

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：85502

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892033

研究課題名(和文) 新たな放流用種苗生産技術の開発：凍結保存した生殖細胞から天然トラフグ種苗をつくる

研究課題名(英文) Development of a new methodology to produce seedlings for stock enhancement:
Production of seedlings derived from cryopreserved germ cells of wild tiger puffer

研究代表者

吉川 廣幸 (Yoshikawa, Hiroyuki)

独立行政法人水産大学校・その他部局等・助教

研究者番号：40733936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：漁獲された天然魚の遺伝資源を栽培漁業での種苗生産に活用するため、トラフグ精巢を凍結保存するための技術を確立した。精原幹細胞を含む凍結保存されたトラフグ精巢細胞をクサフグ宿主へと移植したところ、これらの凍結保存されたトラフグ精原幹細胞は、宿主生殖腺内において精子形成が生じ、機能的なトラフグ精子へと分化した。

研究成果の概要(英文)：This study established a methodology for cryopreservation of whole testes collected from tiger puffer in order to utilize genetic resources of captive wild fish into seed production for stock enhancement. By transplanting cryopreserved testicular cells contained spermatogonial stem cells (SSCs) of tiger puffer, the transplanted SSCs resumed spermatogenesis in grass puffer as surrogate recipient, and ultimately differentiated into functional sperm within the recipient gonads.

研究分野：遺伝育種

キーワード：トラフグ 生殖幹細胞 凍結保存 遺伝資源 種苗放流 栽培漁業 代理親魚技術 生殖細胞移植

1. 研究開始当初の背景

トラフグは、白子(精巢)や身(魚肉)が高値で取引されることから、水産上、重要な魚種の一つとして位置づけられているものの、トラフグを含むフグ類の天然資源は急激な減少傾向にある。このため、トラフグ天然資源を維持・管理し、回復させることが求められている。現在のところ、漁獲量管理に加えて、国内各地において種苗放流が行われているものの、資源量を回復させるまでには至っていない。資源量を回復させるための種苗放流には、遺伝的組成や適性を考慮に入れ、放流地先に応じた天然種苗を放流することが重要である。しかしながら、天然個体を人為環境下で健康的に飼育・管理し、成熟させることは難しく、多大な労力を必要としてしまう。また、成熟した個体を天然下から採捕し、成熟天然親を種苗生産に用いる戦略も取り組まれているが、天然資源の減少により、その採捕は困難を極めつつある。このため、フグ類の資源を保全・回復させるためには、健全な天然資源を効率的に保全し、回復可能とする新規技術の開発が求められていた。

2. 研究の目的

上記の問題を解決するため、漁獲されたトラフグ天然個体より採取された生殖幹細胞を凍結保存する技術を確立すると共に、保存された天然トラフグの生殖幹細胞を、飼育を行いやすい養殖魚や小型の近縁種の体内で機能的な配偶子へと分化させる技術(=代理親魚技術)により、放流用の健全な天然種苗を生産できる新規種苗生産技術の開発を行うことを目的とした。本技術が確立されたならば、放流効果の高い遺伝的に健全な天然種苗を効率的に保存・生産でき、フグ類天然資源の回復を促すことができる可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 供試魚

トラフグおよびクサフグは、山口県下関市および福岡県北九州市沿岸で漁獲された魚を独立行政法人水産大学校へ搬入・飼育管理し、本研究に使用した。

(2) 最適凍結保存液の検討

トラフグより採取した精巢は、市販の凍結保存容器を用いた緩慢凍結を行い、液体窒素中で凍結保存した。また、同じくトラフグ属であるクサフグの精巢についても、同様な処理を行い下記の検討を行った。

Leibovitz's L-15 培地に凍害防止剤としてジメチルスルフォキシド(DMSO)、グリセロールあるいはエチレングリコールを種々の濃度で添加した。さらに、これら凍結保存液へのトレハロース、グルコース、牛胎児血清および卵黄の共添加についても検討し、最適な凍結保存液を明らかにした。なお、凍結保存された精巢細胞の生存率の評価は、解凍

された精巢を酵素処理により細胞分散した後、トリパンブルー染色により行った。

(3) 凍結保存細胞からの配偶子生産技術の開発

明らかにされた最適条件により凍結保存された精巢は、酵素処理による細胞分散した後、細胞表面に PKH26 染色を施すことにより、その他の細胞との識別を可能にした。これらの調整された細胞は、不妊化のために3倍体化処理(受精卵を受精後5分後から30分間5の海水中で低温培養処理)されたクサフグ孵化仔魚の腹腔内へと移植した。その後、クサフグ宿主個体内でのドナー細胞(凍結保存された細胞)の挙動を解析した。さらに、宿主個体を養成飼育することにより成熟させ、ドナー細胞が宿主生殖腺内で機能的な配偶子へと分化可能か否かを解析した。なお、凍結保存細胞に由来するトラフグ配偶子、あるいはこれら配偶子により誕生した子孫の存在の可否は、トラフグ種特異的なプライマーによるゲノムDNAのPCRにより陽性かどうかを判定した。

4. 研究成果

(1) 最適凍結保存液の解明

精巢を凍結保存する際に用いる凍結保存液について検討した結果、クサフグ精巢細胞の解凍後生存率は、1.3M DMSO、1.3M グリセロールおよび1.4M エチレングリコール添加区で、それぞれ平均57.2%、43.0%および28.2%であった(図1)。また、トラフグ精巢についても同様に1.3M DMSO添加区が他の凍害防止剤添加区に対し高い細胞生存率を示した(55.9%)(図2)。高い生存率が得られた1.3M DMSOと共にトレハロース(0.1M)および卵黄(10%)を添加した保存液について検討したところ、クサフグでは平均66.5%(図3)、トラフグでは平均61.2%(図4)と最も高い細胞生存率が得られた。よって、これら凍害防止剤を含む凍結保存液が、トラフグ属魚類の精巢を緩慢凍結する際の最適な凍結保存液であることが判明した。

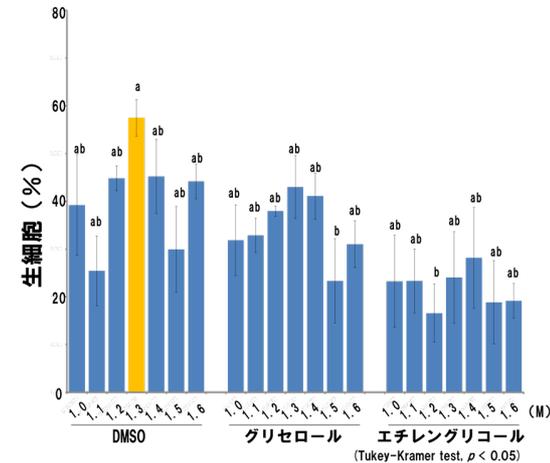


図1. 各種凍害防止剤における凍結保存処理によるクサフグ精巢細胞の解凍後生存率

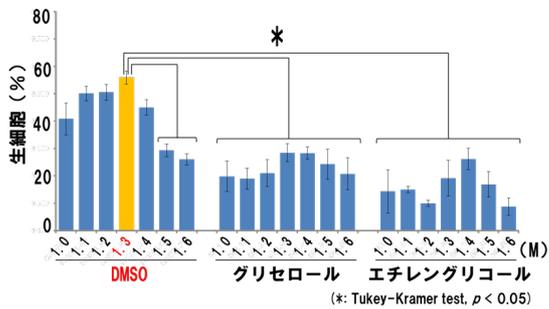
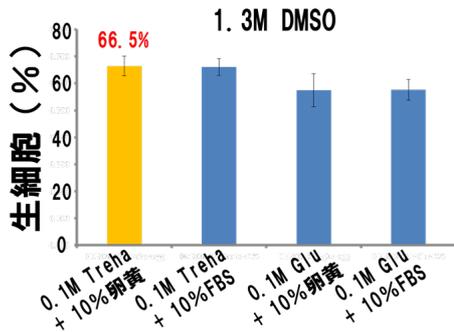
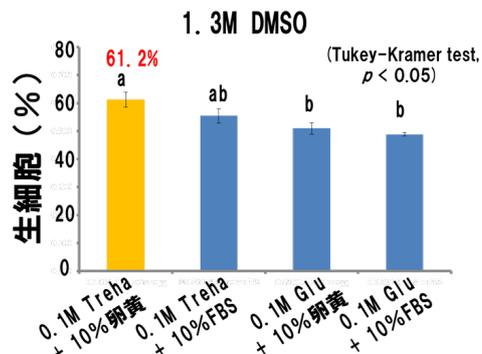


図2. 各種凍害防止剤における凍結保存処理によるトラフグ精巣細胞の解凍後生存率



(DMSO:ジメチルスルフォキシド、Treha:トレハロース、Glu:グルコース)

図3. 1.3M DMSOを含有する凍結保存液への各種凍害防止剤の共添加における凍結保存処理によるクサフグ精巣細胞の解凍後生存率



(DMSO:ジメチルスルフォキシド、Treha:トレハロース、Glu:グルコース)

図4. 1.3M DMSOを含有する凍結保存液への各種凍害防止剤の共添加における凍結保存処理によるトラフグ精巣細胞の解凍後生存率

(2) 凍結保存細胞からの配偶子生産

(1)により明らかにした最適な凍結保存液を用いて凍結保存されたトラフグ精巣細胞を酵素処理による細胞分散の後、PKH26を用いた蛍光染色を施し、これらの調整された細胞をクサフグ宿主仔魚の腹腔内へとマイクロマニピュレーターを用いて移植した(図5)。これら移植操作を施した計1700個体の宿主の1ヶ月齢時点での生残率は平均15%であった(非移植個体の生残率は平均40%)。一部の宿主について解剖・観察を行ったとこ

ろ、平均26%において宿主生殖腺内への凍結保存細胞の生着が観察された。

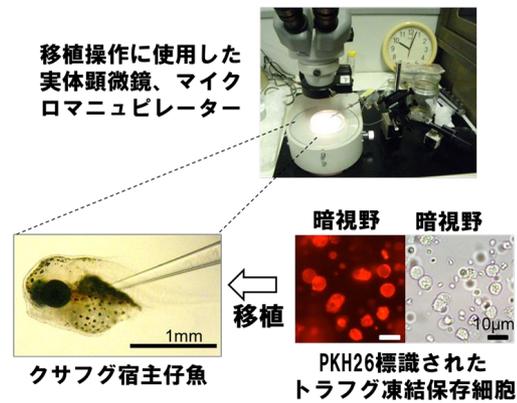


図5. クサフグ宿主仔魚腹腔内へのトラフグ凍結保存細胞の移植操作

10ヶ月齢まで養成したクサフグ宿主136個体について解析したところ、宿主全体の17%にあたる成熟雄個体から移植された凍結保存細胞に由来するトラフグ精子の生産が確認された(図6)。これらの精子を用いた交配試験では、対象試験区の正常個体と同等な受精率および孵化率が得られたことから、宿主個体が生産した凍結保存細胞に由来したトラフグ精子は、次世代子孫の作出が実的に可能な機能的精子であることも明らかとなった。雌個体に関しては、現時点で成熟年齢に達しておらず、凍結保存細胞から機能的な卵への分化が可能であるか否かの検証は今後必要であるものの、本研究により明らかにされた精巣の凍結保存技術および生殖細胞移植技術の利用により、漁獲により失われる希少な天然遺伝資源を保存・管理することができ、これらを用いてトラフグ天然資源の回復を促すための放流種苗生産が可能になるものと期待される。

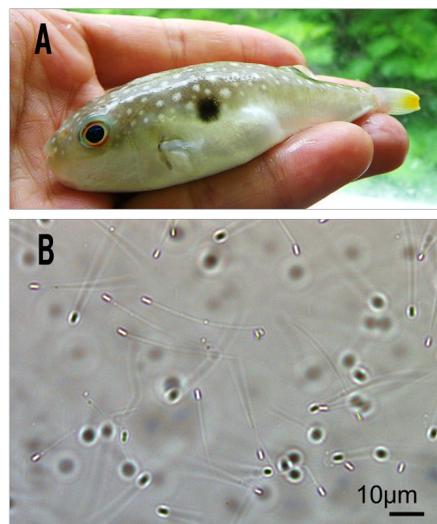


図6. 10ヶ月齢のクサフグ宿主(A)と生産された凍結保存細胞に由来するトラフグ精子(B)

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

吉川廣幸, 井野靖子, 小松武史, 片山貴士, 吉浦康寿: トラフグ属魚類精巢の凍結保存技術の開発. 平成27年度日本水産学会秋季大会, 仙台 (2015年9月24日)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉川 廣幸 (YOSHIKAWA HIROYUKI)
(独)水産大学校・生物生産学科・助教
研究者番号: 40733936