

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 11日現在

機関番号：82708

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880035

研究課題名（和文） ヒラメの不妊化に向けた始原生殖細胞の移動の解析

研究課題名（英文） Analysis of primordial germ cells migration for infertility in Japanese flounder

研究代表者

山口 寿哉 (Toshiya Yamaguchi)

独立行政法人水産総合センター・増養殖研究所・養殖技術部・任期付研究員

研究者番号：70604312

研究成果の概要（和文）：始原生殖細胞(PGC：Primordial germ cell)の動態とその分子機構について海産養殖魚ではほとんど調べられていない。そこで、ヒラメを用いて PGC の移動とそれに関わる分子機構の解析を行った。始原生殖細胞の移動に関わる *cxcr4* (4型ケモカイン受容体) をヒラメにおいて単離した。また、ケモカイン受容体の阻害剤 AMD3100 を投与することで PGC マーカー遺伝子である *vasa* の mRNA が消失した。この結果から、ヒラメにおいて PGC の移動に *cxcr4* が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In marine farmed fishes, it is not yet investigated the molecular mechanism in fundamental dynamic state of primordial germ cell PGC. Then, in this study, migration of PGC and the molecular mechanism were analyzed using the Japanese flounder. The *cxcr4* (4 type chemokine receptor) gene is isolated in Japanese flounder, which is known that the involved with migration of a primordial germ cell. Moreover, I tried prevention of PGC migration by using a chemokine receptor inhibitor AMD3100 which combines with *cxcr4* specifically and inhibit the work antagonistically. As a result, in the individual which administrated AMD3100, a PGC marker *vasa* mRNA is disappeared in Japanese flounder. It became clear from this result that *cxcr4* participates in migration of PGC in the flounder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：不妊化、始原生殖細胞、*cxcr4*、ヒラメ

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の養殖魚研究において、長年の努力と投資により様々な有用形質を保持した優良系統が選抜育種されてきた。しかしながら、近年、それらの優良系統が国外へ流出する危

険性が懸念されている。また、養殖魚のメスにおいては、卵の成長に栄養を費やし可食部分が減少することで商品価値が下がる場合が多く、この成熟にともなう肉質低下を防ぐ手段の開発が望まれている。また、天然魚と

は異なった遺伝的特徴をもつ養殖魚やその子孫が外界に出た場合の生態系への悪影響も懸念されている。このような問題を解決する為には、配偶子(卵や精子)を持たない魚を作り出す「不妊(稔)化」の技術開発が必要とされているが、生産額の大きい海産の養殖対象魚に応用可能な技術は確立されていない。卵や精子のもとになる始原生殖細胞(PGC: Primordial germ cell)は発生初期において、成熟した卵や精子の数と比較して細胞数が少なく、また、将来卵巣や精巣になる領域には発生初期にPGCは存在せず、別の領域から「移動」してくることで卵や精子へと分化する。さらに、硬骨魚類であるゼブラフィッシュにおいて、このPGCの移動に関わる遺伝子である *cxc4* (ケモカイン受容体)の働きを抑制することで生殖細胞が全くない状態になることが報告されている(Doitsidou et al., 2002)。これらことから、PGCの移動を抑制する技術により不妊化できる可能性がある。しかしながら、海産養殖魚においてはPGCの移動についての基礎的な情報はほとんど無い。

## 2. 研究の目的

ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)は海産養殖魚のなかで比較的扱いやすく、申請者が所属する水産総合研究センター増養殖研究所においては、ヒラメを飼育し産卵させる為の施設が完備されている。また、申請者はヒラメの温度依存性性決定の分子機構を解明しており(Yamaguchi et al., 2010)、ヒラメの生殖腺についての知識が豊富であることから、本研究課題においては、ヒラメを実験材料に選定し、PGCの移動を観察する為に必要なマーカー遺伝子の単離を行い、PGCの移動を詳細に観察する。さらに、PGCの移動に関わる遺伝子の発現とその機能的な解析を目的として、アンチセンスオリゴを受精卵にマイクロインジェクションして翻訳阻害(ノックダウン法)を行い、PGCの移動に関わる分子機構の解析を行う。これにより、海産養殖魚類の不妊化技術の開発に不可欠なPGCの移動に関する基礎的な解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒラメにおけるPGCの移動状況の解析

配偶子のもとになるPGCは発生時期に移動して、将来生殖腺に分化する領域に集まることが知られている。硬骨魚類であるゼブラフィッシュにおいては、動物極側に胚盤葉が形成される受精後4時間頃からPGCが移動を始め、受精後24時間には将来生殖腺に分化する領域に到達する。このPGCが移動するプロセスは約20時間であり、孵化前にはPGCの移動は完了していることが報告されている(Weidinger et al., 1999)。このことから、ヒラメにおいてもPGCの移動は孵化前に完了

している可能性が高いと考えられる。そこで、ヒラメにおいても孵化前におけるPGCの移動の状況を確認する為に、マーカー遺伝子の発現を指標にしたPCR及びホールマウント *in situ* hybridizationによるmRNAの発現解析を行う。PGCのマーカー遺伝子として、ゼブラフィッシュにおいてPGCに発現することが報告されている(Yoon et al., 1997) *vasa* 遺伝子等が考えられる。このように、受精前後のヒラメ受精卵において、*vasa* 遺伝子等をPGCのマーカーとしてその発現の解析を行うことで、ヒラメにおけるPGCの移動の状況を解析する。

### (2) ヒラメにおけるPGC移動及び維持に関わる遺伝子の単離

PGCの移動の分子メカニズムについては、SDF-1(stromal cell-derived factor-1)をリガンドとするケモカイン受容体(*cxc4*: C-X-C chemokine receptor-4)が重要な役割を持つとされ、ゼブラフィッシュにおいてもその重要性が示されている(Doitsidou et al., 2002)。また、*dead end* 遺伝子についても、この遺伝子の翻訳を、ノックダウン法を用いて一過的に抑制した場合、PGCの移動が阻害され、PGCはアポトーシスにより消滅することが報告されている(Weidinger et al., 1999)。このようにいくつかのPGCの移動に関与する遺伝子が魚類においても報告されている。そこで、まずは、ヒラメ未分化生殖腺及び、成体の生殖腺などからこれらの遺伝子の単離を試みる。

### (3) 機能阻害によるPGC移動に関する遺伝子の解析

ヒラメ受精卵にマイクロインジェクションによる機能阻害を試みる。マイクロインジェクション法を用いることで、ヒラメ受精卵に *cxc4* mRNA のアンチセンスオリゴを注入することで、*cxc4* mRNA の翻訳阻害を行う。また、海産魚の受精卵へのマイクロインジェクションは非常に困難である為、*cxc4* のアンタゴニストを用いた *cxc4* の機能を阻害実験も同時に行う。*cxc4* のアンタゴニストにはAMD3100を用いる。AMD3100はがん治療に用いられる薬剤で、ケモカイン受容体のシグナルを阻害する。これらの機能阻害実験を行った後、最長で生殖細胞を確実に観察可能になる孵化後60日齢まで飼育し、各時期においてサンプリングを行う。サンプリング後 *vasa* 遺伝子や *sycp3* 遺伝子などのPGCマーカー遺伝子の発現解析を行うことで、PGCの移動が阻害されるかどうかを調べる。この実験により、ヒラメにおいて単離した遺伝子がPGCの移動に関わっているかどうかを確認する機能的な解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ヒラメにおける PGC の移動状況の解析  
生殖細胞のマーカー遺伝子である *vasa* がヒラメにおいても他種と同様に生殖細胞特異的に発現することが *in situ* hybridization、免疫染色による組織学的な解析により分かった。それにより、*vasa* mRNA の発現を調べることで、PGC の移動状況を調べた結果、受精後 1 日目には PGC の移動が完了していることが分かった。

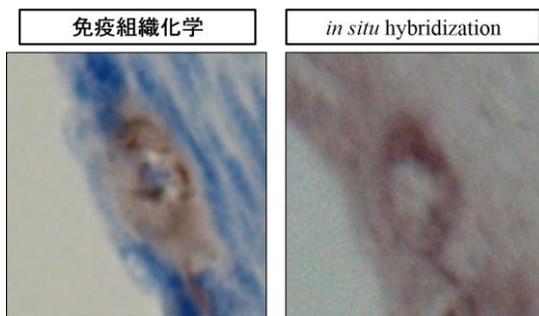


図 1、生殖細胞における *vasa* タンパク質及び、mRNA の発現

(2) ヒラメにおける PGC 移動に関わる遺伝子の単離

始原生殖細胞の移動に関わることが他種において知られている *cxcr4* (4 型ケモカイン受容体) 及び、そのリガンドである *sdf-1* をヒラメにおいて単離した。単離した *cxcr4* はゼブラフィッシュ (84.1%)、メダカ (82.6%) などと高い相同性が得られた。また、系統樹解析の結果、他種の *cxcr4* と系統的に近いことが分かったことから、得られた配列はヒラメの *cxcr4* である可能性が非常に高い (図 1)。そこで、*cxcr4* の mRNA 及び、タンパク質の発現を PCR、*in situ* hybridization 及び、western blot により調べたところ、*vasa* mRNA と同じ生殖細胞において発現することが孵化直後のヒラメ仔魚において分かった (図 1)。また、生殖細胞特異的に発現する減数分裂マーカー *sycp3* を単離し、発現を調べたところ、*vasa*、*cxcr4*、*sycp3* は全て生殖細胞において発現していた。

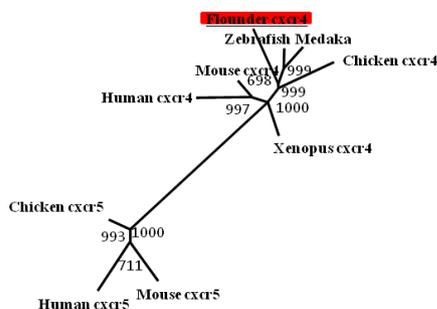


図 1、単離したヒラメ *cxcr4* の系統樹

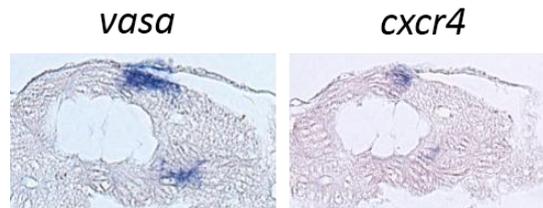
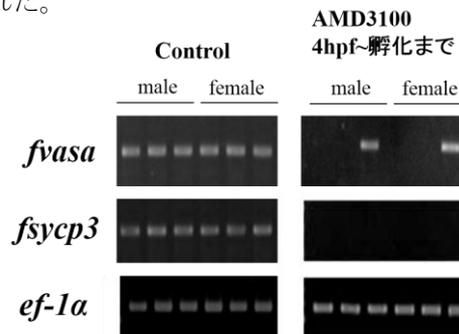


図 2、孵化後 1 日齢における *vasa* mRNA と *cxcr4* mRNA の *in situ* hybridization による発現解析

(3) 機能阻害による PGC 移動に関する遺伝子の解析

さらに、機能解析のためマイクロインジェクション法による *cxcr4* mRNA のノックダウンを試みたが、海産魚の受精卵へのマイクロインジェクションは技術的に困難であった。そこで別の方法として、*cxcr4* と特異的に結合しその働きを拮抗的に阻害するケモカイン受容体阻害剤 AMD3100 にヒラメ受精卵を浸漬することで PGC の移動阻害を試みた。浸漬は受精後 4 時間 (4hpf) から孵化まで浸漬した。その結果、AMD3100 を投与した個体では PGC マーカー遺伝子である *vasa* 及び、*sycp3* mRNA が消失した (図 1, 2)。この結果から、ヒラメにおいて PGC の移動に *cxcr4* が関与することが明らかとなった。始原生殖細胞の異動に関わる *cxcr4* が海産魚であるヒラメにおいても他種と同様に生殖細胞の維持に関わるという報告は無く、本研究により養殖魚の生殖機能の制御の可能性を示す結果が得られた。



*fvasa*, *fsycp3*: 生殖細胞マーカー

図 1、AMD3100 による生殖細胞へ影響

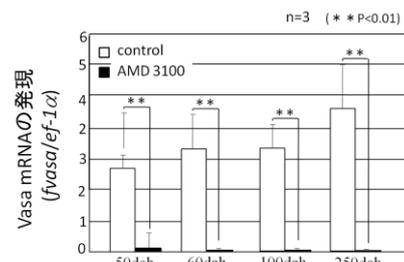


図 2、AMD3100 浸漬による *vasa* mRNA の経時的解析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Toshiya Yamaguchi, Takeshi Kitano  
High temperature induces cyp26b1 mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 査読有  
Vol. 419, p. 287~292  
2012年2月発行に掲載  
DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.02012

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 寿哉 (YAMAGUCHI TOSHIYA)  
独立行政法人増養殖研究所・養殖技術部  
・任期付研究員  
研究者番号 : 70604312

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :