

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19294

研究課題名(和文)細胞取り込み能をもつ「コンピテント胚」の開発

研究課題名(英文)Development of the "competent-embryo" that possess the cells up-taking ability.

研究代表者

後藤 理恵(風藤理恵)(Goto, Rie)

愛媛大学・南予水産研究センター・准教授

研究者番号：70399997

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):ゼブラフィッシュ胚を用いて、1)異なる2個体を融合するための条件、2)胚と初期発生期の胚盤を融合する条件、および3)胚と胚細胞を融合するための条件を明らかにした。具体的には、既存の酵素で処理することによる融合法と、新たに開発した微細粒子で胚を処理することによる融合法を開発した。ドナーの細胞は数時間で速やかにレシピエント胚に取り込まれ、レシピエント胚中で発生を継続した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、マイクロピペットを用いることなく、ドナー細胞をレシピエント杯に導入する方法を開発した。この方法では、キメラを用いた各種生物学的解析に、職人技が要求される従来の細胞移植技術を使う必要がなくなる。さらに、簡便化できる技術であることから、将来的には操作の自動化も期待できる。以上のことから、細胞移植研究の効率化、実験コストの節減、および大規模化を実現するためのコア技術となることを期待している。

研究成果の概要(英文):We developed novel techniques to "fuse" 1) two embryos, 2) one whole embryo with a blastodisc from a donor embryo, and 3) one whole embryo with embryonic cells, using zebrafish (*Danio rerio*) model. Specifically, the methods were composed of two approaches: enzymatic treatment or micro-particle treatment that we newly developed in this research for fusing embryos. Donor cells were merged into the recipient embryos rapidly in a few hours just after treatment, and then they developed normally in the recipient embryo.

研究分野：水産発生学

キーワード：キメラ コンピテント胚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで「魚類の借腹生産」に関する研究を行ってきた。絶滅危惧魚種などの生殖幹細胞を単離濃縮し、飼育技術が確立されている魚種の生殖巣へ移植することで、効率的な生物生産を図る技術である[1]。これまでにいくつかの手法が報告されているが、どれもマイクロマニピュレーター、マイクロインジェクター、顕微鏡が必要で、熟練した研究者による幹細胞移植操作が要求される。技術の普及を妨げるボトルネックは、移植操作自体の困難さであった。

我々は研究の過程で、ある種の酵素処理をほどこした胚では、稀ではあるものの胚同士が融合することを見出した。おそらく、酵素により密着結合やギャップ結合などの構造が破壊され上皮細胞の結合が緩み、酵素除去後の急速な修復の過程で隣接した胚と融合するのではないかと考えられた。このことから、他の胚細胞を取り込むことのできる「コンピテント胚」を作製できると確信した。

「コンピテント胚」による胚融合現象は、「移植」の概念を根底から変える可能性をもつ技術になりうる。「胚↔細胞」の融合が可能となれば、生殖幹細胞の入ったチューブに「コンピテント胚」を投入することで融合させ「生殖系列キメラ」を作出するなど、移植操作を極限まで簡素化できる。始原生殖細胞 (PGCs) の移植による「生殖系列キメラ」を大量に作出することができれば、新しい育種技法の開発につながる。あらたな水産育種分野・研究手法を創出する可能性をもつ技術であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、「胚融合現象」を用いた新しい魚類胚細胞移植技術を開発することを目的とした。本研究では、実験材料の入手のしやすさからゼブラフィッシュを用いた。研究は以下の計画で行った。

1年目) コンピテント胚作出条件の検討と最適化

1～2年目) コンピテント胚の生物学的メカニズム解明

1～3年目) 胚融合用モールドの開発

2～3年目) 「コンピテント胚」に細胞塊・単一細胞を取り込ませる条件開発

3. 研究の方法

【特許出願準備中のため一部割愛】

ゼブラフィッシュ胚を様々な方法で処理し、胚、胚盤、胚細胞と融合させる条件を検討した。融合条件には、胚を固定するための寒天モールドベースの試作およびテストを含む。ドナー細胞には、GFPで標識されたトランスジェニックゼブラフィッシュ系統、あるいはFITC-dextranの顕微注入により標識された個体を用いた。免疫組織化学的解析にはBiotin-dextranで標識した胚をドナーに用いた[2]。

胚融合の成否は、囊胚期に実体顕微鏡により観察することで確認した。ドナー細胞のレシピエント胚中での分布は、蛍光顕微鏡により観察した。また、一部の融合胚はブアン氏液により固定してパラフィン切片による組織学的観察に供し、どのようなメカニズムで融合現象が生じるのかを検討した。

融合胚の一部は発生を継続させ、顕微鏡観察により健全性を確認するとともに、個体中のドナー細胞の存否および分布を調べた。

4. 研究成果

【特許出願準備中のため詳細は割愛】

ゼブラフィッシュ胚を用いて、1)異なる2個体を融合するための条件、2)胚と初期発生期の胚盤を融合する条件、および3)胚と胚細胞を融合するための条件を明らかにした。具体的には、既存の酵素で処理することによる融合法と、新たに開発した微細粒子で胚を処理することによる融合法を開発した。卵質に若干の影響を受ける傾向は認められたものの、100%に近い効率で融合胚および細胞導入胚を誘導できた(図)。ドナーの細胞は数時間で速やかにレシピエント胚に取り込まれ、レシピエント胚中で発生を継続した。

開発した手法により、マイクロピペットを用いないドナー細胞のレシピエント胚への導入が実

現した。原理的には、他魚種を含む様々な動物に展開可能な方法である。本課題で開発した技術は、発生学的・発生工学的研究に広く応用できるポテンシャルをもっていると考えられる。



図、寒天モールド内で誘導した融合胚。今回開発した方法では、極めて高い効率で胚を融合することができた。同様の手法で、胚断片および胚細胞も効率的に導入することが可能だった。

<引用文献>

[1] Goto R, Saito T. A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. *Theriogenology* 2019;133:216-27. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.03.032.

[2] Saito T, Goto R, Arai K, Yamaha E. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biology of Reproduction* 2008;78:159-66. doi:10.1095/biolreprod.107.060038.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Diogenes Henrique de Siqueira-Silva, Taiju Saito, Amanda Pereira dos Santos-Silva, Raphael da Silva Costa, Martin Psenicka, George Shigueki Yasui	4. 巻 44
2. 論文標題 Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1469 ~ 1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-018-0506-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fatira, E., Havelka, M., Labbe, C., Depince, A., Iegorova, V., Psenicka, M., Saito, T	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer (iSCNT) in sturgeons and an unexpectedly produced gynogenetic sterlet with homozygous quadruple haploid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24376-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Rie, Saito Taiju	4. 巻 133
2. 論文標題 A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2019.03.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taiju Saito
2. 発表標題 Surrogate production in fish
3. 学会等名 Workshop on Aquatic Sciences Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Taiju Saito, Rie Goto, Nicola Rivers, Etsuro Yamaha	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 15
3. 書名 Production of Germ-Line Chimeras in Zebrafish. In: Pelegri F. (eds) Vertebrate Embryogenesis. Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 Rie Goto, Taiju Saito, Takahiro Matsubara, Etsuro Yamaha	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 13
3. 書名 Microinjection of Marine Fish Eggs. In: Liu C., Du Y. (eds) Microinjection. Methods in Molecular Biology	

1. 著者名 戸村道夫、斎藤大樹、後藤理恵、他57名	4. 発行年 2017年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 312
3. 書名 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A	

〔産業財産権〕

〔その他〕

特許出願準備中

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	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	斎藤 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