

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19129

研究課題名（和文）魚類致死性雑種の発生工学的利用

研究課題名（英文）Investigation of the potential use of hybrid cells as materials for chimerical improvement of surrogate hosts in teleost.

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：養殖の種苗生産において、ドナー種の精子や卵を別種のホスト種に産ませる研究が進んでいる。しかし、ドナー配偶子は近縁のホスト種からしか生産されていない。この問題の克服のため、ドナー種の細胞を胸腺に組み込み、免疫学的寛容を持つホスト個体の誘導を試みた。同種、異種あるいはホスト種を母親とする雑種の胞胚期の細胞をアクチビンで処理し、ホストの胞胚に移植すると、ホスト胚の咽頭嚢や消化管などの内胚葉系列の器官に組み込まれた。遺伝的なクローンであるフナ3倍体の細胞を咽頭部に組み込んだキンギョのキメラを誘導したのち、同系統のフナ鱗を移植し免疫学的な寛容を検証したが、鱗は拒絶され寛容は誘導されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ドナーの細胞を免疫的に拒絶しないホスト個体の誘導は行えず、当初の目的は達成されなかった。しかし、アクチビン処理した胞胚細胞は、遠縁種のものであっても、ホスト胚に奇形を誘導する細胞塊を形成することなく内胚葉系列に組み込まれた。免疫学的な寛容を誘導した鳥類での研究でも、数多くのドナー細胞を胸腺に組み込む必要がある。したがって、多くのドナー細胞を胸腺部位へ組み込めれば、免疫的な寛容を誘導し、遠縁種の生殖細胞の分化を助けられる可能性が示されたと考えている。

研究成果の概要（英文）：There are many reports of producing donor gametes from host species which are closely related from donor by surrogate propagation in teleost. But it is difficult to produce donor gametes, especially eggs, from distantly related host species. Somatic cells carrying the donor genome may be required by the host parent to support oocyte differentiation. We aimed to induce host individual with immunological tolerance to donor somatic cells. When deep layer cells of the hybrid with donor genome were transplanted into the parental blastula, many hybrid cells differentiated to cells of somatic lineages. When donor cells were treated with activin B, they contributed to endoderm lineages such as the pharyngeal pouch. Somatic chimeras with donor cells around the pharynx were induced by transplanting triploid crucian carp blastomeres into goldfish. When the scales from triploid were transplanted into resultant chimeras, they were rejected, suggesting that immunological tolerance was not induced.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：生殖系列キメラ 体細胞系列キメラ 借腹生産 雑種 胸腺 始原生殖細胞 魚類

1. 研究開始当初の背景

桃栗三年柿八年と言われているが、これは播種してから果実を収穫するまでの年数である。しかし、桃栗柿の穂木を成木の台木に接ぐ「接木」という手法を用いるともっと短時間で結果(果実)を得ることが可能である。これを水産科学の種苗生産に応用したのが借腹(代理親)生産である(荒井と山羽、2008)。この手法では、水産重要種(ドナー)の生殖系列の細胞を別の魚(ホスト)に移植してホストの生殖腺内でドナーの配偶子(卵・精子)を生産する。すなわち生殖系列の細胞が穂木に相当し、ホストの体が台木となる。同属レベルの近縁種間で本手法を用いると、成熟までの期間の短い魚が長い魚の配偶子を、また、小型の魚が大型の魚の配偶子を作ることが明らかになってきた(Saito *et al.*, 2008)。

しかし、亜科を越える系統的に遠縁なドナー/ホスト関係では配偶子、特に卵は誘導されない。これは、ドナー生殖細胞とホストの生殖腺体細胞の相互作用が種差により機能しなかったり、体細胞からの供給が必要とされるドナーと同種の卵黄蛋白が得られなかったりするためと解釈されている。借腹生産において機能的な卵を得るためには、生殖系列キメラの体細胞要素に、ドナー由来の細胞を混合させる必要がある。しかし、種の異なる体細胞を個体の中で混在させるのは、発生生物学的にも免疫学的にも困難が伴う。なぜなら、種の異なる細胞は、発生過程において「分類群特異性」により選別されるので均質な混合状態を誘導できないし(モンロイとモスコーナ、1982)、免疫学的には、移植された細胞は免疫系の発達に伴って排除される。これらの生物学的な壁を回避しないと遠縁種間での借腹生産は困難である。

作物・果樹生産の「接木不親和性」を示す種間では、台木と穂木の間さらに「中間台木」を挟んで接木を可能としている。さらに、異科接木適性を持つタバコ茎を中間台木にすることで、キク科とナス科での遠縁の接木も可能となっている。魚類の借腹生産において、作物生産での「中間台木」に相当する細胞が得られれば、遠縁種間での生殖系列キメラを介した配偶子誘導が可能となり、養殖における種苗生産に画期的な進展が起こればと考えられる。

遠縁種のドナーの卵を分化させるには、①生殖隆起に移動したドナー生殖細胞の分化をサポートできる中間台木に相当する細胞(台木細胞)を生殖腺の体細胞に組み込む、②生殖腺に組み込まれた台木細胞が免疫的に排除されないように、胸腺にも台木細胞を組み込む、③生殖隆起に移動したドナー生殖細胞が取り込める卵黄前駆物質を分泌する肝臓に台木細胞を組み込む、の以上3点が必要最小限の条件と考えられた。前述のように、この台木細胞には、宿主の胚細胞と混合し協調的に個体を形成する特性が必要である。このような細胞として、ドナーとホスト種の種間雑種の細胞が使える可能性がある。

魚類では、例えばマミチヨグとタイセイヨウサバのような「目」を跨いだ種間でも交雑が可能で、致死ではあっても胚が形成される例が示されている(山本、1918)。亜科を超える遠縁種での交雑に由来とする雑種は、個体としては致死であることがほとんどである。しかし、致死の雑種細胞を雌親種の胚に移植すると、組織の構成要素として6ヶ月を超えて生き残る(Naya *et al.*, 2020)。また、雑種細胞はホストの遺伝子を有するため、発生初期に移植されるとホストの細胞とよく混合し「分類群特異性」を示さない。これらのことから、雑種細胞を中間台木に使える可能性がある。

雑種細胞が上述の中間台木としての要件を満たすためには、雑種細胞を生殖腺、胸腺、肝臓に組み込ませる必要がある。生殖隆起は中胚葉の側板領域から生じ、胸腺と肝臓は内胚葉から分化する。細胞系譜の研究から、中内胚葉の細胞は、胞胚の周縁部で卵黄細胞からの誘導で分化することが明らかとなっている。このことから、胞胚期に胚盤周縁部に雑種細胞を移植することで生殖隆起、胸腺、肝臓に雑種細胞を組み込んだ宿主胚を誘導できるものと予想される。

遠縁な種間での借腹生産は、種苗生産における親魚の成熟までの期間の短縮や、種苗生産の安定化に有効である。しかし、遠縁な種間での借腹生産では成熟卵が得られないことが課題となっている。さらに体細胞の移植でも遠縁な種間では細胞の選別による細胞塊の形成が行われてしまうことが先行研究でわかっている(Saito *et al.*, 2010)。そのため、ドナー種の体細胞はホスト体内でドナーPGCの分化をサポートできない。細胞塊の形成の原因として細胞膜状に存在するタンパク質である細胞接着分子が挙げられ、その一種であるカドヘリンでは異なる種類の分子間では互いの細胞が排除し合うことがわかっている。雑種細胞は両親種の遺伝子を有するので細胞接着分子も両方を発現する可能性がある。その場合、上述の中間台木のように両親2種に由来する細胞を仲介し、ドナーとなる種の細胞のホスト内での細胞塊の形成を防ぎ、分化をサポートを期待できる。そのためには先に雑種細胞がホスト胚の細胞と混在しながら分化できるかを調べる必要がある。

2. 研究の目的

上述のように、作物・果樹生産の接木不親和性を示す種間では、台木と穂木の間さらに「中間台木」を挟むことで接木を可能としている。さらに、異科接木適性を持つタバコ茎を中間台木にすることで、キク科とナス科での遠縁の接木も可能となっている。魚類の借腹生産において、

作物生産での「中間台木」に相当する細胞が得られれば、遠縁種間での生殖系列キメラを介した配偶子誘導が可能となり、養殖における種苗生産に画期的な進展が起これと考えられる。本研究では、生殖系列キメラを誘導するドナーとホストの2種の雑種細胞を「中間台木」として捉え、これを組み込んだキメラ個体が借腹生産のホストとして有用であるかを示すことを目的とする。

本研究では、遠縁な種間での雑種細胞を移植したときにホスト胚細胞と協調的に組織へ分化できるのかを調査することを目的として、近縁種から遠縁種にわたる2魚種間で雑種を作成し、その雑種の胚発生を明らかにするとともに、胞胚期の雑種細胞をドナーとし母親種の胚をホストとしたキメラ個体を誘導し、キメラ体内でのドナー雑種細胞の追跡と組織学的な解析を行った。

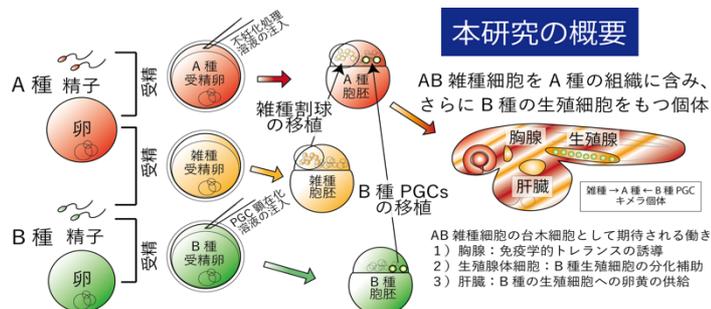
3. 研究の方法

遠縁種からの生殖細胞を移植したキメラ個体においてドナーの卵を分化させるには、① 生殖隆起に移動したドナー生殖細胞の増殖と分化をサポートできる中間台木に相当する細胞（台木細胞）を生殖腺の体細胞に組み込む、② 生殖腺に組み込まれた中間台木に相当する細胞が免疫的に排除されないように、胸腺にも台木細胞を組み込む、③ 生殖隆起に移動したドナー生殖細胞が取り込む卵黄前駆物質を分泌する肝臓に台木細胞を組み込む、の以上3点が必要最小限の条件と考えられた。

前述したように、この台木細胞には、宿主の胚細胞と混合し協調的に個体を形成する特性が必要である。申請者らは、この中間台木としてドナーとホストの雑種細胞を使うことを考えた。魚類では、例えばマミチヨグとタイセイヨウサバのような「目」を跨いだ種間でも交雑が可能で、致死ではあっても胚が形成される例が示されている。亜科を超える遠縁種を父親とする雑種は個体としては致死であることがほとんどである。しかし申請者らは、致死の雑種細胞を雌親種の胚に移植すると、組織の構成要素として6ヶ月を超えて生き残っていることを明らかにした (Naya *et al*, 2020)。また、雑種細胞はホストの遺伝子を有するため、発生初期に移植されるとホストの細胞とよく混合し「分類群特異性」を示さない。生殖隆起は中胚葉から生じ、胸腺と肝臓は内胚葉から分化する。中内胚葉は *in vivo* では胞胚の周縁部で卵黄細胞からの誘導で分化し、*in vitro* ではアクチビンなどのシグナル伝達物質により人為的に誘導できる。このことから、生殖隆起、胸腺、肝臓に雑種細胞を組み込んだ宿主胚を誘導できるものと考えている。したがって、雑種細胞を雌親種の胞胚に移植し、生殖隆起と肝臓、胸腺に組み込んだ体細胞キメラ個体ができれば、これをホストとして、遠縁種のドナーの卵を分化させられる可能性がある。

本研究で主たる材料とするキンギョは、種苗生産に適する数の卵を産卵し、素人でも飼育できる魚種である。その胚には借腹生産に不可欠な様々な発生工学的な操作を加えられる。これまで本種を雌親とした様々な種間交雑の報告がある。その中にはキンギョ×ティラピアなど目レベルで異なる交雑もあり、孵化まで発生が進んでいる (Yan and Özgünen, 1993)。そのため、本申請の材料として最適である。本研究では、誘導するに必要な3点を明確にするため以下の実験を行う予定であった。

- 1) キンギョを雌親種とし、目や科を超えるレベルの遠縁魚種と交雑を行い、両種のゲノムを有する雑種胚細胞が得られるか：雄親種としては、天然、あるいは水産試験場などで成熟雄親魚が得られるものとし、雑種状態は、ゲノム量、あるいはマーカーDNAの存在により明らかにする。



- 2) 遠縁種間の雑種胚細胞を組み込んだ体細胞キメラ胚の発生/成長能力の検定と、雑種胚細胞の胸腺、肝臓、及び生殖隆起への分化：雑種細胞を標識してホスト胚へ移植し、その標識を追跡するとともに、組織学的、分子生物学的にどのような器官に雑種細胞が組み込まれたかを明らかにする。また、これらの組織に分化させる移植方法を検討する。
- 3) 雑種細胞を組み込んだホスト用の個体が、ドナーの生殖細胞の卵細胞への分化に利用可能であるか：これまで精子は得られているが卵形成が確認できなかった、ドジョウ→キンギョ、ドジョウ→ゼブラフィッシュ、キンギョ→ゼブラフィッシュの組み合わせ、卵も精子も得られていないゼブラフィッシュ→キンギョの生殖系列キメラの組み合わせで課題の検討を行う。雑種細胞とともに、雄親種の始原生殖細胞を雌親種に移植した生殖系列キメラを誘導し、その配偶子形成能力を明らかにする。

4. 研究成果

- 1) ゼブラフィッシュを雌親種とし、種レベルで異なるパールダニオ、属レベルで異なるヒナモロコ、亜科レベルで異なるキンギョ、科レベルで異なるドジョウ、目レベルで異なるティラピアと雑種を作成して細胞質を蛍光標識し、その雑種胞胚の細胞を母親種であるゼブ

ラフィッシュのホスト胞胚へ移植した。その結果、雑種細胞は、ホスト胚の形態形成に異常を起こすことなくホストの胚と共に分化することが明らかとなった。

- 2) 最も異なるゼブラフィッシュ×ナイルティラピア間の雑種は、胞胚期に全て死亡した。しかし、この胞胚細胞を組み込んだゼブラフィッシュ胚では主に筋肉細胞に組み込まれ、さらに組織学的には前腎輸管に組み込まれていた。
- 3) ドナー細胞を胸腺へ分布させるため、キンギョを材料として胸腺の分化時期の組織学的解析を行った。キンギョ、フナの両種において、胸腺は孵化日（受精後5日）から確認された。胸腺は第2、3鰓弓と耳胞の間に位置し、形状は成長するにつれて楕円から丘状に変化した。

- 4) キンギョまたはゼブラフィッシュを材料とし、(1) 蛍光標識した胞胚の胚盤から深層細胞を回収しドナー細胞として移植する実験、(2) ホスト個体の咽頭部へドナー細胞を分布させる条件検討を行った。分離胚細胞をホスト胚へ移植した場合内胚葉への分化を組織学的に明らかにした。ドナー細胞は無処理で移植すると外胚葉系列の組織へ、アクチビン処理すると殆どが内胚葉に分化させることが可能であった(図1)。

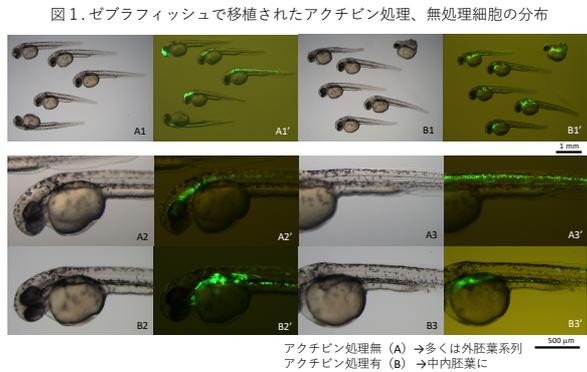


図1. ゼブラフィッシュで移植されたアクチビン処理、無処理細胞の分布

1) 両者を混合して移植すると処理細胞の多くは内胚葉に、無処理細胞の多くは中胚葉組織へと分化した。この結果、ドナーとする細胞は、ホスト細胞とはなるべく混合させずに移植するのが良いと考えられた。

- 5) キンギョとゼブラフィッシュ間の異種間での移植では、ドナーをアクチビン処理しない場合、移植細胞はホスト胚のなかで凝集塊を形成したのに対し、アクチビン処理した場合は細胞塊にならずに内胚葉組織へ組み込まれた(図2)。

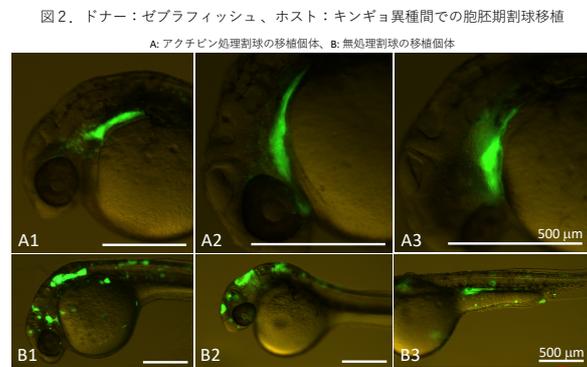


図2. ドナー：ゼブラフィッシュ、ホスト：キンギョ異種間での胞胚期剖球移植

- 6) 父親の異なる雑種間での体細胞キメラの作成を行った。ゼブラフィッシュを雌親種とし、種レベルで異なるパルダニオ、属レベルで異なるヒナモロコ、亜科レベルで異なるキンギョ、科レベルで異なるドジョウ、目レベルで異なるティラピアと雑種を作成して細胞質を蛍光標識し、その雑種胞胚の細胞を母親種であるゼブラフィッシュのホスト胞胚へ移植した。その結果、雑種細胞は、ホスト胚の形態形成に異常を起こすことなくホストの胚と共に分化することが明らかとなった。最も異なるゼブラフィッシュ×ナイルティラピア間の雑種は、胞胚期に全て死亡した。しかし、この胞胚細胞を組み込んだゼブラフィッシュ胚では主に筋肉細胞に組み込まれ、さらに組織学的には前腎輸管に組み込まれていた。

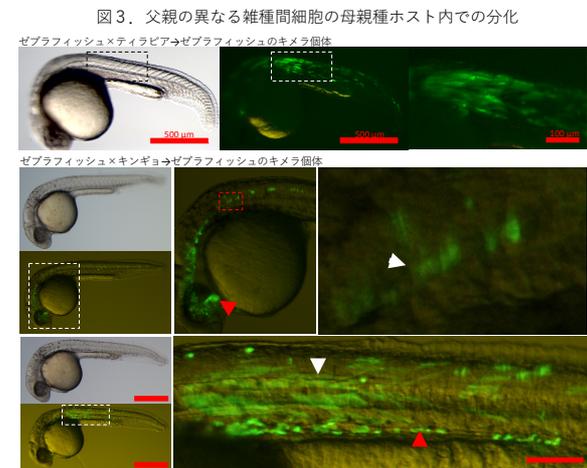


図3. 父親の異なる雑種間細胞の母親種ホスト内での分化

- 7) ゼブラフィッシュ×パルダニオの雑種の胞胚細胞をアクチビンで処理し、ゼブラフィッシュ胞胚へ移植した。その結果、雑種細胞はホストの形態形成を乱す事なく内胚葉系列へ組み込まれた。パルダニオ特異的なプライマーを用いたPCR解析により、処理細胞と無処理細胞は、少なくとも移植後17日まではホスト胚の中に残っていた。

- 8) ドジョウ♀×キンギョ♂とする雑種細胞をドナーとしキンギョをホストとする、母親の異なる雑種細胞の移植キメラを作成した。その結果、アクチビン処理を行わないとドナー細胞がホスト胚内で凝集した。一方、アクチビン処理を行った胚細胞を移植すると凝集することなくホストの内胚葉へ分化した。

- 9) 3倍体フナの胞胚細胞をアクチビン処理し、パルダニオ胞胚へ移植したキメラを作成した。フナの細胞が咽頭部に分布することを確認したのち個体を飼育し、147日後にフナ特異的なプライマーを用いたPCRによりフナ細胞の残存を調べたが、ポジティブなバンドは

観察されず、免疫学的なトレランスは誘導されていないと考えられた。

- 10) 免疫学的なトレランス状態を生み出す可能性を検証するために、遺伝的なクローンが生み出される3倍体フナの蛍光標識した胚細胞をドナーとし、同種のキンギョを宿主とする体細胞キメラ個体の誘導を行った。その後、半年以上飼育した、咽頭領域に蛍光細胞が分布するキメラ個体に、ドナーと同系統のクローンフナの鱗を移植した。これらのキメラ個体は自身の鱗を受容したもののフナの鱗は受容せず、免疫的な寛容を生み出すことはできなかった。
- 11) 同様に、3倍体のフナの蛍光標識した胚細胞にアクチビン処理を行いゼブラフィッシュ胞胚に移植し、咽頭領域にドナー蛍光細胞を持つ個体を作成した。この個体を100日以上飼育したのちフナの特異的プライマーによりドナー細胞の生存を調査したが、ドナー細胞特異的なバンドは確認されなかった。
- 12) これらの結果から、異種胞胚細胞、雑種胞胚細胞ともにアクチビンで処理して宿主胞胚に移植すると胸腺に分化する咽頭部を含め内胚葉系列の組織へ組み込まれることが明らかになった。しかしながら、これらのドナー細胞は成長が進むにつれて消失あるいは排除されてしまうと考えられ、免疫学的なトレランスを誘導できなかった。ウズラ→ニワトリキメラでトレランスを誘導するためには、胸腺においてホストの1/3以上の量のドナー細胞が組み込まれる必要があるとされている (Ohki *et al.*, 1988)。魚類においても、より多くのドナー細胞を宿主咽頭部へ移植する方策が必要であると考えられた。
- 13) 胞胚期に移植された異種の胚細胞は胚発生過程で細胞塊を生じ、宿主の胚発生に異常を生じさせるというこれまでの結果から、雑種細胞を用いる実験系を考案した。ところが、胞胚期にアクチビン処理された異種の細胞は内胚葉へと組み込まれ、宿主の胚発生に大きな影響を与えないという結果が得られた。これは、分化した予定内胚葉細胞が、分散して将来の内胚葉系列の器官へ移動することと関連していると予想された。したがって、本研究の申請時に目標としていた雑種細胞を宿主に組み込ませるのではなく、生殖系列キメラのドナーPGCと同種の胚細胞を宿主に組み込ませ、この宿主個体を借腹生産の宿主として利用できる可能性があると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	漆畑 博太郎 (Urushibara Hirotaro)		
研究協力者	川崎 達晃 (Kawasaki Tatsuaki)		
研究協力者	前濱 友翼 (Maihama Yusuke)		
研究協力者	岡野 純平 (Okano Junpei)		

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
---------	---------