

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660161

研究課題名(和文) 魚類の多精現象の再検討と育種応用

研究課題名(英文) Revision and application of polyspermy in fish

研究代表者

荒井 克俊 (ARAI, KATSUTOSHI)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00137902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ドジョウ野生型を雌、アルビノ系統を雄として、接水で賦活した卵の卵膜を除去し、動物極の胚盤中心付近に約1～1000精子を顕微注射したところ、精子数1000で卵割率は対照と同様の87%まで向上し、6%程度の胚が孵化した。卵膜除去卵への授精による強制的多精を行った場合も2%程度の胚が孵化した。アルビノ形質発現とマイクロサテライトDNA父系アレルのみの出現から、大部分の半数体、半数体を含むモザイク、四倍体は雄性発生胚であることが判明した。野生型で母系、父系の両アレルをもつ卵核と精子核の融合に起因する二倍体、三倍体、異数体胚も少数出現した。同様に、ゼブラフィッシュにおいても発生胚を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：About 1, 10, 100 or 1000 spermatozoa of albino male were microinjected into an activated and then dechorionated egg of wild-type female loach *Misgurnus anguillicaudatus*. The group injected with about 1000 spermatozoa gave 87% cleavage rate, almost equivalent to control and 6% hatched. When dechorionated eggs were inseminated with sperm to induce polyspermy, 2% hatched. Expression of albino trait and all-male inheritance of microsatellite DNA markers concluded that most resultant haploid, mosaic including haploid cells, and tetraploid embryos were androgenetically developed progeny. While diploid, triploid, aneuploid and mosaic embryos also occurred by the fusion of egg nucleus and single to multiple numbers of sperm nuclei. Similar development was observed in microinjected and polyspermy eggs of zebrafish.

研究分野：水族遺伝育種学

キーワード：倍数体 胚操作 ICSI 顕微注射 受精 モザイク 雄性発生 ドジョウ

1. 研究開始当初の背景

顕微授精 (ICSI: Intra-cytoplasmic Sperm Injection) とは、単一の精子を微細なピペットに取り、それを卵の細胞質中に顕微鏡下の微細操作で注射する方法である。ICSI は現在、ヒトの不妊治療技術として利用されるのみならず、精子の卵賦活因子、精子によるトランスジェニック、精子の細胞遺伝学等の生殖生物学的な課題解明に切り込む有効な手段となっている (Kimura et al. 1999; Perry et al. 1999; Kaneko et al. 2005)。しかしながら、哺乳類以外の脊椎動物、特に魚類においては ICSI の成功例は乏しい。それは、一般に哺乳類で開発発展した ICSI 技術のプロトコルをそのまま魚類に応用するのは極めて難しいことが大きな理由である。魚卵の卵膜は厚く、固く、強く、顕微注射自体が困難である。その上、哺乳類の卵はどこからでも精子を受け入れるのに対して、魚類では精子は卵の動物極側にある卵門 (micropyle) という構造を通してのみ卵内に進入できる。従って、既報の魚類における ICSI 実験はすべて卵門を通して顕微注射を行う方法によってのみ実施されてきた。この様な手法による魚類における ICSI 成功率は、ゼブラフィッシュで 1.6% (Poleo et al. 2001)、ティラピアで 8.5% (Poleo et al. 2005)、メダカで 13.4% (Otani et al. 2013) であり、マウスで通例知られている 50% (Yanagimachi 2005) に及ばない。

卵門を通しての精子の顕微注射は、魚類における ICSI 成功の条件であったが、このこと自体が技術の困難さを増していた。何故なら、魚類の卵は精子の微細さに比較すると、著しく巨大であり、両者を同時に顕微鏡の一視野内に観察することはできないから、顕微操作は極めて困難である。しかし、ICSI は魅力的な技術であり、モデル動物となる小型魚類から養殖対象となる大型魚類まで、基礎から応用にわたる研究を促進させうる。例えば、絶滅危惧種あるいは産業重要種の凍結保存精子が運動能力を失った場合や、未熟の精細胞しか入手できない場合であっても、ICSI により個体復活の可能性がある。

単一の精子を卵門から非常に薄い細胞質層に顕微注射する常法が困難であるので、多数の精子を賦活卵の動物極に顕微注射するというアイデアが代替案として考えられた。しかし、よく知られているように、硬骨魚類は単一の卵と精子の間で受精が生じる単精 (monospermy) であり、ただ一つの精子が卵門から卵内に進入することにより、その後の正常な受精現象と卵割、発生分化が保証される。それゆえ、複数精子の卵内への進入、すなわち多精 (polyspermy) は物理的・化学的なメカニズムにより拒否される (Ginsburg 1961)。物理的障壁は卵門の存在であり、この構造が複数精子の卵内への進入を防いでいる。従って、卵門とともに卵膜を除去してしまうと多精が起きる。ニシン *Clupea pallasii* で卵膜

を除き授精を行うと、複数の精子が胚盤内に入った (多精) にもかかわらず、85% が胞胚期に達するが、体節形成期までは 10% の胚が、心臓拍動までは 3% が達したという (Yanagimachi 1957)。もう一つの多精拒否機構は表層反応であり、これはカルシウム・シグナルにより導かれ、表層胞の崩壊とそれに続く囲卵腔形成を起こす。囲卵腔は複数精子進入のバリアとなり、二番目以降の精子は卵を授精することはできない (Ginsburg 1972)。従って、このような表層反応が遅延すると、多精拒否機構は当然働かなくなる。

多精は発生異常を引き起こすが、ポリエチレングリコール処理あるいは高 pH 高 Ca 処理により作出した融合精子などの複数の精子の授精による雄性発生二倍体や三倍体の作出例が知られている (Araki et al. 1995; Nagoya et al. 2010; Ueda et al. 1986, 1988)。これらの報告は複数精子の受精 (多精) により正常な雄性発生体や倍数体が誘起可能なことを示している。

研究代表者が知る限り、魚類において複数精子を顕微注射した後、すなわち、強制的な多精を起こしたのち、生じる子孫の発生能力や倍数性・遺伝を検討した例はない。

2. 研究の目的

硬骨魚類の受精は単精により成立し、複数精子が入った場合 (多精) は受精卵の発生は異常となることは常識であった。しかし、魚類で多精の過程と結果を詳細に検討した例は一部の古典的研究 (Yanagimachi 1957; Ginsburg 1961, 1972) を除き乏しい。本研究では、強制的に多精を誘起あるいは複数精子の ICSI を試みる。そして、低頻度でも、生じることが予想される胚 (受精卵) について、卵核と進入した精子核の挙動、分裂装置の役割などの発生学的な観察を行うとともに、フローサイトメトリー、DNA マーカー分析による遺伝学的な検討を行い、進入した複数の精子がどのような行動をとり、卵内で何が起きているかを明らかにすることを目的とする。

多精により正常な受精あるいは単為発生、染色体倍加が生じる可能性を検討し、生じた場合はその機構を考察して、新たな魚類の発生工学・育種技術開発に資する。また、多精という異常現象の影響を再検討することにより、魚類の受精に関する我々の知識を豊富にする。

3. 研究の方法

(1) ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* を用いた実験

材料: 北海道大学大学院水産科学研究院 (函館キャンパス) における先端環境制御実験棟において飼育中のドジョウ野生型二倍体 (北海道七飯町原産) およびアルビノ (劣性形質) 系統を用いた。

採卵・採精と受精: ドジョウでは、配偶子

採取の 12 時間前にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG) を雌の場合は 400IU、雄の場合は 200IU を腹腔内に注射し、人為排卵と排精を促した。採卵は雌の腹部を指で圧迫して、塩化ビニール樹脂フィルムを底に貼った直径 90 ミリのペトリ皿に 100 - 300 卵を採取した。採精は排泄口にヘマトクリット毛細管をあて、採精した。得た精液は Kurokura 液 (Kurokura et al. 1986) に懸濁した。採卵・採精においては、0.1% フェノキシエタノール溶液により麻酔を行った。授精は乾導法により行った。すなわち、卵群に精子 50 μ L を媒精し、40 倍の環境水を加え、静置した。

顕微注射液と胚培養液：マイクロインジェクションには、顕微注射液 (200mMKCl) を、胚の培養には胚培養液 (1.6% 卵白、100IU ストレプトマイシン、100IU ペニシリンを含有するリンゲル液 [7.5g/L NaCl, 0.2g/L KCl, 0.2g/CaCl₂]) を用いた。これらの希釈系列 (0 - 100%) における精子の運動を Yasui et al. (2008, 2009) に従って評価した。

顕微注射装置：精液を 200 mM KCl と 0.5 % rhodamine を含む液で希釈した。希釈により、精子濃度を 10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ 精子 mL⁻¹ に調整して、内径 10 μ m のマイクロピペットにとった。マイクロピペットを顕微注射装置 (Eppendorf Cellt tram Vario) に取り付け、マイクロマニピュレーター (Narishige M-150, Japan) により、実体顕微鏡 (Leica M165 FC, Germany) で操作した。

卵膜除去卵の調整：100 から 120 卵を脱塩素した水道水で接水し、2 分後に囲卵腔が形成された後に卵膜除去液 (0.12 % トリプシン、0.4 % 尿素を含むリンゲル液) に入れた。卵膜除去 (約 5 分間) 後に卵を底面に寒天ゲルを敷いたペトリ皿中の胚培養液 (前述) に置いた。

顕微注射実験：卵膜除去卵の動物極中央部に精子を注射した。卵あたり約 10 nL の精子懸濁液を注射した。注射あたりの精子量はおおよそ 1、10、100、1000 細胞 (精子) と推定された。対照群としては、普通に授精した受精卵 (卵膜つき)、接水賦活した未授精卵、授精後卵膜除去した卵、未授精顕微注射卵 (顕微注射液のみを注射) を置いた。10⁸ 精子 mL⁻¹ の精液を卵膜除去卵に顕微注射することなく、ただ動物極側にかけただけの多精授精群も作成した。

発生成績：顕微注射した卵の発生成能を明らかにするため、対照 (普通に受精) が 2 細胞期、胞胚期、12 体節期、孵化期に達した時の生残卵 (胚) を計数した。正常及び異常胚の数も計数した。一部の卵については、2% パラホルムアルデヒド・2% グルタルアルデヒド燐酸緩衝液で固定し、発生の観察に供した。孵化胚体表の色素細胞の有無を観察して、劣性形質 (オレンジ色) 発現を判断した。

倍数性判定と遺伝解析：細胞核 DNA 量をフローサイトメトリー法で測定することにより倍数性を判定した。父系・母系ゲノムの伝

達を調べるため、マイクロサテライト DNA マーカー 3 座 (*Mac24*; *Mac345*; *Mac449*) について PCR 増幅を行い、自動シーケンサ ABI 3131xdl (ABI) により分析し、マーカー型を GeneMapper program ver.3.7 (ABI) により解析した。

(2) ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた実験

材料：ゼブラフィッシュ

Danio rerio 野生型系統およびゴールデン (劣性形質) 系統を用いた。

採卵・採精：実験前日夕方に雌を水槽中の金属製のかごに入れ、その外に雄を入れた。実験当日の朝に雄をかごに移動させ、追尾行動が起こり、雌が排卵したことを確認してから両者を隔離した。排卵雌からは腹部を圧迫することにより、採卵した。雄からの採精はドジョウの場合と同様に行った。卵数が限られたため、顕微注射と多精の実験は別々に行った。

希釈精液の調整：卵膜除去卵への多精実験では、Kurokura 液で希釈した精液について、精子検査用マクラーカウンティングチャンバーを用いて精子濃度を計算し、精子濃度を 10⁷/ml にした。顕微授精実験では 0.5% ローダミンと 200mMKCl により 10⁷/ml とした。

卵膜除去卵調整と顕微授精：200 - 300 卵を採卵した後、50ml の水に接水させ、2 分後に囲卵腔形成を確認後 0.1% トリプシンと 0.4% 尿素を含む Hanks 液により、卵膜除去を行った。

発生成績：ドジョウの場合と同様に処理卵を観察した。

4. 研究成果

(1) ドジョウ

精子の運動性：80 - 100% 濃度の顕微注射液と胚培養液の中で動く精子は無かった。胚培養液では 70%、顕微注射液では 50% の濃度で精子の運動が開始され、それら以下の濃度で活発な運動が生じた。精子の 84% が直進運動を示した。

発生成績と形態、色彩形質：普通に受精した群、受精後卵膜除去した群は、79-88% の受精率を示し、69-77% の孵化率を示した。顕微注射群の受精率 (2 細胞期胚出現率) は 1 精子を注射した場合約 7%、10 精子を注射した場合約 8%、100 精子を注射した場合約 25%、1000 精子を注射した場合約 87% と上記対照群と同様であった。しかし、それらの孵化胚出現率は著しく低く、最も高い孵化率を示した約 1000 精子を注射した群でも約 6% であった。この群で孵化した 28 個体のうち、5 個体は正常野生型、3 個体は異常野生型、20 個体は異常形態のアルビノであった。多精授精群では約 2% が孵化し、この場合も異常形態のアルビノが出現した。

接水賦活のみの未受精卵、未授精顕微注射卵では卵割は起きなかった。後者では卵割様の現象が見られたが、それ以上の発生は生じ

なかった。顕微注射をした群では、多くの卵が異常な卵割を示し、割球の大きさが不均等な場合、無核の部分を持つ場合が見られた。

倍数性：顕微注射および強制多精の群より生じた胚についてフローサイトメトリー法で倍数性を調べたところ、半数体が最も多く出現した。このほか、半数体-異数体、半数体-二倍体、半数体-三倍体などの半数体細胞を含むモザイク、二倍体、三倍体、四倍体、五倍体が見られた。観察した中で最も高い倍数体は五倍体であった。

マイクロサテライト DNA マーカー分析：顕微注射および強制多精より生じた胚のほとんどは異常であったが、中には正常な外見を有する野生型の色彩の三倍体、アルビノの四倍体が見られた。半数体のみならずモザイクの異常胚の多くに劣性のアルビノ形質が認められた。

これらのアルビノ形質を示す個体は父系ゲノムのみで発生した雄性発生胚と考えられた。そこで、雄性発生を遺伝学的に確認するために、マイクロサテライト DNA マーカー (*Mac24; Mac345; Mac449*) の分析を行った。その結果、正常対照胚 (二倍体) はすべて母系、父系アレルを持つのにに対し、顕微注射より生じたアルビノ形質を示した半数体、半数体細胞を含むモザイク、正常形態の四倍体は父系アレルのみを示したことから、雄性発生胚と判定された。正常あるいは異常にかかわらず、野生型色彩形質を示す二倍体、三倍体胚および体表にわずかな黒色色素を示す異数体、モザイク胚は母系、父系両アレルを示した。従って、これらは卵核と精子核の融合により生じた胚である。半数体 (色彩不明) でありながら、母系と父系アレルを示す胚も見られたが、これらは雌性発生半数体細胞と雄性発生半数体細胞のモザイク胚と考えられた。

(2) ゼブラフィッシュ

顕微注射胚、強制多精胚いずれにおいても、ドジョウの場合と同様に、胚盤の一部のみで卵割が進行する異常が多く見られた。

約 100 精子の顕微注射を行った卵は対照の 27-30% に対して、15-30% の卵割率が見られた。そして、9-31% が胞胚に達し、1-6% がエピソードを開始したが、体節形成、孵化に至る胚は全く得られなかった。

強制多精を行った場合も、16% が卵割を開始し (対照 32%)、15% が胞胚期に、2% がエピソードを開始したが、体節形成、孵化に至った胚は全く得られなかった。

全体に卵質が不良で、倍数性や DNA マーカーの解析には到らなかったが、ゼブラフィッシュでも多数精子の顕微注射と強制受精により、発生が開始されることが判明した。

<引用文献> 引用順

Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry ACF, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation

suggests the involvement of sperm perinuclear material. 1999; *Biol. Reprod.* 58:1407-1415.

Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999; 284:1180-1183.

Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2005; 64:1704-1715.

Poleo GA, Denniston RS, Reggio BC, Godke RA, Tiersch TR. Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 2001; 65:961-966.

Poleo GA, Godke RA, Tiersch TR. Intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved, fixed, and freeze-dried sperm in eggs of Nile tilapia. *Mar. Biotechnol.* 2005; 7:104-111.

Otani S, Iwai T, Nakahata S, Sakai C, Yamashita M. Artificial fertilization by intracytoplasmic sperm injection in a teleost fish, the medaka (*Oryzias latipes*). *Biol. Reprod.* 2009; 80:175-183.

Yanagimachi R. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: Its biology and applications in humans and animals. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 10: 247-288.

Ginsburg AS. The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1961; 9:173-190.

Yanagimachi R. Some properties of sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. *Annot. Zool. Japan* 1957; 30: 114-119.

Ginsburg AS. Fertilization in fishes and problem of polyspermy. *US Dep. Comm. Nat. Tech. Inf. Ser.* Springfield. 1972; 366p.

Araki K, Shinma H, Nagoya H, Nakayama I, Onozato H. Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1995; 52, 892-896.

Nagoya H, Kawamura K, Ohta H. Production of androgenetic amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* with dispermy fertilization. *Fish. Sci.* 2010; 76:305-313.

Ueda T, Kobayashi M, Sato R. Triploid rainbow trouts induced by polyethylene glycol. *Proc. Japan Acad. Ser.B* 1986; 62:

161-164.

Ueda T, Sato R, Kobayashi J. Triploid rainbow trout induced by high-pH · high calcium. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; 54: 2045.

Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 1984; 37:267-273.

Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. *Cryoletters* 2008; 29:383-390.

Yasui GS, Arias-Rodriguez L, Fujimoto T, Arai K. A sperm cryopreservation protocol the loach *Misgurnus anguillicaudatus* and its applicability for other related species. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 116:335-345.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yasui GS・斎藤大樹・趙 岩・藤本貴史・山羽悦郎・荒井克俊．多数精子の顕微授精による雄性発生胚と倍数体胚の出現．平成27年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学．東京都港区．平成27年3月30日

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒井 克俊 (ARAI Katsutoshi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：00137902

(2)研究分担者

藤本 貴史 (FUJIMOTO Takafumi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：10400003