

|      |       |
|------|-------|
| 課題番号 | GS010 |
|------|-------|

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

|                |                                       |
|----------------|---------------------------------------|
| 研究課題名          | 異種間精原細胞移植を用いた大型食用海産魚種苗生産の低エネルギー化技術の開発 |
| 研究機関・<br>部局・職名 | 国立大学法人東京海洋大学<br>先端科学技術研究センター・准教授      |
| 氏名             | 竹内 裕                                  |

1. 当該年度の研究目的

本研究では、宿主(小型海産魚)の生殖腺体細胞に含まれた異種(大型海産魚)由来ドナー精原細胞が、配偶子形成を開始し、正常な配偶子へと分化するためには、どのような条件が必要となるのか?を明らかにすることで、精原細胞移植によるドナー由来配偶子生産技術(代理親魚技術)の完成を目指す。

具体的には、1)生理学的条件(遺伝的距離、および、配偶子形成過程での体内温度環境)を戦略的に組み合わせた宿主とドナー間での移植実験を行う、2)三倍体(不妊化)宿主を用いることで、ドナー精原細胞に対して宿主生殖腺内での細胞学的ニッチを与える、の2点に着目し、それぞれを単独および同時に行った場合に、ドナー由来の配偶子形成過程がどのように進行するかを解析する。実験には、世界的に重要な養殖対象海産魚であるニベ科およびアジ科魚類を用いる。宿主は、全長 10 cm 体重 100g(6ヶ月齢程度)で成熟に至る小型で陸上水槽飼育が容易なニベ(ニベ科ニベ属)を用いる。

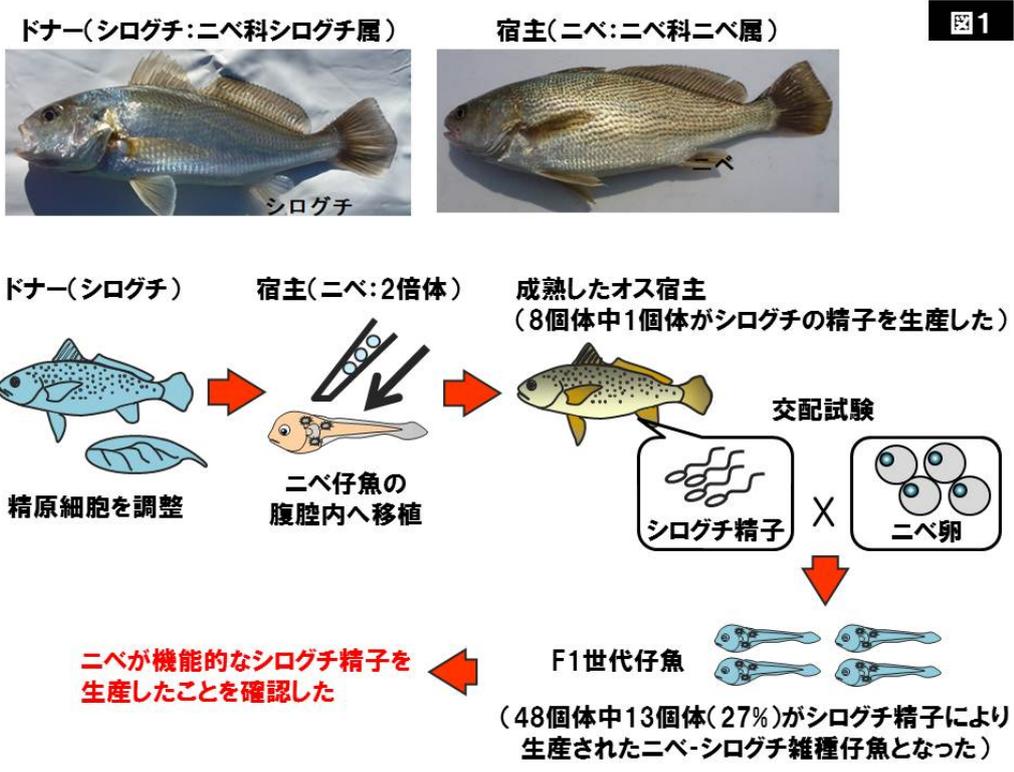
昨年度までの研究において、ニベを用いた同種間での精原細胞移植(ドナーにはGFP遺伝子導入ニベを用いた)により、宿主ニベにドナー由来の卵および精子を生産させることに成功した。さらに、同種間移植においても、ドナー由来の配偶子を高効率に生産するためには、宿主の三倍体化による不妊化が有効であることを明らかにした。これまでに、異種ドナー5種のうちオオニベ、ブリ、カンパチの精原細胞を三倍体ニベ宿主へ移植する実験を修了しており、現在、それら宿主魚を成熟させるための飼育試験を継続している。残りの異種ドナー候補2種のうちロウニンアジは、幼魚の確保および精原細胞の分離方法の最適化を行っている。レッドドラムについては、平成24年度に台湾の養魚場において精巢のサンプリングを行う準備を進めている。各魚種の移植後精原細胞の追跡の際のツールとして用いる分子マーカー遺伝子の単離についても終了している。

平成24年度は、引き続き異種ドナー魚種の宿主ニベへの精原細胞移植を継続し、宿主生殖腺内におけるドナー精原細胞の増殖および分化について調査する。さらに、性成熟に達した代理親ニベから配偶子を採取し、ドナー種由来の配偶子が生産されているかをDNA解析により調査する。最後に、ドナー由来の卵および精子を生産する雌雄各々の代理親ニベを交配することで、ドナー由来種苗の生産を試みる。以上の実験により、異種間精原細胞移植により、「ドナー由来の精子と卵を生産する雌雄各々の代理親ニベ」を作出する。

2. 研究の実施状況

これまでの研究では、宿主として用いるニベに対して、近縁種のニベ科魚類から1種(オオニベ)、遺伝的に離れたアジ科魚類から2種(ブリ、カンパチ)をドナーとして実験を行ってきた。これらのいずれのドナー魚種を用いた場合でも、移植後1か月後では宿主生殖腺内へのドナー精原細胞の生着が高い割合で確認された。しかしながら、その後(少なくとも6か月以内)の配偶子形成過程において、ドナー由来生殖細胞はほとんどが消失し(RT-PCR 解析)、ニベ宿主による異種ドナー由来配偶子の生産には成功していない。また、これまでのところ、三倍体処理により不妊化したニベを宿主に用いた場合でも、異種ドナー由来配偶子の生産には至っていない。そこで、平成24年度には、現時点での最大の課題である「ニベ宿主による異種ドナー由来配偶子の生産」を達成するため2つの研究に着手した。1つは、ニベ科魚類の中から新たなドナー候補魚を選定し移植実験を用いること、もう1つは、三倍体化以外の新たな宿主の不妊化技術の開発と不妊魚の宿主としての利用である。これらの研究過程で、平成24年度には、大別して下記の4つの研究成果が得られた。

- (1) 同科異属間での精原細胞移植により、ドナー(シログチ)由来の異種精子を生産するニベの作出に成功した(図1)。
- (2) ニベの同種間移植では、ドナー由来配偶子の生産効率(ドナー由来配偶子を生産した宿主魚の割合、および、F1 世代中に出現するドナー由来子孫の出現率)は、三倍体宿主を用いた場合に飛躍的に高まることを明らかにした。
- (3) ニベ(ニベ科ニベ属)とシログチ(ニベ科シログチ属)を交雑して得られた F1(ニベ-シログチ)雑種は、自身の生殖細胞(内在性生殖細胞)を欠失した不妊魚となることを発見した。
- (4) ニベシロ不妊雑種を宿主として用いた場合、その宿主生殖腺内では、ドナー(ニベ)由来の生殖細胞が増殖・分化し、機能的なドナー由来配偶子が生産されることを発見した。この結果は、ニベシロ不妊雑種がドナー配偶子の生産を目的とした宿主魚として利用可能であることを示している。



3. 研究発表等

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <p>雑誌論文</p> <p>計 3 件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <p>Biological characteristics of fish germ cells and their application to developmental biotechnology.<br/>Yoshizaki G, Okutsu T, Morita T, Terasawa M, Yazawa R, <b>Takeuchi Y</b>.<br/>Reprod Domest Anim. 2012 Aug;47 Suppl 4:187-92.</p> <p>Gonadal development and fertility of triploid grass puffer Takifugu niphobles induced by cold shock treatment.<br/>Hamasaki M, <b>Takeuchi Y</b>, Miyaki K, Yoshizaki G.<br/>Mar Biotechnol (NY). 2012 Apr;15(2):133-44.</p> <p>Characterization of lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) as a potential cell-surface marker on spermatogonia in Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis.<br/>K. Nagasawa, M. Miwa, R. Yazawa, T. Morita, <b>Y. Takeuchi</b>, G. Yoshizaki.<br/>Fish. Sci. 2012. 78, 791-800.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>  |
| <p>会議発表</p> <p>計 9 件</p> | <p>専門家向け 計 9 件</p> <p>Modification of fatty acid metabolic pathway by transgenesis in the nibe croaker (Nibea mitsukurii).<br/>Naoki Kabeya; <b>Yutaka Takeuchi</b>; Yoji Yamamoto; Ryosuke Yazawa; Yutaka Haga; Shuichi Satoh; Goro Yoshizaki.<br/>XV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Molde, Norway. 4-7/June/2012.</p> <p>Preservation of bluefin tuna germ cells by vitrification of whole testis.<br/>S. Seki, R. Yazawa, Y. Iwasaki, T. Morita, <b>Y. Takeuchi</b>, G. Yoshizaki.<br/>The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. Kochi 2012, July 13-16.</p> <p>養殖対象海産魚種を用いた精原細胞異種間移植技術(代理親魚技術)の開発<br/><b>竹内 裕</b><br/>平成 24 年度日本水産学会北海道支部大会若手の会記念講演会、網走、2012 年 12 月 15 日</p> <p>東京湾における大型アナゴ類の資源生態 II.性比と成熟<br/>下村友季子・本村大地・<b>竹内 裕</b>・片山知史・秋山清二<br/>平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26-30 日</p> <p>脂肪酸代謝酵素遺伝子導入ニベの作出- 2.各組織における外来遺伝子の発現と脂肪酸組成<br/>壁谷尚樹・<b>竹内 裕</b>・矢澤良輔・芳賀 穰・佐藤秀一・吉崎悟朗<br/>平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26-30 日</p> <p>黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ(LHRHa)の経口投与によるゴマサバの産卵誘発<br/>高橋孝太郎・佐藤健太・矢澤良輔・<b>竹内 裕</b>・森田哲朗・吉崎悟朗<br/>平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26-30 日</p> <p>海産魚における代理親魚技術の開発:三倍体宿主を用いたドナー由来次世代の高効率生産<br/>吉川廣幸・<b>竹内 裕</b>・井野靖子・岩田 岳・壁谷尚樹・矢澤良輔・吉崎悟朗<br/>平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26-30 日</p> <p>人為交雑によるニベ科不稔性雑種の探索と雑種宿主の代理親魚技術への利用<br/>吉川廣幸・井野靖子・町田有里・矢澤良輔・<b>竹内 裕</b><br/>平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26-30 日</p> |

様式19 別紙1

|  |   |
|--|---|
|  | <p>半閉鎖循環型 10 m3 水槽を用いたスマの継続的な産卵誘発<br/>         矢澤良輔・竹内 裕・佐藤健太・町田有里・高橋孝太郎・吉崎悟朗<br/>         平成 25 年度日本水産学会春季大会、東京、2013 年 3 月 26－30 日</p> <p>一般向け 計 0 件</p>   |
| <p>図 書</p> <p>計 0 件</p>                                      |   |
| <p>産業財産権<br/>         出願・取得状<br/>         況</p> <p>計 0 件</p> | <p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>  |
| <p>Webページ<br/>         (URL)</p>                             | <p>東京海洋大学 先端科学技術研究センター 竹内研究室Webサイト<br/> <a href="http://www.kaiyodai.ac.jp/sentanken/takeuchi/takeuchi.html">http://www.kaiyodai.ac.jp/sentanken/takeuchi/takeuchi.html</a><br/>         東京海洋大学 竹内研究室@館山ステーション 新着情報(ブログ)<br/> <a href="http://d.hatena.ne.jp/yutakat1975/">http://d.hatena.ne.jp/yutakat1975/</a></p>   |
| <p>国民との科<br/>         学・技術対話<br/>         の実施状況</p>          | <p>1) 埼玉県立熊谷西高校理数科校外実習における講義および施設案内、生徒 40 名:教員 3 名 (2012 年 8 月)</p> <p>2) 第 31 回「海とさかな」自由研究・作品コンクール体験学習ツアー(朝日新聞社主催)、小学 4～6 年生 30 名:引率 10 名(2012 年 8 月 10 日)</p> <p>3) 新宿区小中学校合同宿泊研修会における講義、学校教員 20 名(2012 年 8 月 21 日)</p> <p>4) ひらめき☆ときめきサイエンス「サバにマグロを産ませる～魚の代理親(だいいりおや)技術～」、小学 5～6 年生 30 名(2012 年 8 月 29 日)</p> <p>5) コアSSH「長崎SSH科学プロジェクト」研修会、「最新の海産魚の種苗生産技術について学ぶ」講義および実習、長崎県立長崎鶴洋高等学校生徒 3 名:教員 1 名(2013 年 1 月 12～13 日)</p> |
| <p>新聞・一般雑<br/>         誌等掲載<br/>         計 1 件</p>           | <p>房日新聞 2013 年 2 月 13 日「サバにマグロを産ませる・細胞移植による代理親技術の研究進む」</p>  |
| <p>その他</p>   |   |

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

|      | ①交付決定額      | ②既受領額<br>(前年度迄の<br>累計) | ③当該年度受<br>領額 | ④(=①-②-<br>③)未受領額 | 既返還額(前<br>年度迄の累<br>計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 113,000,000 | 69,800,000             | 24,720,000   | 18,480,000        | 0                     |
| 間接経費 | 33,900,000  | 20,940,000             | 7,416,000    | 5,544,000         | 0                     |
| 合計   | 146,900,000 | 90,740,000             | 32,136,000   | 24,024,000        | 0                     |

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

|      | ①前年度未執<br>行額 | ②当該年度受<br>領額 | ③当該年度受<br>取利息等額<br>(未収利息を除<br>く) | ④(=①+②+<br>③)当該年度<br>合計収入 | ⑤当該年度執<br>行額 | ⑥(=④-⑤)<br>当該年度未執<br>行額 | 当該年度返還<br>額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 430,392      | 24,720,000   |                                  | 25,150,392                | 24,526,525   | 623,867                 |             |
| 間接経費 | 450,774      | 7,416,000    |                                  | 7,866,774                 | 7,866,774    | 0                       |             |
| 合計   | 881,166      | 32,136,000   | 0                                | 33,017,166                | 32,393,299   | 623,867                 | 0           |

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

|         | 金額         | 備考                            |
|---------|------------|-------------------------------|
| 物品費     | 8,988,251  | 海産魚類用飼育水槽、海水冷却装置、実験試薬等        |
| 旅費      | 881,613    | 研究調査(和歌山県、オーストラリア、台湾)、海外研究者招聘 |
| 謝金・人件費等 | 13,064,278 | 博士研究員人件費、生物飼育員人件費             |
| その他     | 1,592,383  | 塩基配列解析委託費、機器修理費等、水槽移動作業費      |
| 直接経費計   | 24,526,525 |                               |
| 間接経費計   | 7,866,774  |                               |
| 合計      | 32,393,299 |                               |

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名               | 仕様・型・性能<br>等                                     | 数量 | 単価<br>(単位:円) | 金額<br>(単位:円) | 納入<br>年月日 | 設置研究機関<br>名 |
|-------------------|--|----|--------------|--------------|-----------|-------------|
| 超軽量パーソナル<br>分光光度計 | NanoDrop Lite<br>プリンター無                          | 1  | 869,400      | 869,400      | 24.4.18   | 東京海洋大学      |
| 投げ込み式冷却装<br>置     | イワキ製<br>500HPS-M サー<br>モスタットTC-201<br>付 電源線長 30m | 1  | 885,150      | 885,150      | 24.6.1    | 東京海洋大学      |
|                   |  |    |              | 0            |           |             |