

研究課題別評価

1. 研究課題名: 培養系での魚類始原生殖細胞からの個体創生技術の確立

2. 研究者氏名: 吉崎悟朗

3. 研究の狙い:

in vitro で培養している細胞から個体を作出できれば、あらゆる遺伝子改変技術・細胞工学的技術を個体レベルで利用することが可能になるうえ、細胞が個体を形成するために必要な能力を解明していくための強力な実験系になることが期待される。そこで、個体に改変するための培養細胞の材料として、将来、配偶子に分化することが既に決定付けられた生殖細胞系列の前駆細胞に着目した。本研究ではこのニジマスから単離した生殖細胞を用い、その *in vitro* での培養方法の開発とともに、単離したドナー由来の生殖細胞を効率的に宿主個体に移植し、宿主生殖腺内で機能的な配偶子にまで改変する技術の開発・改良を目指した。

4. 研究成果

種々の成熟段階のニジマスから生殖細胞を単離し、これを孵化直後の稚魚の腹腔内に移植した結果、性的に未分化な始原生殖細胞のみならず、性分化が完了した精巣内に存在する精原細胞を移植した場合でも、ドナー細胞は宿主の生殖腺に取り込まれ、そこで増殖、分化することを見出した。さらに雄宿主に移植した精原細胞は宿主の精巣内で機能的な精子に分化すること、およびこれらドナー由来の精原細胞は複数の産卵期にわたり大量の精子を供給し続けることが確認された。このことは魚類精巣内にも生殖幹細胞集団が存在することを示唆している。一方、雌宿主に移植した精原細胞は、宿主自身の生殖細胞の成熟と完全に同調しながら、機能的な卵にまで分化し、正常な次世代個体を生産することが可能であった。これらの結果から、成体の精巣内に存在する生殖細胞(精原幹細胞と予想される集団)は未分化生殖腺体細胞に取り囲まれることで始原生殖細胞と同様に振舞い、性的両能性も獲得することが示唆された。

ドナーに由来する次世代個体の効率の良い選抜法を開発する過程で、始原生殖細胞の異種間移植が可能であることを明らかにした。すなわち、*in vitro* に単離した生殖細胞から個体を作製する際、上記のように宿主への細胞移植を施す必要が生じるが、宿主個体はドナー由来の配偶子に加え、宿主自身の配偶子も生産する。そこで、この両者に由来する次世代個体を簡便に判別する方法が必要となる。そこで生殖細胞の異種間移植に着目した。ヤマメの孵化稚魚にニジマスの始原生殖細胞を移植した結果、ニジマス細胞はヤマメ宿主に拒絶されることなく生殖腺に取り込まれ、増殖、分化した後、機能的な卵や精子が生産されることを明らかにした。さらに、これらの配偶子を通常のニジマスから得られた配偶子と受精させた結果、正常な次世代個体を作出することが可能であった。この際、宿主ヤマメは、ドナーニジマスに由来する配偶子と宿主ヤマメ自身の配偶子の両者を生産するが、これらをニジマス配偶子と受精させることで、宿主ヤマメ由来の配偶子がニジマス配偶子と受精した場合は致死性雑種となり、生残性の個体を選別するだけで効率良くドナー由来個体の同定が可能であった。

さらに、上記の精原細胞の培養条件の至適化を行った。GDNF、bFGF、プロゲステロン、エストラジオール 17 β 、およびニジマス 20 日胚の抽出液にこれら精原細胞の増殖促進活性が認められた。また、ニジマス顆粒膜細胞およびセルトリ細胞で特異的に発現している新規の TGF- β スーパーファミリーメンバーである *rtgr-1* も精原細胞の増殖を顕著に促進した。さらに、上記の増殖因子を加えた培地で 1 ヶ月間培養した細胞をニジマス孵化稚魚へ移植したところ、これらの細胞は宿主生殖腺内でコロニーを形成する能力を保持していることを確認した。

上記の始原生殖細胞や精原細胞の移植技術は、in vitro 培養系と組み合わせることで、マウスの ES 細胞を駆使した遺伝子ターゲティング実験と同様の遺伝子機能解析系に利用できることと期待される。さらに、これら生殖細胞の凍結保存により、魚類の遺伝子資源を半永久的に保存することが可能になるばかりでなく(魚卵や胚は凍結保存が不可能であるため、遺伝子資源の安全な保存策が無い)、サバのような小型魚種にマグロのような大型魚の配偶子を生産させることで、魚類種苗の生産技術を簡略化することも可能になるであろう。

5. 自己評価

当初の目標として掲げていた始原生殖細胞の in vitro 培養技術には、材料となる細胞を健康な状態で大量に調整する方法を見出すことができず、大きな進展が見られなかった。一方、移植技術の改良の過程で精巣内に大量に存在する精原細胞が、宿主へ移植後、始原生殖細胞と同様の挙動を示すことを見出すことができたため、調整が容易な本細胞を用いてほとんどの実験を行った。現段階では株化細胞の樹立には至っていないが、基本的な培養条件や種々の成長因子の効果は明らかになっており、今後継続的に研究を行うことで、精原細胞の株化が近い将来可能になると期待される。

6. 研究総括の見解

水産資源の維持と食料としての魚類の有効かつ持続的な養殖技術の確立を目標とした、きわめて独創的かつチャレンジングな基礎研究である。

非常にユニークな方法論によって、魚類個体の始原生殖細胞や精原細胞を異種魚類の宿主に移植し、そのドナー由来の精子または卵を得て個体にまで成育する系を確立し、それによって目覚ましい成果を収めた。当初の目的のひとつである始原生殖細胞を株化するまでには至らなかったが、始原生殖細胞のガラス器内培養系を確立しつつあり、近い将来の成果が十分期待できる。総合的には、応用面の研究も精力的に手掛けつつあり、当初の研究目的を超える成果を収めるとともに、新しい研究を展開しつつあり、高レベルのさきがけ的研究であると評価できる。

7. 主な論文

- Okutsu, T. Suzuki, K. Takeuchi, Y. Takeuchi, T. and Yoshizaki, G. (2005) Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs. (submitted)
- Yoshizaki, G. Tago, Y. Takeuchi, Y. Sawatari, E. Kobayashi, T. and Takeuchi, T. (2005) GFP-labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biology of Reproduction*. 73:88-93.
- Takeuchi, T. Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004) Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430:629-630.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004) Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development*, 67:91-100.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2003) Primordial germ cell; a novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 453-457.
- Boonanuntasarn S, Yoshizaki G, Takeuchi T. (2003) Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*. 310:1089-1095.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003) Generation of live fry from intra-peritoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of*

Reproduction, 69:1142-1149.

招待講演

- ・ 7th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2003/5/18-5/23, Mie Japan, “Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering”
- ・ 3rd International Congress on Embryo Biotechnology, 2003/10/29-10/30, Seoul Korea, “Germ cell transplantation in fish: can salmon make trout?”
- ・ 37th Annual meeting of Society for the Study of Reproduction, 2004/7/31-8/3, Vancouver, Canada, “Transplantation of primordial germ cells in fish: Can salmon make trout?”
- ・ 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004/8/8-8/12, Port Seguro, Brazil, “Germ cell transplants in fish”
- ・ 放射線医学総合研究所第5回シンポジウム：放射線影響研究および被爆治療のキープレーヤー：幹細胞, 2005/12/1-2, 千葉, “生殖細胞移植実験が明らかにした魚類生殖幹細胞の可塑性”

受賞

- ・ 平成17年4月20日 文部科学大臣表彰 若手科学者賞「始原生殖細胞を用いた新たな魚類発生工学技術の研究」文部科学省
- ・ 平成17年5月29日 マリンバイオテクノロジー学会賞岡見賞「魚類生殖細胞を利用した新たな発生工学技術の開発」(社)マリンバイオテクノロジー学会
- ・ 平成18年2月2日 若手農林水産研究者賞「生殖細胞の異種間移植を利用した魚類養殖法に関する研究」農林水産省
- ・

取材

- ・ ニジマスの生殖細胞を移植した宿主ヤマメがニジマス精子を生産した研究について 2005/7/30, 朝日新聞、読売新聞、毎日新聞、共同通信、時事通信、東京中日新聞、産経新聞、日刊工業新聞、日経 BP