

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660166

研究課題名(和文)ニジマス代理親魚はサケの卵や精子を何度も生産できるのか？

研究課題名(英文)Can rainbow trout repeatedly produce gametes derived from iteroparous salmon?

研究代表者

吉崎 悟朗 (YOSHIZAKI, Goro)

東京海洋大学・その他部局等・教授

研究者番号：70281003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメマス生殖細胞を移植したニジマスは雌雄ともに少なくとも2年にわたり配偶子を生産しつづけることが明らかとなった。これらのニジマス親魚の雌雄が生産したヒメマス卵と精子を人工授精した結果、次世代に通常のヒメマスを生産することが可能であった。また、これらの孵化時期はヒメマスのものと同一であり、ニジマスの孵化時期より有意に遅いものであった。さらにDNA解析の結果、これらの次世代個体は完全なヒメマスであることが証明された。以上の実験により、ニジマス宿主は一回繁殖型のヒメマスの正常な配偶子を複数回にわたり生産可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Most Pacific salmon only spawn once. However, rainbow trout allows them to spawn multiple times. Since the ability to use iteroparous surrogate trout to produce semelparous salmon gametes would facilitate the production of semelparous salmon, we produced surrogate rainbow trout with germ cells derived from semelparous sockeye salmon. Seven males and three females out of twenty three recipients had matured by the second spawning season. Two of the seven males that had matured in the previous spawning season, matured again in the third spawning season. Further, one out of the three females matured again in the third spawning season, too. Compared to same-aged control rainbow trout, these recipient rainbow trout produced similar numbers of gametes. PCR-RFLP analyses showed that the banding patterns obtained for the offspring were identical to those of sockeye salmon. Taken together, we concluded that rainbow trout recipients could repeatedly produce sockeye salmon gametes.

研究分野：水族発生工学

キーワード：ニジマス ヒメマス 多回繁殖 一回繁殖 品種改良 生殖細胞移植

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はいまままでに、卵や精子のおもとの細胞である生殖細胞を別種の宿主へと移植することで、この代理親魚に目的種の卵や精子を生産させる技術の構築に成功している (Nature, 2004)。続いて、三倍体不妊魚を宿主に用いることで、ヤマメ両親からニジマス次世代のみを大量生産することにも成功している (Science, 2007)。また、凍結生殖細胞を宿主に移植することで、凍結細胞由来の卵や精子を作り出す技術も構築済みであり、本技術を用いた絶滅危惧種の保存にも既に着手している。さらに、本技術を用いてクサフグ両親からトラフグ種苗を大量生産することや、アジにプリを生ませることも可能になっている。このように、研究代表者のグループは魚類生殖細胞移植の基盤技術を構築してきた。しかし、従来は移植細胞を供給する魚種と、細胞を移植される魚種は似通った繁殖特性を備えたものを選んで利用してきた。魚類の繁殖回数は種毎に大幅に異なっており、これを支配している機構も明らかになっていない。しかし、本技術を駆使することで、サケのように一回の産卵後に斃死する魚種の配偶子を、ニジマスの様に繰り返し産卵できる魚種に生産させることができれば、一回産卵型の魚種の種苗生産を効率化できるのみならず、育種素材としての汎用性も高まると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

タイヘイヨウサケ属の魚種の多くは一回繁殖型であり、生涯のうち一度、配偶子を生産した後に斃死することが知られている。したがって、これらの魚種の種苗生産では同一の親魚を反復利用することが不可能であり、これが当該種の育種、すなわち品種改良の大きな障害になっている。また、これらの種の種苗生産を毎年行うためには、全年級群を絶やさずに養成し、親魚に仕立てる必要があり、もし何らかの事故や感染症により特定の年級群が全滅した場合には、その年の種苗生産は不可能となってしまう。そこで、本研究ではこれら一回繁殖型のサケ科魚類の配偶子をニジマスを代理親魚として利用することで繰り返し生産する技法の開発を目指した。

3. 研究の方法

一回繁殖型の魚種としてベニザケ、マスノスケ、サクラマスを用い、これらの生殖細胞 (本研究では精原細胞を用いる) を精巣から調整し、蛍光色素で染色した後に、多数回産卵型のニジマス宿主へと移植した。なお、異種間の細胞移植における免疫拒絶を回避するため、移植は免疫系が未発達である孵化直後の仔魚腹腔内へと行った。腹腔内へと移植した生殖細胞はアメーバ運動により自ら宿主生殖腺へと移動し、そこに取り込まれることは既に確認済みである。その後、移植細胞

が宿主生殖腺に生着しているか、増殖しているかを蛍光観察により確認し、ニジマス宿主と種々のドナー種との適合性を明らかにした。さらに、宿主ニジマスを継続飼育することで、これらの個体を成熟させ、各年度の産卵期には、ドナー由来の精子を繰り返し生産するか否かを確認した。なお、得られた卵や精子は交配実験に供し、これらの発生能も併せて解析した。

4. 研究成果

平成 25 年度は、一回産卵型の魚種としてヒメマス、マスノスケ、ヤマメを用い、これらの魚種の精巣をトリプシン処理により解離することで、移植用の精巣細胞懸濁液を調整した。次に得られた精巣細胞懸濁液を細胞膜の蛍光標識剤である PKH26 で赤色蛍光標識を施し、これらのドナー細胞を多数回産卵型のニジマスへと移植した。なお、この際に宿主ニジマスは移植細胞由来の卵、精子のみを生産するよう不妊の三倍体個体を用いた。その後、宿主ニジマスを経時的に蛍光顕微鏡を用いて観察することで、PKH26 陽性の移植細胞が宿主の生殖腺に生着しているか、宿主生殖腺内で増殖を開始しているか、さらには雌宿主の卵巣内で精原細胞は雌の生殖細胞へと分化しているかを調査した結果、すべてのドナー由来の生殖細胞がニジマス生殖腺へと取り込まれ、増殖を開始していることが明らかになった。また一部のメス宿主においては移植細胞が卵母細胞に分化していることが確認された。さらに、これらの宿主ニジマスを継続飼育した結果、産卵期には、ニジマス宿主がヤマメ、ヒメマス、マスノスケの精子を生産したことを確認した。なお、得られた精子は正常な受性能を保持しており、それぞれの魚種由来の卵と受精し、正常な次世代の作出にも成功した。

平成 26 年度は、一回繁殖型であるヒメマスをドナーとして用い、多回繁殖型であるニジマスを宿主として用いた。ニジマス宿主は、三倍体化処理により不妊化した宿主、または、生殖細胞の生存に必須な遺伝子である dead end 遺伝子の翻訳を、アンチセンス法により阻害することにより生殖細胞を除去した宿主を用いた。移植魚が機能的な配偶子を生産できるかどうか調べるため、成熟年齢に達するまで飼育し、得られた配偶子をヒメマス配偶子と交配した。ヒメマス精原細胞を移植した三倍体宿主では、移植魚 23 尾中 1 尾がヒメマス精子を排精したが、受精能がなく稚魚を得ることができなかった。また、ヒメマス卵を 2 年にわたって排卵した個体があったものの、その割合は 23 尾中 1 尾と非常に低かった。そこで、生殖細胞除去ニジマスを宿主として用いたところ、移植魚 23 尾中 5 尾が機能的なヒメマス精子のみを排精した。また、23 尾中 2 尾が機能的なヒメマス卵も排卵した。以上の結果より、ニジマスを宿主とした場合、

三倍体より生殖細胞除去個体を用いた方が効率的にヒメマス配偶子を生産可能であることが明らかになった。

平成 27 年度は、これら一回繁殖型のサケ科魚類の配偶子をニジマスを代理親魚として利用することで繰り返し生産する技法の開発を目指した。ニジマス宿主には生殖細胞の生残に必須の遺伝子である dnd の発現阻害をノックダウン法により実現した固体を用い、これらの宿主に一回繁殖型のヒメマスの生殖細胞移植を施した。これらの魚を 2 年間飼育した結果、移植魚 23 尾中 7 尾がヒメマスの精子を生産し、3 尾がヒメマスの卵を生産した（上述のデータ取得後の個体数も加えた総計）。これらの宿主個体をさらに一年間継続飼育したところ、雄 7 尾のうち 2 尾が再び成熟して精子を、雌 3 尾のうち 1 尾が卵を生産した。また雌雄それぞれ 1 尾と 2 尾が満三歳であらたに成熟した。そこで、これらのニジマス代理親魚の雌雄が生産したヒメマス卵と精子を人工授精した結果、通常のヒメマスを生産することが可能であった。また、これらの孵化時期はヒメマスのものと同じであり、ニジマスの孵化時期より有意に遅いものであった。さらに DNA 解析の結果、これらの次世代個体は完全なヒメマスであることが証明された。以上の実験により、一回繁殖型のヒメマスの配偶子をニジマスは複数回にわたり生産可能であることが明らかとなった。

以上のように本申請による一連の実験により、多回繁殖型のニジマスは一回繁殖型であるタイヘイヨウサケ属魚類の配偶子を複数にわたって生産することが可能であることが明らかとなった。これらの技法は、当該種の種苗生産の効率化、簡略化に繋がるのみならず、戻し交配等を駆使した品種改良にも応用できると期待される。

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 4 件)

G Yoshizaki, K Takashiba, S Shimamori, K Fujinuma, S Shikina, T Okutsu, S Kume, M Hayashi. Production of germ cell-deficient salmonids by the dead end gene knockdown and their use as recipients for germ cell transplantation. *Molecular Reproduction and Development*. 2016, 83, 298-311, doi: 10.1002/mrd.22625.

T Okutsu, S Shikina, T Sakamoto, M Mochizuki, G Yoshizaki. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow

trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 2015, 446, 298-302, doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.020.

S Shikina, K Nagasawa, M Hayashi, M Furuya, Y Iwasaki, G Yoshizaki. Short-term in vitro culturing improves transplantability of type A spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction & Development*. 2013, 80(9), 763-773, doi: 10.1002/mrd.22208.

吉崎悟朗, Lee Seungki. 魚類の生殖細胞操作:トレハロースはクニマスの将来を救えるか?. 第 17 回トレハロースシンポジウム記録集. 2013, 1-6.

〔学会発表〕(計 11 件)
G Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: can mackerel make tuna?. デンマーク養殖アカデミックワークショップ(招待講演)(国際学会), デンマーク大使館(東京), 2015 年 9 月.

G Yoshizaki. PRODUCTION OF VIABLE TROUT OFFSPRING DERIVED FROM FROZEN WHOLE FISH. The 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes(招待講演)(国際学会), イタリア アンナコ, 2015 年 9 月.

吉崎悟朗. サバからマグロは産まれるか. 読売テクノ・フォーラム 2014 年度 秋のシンポジウム ゴールド・メダル賞創設 20 周年を記念する講演会 科学の力で、世界を元気に(招待講演), 東京, 2014 年 11 月.

G Yoshizaki. Transplantation of salmon germ cells into rainbow trout recipients: can iteroparous trout repeatedly produce gametes derived from semelparous salmon?. 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish(招待講演), ポルトガル, 2014 年 5 月.

神谷賢治, 定家咲子, Lee Seungki, 名倉盾, 吉崎悟朗. ニジマス代理親を用いたマスノスケ配偶子生産系の開発. 平成 26 年度公益社団法人日本水産学会春季大会, 北海道 函館市(北海道大学), 2014 年 3 月.

吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞操作: サバからマグロは産まれるか?. 広島大学 大学院生物圏科学研究科シンポジウム 『生物学の基礎的研究から水・畜産業へのトランスレーション』(招待講演), 広島県 東広島市(広島大学 大学院生物生産学部), 2014 年 1 月.

吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞移植: 現状とその

可能性. マリンバイオテクノロジー学会懇談会(招待講演), 東京都新宿区(早稲田大学先端生命医科学センター), 2013年11月.

吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞操作: トレハロースはクニマスの将来を救えるか?. 第17回トレハロースシンポジウム(招待講演), 東京都江東区(東京ビックサイト), 2013年11月.

吉崎悟朗. サバにマグロを生ませる. 高知大学アカデミアセミナー「海洋」その恵み・神秘・脅威(招待講演), 高知県 高知市(高知RKCホール), 2013年7月.

佐久間大夏, 林誠, 吉崎悟朗. ニジマスの背中で精子を作る. 第15回マリンバイオテクノロジー学会大会, 沖縄県 中頭郡(沖縄県市町村自治会館), 2013年6月.

吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞移植 サバからマグロは生まれるか?. 第3回農学部先端研究交流セミナー(招待講演), 宮崎県 宮崎市(宮崎大学 農学部講義等) 2013年4月.

〔図書〕(計 1 件)

吉崎悟朗. 「サバからマグロが生まれる!？」岩波書店, 2014, 126.

〔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

吉崎 悟朗 (Yoshizaki Goro)
東京海洋大学 学術研究院 教授
研究者番号: 70281003