

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05826

研究課題名(和文)海産魚卵巣内への生殖幹細胞移植技術の開発：ドナー由来の卵を短期間で生産する

研究課題名(英文) Development of germ cell transplantation method into the sterile gonads of adult fish.

研究代表者

竹内 裕 (Takeuchi, Yutaka)

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：70418680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：魚類において初めて生殖細胞を欠損する不妊化卵巣内へのドナー生殖細胞の移植を行い、ドナー由来の機能的な卵の生産に成功した。宿主として用いたニベ×シログチの種間雑種は生殖細胞欠損型の不妊を示し、三倍体化により卵巣様生殖腺が分化することを確認した。さらに、この卵巣様生殖腺がドナー由来卵を生産できることを証明した。一方で、XX型の性染色体を有する卵原細胞をドナーとして精巣様生殖腺内に移植したとき、卵原細胞に由来するドナー由来精子が生産された。この精子を用いて次世代子孫を作出したところ、次世代は全てメスとなった。このことは本生殖細胞移植技術が、全メス種苗生産を可能にする新たな手法となることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類では、精子や卵のもととなる生殖細胞をある魚(ドナー)から違う魚(宿主)へすることができる。この技術を利用して、サバにマグロを産ませる研究(=代理親魚技術)が進められている。本実験では、より迅速かつ簡便にドナー由来の精子や卵を生産する技術を開発するため、成魚の卵巣あるいは精巣内に直接、ドナー生殖細胞を移植する技術を開発した。実験には世界的に重要な養殖魚であるニベ科魚類を用いた。生殖細胞を全く持たないニベ科交雑魚(=人工授精で作出した雑種魚)成魚の卵巣内および精巣内に、ニベ(俗名：イシモチ)の生殖細胞を移植し、受精可能な卵と精子をそれぞれ生産することに成功した。

研究成果の概要(英文)：For the first time in fishes, donor germ cells were transplanted into infertile ovaries lacking germ cells, and functional donor-derived eggs were successfully produced. The interspecies hybrid of Nibe x Shiroguchi used as a recipient showed germ cell-deficient sterility, and it was confirmed that the ovary-like gonads were differentiated by triploidization. Furthermore, we proved that this ovary-like gonad can produce donor-derived eggs. On the other hand, when oogonia with XX sex chromosomes were transplanted into the testis-like gonads as donors, donor-derived sperm derived from the oogonia were produced. When the next generation offspring were produced using these sperm, all of the next generation were females. This indicates that this germ cell transplantation technique can be a new method for the production of all-female seedlings.

研究分野：魚類生殖工学

キーワード：生殖細胞移植 海産魚 雑種不妊 配偶子形成 性統御 全雌生産 養殖

1. 研究開始当初の背景

魚類における生殖細胞の異種間移植研究は、研究代表者らが 2004 年に発表したヤマメ精巢内でのニジマス精子の生産に成功した実験 (Takeuchi et al., 2004) に端を発し、現在、淡水魚・海水魚問わず世界中に広がっている (Takeuchi et al., 2009 の他、7 カ国 12 研究室から SCI journal に掲載された関連論文 80 報以上)。これまで少なくとも 11 魚種で同種や近縁種をドナーに用いた移植実験の成功例 (ドナー由来の卵や精子の生産に至った例など) が報告されているが、同科異属や異科の魚をドナーに用いた移植実験では、マアジ宿主によるブリ精子の生産 (Morita et al., 2015)、ティラピア宿主によるナマズ精子の生産 (Silva et al., 2016)、ゼブラフィッシュ宿主によるキンギョおよびドジョウ精子の生産 (Saito et al., 2008) の 3 例に留まっている。特に、遺伝的距離が離れるにつれ、ドナー由来の精子は作れても卵は作れない、あるいは、ドナー生殖細胞は宿主生殖腺内に生着し増殖するものの、その後消失していく結果に終わる場合が多い (Takeuchi et al., 2020)。『異種ドナー生殖細胞は、なぜ宿主生殖腺内で消えゆくのか?』この問いを解決することが、代理親魚技術の適応範囲を大幅に広げ、魚類の育種や遺伝子資源保護の分野で更に利用されていくことに繋がる。その解決策の 1 つとして、申請者らは自身の配偶子を生産できない 3 倍体・雑種の不妊化魚を作成し、宿主魚として用いる技術を開発した (Yoshikawa et al., 2017, 2018)。特筆すべき事例として、ニベとシログチ (ともにニベ科ニベ属) の交雑により作出した不妊化雑種 (以下、ニベシロ雑種) を宿主として、属のレベルで異なるドナー魚種であるオオニベ (ニベ科オオニベ属) 精子の生産に成功した (竹内ら、論文準備中)。ニベシロ雑種は、稚魚期に内在性生殖細胞が細胞自発的に消失するといった非常にユニークな生殖細胞欠損の表現型を示すため、宿主とドナーの生殖細胞が生殖腺内で競合せず、また、ドナー細胞が生着・分化するための空間的余裕を多く提供できたと考えられる (Yoshikawa et al., 2018)。すなわち「ドナー生殖細胞と内在性生殖細胞との競合を抑えること、ドナー生殖細胞の生存と配偶子形成を司る生殖腺内の体細胞 (以下、ニッチ細胞) に支持されること」が、同科異属のドナー種 (オオニベ) 由来精子の生産に繋がった可能性が強く示唆された。しかし、ドナー由来卵の生産には至っておらず、さらなる技術改革が必要とされている。

2. 研究の目的

ニベ×シログチ雑種は、生殖細胞欠損型の不妊性を示すため、海産魚の代理親魚技法における有用な宿主として期待されている。しかし、当雑種の生殖腺は精巢様に分化するため、これらを宿主としてドナー由来卵が生産された例は無い。本研究では、不妊化雑種を三倍体化することで卵巣分化の誘導が可能か? さらに、卵巣様生殖腺がドナー由来卵を生産できるか? について調べた。

3. 研究の方法

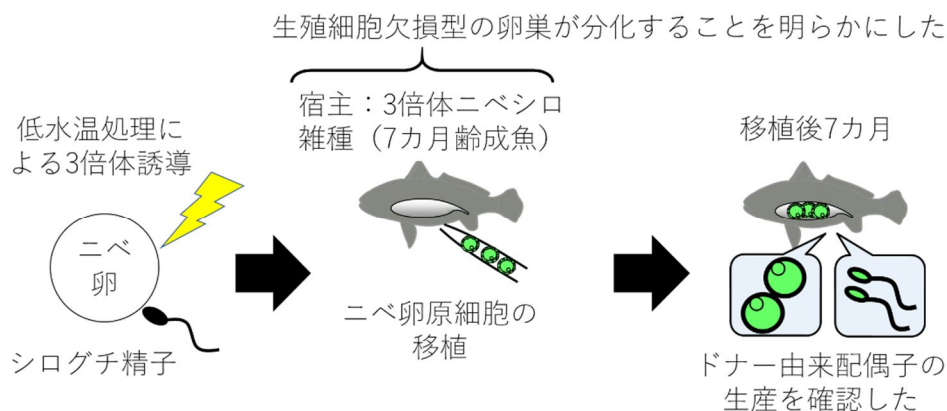
Takeuchi et al., 2018 の方法に従い、ニベシロ雑種受精卵の作出後に低温処理による第二極体放出阻止を行い、3 倍体化を試みた。次に、核型解析と種判別 PCR 解析から雑種 3 倍体と判定された個体について、妊性および性比調査を行った。最後に、雑種 3 倍体に対して、生殖細胞移植を行い、宿主としての有用性を検討した。なお、本実験の生殖細胞移植試験では、Xu らが開発したニベシロ雑種成魚の生殖腺へのドナー生殖細胞の直接移植法を用いた (Xu et al., 2019)。

4. 研究成果

魚類では雑種 2 倍体と雑種 3 倍体では異なる生殖特性を示す例が数例報告されている。ニベシロ雑種は交雑 (人工授精) のみで作出できる生殖細胞欠損型の不妊魚であることから、代理親魚技法における有用な宿主として期待されているが、全ての個体が精巢様生殖腺に分化する。本研究では、ニベシロ雑種を 3 倍体化することで、生存性の向上や生殖細胞欠損型の卵巣が分化するといった、代理親魚技術における宿主としての有用な形質が得られることを明らかにした。

7 ヶ月齢成魚の時点で、雑種三倍体と判定された個体の生殖腺組織観察および cDNA を用いた RT-PCR を行い、生殖腺の形態、性特異的マーカーの発現様式を調べた。続いて、雑種三倍体の宿主としての有用性を調べるため、成魚 8 尾の生殖腺内へ GFP 遺伝子導入ニベから調整した卵原細胞を移植し、9 ヶ月後に配偶子形成の有無を調べた。配偶子が得られた場合には、野生型ニベとの交配試験を行い、F1 世代 (孵化仔魚) が GFP 遺伝子を保持するか否かを調べた。7 ヶ月齢の成魚 80 尾中、38 尾 (48%) が雑種三倍体となり、その生殖腺は生殖細胞を欠損していた。そのうち 10 尾では精巢様生殖腺が、12 尾では卵巣腔を有する卵巣様生殖腺が観察された。卵巣様生殖腺では、雄特異的 *dmrt1* は発現せず、雌特異的 *foxl2*, *cyp19a1a* が発現していた。生殖細胞移植試験の結果、雌雄各 1 尾の宿主が GFP 陽性を示す配偶子を産生し、それらの F1 世代仔魚は全て GFP 陽性を示すドナー由来子孫であることが確認された。以上により、ニベシロ雑種を三倍体化することで、生殖細胞を欠損した卵巣様生殖腺の分化が誘導されること、卵巣様生殖腺への

生殖細胞移植により機能的な卵生産が可能であることが示された。さらに、卵巢様生殖腺がドナー由来卵を生産できることを証明した。一方で、卵原細胞をドナーとして二倍体雑種宿主の精巢様生殖腺内に移植したとき、ドナー卵原細胞に由来する精子が生産された。この精子を用いて、次世代子孫を作出したところ、それらの性別は全てメスとなった。これは、XX型の性染色体を有する卵原細胞が精子へと分化したため、全ての精子がX染色体を有した結果と考えられる。このことは本生殖細胞移植技術が、養殖用種苗の性統御、すなわち、全メス種苗生産を可能にする新たな手法として期待できることを示している。以上の結果を、英語原著論文として発表した (Xu et al. 2020)。また、R1年度途中に、ドナー魚に対して、アルキル化剤(抗がん剤)を注入すると生殖腺内から生殖幹細胞以外の生殖細胞が死滅する可能性が示された。これにより、ドナー細胞中に生殖幹細胞のみを選抜できれば現在の課題である移植成功率の改善につながる可能性が示された。



< 引用文献 >

- Morita T, et al. Functional sperm of the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, jack mackerel (*Trachurus japonicus*). *Mar Biotechnol* 2015;17(5):644-654.
- Silva MA, et al. Successful xenogeneic germ cell transplantation from Jundia catfish (*Rhamdia quelen*) into adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testes. *Gen Comp Endocrinol* 2016;230-231:48-56.
- Saito T, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 2008;78(1):159-166.
- Takeuchi Y, et al. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 2004;430(7000):629-30.
- Takeuchi Y, et al. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol Reprod* 2009;81(6):1055-63.
- Takeuchi Y, et al. Production of functionally sterile triploid Nibe croaker *Nibea mitsukurii* induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock. *Aquaculture* 2018;49445-49456.
- Takeuchi Y, et al. Chapter 17. Intraperitoneal Germ Cell Transplantation Technique in Marine Teleosts. M. Yoshida, J.F. Asturiano (eds.), *Reproduction in Aquatic Animals*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020;pp.357-379.
- Xu D, et al. Germ cell-less hybrid fish: ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm. *Biol Reprod* 2019;101(2):492-500.
- Yoshikawa H, et al. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). *Aquaculture* 2017;478:35-47
- Yoshikawa H, et al. Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. *Genetics* 2018;209(2):507-521.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Qin Z, Yang F, Tian L, Chen R, Xu D, Takeuchi Y	4. 巻 51
2. 論文標題 Induction of sex reversal in blue drum (<i>Nibea mitsukuri</i>) and gynogenetic yellow drum (<i>Nibea albiflora</i>) by oral administration of letrozole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 882-889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.14434	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 Yazawa R, Takeuchi Y, Machida Y, Amezawa K, Kabeya, Tani R, Kawamura W, Yoshizaki G	4. 巻 50
2. 論文標題 Production of triploid eastern little tuna, <i>Euthynnus affinis</i> (Cantor, 1849)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 1422-1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.14017	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 -
1. 著者名 Hayasaka O, Takeuchi Y, Shiozaki K, Anraku K, Kotani T	4. 巻 9
2. 論文標題 Green light irradiation during sex differentiation induces female-to-male sex reversal in the medaka <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38908-w	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 -
1. 著者名 Xu D, Yoshino T, Konishi J, Yoshikawa H, Ino Y, Yazawa R, Lacerda SM, Franca LR, Takeuchi Y	4. 巻 101
2. 論文標題 Germ cell-less hybrid fish: ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 492-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz045	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 Takeuchi Y, Yatabe T, Yoshikawa H, Ino Y, Kabeya N, Yazawa R, Yoshizaki G.	4. 巻 494
2. 論文標題 Production of functionally sterile triploid Nibe croaker <i>Nibea mitsukurii</i> induced by cold-shock treatment with special emphasis on triploid aptitude as surrogate broodstock	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 45-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquaculture.2016.05.030	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 -

1. 著者名 Yoshikawa H, Xu D, Ino Y, Yoshino T, Hayashida T, Wang J, Yazawa R, Yoshizaki G, Takeuchi Y.	4. 巻 209
2. 論文標題 Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 507-521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/genetics.118.300777	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 Yazawa R, Takeuchi Y, Machida Y, Amezawa K, Kabeya N, Tani R, Kawamura W, Yoshizaki G.	4. 巻 50
2. 論文標題 Production of triploid eastern little tuna, <i>Euthynnus affinis</i> (Cantor, 1849)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aquaculture research	6. 最初と最後の頁 1422-1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/are.14017	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

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshino, T., Xu, D., Hayashida, T., Yoshikawa, H., Ino, Y., Takeuchi, Y.
2. 発表標題 PRODUCTION OF DONOR-DERIVED EGGS AFTER OVARIAN GERM CELL TRANSPLANTATION INTO ADULT GONADS OF GERM-CELL DEFICIENT HYBRID CROAKERS
3. 学会等名 11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawamura, W., Yazawa, R., Tani, R., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G.
2. 発表標題 SUITABILITY OF HYBRID MACKEREL (<i>Scomber australasicus</i> × <i>S. japonicus</i>) WITH GERM CELL-LESS STERILE GONADS AS A SURROGATE BROODSTOCK FOR PRODUCTION OF BLUEFIN TUNA
3. 学会等名 11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yazawa R., Kawamura W., Hattori R.S., Yoshinaga T.T., Tsukamoto R.Y., Takeuchi Y., Yoshizaki G.
2. 発表標題 PRODUCTION OF FUNCTIONAL BLUEFIN TUNA SPERM USING SURROGATE BROODSTOCK TECHNOLOGY
3. 学会等名 11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takeuchi Y, Yazawa R, Yoshizaki G.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 23
3. 書名 Reproductive Biology and Aquaculture Technology in Aquatic Animals	

1. 著者名 吉崎悟朗・矢澤良輔・竹内 裕	4. 発行年 2018年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 212
3. 書名 魚類発生学の基礎	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
中国	浙江省海洋水産研究所			
ブラジル	Federal University of Minas Gerais			