したりする研究が増えています。ゲノム編集技術を利用した生物の改良もこのような研究の一部です。これまでは DNA（遺伝子）の情報の変化（塩基配列の変化）を偶然に頼っていましたが、ゲノム編集技術の利用でかなり計画的に塩基配列を変化させることができるようになりました。

遺伝子（DNA）を直接操作するゲノム編集技術は新しい技術であり、倫理的、社会文化的な観点から懸念が示されている他、生態系への影響も危惧されています。しかし、この技術は、食糧の安定供給や、病気の治療、石油に代わる燃料の生産など様々な分野に応用できる可能性があり、人の未来にとって非常に有望な技術です。

本研究では将来的に編集魚の屋外への放流を想定していますが、本研究の中で十分な安全性の検証をします。

Q 外来魚ブルーギルの駆除について

A 外来生物と言えど、在来の生物と同じ命を持つ生き物です。しかし、外来生物が野外で繁殖すると、生物多様性に与える影響が大きく、在来の野生生物の減少や絶滅、農林水産業への影響が懸念されます。外来生物が在来種を捕食したり、在来種の生息場所や餌を奪ったり、在来種と交雑して雑種を作ったりするためです。

特に、ブラックバスやブルーギルについてはこれまで多くの研究がなされ、生態系へ大きな影響を与えることが科学的に示されています。

その地域の在来種が失われるということは、その地域における生物の進化や、生物とともにある文化がなくなってしまうことです。在来の種や遺伝子の多様性は私たちの財産であり、私たちにはそれを将来に引き継いでいく責任があります。

Q ゲノム編集とは？遺伝子組換えとはどう違う？

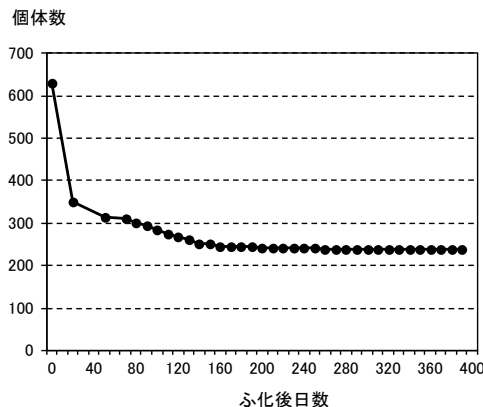
A 「遺伝子組換え」技術とは、別の生物の遺伝子を導入して、元の生物が本来持っていない性質を持たせる技術です。例としては、害虫を駆除できる「Bt コーン」が有名で、ガ等の虫を殺す毒素を作る微生物の遺伝子を組み込んだトウモロコシです。なお、このような遺伝子組換え生物は、食品としての安全性や生態系への影響（生物多様性影響）等について、法律に沿って確認（安全性確保）をした上で利用されています。この虫を殺す毒素についても、人には害を与えないと考えられています。

「Bt コーン」以外にも、農業分野では除草剤耐性を持つダイズや、医療分野では大腸菌によるヒトインスリンの生産が実用化されています。

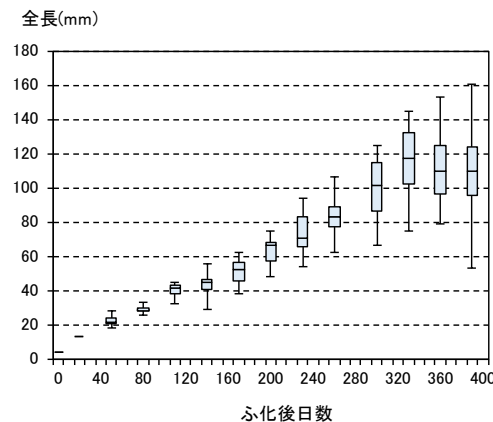
ただし、遺伝子組換えは遺伝子の導入を偶然に頼る面があり、効率性の悪い技術です。

生産支援体制の構築とコスト計算

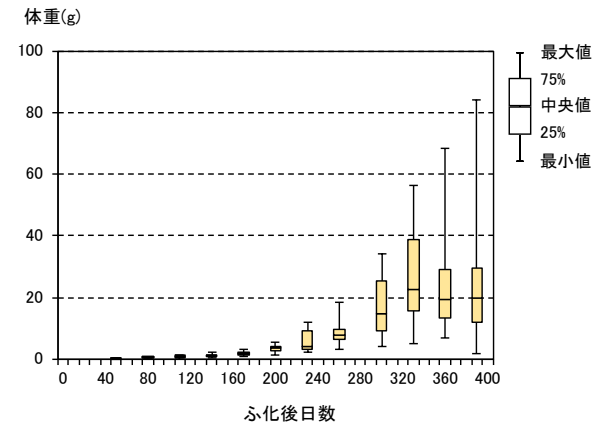
- ・研究分担機関施設（民間）において、ブルーギルの飼育、人為催熟、採卵、人工授精等を実施し、受精卵及び仔魚を得ることができた。仔魚については成魚まで飼育し、再び仔魚を得ることができており、基本的な生産システムは構築できた。
- ・仔魚の成長については、1年で全長100mm程度に成長しており、放流時期によっては放流個体が野生環境での交配に参加できる可能性が示された。
- ・飼育日数とともに成長に個体による大きな差が生じ、放流魚を効率的に生産するため体サイズによって選別し飼育することの必要性が示唆された。



生産した個体の生残



生産した個体の成長(全長、体重)



- ・生産コストは、本施設と同条件の場合、ふ化から1年間の飼育で、1,000個体を生産した場合、約5,700円/個体であった。それを基本に生産コストの削減を検討した結果、年間4,000個体が生産可能であり、約2,200円/個体と試算された。。

- ✓ 200Lパンライト水槽 × 20基
- ✓ 飼育密度50個体/200L
- ✓ 標準的な餌料に加え、高価な栄養価・嗜好性の高い餌料
- ✓ 飼育スペースには余裕あり
- ✓ きめ細やかで丁寧な観察・飼育(年間延べ400人弱)
- ✓ 飼育水に上水を使用

【共通の条件】

- ✓ 約70m²のラボ(毒性試験用施設)
- ✓ 飼育水温24℃
- ✓ 年1回の種苗生産、その後1年間飼育

現状の条件で年間1000
個体生産した場合(実績より)

5,698円/個体

基本的に現施設で可能な効率化を実施したとすると

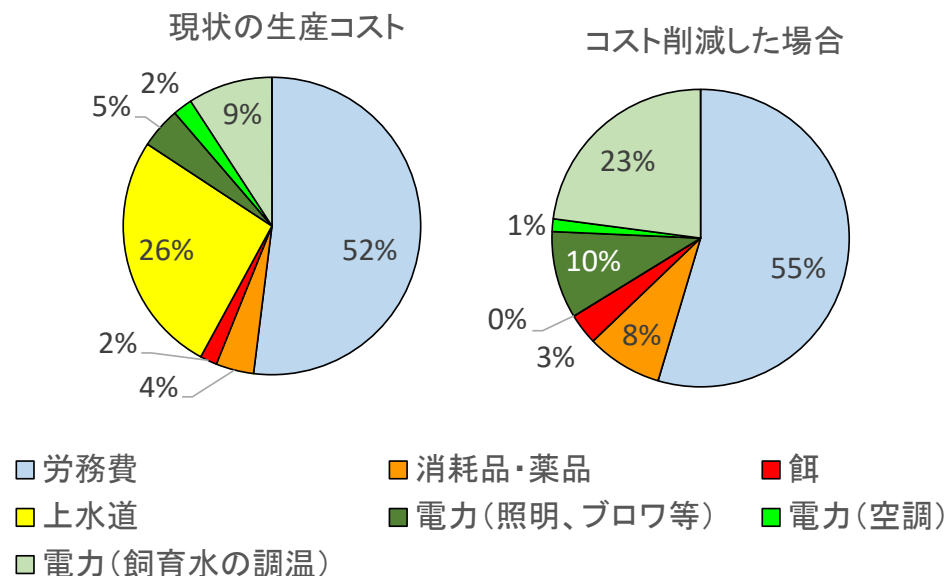
コスト削減と効率化を実施し、年間4000個体生産した場合

2,169円/個体

- ✓ 飼育密度を2倍
- ✓ 水槽数(飼育面積)を2倍
- ✓ 安価な餌料
- ✓ 飼育・観察の簡素化・省力化
- ✓ 地下水を活用

- コストの構造をみると、労務費の割合が高かった。実用化には、スケールメリットを活かした労務費の削減など、さらなるコスト削減が必要。

- 放流サイズ（飼育期間、年間の生産量等コストに影響）と放流後の生残率の妥協点の検討が必要。



項目	現状の生産コスト (円/個体)	コスト削減した場合 (円/個体)
労務費	2,962	1,185
消耗品・薬品	234	179
餌	105	73
上水道	1,500	0
電力(照明、ブロワ等)	254	205
電力(空調)	120	30
電力(飼育水の調温)	523	497
合 計	5,698	2,169

今回のコスト計算は、固定したものではなく、生産条件によって更なるコスト削減を検討すべきものである。

総括・主要成果

新たな外来生物の駆除技術開発の進行状況と主な成果（これまでの成果、今回の成果）

1. 基盤技術開発（環境研究総合推進費4-1408：H26-28）

- ・ブルーギルの人工繁殖・交配技術の開発・確立
- ・ブルーギルの全ゲノム情報の整備
- ・ブルーギルのゲノム編集技術の基盤技術開発

2. 応用技術開発、実証試験準備（環境研究総合推進費4-1703：H29-R1）

- ・不妊化遺伝子ホモ搭載魚の作出
- ・編集ブルーギルの配偶行動試験の実施方法の確立
- ・野生集団の生息量と繁殖貢献度の推定
- ・実証試験に対する社会合意形成手続きの明確化
- ・編集ブルーギルの生産コストの試算
- ・オオクチバス全ゲノム情報の整備

当初、不妊化遺伝子の多重搭載魚の作出とその不妊性の確認までを目標としていたが、次世代の作出に時間を要し、一不妊化遺伝子搭載の親魚候補を得た段階にとどまった。しかしながら、実証試験は一遺伝子ごとに評価が必要であること、また複数の遺伝子について順調に開発が進んでいることから、おおむね順調に開発ステップをすすめることができた。

科学的意義

科学的意義のある主な成果

1. ブルーギルの性決定様式がZWであることを（ほぼ）確定した
2. 野外集団において繁殖貢献度は3歳魚が最も高いことを明らかにした
3. 琵琶湖で有効集団サイズの減少を科学的に明らかにした⇒長年の駆除成果を立証
4. ブルーギルならびにオオクチバスの高品質な全ゲノム情報を整備した
5. メス成熟関連遺伝子3種（*fshb*、*fshr*、*foxl2*）、次年度表現型解析が実施可能

将来展望

実証試験の実施方法について

関係省庁担当者との意見交換（2019年10月31日）における指摘事項

1. 過去に動物で1種使用（野外）の実例はない
2. 1種使用の前に2種使用（管理区域内）条件下において駆除能力の証明が必要
3. 増殖率など野生集団でなければとれないデータがあったとしても、まずは管理区域内で取れる生物情報及び環境影響評価情報の収集が必要
4. 外来核酸が含まれていないことを示す必要

今後必要な飼育施設と実施上の要点

上記、提案試験（管理区域内）の実施には、以下の要件を満たす人工池が必要

1. ブルーギルが自然繁殖できるサイズの人工池（数十尾が繁殖するために、例えば10x10m四方以上のサイズ）とその上面を覆う上屋(ネット付きフェンス等) および排水に二重トラップが必要
2. 当所属機関の人工池を使用する場合、上記整備に（数百万）が必要
3. 駆除効果の比較には、試験区及び対照試験区用に人工池が最低2面必要
4. 試験期間中あるいは終了後に、全尾測定、サンプリングの必要があるため、完全排水できる仕様が必要
5. 野外では成熟にオスは1-2年、雌は2-3年かかると想定されるため、不妊化魚の投入密度を変えるなど試験条件を振るなど、試験期間を短くする工夫が必要

将来期待される主たる成果、副次的成果

期待される主たる成果（含 科学的知見）

1. 遺伝子の機能欠損解析によるブルーギルの卵成熟メカニズムの解明
3. 不妊化遺伝子のブルーギル野生集団への浸透様式の解明（駆除効果の立証）
4. 昆虫など他の外来生物種への応用
5. 侵略的外来種からの生態系の回復

副次的成果

1. ゲノム編集生物の野外使用の指針作り（ケーススタディとしての活用）
2. 魚類を中心とした不妊化技術の標準化（魚種によって難度が異なる可能性）
3. 外来種問題、環境問題に対する市民意識の向上、再認識、啓発
4. 駆除・防除関係者の高齢化、後継者不足問題に対応し、本駆除技術の事業化、公益団体による活動等、新しい形態の防除活動および支援の検討
5. 地域・地方に合わせた外来種問題への貢献、新規駆除技術の開発情報の提供・情報交換等による国際貢献と国際研究協力体制の構築

“遺伝子制圧法”の開発行程

防除効果の実証

基盤技術開発

実証魚の開発 と実証試験の準備

R3年度
次期研究予算
応募準備中

H26年 環境研究総合推進費
4-1408

H29年 環境研究総合推進費
4-1703 R1年

