

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25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・ 部局・職名	国立大学法人東京海洋大学 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

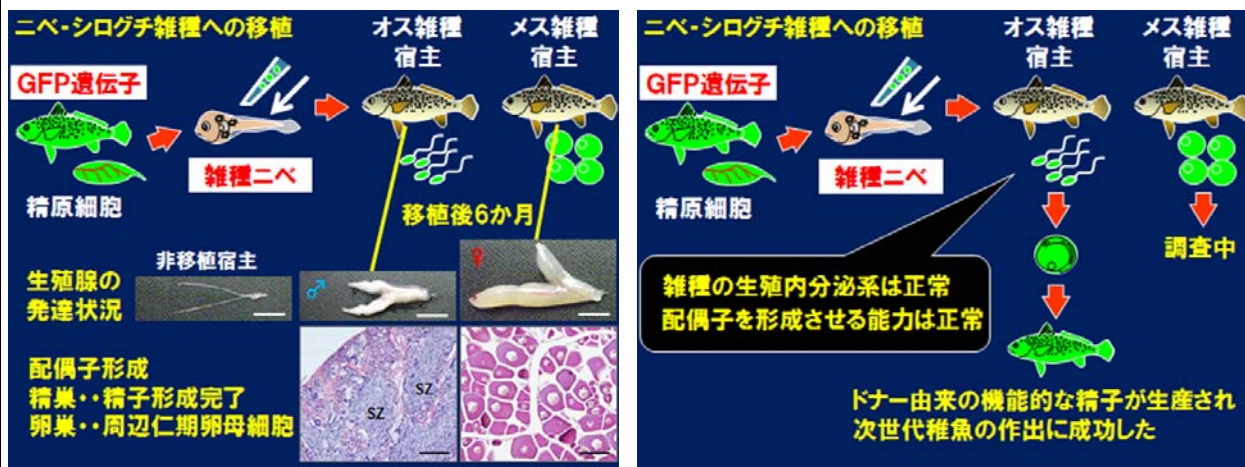
<p>サケ科魚類において独自に開発した魚類精原細胞の移植手法を応用し、海産魚での代理親技術(魚の借腹)の開発を行う。本技術がサケ科魚類より遥かに小型の卵を産み、多様な種を擁するスズキ目海産魚でも利用可能であることを証明し、代理親技術を利用した養殖対象魚種の種苗生産法の開発を目指す。</p> <p>本研究では、宿主の生殖腺体細胞に内包された異種由来ドナー精原細胞が、配偶子形成を開始し、正常な配偶子へと分化するためには、どのような条件が必要かを明らかにすることで、海産魚における異種間精原細胞移植によるドナー由来配偶子生産技術(代理親魚技術)の完成を目指した。実験には、世界的に重要な養殖対象海産魚であるニベ科およびアジ科魚類を用いた。宿主として、全長10cm体重100g(6ヶ月齢)で成熟に至る小型かつ水槽飼育が容易なニベ(ニベ科ニベ属)を選定した。昨年度までの研究において、ニベ宿主(ニベ科ニベ属)のオスが、シログチ精子(ニベ科シログチ属)を生産することを確認し、<u>「海産魚における異種間精原細胞移植によるドナー由来配偶子生産」が可能であることを証明した。</u></p> <p>しかし、3倍体不稔化宿主(ニベ)を用いた場合では、異種ドナー(シログチ、オオニベ、ブリ、カンパチ)精原細胞由来の配偶子生産は確認されなかった。また、これらの異種ドナー精原細胞は、一旦、宿主生殖腺内に生着したのち、移植後1ヶ月間は生存および増殖可能であるものの、移植後2ヶ月以降では生存している様子が確認されなかった。これらの結果は、異種由来ドナー細胞は、宿主生殖腺内で免疫拒絶ではない別の要因によって排除されることを強く示唆している。3倍体ニベは減数分裂の進行不全により不妊となるものの、体細胞分裂を行っている精原・卵原細胞期の生殖細胞の生存および増殖は正常であるため、3倍体ニベは2倍体ニベと同等数の精原・卵原細胞を有する。したがって、3倍体ニベ宿主の生殖腺内では、宿主とドナーの精原・卵原細胞間で細胞学的なニッチが競合し、その結果、ドナー由来の精原・卵原細胞が排除される可能性が考えられた。<u>そこで本年度は、本プロジェクトで開発した生殖細胞欠損型のニベシログチ不妊化雑種(ニベシロ雑種)を用い、宿主VSドナー間の精原・卵原細胞のニッチの競合を失くした状況を作ることで、より長い期間ドナー精原細胞を宿主生殖腺に生存させ、ドナー由来の配偶子形成を誘起することを目標とした(実験①~②)。</u></p> <p><u>上記の実験によって、ニベシロ雑種が精原細胞移植技術の宿主として利用可能であることが確認されたことから、これらの個体を利用し、精原細胞移植に際してより短期間でドナー種と宿主種の適合性を評価する新たなアッセイ法の開発を行った(実験③)。</u>すなわち、ニベシロ雑種宿主の成魚に対して、哺乳動</p>
--

物やテトラピア、ゼブラフィッシュなどで既に確立されている輸精管内への精原細胞移植を行った。

さらに、本プロジェクトで設置した温調式10トン循環水槽を用いて、効率的かつ低コストで水産上有用品種の受精卵生産を行う技術の開発を行った(結果④)。実験には、小型マグロ類の中でも人工種苗生産技術の開発が期待されているスマを用いた。本年度は、既に本研究室で開発された温調式10トン循環水槽内でのスマ産卵誘発に掛るランニングコスト算出のため、オフィスビル等の消費電力量モニタリングに使用される電力見える化システム(XemsWatcher、NECソフト製)を採用し、スマ受精卵の獲得に要する消費電力量を算出した。

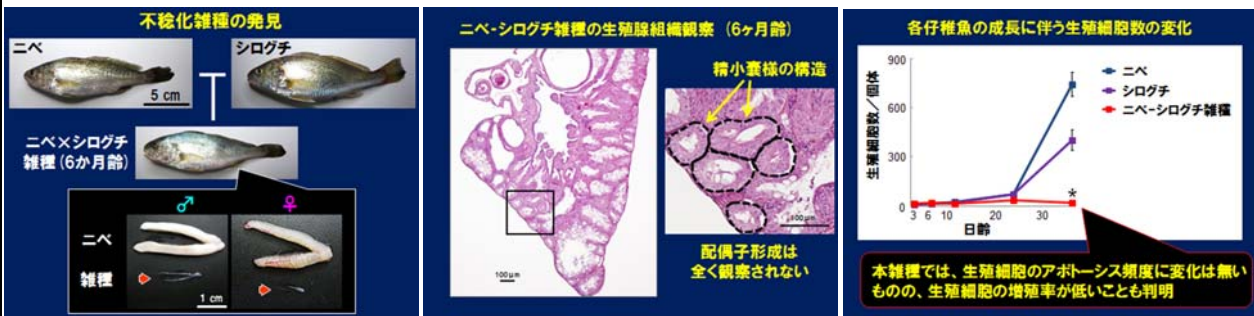
2. 研究の実施状況

実験① ニベ卵にシログチ精子を人工授精することで作出した生殖細胞欠損型のF1世代雑種(ニベシロ雑種)を宿主として用いた。GFP 遺伝子導入ニベより得られた精原細胞をドナーとして、ニベシロ雑種仔魚の腹腔内へ移植した。6カ月齢の雑種宿主について排精の有無を調査したところ、126尾中43尾(34%)において排精が認められた。採取された精子は、全てがGFP陽性を示し、精子の運動時間および濃度は野生型ニベと同等であった。雑種宿主と野生型ニベ雌との交配試験の結果、正常な孵化仔魚が得られ、これらは全てGFP陽性を示した。また、解剖の結果、これら雑種宿主の生殖腺指数は1.0であり、非移植個体(0.2)の5倍程度に発達した。また、126尾中1尾の生殖腺は、GFP陽性を示す周辺仁期の卵母細胞を有する卵巣であった。以上より、本不妊化雑種の生殖腺は、ドナー精原細胞を機能的な精子あるいは卵母細胞へと分化させる能力を有することが明らかとなり、本雑種が代理親技術の宿主として利用できることが証明された。

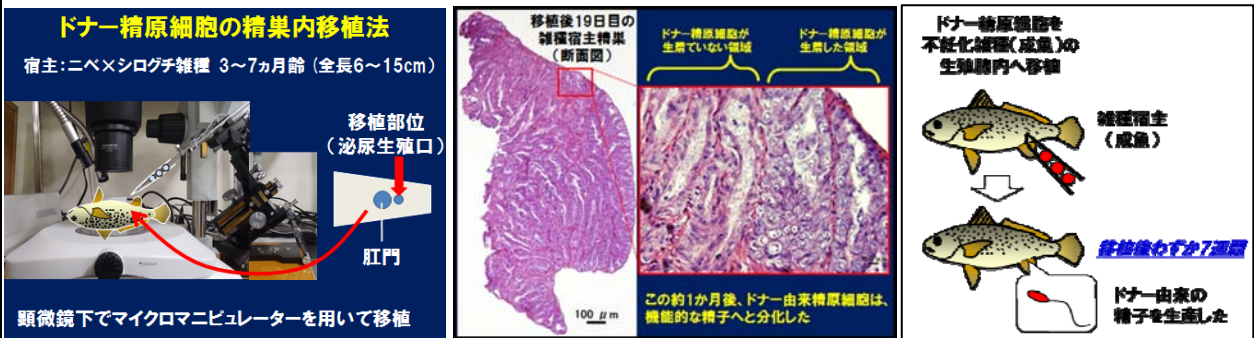


実験② 分子生物学的手法を用いて、ニベシロ雑種が生殖細胞を欠損するメカニズムについて解析した。5カ月齢の矮小化した雑種生殖腺では、生殖細胞マーカー(*vasa*, *dnd*, *dmc1*)は発現しておらず、組織観察でも生殖細胞の存在は認められなかった。精巢体細胞マーカー(*dmrt1*, *cyp11b*, *gsdf*)については、両親種と同様の遺伝子発現が見られたが、卵巢体細胞マーカー(*cyp19a1*, *foxl2*)の発現は認められなかった。仔稚魚期での生殖腺発達を経時的に観察したところ、孵化10日齢では、両親種と同等数の始原生殖細胞(15.2 ± 4.1 , $n=6$)が、生殖腺原基内で正常に分布している様子が確認された。しかし、30日齢では、両親種における始原生殖細胞数が、それぞれ 740 ± 70 ($n=8$) および 400 ± 65 ($n=15$) へと増加したのに対し、雑種では 18 ± 3 ($n=15$) となった。さらに、始原生殖細胞の増殖率は両親種(10%および8%)よりも、雑種(2%)において有意に低くなるものの、生殖腺原基内でのアポトーシス細胞の出現率に違いは無いことが判明した。以上より、本不妊化現象は、初期生殖腺発達過程における始原生殖細胞の増殖異常に起因す

ることが強く示唆された。本不稔化雑種は、生殖細胞の増殖および生殖腺原基の性分化機構を解明するための有用なモデルになると期待される。



実験③ 不妊化雑種の矮小化した精巣内に、ドナー精原細胞を直接移植する精巣内移植法を開発した。ティラピアやゼブラフィッシュでは、オスの成熟個体に対して薬物処理や温度処理を行い、一時的に精巣内の生殖細胞を消失させたのちドナー精原細胞の輸精管内移植を行うことで、1~2ヶ月間程度の短期間のうちに、ドナー由来の精原細胞が宿主精巣内に生着し、配偶子形成を開始して精子へと分化する。3倍体ニベの精巣では、宿主自身の生殖細胞が不完全ながらも部分的な配偶子形成を行うため精巣内に空間的余裕が少なく、輸精管内移植法の適用は困難であった。しかし、ニベシロ雑種は精巣を構成する各種体細胞は正常に分化しているものの、生殖細胞を欠失している状態にあることが先の実験で判明したため、ドナー精原細胞が精巣内で生着・増殖・分化するための空間的余裕が十分に存在すると考えられた。そこで、GFP遺伝子導入ニベをドナーとして用いて、ニベシロ雑種成魚(3~7か月齢)の輸精管内への精原細胞移植を行い、その後のドナー由来配偶子形成を調査したところ、移植を行った32尾中4尾(12.5%)で、ドナー由来精子を生産することが判明した。また、ドナー由来精子の生産に要した期間は移植後7週間であり、その期間は従来のふ化仔魚宿主への移植(最短で4ヶ月)に比べ大幅に短縮された。続いて、免疫応答系が既に完成した成魚の精巣への移植が、異種間でも可能であるか調べるため、オオニベ精原細胞をドナーとした輸精管内移植を実施した(本結果は非公表部分に記載)。



実験④ 本プロジェクトで設置した温調式10トン循環水槽では、小型マグロ類であるスマの産卵誘発が可能になっている。本水槽はインバーター式加温冷却機を採用した省エネ型の親魚水槽であり、省コストでの受精卵供給が期待されているが、実際の産卵誘発に要する電気コストについては未知であった。そこで、電力見える化システム(XemsWatcher)を採用し、スマ受精卵の獲得に要する消費電力量を算出した。その結果の一例として、19℃の自然海水をスマの産卵適水温である26℃へと加温し産卵誘発したとき、一日あたりの消費電力量は169±10kwhとなった。低圧電力1kwhあたり約15円とすると電気コストは約2535円/日となる。本水槽内10~50万粒/日の受精卵が生産されることから、受精卵1万粒あたりに掛る電気コストは50~253円となる。現時点で、スマ受精卵には市場価格が存在しないが、ヒラメ受精卵が1万粒あたり1万円で販売されていることを考えると、養殖対象種の受精卵生産に掛けうる電気コストと

様式19 別紙1

<p>会議発表</p> <p>計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 9 件</p> <p>ニベ×シログチ雑種の生殖細胞欠損性不稔現象は始原生殖細胞の増殖異常に起因する 吉川廣幸・井野靖子・吉崎悟朗・竹内 裕 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>海産魚における代理親魚技術の開発：ニベ科不稔性雑種を宿主としたドナー由来次世代の生産 吉川廣幸・井野靖子・矢澤良輔・竹内 裕 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>スマの養殖技術の開発 ① 15トン円形水槽を用いた種苗生産試験 白石智孝・濱地寿生・奥山芳生・中西一・竹内 裕・矢澤良輔・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>代理親魚技術を用いたトラフグ配偶子の生産(2)：クサフグ両親からのトラフグの誕生 濱崎将臣・吉川壮太・菊池 潔・竹内 裕・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>スマ三倍体の作出とその特性解析 町田有里・矢澤良輔・嶋田幸典・吉川廣幸・竹内 裕・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 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初期卵成長の促進 雨澤孝太郎・矢澤良輔・竹内 裕・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ(LHRHa)の経口投与によるスマの産卵誘発 雨澤孝太郎・佐藤健太・矢澤良輔・竹内 裕・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>アイゴの脂肪酸不飽和化酵素における二重結合導入位置の選択に関わる領域の探索 千葉瑞萌・壁谷尚樹・芳賀 穰・佐藤秀一・矢澤良輔・竹内 裕・吉崎悟朗 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>アワビ類における生殖細胞マーカーのクローニングと発現解析 大岡嗣欧・王俊杰・山川紘・竹内 裕 平成 26 年度日本水産学会春季大会、函館、2014 年 3 月 27－30 日</p> <p>一般向け 計 2 件</p> <p>スマ(ヤイトカツオ)の完全養殖について ～千葉・館山での挑戦～ 竹内 裕 平成 25 年度和歌山県水産試験場成果発表会、和歌山、2014 年 2 月 14 日</p> <p>ニベ科魚類をモデルとした海産魚における精原細胞移植技術の高度化 竹内 裕 平成 25 年度東京海洋大学重点研究成果報告会、品川、2014 年 2 月 21 日</p>
<p>図 書</p> <p>計 0 件</p>	

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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 http://www.kaiyodai.ac.jp/sentanken/takeuchi/takeuchi.html 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) http://d.hatena.ne.jp/yutakat1975/
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1) 埼玉県立熊谷西高校SSHでの講義および施設案内、生徒39名:教員3名(2013年7月26日) 2) 第1回海洋・水産研究チャレンジセミナーでの講義、中高生40名:社会人60名(2013年8月12日) 3) ひらめき☆ときめきサイエンス「魚の代理親技術」、小学5~6年生30名(2013年8月23日) 4) 中央ろうきん友の会「サバにマグロを産ませる技術の開発」、社会人100名(2013年8月29日) 5) 館山市立神戸小学校出前講義(2013年9月20日) 6) 岩手県立釜石高校SSHでの講義、生徒20名:教員3名(2013年10月5日)
新聞・一般雑 誌等掲載 計1件	水産経済新聞 2013年12月17日「スマ(ヤイトカツオ)養殖に成功:高級魚を安定供給」
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	113,000,000	94,520,000	18,480,000	0	0
間接経費	33,900,000	28,356,000	5,544,000	0	0
合計	146,900,000	122,876,000	24,024,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	623,867	18,480,000	0	19,103,867	18,480,000	623,867	0
間接経費	0	5,544,000	0	5,544,000	5,356,839	187,161	0
合計	623,867	24,024,000	0	24,647,867	23,836,839	811,028	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	4,611,054	酸素供給装置、顕微鏡用デジタルカメラ、実験試薬等
旅費	868,046	研究調査(台湾、長崎、和歌山)、研究打合せ
謝金・人件費等	12,428,817	博士研究員人件費、生物飼育員人件費
その他	572,083	塩基配列解析委託、研究機材レンタル、英文校正委託等
直接経費計	18,480,000	
間接経費計	5,356,839	
合計	23,836,839	

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 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
高純度酸素供給システム	(往原産業:整備 等含む)	1式	577,500	577,500	25.12.18	東京海洋大学
顕微鏡用デジタル カメラ	オリンパスメディ カルサイエンス 製:DP73-SET-A	1式	1,262,520	1,262,520	26.2.25	東京海洋大学