

令和元年6月20日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07874

研究課題名(和文)代理親効果による配偶子特性の改変

研究課題名(英文)Improvement of donor germ cells functions by surrogate host

研究代表者

齋藤 大樹 (Saito, Taiju)

愛媛大学・南予水産研究センター・准教授(特定教員)

研究者番号：90396309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ドナー生殖細胞を代理親に移植する「代理親生産技術」により、ドナー配偶子を効率的に生産することが可能である。本研究では、代理親がドナー配偶子へ与える影響を検討した。胚の発生率が極めて低く脆弱な系統として知られているゼブラフィッシュ系統(Casper)をドナーとし、野生型(AB系統)胚へ始原生殖細胞(PGCs)を割球移植法により移植した。その結果、生殖系列キメラを経由したcasper系統の生残率は32%であった。また、通常casper系統よりも卵膜が強固で、排精量が多く、CASA解析により運動精子率が高いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、代理親を経由してドナー配偶子生産を行うことにより、魚類配偶子の一部機能(卵膜の厚み、受精卵の発生率、精子活性等)が高まることが明らかとなった。すなわち、本研究を応用することにより、遺伝子の改変を伴うことなく、代理親生産技術により目的系統(種)の配偶子機能を高めることができる可能性がある。より妊性が高く、より卵質の高い配偶子を形成できる宿主系統を確立すれば、あらゆる系統の配偶子を高品質に生産できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)："Surrogate production" is a technique to achieve efficient production of target gametes via surrogate parents by inducing germ line chimera. The germ line chimera can be produced by transplanting germ line stem cells, such as primordial germ cells (PGCs), spermatogonia, and oogonia. In this study, we test if there are "parental effects" on germ cells by using different zebrafish strains, Casper and AB. We transplanted Casper PGCs into AB blastula embryos with BT-method to produce germ line chimeras. The host embryos were injected with MO against dnd gene in advance to remove endogenous PGCs. As a result, the survival rate of Casper larvae obtained from germ line chimeras was significantly higher than that of normal Casper strain. In addition to this, their chorion were thicker than controls, and CASA analysis revealed sperm from chimeras showed better scores than controls.

研究分野：水産発生工学

キーワード：借腹生産 代理親生産 始原生殖細胞 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、親の健康状態が「配偶子の質」に影響を与える証拠が多数報告されている。マウスの例では、特異的な臭いとともに電気ショックなどの恐怖刺激を雄マウスに経験させると、エピジェネティック制御により、その雄の精子に由来する子孫も同じ臭いに反応して恐怖発作を起こすことが報告されている (Dias and Ressler, Nat. Neurosci. 2014)。魚でも、環境変化や親の栄養状態によって生産する卵サイズが変わる例が知られている。このことから種苗生産では、いかに状態の良い親魚から配偶子を得るかが成功へのポイントとなる。しかしながら、その、“状態の良い親魚”には生物学的限界がある。すなわち、いかに良好な親魚であろうとも、自身の遺伝的特性に応じた形質の配偶子しか作ることができないのである。

近年注目を集めている配偶子生産技術に「借腹生産」がある。これは、胚中の「始原生殖細胞 (PGCs)」や「成熟生殖巣の生殖幹細胞 (GSCs)」を不妊化した宿主に移植し、生殖細胞を置換した「生殖系列キメラ」を作出することで効率的に配偶子を得る一連の技術である。もし、適切な代理親を選択することで配偶子の变化を好ましい方向へ導くことが可能ならば、革新的な種苗生産技術となる。しかしながら、これまでのところ、生殖系列キメラによって生産された配偶子がいかなる性質を持つのか調べた研究はほとんどない。そこで本研究では、配偶子の性質が異なる魚種をそれぞれドナーとレシピエントに設定し、「配偶子への代理親効果」を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、代理親効果によって影響を受ける配偶子の性質を網羅的に調べることを目的とした。

(1) 第一に、代理親が配偶子へ与える影響を評価するための精密な実験系を構築する。すなわち、生殖細胞の移植により「生殖系列キメラ」を作出し、それらから配偶子を得る手法を検討する。

(2) 次に、キメラから得られた配偶子を使用し、代理親効果によって変化する、配偶子 (卵・精子) および胚のあらゆる量的形質を測定する。以上の結果から、代理親効果があるか否かを明らかにする。

本研究では、実験魚として利用しやすいゼブラフィッシュを主要な実験材料とするが、水産資源上重要なチョウザメや海産魚でも借腹生産技術を確立し、水産への展開も目指す。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ 2 系統 (Casper 系統、AB 系統) を実験に用いた。Casper 系統は *roy* 遺伝子と *nacre* 遺伝子の 2 つの遺伝子が欠損した二重変異体で、初期生残率が極めて低く、配偶子の状態も悪いことが知られている。AB 系統は野生型の系統である。

(2) Casper 系統の親魚から得られた受精卵の胚盤に GFP-*zfnos3* 3'UTR mRNA を微小ガラス管を用いて顕微注入し、PGCs を可視化した。同時に採卵した AB 系統の受精卵には、*dnd* 遺伝子に対するモルフォリノオリゴを顕微注入し、内在性の PGCs を除去した。胞胚期に、Casper 系統の PGCs を含む胚領域 (胚盤周縁部) を AB 系統の胚へと移植した。移植されたドナー PGCs が生殖腺形成域へと定着した個体を選別し、飼育した。



図. ドナー PGCs が生殖腺形成域で増殖している個体。緑色蛍光を発している細胞が PGCs。

(3) 数ヶ月飼育し、親魚まで養成したキメラおよび未処理のコントロール魚を Tricaine により麻酔し、腹部圧迫により精子を得た。精子は 10 倍の HANKS 液により希釈し、CASA (computer

assisted sperm analysis)解析に供した。

(4) 親魚まで養成したキメラおよび未処理のコントロール魚の自然交配により受精卵を採取し、卵膜の厚さおよび孵化仔魚の発生率を調べた。

(5) 同様に、ロシアチョウザメ、シベリアチョウザメの精原細胞を不妊化処理したコチョウザメ孵化仔魚に移植し、生殖系列チョウザメキメラを作出した。また、以上の知見を海産魚に応用すべく、精原細胞・卵原細胞の大量移植法の開発を試みた。

4. 研究成果

通常飼育での casper 系統の親魚までの生残率はおよそ 5%と極めて低かったが、キメラ化することにより、Casper 生殖細胞をもつ生殖系列キメラのうちおよそ 70%を生残させることが可能であった(図)。これらの生殖系列キメラは正常に成熟し配偶子形成を行い、交配実験より、casper 系統の配偶子のみを生産していることが確認された。キメラ同士の交配により、生殖系列キメラを経由した casper 個体の作出が可能であった。極めて興味深いことに、生殖系列キメラを経由した casper 系統の生残率は 32%であった。また、通常 casper 系統よりも卵膜が強固で、排精量が多く、CASA 解析により運動精子率が高いことが明らかとなった。以上のことから、本申請の目的であった「配偶子への代理親効果を評価するための精密なキメラ作出実験系」を確立した上で、これまで全く知られていなかった「配偶子への代理親効果」を明らかにすることができた。これらの結果は論文としてまとめ投稿準備中である。

加えて、本知見を他魚種に応用すべく、チョウザメおよび海産魚をモデルとし、効率的に生殖系列キメラを作出するための新規移植法を開発した。新規移植法を用いることで、これまで報告されたどの方法よりも高い効率でドナー細胞を宿主胚に導入することが可能であることが明らかとなった。現在、本手法を用いた海産魚生殖系列キメラを飼育中であり、今後代理親効果の検証を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

- (1) Rie Goto and Taiju Saito (2019) A state-of-the-art review of surrogate propagation in fish. *Theriogenology*, Volume 133, 15 July 2019, Pages 216-227.
- (2) Viktoriia Iegorova, Milos Havelka, Martin Psenicka, Taiju Saito. (2018) First evidence of viable progeny from three interspecific parents in sturgeon. *Fish Physiology and biochemistry*. 2018 Dec;44(6):1541-1550. doi: 10.1007/s10695-018-0553-6. Epub 2018 Sep 19.
- (3) Viktoriia Iegorova, Martin Psenicka, Ievgen Lebeda, Marek Rodina, Taiju Saito. (2018) Polyspermy produces viable haploid/diploid mosaics in sturgeon. *Biology of Reproduction*. Volume 99, Issue 4, October 2018, Pages 695–706, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy092>
- (4) Diógenes Henrique de Siqueira-Silva, Taiju Saito, Amanda Pereira dos Santos-Silva, Raphael da Silva Costa, Martin Psenicka, George Shigueki Yasui. (2018) Biotechnology applied to fish reproduction: tools for conservation. *Fish Physiol Biochem*. 2018 Apr 29. doi: 10.1007/s10695-018-0506-0.
- (5) Güralp, H., Pocherniaieva, K., Blecha, M., Policar, T., Pšenička, M., Saito, T. (2017) Development, and effect of water temperature on development rate, of pikeperch *Sander lucioperca* embryos. *Theriogenology*, 104:94-104. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.050.
- (6) Piva LH, de Siqueira-Silva DH, Goes CAG, Fujimoto T, Saito T, Dragone LV, Senhorini JA, Porto-Foresti F, Ferraz JBS, Yasui GS. (2017) Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology*, 108:239-244. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.013.
- (7) Güralp, H., Pocherniaieva, K., Blecha, M., Policar, T., Pšenička, M., Saito, T. (2016) The migration of primordial germ cells during late embryogenesis of pikeperch *Sander lucioperca* relative to blastomere transplantation *Czech Journal of Animal Science*, 62: 121-129.
- (8) Güralp, H., Pocherniaieva, K., Blecha, M., Policar, T., Pšenička, M., Saito, T. (2017) Development, and effect of water temperature on development rate, of pikeperch *Sander lucioperca* embryos. *Theriogenology*, 2017 Aug 1;104:94-104. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.050.

〔学会発表〕(計 7件)

- (1-6) 6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes にて計 6件 (うち招待講演 1件)
- (7) Workshop on Aquatic Sciences Biotechnology (招待講演)

〔図書〕(計 3件)

- (1) Taiju Saito, Rie Goto, Nicola Rivers, Etsuro Yamaha. "Production of germ-line chimeras in zebrafish" in *Vertebrate Embryogenesis: Embryological, Cellular, and Genetic Methods*, 2nd Edition (Ed. F. Pelegri). *Methods in Molecular Biology*.
- (2) Rie Goto, Taiju Saito, Takahiro Matsubara, Etsuro Yamaga. *Microinjection of Marine Fish Eggs*.

Microinjection Methods and Protocols (Ed. Liu, Chengyu, Du, Yubin) Springer, Methods in Molecular Biology.

(3) 戸村道夫 編、羊土社、ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。