

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26252033

研究課題名(和文)代理親魚技法を用いた遺伝的不妊魚の大量生産法の開発

研究課題名(英文)Mass production of genetically sterile mutant fish by germ-cell transplantation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的不妊魚の大量生産を目指し、FSH受容体の変異メダカの生殖細胞を、野生型メダカ三倍体の孵化仔魚へと移植した雌宿主とFSH受容体ホモ欠損の突然変異個体の雄を交配した。得られた次世代のゲノムを解析した結果、これら次世代個体はFSH受容体ホモ欠損であった。以上、体細胞で発現する再生産に不可欠な遺伝子をホモ欠損した突然変異個体の生殖細胞を代理親魚へと移植することで、不妊個体を大量生産可能となった。

研究成果の概要(英文)：The escape of captive fish is a serious global problem, as some of the farmed fish are highly domesticated. While the adoption of sterile fish seeds is desirable for avoiding genetic pollution, the mass production of sterile seeds is difficult. We employed medaka that were mutants for FSHR, produced by TILLING, as the female homozygous mutants are completely sterile. Since the homozygous males are fertile, production of sterile seeds can be achieved by mating heterozygous females with homozygous XX sex-reversed males. However, only half of the resulting F1 individuals are homozygous. To overcome this problem, we applied germ cell transplantation. We transplanted XX spermatogonia isolated from sex-reversed mutants homozygous for FSHR into sterile triploid female recipients. The resulting surrogate females produced only FSHR-mutant eggs. Thus, we confirmed that germ cell transplantation is a powerful technique for mass production of genetically sterile fish.

研究分野：水族発生工学

キーワード：不妊魚 メダカ トラフグ ゲノム編集 FSH受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、テラピアやサケ類(例:チリのギンザケ等)といった外来種に加え、多くの育種系統が世界中で養殖されている。養殖生産が世界的に増加している現在、これら養殖品種や外来種の養殖施設からの逃亡は無視できる状況ではなく、既に一部の地域では逃亡魚による遺伝子かく乱、在来種との競合といった問題が表面化している。この問題の解決策としては、養殖魚の不妊化が効果的かつ現実的な方法である。三倍体や薬剤処理、放射線処理等の不妊化技術も知られてはいるが、いずれの方法も確実性は乏しく、大量の養殖魚への応用を考えると、その効果には疑問が残る。そこで、本研究では突然変異育種法を用いて100%の不妊化が可能な遺伝的不妊魚の作出を目指した。しかし、遺伝的不妊魚は次世代を作出できないため、その大量生産が困難である。そこで、代理親魚技術を利用することで、これらの遺伝的不妊魚を簡便に大量生産する技術を開発した。

2. 研究の目的

GTHrは生殖細胞を哺育する体細胞群で発現しているため、このホモ変異個体(不妊)から生殖細胞を単離し、これを正常な遺伝子を保持する代理親魚の生殖腺に移植すれば、代理親魚の正常な(GTHrを持つ)哺育細胞が、移植されたホモ不妊個体由来の生殖細胞を養い、不妊個体由来の卵や精子を生産することが期待される。この際に宿主に三倍体を利用すれば、この代理親魚は自ら配偶子は生産せず、GTHr遺伝子が破壊された卵や精子のみを大量に生産することが予想される。さらにこれらの卵と精子を受精させれば、不妊魚を大量生産することが可能である。そこで、本研究ではこの戦略を具体化するため、まず世代期間が短いメダカで本戦略の妥当性、実現性を確認すること、さらにトラフグやサケ科魚類、サバ科魚類へと応用するための基盤技術構築を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は生殖腺刺激ホルモン受容体(GTHr)遺伝子の突然変異個体の作出と変異遺伝子のホモ化による不妊魚の作出、さらにホモ不妊魚から得られた生殖細胞を、代理親魚へと移植し、GTHr遺伝子の変異をもつ卵や精子のみを大量に生産すること、ひいてはこれらを受精することで、不妊魚のみを大量生産する技術の構築から構成される。突然変異体のモデルにはFSHrに変異が導入されたメダカを用いた。これらの変異体仔魚に性転換処理を施すことで、XX雄の作出を行った。また、これらの雄個体の精巢から生殖細胞を調整し、これらを三倍体化処理を施した野生型のメダカ仔魚へと移植した。得られた宿主個体を成熟させ、雌親魚をFSHrのホモ変異個体の雄(雄は妊性を有する)と交配した。得られた次世代個体についてはFSHrの変異が

ホモで挿入されているかを検証した。さらに、各種水産場有用種においても、本法に利用するためのドナー個体を効率的に作出するため人工ヌクレアーゼ処理により各種生殖関連遺伝子のノックアウトを試みた。

4. 研究成果

遺伝的不妊魚の大量生産を目指し、研究分担者の北野が作成したFSH受容体の突然変異メダカの生殖細胞を、突然変異を保持していないメダカ三倍体の孵化仔魚腹腔内へと移植した。なお、これらの移植細胞には、赤色蛍光遺伝子で標識したものをを用いた。移植1月後に宿主を開腹し、移植細胞の挙動を観察した結果、観察個体の半数で赤色蛍光を発する移植生殖細胞が宿主の生殖腺へと取り込まれていることを確認した。また、これらの宿主個体を継続飼育した結果、一部の個体が成熟し、配偶子を生産することを確認した。

そこで、これらのうち雌宿主個体とFSH受容体ホモ欠損の突然変異個体の雄を交配することによって得られた次世代からゲノムDNAを抽出し、まずCEL1による変異挿入スクリーニングを行った。次に、これらのスクリーニングで陽性だった個体に関しては、ダイレクトシーケンシングを行った結果、得られた次世代個体は間違いなくFSH受容体ホモ欠損であることが明らかとなった。続いて、これら得られた次世代のメス個体の妊性を調査した結果、すべての個体が卵黄蓄積の開始期で卵形成が停止しており、妊性を持たないことが明らかとなった。

以上の結果から、生殖細胞以外の細胞で発現する再生産に不可欠な遺伝子をホモ欠損した突然変異個体の生殖細胞を代理親魚へと移植することで、これらの変異を保持する配偶子を大量生産できること、さらにはこれらの配偶子を用いて次世代生産することで不妊個体の大量生産が可能であることが明らかとなった。

一方、ドナーの新たな候補として、ゲノム編集(TALEN)を利用してLHRノックアウトメダカ系統の作製に成功した。この系統の表現型を解析したところ、XXメスは不妊であったが、XYオスは妊性があることが確認された。また、よりドナーとして適した突然変異体を作成するために、CRISPR/CAS9システムを利用して、細胞外ドメインに変異を導入したFSHR/LHRダブルノックアウトメダカ系統を作製し、このメダカが通常発生することを確認した。今後は、雌雄両方の妊性に関して、以前作製したノックアウトメダカ系統と比較する予定である。

また、本技法の大型産業種への応用を見据え、CRISPR/CAS9システムでニジマス、ヒメマス、ヤマメのdnd遺伝子の変異導入が可能であるかを検討した。これらのRNAを各種受精卵へと導入し、親世代での変異導入効率を解析した。その結果、導入個体の約7割程度

異が生じていることが確認された。また、交配により F2 世代においては dnd 遺伝子をホモに持つ不妊個体を大量生産することが可能であった。

さらに、遺伝的不妊トラフグを作出するため、不妊候補遺伝子の絞り込みを行った。そのうちメダカでの不妊化が確認できている FSH 受容体、CYP17a1 について、遺伝子欠損体作出に必要な CRISPR/Cas9 の標的 RNA を設計、合成し、これを受精卵へと顕微注入することで、cyp17a1 遺伝子変異トラフグの作出を試みた。その結果、cyp17a1 遺伝子に変異が導入された不妊化（機能欠損）が期待できるトラフグの作出に成功した。

なお、遺伝的に不妊化された養殖魚を作出することを目指して、トラフグの遺伝的不妊化実験を行ったところ、ゲノム編集によって FSH 受容体の機能喪失が期待できる欠失変異（frame-shift）を効率よく導入できた。また、不妊化系統の始祖となる親魚候補を 80 尾確保した。今後、これらの個体の不妊化状態を解析するとともに、クサフグを用いた代理親魚技術を導入し、卵を産まないトラフグの大量生産を目指す。

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 11 件)

- (1) H Yoshikawa, Y Takeuchi, Y Ino, J Wang, G Iwata, N Kabeya, R Yazawa, G Yoshizaki. Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*). *Aquaculture*. 478, 35-47 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.011> (査読有)
- (2) 吉崎悟朗. 生殖細胞の凍結保存による絶滅危惧魚種の遺伝子資源の保存. 冷凍 2016 年 11 月号第 91 巻 1069 号, 15-20 (2016). (査読無)
- (3) 矢澤良輔, 竹内裕, 吉崎悟朗. 養殖産業における代理親魚技術の利用～飼育スペースや労力の軽減、育種の加速、生殖細胞バンクの構築など～. 月刊アクアネット No.9, 40-43 (2016). (査読無)
- (4) S Lee, N Katayama, G Yoshizaki. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 478(3), 1478-1483 (2016). doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.156. (査読有)
- (5) S Boonanuntasarn, P Bunlipatanon, K Ichida, K Yoohut, O Mengyu, S Detsathit, R Yazawa, G Yoshizaki. Characterization of a vasa homolog in the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) and its expression in gonad and germ cells during larval development. *Fish Physiology and Biochemistry*. 42(6), 1621-1636 (2016). doi: 10.1007/s10695-016-0245-z (査読有)
- (6) S Lee, G Yoshizaki. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology*. 72(2), 165-168 (2016). doi:10.1016/j.cryobiol.2016.01.004. (査読有)
- (7) S Lee, Y Iwasaki, G Yoshizaki. Long-term(5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology*. 73(2), 286-290 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.08.001>(査読有)
- (8) N Katayama, S Kume, S Hattori-Ihara, S Sadaie, M Hayashi, G Yoshizaki. Germ Cell-Specific Excision of loxP-flanked Transgenes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*. 94(4),79 (2016). doi: 10.1095/biolreprod.115.136929. (査読有)
- (9) 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*. 83(4), 298-311(2016). doi:10. 1002/mrd.22625. (査読有)
- (10) J.A. Fernandez, E.J. Bubner, Y Takeuchi, G Yoshizaki, T Wanga, S.F. Cummins, A Elizur. Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. *Gen Comp Endocrinol*. 213, 16-23 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.007> (査読有)
- (11) Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T,

Kitano T. Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka. *Endocrinology*. 155(8), 3136-3145 (2014). doi: 10.1210/en.2013-2060. (査読有)

〔学会発表〕(計 22 件)

- (1)藤原亮, 片山直人, 藤井渉, 内藤邦彦, 吉崎悟朗. 生殖細胞欠損ヤマメの作出とその代理親魚への応用. 平成 29 年度日本水産学会春季大会. 東京都 港区(東京海洋大学品川キャンパス) 2017 年 3 月 26 -30 日.
- (2)吉崎悟朗. 生殖細胞を借り腹でつくる ~ マグロを絶滅から救えるのか? ~. 日本動物学会第 69 回関東支部大会 公開シンポジウム『生殖細胞に秘められたパワーを解く』. (招待講演) 東京都 文京区(筑波大学 東京キャンパス文京校舎) 2017 年 3 月 20 日.
- (3)竹中亨彰, 長船奈津美, 風藤行紀, 吉浦康寿, 平井俊朗, 北野健. メダカにおける生殖腺刺激ホルモン受容体の機能解析. 第 41 回日本比較内分泌学会大会. 神奈川県 相模原市(北里大学相模原キャンパス) 2016 年 12 月 9-11 日.
- (4)M Digmayer, G Yoshizaki, L Qian, N Katayama, RH Nóbrega. Targeted rnutagenesis using easy-to-use CRISPR/Cas system in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR 2016). SP Brazil (Campos do Jordão). 2016 年 11 月 6-9 日.
- (5)G Yoshizaki. Germ-cell transplantation research: collaboration between a university and a fishery company. The 15th Asia Maritime & Fisheries Universities Forum. (招待講演) 台湾 基隆市 (National Taiwan Ocean University) 2016 年 10 月 13-15 日.
- (6)G Yoshizaki. Present status of germ cell transplantation for conservation in fish. 1st International Conference on Aquaculture Biotechnology 2016. (招待講演) Bogor, Indonesia (IPB International Convention Center) 2016 年 10 月 12 日.
- (7)A.C. Nogueira Vasconcelos, A Octavera, G Yoshizaki. Cloning of Dead end gene in *Colossoma macropomum* and its expression in the germ cell lineage. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会. 奈良県 奈良市(近畿大学農学部奈良キャンパス) 2016 年 9 月 8-11 日.
- (8)L Qian, M Digmayer, T Kitano, G Yoshizaki. Targeted Mutagenesis Using the "INSTANT" CRISPR/Cas9 System in Rainbow Trout. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会. 奈良県 奈良市(近畿大学農学部奈良キャンパス) 2016 年 9 月 8-11 日.
- (9)G Yoshizaki. Germ cell manipulation in fish. The 22th Japanese medaka and zebrafish meeting. (招待講演) Okazaki Japan (National Institute for Basic Biology) 2016 年 8 月 20-21 日.
- (10)G Yoshizaki. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. The 9th NIBB International Practical Course. (招待講演) Okazaki Japan (National Institute for Basic Biology) 2016 年 8 月 13-30 日.
- (11)T Kitano, T Takenaka, N Murozumi, S Hara. Gonadotropins and their roles on sexual development in medaka. 8th Congress of the Asia and Oceania Society for comparative Endocrinology. (招待講演) 韓国 ソウル (Korea University School of Medicine) 2016 年 6 月 20-24 日.
- (12)S Hara, T Murakami, N Osafune, T Kitano. Role of estrogens on gonadal sex differentiation in medaka. 8th Congress of the Asia and Oceania Society for comparative Endocrinology. (招待講演) 韓国 ソウル (Korea University School of Medicine) 2016 年 6 月 20-24 日.
- (13)G Yoshizaki. Germ cell manipulation in fish. 19th European Testis Workshop. (招待講演) France, Saint-Malo (Palais du Grand Large) 2016 年 6 月 11-15 日.
- (14) G Yoshizaki. Germ Cell Manipulation in Fish: Can Mackerel Produce Tuna Gametes? The 7th World Fisheries Congress, Busan 2016 Secretariat. (招待講演) 韓国 釜山 (The Busan Exhibition & Convention Center (BEXCO)) 2016 年 5 月 23-27 日.
- (15)石田茉莉子, 室積典和, 北野健, 吉浦康寿, 吉崎悟朗. 代理親魚技法を用いた

不妊魚大量生産技術の開発. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 東京都 港区(東京海洋大学品川キャンパス) 2016 年 3 月 26-30 日.

(16) L Qian, W Fujii, K Naito, G Yoshizaki. Use of dnd-knock out zebrafish as recipients for germ cell transplantation. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 東京都 港区(東京海洋大学品川キャンパス) 2016 年 3 月 26-30 日.

(17)毛塚富美, 吉崎悟朗. メダカを低温飼育すると宿主生殖腺へ生着可能な A 型精原細胞が精巣内で濃縮される. 平成 28 年度日本水産学会春季大会. 東京都 港区(東京海洋大学品川キャンパス) 2016 年 3 月 26-30 日.

(18)吉浦康寿, 岸本謙太, 黒柳美和, 片山貴士, 今井正, 鷺尾洋平, 村上悠, 安齋賢, 北野健, 木下政人. トラフグにおけるゲノム編集技術を用いた遺伝的不妊魚の作出. 2015 年度日本水産増殖学会(第 14 回)大会. 千葉県 館山市(東京海洋大学館山ステーション) 2015 年 11 月 13-14 日.

(19)片山直人, 定家咲子, 矢澤良輔, 藤井涉, 内藤邦彦, 吉崎悟朗. 生殖細胞欠損サケ科魚類の大量生産を目指した dead end 遺伝子のゲノム編集. 第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会. 東京都港区(東京海洋大学品川キャンパス) 2015 年 5 月 30-31 日.

(20)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) Olhão, Portugal, Portuguese Republic (Olhão Municipal Auditorium) 2014 年 5 月 25-30 日.

(21)G Yoshizaki. Mass production of sterile fish: how can we produce gametes from sterile fish? The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. (招待講演) Taipei, Taiwan(Academia Sinica) 2014 年 5 月 4-8 日.

(22)G Yoshizaki. Production of donor-derived eggs and sperm by allogenic transplantation of cryopreserved spermatogonia in medaka. 2nd Strategical Meeting for Medaka Research. (招待講演) Seville, Spain,

(Spanish Research Council (CSIC) museum "Casa de la Ciencia"). 2014 年 4 月 10-12 日.

〔図書〕(計 1 件)

北野健 他. 裳華房「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ 成長・成熟・性決定: 継」6 章 魚類の性決定. 2015, 76-85.

〔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

(2)研究分担者

北野 健 (Kitano Ken)
熊本大学 大学院先端科学研究部 (理)
准教授
研究者番号: 40336219

(3)研究分担者

吉浦 康寿 (Yoshiura Yasutoshi)
国立研究開発法人水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 主任研究員
研究者番号: 90372052