

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02289

研究課題名（和文）生殖細胞欠損魚への生殖腺内生殖細胞移植を介した早期配偶子生産法の開発

研究課題名（英文）Development of a rapid gamete production technique using germ cell transplantation into a gonad of germ cell-less fish.

研究代表者

吉川 廣幸（Yoshikawa, Hiroyuki）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：40733936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、世代時間が長い大型海産魚の配偶子を早期に得るための新たな世代時間短縮法の構築を目指して研究を行い、次の成果を得た。まず、ゲノム編集を用いて世代時間が短い小型近縁種において、生殖細胞欠損個体を大量生産するための技術を確立した。さらに、不妊化された小型近縁種の成魚の生殖腺内で配偶子を代理生産するための細胞移植技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用品種をつくりだすには、始祖となる魚を交配し、変異の固定と均一化をはかることが必要となる。しかし、世代時間が長く、それに伴い体サイズが大型化する海産魚を成熟させて次世代を得ることは容易ではなく、有用品種樹立に向けた最大の障壁となっている。本研究では、不妊魚生殖腺へ生殖細胞を移植して小型魚種から早期に配偶子を代理生産する新規の世代時間短縮法構築に向けた成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a novel method to shorten the generation time of large marine fish, which typically have long generation times, in order to obtain gametes early, and we achieved the following results. First, using genome editing, we established a technique to mass-produce germ cell-deficient individuals in small, closely related species with shorter generation times. Then, we developed a cell transplantation technique to produce gametes in the gonads of those sterile adults.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：トラフグ 代理親魚技術 ゲノム編集 種苗生産 生殖細胞欠損

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

水産分野では選抜育種やゲノム編集技術などを利用して有用品種・系統をつくりだす試みが行われつつある。しかし、これらをつくりだすには、有用形質を示す遺伝的変異の固定と均一化をはかることが必要となるため、どのような育種手法を用いたとしても、品種の始祖となる魚を交配する必要がある。よって、世代時間が長く、それに伴い体サイズが大型化する海産魚を成熟させて次世代を得ることは容易ではなく、有用品種樹立に向けた最大の障壁となっている。

この問題を解決する手段の一つに、“代理親魚技術”〔Yoshizaki and Yazawa (2019) Fish. Sci., 85, 429-437〕がある。本技術は、卵や精子のもととなるドナーの生殖細胞を宿主へと移植することで、宿主からドナーの卵や精子を形成させ、それらの交配によりドナー由来の子孫を生産するものである。例えば、トラフグが成熟するには一般に雄で2年、雌で3年以上の養成期間が必要であり、さらに親魚の体サイズは大型(雌では全長50cm以上)となるため、大規模な飼育スペースも必要となるが、研究代表者らは、ドナーとするトラフグの細胞をクサフグ(全長12cm程度、トラフグ属で最も小型の近縁種)の孵化仔魚腹腔内へ移植することで生殖腺内へ取り込ませ、成熟したクサフグ宿主からトラフグ配偶子を生産させることに成功している〔Yoshikawa et al. (2020) Aquaculture, 526, 735385; Yoshikawa et al. (2018) Aquaculture 493, 302-313〕。しかしながら、クサフグ宿主が成熟するまでの期間は依然として長く(雄で1年、雌で2年)、養殖品種樹立までの難点を飛躍的に解決し、トラフグ育種を加速していくには十分とはいえない。

近年、研究代表者らはスズキ目ニベ科内の属間雑種が生殖細胞を欠損する不妊を呈することを発見し〔Yoshikawa et al. (2018) Genetics 209, 507-521〕、本雑種の成魚の生殖腺へニベの生殖細胞を移植したところ、これらは機能的な配偶子へと分化することが判明した〔Xu et al. (2019) Biology of reproduction 101, 492-500; Xu et al. (2019) Biology of reproduction 103, 1289-1299〕。一般に、ニベは雌雄ともに6ヶ月齢で成熟に至るが、この成魚精巢へ移植する手法では、最短で移植2ヶ月後にドナー精子が形成されることも確認された。宿主が成魚になるまでの成長時間を待つ必要がなく、ドナー配偶子を獲得するまでに必要な時間の短縮がはかれる本手法は、ドナー由来次世代の作出を劇的に早く行えるポテンシャルを有している可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、世代時間が比較的長く重要な養殖魚種であるトラフグを対象として、ゲノム編集によりトラフグの代理親となるクサフグの生殖細胞欠損個体の大量生産技術を開発するとともに、これら成魚の生殖細胞欠損生殖腺への細胞移植を介した代理親魚生産技術を確立することにより、世代時間が長い大型海産魚の配偶子を早期に得られる新規の世代時間短縮法を構築することを旨とした(図1)。

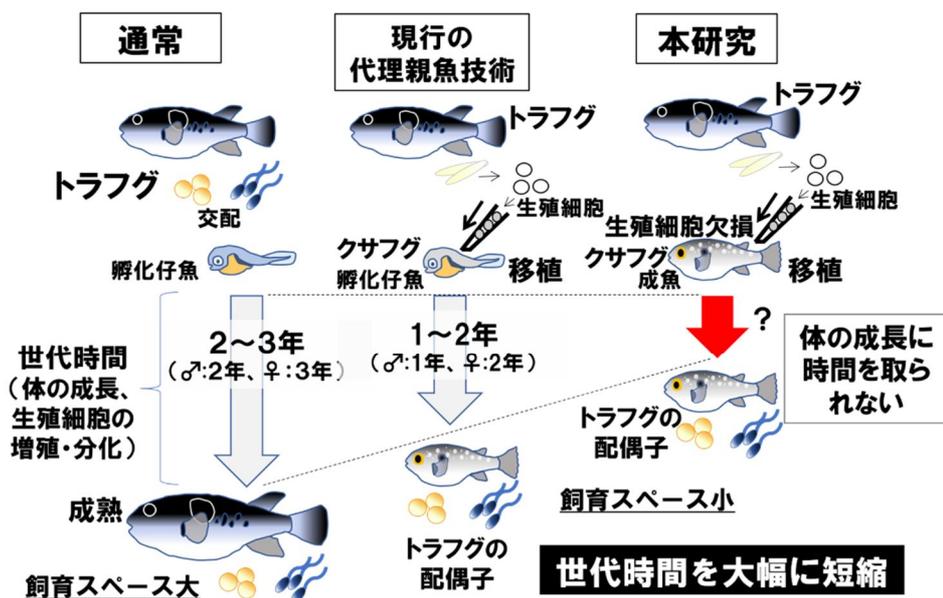


図1. 本研究の目的と概要

3. 研究の方法

生殖細胞欠損魚の大量生産法の開発：

生殖細胞の生存に必須な *dnd1* の遺伝子配列内部へ蛍光タンパク質遺伝子タグ (FP タグ) を挿入することにより、遺伝子破壊とその可視化が可能な遺伝子破壊システムの樹立を目指した。CRISPR-Cas9 システムにより標的 DNA 配列を切断するため、クサフグ *dnd1* (GenBank accession no. LC511048) の第 4 エキソン内に sgRNA を設計した。Murakami et al. (2017) [https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2665] に従い、水晶体で発現するクリスタリンのプロモーターと蛍光タンパク質 (緑色蛍光タンパク質 (GFP) または赤色蛍光タンパク質 (RFP)) を連結した配列を前述の sgRNA による標的切断箇所へ FP タグとして挿入するためのドナープラスミドを作成した (図 2)。そして、これら sgRNA およびドナープラスミドと Cas9 mRNA を含むゲノム編集溶液をクサフグ受精卵へ顕微注入し、顕微注入を行った F0 を観察した。また、これらを親魚として、野生型個体と交配し、F1 を得るとともに、これら F1 の雌雄 (GFP タグ標識された個体と RFP タグ標識された個体) を交配させ、F2 を作出し、その生殖特性を評価した (図 3)。

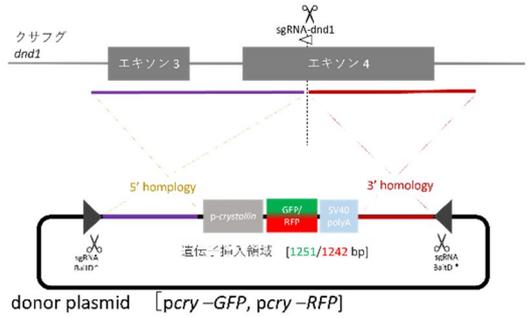


図2. CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集箇所とドナープラスミド

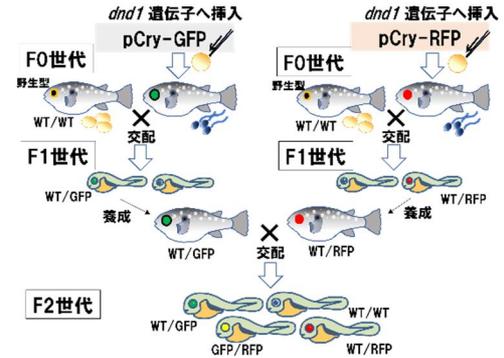


図3. 交配試験の概略

生殖細胞欠損魚の宿主適正に関する検討：

FP タグ挿入により *dnd1* を遺伝子破壊し、生殖細胞欠損を誘導したクサフグについて、トラフグをドナーとした場合の宿主としての適性を既法の移植法を用いて評価した。FP タグを挿入した F1 の雌雄 (GFP タグ標識された個体と RFP タグ標識された個体) を交配して作出した F2 の内、GFP・RFP 共陽性の水晶体を有するふ化仔魚の腹腔内へトラフグ精巣細胞を移植した。これら宿主は、成熟に至る 2 歳齢の繁殖期まで飼育養成し、ドナー由来の配偶子生産の有無を評価した。

生殖腺内移植による代理親魚の作出：

ドナーとするトラフグの生殖細胞を、宿主とする生殖細胞欠損クサフグの生殖腺内へ導入するための移植手法を検討した。溶液導入の成否を評価するため、トリパンブルー溶液の生殖腺への導入を試みた。次に、トラフグ精巣を酵素分散し、ドナー細胞として、宿主とする生殖細胞欠損個体の生殖腺へ移植した。移植 1 ヶ月後以降、宿主の生殖腺発達状況を観察するとともに、宿主の生殖腺から抽出した DNA を用いて PCR 解析を行った。さらに、宿主を 1 年間飼育し、生殖腺の発達状況を観察した。

4. 研究成果

生殖細胞欠損魚の大量生産法の開発：

ゲノム編集溶液を導入した受精卵の発生観察を行ったところ、約 8% の胚で水晶体に GFP または RFP の蛍光が観察された (図 4)。これらの個体について PCR 解析したところ、約 40% で標的箇所への FP タグの挿入が行われていたことを確認した。次に、FP タグが導入された F0 から F1 を作成し、F1 の雌雄 (GFP タグ標識された個体と RFP タグ標識された個体) を交配させて F2 を作出したところ、これらはメンデル遺伝の法則に従い、等頻度で水晶体が GFP 陽性、RFP 陽性、野生型および GFP・RFP 共陽性であった。これら F2 世代の生殖腺を観察したところ、GFP・RFP 共陽性個体では 24 ヶ月の成熟齢の個体であっても、他と比べて著しく生殖腺が発達しておらず、生殖腺内に生殖細胞は観察されなかった (図 5)。以上より、FP タグを *dnd1* の両アレルに挿入することで *dnd1* の遺伝子破壊が可能であり、外部観察から生殖細胞欠損の形質を簡便に判別できることが明らかとなった。

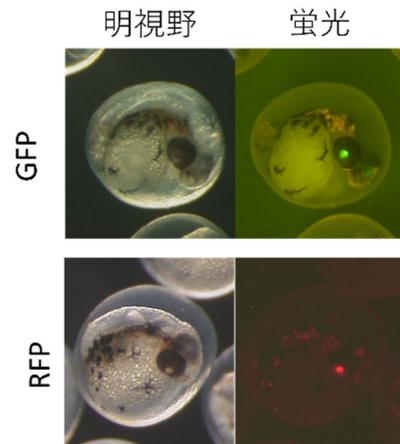


図4. マイクロインジェクションを行ったF0胚。ドナープラスミドを含むゲノム編集溶液を導入した。

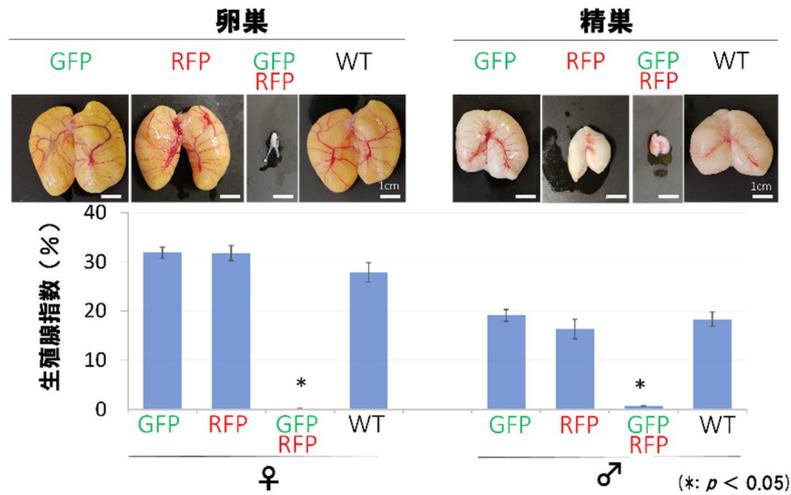


図5. FPタグ導入個体(24ヶ月齢)の生殖腺と生殖腺指数

生殖細胞欠損魚の宿主適正に関する検討：

ふ化仔魚腹腔内へ細胞を移植する既法により、FP タグ挿入の生殖細胞欠損魚へトラフグ精巢細胞を移植したところ、宿主の雄では1歳で、雌では2歳の繁殖期にそれぞれトラフグ精子と卵が生産されたことが確認できた。よって、本研究で作出された生殖細胞欠損魚がトラフグ配偶子の代理生産を可能にする生殖腺環境を有することが明らかとなった。

生殖腺内移植による代理親魚の作出：

クサフグの生殖腺内への移植手法を確立するため、トリパンプル溶液を用いてその成否を検討した。まず、泌尿生殖孔から注入することで生殖腺内への導入が可能か検討したものの、注入した溶液を生殖腺内へ到達させることはできなかった。一方で、外科的にクサフグの腹部を切開して、その後に目視しながら生殖腺へトリパンプル溶液を注射する手法では、生殖腺へ溶液を導入することが可能であった(図6)。本手法によりトラフグ精巢細胞を生殖細胞欠損のクサフグへ移植したところ、移植2か月後の少数個体の生殖腺からトラフグゲノムが検出された(図7)。しかし、移植1年後までの飼育期間において、宿主からの配偶子生産は認められなかった。



図6. クサフグ成魚生殖腺への移植操作

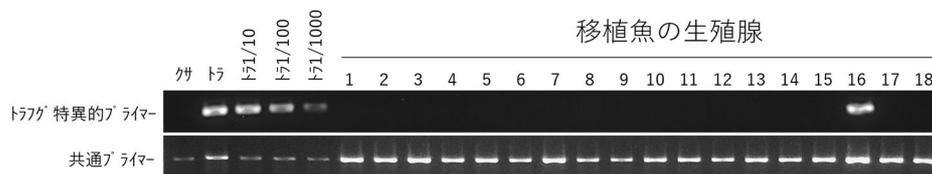


図7. 移植魚の生殖腺から抽出したDNAのPCR解析

今後、本研究により樹立した生殖細胞欠損系統へ免疫欠損形質を付与してドナー細胞の宿主生殖腺への定着効率を高めるなど、成魚生殖腺への移植を介した代理生産を可能にするための更なる検討が求められる。これまで難点であった海産養殖魚共通の世代時間の問題を解決し、高速な有用品種の樹立を実現するための世代時間短縮法として、今後の技術開発の進展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Hiroyuki、Ino Yasuko、Shigematsu Atsushi、Yoshiura Yasutoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 Enrichment of spermatogonia by density gradient centrifugation for use as a donor of surrogate production of tiger puffer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 4032 ~ 4044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/are.15905	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6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 三留明葵, 奥村友紀恵
2. 発表標題 ヒガンフグの生殖特性評価と人工排卵誘導技術の開発
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 岸本謙太, 木下政人, 吉浦康寿
2. 発表標題 蛍光タンパク質遺伝子挿入によるクサフグの不妊形質の可視化
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshikawa H
2. 発表標題 Studies on surrogate broodstock technology in tiger puffer and its application for breeding program.
3. 学会等名 The 27th Joint International Symposium between Pukyong National University and National Fisheries University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 岸本謙太, 木下政人, 吉浦康寿
2. 発表標題 遺伝子破壊による生殖細胞欠損クサグ宿主の作出
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸
2. 発表標題 代理親魚技術によるトラフグ生産と遺伝資源の保存管理技術の開発
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会シンポジウム「トラフグ養殖研究の最前線～次世代のトラフグ生産を科学する～」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川廣幸, 井野靖子, 吉浦康寿
2. 発表標題 密度勾配遠心によるトラフグ精原細胞の濃縮と代理親技術への利用
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

〔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 分担者	木下 政人 (Kinoshita Masato) (60263125)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉浦 康寿 (Yoshiura Yasutoshi) (90372052)	福井県立大学・海洋生物資源学部・教授 (23401)	

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