平成 23 年度水産学奨励賞

精原細胞の異種間移植法を用いた水産有用海産魚類における
代理親魚技術の確立

竹 内 裕

東京海洋大学先端科学技術研究センター

Establishment of spermatogonial cell transplantation technique in marine teleost

YUTAKA TAKEUCHI

*Research Center for Advanced Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,
Tateyama, Chiba 294-0308, Japan*

筆者らの研究グループでは、大型食用海産魚の種苗生産を簡便化かつ低コスト化する新たな種苗生産技術の開発を行っている。具体的には、「サバにマグロの卵や精子を生産させる」などの「ある魚に、違う種類の魚の卵や精子を生産させる技術（＝代理親魚技術）」の開発である（図1）。^{1,2)}一旦、体外へ分離した生殖細胞から、必要に応じて配偶子を生産し、受精を介して個体へと変換することが可能となれば、希少種や優良系統の遺伝子資源の保存、in vitro で遺伝子組換えした細胞からの遺伝子改変魚の作出、マグロ類など親魚の維持管理が困難な魚種の新たな採卵法の開発など、多岐の分野での貢献が期待できる（図2）。本稿では、海産魚における代理親魚技術の現状と課題、これまでに得られた知見について概説する。

1. 研究背景

マグロ類、ブリ類、ハタ類のように、大型の水産有用海産魚は、飼育下で性成熟させることが困難で、かつ、成熟年齢に達するまでに多年を要する魚種が多い。そのため、親魚養成や採卵、継代飼育には、多大な時間・労力・スペースが必要となり、次世代作出は容易ではない。一例を挙げると、クロマグロは、体サイズが大きい、高速で遊泳する、スレに弱いといった非常に扱いにくい魚であるため、飼育下で産卵させる技術の開発は他魚種に比べ遅れている。現在、クロマグロの親魚養成は、主に、海上の大型生け簀で行われており、成熟誘導のために環境制御（水温や日長制御）を行うことは原理的に不可能である。また、琉球諸島周辺海域で産卵するクロマグロに対して、その最適な産卵環境を本州や九州

図1 代理親魚マサバを利用したクロマグロ配偶子の生産

図2 細胞を個体へ変換する技術の開発とその水産学的意義

の沿岸に設置した海上生け簀で再現することは非常に困難である。さらには、マダイやブリなどの産卵誘発に際して一般的に行われている麻酔した魚体から卵巣の一部を取り出す成熟度鑑別法や、成熟を促すホルモン投与法の開発も発展途上である。数千トンクラスの大規模な陸上水槽を準備し、環境制御を行えば、水槽内で自然産卵させることも可能であると予想されるが、その建設や維持管理に掛かる費用は莫大となる。したがって、現在、全国・全世界的に見ても、クロマグロの良質の受精卵を安定供給する技術の開発は急務の課題であるといえる。また近年、水産有用海産魚においてもゲノム情報等を利用した育種への期待が高まっており、そのためには、優れた形質を有する個体を短期間のうちに確実に親魚へと養成し、次世代を作出する技術が必須であると考えられる。

このような問題を克服するため、筆者らは、サケ科魚類において開発した代理親魚技術（例：ヤマメにニジマスの配偶子を生産させる）^{3,4)}の海産魚への応用に着手した。すなわち、大型食用海産魚（ドナー）の生殖腺から配偶子の起源となる生殖細胞（主に、精原細胞）を取り出し、小型の近縁種（宿主）に移植したのち、宿主の生殖腺内で配偶子へと分化させる技術の開発である。親魚養成および採卵が容易で、ドナー種よりも小型かつ若齢で成熟する宿主種を選定し、その生殖腺を配偶子生産の器として利用することができれば、ドナー種の受精卵供給の安定化、親魚養成における大幅な省エネルギー化・省スペース化・短期間化が可能となる。また、宿主魚の体内では、宿主自身の内分泌系支配下でドナー種由来の配偶子が生産されるため、陸上水槽内で宿主魚の成熟に適した生活環境を提供することで、良質の受精卵を周年供給することも可能になると期待される。この技術をサケ科魚類以外の水産上重要魚種に応用できれば、i) 大型魚種の卵や精子を小型の近縁種に生産させることや、ii) 成熟までに多年を要する魚種の卵や精子を短期間で成熟する近縁種に生産させるといった、全く新しい種苗生産システムを構築できると期待している。さらに、本技術により親魚サイズが小型化されれば、種苗生産施設も大幅に小型化可能となるため、iii) 人工海水を用いた循環陸上養殖システムを用いて、病原体フリーの環境で大型海産魚の種苗生産を行うことも可能になると期待される。これらの結果、“良質の海水が大量に供給可能な場所に、巨額の資金を投じて種苗生産施設を建設する”という従来の概念から脱却し、小規模な陸上施設で大型食用海産魚を短期間かつ低コストで種苗生産するという新しい産業のシーズを生み出すと考えられる。

本研究では、多くの水産有用海産魚類と同じく分離浮遊卵を産卵するスズキ目の海産魚であるニベ *Nibea mitsukurii* およびマサバ *Scomber japonicas* を用い、精原細胞

ニベ受精卵
(0.8mm)

ニベ親魚
(全長15cm, 4~6か月で成熟)

マサバ受精卵
(1mm)

マサバ親魚
(全長40cm, 1年で成熟)

図3 代理親魚技術の開発に用いたニベおよびマサバ

深型100L水槽

小さいスペースで多くの種苗槽
(=実験区)を設置可能(現在、
6x5mの種苗室内に、6台の
ウォーターバスを設置して、42基
の100L種苗槽を稼働)

図4 海産魚における小規模かつ多回数の種苗生産システムの確立

胞移植法の開発を行った（図3）。海産魚での代理親魚技術の開発にあたり、まず、移植実験に用いる海産仔魚を周年供給することを目指した。既に、ニベの周年採卵、水槽内でのマサバの産卵誘発、100 L 水槽を用いた海産魚の小規模種苗生産系の構築に成功し、これにより研究開発速度が大幅に向上した（図4）。

研究を行った東京海洋大学館山ステーション（坂田）では、約6年前から施設改修や飼育設備の整備を継続的に行い、現在、主に、ニベ科（ニベ、オオニベ）およびサバ科（クロマグロ、スマ、ハガツオ、マサバ、ゴマサバ）の魚類を各数十～数千尾飼育している。また、研究室は、顕微鏡類（蛍光生物顕微鏡、蛍光実体顕微鏡、共焦点顕微鏡）、細胞移植用マイクロマニピレータ、DNA・RNA 解析用研究機器、細胞培養機器、組織切片作製装置などを備えており、本ステーションは海産魚飼育施設と最先端の基礎研究機器を兼ね備えた水産研究施設へと変貌している（図5）。

図5 東京海洋大学・館山ステーション（坂田）の飼育設備

2. ドナーとして利用可能な精原細胞の調整

未成熟精巣より調整した精原細胞集団の中には、宿主腹腔内へと移植された後に、生殖腺原基へ向かって自発的に移動し生着する能力を有する生殖細胞が存在することが明らかとなっている。^{4,5,6)} これらの細胞をより多く回収し、ドナーに用いることが移植成功の鍵となるが、現時点では、これらの細胞を選択的に単離する方法は存在しない。そこで、移植に適したドナー細胞の調整法を定量化するため、ニベおよびマサバより未成熟精巣を摘出し、精巣細胞懸濁液中の精原細胞含有率を調べたのちに移植を行ったところ、精原細胞を約25%以上含む細胞懸濁液を移植した場合に、宿主生殖腺内へのドナー細胞の生着が高効率で起こることを明らかにした。⁷⁾

3. 海産仔魚への腹腔内細胞移植

海産魚の分離浮遊卵は、直径が1mm以下と小さく、ふ化仔魚もハンドリングストレスに対して非常に脆弱である。しかし、精原細胞の腹腔内移植は、後述の理由により仔稚魚期に行う必要があるため、大型で強靱なサケ科魚類のふ化稚魚を用いて開発した本移植技術が海産仔稚魚に応用可能であるかが本研究の最大の課題であった（図6）。

本移植実験系において、腹腔内に移植されたドナー精原細胞は、一旦、腹膜上に接着したのち、内在性始原生殖細胞の移動ルート上を経由して宿主生殖腺内へ取り込まれると考えられる。したがって、宿主体内での内在性始原生殖細胞の移動期を正確に把握し、その期間内に移植を行うことが移植成功のもう一つの鍵となる。ニベおよびマサバ仔稚魚期の組織学的観察の結果、始原生殖細胞の移動期は両種とも日齢10～14（全長4～5mm）程度のワムシ摂餌期であることが判明した（図7）。この時期の仔魚はハンドリングに極めて弱いが、ウシ血清アルブミンを含有する低濃度のトリカイン麻酔液を用いる

図6 サケ科魚類と分離浮遊卵産出型海産魚類のふ化仔稚魚サイズの比較

図7 宿主生殖腺の観察による移植適期の検討

ことで、顕微注入法による腹腔内細胞移植が可能となった。⁷⁾ これにより、移植3週間後での宿主個体の生残率は平均して約20%、宿主生殖腺内へドナー細胞の生着率は50-70%（最高で100%）と安定して高い値を得ることができるようになった（図8, 9）。^{7,8,9)}

4. ドナー精原細胞に由来する次世代個体の誕生

宿主生殖腺に生着したドナー精原細胞が配偶子へ分化したことを確認するためには、次世代子孫中にドナー由来の遺伝的形質を示す個体を誕生させる必要がある。まず、宿主自身の配偶子形成を阻止し、ドナー精原細胞のみが効率的に増殖・分化できる状況を作り出すため、3倍体化宿主の利用を検討した。ニベでは10℃の低温海水中へ受精直後の卵を浸漬することで高い生残率で3倍体を作成可能であり、さらに、これらの3倍体ニベは機能的な配偶子を生産せず不妊となることを明らかにした（竹内ら、未発表）。次に、海産魚ではドナーと宿主の細胞を識別可能なアルビノなどの遺伝的形質がほとんど存在しないため、オワンクラゲGFP遺伝子を導入した遺伝子組換えニベを作成し、¹⁰⁾ GFP遺伝子導入ニベ

図8 ドナー精原細胞の移植実験

図9 移植3週間後の宿主生殖腺の蛍光観察
矢じり: 宿主生殖腺内に生着したドナー精原細胞

べより調整した精原細胞をドナーとして用いて3倍体の野生型ニベへの移植を行った。これらの3倍体宿主を7か月間飼育して得られた6尾の排精オス個体中2尾、および、8尾の排卵メス個体中8尾より、GFP遺伝子陽性を示すドナー由来の子孫が誕生した（竹内ら、未発表）。これら一連の結果は、サケ科魚類に比べて遥かに小さく未熟な状態で分化する分離浮遊卵産出型海産魚の仔魚に対しても精原細胞移植が可能で、かつ、宿主によるドナー由来配偶子の生産が行われたことを示している。

5. 終わりに

異種間での移植実験では、現在までに、ドナー由来ブリ精子を生産するマアジの作出（森田ら、未発表）や、ドナー由来トラフグ精子を生産するクサフグの作出に成功している（濱崎ら、未発表）。今後は、遺伝的距離や産卵適水温の異なるドナー種と宿主種とを戦略的に組み合わせることで、宿主生殖腺内での異種由来配偶子生産が可能となる条件を明らかにし、より効率的で様々な海産

魚種に対応できる技術へと発展させることを目標としている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、東京海洋大学大学院・竹内俊郎教授ならびに吉崎悟朗教授には終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました。また、東京海洋大学水圏科学フィールド教育研究センター・館山ステーション（坂田）ならびに大泉ステーションの教職員の皆様には、数々のご助力、ご助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。最後になりましたが、実験魚の飼育を第一に考えた、実習場に泊まり込みながら懸命に研究をしていた博士研究員ならびに学生の皆様には、心より感謝を申し上げるとともに、今後のご活躍をお祈りいたします。

文 献

- 1) Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, Shikina S, Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J. Reprod. Dev.* 2006; **52**: 685–693.
- 2) Yoshizaki G, Okutsu T, Takeuchi T. Germ Cell Transplantation in Fish: Basic Biology and Biotechnological Applications. In: Fletcher GL, Rise ML (eds). *Aquaculture Biotechnology* Wiley-Blackwell, New Jersey. 2012; 223–232.
- 3) Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 2004; **430**: 629–630.
- 4) Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 2007; **317**: 1517.
- 5) Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; **103**: 2725–2729.
- 6) Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions. *Biol. Reprod.* 2008; **78**: 151–158.
- 7) Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biol. Reprod.* 2009; **81**: 1055–1063.
- 8) Higuchi K, Takeuchi Y, Miwa M, Yamamoto Y, Tsunemoto K, Yoshizaki G. Colonization, proliferation and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fish. Sci.* 2011; **77**: 69–77.
- 9) Yazawa R, Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Kabeya N, Yoshizaki G. Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol. Reprod.* 2010; **82**: 896–904.
- 10) Yamamoto Y, Kabeya N, Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Tsunemoto K, Yazawa R, Kawamura T, Yoshizaki G. Establishment of a stable transgenic strain in a pelagic egg spawning marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*. *Aquaculture* 2011; **313**: 42–49.