

# 精原細胞移植技術を用いた海産魚における代理親魚技術の開発

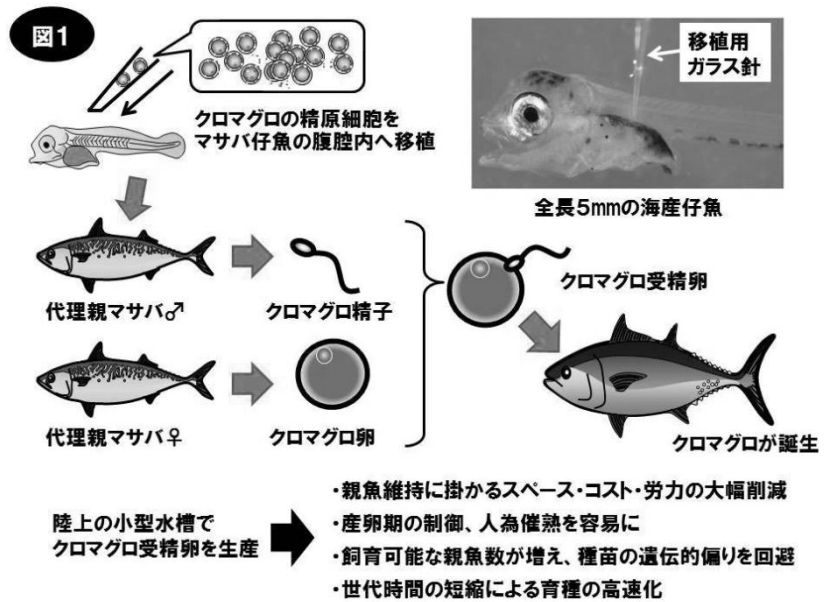
竹内裕（東京海洋大学先端科学技術研究センター）

yutakat@kaiyodai.ac.jp

## はじめに

魚の種苗生産や養殖の分野では世界屈指の技術を有する日本においても、クロマグロなどの大型海産魚に良質の卵を計画的に産ませる技術の開発は発展途上である。本研究では、体が小さく水槽内でも産卵可能なマサバやマアジなど小型海産魚の体を借りて、クロマグロやブリなど体サイズが大きく性成熟までに長期間を要する大型海産魚の卵や精子を生産させる技術（代理親魚技術）の確立を最終目的とし（図1）、世界的な水産上有用魚種（＝アジ、サバ、マグロ、ヒラメ、タイなど）を多く含むスズキ目海産魚を用いた精原細胞\*の同種間および異種間移植技術を開発した。

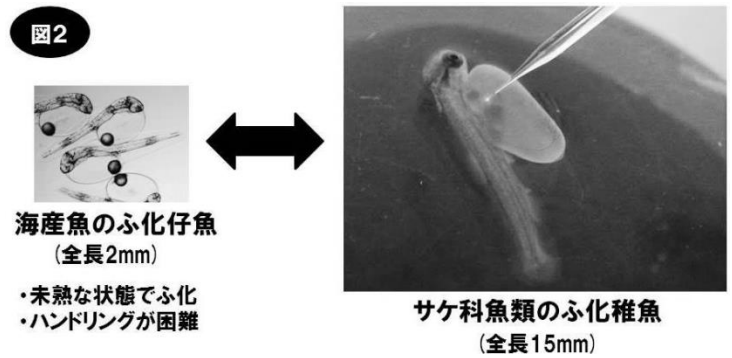
\*精原細胞は精巣内に多数存在し、精子の起源となる細胞であるが、東京海洋大学・吉崎研究室の研究により、メス宿主稚魚（ニジマス）に移植し、卵巣内に取り込まれた場合は、卵へと分化することが判明している<sup>1)</sup>。すなわち、魚類の精原細胞には性的両能性が備わっており、精原細胞をドナーとした移植を行うことで、卵と精子のいずれをも生産することが可能となっている。



## ドナー精原細胞を海産魚仔魚の腹腔内へ移植する

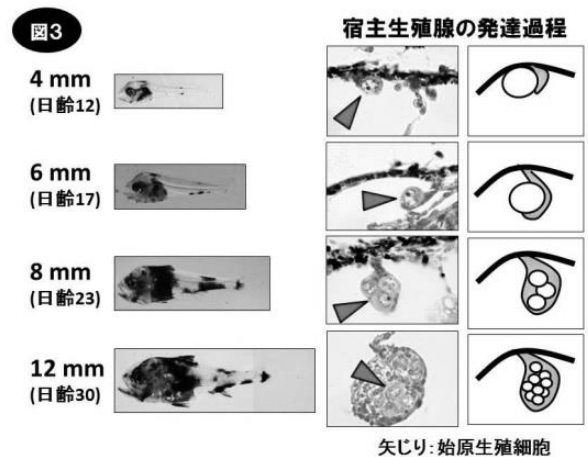
異種あるいは同種異個体間での生殖細胞移植に際して、ドナーと宿主間の際に起こる免疫拒絶を回避するためのシンプルな方法として、免疫系が未発達な時期、すなわち仔稚魚期での腹腔内細胞移植を実践してきた<sup>1-4)</sup>。本技術がはじめに確立されたサケ科魚類のふ化稚魚は大型であり細胞移植操作に耐えることができたため、ヤマメ（宿主）にニジマス（ドナー）を産ませる実験が成功した<sup>3), 4)</sup>。この技術が増養殖の対象となる海産魚でも利用できるようになれば、これまで困難であった大型海産魚の種苗生産技術や、種あるいは有用系統の保存技術としての利用価値が飛躍的に高まる。しかしながら、スズキ目海産魚の多くは、分離浮遊卵と呼ばれる魚類の中でも最も小さい卵を産み（直径1 mm 以下）、そのふ化仔魚も全長2 mm 程度と非常に小型でハンドリングストレスに弱いため、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2）。また、サケ科魚類で

は、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。



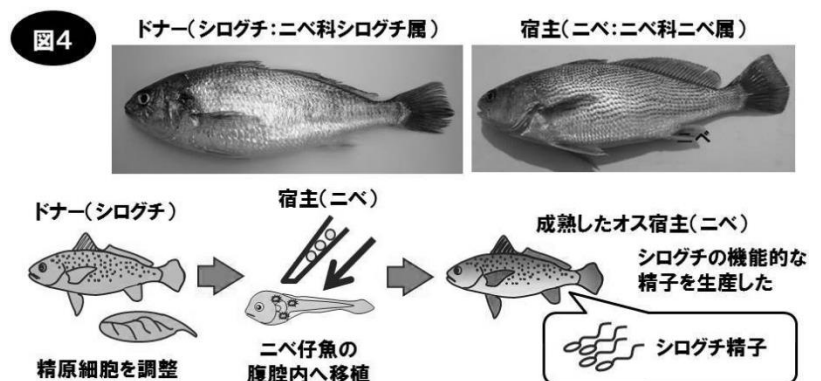
そこで、ニベ、マサバ、ヒラメといった海産仔稚魚の始原生殖細胞の発生過程を組織学的に観察した結果、始原生殖細胞の移動期はいずれの種においても日齢 10~14 (全長 4~5 mm) 程度のワムシ摂餌期であることが判明した (図3)。この時期の仔魚はハンドリングに極めて弱いが、ウシ血清アルブミンを含有する低濃度のトリカイン麻酔液を用いることで、ふ化後 1~2 週間程度の全長 4 mm 程度の海産仔魚の腹腔内へドナー精原細胞を移植できるようになった<sup>5-7)</sup>。これにより、移植 3 週間後での宿主個体の生残率は平均して約 20%、宿主生殖腺内へドナー細胞の生着率は 50-70% (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。さらに、

宿主仔魚の腹腔内に移植された異種あるいは同種異個体由来のドナー精原細胞は、移植後 3 週間以内に宿主の生殖腺内へと生着して増殖を開始することを確認した。これまでに、ニベ科<sup>5)</sup>、<sup>8)</sup>、サバ科<sup>7)</sup>、アジ科<sup>9)</sup>、ヒラメ科、フグ科といった広範の海産魚種において宿主仔魚腹腔内への精原細胞移植技術を確立し、以下に記すような成果を得てきた。



### スズキ目ニベ科魚類を用いた精原細胞移植技術の開発

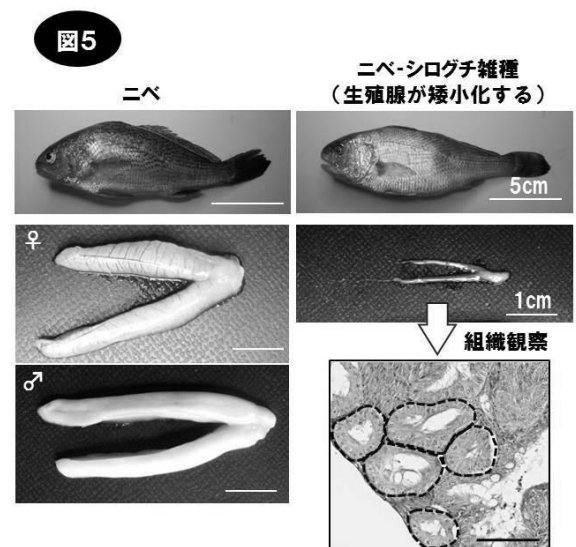
海産魚では、細胞移植実験を行う際にドナー細胞と宿主細胞を容易に識別できる遺伝的マーカー (例: アルビノ形質) がほとんど存在しない。そこでまず、オワンクラゲ GFP 遺伝子を導入した遺伝子組換えニベ系統を樹立した<sup>9)</sup>。これらの精原細胞をドナーに用いて野生型ニベ宿主へ移植することで、宿主生殖腺内で GFP 陽性を示す卵と精子、すなわち、移植したドナー精原細胞に由来する卵と精子が生産されることを証明した。異種間移植においては、ニベ宿主に対し、同科異属のシログチ精原細胞を移植することで、ニベによるシログチ精子の生産に成功した (図4)。以上の実験により、サケ科魚類で開発した魚類の精原細胞移植技術が海産魚でも利用可能であることを証明した。



続いて、移植したドナー精原細胞をいかに高確率で機能的な

配偶子にまで分化させるか、について研究を行った。宿主魚にドナー由来配偶子を効率的に生産させるためには、宿主自身の配偶子を形成させないことが重要となる。そこでまず、ニベを用いて3倍体化による不妊化魚を作出し、3倍体ニベが宿主として利用できるか調べた。魚類の3倍体は、生殖腺を構成する体細胞は正常に機能するものの、その生殖細胞は配偶子形成の過程（特に、減数分裂時）で異常をきたすため受精能・発生能を有する配偶子はほとんど生産されない。実際に、3倍体ニベを宿主に用いた場合、宿主はドナー由来の卵あるいは精子のみを生産した。さらに、ドナー由来配偶子を生産できた宿主の出現頻度は、2倍体宿主を用いた場合に比べ、オスで7倍、メスで4倍高まることを明らかにした。

上述のように、3倍体宿主の利用により代理親魚技術の成功率は向上したが、3倍体を作出するためには、受精直後に強いコールドショック（10℃の海水に15分間浸漬）を与える必要がある。したがって、ニベの卵質の良し悪しによって3倍体化処理した受精卵の発生率は大きく変動するため、3倍体宿主の安定的な供給は容易では無い。そこで、より安定的かつ容易に不妊化宿主を生産する方法として、種間交雑による不妊化を試みた。ラバ（ウマとロバの交雑種）が不妊となるように、魚類においても交雑魚が不妊化する現象が報告されている。そこで、国内で釣獲可能なニベ科魚類4種を収集し、種々の組み合わせで交雑試験を行ったところ、ニベの卵とシログチの精子を受精させた場合にのみ、生殖細胞欠損型の不妊化個体を得られることを発見した（図5）。さらに、本雑種宿主に対して、ニベ精原細胞の移植を行いドナー由来ニベ精子を生産させることにも成功し、不妊化雑種を宿主とした精原細胞の移植が可能であることを示した。



精小嚢様の構造は存在するものの生殖細胞は全く観察されない

以上のように、3倍体魚および種間交雑魚の2つのタイプの不妊化魚を用いた研究により、海産魚において、代理親魚技術を実用化可能なレベルにまで改善することができた。現在、民間企業や公設試と協力し、ブリ精子を生産するマアジの作出や、トラフグ精子を生産するクサフグの作出、天然ヒラメの精子を生産する継代ヒラメの作出にも成功しており、本技術の魚類種苗生産現場への普及が進んでいる。

### 代理親魚技術によって魚類の種苗生産はどう変わるのか？

宿主魚の体内では、宿主自身の内分泌系の支配下でドナー由来の配偶子が生産されるため、宿主魚の成熟に適した生活環境を提供することで、ドナー種の受精卵を周年供給することが可能になると期待される。本研究の成果によって、サケ科魚類のみならず、水産上重要な海産魚種においても、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実現できる可能性が示された。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縮小可能となるため、iii) 循環型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。

果実や農作物の栽培において、異種の台木への“接ぎ木”により、収穫までの期間を短縮したり、単位面積当たりの収穫量を向上させるような人為的処理が一般的に行われ、大きな成果を挙げているように、海産魚の代理親魚技術が、より多くの公設試や民間の種苗生産業者において取り込まれる種苗生産技術へと発展するよう貢献したい。

## おわりに

学生時代から現在に至るまで、次々に解明されていく生殖細胞の発生や分化のメカニズムに興味を持ち研究を行ってきた。生殖細胞を操り、配偶子へと分化させることができれば、受精を介して個体を誕生させることができる。生殖細胞研究の魅力は、その研究成果が個体（＝新しい生命）を作りだすことに直結するという点にある。魚類に限らず、昆虫や鳥、哺乳動物なども含め生殖細胞に関する基礎研究で発見された事象を理解することに努め、それらの情報をいかに産業動物に置き換え、生物生産に利用できるかを追求していきたい。

## 謝辞

本賞の受賞にあたっては、公益社団法人日本水産学会からのご推薦を頂きました。渡部終五会長をはじめ、学会関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

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暖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、実習場に泊まり込みながら懸命に研究をしていただいている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祈念いたします。

## 文献

- 1) Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, **Takeuchi T**, Yoshizaki G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; **103**: 2725-2729.
- 2) **Takeuchi Y**, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. *Biology of Reproduction*, 69, 1142-1149.
- 3) **Takeuchi Y**, Yoshizaki G, Takeuchi T. *Nature* 2004; **430**: 629-630.
- 4) Okutsu T, Shikina S, Kanno M, **Takeuchi Y**, Yoshizaki G. *Science* 2007; **317**: 1517.
- 5) **Takeuchi Y**, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G. 2009. *Biology of Reproduction*, 81, 1055-1063.
- 6) Yazawa R, **Takeuchi Y**, Higuchi K, Yatabe T, Kabeya N, Yoshizaki G. 2010. *Biology of Reproduction*, 82, 896-904.
- 7) Higuchi K, **Takeuchi Y**, Miwa M, Yamamoto Y, Tsunemoto K, Yoshizaki G. 2011. *Fisheries Science*, 77, 69-77.
- 8) Morita T, Kumakura N, Morishima K, Mitsuboshi T, Ishida M, Hara T, Kudo S, Miwa M, Ihara S, Higuchi K, **Takeuchi Y**, Yoshizaki G. 2012. *Biology of Reproduction*, 86, 1-11.
- 9) Yamamoto Y, Kabeya N, **Takeuchi Y**, Higuchi K, Yatabe T, Tsunemoto K, Yazawa R, Kawamura T, Yoshizaki G. *Aquaculture* 2011; **313**: 42-49.