

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H02564

研究課題名(和文) in vivo選抜育種による魚類育種の加速化実現

研究課題名(英文) Acceleration of fish breeding in vivo through germline chimera

研究代表者

山羽 悦郎 (YAMAHA, Etsuro)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：60191376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：産業的に重要な魚種の多くは、初期減耗率が高く世代時間が長いため育種に時間がかかる。本申請では、育種の短縮化のために、多数の胚から分取した始原生殖細胞(PGCs)を少数の宿主胚へ移植した生殖系列キメラを誘導し、この個体の中でPGCsの選抜を目指した。セルソーターで初期胚からのPGCsの分取を行い、これらをまとめて宿主胞胚に移植する技術開発を行った。分取された多数のPGCsを胞胚へ移植すると、宿主胚の様々な領域への移動やPGCsのみの細胞塊が形成され、本来の生殖腺形成部位への移動率は低かった。遺伝的に多様なPGCsを持つキメラの誘導には、生殖腺への直接移植などの方法が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業作物では、バラバラに分離・培養された細胞の中から有用なものを選び出し、短期間で新しい品種が育成されている。動物では細胞から個体を再生できないが、卵や精子になる細胞(始原生殖細胞:PGCs)を宿主に移植すると、たったひとつだけからでも卵や精子になることは知られていた。そこで、機械で分離した多数のPGCsを体の中で培養・選別する技術を確認し、短期間で系統の樹立を試みた。結果として、今回用いた方法では、多数のPGCsを宿主の生殖腺へ組み込むのは困難で、数個しか組み込めなかった。少数ながらPGCsが組み込まれた個体から次世代が得られれば、育種の短縮が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It takes a long time for genetic breeding in commercially important fish species, because of their low survival rate in their early stage of development and long generation time. When germline chimeras, in which primordial germ cells (PGCs) with genetic diversity are transplanted into host blastula of different species are induced, only PGCs adapted under different gonadal environment are expected to differentiate into normal gametes. As these chimera individuals will select such adapted PGCs in vivo, they shorten the breeding times. In this application, we established such techniques, namely cell sorting of visualized PGCs with GFP fluorescence at the blastula stage, loading into glass needle as cell mass, and transplantation into the host blastula. When a large number of sorted PGCs were transplanted, low number of them migrated to host gonadal region, while many distributed various regions of the host embryo and formed cell mass in some cases. Other methods will be required.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：始原生殖細胞 生殖系列キメラ 魚類 育種 セルソーティング PGCs

## 1. 研究開始当初の背景

魚類養殖において品種の育成は急務である。しかしながら、育種の世代交代には時間がかかるため、短縮の技術が必要である。植物育種では、花粉培養技術により半数体ゲノムの中から目的の形質に係るゲノム構成を持った細胞を一代で選び出せる。そして、この半数体のゲノムの倍加や交配で、次世代でヘテロシス育種や形質選抜が容易になる。すなわち、選抜対象を「個体」から「細胞」へ移すことで育種に必要な時間を大幅に短縮できている。このようなアプローチは動物育種では行われていない。

申請者らは、たった一個の始原生殖細胞 (PGCs) を、不妊化した宿主個体に移植することにより生殖系列キメラを誘導し、機能的に正常な卵および精子を得ることに成功している。このことは、多数の集団・個体から遺伝的に多様な PGCs を集め、少数の宿主に移植すると、遺伝的に多様な配偶子を少数の親魚から得られることを意味する。この時、ドナーPGCs の中で、宿主環境に適応できない細胞、配偶子へ分化するために必須の遺伝子を持たない細胞、なんらかの理由で他の PGCs より生残能力の低い細胞は排除される。すなわち、ドナーPGCs の中から目標とするゲノムをもつ細胞を生体内で選抜できると考えられた。

PGCs は、近縁種の生殖腺中でしか配偶子に分化できないとこれまで考えられてきた。しかし、上述の手法を用いれば、遠縁種の生殖腺中でも分化できるゲノム構成を持つ PGCs のみを選抜 (*in vivo* selection) できる可能性がある。選ばれた PGCs を世代交代時間の短い宿主に移植することで、育種のを速度を飛躍的に促進することができるものと考えられる。

また、この生殖系列キメラの手法を用い、人為雌性発生により誘起した半数体の PGCs を生残性の二倍体あるいは三倍体の生殖腺で培養 (生体内培養) すると、この半数性の PGCs から遺伝的に均一なクローン精子が生み出されることを明らかにした。すなわち、通常致死性の半数体ゲノムを生残性の宿主生殖腺で生体内培養することで、配偶子に分化可能な半数体ゲノムを選抜できることが示された。この一個の半数体 PGCs に由来する配偶子は遺伝的に均一なクローン配偶子となることが判明している。様々な半数体 PGCs に由来するクローン配偶子、すなわち遺伝的に均一な卵と精子の掛け合わせにより、ヘテロ接合のクローン、すなわちヘテロクローン品種が作製できる。このようなヘテロクローンでは雑種強勢 (ヘテロシス) が期待できるので、その由来するゲノムを選抜することで、優良形質を示す集団を作成できる。

## 2. 研究の目的

(1) 産業的に重要な魚種の多くは、初期減耗率が高く世代時間が長いこと、育種に時間がかかる。作物品種では花粉培養やソマクローナル変異などの細胞培養技術を用い、育種期間を短縮している。魚類では、体細胞から個体を作り出すことが困難なため、細胞の選抜による育種は行われていない。本申請では、始原生殖細胞 (PGCs) を用い、選抜の対象を「個体」から「細胞」へ移し、魚類の育種期間を短縮化する技術を確認することを目的とした。

(2) 上述の技術の確立に続き、①遺伝的多様性を有する PGCs の中から、遠縁種の生殖腺で配偶子に分化できるゲノム、および配偶子形成に係る全ての遺伝子が正常である組み合わせのゲノムを生体内で選抜でき、②育種期間の短縮を可能とする育種技術の確立、③様々な魚種で遺伝的多様性を有する PGCs を分離する技術の開発、を目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) 上述の目標を達成するために、多様性を持つ多数の胚から PGCs をセルソーターで分離し、適宜、様々な宿主へ移植し、宿主生殖腺での配偶子分化過程を解析する。

(2) 配偶子の形成が確認されたのち、半数体の PGCs から誘導されたクローン配偶子の交雑により雑種強勢系統、あるいは核・細胞質雑種の配偶子を得、実際に育種に利用できるかを確認する。PGCs をセルソーターで特異的に分離するための、PGCs マーカーの開発を目指した。

## 4. 研究成果

(1) 胞胚細胞のセルソーティング手法の開発：本研究では、胞胚期に解離させた胚細胞に由来する初期の PGCs を材料とした。その理由として、個体としては致死の胚などからも細胞が得られる、増殖/生殖隆起への移動能力が高いなどが挙げられる。特に、本研究で材料とする半数体は致死であり、胚発生の初期に死亡する場合も多いからである。一方、①胚あたりの数 (約 4-16 細胞/胚) が少なく胚の数も限られること、②サイズが大きく (直径 20-40  $\mu$ m) 運動能力の高い細胞で壊れやすい、③夾雑物が多く流路の詰まりが生じやすい、等の問題点がある。本研究では、人工的なキメラ mRNA を、キンギョまたはゼブラフィッシュの受精卵 (あるいは雌性発生半数体卵) に注入して PGCs を GFP で顕在化させ、その蛍光を指標にセルソーターにより分取した。本研究費で購入した機種を含め 4 社の

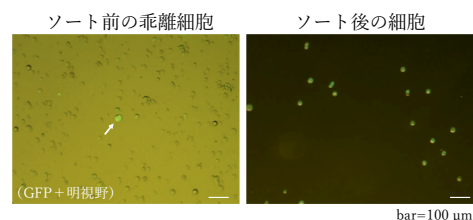


図1. ゼブラフィッシュでのGFP標識細胞の液滴型セルソーターによる分取

セルソーターを用い、胞胚期に解離させ、GFP 蛍光で顕在化させた細胞からの PGC 分離を試みた。(1)-① 液滴方式によるセルソート：この方式では、細胞を懸濁させた溶液を流路から空気中へ放出する際に液滴とし、目的細胞が入った液滴に電圧をかけてコレクトチューブ内に分取する。そのため、剪断力・高水圧・超音波・高電圧・着水時の衝撃があり、大型細胞にはダメージが大きい。本研究で購入した機種については微細な流路を持つソーティングチップを経由する。そのため、通常の生理的塩類溶液などに懸濁した胞胚由来の大型細胞はほとんど分取できなかった。この問題に対するために様々な溶液で条件検討を行った。その結果、高濃度の BSA などのタンパク質を加えて細胞膜を保護する培養液での細胞の懸濁が有効であった (図 1)。

(1)-② ダメージレスセルソーティング：液滴を形成しない機械的な動作により、細胞を分取する分取方式である。このため、液滴方式のようなダメージがかからず、巨大でデリケートな細胞を分取できる。この方式の 2 社のソーターを試したが、どちらも運動性の高い PGCs の分取が可能であった。しかしながら、一方の機種は分取の速度が遅く得られる細胞数が少なかった。いま一方のものは、一回の分取での純度が低く、繰り返しにより純度を上げる方式で、繰り返しの際の PGCs の回収に難があると考えられた (図 2 A)。最終的に、どちらの機種も分取後の移植に至るまでの過程でのロスが大きく、本研究での目的には合致しないものと考えられた。

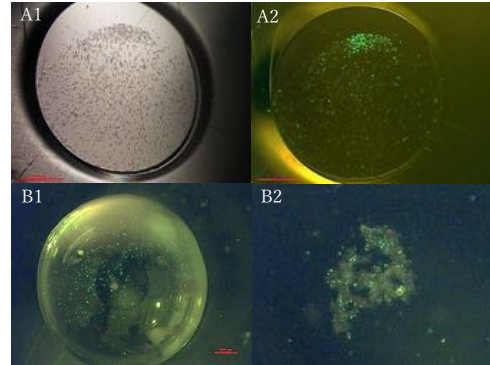


図 2. ダメージレスのセルソーターでの PGCs の濃縮 (A) と濃縮された細胞での細胞塊の誘導 (B)。

(2) 分取細胞の検定：本研究では、受精卵への人工 mRNA の顕微注入により PGCs に GFP 蛍光を与えて顕在化を行っている。この方式では、バックグラウンドに GFP 蛍光が生じるため強い蛍光細胞が必ずしも PGCs とは限らない。そこで、PGCs に特異的な Vasa タンパク質に対する市販の抗体 (abcam209710) を用いて、分取した GFP 蛍光を有する細胞が Vasa タンパク質を持つかを検討した。その結果、ゼブラフィッシュでは分取前  $5.7 \pm 1.5\%$  の蛍光細胞が、分取後の  $93 \pm 0.98\%$  が、キンギョでは分取前  $3.2\%$  が後に  $87\%$  が Vasa 陽性細胞であった。このことは、本研究で用いた胞胚期で解離した GFP 陽性細胞には体細胞系列の細胞が混在すると考えられた (図 3)。

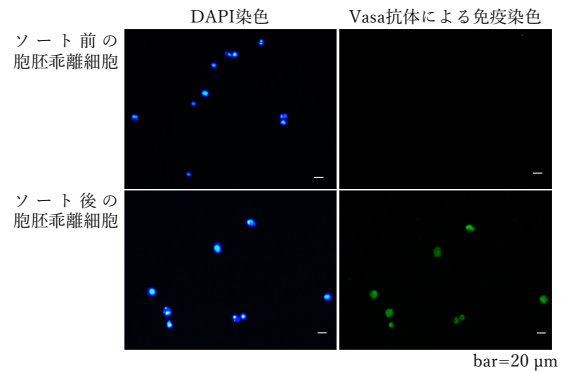


図 3. ソート前後のゼブラフィッシュ乖離細胞に対する Vasa 免疫染色による PGCs の検定

(3) 分取細胞の移植法の開発：胞胚期で解離した PGCs は大型で壊れやすく、分取後は基質への接着性が高かった。分取した PGCs を複数宿主胚へ移植するため、分離した細胞の宿主胚への移植方法を開発した。

(3)-① 分取細胞の凝集塊の誘導と移植：ダメージレス型のソーターで回収した高頻度で PGCs を含む細胞集団を細胞低接着型シャーレ中で水平振盪し、PGCs を含む細胞塊を得た (図 2 B)。塊状化した細胞は、移植用のガラス針の先端から吸い込むことはできなかった。細胞塊を、針の後端から挿入し、インジェクションにより宿主胞胚へ移植したところ、体節期では PGCs が確認されたがその後消失した。

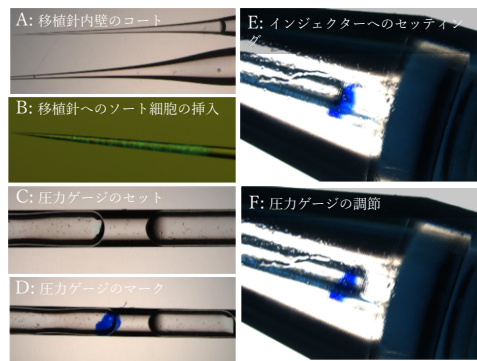


図 4. 分取細胞の移植針へのセッティング

(3)-② 分取細胞の濃縮と移植：液滴型のソーターにより分離した PGCs を高濃度のタンパク質を含む溶液を満たしたシリコンコーティングテストチューブに採取し、その後の遠心処理で分取後の PGCs を高密度での濃縮が可能となった。針の後端からの高濃度の分離細胞の挿入では、細胞の針の内壁への接着が起こり、針先端への細胞の集中が困難であった。そこで、まずプーラーで作成した先端が閉じたままのガラス針の内面をタンパク質によりコーティングした。続いて、ゲルローディングピペットを用い、ガラス針の後端より細胞懸濁液を挿入した。細胞液を挿入したガラス針自体をスウィング型遠心機で遠心し、分取細胞を針先へと集めた (図 4 A)。分取細胞を先端に集めたガラス針をインジェクターへ装着し (図 4 B-F)、宿主胞胚へ移植し、その後のドナー細胞の移動を確認した (図 5)。その結果、分取した細胞が生殖腺へ移動する確

率は低く、ホスト胚の様々な領域に分布した (図6)。特に、ドナー細胞が卵黄上に細胞塊を形成するなどの、正常胚では観察されない分布が確認された。

(4) 半数体 PGCs のソーティング：雌性発生半数体の誘導では、第2極体を放出しない自然倍加が稀に起こり、二倍体の胚が混在する。半数性の PGCs を得るためには、半数体細胞のみをソーティングする必要がある。紫外線を照射した精子により受精した卵に人工 mRNA を注入し、PGCs に GFP 蛍光を与えた。胞胚期で割球を解離後、培養して胚細胞を回収し、さらに Hoechst33342 で生体核染色を行った。半数性でかつ GFP 蛍光を有する細胞の分取を試みた。Hoechst33342 染色による半数体細胞と二倍体細胞の区別は、細胞質のバックグラウンドによって差が大きく、必ずしも一定の差が得られなかった。

(5) 生殖細胞質を有する細胞の分離：PGCs は、生殖細胞質を受け継いだ割球から分化する。生殖細胞質には *buckyball1(buc)* という遺伝子の転写産物が含まれることが知られている。受精卵へ GFP-*buc* mRNA を顕微注入することで生殖細胞質に蛍光を付与できる。そこで、キンギョを材料として蛍光を付与した生殖細胞質を有する割球をソーティングし、PGC に分化する割球の頻度を高めた上で、同種のホスト胞胚への移植を行った。ソーティングと移植の手順は、(3)-①と②に従った。分取した細胞の GFP-*buc* の蛍光は、その後消失してしまうので、分取後に PKH26 で赤色蛍光を、あるいは biotin-dextran により組織学的な標識を付与してからホスト胚への移植を行った。分取細胞を移植された胚のうち生殖隆起領域に蛍光細胞が確認されたのは 36.8% のみであった。組織学的な解析で、標識細胞が背側体腔壁への取り込みが確認された。

(6) 人工 mRNA を用いない PGC の濃縮：ゼブラフィッシュでは、GFP-*buc* mRNA を注入した胚での蛍光細胞が、細胞内構造の複雑性を示す SSC の値が高い傾向が見られる。このことから、胞胚期の細胞のうち、SSC の高い領域のソーティングにより、PGC の頻度を高めた細胞群が得られると考えられた。また、胞胚において生殖細胞が局在する胚盤の下部の周縁部は卵黄に近いので、卵黄顆粒をより多く取り込んでいると考えられた。そこでゼブラフィッシュ卵黄顆粒成分リポビテリンの抗体を作成し、PGC の分化と卵黄顆粒の量との関連性を調べた。SSC の高さを指標にして分取直後の胞胚細胞では、生殖細胞の指標とされる *Vasa* に対する抗-*vasa* 抗体を用いると、55.3%の細胞が陽性であった。また、分取 24 時間培養後の細胞では、抗-*vasa* 抗体陽性のもは、ほとんど観察されなかった。このことは、分取直後の *vasa* の発現は、母系由来のものであると考えられる。一方、抗-リポビテリン抗体に陽性の細胞は、分取直後では 94.8%、2 時間後に 42.5%、さらに分取後 24 時間では 24.3%となった。その後の PGCs でのリポビテリンの残存は明確とはならなかった。これらのことから、SSC を指標とした PGCs の濃縮、あるいはリポビテリンを指標とした選抜は困難と考えられた。

(7) 多様性を生み出す精子の凍結保存：雌性発生半数体は、紫外線で遺伝的な不活性化を行なった精子により誘起するが、卵の第2次極体放出の自発的な停止による雌性発生2倍体が混在する。また、数多くのメス親魚からの採卵が困難なため、遺伝的多様性が限られる。確実な半数体の誘起と多様性の確保のためには雄性発生半数体の誘導が望まれる。また、多様性の確保のためには多数の個体の精子を凍結保存も必要である。本研究で用いられているキンギョでは精子の凍結保存法が確立されていない。そこで、メタノールと数種の糖を抗凍結剤として使った凍結保存を検討したが、希釈後のゲル化が起こるなど解凍後に受精可能な精子を得るための条件が見つかっていない。

(8) 本研究ではセルソーターを用いて初期胚から数多くの PGCs を得、これをホスト胚に移植し、遺伝的に多様な生殖細胞の体内で培養・選抜を試みた。しかしながら、初期胚の PGCs は脆弱で取り扱いづらく、さらにホスト胞胚への多量な移植ではドナー細胞の塊状化、異所的な分布が高頻度で起こり生殖隆起への到達率が低かった。そのため、生殖系列キメラの誘導ができなかった。この結果は、個々の PGC と集団としての PGCs の細胞としての振る舞いが異なると考えられ、発生過程における PGCs の生殖隆起への移動の分子機構が、限られた数の移動しか容認していない可能性を予想させる。ソーターにより分離した PGCs を孵化胚の生殖隆起部分への直接移植を試みているが、肯定的な結果は現在のところ得られていない。生殖隆起への遺伝的に異なる複数の PGCs の取り込みを予想した研究当初の目標を検討し直す必要がある。

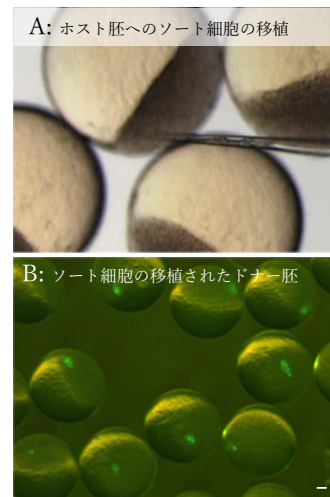


図5. ソートしたゼブラフィッシュ GFP 標識細胞のホスト胞胚への移植

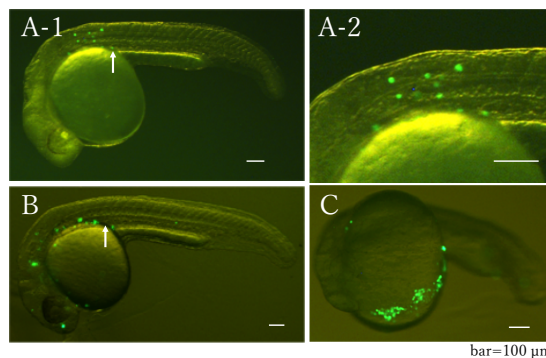


図6. ホストゼブラフィッシュ胚へ移植されたソート細胞 (緑色細胞.A:ゼブラフィッシュ, B, C:キンギョ) の分布。→は生殖腺原基の位置を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤祐助・藤本貴史・斎藤大樹・後藤理恵・松原孝博・山羽悦郎
2. 発表標題 半数体始原生殖細胞の細胞選別と移植技術の改善
3. 学会等名 令和2年度 日本水産学会北海道支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 斎藤大樹・後藤理恵	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学別冊 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A 正しいデータを出すための100箇条 Q96	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤本 貴史  (FUJIMOTO Takafumi)  (10400003)	北海道大学・水産科学研究院・准教授   (10101)	
研究分担者	松原 孝博  (MATSUBARA Takahiro)  (60443389)	愛媛大学・南予水産研究センター・教授   (16301)	
研究分担者	後藤 理恵 (風藤理恵)  (GOTO Rie)  (70399997)	愛媛大学・南予水産研究センター・准教授   (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 大樹  (SAITO Taiju)  (90396309)	愛媛大学・南予水産研究センター・准教授（特定教員）    (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関