

## 生殖細胞移植を用いた魚類遺伝子資源保存法の開発

吉崎悟朗\*

### Germ cell transplantation in fish: A novel approach for conservation of genetic resources

Goro YOSHIZAKI

**Abstract** To date, we do not have any cryopreservation method for fish eggs and embryos. Therefore, there is no available system to preserve fish genetic resources other than raising live individuals in captivity. To overcome this obstacle, we recently established a system to cryopreserve trout spermatogonia using slow-freezing method. In order to convert isolated spermatogonia into functional gametes, we established a novel spermatogonial transplantation method. Spermatogonia from male trout were transplanted into the peritoneal cavity of newly hatched sterile triploid salmon. The transplanted trout spermatogonia migrated towards the recipient salmon genital ridges, and were subsequently incorporated into them. In male recipients, transplanted spermatogonia underwent spermatogenesis. Further, in female recipients, transplanted spermatogonia underwent oogenesis. At 2 years after transplantation, sterile salmon recipients only produced donor-derived trout sperm and eggs. By artificial insemination with the sperm and eggs obtained from the triploid salmon recipients, only the donor-derived trout offspring was successfully produced. Thus, the transplanted trout germ cells proliferated and matured normally in a xenogeneic microenvironment. Combined with cryopreservation of spermatogonia, the xeno-transplantation technique would make it possible to preserve fish genetic resources and to revive extinct species using closely related species as a surrogate when necessary.

**Key words :** spermatogonia, primordial germ cell, vasa, endangered species, surrogate broodstock

近年、地球規模での環境破壊と乱獲により、多くの水産生物の資源量が減少し、一部の種では絶滅の危機に瀕しているものも少なくない。サケ科魚類も例外ではなく、北米ではブルトラウト (*Salvelinus confluentus*) やゴールデントラウト (*Oncorhynchus aguabonita whitei*) 等が絶滅危惧種に指定されている。また、種としては十分な数が残されているものの、地域個体群として絶滅が危惧されている集団も少なくない。サケ科魚類、特に陸封された集団は他の河川に分布する集団と遺伝的に交流することがないため、各地域個体群が独自の分化をとげている例も多く見受けられる。わが国のイワナ類も多くの研究者が異なる亜

種に細分化することを提唱しているが、これは各地域の集団ごとに異なった斑紋や色彩変異を有するためである。日本のイワナ類もレッドデータブックに記載されている地域個体群が少なくない。このように日本のイワナ類が減少してしまった理由に、河川環境の悪化が挙げられる。砂防ダムの建設や流域の開発に伴い、イワナの生息環境が悪化していることは間違いないが、それに加えもう一つの大きな問題は、無計画な人口種苗の河川放流である。先に述べたように、多くの陸封型サケ科魚類はそれぞれの河川環境に応じた適応がなされてきたわけであるが、人口種苗をその起源を考慮せずに放流することで、各地域個体群の遺伝子資

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

\* 東京海洋大学 海洋科学部 海洋生物資源学科 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7  
(Tokyo University of Fisheries, 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan)

源が大いに攪乱されている点も見逃せない事実である。

このような現状において、これらサケ科魚類の遺伝子資源の保全は極めて早急に対応すべき重要な課題である。当然、第一に行うべきことは生息環境を修復することであることは間違いのない事実であるが、多くの場合、環境修復には極めて長い時間を要する。特に砂防ダム等の人口建設物が魚類の生息域に存在する場合、その撤去は現実的には不可能であるうえ、水質改善も長期間を要する。このような現状において、絶滅危惧種を守るためにはなんらかのバックアップとなる技術開発が重要である。

### 魚類細胞の凍結保存

絶滅危惧種保全のバックアップ技術としては、卵や精子の凍結保存が、まず第一に挙げられる。しかし、魚類では精子の凍結保存は可能になっているものの、卵の大きさが極めて大きく（凍結保存が可能になっている一部の哺乳動物の卵と比べ、その大きさ（重量）は1000倍以上である）、脂肪分に富むため、その凍結保存技術が全く開発されていない（Chao and Liao, 2001）。精子を凍結保存しておき、これを雄性発生（ $\gamma$ 線照射により遺伝的に不活性化した卵へと凍結精子を受精させ、得られた受精卵の第一卵割を阻害することで2Nの個体を作成する方法）により個体を作成するというアプローチも考えられるが（荒井, 1997）、この場合ミトコンドリアのDNAは卵を提供する魚種に由来することとなり、得られた個体は、核DNAとミトコンドリアDNAが異種に由来する人為雑種となり、これらを自然界へと放流することは望ましくない。また、体細胞を液体窒素中で凍結保存しておき、必要な際に異種の卵へと核移植することにより個体を作成するというアプローチも考えられるが（若松・尾里, 2002）、この場合も雄性発生と同様、細胞質中のミトコンドリアDNAは卵を提供した異種に由来するため、あくまでも核細胞質雑種しか作成することはできない。もうひとつの可能性は胚細胞の凍結保存である（Kusuda, 2004）。これは、初期胚の割球を卵黄から単離して凍結保存し、必要な際に宿主胚に移植することで（宿主の胚の割球と混ぜる）、宿主由来の卵黄を利用して移植細胞と宿主細胞が混在したキメラ個体を作成するという方法である。これらの割球移植は今までに多くの水産上有用種で試みられており、キメラ個体が成熟し、効率的に移植細胞由来の卵や精子を生産する場合は、魚類遺伝子資源保存の有効な方法になると期待される。しかし、絶滅危惧種由来の初期胚の採集は現実的には容易ではなく、本法の応用は人為管理下

での飼育や再生産が可能な魚種に限定される。そこで筆者らは、生殖細胞を凍結保存し、これを宿主個体内で卵や精子にまで成熟させる方法を考案した。

### 始原生殖細胞移植

2004年に筆者らの研究室では、性的に未分化な始原生殖細胞を孵化稚魚から単離し、これを異種宿主へと移植することで、移植した始原生殖細胞を宿主の生殖腺内で機能的な精子へと改変する技法の開発に成功した（図1）（Takeuchi et al., 2004）。このような異種間細胞移植で問題になるのは、宿主による移植細胞の免疫拒絶である。水産上有用種でこのような技術を開発する場合、クローン系統間での移植や、免疫抑制剤の使用は不可能である。そこでこの問題を解決するために、筆者らは免疫系の発生過程に着目した。魚類を含む多くの動物種では、胚形成の後期に免疫に関与する器官の形成が始まる。しかし魚類の場合、孵化時には免疫系の構築が完成しておらず、免疫的に未熟な状態で孵化期を迎えることが知られている（Manning and Nakanishi, 1996）。そこで、この現象を逆手にとって、宿主の免疫系が未熟である孵化前後の稚魚へと異種由来の細胞を移植することを計画した。実際の実験には、始原生殖細胞がGFP遺伝子で蛍光標識されている遺伝子導入ニジマス（ドナー）（Yoshizaki et al., 2000; Takeuchi et al., 2002）、通常ヤマメを宿主に用いた。しかし、この孵化前後の稚魚は全長1～1.5cm程度と小さく、これらの宿主個体の腹腔内に存在する未分化生殖腺に、ドナー細胞を直接マイクロインジェクションすることは不可能であった。そこで、筆者らは動物の生殖腺の発生機構を利用することを考えた。

すべての動物はその発生過程において、生殖腺原基は体細胞のみから構成される。この時期に始原生殖細胞は生殖腺外で分化し、その後生殖腺原基から分泌されるケモカインにより誘引されて移動し、最終的に生殖腺原基に取り込まれる。すなわち生殖腺はこの時期になって初めて、体細胞と生殖細胞の両者をもつ構造を完成させるのである（濱口・四ノ宮, 2000; Yoshizaki et al., 2002）。筆者らは、この生殖腺原基から分泌されるケモカインによる始原生殖細胞の誘引を、移植実験に利用しようと考えた（Takeuchi et al., 2003）。実際に、ドナー個体から単離した始原生殖細胞を孵化稚魚の腹腔内に移植すると、移植された始原生殖細胞は宿主生殖腺に向かって仮足を伸長しながら移動し、最終的にはそこにたどり着き、配偶子形成を開始した。さらに、宿主生殖腺内に取り込まれたドナー由来の始原生殖細胞はそこで機能的な精子にまで

分化することを発見した。すなわちニジマス精子を生産するヤマメ親魚の作出に成功した (Takeuchi et al., 2004)。しかし、この実験ではニジマス由来の卵をヤマメに生産させることはできなかった。そもそも1尾のニジマス孵化稚魚が保持する始原生殖細胞数は100にも満たないため、上記の実験を行うには大量のドナー用の稚魚を解剖する必要があるうえ、宿主あたりに移植できる細胞数も実際は10~20細胞と少なかった。そこで、移植細胞数が少ないことが宿主がドナー由来の卵を生産できない理由ではないかと考え、より大量に入手可能な細胞を移植に用いることを検討した。

### 精原細胞移植

始原生殖細胞は性分化に伴い、雌の卵巣内では卵原細胞へ、雄の精巣内では精原細胞へと分化する。特に雄個体は生涯にわたり極めて多数の精子を生産し続ける。これは精原細胞の中には幹細胞と呼ばれる自己複製能と分化能の両者を兼ね備えた細胞が存在するからと考えられている。筆者らは、この精原細胞、特に幹細胞を移植実験に利用できないかと考えた (Okutsu et al., 2006)。そこで、始原生殖細胞を用いた実験と同様、GFPで蛍光標識を施された精原細胞を性分化後の精巣から調整し、移植実験に供した。始原生殖細胞の実験とは異なり、6ヶ月齢程度の個体1尾から数十万単位の精原細胞が調整可能であるため、この実験では約10000細胞の精原細胞を孵化前後のヤマメ稚魚の腹腔内へと移植した (図2)。その結果、成魚から単離した精原細胞を移植した場合であっても、移植された精原細胞は腹腔内で宿主生殖腺へと向かって移動し、そこに取り込まれコロニーを形成することを見出した。また、移植されたニジマス由来の精原細胞は宿主生殖腺内で宿主ヤマメ自身の精原細胞と同調して増殖、分化し、最終的には機能的な精子にまで分化する

ことを確認した。得られた精液を通常のニジマスから得られた卵に人工授精すると、次世代でニジマス卵とヤマメ精子が受精した雑種に混ざって、完全なニジマスが生まれてきた。これらのニジマスはドナーの遺伝マーカーであるGFP遺伝子を保持していること、さらにはRAPD解析の結果、得られたち魚は完全なニジマスであり、ヤマメゲノムは全く持たないことが確認された。

一方、雌ヤマメ宿主腹腔内へ移植されたニジマス精原細胞も、宿主卵巣内に取り込まれ、そこで増殖、分化を開始した。これらの細胞も宿主ヤマメ自身の卵母細胞と同調して成長し、正常な卵を生産した。得られた卵を通常のニジマス精子と受精した結果、正常なニジマス次世代個体を得ることに成功した。この事実は、成魚の精巣が保持する精原細胞は、精子へと分化することが運命付けられているわけではなく、卵へと分化する能力も併せ持っているということを示している (Okutsu et al., 2006a,b)。また、生殖細胞移植を実用化する際に、孵化前後の稚魚から始原生殖細胞を単離することが不要になり、雄個体が生涯精巣内に持ちつづける精原細胞を用いて卵、精子の両者を生産できるという点は、大きなブレイクするになるものと期待される。特に、最初に述べたように絶滅危惧種の保全に本技術を応用する場合、絶滅危惧種の孵化稚魚を大量にサンプリングすることは困難であるため、この点は大きな利点といえる。このように大きな可能性を秘めた精原細胞移植であるが、雌雄どちらの宿主に精原細胞を移植した場合も、宿主個体はヤマメ自身の配偶子と移植細胞由来のニジマス配偶子の両者を生産する。したがって、これらの宿主個体同士を交配した場合、多くの宿主由来のF1に加え、ドナーと宿主の雑種も生じることとなる。この技術を実用化の際はドナー由来の配偶子のみを生産する宿主の作出が重要である。

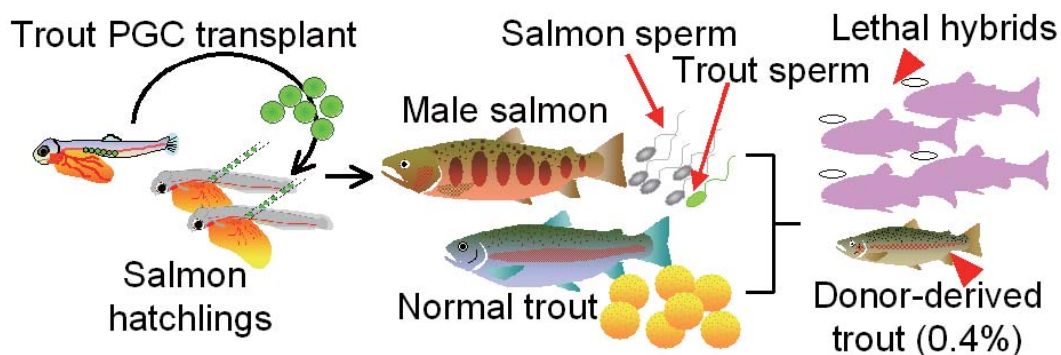


Fig.1. Production of trout-derived sperm from salmon recipient receiving trout primordial germ cells. Normal offspring were obtained by insemination of normal trout eggs with milt obtained from recipient salmon.



Fig.2. Germ cell transplantation into a peritoneal cavity of newly hatched embryo.

#### 異種精原細胞の不妊宿主への移植

ドナー由来の配偶子のみを生産する宿主個体を作成するにあたり重要な点は、宿主自身の配偶子を生産できない個体を移植実験に使用することである。そこで、筆者らは3倍体個体を宿主に利用することを検討した。ヤマメの場合、受精卵を受精から15分後に27℃の温水に15分間浸すだけで、高率で3倍体を作成することが可能である。そこで、得られた3倍体宿主にニジマス精原細胞の移植を行った (Okutsu et al., 2007)。移植後の宿主個体を2~3年間継続飼育した結果、雌雄ともに成熟個体を得ることに成功した。なお、筆者らの飼育条件下では、通常の3倍体個体は雌雄ともに全く成熟は認められなかった。これらの3倍体ヤマメ宿主から得られた卵、精子を人工授精した結

果、得られたF1世代のすべての個体が完全なニジマスであった。これらの個体はドナーのマーカーであるGFP遺伝子を保持していたうえ、核ゲノム、ミトコンドリアゲノムの両者が完全にニジマス由来であることも証明された (図3)。

従来、3倍体の不妊の理由は、減数分裂の進行不全といわれてきたが、3倍体個体の生殖腺体細胞が正常な機能を有するか、あるいは3倍体個体の繁殖内分泌系が正常に機能するか、といった点については明瞭な答えが得られていなかった。今回の研究で3倍体の宿主に正常な2倍体の生殖細胞を移植することで機能的な配偶子が得られたことから、3倍体個体の生殖腺体細胞や生殖内分泌系は正常に機能することが明らかとなった。

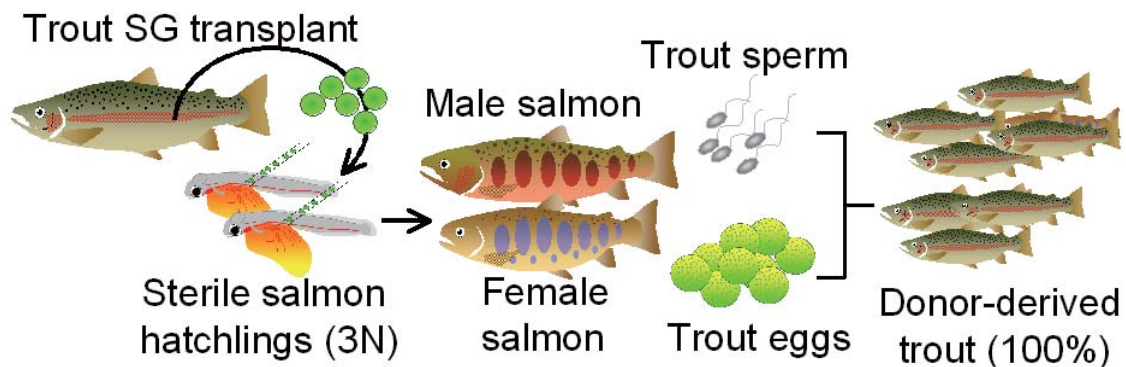


Fig.3. Production of trout offspring from triploid salmon parents receiving trout spermatogonia. Triploid salmon recovered fertility by transplantation of diploid trout spermatogonia and produced either eggs or sperm.

## 精原細胞の凍結保存

以上のように精原細胞さえあれば、近縁種への移植を介して機能的な卵や精子を生産できることが明らかとなった。たとえば、人為管理下では成熟させ難い種や、雄個体しか採捕できない場合に、当該絶滅危惧種の精原細胞を、飼育が容易で成熟までに要する期間が比較的短い宿主に移植すれば、絶滅危惧種の卵と精子を容易にかつ短期間で得ることが可能になる。しかし、先にも述べたように、この細胞移植技術を生殖細胞の凍結保存技術と組み合わせることで、これらの絶滅危惧魚種の遺伝子資源の保存が極めて現実的になると期待される (Yoshizaki et al., 2003; Okutsu et al, 2006b) (図 4)。上述のように魚類の場合は卵の凍結保存が不可能なため、従来、凍結細胞から個体を作成する技術は皆無であった (卵の凍結保存の成功例は数例報告されているが、他のグループによる追試が全くできていない。最近、これらの凍結方法では解凍後に生きた卵を全く得ることができないという論文まで発表されている)。

そこで、筆者らはニジマスの精原細胞を凍結保存する実験を行った。その結果、細胞を解離した状態で凍結保存を行った場合、プロピレングリコールを含む凍

結保存液中で  $-80^{\circ}\text{C}$  まで  $-1^{\circ}\text{C}/\text{分}$  で冷却し、その後、液体窒素中に保存するというプロトコールが適当であることが明らかになった (Kanno and Yoshizaki, 未発表データ)。またこの方法で凍結保存した精原細胞を解凍後、上述の方法で移植をすると、凍結後の細胞であっても宿主生殖腺に取り込まれ、そこで機能的な卵や精子にまで分化可能であることを確認した。実際に凍結精原細胞を3倍体宿主へと移植することで、凍結細胞由来の卵のみを生産する宿主個体の作出にも成功している。ところが、この方法で絶滅危惧種の精原細胞を凍結するとなると、サンプリング直後の精巣を酵素処理により解離する必要が生じる。この場合、特殊な実験機器が必要なため、実験場所が限定されるということが危惧された。そこで、筆者らは、個体から単離した精巣をそのままの状態 (解離せずに) 凍結した場合でも、高生残率で精原細胞を凍結保存できる方法を開発した (Iwasaki & Yoshizaki 未発表データ)。この方法であれば、超低温庫さえあれば、どのような施設においても精原細胞の凍結保存が可能である。凍結した精巣は、ドライシッパーにより施設が整った研究室に輸送後、細胞解離、移植操作を行うことが可能である。

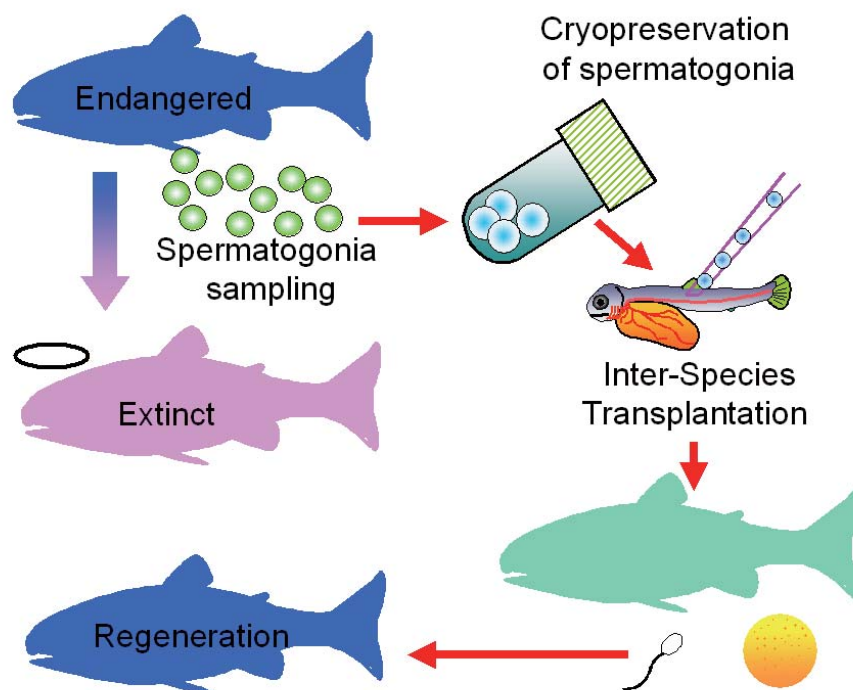


Fig.4. Strategy to regenerate extinct species by cryopreservation of spermatogonia and their transplantation.

### 絶滅危惧サケ・マス類保護に向けた応用

以上のように、精原細胞凍結、解凍後の細胞の移植、という2つの実験系を融合させることで、再現性よく凍結細胞から機能的な卵を生産することが可能になった。詳細は省略するが、移植技術が構築された現在、もはやGFP遺伝子で蛍光標識した精原細胞を実験に用いることが不要になっており、上述の方法を実際に絶滅危惧種へと適応することが可能になった。凍結細胞からの機能的な卵の生産は世界で初めての例であり、今後この方法が世界各地の希少なサケ・マス類の遺伝子資源の保存に貢献することが期待される。筆者らは既に米国海洋大気局とアイダホ大学との共同で、アイダホ州のRedfish lakeで産卵するベニザケ集団の保全プロジェクトを開始している。このベニザケの産卵場は河口から約1500km、標高2000mの位置にあり、ベニザケは産卵にいたるまでの間、激流に逆らって非常に長い距離を遡上する必要がある。このベニザケ集団は、かつては湖の語源 (Redfish) になるほど大量に遡上していたが、近年その遡上個体数が激減し、2006年は3尾、2007年は4尾の遡上しか確認されていない。既にこれらの個体の精原細胞を液体窒素内で保存しており、将来万が一この集団が絶滅した場合には、代理の親魚を用いることで凍結細胞から集団を復活させることが考えられている。種あるいは集団を健全に保全していくためには、個体数がここまで減少してしまう前、すなわち十分な多様性が残されている間に精原細胞を凍結することが重要である。筆者らは、世界各地のサケ・マス類がRedfish lakeのベニザケのようにならないためにも、早いうちに精原細胞のサンプリングを行い、これらを液体窒素内で凍結保存する、いわゆるサケ・マス類の精原細胞バンクを構築したいと考えている。

### おわりに

本総説で紹介した技術は、まずサケ・マス類を材料に開発された技術であるが、現在、これを海産魚へ応用しようと検討中である。海産魚の仔稚魚はサケ科魚類と比較すると極端に小型であるため、細胞をマイクロインジェクション法で移植できるかが疑問視されていたが、筆者らの研究グループは既にこの問題を解決し、同様の方法で海産魚の仔稚魚へと精原細胞を移植可能であることを確認している。このような技術が海産魚で構築できれば、クロマグロのように親魚が巨大で飼育に多大な労力、コスト、スペースが必要な魚種の精原細胞を、マサバのような小型宿主に移植するこ

とで、クロマグロの配偶子を生産するマサバ宿主の生産も可能になることが期待される。

### 引用文献

- Chao N. H., and Liao I. C., 2001: Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197, 161-189.
- 濱口 哲・四宮 愛, 蛋白質核酸酵素, 45, 2690-2698 (2000)
- Kusuda S., 2004: Current status and perspective of cryopreservation of sperm and blastomeres in fish. *Fish Genetics and Breeding Science*, 34, 1-25.
- Manning M. J. and Nakanishi T., 1996: The specific immune system: cellular defences, in "The fish immune system" (ed. by Iwama G and Nakanishi T.), Academic Press, New York, pp.159-205.
- Okutsu T., Suzuki K., Takeuchi Y., Takeuchi T., and Yoshizaki G., 2006a: Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 2725-2729.
- Okutsu T., Yano A., Nagasawa K., Shikina S., Kobayashi T., Takeuchi Y., and Yoshizaki G., 2006b: Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation. *J. Reprod. Dev.*, 52, 685-693.
- Okutsu T., Shikina S., Kanno M., Takeuchi Y., and Yoshizaki G., 2007: Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317, 1517.
- Takeuchi Y., Yoshizaki G., Kobayashi T., and Takeuchi T., 2002: Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol. Reprod.*, 67, 1087-1092.
- Takeuchi Y., Yoshizaki G., and Takeuchi T., 2003: Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.*, 69, 1142-1149.
- Takeuchi Y., Yoshizaki G., and Takeuchi T., 2004: Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430, 629-630.
- 若松裕子・尾里健二郎, 2002: 魚類のクローニング. *海洋と生物*, 139, 120-125.
- Yoshizaki G., Takeuchi Y., Kobayashi T., Ihara S., and Takeuchi T. 2002: Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.*, 26, 3-12.

- Yoshizaki G., Takeuchi Y., Kobayashi T., and Takeuchi T., 2003: Primordial germ cells: A novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 453-457.
- Yoshizaki G., Takeuchi Y., Sakatani S., and Takeuchi T., 2000: Germ-cell specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int. J. Dev. Biol.*, 44, 323-326.