

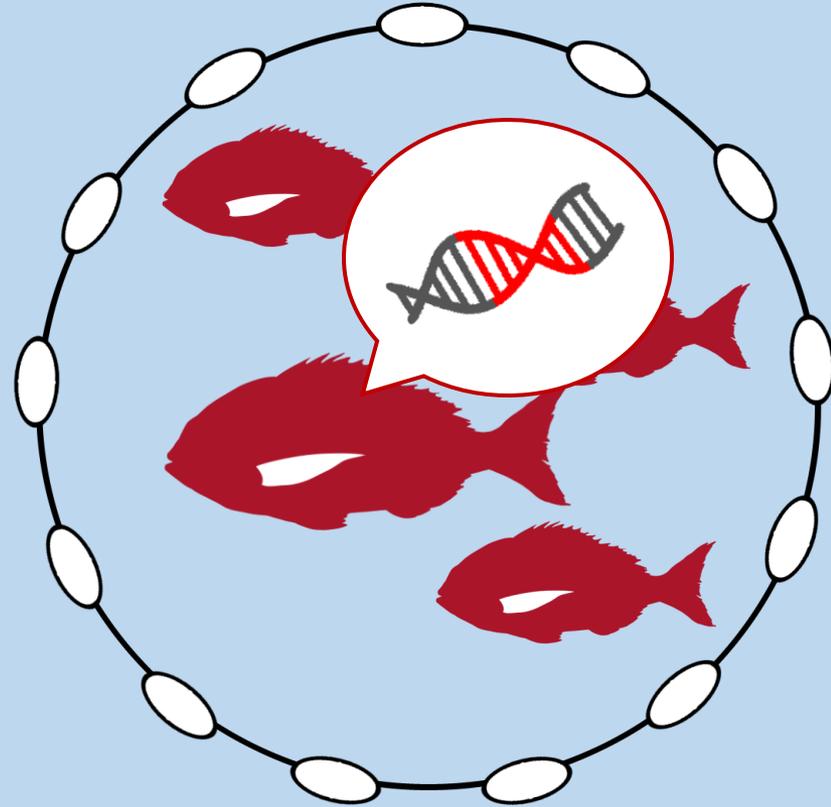
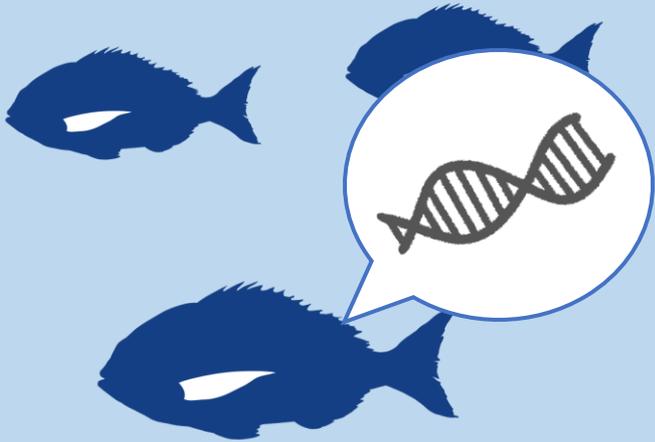
育種産物の不妊化と種の保存

東京海洋大学

吉崎悟朗

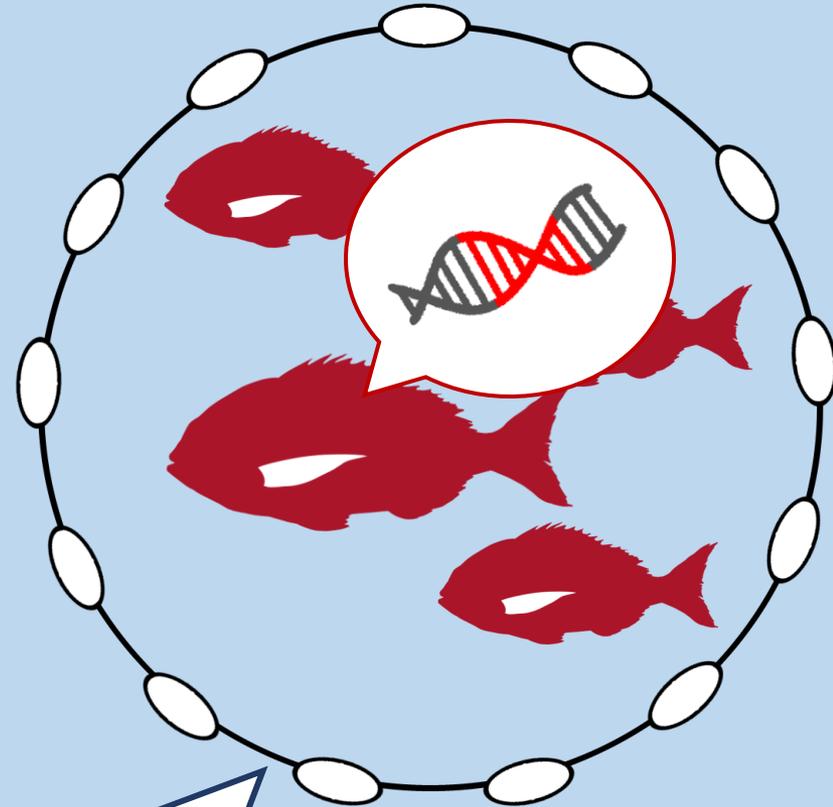
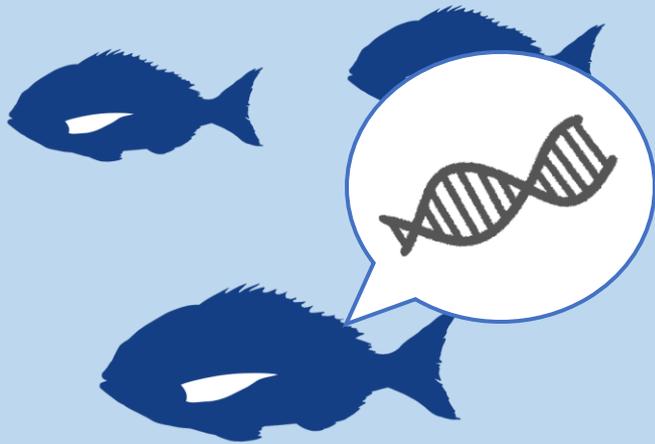
養殖魚逃亡による遺伝子汚染問題

海水魚類の養殖では海面の網いけす養殖が主流



養殖魚逃亡による遺伝子汚染問題

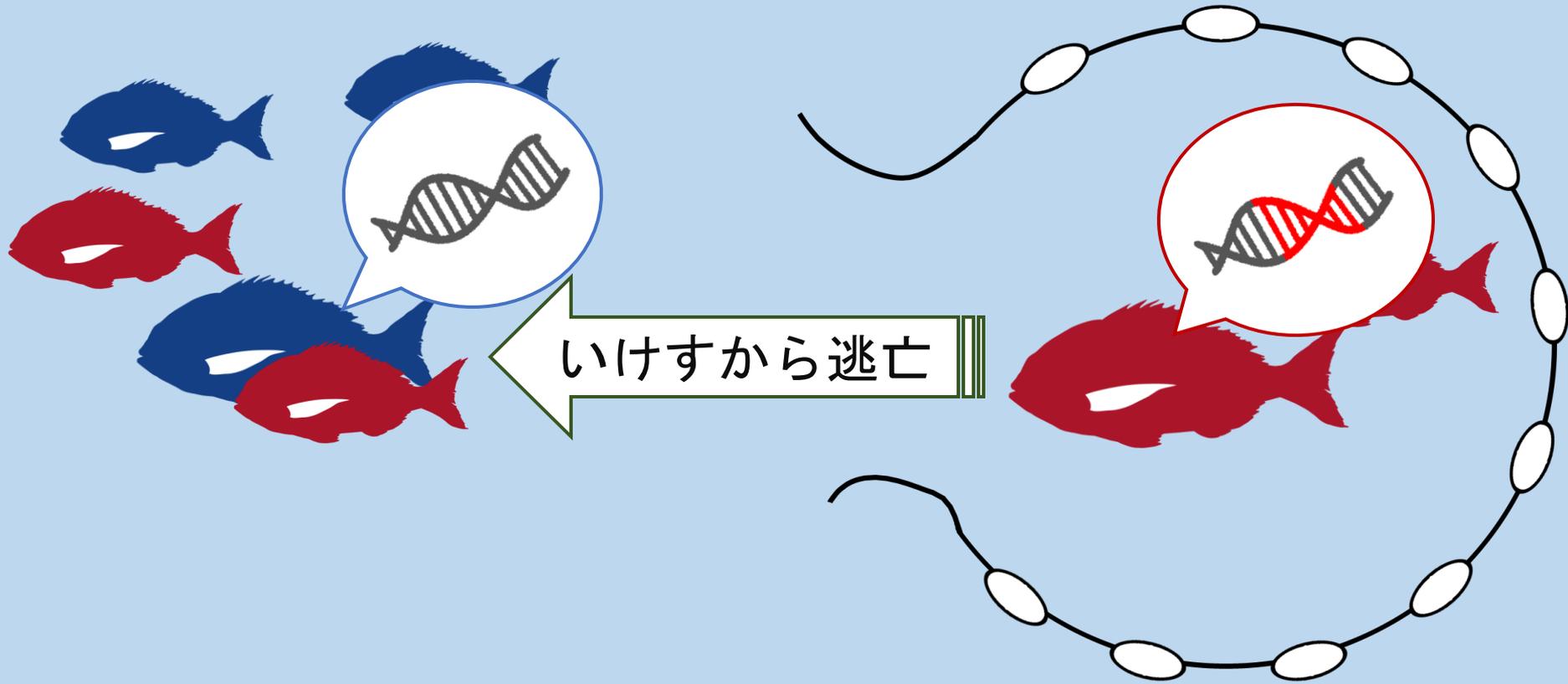
海水魚類の養殖では海面の網いけす養殖が主流



網いけすは台風などの自然災害や海獣による食い破りなどの被害に脆弱

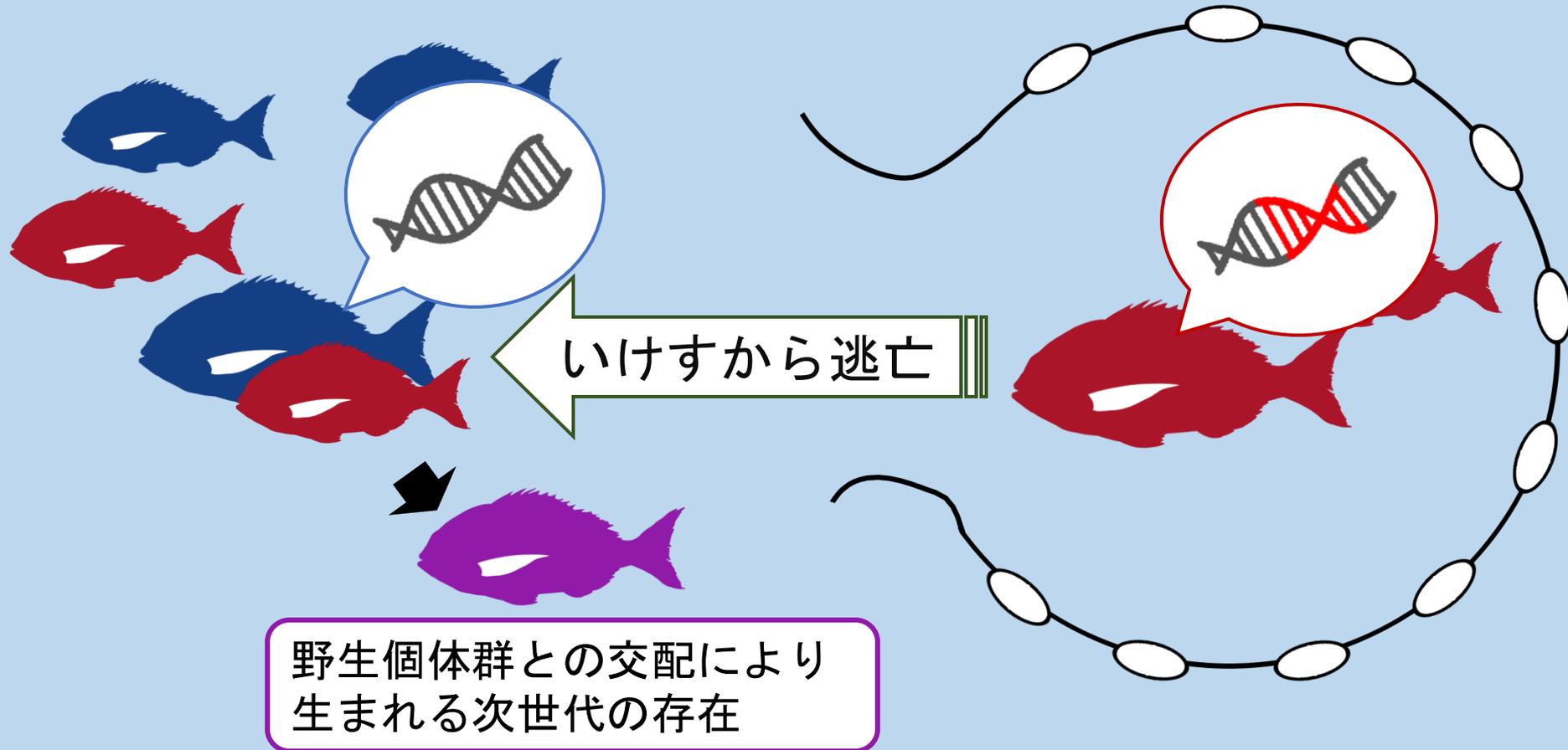
養殖魚逃亡による遺伝子汚染問題

海水魚類の養殖では海面の網いけす養殖が主流



養殖魚逃亡による遺伝子汚染問題

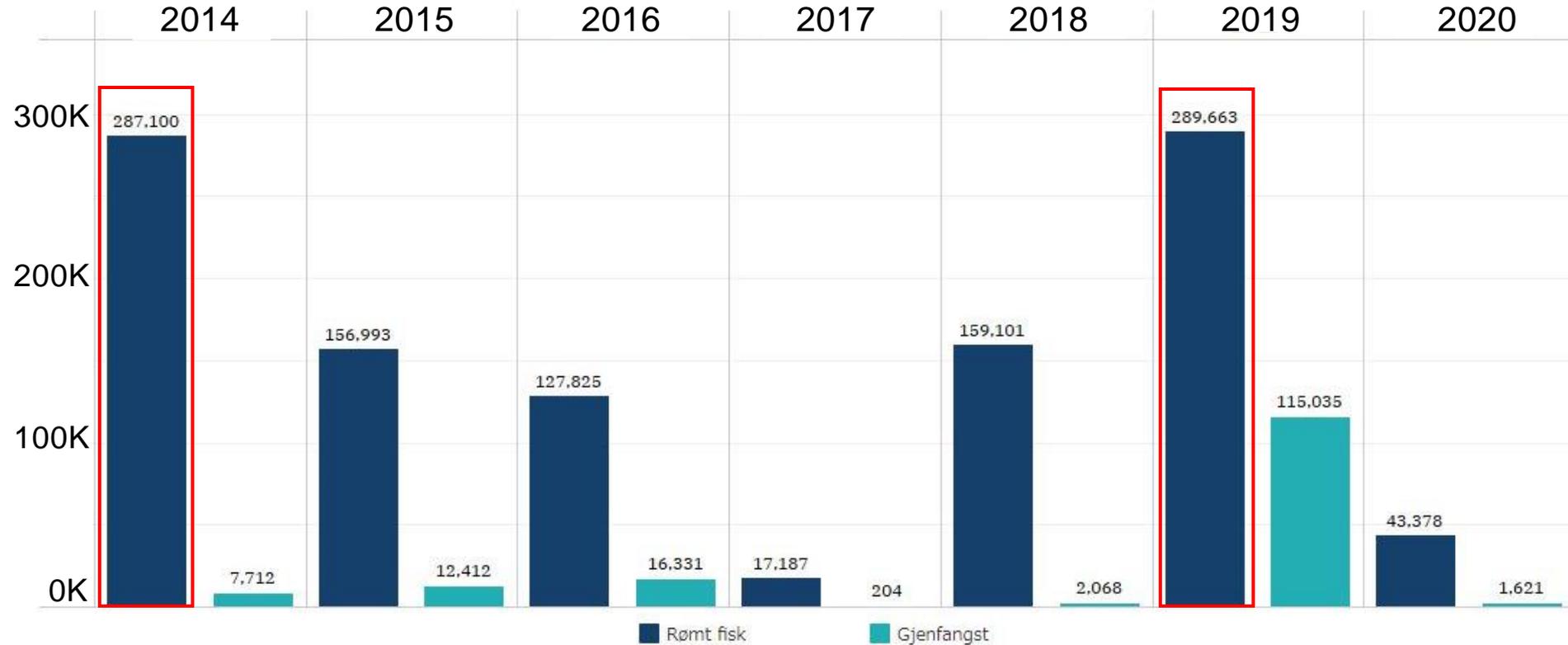
海水魚類の養殖では海面の網いけす養殖が主流



野生個体群の遺伝的な攪乱をもたらす危険性がある

養殖魚逃亡による遺伝子汚染問題

2014年から2020年の期間に報告された逃亡サーモン数と再捕獲数



ノルウェーでは逃亡魚の報告が法律で義務付けられている

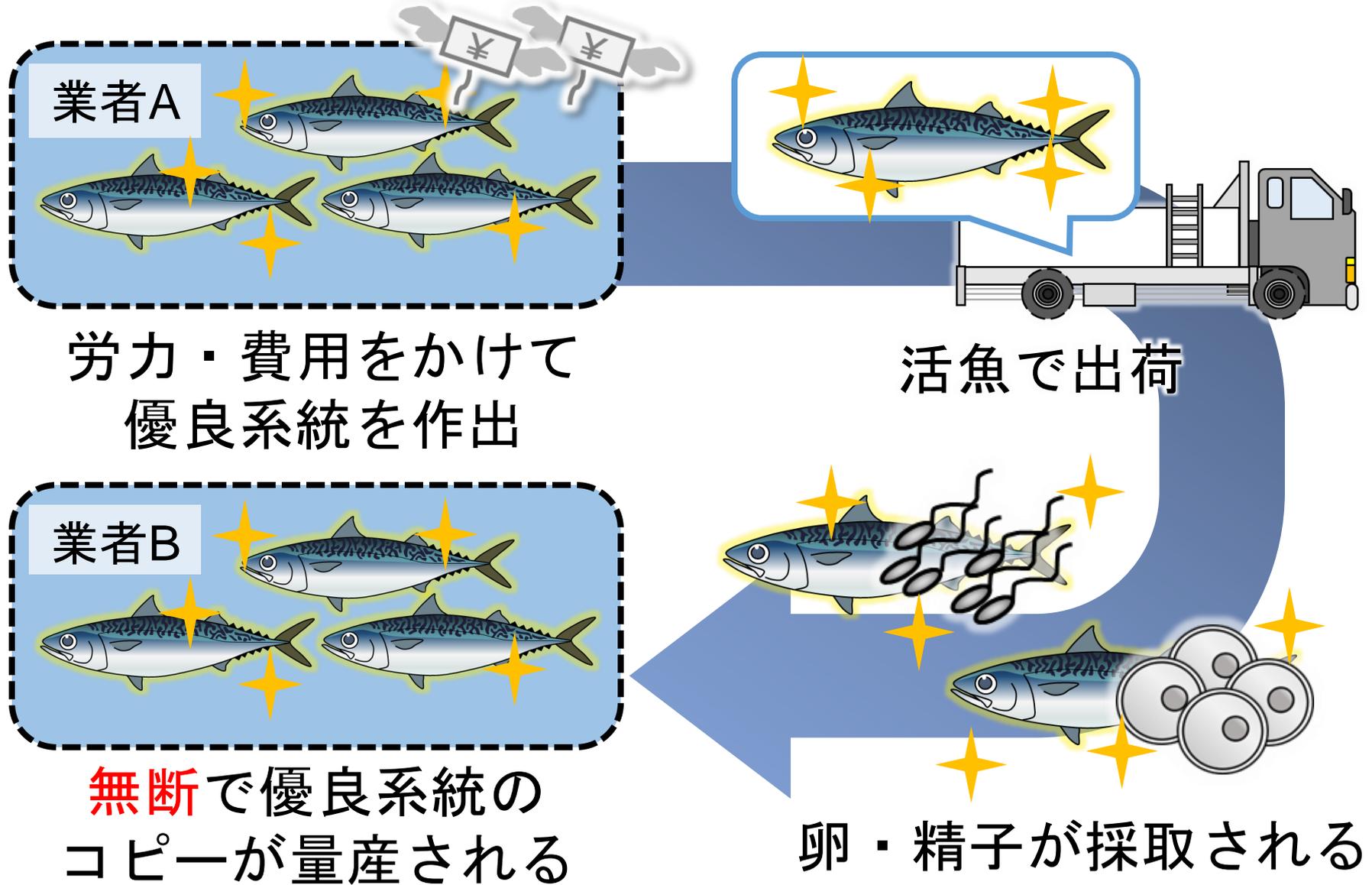
逃亡魚数

再捕獲数

(Norwegian Directorate of fisheries)

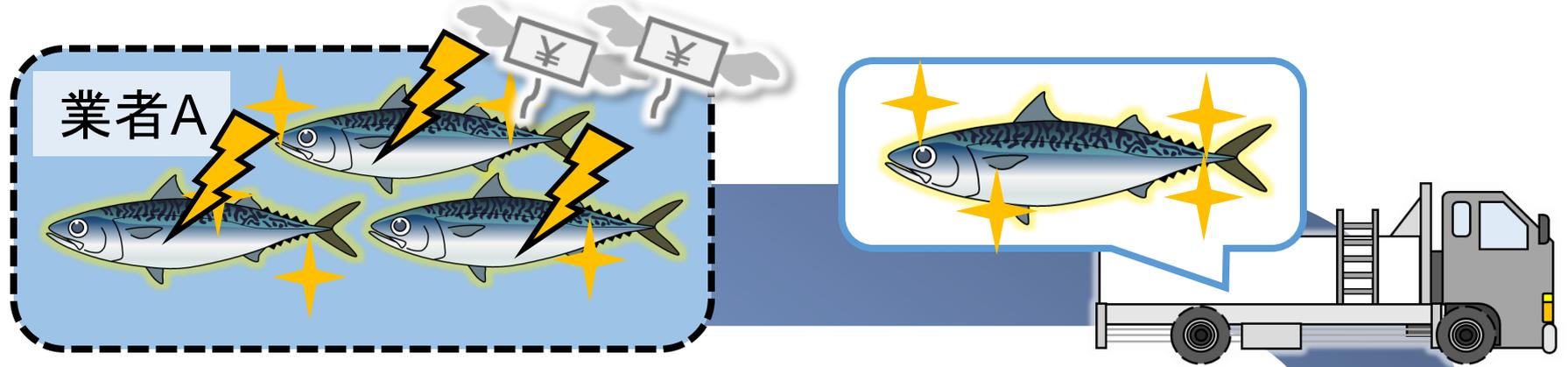
養殖魚の逃亡問題の解決が急がれている

養殖魚が抱える課題



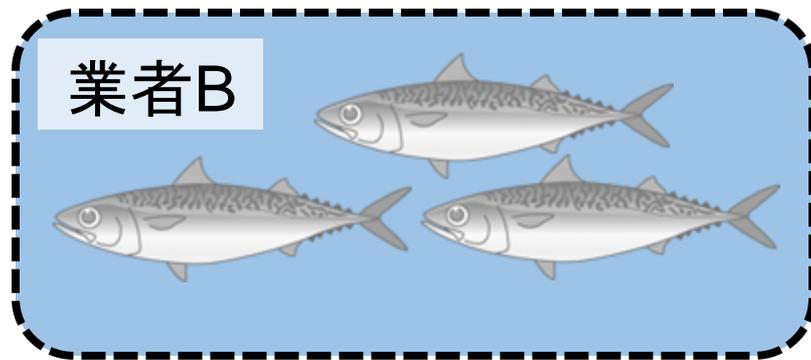
開発者の利益や権利を守ることができない

養殖魚が抱える課題

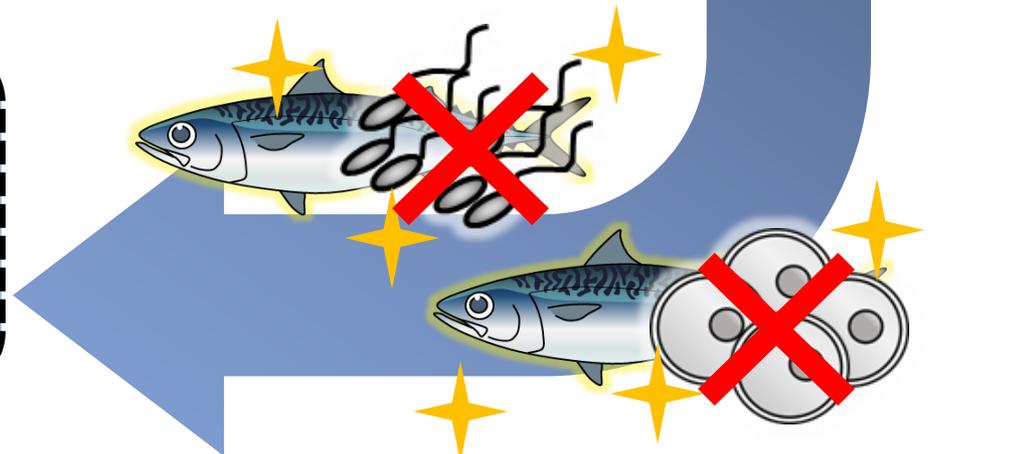


優良系統を不妊化

活魚で出荷



優良系統のコピーが
作出されない

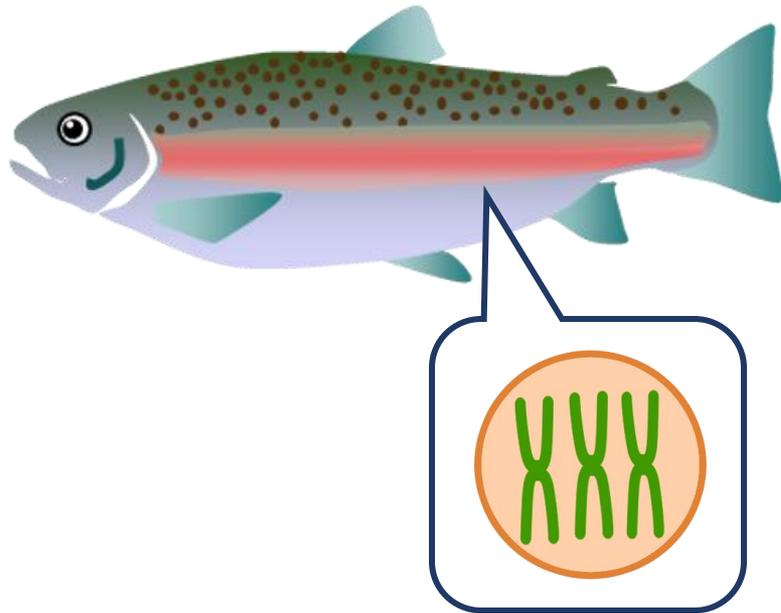


卵・精子が採取できない

優良系統の盗用を防ぐことが可能

養殖魚の逃亡問題への解決策：不妊化

【三倍体化】



メリット

- ・ 温度処理・加圧処理などの簡易な方法で作出可能

デメリット

- ・ 妊性を持つ二倍体の残存
- ・ 魚種による生残率・三倍体化率のばらつき

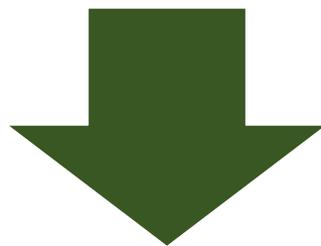
三倍体作出による不妊魚の大量生産には
未だ課題が残されている

生殖腺体細胞遺伝子のノックアウト(KO)による不妊化

① 生殖腺体細胞の機能を
欠損した不妊魚の系統確立

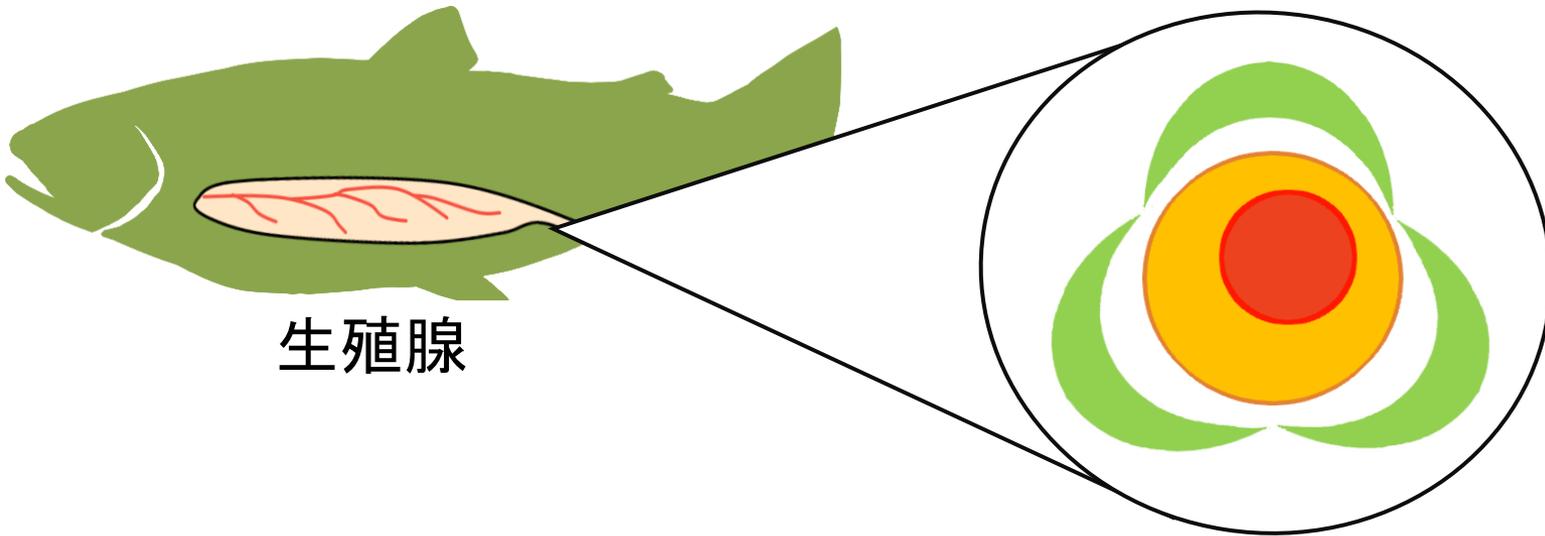


② 代理親魚技法を併用



不妊魚のみの大量生産を目指す

生殖細胞と生殖腺体細胞



生殖腺



生殖細胞

配偶子のもととなる細胞



生殖腺体細胞

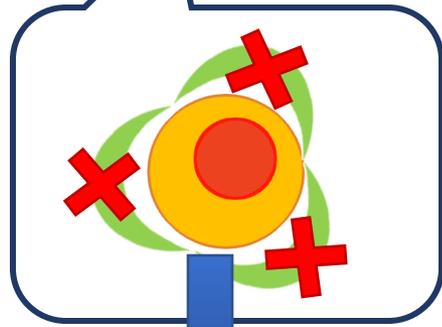
生殖細胞を取り巻く細胞群
生殖細胞を保育する機能を持つ
支持細胞（セルトリ細胞、顆粒膜細胞）も含まれる

本研究の流れ① 生殖腺体細胞遺伝子KO

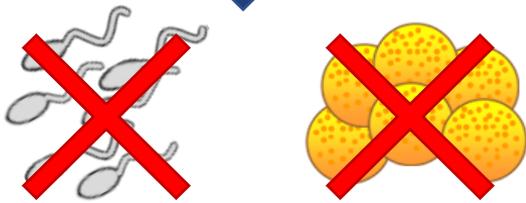
【生殖腺体細胞KO】



- 生殖細胞
- ×生殖腺体細胞



生殖細胞を保育する機能が失われる



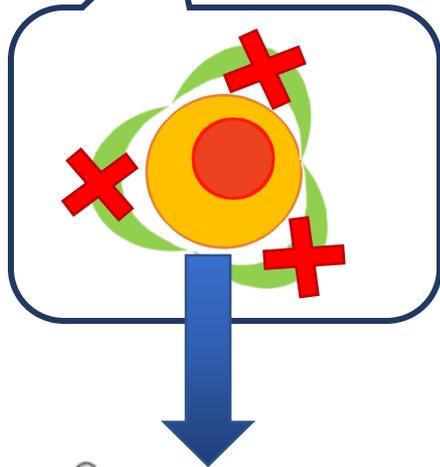
生殖細胞が精子や卵まで成熟しない不妊魚

本研究の流れ① 生殖腺体細胞遺伝子KO

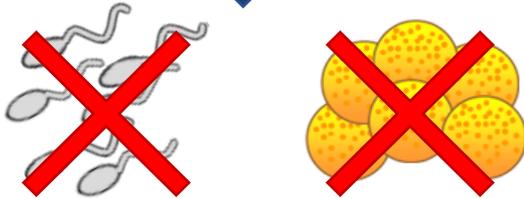
【生殖腺体細胞KO】



○生殖細胞
×生殖腺体細胞



卵や精子を作らないために、
この遺伝形質を次世代に伝えることは
原理的に不可能



生殖細胞が精子や卵まで
成熟しない不妊魚

本研究の流れ② 代理親魚技法の併用

【生殖腺体細胞KO】

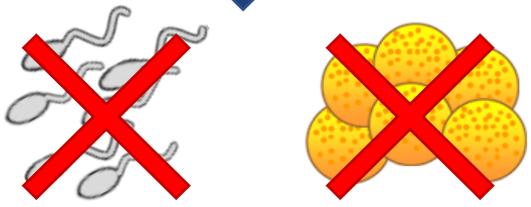
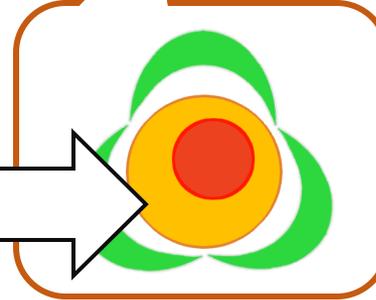
【代理親魚技法】



○生殖細胞
×生殖腺体細胞

×生殖細胞
○生殖腺体細胞

生殖細胞の移植



生殖細胞が精子や卵まで
成熟しない不妊魚

本研究の流れ② 代理親魚技法の併用

【生殖腺体細胞KO】

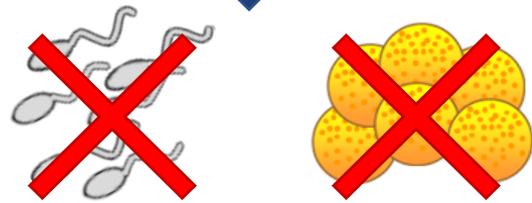
【代理親魚技法】



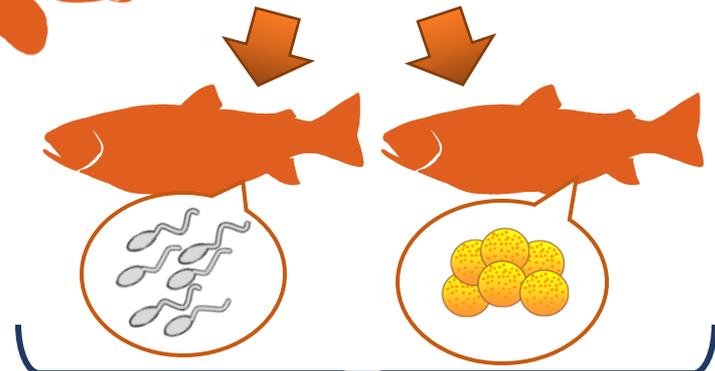
○生殖細胞
×生殖腺体細胞

×生殖細胞
○生殖腺体細胞

生殖細胞の移植



生殖細胞が精子や卵まで
成熟しない不妊魚



候補遺伝子の同定

ニジマストランスクリプトーム情報から
生殖腺の体細胞で特異的に発現している遺伝子を同定

ニジマス全組織 transcripts

95,152 個

体細胞組織と生殖細胞で発現がないもの

2,120 個

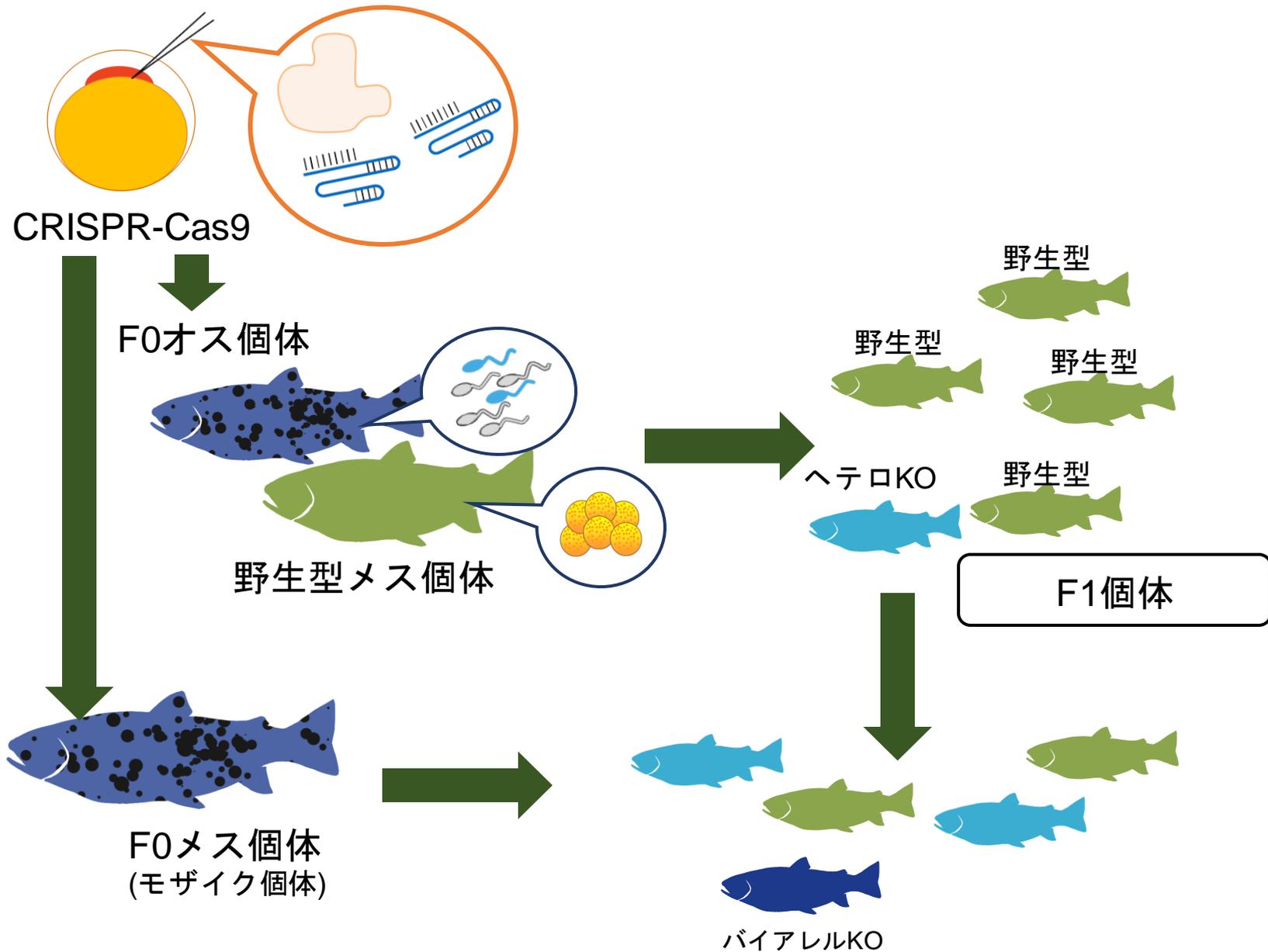
生殖腺で発現があるもの (tpm > 0)

70 個

生殖腺で発現が高いもの (より発現量が高いもの tpm > 1)

9 個

ノックアウト個体群の作出



24mpf バイアレルKO メス



上 : バイアレルKO個体(体長:29.0cm 体重:472.7g 生殖腺重量:552.5mg GSI:0.12)
下 : WT個体(体長:29.0cm 体重:442.7g 生殖腺重量:62.5g GSI:14.12)

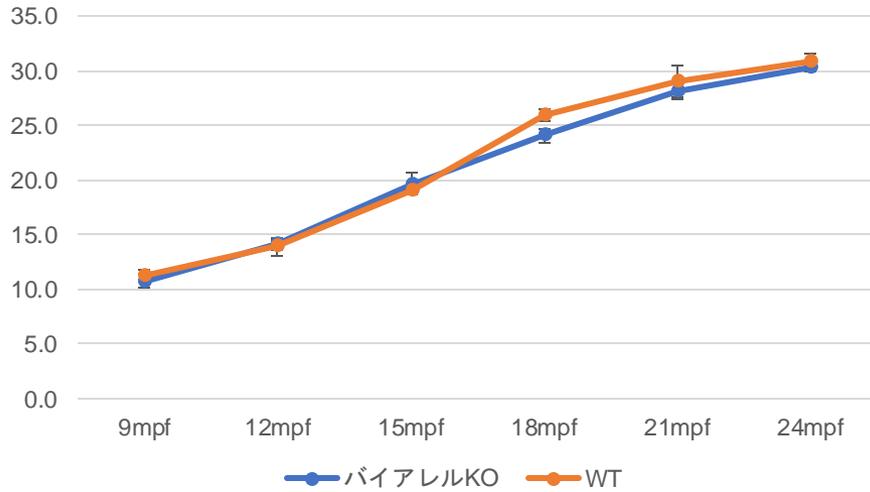
24mpf バイアレルKO メス



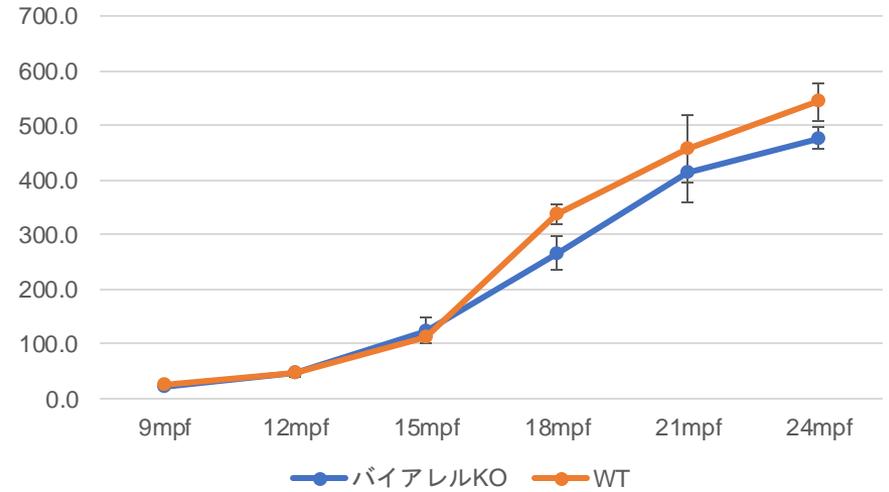
上 : バイアレルKO個体(体長:29.0cm 体重:472.7g 生殖腺重量:552.5mg GSI:0.12)
下 : WT個体(体長:29.0cm 体重:442.7g 生殖腺重量:62.5g GSI:14.12)

バイアレルKOメス経時的変化(平均値+標準誤差)

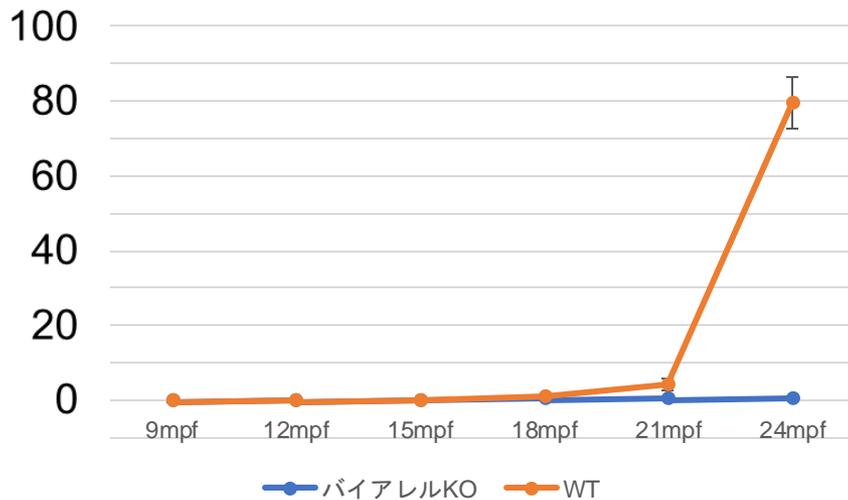
標準体長(cm)



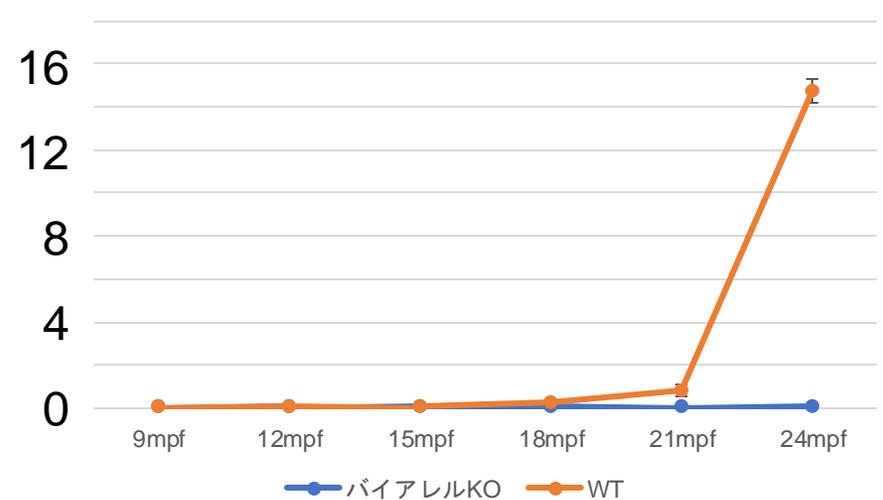
体重(g)



生殖腺重量(g)



GSI



24mpf バイアレルKO オス



上 : バイアレルKO個体(体長:31.3cm 体重:578.8g 生殖腺重量:0.19g GSI:0.03)
下 : WT個体(体長:31.2cm 体重:524.8g 生殖腺重量:29.59g GSI:5.64)

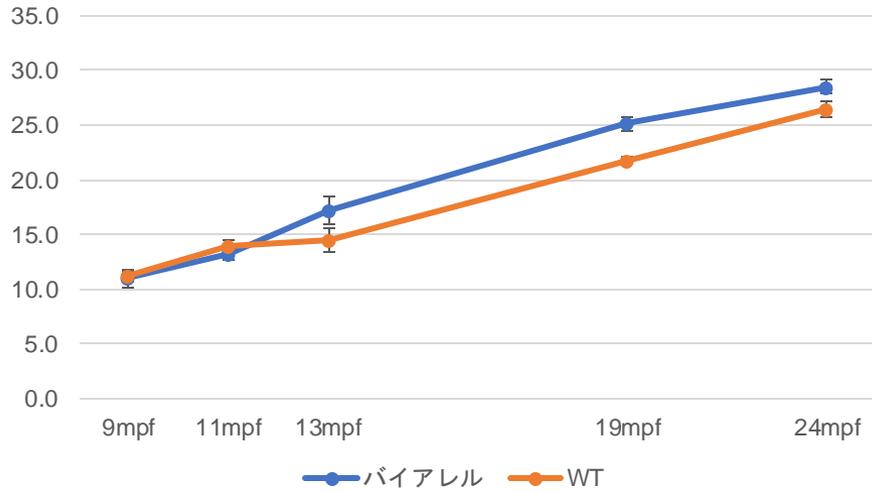
24mpf バイアレルKO オス



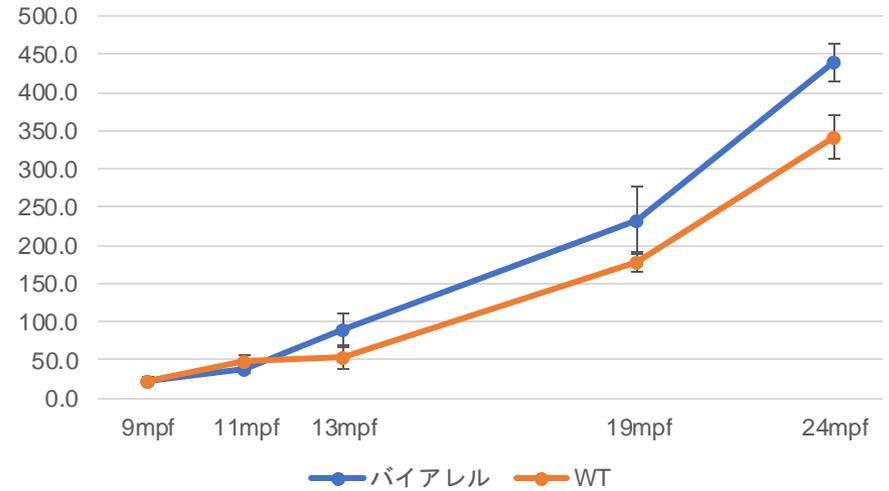
上 : バイアレルKO個体(体長:31.3cm 体重:578.8g 生殖腺重量:0.19g GSI:0.03)
下 : WT個体(体長:31.2cm 体重:524.8g 生殖腺重量:29.59g GSI:5.64)

バイアレルKOオス 経時的変化(平均値+標準誤差)

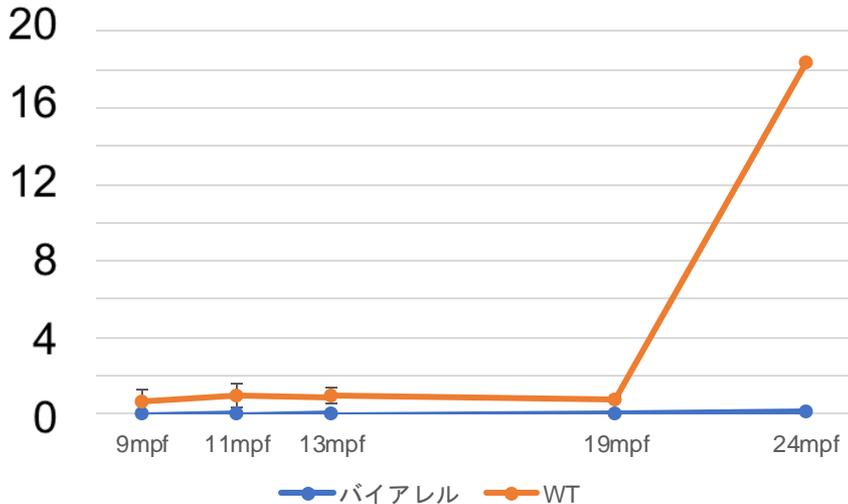
体長(cm)



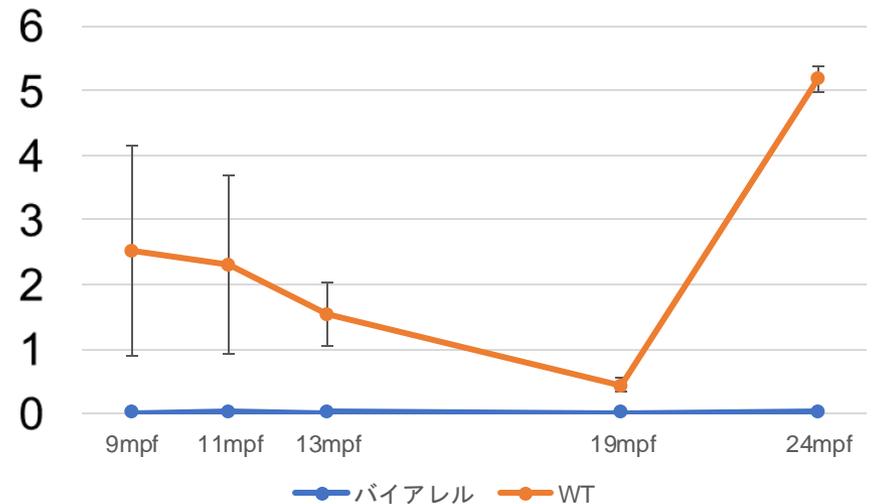
体重(g)



生殖腺重量(g)



GSI



24mpf バイアレルKO オス



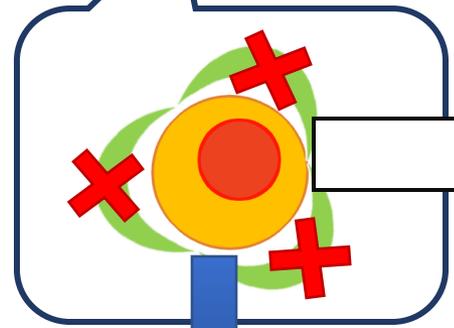
脂の乗りの改善？

代理親魚技法の併用

【生殖腺体細胞KO】



○生殖細胞
×生殖腺体細胞

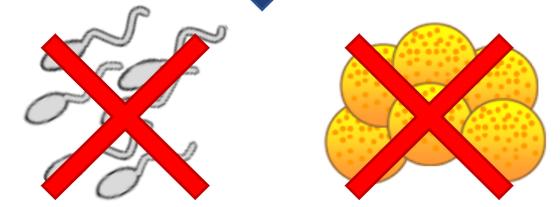
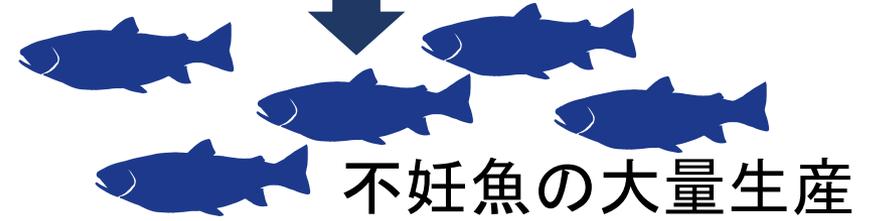
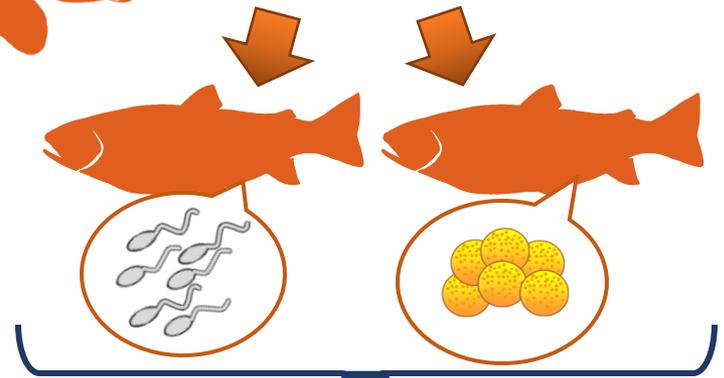
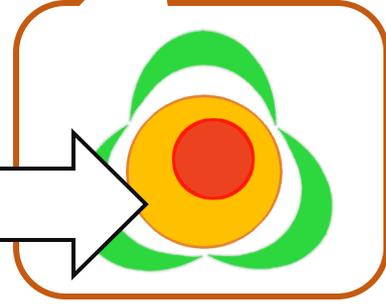


生殖細胞の移植

【代理親魚技法】



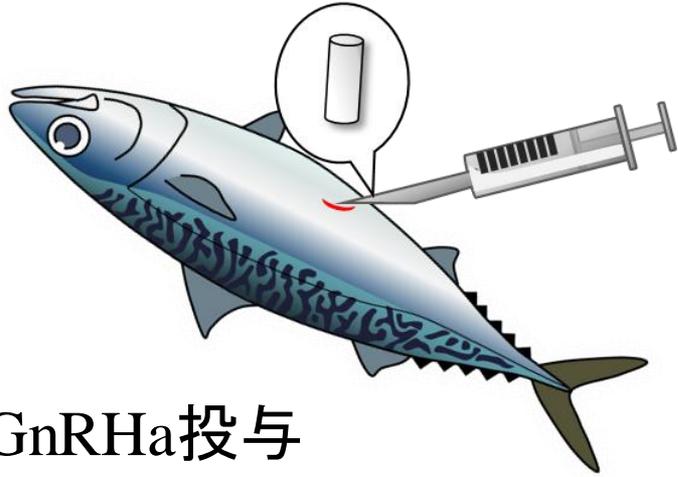
×生殖細胞
○生殖腺体細胞



生殖細胞が精子や卵まで
成熟しない不妊魚

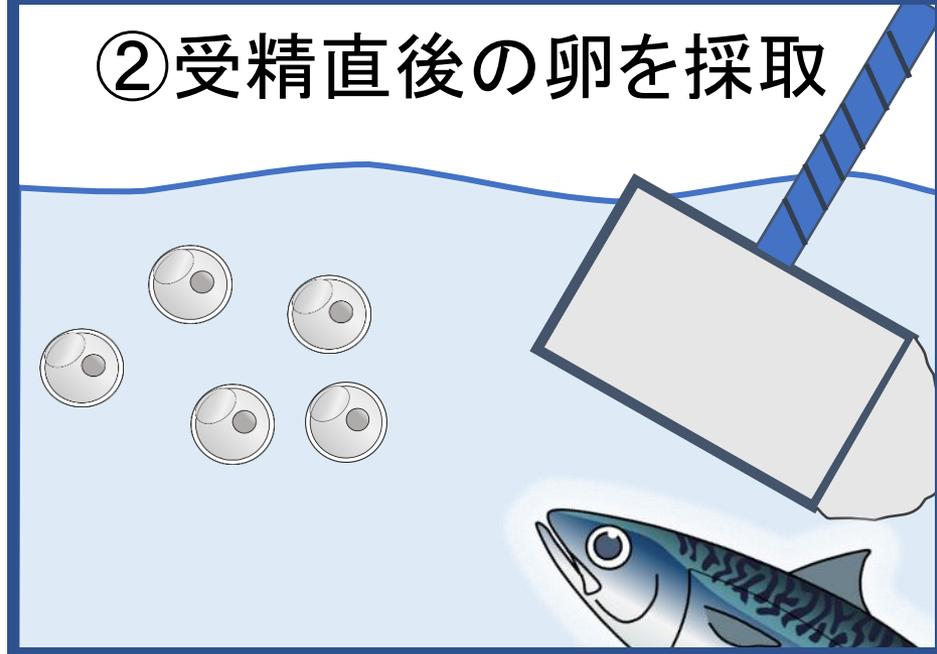
マサバ受精卵への顕微注入

①産卵誘発

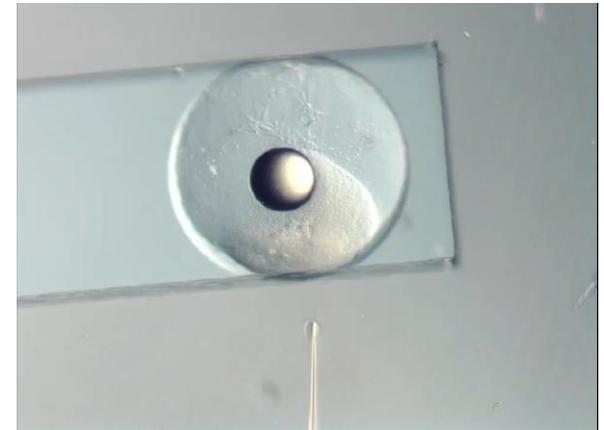
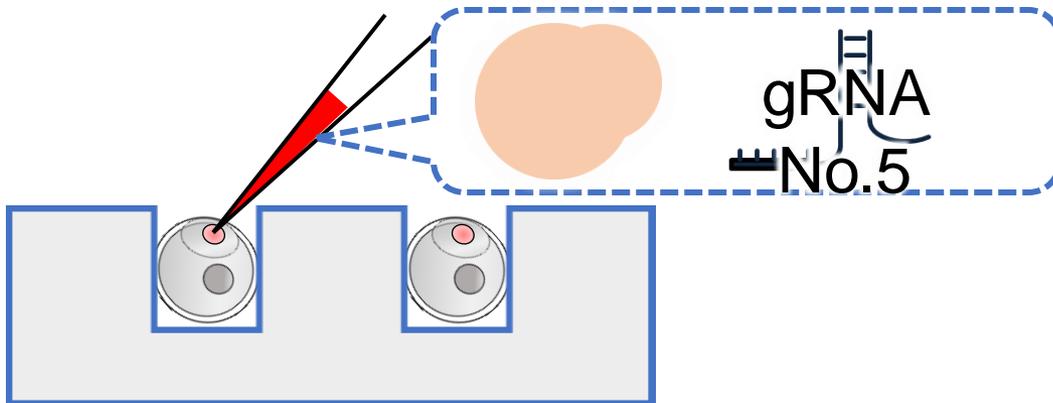


GnRHα投与

②受精直後の卵を採取

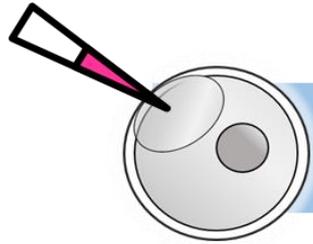


③CRISPR/Cas9溶液を顕微注入



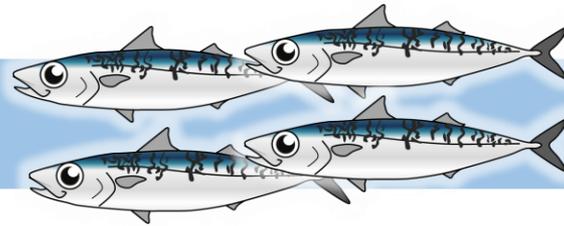
顕微注入個体の作出・飼育

4回の顕微注入



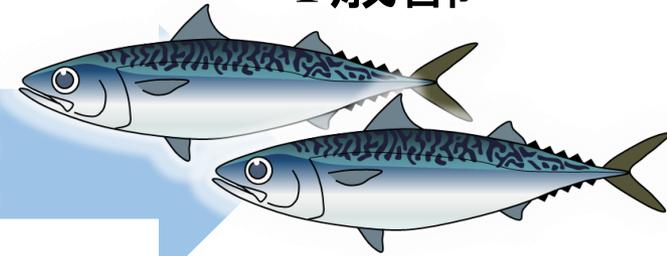
1,341粒

30日齢

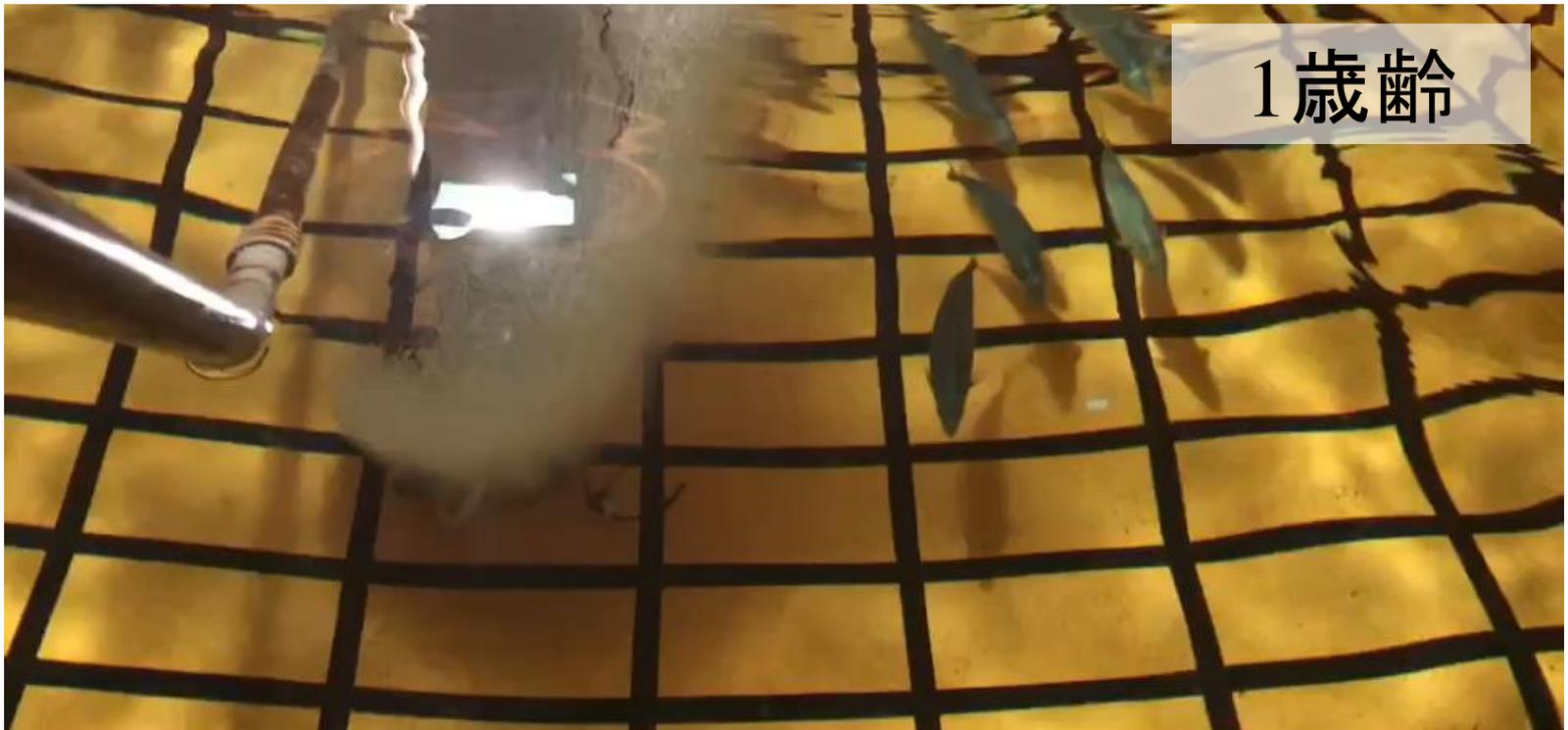


71尾

1歳齢

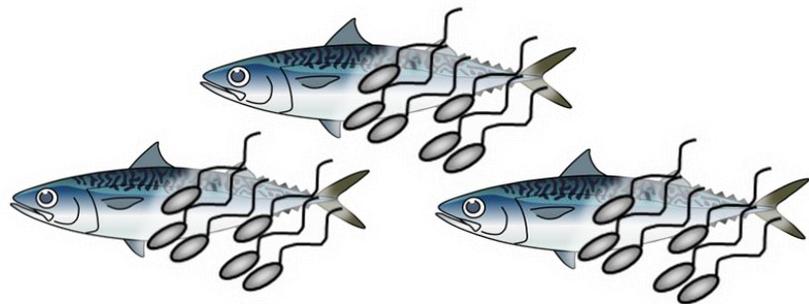


25尾

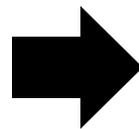


1歳齢の顕微注入個体を25尾生残させる事に成功

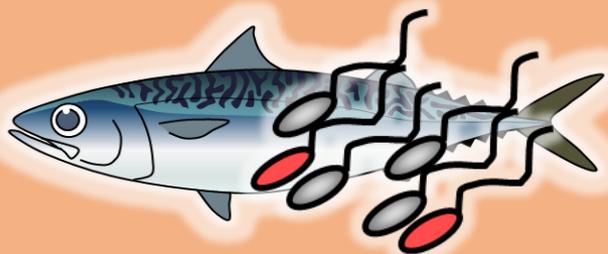
ターゲット遺伝子に変異が導入されていたか？



オス個体から精子を採取

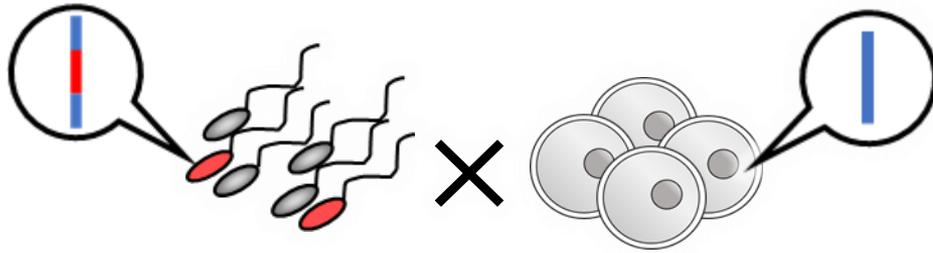


DNA抽出・T7EI解析



8尾中1尾の精子から
ターゲット部位に変異が検出

変異導入された精子によるF1世代の作出



人工授精でF1世代を作出



44,906尾のF1仔魚を作出

ヘテロKO個体から精子を採取

236日齢



精子 PC WT DW M

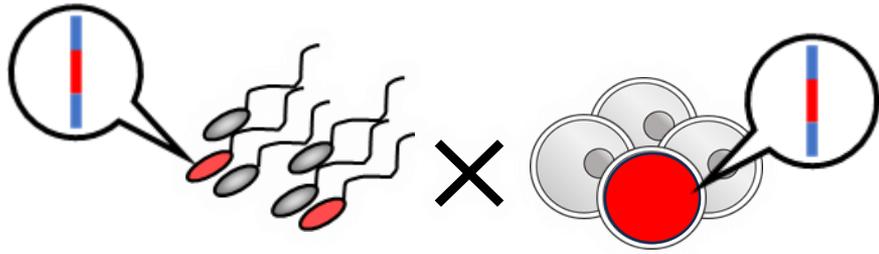


精子の23塩基挿入を確認

運動を確認

20 μ m

ヘテロKOマサバ同士の交配で生まれたF2世代

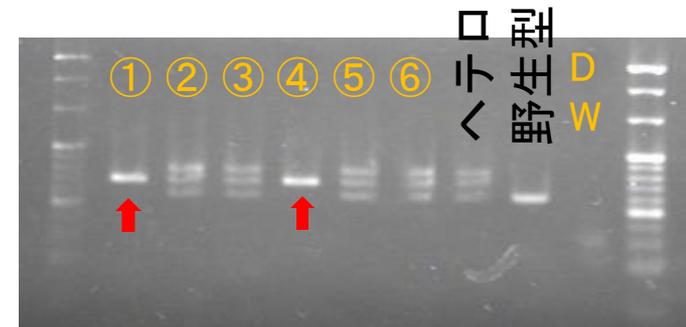
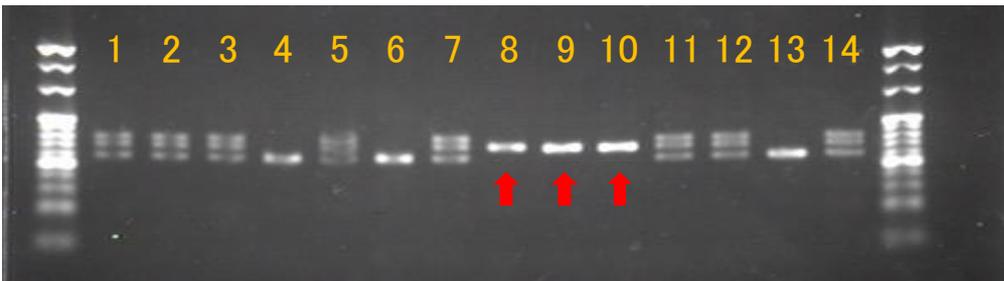
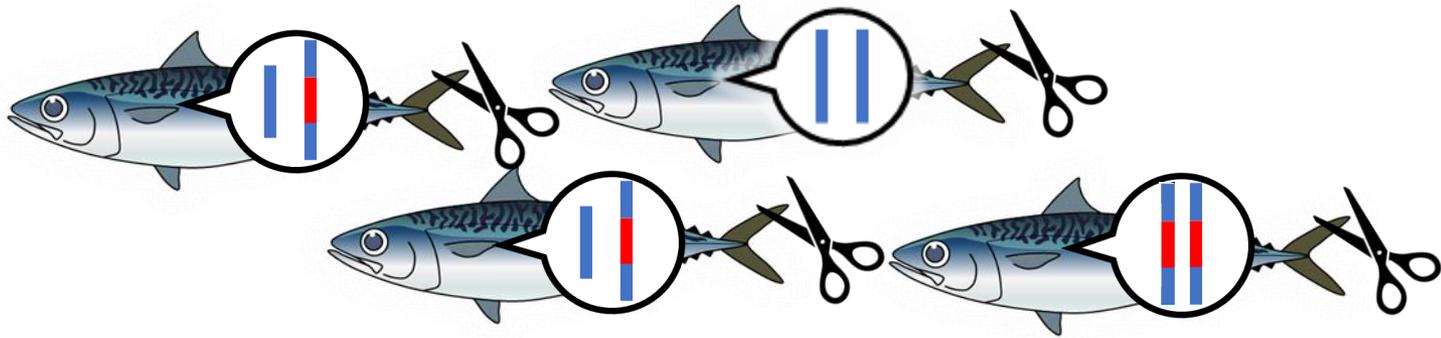


F1同士的人工授精でF2世代を作出



孵化後5カ月齢

ホモKOマサバの特定



野生型：ヘテロ：**ホモ** = 13：26：7

ホモKOマサバの作出に成功・・・不妊か？？？

本研究のまとめと展望

