

自動キャピラリー電気泳動システムを用いた ゲノム編集技術による 高速品種改良水産物のスクリーニング

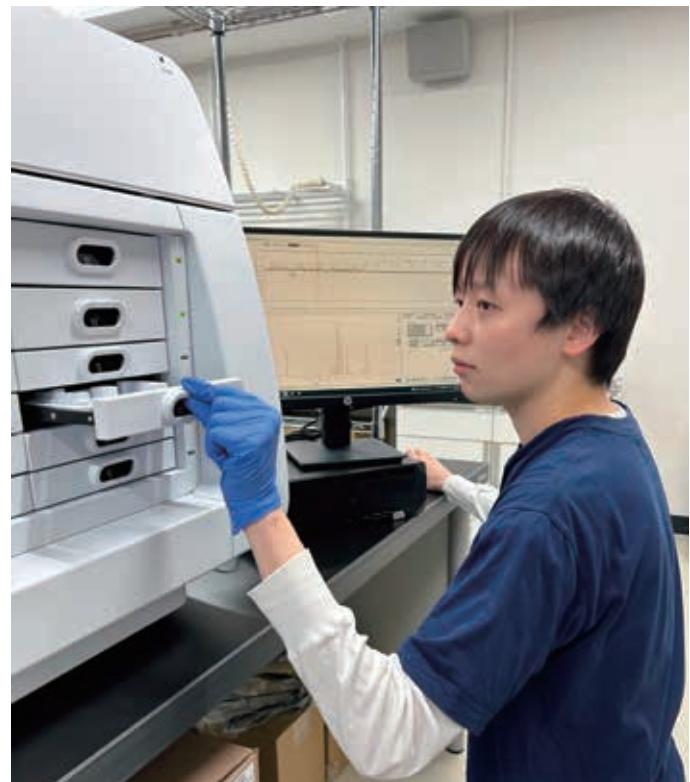
はじめに

ゲノム編集は、標的とする遺伝子を特異的に改変する技術であり、従来の遺伝子組換えと違い外来遺伝子を導入しないなどの利点から、近年ではさまざまな分野で応用が進んでいます。

今回はリージョナルフィッシュ株式会社 研究開発部 魚類育種グループ 主任研究員の國井厚志博士にお時間をいただき、アジレントの自動キャピラリー電気泳動システムである Fragment Analyzer と ZAG DNA Analyzer（以下 ZAG）を利用した品種改良水産物のスクリーニングについてお伺いしました。



Agilent Fragment Analyzer System



國井厚志博士と Agilent ZAG DNA Analyzer System

Q. リージョナルフィッシュ株式会社について教えてください

弊社は、ゲノム編集等の技術を用いた超高速な水産物の品種改良と、IoTなどを活用したスマート養殖を組み合わせ、より効率的かつ持続可能な日本の水産業への貢献、さらには世界のタンパク質不足といった食料問題の解決を目指しています。2021年には世界初のゲノム編集動物性食品となる22世紀鯛、続いて22世紀ふぐを、2024年には22世紀ひらめを上市しました。我々のグループでは、水産物、特に魚類の品種改良に関する標的遺伝子の選定から、ゲノム編集による新品種の開発、さらにゲノム編集手法の研究を行っています。

Q. Fragment Analyzer/ZAG の活用方法、使用しているキットを教えてください

弊社では多検体を迅速に処理するために、96サンプルを同時に分析できる5300 Fragment Analyzerと、96-well plateを最大

で9枚セットできるZAGを導入しています。ゲノム編集によって標的遺伝子領域に変異が生じたかどうかの確認に、PCRと電気泳動が必要なHMA(Heteroduplex Mobility Assay)*を実施しており、バンドパターン(図1)などの確認にFragment AnalyzerとZAGを利用しています。ほとんどの場合、dsDNA 905 Reagent KitおよびZAG 105 dsDNA Kitを使用し、500 bpまでの範囲で泳動像を取得します。変異の種類(例えば3塩基欠失と4塩基欠失)によって、野生型とのヘテロ二本鎖のバンドパターンが異なるのですが、長い增幅産物ではその違いの区別が難しい場合や、ヘテロ二本鎖のバンドがUpper Marker(500 bp)に干渉してしまう場合があること、逆に短い増幅産物では変異を配列レベルで調べるダイレクトシーケンスができないことから、増幅長は200 bp前後に落ちています。HMA以外にも、通常のPCR産物の確認やNGSライブラリの品質評価を行う用途もあり、目的によっては500 bpよりも大きなサイズに対応したキットを使用しています。

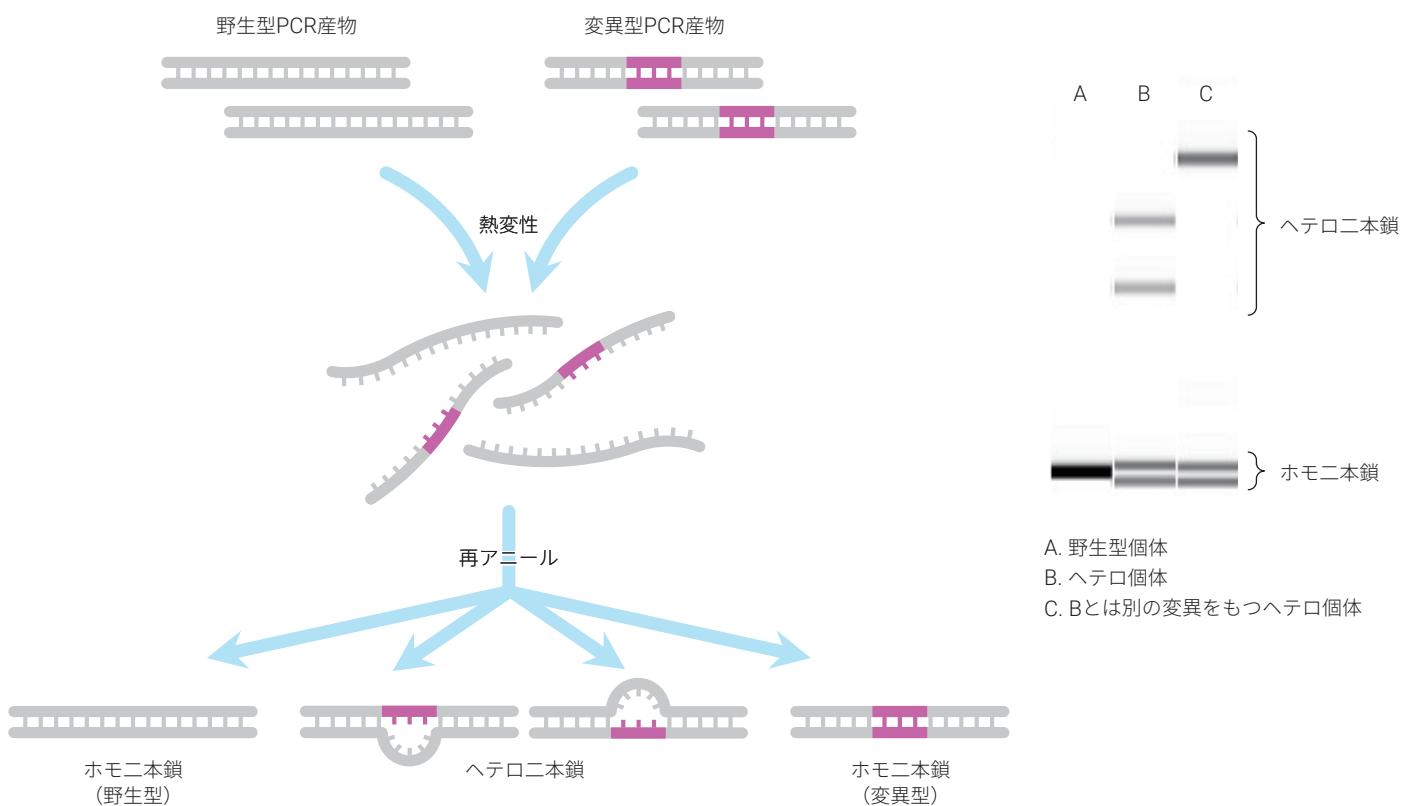


図1 HMA (Heteroduplex Mobility Assay) の概要とバンドパターン

Q. Fragment Analyzer と ZAG の使い分けはどうされているのでしょうか？

サンプル数とランニングコストを確認し、どちらの機種で解析するかを決めています。また、同日に異なるキットを使う場合は、ソフトウェア上でのゲルの切り替えや、試薬プレートの入れ替え（96 キャピラリーの場合に必要）における人為的なミスや手間を避けるため、別々の装置でそれぞれ解析をするようにしています。

Q. 1 日にどのぐらいのサンプルを処理されるのでしょうか？

魚類は産卵の時期が決まっているため、解析はどうしても一定期間に集中するのですが、多いときには 96-well プレート 5、6 枚分を連日解析することもあります。なぜこのような膨大な数になるか？これは魚類の特徴ですが卵を大量に産むこと、また変異の確認を複数の飼育段階で行う必要があるからです。品種開発の流れとしては、まず受精卵にマイクロインジェクションでゲノム編集ツールを導入し、F0 世代を作製します。ツールの導入後、卵割をしていく過程で細胞ごとに独立して変異が生じていき、全体としては多様な変異のモザイクとなるため、導入していないサンプルと比較しバンドの乱れがあるかなどで変異の有無を確認します。この世代では最大でも数百尾程度の確認なので、サンプル数はそれほど多くありません。変異の導入に成功した個体と野生型個体を掛け合わせた次の世代（F1 世代）では、F0 個体のある 1 つの生殖細胞での変異が受け継がれてヘテロ接合となるので、この世代ではバンドパターンによる変異の識別を行います。まず前段階として、F1 世代の胚（孵化前の卵）を一部サンプリングし、どの F0 個体を親として使うか検討します。ヒレと生殖細胞での変異の入り方は完全に一致しているわけではないので、ヒレに統いて胚での確認も必要になるというわけです。F0 世代 1 個体あたり 30～40 の F1 胚を解析して、その F1 集団がもつ変異の種類や頻度を推測し、親個体として有望とみられた場合は追加で野生型個体との掛け合わせを行い、F1 世代を育てます。次に、ヒレが採取できる程度に成長した段階で、各 F1 個体がもつ変異の確認を行います。この世代以降、変異のホモ化が完了するまで解析するサンプル数は膨大になります。また、複数遺伝子領域での変異を狙っている場合は、1 サンプルにつき複数の PCR 産物の確認が必要となり、泳動数は倍々に増えていくので、ハイスループットで解析できる装置が必須です。

Q. 弊社製品を使用するメリット、また改善点やご要望があれば教えてください

先ほどの話のように一度に解析するサンプル数が膨大になるので、ハイスループットであることが一番のメリットです。さらに、これは想定していなかったのですが、分解能が高くバンドパターンの差を明確に判別することができます。通常は 4、5 塩基から十数塩基程度の欠失をターゲットとしていますが、ツールの特性上 1 塩基の欠失や挿入が起こる場合があります。この 1 塩基レベルの変異も、確実ではありませんが野生型と区別できことが多いです。一時期、同じサンプルでも泳動回によってヘテロ二本鎖のバンドのパターンが変わってしまうといった問題があったのですが、ゲルの量をある程度正確に測ることで改善しました。使い勝手に関しては特に問題はなく満足しています。コストをもう少し下げることができれば大変ありがたいと思います。

* HMA (Heteroduplex Mobility Assay)：ヘテロ二本鎖移動度分析。ゲノム編集の標的サイト周辺領域を PCR で増幅した後、熱変性・再アニールにより、変異型 DNA と野生型 DNA（場合によっては 2 種類の変異型 DNA）のヘテロ二本鎖を形成させます。ヘテロ二本鎖はホモ二本鎖と構造が異なり、電気泳動時の移動度が顕著に小さくなっているため、変異の有無を目視レベルで確認することができます。

Agilent Fragment Analyzer System

Agilent Fragment Analyzer system は、自動パラレルキャピラリー電気泳動を使用して、DNA フラグメント解析、NGS ライブラリ、cell-free DNA (cfDNA)、RNA QC などの幅広いアプリケーション向けの核酸品質管理を提供しています。

シンプルなサンプル調製、自動分析、および直感的な解析ソフトウェアにより、効率的で正確な測定が実行できます。

主な利点

- 幅広い DNA および RNA キット
- アプリケーション間のシームレスな切り替え
- 装置の準備作業を最小化
- 自動分析

詳細はこちら



aglt.co/FragmeentAnalyzer-RF



Agilent ZAG DNA Analyzer System

Agilent ZAG DNA Analyzer system は、多検体の DNA フラグメント解析ワークフローにおけるボトルネックを解消します。

このシステムではパラレルキャピラリー電気泳動を使用して、1 日あたり数千もの DNA フラグメントサンプルを処理できるため、アガロースゲルの使用による障壁を取り除けます。

主な利点

- 高スループット
- 幅広いサイジング範囲
- 短い分離時間
- 高分離能

詳細はこちら



aglt.co/ZAG-DNA-Analyzer-RF



[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カストマーコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

www.agilent.com/genomics/genomics-jp

G250768

© Agilent Technologies, Inc. 2025

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, OCT. 2025

5994-8683JAJP