

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12614

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25114005

研究課題名(和文)サケ科魚類の進化に伴うGSC制御機構の変化

研究課題名(英文)Evolution of GSC regulation in salmonids

研究代表者

吉崎 悟朗(Yoshizaki, Goro)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：70281003

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 80,880,000円

研究成果の概要(和文):進化的に原始的なニジマス(多回繁殖)は排卵、排精後も生殖腺内に未分化生殖細胞を保持しており、移植実験から幹細胞能を保持していることが明らかとなった。一方、進化の進んだヒメマス(一回繁殖)は同時期に配偶子幹細胞の残存は全く見られなかった。なお、この幹細胞の挙動の変化は連続的なものであり、進化途上のヤマメ、マスノスケはその中間的な特徴を示した。生殖細胞移植実験の結果、多回繁殖のニジマスはヒメマスやマスノスケの配偶子を複数年(最長4年)にわたり継続的に生産可能であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文):Pacific salmon has both semelparous and iteroparous species. Rainbow trout, which is a primitive salmon shows iteroparity and maintained their type-A spermatogonia in their post-spermiated testes. Germ cell transplantation assay revealed that the type-A spermatogonia possessed stem cell population. On the other hand, sockeye salmon, which is an evolved species shows semelparity and did not possess any type-A spermatogonia in their post-spermiated testes. This change was continuous phenomenon and masu salmon and Chinook salmon, which are evolutionally positioned between above-mentioned two species possessed reproductive characteristics somewhere between rainbow trout and sockeye salmon. Germ cell transplantation study also revealed that the iteroparous rainbow trout produced gametes of sockeye salmon and Chinook salmon multiple times in their gonads.

研究分野：水族発生工学

キーワード：ヒメマス ニジマス マスノスケ 生殖細胞 代理親魚 生殖幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

サケ科魚類には一回繁殖と多回繁殖の魚種が存在する。多回繁殖のニジマスでは成熟生殖腺中に多数の生殖幹細胞 (GSC) が存在しているのに対し、一回繁殖型のヤマメ雌では、繁殖期後の斃死直前の個体が持つ卵巣から GSC が完全に消失していることが知られていた。その他にも一回繁殖型のサケの生殖腺構造を記載した研究例は少なくないが、その多くは分化した生殖細胞に注目したものであり、未分化細胞を詳細に追跡した研究例はほとんど存在しない。

### 2. 研究の目的

そこで本課題では、これら種間で繁殖回数の違いを生み出す GSC の挙動を、形態学的手法と移植実験の組み合わせで明らかにする。さらに、異種間 GSC 移植により、一回繁殖種由来の生殖細胞をもつ多回繁殖種、あるいはその逆を種々の組み合わせで作出し、GSC の挙動を解析する。これにより、GSC の挙動は完全に細胞自律的なのか、あるいは体細胞環境の影響も受けているのかを明らかにする。続いて、この両繁殖型を生み出す GSC 自律的な制御機構と生殖腺を構成する体細胞からの非自律的な制御機構を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

A 型精原細胞 (ASG) は、生涯にわたり精子供給を支える精原幹細胞 (SSC) を含むことが知られている。タイヘイヨウサケ属には、多回繁殖型種と一回繁殖型種が存在するが、前者に属するニジマスの精巣は、排精後も ASG を保持し、次回以降の精子形成を司る。一方、後者に属するヒメマスは、初回排精後に斃死する。また、DNA 解析によるとニジマス、ヤマメ、マスノスケ、ヒメマスの順に進化が進んだことが示唆されている。ヤマメ、マスノスケは、基本的には一回繁殖であるもののニジマスとの遺伝的距離がヒメマスに比べて近く、複数回繁殖する個体が少数ながら存在する。このように繁殖回数が異なる 4 種間では、精子形成の根幹を司る SSC、あるいは ASG の振る舞いに差があるのではないかと考えた。この点を明らかにできれば、SSC の制御機構解明の一助になると期待できる。そこで、本研究ではニジマス、ヒメマス、ヤマメおよびマスノスケの排精後の ASG の振る舞いを解析した。さらに、ニジマス、ヒメマスの精巣内 ASG 数の経時変化を定量するとともに、ニジマス ASG をヒメマスに、さらにヒメマス ASG をニジマスに移植し、ヒメマス精巣環境におけるニジマス ASG およびニジマス精巣環境におけるヒメマス ASG の振る舞いを解析することで、その制御機構の解明を試みた。

### 4. 研究成果

まず、排精後の ASG の振る舞いを明らかにするため、上記 4 種の排精後の各精巣組織を

生殖細胞特異抗体で免疫染色した。その結果、ニジマスは排精後も ASG を保持したが、ヒメマスは排精後に ASG を消失した。また、ニジマスに最も近縁なヤマメは排精後も ASG を保持したが、ヒメマスに近縁なマスノスケは排精後に ASG を消失した。以上のことから、タイヘイヨウサケ属魚類の繁殖回数は、寿命に規定されるのみならず、精巣の精子生産能力によっても規定されていることが明らかになった。さらに、成熟時の年齢と排精後の ASG の振る舞いとの関係を明らかにするために、通常より 1 年早く成熟 (早熟) した上記 4 種の排精後の精巣を解析した。その結果、満 2 歳の早熟ヒメマスは満 3 歳の同成熟魚と同様、排精後に ASG を消失した。このことから、ヒメマスは成熟年齢にかかわらず、初回排精後に ASG を消失することが明らかになった。すなわち、ヒメマスは仮に初回排精後に生残しても、翌年以降の繁殖期に精子を再生産できないと示唆された。一方、満 3 歳の早熟マスノスケは満 4 歳の同成熟魚と異なり、排精後もニジマス、ヤマメ同様、ASG を保持した。このことから、一回繁殖型種の中でも進化した魚種ほど、成熟年齢に関係なく初回排精後に ASG が消失する傾向が示唆された。

次に、ASG の消失過程を明らかにするため、ニジマス、ヒメマスの精子形成開始前 (33 か月齢) から排精後 (38 か月齢) までの各精巣組織を解析し、両種 ASG 数の経時変化を計数した。その結果、ニジマスの精巣あたり ASG 数は、33 か月齢から 38 か月齢まで、 $5 \times 10^6$  個から  $12 \times 10^6$  個の間を推移した。一方、ヒメマスの精巣あたり ASG 数は、33 か月齢の  $6 \times 10^6$  個から、35 か月齢までの期間に半減し、排精後 1 か月以内に消失した。

さらに、一回繁殖型種の ASG の制御機構を明らかにするため、三倍体化処理を施したヒメマスにニジマス ASG を移植し、ヒメマス精巣環境下でのニジマス ASG の振る舞いを解析した。その結果、ヒメマスへ移植されたニジマス ASG は、排精 1 か月後もニジマス同様、精巣に保持された。さらに、このニジマス ASG をニジマス孵化稚魚へ再移植したところ、一部の細胞が生殖腺へ生着した。すなわち、ヒメマス精巣内に排精後も保持されたニジマス ASG は、SSC を含むことが明らかになった。一方、dnd 遺伝子に対するアンチセンスモルフオリの処理により内在性の生殖細胞を欠損させたニジマスにヒメマス ASG を移植した結果、ヒメマス ASG 中に含まれる SSC はニジマス精巣内に残存し続け、これらヒメマス雄宿主は 5 年間にわたりヒメマス精子を生産し続けることが明らかになった。以上の結果から、ニジマス SSC がヒメマス体細胞環境下でも排精後の精巣内に保持されたことから、その挙動は生殖細胞自律的な制御も受けていることが示唆された一方、ヒメマス SSC はニジマス体細胞環境下で排精後も生存し、機能的なヒメマス精子を生産し続けた結果から、その挙動は体細胞環境にも支配されている

ことが明らかになった。現在、これらの制御機構を明らかにすべくニジマス、ヒメマス両種の生殖細胞および生殖腺体細胞におけるトランスクリプトームの比較解析を進行中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

他 17 件(査読有 14 件、査読無 3 件)

(1) Hayashi M, Sakuma D, Yoshizaki G: Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 85, 155-162(2018). DOI:10.1002/mrd.22949 (査読有)

(2) Yoshizaki G, Lee S: Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation. *Stem Cell Research*, 29, 103-110 (2018). DOI:10.1016/j.scr.2018.03.015 (査読有)

(3) Sato M, Hayashi M, Yoshizaki G: Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 96, 1303-1316 (2017). DOI:10.1093/biolre/i0x049 (査読有)

(4) Li Q, Fujii W, Naito K, Yoshizaki G: Application of dead end-knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation. *Molecular Reproduction and Development*, 84, 1100-1111(2017). DOI:10.1002/mrd.22870 (査読有)

(5) Falahatkar B, Poursaeid S, Kitada R, Yoshizaki G: Hypothermic storage of isolated spermatogonia and oogonia from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cryobiology*, 76, 125-128(2017). DOI:10.1016/j.cryobiol.2017.03.005 (査読有)

(6) Lee S, Katayama N, Yoshizaki G: Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478, 1478-1483(2016). DOI:10.1016/j.bbrc.2016.08.156 (査読有)

(7) Yoshizaki G, Takashiba K, Shimamori S, Fujinuma K, Shikina S, Okutsu T, Kume S,

Hayashi M: Production of germ cell deficient salmonids by dead end gene knockdown, and their use as recipients for germ cell transplantation. *Molecular Reproduction and Development*, 83, 298-311(2016). DOI:10.1002/mrd.22625 (査読有)

(8) Lee S, Yoshizaki G: Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology*, 72, 165-168(2016). DOI:10.1016/j.cryobiol.2016.01.004 (査読有)

(9) Katayama N, Kume S, Hattori-Ihara S, Sadaie S, Hayashi M, Yoshizaki G: Germ Cell-Specific Excision of loxP-flanked Transgenes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*, 94, 79 (2016). DOI:10.1095/biolreprod.115.136929 (査読有)

(10) Lee S, Iwasaki Y, Yoshizaki G: Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology*, 73, 286-290(2016). DOI:10.1016/j.cryobiol.2016.08.001 (査読有)

(11) Okutsu T, Shikina S, Sakamoto T, Mochizuki M, Yoshizaki G: Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 446, 298-302(2015). DOI:10.1016/j.aquaculture.2015.05.020 (査読有)

(12) Lee S, Seki S, Katayama N, Yoshizaki G: Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports*, 5, 16045 (2015). DOI:10.1038/srep16045 (査読有)

(13) Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, Yamaguchi K, Miwa M, Yoshizaki G: Expression patterns of *gnf* and *gfr 1* in rainbow trout testis. *Gene Expression Patterns*, 14, 111-120(2014). DOI:10.1016/j.gep.2014.01.006 (査読有)

(14) Sato M, Morita T, Katayama N, Yoshizaki G: Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation. *Aquaculture*, 422-423, 218-224(2014). DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.12.016 (査読有)

(15) Hayashi M, Sato M, Nagasaka Y, Sadaie S, Kobayashi S, Yoshizaki G: Enrichment of Spermatogonial Stem Cells Using Side Population in Teleost. *Biology of Reproduction*, 91, 23 (2014). DOI:10.1095/biolreprod.113.114140 (査読有)

(16) Kume S, Katayama N, Ichida K, Hattori-Ihara S, Nagasawa K, Yoshizaki G: Transgene manipulation in rainbow trout using Cre recombinase. *Fisheries Science*, 80, 767-773(2014). DOI:10.1007/s12562-014-0742-x (査読有)

(17) Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, Hayashi M, Octavera A, Alimuddin, Yoshizaki G: Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology*, 16, 309-320(2014). DOI:10.1007/s10126-013-9551-y (査読有)

(18) Makkapan W, Yoshizaki G, Tashiro M, Chotigeat W. Expression profile of ribosomal protein L10a throughout gonadal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 1069-1081(2014). DOI:10.1007/s10695-013-9906-3 (査読有)

(19) Lacerda S.M.S.N, Costa G.M.J, Campos-Junior P.H.A, Segatelli T.M, Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, Yoshizaki G, França L.R: Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 3-11(2013). DOI:10.1007/s10695-012-9606-4 (査読有)

(20) Shikina S, Nagasawa K, Hayashi M, Furuya M, Iwasaki Y, Yoshizaki G: Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development*, 80, 763-773(2013). DOI:10.1002/mrd.22208 (査読有)

(21) Nagasawa K, Fernandes JM, Yoshizaki G, Miwa M, Babiak I: Identification and

migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: characterization of vasa, dead end, and lymphocyte antigen 75 genes. *Molecular Reproduction and Development*, 80, 118-131(2013). DOI:10.1002/mrd.22142 (査読有)

[学会発表](計 19 件)  
他 93 件 (国際発表 23 件、国内発表 70 件)  
(1) Yoshizaki G: Production of Viable Trout Offspring Derived from Frozen Whole Fish. The 50th anniversary meeting of Society for the Study of Reproduction (SSR). Washington DC, USA (2017).

(2) Yoshizaki G: TRANSPLANTATION OF SALMON GERM CELLS INTO RAINBOW TROUT RECIPIENTS: CAN ITEROPAROUS TROUT REPEATEDLY PRODUCE GAMETES DERIVED FROM SEMELPAROUS SALMON? The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro. Fukuoka, JAPAN (2017).

(3) Yoshizaki G: Characterization of Germ-Line Stem Cells by Single-Cell Transcriptome Analysis in Rainbow Trout. The International Plant and Animal Genome Conference(PAG) ASIA 2017. Seoul, Korea (2017).

(4) Yoshizaki G: Production of viable trout offspring derived from germ cells cultured in vitro. The 11th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC)2017. Hawaii, USA(2017).

(5) Yoshizaki G: Production of Viable Trout Offspring Derived from Frozen Testis Via Germ Cell Transplantation. Cryopreservation of Aquatic Biomedical Models Workshop. Birmingham, USA(2017).

(6) Yoshizaki G: Germ cell manipulation in fish. The 22th Japanese medaka and zebrafish meeting. Okazaki, Japan(2016).

(7) Yoshizaki G: Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. The 9th NIBB International Practical Course. Okazaki, Japan(2016).

(8) Yoshizaki G: Germ cell manipulation in fish. 19th European Testis Workshop. Saint-Malo, France(2016).

(9) Yoshizaki G: Germ Cell Manipulation in Fish: Can Mackerel Produce Tuna Gametes? The 7th World Fisheries Congress. Busan,

Korea(2016).

(10) Yoshizaki G : Germ-cell transplantation research:collaboration between a university and a fishery company. The 15th Asia Maritime & Fisheries Universities Forum.Keelung,Taiwan(2016).

(11) Yoshizaki G : Present status of germ cell transplantation for conservation in fish. 1st International Conference on Aquaculture Biotechnology 2016. Bogor, Indonesia(2016).

(12) Yoshizaki G : PRODUCTION OF VIABLE TROUT OFFSPRING DERIVED FROM FROZEN WHOLE FISH. The 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes. Ancona, Italy(2015).

(13) Yoshizaki G : Germ cell transplantation in fish: can mackerel make tuna? デンマーク養殖アカデミックワークショップ. Tokyo, Japan(2015).

(14) Yoshizaki G : GERM CELL TRANSPLANTATION IN FISH: CAN SURROGATE MACKEREL MAKE TUNA? AQUATIC PRODUCTS PROCESSING: Cleaner Production Chain for Healthier Food. Can Tho city, Viet Nam(2015).

(15) Yoshizaki G : Mass production of sterile fish: how can we produce gametes from sterile fish? The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. Taipei, Taiwan(2014).

(16) Yoshizaki G : Transplantation of salmon germ cells into rainbow trout recipients: can iteroparous trout repeatedly produce gametes derived from semelparous salmon? 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhão, Portuguese Republic(2014).

(17) Yoshizaki G : Production of donor-derived eggs and sperm by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. 2nd Strategical Meeting for Medaka Research. Seville, Spain(2014).

(18) Yoshizaki G : Production of donor-derived offspring by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. The 50th Anniversary of the Society for Cryobiology's meeting. Maryland, USA(2013).

(19) Yoshizaki G : Production of donor-derived eggs and sperm by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. The 5th Asian Network of Research Resource Centers International Meeting (ANRRC 2013). Hayama, Japan(2013).

〔図書〕(計 3 件)

(1) 片山 直人、壁谷 尚樹、竹内 裕、矢澤 良輔、吉崎 悟朗: 水産遺伝育種学「第12章 遺伝子・細胞操作と水産育種における応用」東北大学出版会, 256 (215-227)(2017)

(2) 林 誠、市田 健介、吉崎 悟朗: ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A「Q95 魚類(サケ・マス類, マグロ類, ゼブラフィッシュやメダカなど)から調製した細胞のフローサイトメトリー解析やソーティングは可能でしょうか?」羊土社, 312 (288-290) (2017)

(3) 吉崎 悟朗: サバからマグロが産まれる!? 岩波書店, 126 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉崎 悟朗 (Yoshizaki Goro)

東京海洋大学 学術研究院 教授

研究者番号: 70281003