

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

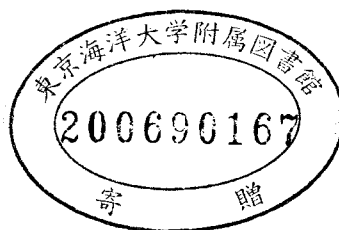
始原生殖細胞を利用した新たな魚類遺伝子資源保存
技術の開発に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 輝正 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/724

始原生殖細胞を利用した
新たな魚類遺伝子資源保存技術の開発
に関する研究

平成 17 年度

(2005)



東京海洋大学大学院

水産学研究科

資源育成学専攻

小林 輝正

始原生殖細胞(PGC)を利用した 新たな魚類遺伝子資源保存技術の開発に関する研究

目 次

	頁
緒論	1
第1章 ニジマス PGC の凍結保存条件の検討および凍結 PGC からの個体の再生 (Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells)	19
Abstract	20
Introduction	21
Materials & Methods	23
Results	28
Discussion	31
References	34
Figure Legends	38
Tables	40
Figures	43
第2章 遺伝子組換えを用いないドナー由来生殖細胞の検出方法の開発	46
緒言	47
材料と方法	50
結果	58
考察	61
参考文献	65
図説明	70
プライマー配列一覧	74
PCR 反応条件一覧	75
表	76
図	78
総括	89
謝辞	93

緒 論

絶滅危惧魚種の増加とその保全

近年、乱獲や環境破壊により多くの魚種が絶滅の危機に瀕している。2004 年に International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) が発表したレッドリストには、絶滅の危険がある魚種 (CR: critical 近絶滅種, EN: endangered 絶滅危惧種, VL: vulnerable 危急種) として 800 の魚種が挙げられている (表1; IUCN, 2004)。日本では、環境省が 2003 年に刊行したレッドデータブックにおいて 76 魚種を絶滅危惧魚種に指定している。その中には、ミヤコタナゴ (*Tanakia tanago*: CR)、イトウ (*Hucho perryi*: EN)、ムツゴロウ (*Boleophthalmus pectinirostris*: VU) など、身近な名前も挙げられている (環境省, 2003)。水生生物の多様性を維持するためにも、こうした魚種の遺伝子資源の保存が重要な課題となっている。

生物の遺伝的多様性を保存するうえで最も安全かつ確実な方法は、その生物種の生息環境の保全と繁殖機会の確保であると考えられている (Margules and Pressey, 2000)。事実、絶滅危惧魚種の保護のために、サンクチュアリ (禁漁区、保護区域) を指定している地域も少なくない。これは、手付かずの自然環境を作り出すことで、当該魚種を含む生態系全てを保全するという考えのもとに成り立っている。しかしながら、人間を含む生物の活動は、(それがサンクチュアリ外の活動であったとしても) 他の生物の生息環境や繁殖に少なからず影響を与えており、完全に隔離した環境を作り出すことは困難といえる。また、長い年月をかけて形成された生態系が元通りになるには、やはり長い年月が必要になる。

環境の保全に代わる遺伝子資源の保存方法として古くから行われている方法は、人工飼育および人工繁殖である。これらは、希少な魚種の一部を天然から採取し、個体として維持する方法で、主に水族館などで行われてきた。しかしながら、全ての魚種が人工繁殖できるわけではなく、むしろ飼育すら可能になっていない魚種も少なくない。また、飼育や繁殖が可能であったとしても、人工の限られた飼育環境下では、疾病や飼育装置の事故等により貴重な飼育魚を失う危険性が

常にある。さらに、限られた個体数で繁殖を繰り返すことは、種内での遺伝的多様性を縮小させ、結果的に絶滅の危険性を増す可能性もある。したがって、個体数が少なく、早急な対処を要する魚種には、より積極的に遺伝子資源の保存を行う手法が必要となる。

魚類養殖における遺伝子資源保存の必要性

魚類は古くから食されてきた人類にとって重要なタンパク源のひとつである。とりわけ、人口増加に伴う食糧不足が懸念される昨今、魚類の食糧源としての重要性は以前にも増して高まっている。しかし、魚類を中心とした水産食品の消費が増大する一方で、乱獲により天然水産資源は減少傾向にある。このような供給不足を補うために、養殖による魚類生産が盛んに行われるようになってきた。

養殖により安定的に魚類を生産するためには、耐病性や経済形質を保持する優良系統の作出が必要である。これまで、そのような系統の作出は、天然から採取した集団から優良個体を選抜し、交配を繰り返して系統化する、いわゆる選抜育種によって行われてきた。しかし、選抜育種では、有用形質を保持するさまざまな系統を個体として維持しなければならないため、多大な労力、時間、費用、スペースが必要となる。したがって、成熟までに長い年月を要する魚種では、その応用に限度がある(鈴木, 1979; 隆島, 1997; 家戸, 2000)。そこで、天然に存在する、または選抜過程で得られた優良系統を、個体としてではなく細胞として簡便に保存する方法、および凍結保存した細胞を必要時に個体に変換する方法の開発が望まれる。

魚類における遺伝子資源保存技術の現状

遺伝子資源の保存技術として最も一般的な方法は、配偶子(卵と精子)の凍結保存である。魚類は卵生生物であり体外発生を行う。そのため、卵と精子を保存することができれば、たとえ個体が絶滅してしまったとしても、それらを解凍して受精するだけで個体を再生することが可能である。さらに、卵や精子を液体窒素内で保存するため、個体の飼育に比べ、スペースやコストが少なく

て済むだけでなく、原理的に、半永久的な保存が可能である。こうした理由から、配偶子の凍結保存に関しては多くの研究がなされてきた。

精子の凍結保存については、多くの魚種においてその保存方法がすでに確立されている (Chao and Liao, 2001; Tiersch, 2001)。これは、精子のほとんどが核であり、卵細胞と融合するための細胞膜、運動器官としての鞭毛、代謝器官としてのミトコンドリアがそれに付随しているのみの単純な構造であるため、その凍結保存が容易なためである。したがって、保存が完全であれば、卵に受精するのみで発生が始まり、保存した遺伝情報を個体に変換することが可能である。さらに、ゲノムを不活性化した卵を用いて雄性発生を行うことで、保存しておいた精子の遺伝情報のみを持つ個体を作成することが可能になっている (Scheerer et al., 1986; Scheerer et al., 1991; Babiak et al., 2002)。しかし、ミトコンドリアのゲノムが卵に由来するため、雄性発生によって得られた個体は、厳密な意味で凍結精子由来の個体とは言えない。それに加え、卵のゲノムを不活性化するための γ 線照射によりミトコンドリアのゲノムも破壊されてしまうため、成功率は極めて低いという問題がある。

一方、魚類卵の凍結保存については、予備的な試行が報告されているが (Delgado et al., 2005; Zhang et al., 2005)、現在のところまったく成功例がない。これは、魚類の卵が精子や組織細胞に比べ非常に大きいことが一因とされている。通常、細胞や精子を急速に凍結すると、細胞内の水分子が大きな氷の結晶を作り、細胞膜や細胞内小器官を破壊してしまうため、解凍後の細胞は死亡してしまう (図 1A)。そこで、これを防ぐために、凍結保護剤が用いられている。一般的には、凍結処理を行う前に、Dimethyl Sulfoxide (DMSO) や Glycelol などの凍結保護剤を含む溶液に細胞を浸漬し、細胞内の水分子と凍結保護剤を置換することで、大きな結晶が形成されるのを防いでいる (図 1B)。上述の精子のように小さく単純な構造を持つ細胞では、比較的容易に凍結保護剤が浸透する。しかし、凍結保存がすでに可能となっている哺乳類の卵母細胞では、その直径が 0.1~0.2mm 程度 (Kaidi et al., 2000) であるのに対し、硬骨魚類の卵は 1mm 前後 (最小: タナゴモドキ-0.3mm, 最大: サケ-9.5mm; 平井, 2004) と大きいので、凍結保護剤の浸透に時

間がかかる。これに加えて、魚類の卵は、受精後の発生に備えて脂肪分に富んだ卵黄を多く含んでいるため、凍結保護剤の浸透が一層困難になっている (Janik et al., 2000)。このような事実を考慮すれば、卵黄が蓄積する以前の卵母細胞や卵原細胞については、容易に保存できる可能性もある。しかし、凍結保存した卵黄蓄積以前の細胞を *in vitro* で機能的な卵に分化させる技術は今のところ開発されていない。

哺乳類では、卵と精子の保存に加えて受精卵・胚の凍結保存が可能になっており、マウスやウシで開発された方法を野生動物に応用する試みがなされている (Liebo and Songsasen, 2002)。魚類においても、哺乳類の方法を模した形で、胚や幼生の凍結保存が試みられており、ヒラメとコイにおいては成功例が報告されている (Zhang et al., 1989; Chen et al., 2005)。しかしながら、解凍後の胚は、わずか数時間しか生存せず、再現性も得られていない。したがってこれらの例においても、卵の凍結保存と同様に、胚のサイズと卵黄が問題になっていると考えられる。また、細胞の分化が進むと細胞の種類によって凍結保護剤に対する浸透性に違いが生まれること、さらに、胚自体が、低張の環境下で生存するために、分子の流出・流入を制御する能力を備えていることが凍結保護剤の浸透を妨げる原因として挙げられている (Hagedorn et al., 1997; Hagedorn et al., 1998)。

配偶子や胚以外の保存方法として近年注目されている技術の一つとして、胚細胞の凍結保存が挙げられる。マウスの初期胚細胞は、全能性を有しており、卵を含む生殖細胞への分化が可能である。魚類においても、初期胚細胞を移植したキメラ個体から、ドナー細胞に由来する F1 個体が得られていることから、その生殖細胞への分化能が示唆されている (Lin et al., 1992; Takeuchi et al., 2001; Yamaha et al., 2001)。さらに、いくつかの魚種において初期胚細胞の凍結保存が報告されている (Calvi and Maisse, 1998; Calvi and Maisse, 1999; Strüssman et al., 1999; Kusuda et al., 2002; Kusuda et al., 2004)。しかしながら、魚類の胚細胞は、その全てが生殖細胞に分化できるわけではなく、わずか数細胞がその能力を有しているにすぎない (Yoshizaki et al., 2002; Raz, 2002)。したがって、遺伝子資源保存の効率を考えた場合、生殖細胞への分化能を有した細胞の

選択的増殖が望まれる。初期胚細胞が全能性を持つマウスでは、これらの細胞から培養細胞株 (Embryonic Stem Cell: ES 細胞) を樹立する方法が確立しているため (Evans and Kaufman, 1981)、*in vitro* で遺伝子資源を増幅することが可能である。魚類においても、メダカやゼブラフィッシュを用いて ES 細胞の作出が試みられてきたが、生殖細胞に分化可能な細胞株はいまだ得られていない (Wakamatsu et al., 1994; Hong and Schartl, 1996a; Hong et al., 1996b)。

以上のように、現状では、魚類の卵、またはそれと同等の細胞を安定的に保存する技術が確立されていない。したがって、卵を介して遺伝するミトコンドリア DNA などの母系遺伝子資源を保存することが可能な、まったく新しい遺伝子資源保存技術の開発が望まれている。

始原生殖細胞を利用した代理親魚養殖

本研究では、新たな遺伝子資源保存方法を開発するうえで、始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell: PGC) に着目した。PGC は性が分化する以前の生殖細胞のことで、雄では精原細胞、精母細胞を介して精子へ、雌では卵原細胞、卵母細胞を介して卵へと分化する細胞である (Yoshizaki et al., 2003)。言い換えれば、PGC は成熟、受精を介して個体に変換することが可能な細胞である。すなわち、凍結保存に用いる卵の代わりとなる細胞として適した細胞といえる。マウスでは、*in vitro* に取り出した PGC から Embryonic Germ Cells (EG 細胞) と呼ばれる株化細胞が作出されており (Matsui et al., 1992)、ES 細胞と同様に、宿主胚に移植することで、キメラを介して EG 細胞を個体に変換することが可能である。また、ニワトリでは、単離した PGC を凍結保存する技術が開発されており、解凍した PGC から、個体を作成することも可能になっている (Naito et al., 1994)。

近年、魚類においても、PGC の移植技術が確立された (Takeuchi et al., 2003)。PGC が緑色蛍光を発する *pvasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマス系統 (Yoshizaki et al., 2000; Takeuchi et al., 2002) の孵化稚魚から取り出した PGC を、同種孵化稚魚の腹腔内に移植したところ、移植した PGC は、雄宿主の生殖腺内では機能的な精子へ、雌宿主の生殖腺内では卵へ分化した。さらに、ニジマスの PGC を異種の宿主であるヤマメ (*Oncorhynchus masou*) の孵化稚魚に移植したところ、移植し

たPGCはヤマメの生殖腺内で機能的な精子に分化し、宿主のヤマメが移植したPGCに由来するニジマスを作出した(Takeuchi et al., 2004)。つまり、PGCは異種の宿主を介しても、個体に変換可能な細胞であることが明らかとなった。

上述のように、PGCは卵への分化能を有した細胞であるため、魚類のPGCを凍結保存することができれば、これまで魚類では不可能だった母系遺伝子資源の保存が可能になる。さらに、凍結保存したPGCを解凍して、近縁の宿主に移植することにより、宿主を介して絶滅してしまった魚種を蘇らせることもできると期待される(図2)。

本研究の目的

本研究では、始原生殖細胞(PGC)を利用した新たな魚類遺伝子資源保存方法の確立を目的とした。この目的を達成するために、第1章ではまず、ニジマスを用いてPGCの凍結保存条件の検討を行った。さらに、凍結保存したPGCが機能的な卵に分化し、これに由来する正常な個体が得られるか否かを検証するために移植実験を行った。つづいて第2章では、遺伝子組換え技法を用いずに、ドナー由来生殖細胞を検出する方法の開発を行った。

なお、本論文の一部については、下記に発表済みである。

学術論文

- 1) Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2002). Mass isolation of primordial germ cells from transgenic trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the *vasa* gene promoter. *Biol Reprod* 67:1087-1092.
- 2) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Tominaga, H., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2002). Visualization of primordial germ cells in transgenic rainbow trout carrying green fluorescent protein gene driven by *vasa* promoter. *Fisheries Science* 68(sup2):1067-1070.

- 3) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Tominaga, H., Kobayashi, T., Ihara, S., and Takeuchi, T. (2002).
Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiol Biochem* 26:3-12.
- 4) Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Cryopreservation of trout
primordial germ cells. *Fish Physiol and Biochem* 28:479-480.
- 5) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2003). Primordial germ cell: A
novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol Biochem* 28:453-457.
- 6) 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. *Mol
Reprod Dev* 67:91-100.
- 7) Yoshizaki, G., Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2005). Green
fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its
application for germ cell transplantation in Salmonidae. *BiolReprod* 73:88-93.
- 8) Kobayashi, T., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2006). Generation of viable fish
from cryopreserved primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* (投稿中).

その他の論文

- 1) 吉崎悟朗・竹内 裕・富永温夫・小林輝正・竹内俊郎 (2000)「蛍光タンパク質の個体への導
入による特定細胞系列の可視化」*日本比較内分泌学会ニュース* 98:34-39.
- 2) 吉崎悟朗・竹内 裕・小林輝正・伊原祥子・竹内俊郎 (2002)「魚類始原生殖細胞を利用した
新たな育種技法の開発」*ブレインテクノニュース* 92:23-26.
- 3) 吉崎悟朗・竹内 裕・小林輝正・竹内俊郎 (2002)「魚類における幹細胞を介した遺伝子導入
技術開発の現状」*海洋と生物* 24-No.2:100-106.
- 4) Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Tominaga, H., Kobayashi, T., Takeuchi, T. (2003). Visualization and

isolation of live primordial germ cells aimed at cell-mediated gene transfer in rainbow trout.
Aquatic Genomics Springer Verlag New York. pp.310-319.

- 5) 吉崎悟朗・竹内裕・小林輝正・高柴邦子・奥津智之・竹内俊郎 (2004)「ニジマスを生むヤマメの作出: 魚類始原生殖細胞を用いた発生工学」*ブレインテクノニュース* vol.106:14-18.
- 6) 吉崎悟朗・竹内裕・小林輝正・多湖康子・竹内俊郎 (2004)「始原生殖細胞を用いた魚類の発生工学 ―サケからマスは生まれるか?―」*バイオインダストリー* 21 No.2:29-37.

口頭発表

- 1) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Tominaga, H., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Visualization and Isolation of live primordial germ cells in transgenic rainbow trout carrying GFP gene driven by *vasa* gene promoter. International symposium: A step toward the great future of aquatic genomics. Tokyo Univ. of Fisheries, Tokyo, Japan. 2000.11.12.
- 2) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Tominaga, H., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Visualization and isolation of live primordial germ cells aimed at a cell-mediated gene transfer in rainbow trout. 3rd IUBS Symposium on Molecular Aspects of Fish Genomics and Development. University of Singapore, Singapore 2001.2.19.
- 3) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., Tominaga, H., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Identification and isolation of primordial germ cells for cell-mediated gene transfer in rainbow trout. Symposium on Aquatic Biology: Development, Growth, Adaptation and Defense. University of Tokyo, Tokyo, Japan. 2001.3.12. (Proceedings pp.101-115)
- 4) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 *vasa* プロモーター・GFP 遺伝子導入ニジマスからの始原生殖細胞の単離 平成 13 年度日本水産学会春季大会 日本大学 神奈川 2001.4.3.

- 5) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Tominaga, H., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Visualization and isolation of live primordial germ cells for cell-mediated gene transfer in rainbow trout. International commemorative symposium: 70th anniversary of the Japanese society of fisheries science. Pacifico Convention Plaza Yokohama, Kanagawa, Japan. 2001.10.3.
- 6) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the GFP gene driven by the vasa gene promoter. 35th annual meeting of society for the study of reproduction. Baltimore, Maryland, USA. 2002.7.28.
- 7) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 フローサイトメーターを用いたニジマス始原生殖細胞の大量精製法の開発 平成 14 年度日本水産学会 近畿大学 奈良 2002.4.4.
- 8) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 ニジマス始原生殖細胞の凍結保存とその生殖系列への導入 平成 15 年度日本水産学会 東京水産大学 東京 2003.4.2
- 9) Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering. International Symposium Reproductive Physiology of Fish, Mielparl Ise-Shima, Mie, Japan. 2003.5.19.
- 10) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 始原生殖細胞の凍結保存による新たな魚類遺伝子資源保存技術の開発 第 97 回日本繁殖生物学会広島大学 広島 2004.9.18.
- 11) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 凍結生殖細胞からの機能的な卵および精子の作出 平成 17 年度日本水産学会 東京海洋大学 東京 2005.4.1.
- 12) Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T. Generation of live fry from cryopreserved primordial germ cells in rainbow trout. 38th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. Quebec city convention center, Quebec, Canada. 2005. 7.24.
- 13) 小林輝正・奥津智之・吉崎悟朗・竹内俊郎 生殖細胞移植における非遺伝子組換えドナー

由来生殖細胞検出方法の開発 平成 18 年度日本水産学会 高知大学 高知 (発表予定)

ポスター発表

- 1) 小林輝正・竹内 裕・吉崎悟朗・竹内俊郎 *vasa*-GFP の導入により可視化したニジマス始生殖細胞のフローサイトメーターを用いた大量精製法の開発 第 7 回小型魚類研究会 東レ総合研修センター 三島 静岡 2001.8.4
- 2) Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. Visualization, isolation, and transplantation of live primordial germ cells aimed at cell-mediated gene transfer in rainbow trout. International symposium: Development and Epigenetics of Mammalian Germ Cells and Pluripotent Stem Cells, Miyako Hotel, Kyoto, Japan. 2001.11.20.
- 3) 竹内 裕・吉崎悟朗・小林輝正・竹内俊郎 始生殖細胞を利用した魚類発生工学の新展開 東京水産大学産学連携講演会 東京水産大学 東京 2002.3.4.
- 4) Kobayashi, T., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, T. Cryopreservation of trout primordial germ cells; A novel technique for preserving fish genetic resources. International Symposium Reproductive Physiology of Fish, Mielparl Ise-Shima, Mie, Japan. 2003.5.19.
- 5) Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. Production of germ line chimeras using cryopreserved trout primordial germ cells. 6th International Marine Biotechnology Conference and the 5th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. Makuhari, Chiba, Japan. 2003.9.21.

参考文献

- Babiak, I., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Brzuzan, P., and Ciesielski, S. (2002). Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factor. *Theriogenology* 57:1229-1249.
- Calvi, S.L. and Maisse, G. (1998). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: Influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology* 36:255-262.
- Calvi, S.L. and Maisse, G. (1999). Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. *Aquat Living Resour* 12:71-74.
- Chao, N.H. and Liao, I.C. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197:161-189.
- Chen, S.L. and Tian, Y.S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63:1207-1219.
- Delgado, M., Valdez, J.R., Miyamoto, A., Hara, T., Seki, S., Kasai, M., and Edashige, K. (2005). Water- and cryoprotectant-permeability of mature and immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 50:93-102.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Freitas, R., Liu, J., Hsu, E.W., Wildt, D.E., and Rall, W.F. (1997). Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool* 278:356-371.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Artemov, D., and Pilatus, U. (1998). Characterization of

major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Bio Reprod* 59:1240-1250.

平井明夫 (2004). 魚の卵の話し. ベルソープックス 017 (日本水産学会監修) 成山堂書店 東京.

Hong, Y. and Scharl, M. (1996a). Establishment and growth responses of early medakafish (*Olyzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:93-104.

Hong, Y., Winkler, C., and Scharl, M. (1996b). Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Olyzias latipes*). *Mech Dev* 60:33-44.

IUCN, (2004). The IUCN Red List of Threatened SpeciesTM Samary Statistics. URL: <http://www.redlist.org/info/tables/table1>

Janik, M., Kleinhans, F.W., and Hagedorn, M. (2000). Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology* 41:25-34.

Kaidi, S., Donnay, I., Lambert, P., Dessy, F., and Massip, A. (2000). Osmotic behavior *in vitro* produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41:106-115.

環境省 (2003). レッドデータブック. URL: http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html

家戸敬太郎 (2000). 育種「海産魚の養殖」(熊井英水編) 湊文社 東京.

Kusuda, S., Teranishi, T., and Koide, N. (2002) Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 45:60-67.

Kusuda, S., Teranishi, T., Koide, N., Nagai, T., Arai, K., and Yamaha, E. (2004). Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* 301:131-138.

- Liebo, S.P. and Songsasen, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57:303-326.
- Lin, S., Long, W., Chen, J., and Hopkins, N. (1992). Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplantations from genetically pigmented to albino embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4519-4523.
- Margules, C.R. and Pressey, R.L. (2000). Systematic conservation planning. *Nature* 405:243-253.
- Matsui, Y., Szebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847.
- Naito, M., Tajima, A., Tagami, T., Yasuda, Y., and Kuwana, T. (1994). Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J Reprod Fertil* 102:321-325.
- Raz, E. (2002). Primordial germ cell development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 13:489-495.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., Allendorf, F.W., and Knudsen, K.L. (1986). Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. *Aquaculture* 57:289-298.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., and Allendorf, F.W. (1991). Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J Exp Zool* 260:382-390.
- 鈴木 亮 (1979). 魚類「水産育種の現状と将来」(日本水産学会編) 厚生社厚生閣 東京.
- Strüssman, C.A., Nakatsugawa, H., Takashima, F., Hasobe, M., Suzuki, T., and Takai, R. (1999). Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effects of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. *Cryobiology*

39:252-261.

隆島史夫 (1997). 水族育種論・増養殖の基礎と応用. 成山堂 東京.

Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2001). Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol Reprod Dev* 59:380–389.

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.

Tiersch, T.R. (2001). Cryopreservation in aquarium fishes. *Mar Biotechnol* 3:S212-S223.

Wakamatsu, Y., Ozato, K., and Sasado, T. (1994). Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo. *Mol Mar Bio Biotechnol* 3:185-191.

Yamaha, E., Kazama-Wakabayashi, M., Otani, S., Fujimoto, T., and Arai, K. (2001). Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* 111:227-236.

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.

- 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.
- Zhang, X.S, Zhao, L, Hua, T.C., and Zhu, H.Y. (1989). A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Letters* 10:271-278.
- Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L., and Rawson, D.M. (2005). Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 50:285-293.

図の説明

図1. 細胞の凍結保存の原理。**A)** 細胞をそのまま液体窒素に入れた場合、細胞内の水分子が大きな氷の結晶を形成し、細胞膜や細胞内小器官が破壊されるため、解凍後の細胞は生残しない。**B)** 細胞を凍結保存する際に、凍結保護剤と細胞内の水分子を置換した場合、形成される氷の結晶は小さく、細胞を傷つけない。したがって、解凍後に凍結保護剤と水分子を再び置換すれば、細胞はその後も生存可能となる。

図2. 凍結PGCからの絶滅魚種の復活。絶滅危惧魚種（ゴールドトラウト）のPGCをあらかじめ凍結保存しておく。もし、ゴールドトラウトが絶滅してしまったとしても、解凍したPGCを近縁の宿主（この場合ニジマス）に移植し、宿主のニジマスにゴールドトラウトの精子や卵を作らせることで、ゴールドトラウトを蘇らせることができる。

表 1. Number of threatened species by major group of organisms (1996-2004).

Vertebrates	Number of described species	Number of species evaluated in 2004	Number of threatened species in 1996/98	Number of threatened species in 2000	Number of threatened species in 2002	Number of threatened species in 2003	Number of threatened species in 2004	Number threatened in 2004, as % of species described	Number threatened in 2004, as % of species evaluated**
Mammals	5,416	4,853	1,096	1,130	1,137	1,130	1,101	20%	23%
Birds	9,917	9,917	1,107	1,183	1,192	1,194	1,213	12%	12%
Reptiles	8,163	499	253	296	293	293	304	4%	61%
Amphibians*	5,743	5,743	124	146	157	157	1,770	31%	31%
Fishes	28,500	1,721	734	752	742	750	800	3%	46%

NOTES:

1) * It should be noted that for certain species endemic to Brazil, there was not time to reach agreement on the Red List Categories between the Global Amphibian Assessment (GAA) Coordinating Team, and the experts on the species in Brazil. The 2004 figures for Amphibians displayed here are those that were agreed at the GAA Brazil workshop in April 2003. However, in the subsequent consistency check conducted by the GAA Coordinating Team, many of the assessments were found to be inconsistent with the approach adopted elsewhere in the world, and a "consistent Red List Category" was also assigned to these species. There was not time to agree these "consistent Red List Categories" with the Brazilian experts before the release of the *2004 IUCN Red List*, therefore the original workshop assessments are retained here. However, in order to retain comparability between results for amphibians with those for other taxonomic groups, the data used in the *Global Species Assessment* (Baillie *et al.* 2004) are based on the "consistent Red List Categories". Therefore, figures in table 1 above will not completely match figures in table 2.1 in the *Global Species Assessment*.

2) ** Apart from the mammals, birds, amphibians and gymnosperms (i.e., those groups completely or almost completely evaluated), the figures in the last column are gross over-estimates of the percentage threatened due to biases in the assessment process towards assessing species that are thought to be threatened, species for which data are readily available, and under-reporting of Least Concern species. The true value for the percentage threatened lies somewhere in the range indicated by the two right-hand columns. In most cases this represents a very broad range. For example, the true percentage of threatened insects lies somewhere between 0.06% and 73%. Hence, although 41% of all species on the *IUCN Red List* are listed as threatened, this figure needs to be treated with extreme caution given the biases described above.

適用: IUCN, (2004). The IUCN Red List of Threatened Species™ Summary Statistics. URL:
<http://www.redlist.org/info/tables/table1> から。

図1

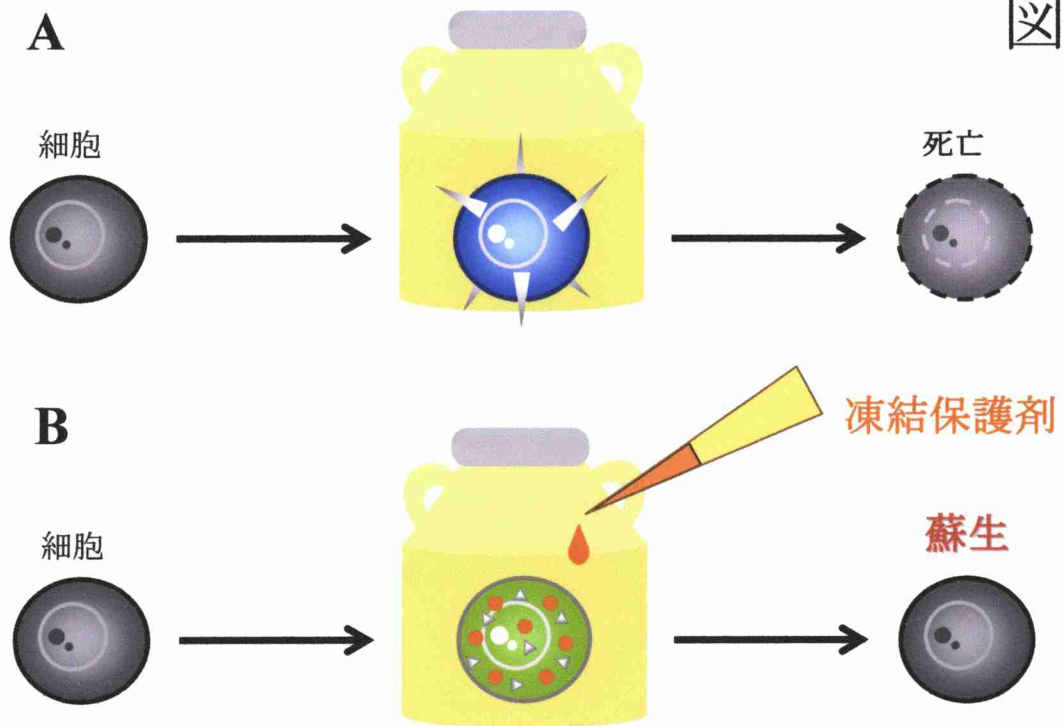
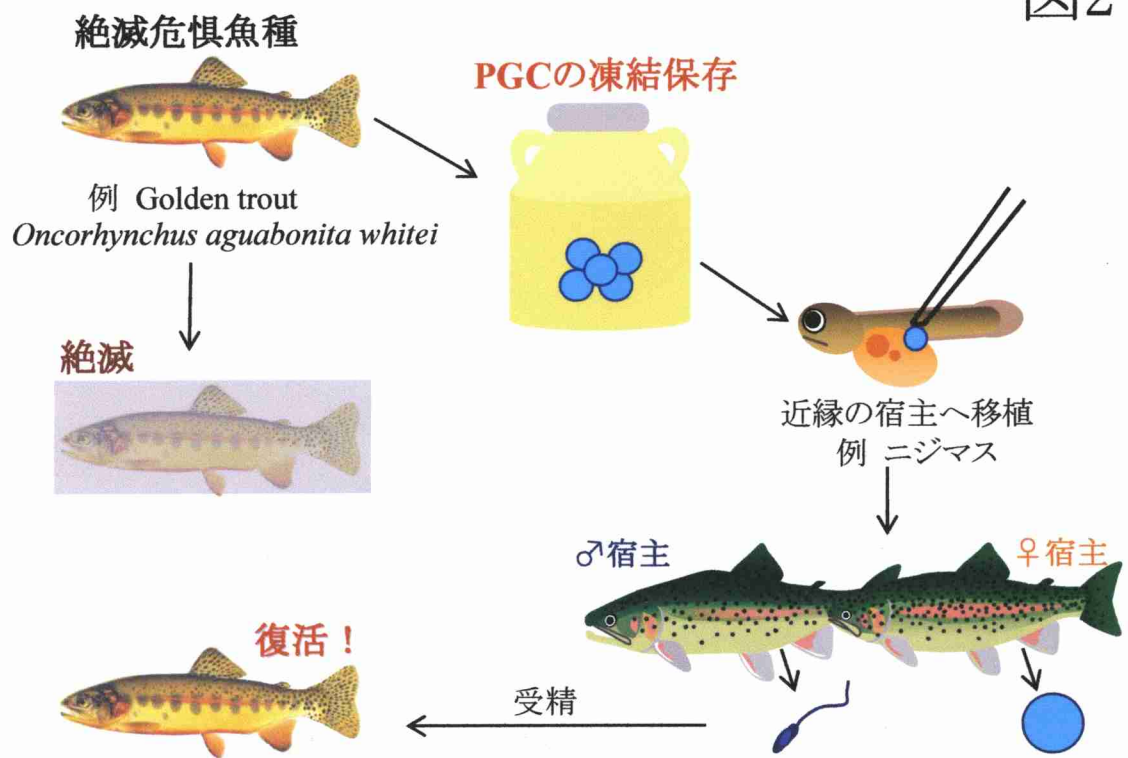


図2



第1章

凍結 PGC からのニジマス個体の再生

(Generation of Viable Fish from Cryopreserved Primordial Germ Cells)

ABSTRACT

An increasing number of wild fish species are in danger of extinction, often as a result of human activities. The cryopreservation of gametes and embryos has great potential for maintaining and restoring threatened species. The conservation of both paternal and maternal genetic information is essential. However, although this technique has been successfully applied to the spermatozoa of many fish species, reliable methods are lacking for the long-term preservation of fish eggs and embryos. Here we describe a protocol for use with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primordial germ cells (PGCs) and document the restoration of live fish from gametes derived from these cryopreserved progenitors. Genital ridges (GRs), which are embryonic tissues containing PGCs, were successfully cryopreserved in a medium containing 1.8 M ethylene glycol. The thawed PGCs that were transplanted into the peritoneal cavities of allogenic trout hatchlings differentiated into mature spermatozoa and eggs in the recipient gonads. Furthermore, the fertilization of eggs derived from cryopreserved PGCs by cryopreserved spermatozoa resulted in the development of fertile F1 fish. This PGC cryopreservation technique represents a promising tool in efforts to save threatened fish species. Moreover, this approach has significant potential for maintaining domesticated fish strains carrying commercially valuable traits for aquaculture purposes.

INTRODUCTION

The consumption of salmonid fish has potential beneficial effects on human health due to their high content of omega-3 fatty acids, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) [1]. This has led to intensive farming worldwide. These species are also attractive to anglers. However, fears are growing that many wild salmonid populations are now facing extinction. Escaped or released farmed fish and exotic species have devastated the population of native species by hybridizing with them, sometimes driving them to the brink of local genetic extinction [2-4]. Habitat destruction caused by dam construction and land-management programmes are also threatening rare salmonids, such as the bull trout (*Salvelinus confluentus*) [5], California golden trout (*Oncorhynchus aguabonita whitei*) [6], and Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) [7].

To maintain the genetic diversity of salmonids, it will be essential to preserve their heritable information. The production of live rainbow trout by androgenesis has been reported previously [8, 9]. However, the survival rate of androgenic diploids was low and maternally inherited cytoplasmic compartments, such as mitochondrial DNA, could not be restored using this approach. Despite the urgent need to preserve maternal genetic material, fish eggs have not yet been successfully cryopreserved, mainly due to their large size and high yolk content [10].

Our recently developed novel surrogate broodstock technology [11] allows intraperitoneally introduced PGCs to resume gametogenesis and differentiate into

functional spermatozoa in allogenic male recipients. Transplanted PGCs can also differentiate into functional eggs in female recipients. In addition, we successfully xenotransplanted PGCs between rainbow trout and masu salmon (*Oncorhynchus masou*) [12]. These results suggest that maternally inherited genetic information could be conserved by cryopreserving PGCs. This approach might even enable currently endangered species to be rescued from future extinction using closely related species as surrogate parents. We therefore established a cryopreservation method for rainbow trout embryonic germline progenitors and investigated whether the thawed PGCs could develop into viable fry.

MATERIALS AND METHODS

Fish

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which maintained at the Field Science Center, Oizumi Station, Tokyo University of Marine Science and Technology (Yamanashi, Japan) was used in this study. *pvasa-Gfp* transgenic rainbow trout strain [13, 14] was used for survival assessment of cryopreserved PGCs and preparation of donor cells. F2 transgenic embryos were generated by crossing F1 heterozygous (*pvasa-Gfp/-*) males with non-transgenic females. On the hatching of the F2 generation, transgenic fish expressing GFP in their PGCs were identified by screening the embryos under a fluorescent dissecting microscope (SZX 12; Olympus, Tokyo, Japan). Non-transgenic rainbow trout (-/-) which was allogenic relationship with donor was used for recipients. The embryos were reared at 10°C. All procedures described herein were conducted in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as promulgated by the Society for the Study of Reproduction.

Embryo Manipulation and GR Collection

pvasa-Gfp transgenic 30-day post-fertilization (dpf) embryos were dechorionized using forceps and anesthetized with 0.05% 2-phenoxyethanol in trout ringer solution [15]. The GRs were manually excised using fine watchmaker's forceps under a dissecting microscope, as described by Kobayashi and colleagues [16]. The excised GRs were stored on ice in phosphate-buffered saline (PBS) with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1 mM

CaCl₂ until use.

Freezing and Thawing of GRs

As GRs are similar in size to mammalian embryos, bovine embryo-freezing medium was used with slight modifications [17, 18]. In brief, PBS based medium containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 5.5 mM D-glucose, and 1.5 M cryoprotectant: dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol (Gly), propylene glycol (PG), or ethylene glycol (EG). Chemicals and reagents were all purchased from Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan. The media were cooled on ice prior to use. The collected GRs were suspended in 300 µl of freezing medium, transferred to cryotubes (Greiner, Frickenhausen, Germany) and equilibrated for 15 min on ice. The tubes were then slowly frozen using a Bicell plastic freezing container (Nihon Freezer Co., Ltd., Tokyo, Japan) at -1°C/min for 90 min in a deep freezer (-80°C) and plunged into liquid nitrogen. After at least 12-h cryopreservation, the tubes were thawed in a water bath for 20 sec at 25°C and rehydrated with PBS.

Freezing and Thawing of spermatozoa

Spermatozoa collected from non-transgenic males were diluted 1:3 in the cryomedium containing 20% methanol and 400mM sucrose. The spermatozoa were then loaded into 0.25ml French straw (Fujihira Industry CO., LTD., Tokyo, Japan) and frozen on dry ice. After 5 minutes, the straws were plunged into liquid nitrogen. Straws were thawed by gently agitating in 10°C water bath for 10 seconds. After thawing, spermatozoa were immediately used for fertilization.

Assessment of PCG Survival

Prior to cryopreservation, five paired GR samples were pooled in one well of a 96-well plate and the initial number of GFP-labelled PGCs was counted under an inverted microscope (IX 70, Olympus) equipped with a GFP filter set. The GRs were then transferred to a cryotube and frozen using the method described above. After thawing, the GRs were dissociated with trypsin [16] and transferred to a 96-well plate, followed by the addition of trypan blue dye. The number of GFP-positive cells that were negative for trypan blue was counted. The survival rates were calculated according to following formula: survival rate = number of GFP (+) and trypan blue (–) cells/initial number of GFP (+) cells. As a control, the survival of trypsin-dissociated GRs without freezing was also calculated in the same procedure. All experiments were repeated at least three times and the results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Cell-Transplantation Procedure and Donor PGC Analysis

A donor cell suspension was prepared from 30–50 pairs of cryopreserved or freshly isolated (non-cryopreserved control) GRs of the *pvasa-Gfp* transgenic strain. Newly hatched (32–34 dpf) non-transgenic hatchlings were used as recipients. Cell transplantation and the observation of donor PGCs in the recipients were performed as described by Takeuchi and colleagues [11] with several modifications. Briefly, 15–20 PGCs were injected into each recipient fish. In the colonization analysis, donor cells were prepared from 0-day (control), 1-day, and 10-month-cryopreserved GRs. Transplantation was performed 3 or 4 times on different days and at least 30 recipients were used in each

transplantation experiment. All the recipients were sampled at 30-day post-transplantation (dpTP) and the colonization of donor PGCs in their gonads was evaluated. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan multiple-range test and are represented as the mean $\pm$ SEM.

Progeny Test

To analyze the germline transmission of the donor-derived phenotype, 0 (non-cryopreserved control), 1, and 5-day-cryopreserved PGCs were used for transplantation. The recipients were allowed to mature for 2-3 years. Milt was then collected from male recipients. DNA was extracted from 1 μ l of each milt sample and subjected to PCR analysis with *Gfp*-specific primers [11]. To examine whether the *Gfp*-positive milts contained functional spermatozoa derived from donor PGCs, they were used to fertilize 1,500–2,000 eggs from non-transgenic females. To confirm whether cryopreserved PGCs differentiated into functional eggs in the female recipients, the eggs stripped from each mature female recipient were fertilized with cryopreserved spermatozoa obtained from non-transgenic males. Two straws were used to inseminate 1000-3000 eggs obtained from female recipients. F1 embryos were raised until the hatching stage and then screened for the donor-derived phenotype (that is, green fluorescence in the PGCs). The donor PGCs were heterozygous for the *Gfp* gene and half of the F1 fish showed the non-transgenic phenotype. The actual germline transmission rate was therefore doubled.

Observation of sperm motility and F2 development

One microliter of spermatozoa extracted from F1 that produced from the eggs derived from cryopreserved PGCs was diluted in 100 μ l of 1.1% NaHCO₃ solution and the duration of sperm motility was measured. As a control, the duration of sperm motility of spermatozoa obtained from normal males was measured in the same procedure. To examine developmental potency of F2 embryos, the fertilization, eyed, hatching, swimming up rates were examined at 15-hour, 24-day, 35-day, and 65-day post-fertilization, respectively.

RESULTS

Optimization of Freezing Condition for Trout GRs

As the number of PGCs was limited (<100 per embryo) [19], we attempted to preserve the GR tissues in order to avoid losses of PGCs during freezing and thawing.

We initially examined the activity of four types of cryoprotectant: DMSO, Gly, PG, and EG. GRs excised from 30-day post-fertilization (dpf) embryos were cryopreserved in medium containing 1.5 M cryoprotectant. After freezing for 12 h, the GRs were rapidly thawed and enzymatically dissociated. PGC survival, assessed by trypan blue dye-exclusion, was significantly higher using medium containing EG compared with the other cryoprotectants (Fig. 1A). An EG concentration of 1.8 M resulted in the highest survival of the thawed PGCs ($51.3 \pm 7.25\%$; Fig. 1B). GFP-positive GR cells, which stained negative for trypan blue dye, showed active movement with extended pseudopodia over time. This is a typical characteristic of PGCs (Fig. 1C-G).

Transplantation of Cryopreserved PGCs to the Allogenic Recipients

To examine whether the cryopreserved PGCs could colonize the recipient gonads, they were transplanted into the peritoneal cavities of non-transgenic hatchlings. All recipient fish were sampled at 30-day post-transplantation (dpTP) and their gonads were observed under a fluorescent microscope. At this time point, the survival rates of the recipient fish that received cryopreserved PGCs were similar to that of control group that received non-cryopreserved PGCs (Table 1). The frequencies of colonization obtained by

transplantation of cryopreserved PGCs were not significantly different from that of control group, indicating that our freezing method was suitable for the long-term preservation of trout PGCs. Recipients showed 1 or 2 GFP-positive cells in their gonads at 15 dpTP (data not shown). This number increased to a maximum of 35 in 1-day-cryopreserved group (Fig. 2A and B) and 56 in 10-month-cryopreserved group (Fig. 2C and D) at 30 dpTP. As 15-20 donor PGCs were originally transplanted, these cells had proliferated in the recipient gonads.

Germline Transmission of Donor PGCs

To determine whether functional spermatozoa and eggs could be produced from cryopreserved PGCs, mature recipients were subjected to progeny tests (Table 2). Donor-derived spermatozoa were detected in the milt of male recipients using the polymerase chain reaction (PCR) with *Gfp*-specific primers. Of the 64 mature male recipients that received 1-day-cryopreserved PGCs, eleven produced *Gfp*-positive milts (Table 2 and Fig. 3A). These milts were used to inseminate eggs from non-transgenic females. After hatching, the F1 progeny were observed under fluorescent microscopy to identify any individuals showing the donor-derived phenotype (that is, GFP-positive PGCs). Spermatozoa derived from five (7.8%) of the male recipients produced F1 progeny with the donor-derived phenotype. Similar results were obtained with recipients that received 5-day-cryopreserved PGCs (Table 2). The germline transmission frequency of the donor-derived F1 was 0.1-13.5%. This low value could be due to the relatively small contribution of the donor PGCs to the recipient germlines. There was correlation between

the band intensity in the PCR analysis and germline transmission frequencies. Indeed, the milts showing faint band (Fig. 3, sample number 10, 16, and 19) failed to produce donor-derived F1 progeny.

Owing to the limited number of eggs, and technical difficulties in extracting genomic DNA caused by the large volume of yolk, a progeny test for female recipients was performed without PCR analysis. Of the 44 recipients injected with 1-day-cryopreserved PGCs, four (9.1%) produced donor-derived F1 progeny (Fig. 3B, Table 2). A female recipient that was transplanted with 5-day-cryopreserved PGCs also produced F1 showing donor-derived phenotype. The viable fry produced from eggs derived from the cryopreserved PGCs have shown normal growth (Fig. 3C).

Fertility of F1 produced from cryopreserved PGCs

Five F1 males that produced from eggs derived from 1-day-cryopreserved PGCs matured at 10 months old. To determine whether the F1 produce functional spermatozoa, motility of the spermatozoa and early survival of F2 were examined. The sperm motility of the five fish was >90% (data not shown) and the duration of sperm motility was approximately 30 seconds, which did not significantly differ from that of normal trout sperm (Table 3). Further, the F2 generations derived from the five F1 showed normal development. These results indicate that the F1 fish produced from eggs derived from cryopreserved PGCs were fertile and that their genetic information preserved in liquid nitrogen could be amplified through ordinary crossing.

DISCUSSION

This study established a cryopreservation method for trout PGCs. These cells could subsequently be converted into functional eggs in female recipients and produce viable fry upon fertilization with cryopreserved spermatozoa. Further, the resulting progenies were proved to be fertile. The PGCs retained the ability to differentiate into both spermatozoa and eggs; thus, this technique conserves not only nuclear genetic information but also maternally transmitted cytoplasmic material. Our method represents a promising tool in the cryobanking of fish genetic resources. Moreover, in combination with our previously reported technique for xenotransplantation between closely related species using freshly isolated PGCs [12], it could realize the restoration of endangered fish species.

One potential limitation of our study was the fact that the donor PGCs were labelled with *Gfp* gene. However, this method would not be appropriate for use with cryopreserved PGCs from wild donor fish. An alternative labelling method is therefore required. A non-transgenic method for visualizing PGCs using *Gfp*-RNAs was recently reported [20] and might be suitable for restoring endangered fish species. An additional problem was the relatively low rate of germline transmission of donor PGCs (Table 2). However, the transplantation method used in this study was extremely simple. Together with high fecundity of most fish species, we can overcome this problem by transplanting PGCs in to large number of recipients. In mice, exclusively donor germ cell-derived progeny have been produced using sterile recipients [21]. Improved results might therefore be achieved using sterilized fish, such as triploid individuals, as recipients in our newly developed

system.

The restoration of live individuals from cryopreserved embryos has been reported in common carp (*Cyprinus carpio*) [22] and flounder (*Paralichthys olivaceus*) [23] using modifications of freezing methods developed for mammalian oocytes and embryos. However, the recovered fish survived for only a few days. Fish eggs and embryos are large and have high volumes of yolk materials compared with those of mammals. This makes it difficult to ensure that a sufficient volume of intracellular water is replaced with cryoprotective agents [10]. In addition, salmonid eggs and embryos are particularly large (diameter: 4–7 mm) compared with those of other fish species (diameter: 0.8–1 mm). The freezing methods used for mammalian oocytes and embryos are therefore unlikely to be suitable for use in fish, particularly salmonids.

Here we cryopreserved PGCs within GRs, which have two or three cell layers and are ~100 μm thick (data not shown). These tissues are similar in size to mammalian embryos [24]. Their smaller size might allow the cryoprotectant to permeate the tissue more effectively, reducing the formation of intracellular ice, which is generally lethal to cells. The superior cryoprotective activity of EG might be due to its low molecular weight compared with the other cryoprotectants examined (Fig. 1A). Similar results have been reported in human embryos [25].

PGC cryopreservation has important applications in fish farming. The growth of intensive farming has increased the need for effective means of preserving germplasm for broodstock management and genetic-improvement programmes. The absence of freezing methods for eggs and embryos has meant that fish strains have been preserved by raising

parental fish. However, this approach is costly, and is susceptible to natural disasters, pathogen invasions, and genetic dilution of the desired traits due to repeated crossing. Our method overcomes these problems, is simple, and does not require complex devices, such as programmable freezers. It could therefore be applied in salmon hatcheries equipped with deep-freezers and liquid-nitrogen tanks.

REFERENCES

1. Tuomisto., J.T., Tuomisto, J., Tainio, M., Niittynen, M., Verikasalo, P., Vartiainen, T., Kiviranta, H., and Pekkanen, J. (2004). Risk-benefit analysis of eating farmed salmon. *Science* 303:266-269.
2. McGinnity, P., Prodohl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Maoileidigh, N.O., Baker, N., Cotter, D., O’Hea, B., Cooke, D., Rogan, G., Taggart, J., and Cross, T. (2003). Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proc R Soc Lond* B270:2443-2450.
3. Gross, M.R. (1998). One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Can J Fish Aquat Sci* 55:131-144.
4. Rubidge, E.M. and Taylor, E.B. (2004). Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Mol Ecol* 13:3735-3749.
5. Neraas, L.P. and Spruell, P. (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Mol Ecol* 10:1153-1164.
6. U.S. Fish & Wildlife Service. Trout, Little Kern golden (*Oncorhynchus aguabonita whitei*). Web (URL:

http://ecos.fws.gov/species_profile/servlet/gov.doi.species_profile.servlets.SpeciesProfile?sPCODE=E01Z#status). (July 2005).

7. Gwo, J.C., Ohta, H., Okuzawa, K., and Wu, H.C. (1999). Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology* 51:569-582.
8. Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., Allendorf, F.W., and Knudsen, K.L. (1986). Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. *Aquaculture* 57:289-298.
9. Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., and Allendorf, F.W. (1991). Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J Exp Zool* 260:382-390.
10. Chao, N.H. and Liao, I.C. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197:161-189.
11. Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Bio Reprod* 69:1142-1149.
12. Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004). Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430:629-630.
13. 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.

14. 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.
15. Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2001). Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol Reprod Dev* 59:380-389.
16. 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. *Mol Reprod Dev* 67:91-100.
17. Martinez, A.G., Brogliatti, G.M., Valcarcel, A., and de ras Heras, M.A. (2002). Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology* 58:963-972.
18. Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol Biochem* 28:497-480.
19. Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., and Takeuchi, T. (2000). Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev* 55:364-371.
20. Yoshizaki, G., Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T., and Takeuchi, T. (2005). Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Bio Reprod* 73:88-93.

21. Ogawa, T., Dobrinski, I., Averböck, M.R., and Brinster, R.L. (2000). Transplantation of male germ cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 6:29-34.
22. Zhang, X.S., Zhao, L., Hua, T.C., and Zhu, H.Y. (1989). A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Letters* 10:271-278.
23. Chen, S.L. and Tian, Y.S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63:1207-1219.
24. Kaidi, S., Donnay, I., Lambert, P., Dessy, F., and Massip, A. (2000). Osmotic behavior *in vitro* produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41:106-115.
25. Chi, H.J., Koo, J.J., Kim, M.Y., Joo, J.Y., Chang, S.S., and Chung, K.S. (2002). Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. *Hum Reprod* 17:2146-2151.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Optimization of freezing conditions for trout PGCs.

A) Survival rates of trout PGCs cryopreserved with medium containing 1.5 M of DMSO, Gly, PG or EG ($n = 3$). Data represent the mean $\pm$ SEM. EG gave significantly higher survival of PGCs than the other protectants. Control represents the survival of trypsin-dissociated PGCs without freezing. **B)** Comparison of various concentrations of EG ($n=16$). Data represent the mean $\pm$ SEM. **C-G)** Time-lapse images of thawed PGCs. Fluorescence view of the genital ridge-cell suspension immediately after dissociation (**C**). The PGCs exhibited intense green fluorescence (arrow). Bright view of the PGCs shown in **C** under greater magnification ($\times 400$) (**D-G**). The PGCs actively moved with extended pseudopodia (arrowheads). Bars = 50 μm (**C**) and 20 μm (**G**).

FIG. 2. Colonization and proliferation of cryopreserved PGCs in the recipient gonads.

Donor PGCs prepared from 1-day-cryopreserved GRs (**A** and **B**) and 10-month-cryopreserved GRs (**C** and **D**) were transplanted into the peritoneal cavity of non-transgenic hatchlings. **A** and **C**) Ventral view of the peritoneal cavity of recipients at 30 dpTP as indicated by the red rectangle in the inset. Donor-derived PGCs were incorporated in the recipient gonads indicated by arrows. The incorporation of donor PGCs was confirmed in the isolated gonads (**B** and **D**, shown in **A** and **C**, respectively). The number of PGCs increased from 15-20 (originally injected) to 35 in **B** and 56 in **D**. Bars = 200 μm .

FIG. 3. Germline transmission of the donor-derived phenotype to the F1 progeny.

A) PCR analysis of the recipient milts with *Gfp*-specific primers. The lanes are labelled as follows: N, negative control (no template); P, positive control (*Gfp*-plasmid); 1–24, DNA extracted from the spermatozoa of male recipients that received 1-day-cryopreserved PGCs. Seven milts were positive for *Gfp* gene (yellow arrowheads). **B)** Ventral view of the peritoneal cavity of the F1 progeny produced from eggs derived from cryopreserved PGCs. The donor-derived phenotype was confirmed by GFP expression in the PGCs (white arrowheads). **C)** F1 progenies produced from eggs derived from cryopreserved PGCs at 6-months old. These fish have shown normal growth. Bars=200 μ m (**B**) and 1 cm (**C**).

TABLE 1. Colonization efficiency of donor PGCs in the recipient gonads.

Duration of storage in LN ₂	No. recipient ^a	No. recipients survived ^b	No. recipients with GFP-positive cells in the gonads at 30 dpTP ^{bc}
0 day	145	127 (98.5 ± 0.86)	18 (12.5 ± 4.8)
1 day	157	134 (86.5 ± 10.3)	14 (10.1 ± 3.9)
10 months	104	99 (90.5 ± 5.52)	26 (20.6 ± 11.9)

^a The sum of 3 or 4 independent experiments with at least 30 recipients each.

^b Parentheses indicate means ± SEM of 3 or 4 independent experiments.

^c dpTP=day post-transplantation.

Table 2. Results of Progeny Test

Duration of storage in LN ₂ (days)	No. recipients	Recipient sex & age (years)	No. of recipients			Contribution rates of donor PGCs to F1 generation (%) ^{bc}
			mature	PCR positive ^a	producing donor-derived offspring ^b	
0	110	male 3	68	NE	7 (10.3)	0.18, 1.01, 3.32, 3.35, 4.06, 4.09, 16.31
		female 3	33	NE	4 (12.1)	0.19, 1.50, 1.61, 7.62
1	110	male 3	64	11	5 (7.8)	2.02, 2.04, 2.45, 13.06, 13.51
		female 3	44	NE	4 (9.1)	0.09, 0.14, 1.81, 3.32
5	71	male 2	18	2	1 (5.6)	0.12
		female 2	16	NE	1 (6.5)	0.85

^a PCR analysis of milts with GFP specific primers. NE=not examined.

^b Parentheses indicate percentage of recipients that produced donor-derived offspring among mature recipients.

^c Because donor PGCs were heterozygous for Gfp gene, the rates were doubled.

TABLE 3. Development of F2 generation

No. mature male F1	Sperm motility (sec)	No. embryos fertilized	% fertilized	% eyed	% hatching	% swim up
1	30.3 ± 1.9	384	100	99.2	99.2	92.7
2	29.0 ± 1.5	357	100	99.2	99.2	98.3
3	27.3 ± 2.4	403	100	99.5	99.5	97.0
4	28.3 ± 1.6	256	98	98.8	97.3	95.7
5	33.7 ± 5.7	403	98	99.5	99.3	97.8
control	28.6 ± 0.9	308	100	98.7	97.7	94.5

FIG. 1

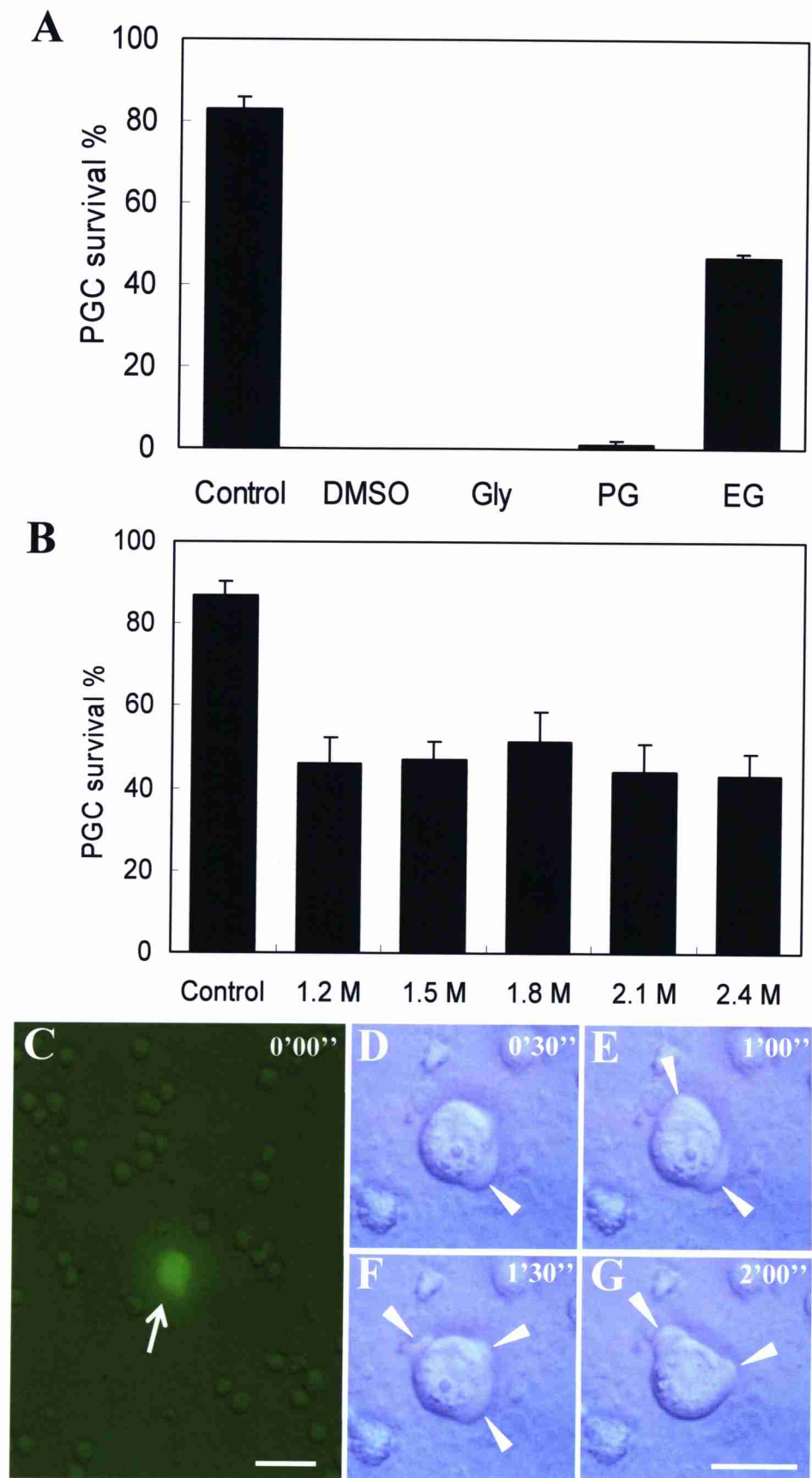


FIG. 2

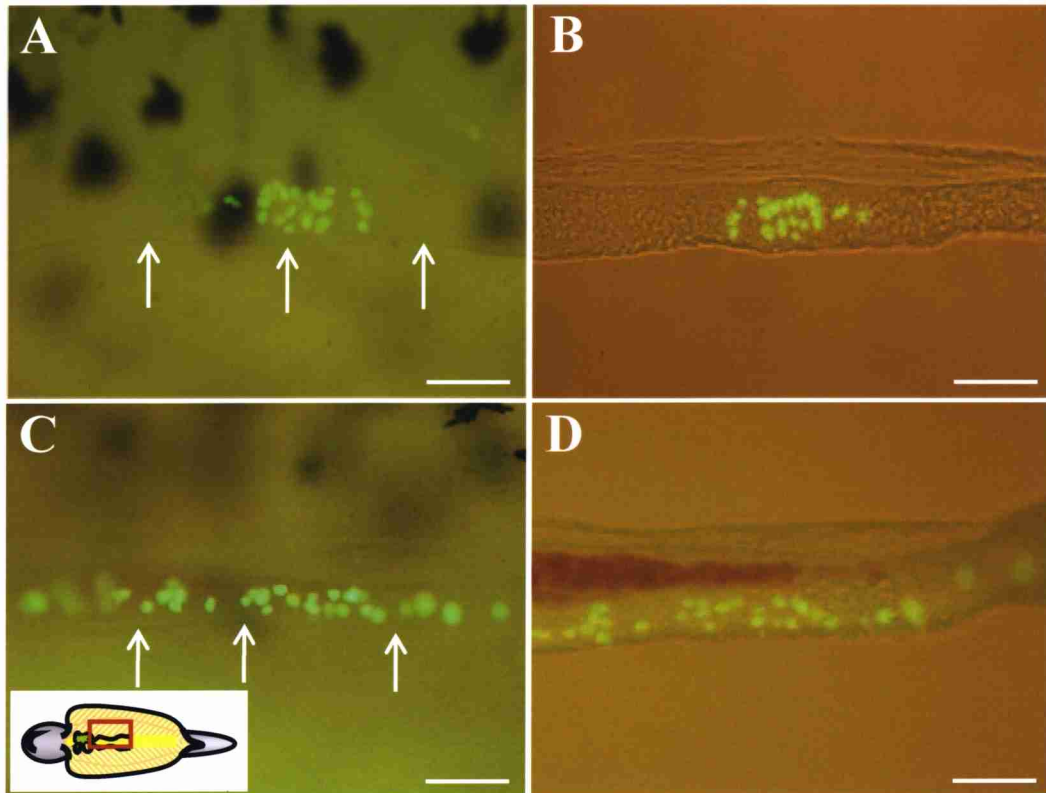
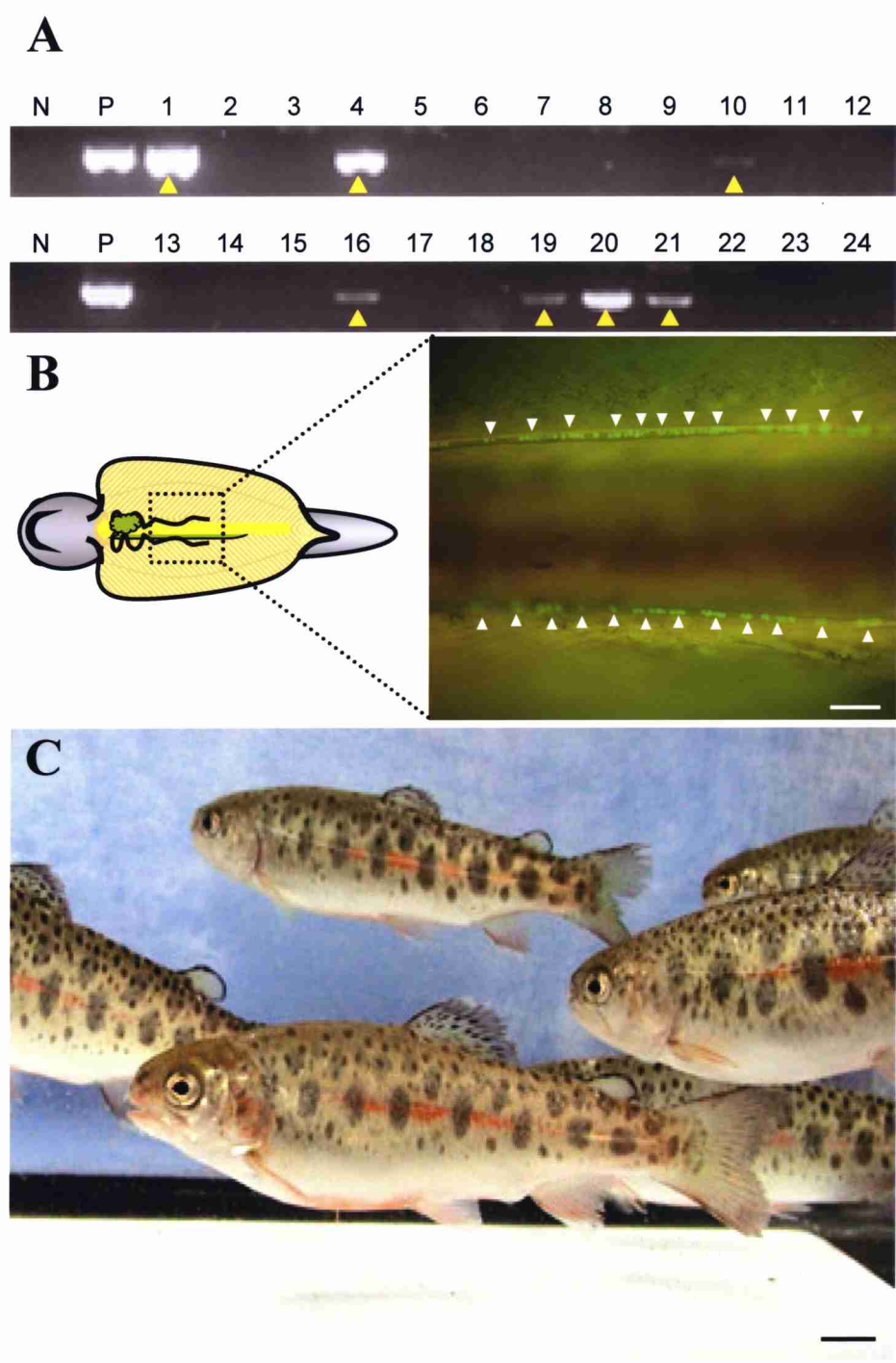


FIG. 3



第2章

vasa 遺伝子の種間多型を利用した 非遺伝子組換えドナー由来生殖細胞検出法の検討

緒 言

第1章では、ニジマスモデルとして PGC の凍結保存方法を確立し、凍結保存した PGC に由来する正常なニジマス個体の再生が可能であることを実証した。今後、この技術を多くの絶滅危惧魚種や養殖魚種に応用することが期待される。

前章においては、ドナーに PGC が緑色蛍光を発する *pvasa-Gfp* 遺伝子組換え系統 (Yoshizaki et al., 2000b; Takeuchi et al., 2002) を用いたことで、1) 移植した PGC が宿主の生殖腺に取り込まれるか否か、2) 成熟した雄宿主が移植した PGC に由来する精子を産生しているか否か、3) 移植した PGC に由来する F1 世代が産生されているか否かを、蛍光を指標として容易に鑑別することが可能であった。しかし、実際の絶滅危惧魚種や養殖魚種にはそのような系統は存在しない。同様の方法を他の魚種に応用する場合、各魚種で遺伝子組換え系統を作成する必要がある。しかし、遺伝子組換え系統の作成には長い年月が必要となるため、個体数が少なく、早急な対処を要するような絶滅危惧魚種や成熟に年数を要する養殖魚種には有効な方法とは言えない。また、絶滅危惧魚種を使って遺伝子改変を行うことは、倫理的、法的に問題となる可能性も高い。したがって、遺伝子組換え系統を作成せずに、ドナー由来の生殖細胞を検出する方法の開発が望まれる。

非遺伝子組換えドナー生殖細胞の検出に有効な方法として、*vasa*3'UTR *Gfp*-RNA を受精卵に導入し、PGC を可視化する方法がすでに開発されている (Wolke et al., 2002; Yoshizaki et al., 2005)。この方法では、*Gfp* 遺伝子の翻訳領域の下流に *vasa* 遺伝子の 3'非翻訳領域 (3'UTR) を付加し、*in vitro* で合成した cRNA を用いている。*vasa* 遺伝子は生殖細胞で特異的に発現する遺伝子であり、その 3'UTR は *vasa*-mRNA を生殖細胞で特異的に安定化させる働きを持つ (多湖, 2002; Knaut et al., 2002)。そのため、*vasa*3'UTR *Gfp*-RNA が導入された胚では、PGC が特異的に緑色蛍光を発する。したがって、この処置を施した胚から得られた PGC を移植した宿主では、ドナーの PGC を、蛍光を指標として容易に確認することが可能である。しかしながら、導入された

合成 RNA は、時間とともに分解されるため、ドナー PGC の追跡が可能な期間が限られている。また、合成 RNA は次世代には伝わらないため、宿主がドナー系統由来の配偶子を生産したか否かを判別することができない。

生物の各種、各系統は、それぞれに特有の塩基配列を有している。集団遺伝学の分野では、この塩基配列の違い (DNA 多型) を利用した、種や系統 (同種内地理的個体群) の判別が行われている。一般的な方法には、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法や RAPD (Random Amplification of polymorphic DNA) 法が挙げられる (谷口・高木, 1997)。これら DNA 多型を用いた種判別法は、遺伝子組換えや合成 RNA の導入のような操作を必要とせず、生物自身が持つ塩基配列を利用するため、どのような魚種・系統にも応用が可能である。そこで、第2章では、DNA 多型を利用し、非遺伝子組換えドナー由来生殖細胞を検出する方法の開発を目的とした。

ドナーの PGC を宿主に移植し、宿主がドナーに由来する配偶子を作出しているか否かを、種間の DNA 多型を利用して確認するためには、宿主の精子、または卵から作出した F1 世代の DNA 多型をドナーと比較すればよい。しかし、移植が失敗していたとしても、宿主が成熟するまで実験の成否を知ることができない。特に、サケ科魚類の様に成熟に長い年月を要する種を宿主に用いた際には、結果が分かるまでに 1~3 年の飼育期間が必要になる。したがって、宿主が成熟する前に、宿主の生殖腺内にドナー由来の生殖細胞が存在していることを確認することが出来れば、移植の成否を判断するうえで非常に有効な手段となる。

PGC を移植した宿主の生殖腺内には、宿主自身の生殖細胞と体細胞、およびドナーの生殖細胞と体細胞が存在している可能性がある (図1A, B)。この中からドナーの生殖細胞のみを検出するには、宿主とドナーの細胞を判別するだけでなく、ドナーの生殖細胞と体細胞も判別しなければならない。しかし、生殖細胞も体細胞も、同じドナー個体に由来するものであれば、全く同じゲノム DNA を有している。そのため、宿主生殖腺のゲノム DNA を用いてドナー魚種に特異的な DNA 多型を検出した場合、それがドナーの生殖細胞に由来するものなのか、それともドナーの体

細胞に由来するものであるのかを判断することができない。そこで、本実験では、生殖細胞と体細胞を判別するために、生殖細胞で特異的に発現する *vasa* 遺伝子に着目した(図 1B)。*vasa* 遺伝子の種間・系統間の多型をもとにドナー系統の *vasa* 遺伝子に特異的な PCR プライマーを作成し、Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)により、宿主の生殖腺中にドナー系統の *vasa* mRNA(cDNA)が検出できれば、ドナー由来生殖細胞が存在していることの証拠となる(図 1C, D)。また、同じプライマーを用いて、宿主の精子ゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことにより、ドナー由来精子の検出も可能である。同様にして、宿主の卵から作成した F1 のゲノム DNA を鋳型に用いれば、ドナー由来の卵が作出されているか否かも確認することが可能である。

そこで本実験では、まず、ゲノム DNA レベルで *vasa* 遺伝子の種間多型がドナー由来生殖細胞の検出に利用可能か否かを検証した。ドナーに *pvasa-Gfp* ニジマス系統、宿主にイワナを用いて精原細胞の移植を行った(奥津, 2003)。このイワナ宿主がニジマスの精子を作出しているか否かを確かめるために、ドナー精子に特異的な *Gfp* 遺伝子のプライマーを用いて PCR スクリーニングを行った。さらに、ニジマス内在性 *vasa* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、*Gfp* 遺伝子のプライマーを用いた PCR と同じ結果が得られるか否かを検証した。つづいて、宿主の生殖腺 cDNA を鋳型とした RT-PCR により、宿主生殖腺内に存在するドナー由来生殖細胞の検出が可能か否かを検証した。ここでは、第 1 章で確立した方法により凍結保存したイトウの PGC をニジマスに移植した。移植後 1 ヶ月および 3 ヶ月の宿主生殖腺から得られた cDNA を鋳型に、イトウ *vasa* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、ニジマス宿主の生殖腺内にイトウの生殖細胞が存在しているか否かを確認した。

材料と方法

1. 供試魚

・ニジマス

本学水圏科学フィールド教育研究センター陸水域生産フィールド大泉ステーションにおいて、水温 10℃の流水を用いて継代飼育されている野生型ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*) 3 歳の雌から採取した卵と1歳または2歳の雄から採取した精子を浸漬法(矢部, 2000)によって受精した。得られた受精卵は、10℃の流水水槽で飼育し、孵化直後の稚魚(積算水温 320~350℃・day)をイトウ PGC 移植実験の宿主として用いた。ニジマス精原細胞の移植に用いたドナー細胞は、本研究室で系統化されている *pvasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマス(Yoshizaki et al., 2000b; Takeuchi et al., 2002)から調整した。

・イワナ

本実験に使用したイワナは、本学大泉ステーションにおいて、上述の条件で継代飼育されているイワナ(*Salvelinus leucomaenis*)を使用した。3 歳の雌から卵を採取し、3 歳の雄から採取した精子と受精した。得られた受精卵はニジマスと同様の方法で孵化(積算水温 420~460℃・day)まで飼育し、宿主として用いた。

・イトウ

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所より供与されたイトウ(*Hucho perryi*)の発眼卵を本学大泉ステーションにおいて 10℃の流水水槽で飼育した。孵化(積算水温 310~340℃・day)後、移植実験のドナーとして用いた。

2. cDNA の合成

・イワナ卵巣cDNA

4ヶ月齢の雌イワナ(体長: 4cm, 体重: 0.87g)から卵巣を摘出しドライアイス上で急速凍結し

た。このサンプルからISOGEN (ニッポンジーン) により、添付のプロトコールに従い全RNAを抽出した。続いて、最終濃度2.2Unit/ml RQ1 RNase-free DNase (Promega)、RNase Inhibitor (東洋紡株式会社)、40mM Tris-HCl (pH7.8)、10mM NaCl、6mM MgCl₂、1mM dithiothreitol溶液中で37℃にて60分間DNA分解反応を行った後に、中山ら(1995a)の方法により、フェノール抽出、エタノール沈殿により精製された全RNAの濃度及び純度を測定した。得られた全RNAのうち2μgを鋳型としてReady To Go You-Prime First-Strand Beads (GE healthcare Life Science)により、オリゴ(dT)アダプタープライマー(プライマー一覧)を用いて第1鎖cDNAを合成した。5' RACEに用いたcDNAは、1μgの卵巣RNAから、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech タカラバイオ株式会社)を用いて合成した。

・イトウ精巣 cDNA

11 ヶ月齢のイトウ雄(体長:11.6cm、体重:20.9g)から精巣を摘出しドライアイスで急速凍結した。このサンプルからイワナと同様の方法で RNA 抽出、および cDNA 合成を行った。

・ニジマス精巣 cDNA

11 ヶ月齢のニジマス雄(体長:13.2cm、体重:31.9g)から精巣を摘出しドライアイスで急速凍結した。このサンプルからイワナと同様の方法で RNA 抽出、および cDNA 合成を行った。

3. イワナ *vasa* 遺伝子断片の単離

・DNA断片①; 図2A-①

合成したイワナ卵巣cDNAを鋳型とし、ニジマス*vasa*遺伝子の単離に用いたdegenerateプライマー(*vasa*-F1 および *vasa*-R2a; Yoshizaki et al., 2000a, プライマー一覧、)を用いて下記の条件にてRT-PCRを行った。PCR反応は、卵巣cDNA0.1μlを鋳型とし、1μMの各プライマー、および0.2mM dNTP、0.25Unitの*TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ株式会社)を含む1×*Ex Buffer*10μl中で、I の条件で行った(PCR反応条件一覧)。これにより、約900bpのDNA断片①を得た。

•DNA断片②；図2A-②

下流の3'非翻訳領域の塩基配列を得るために、ニジマス *vasa* 3'UTR 特異的プライマー (RT*vasa*3'UTR-F; Yoshizaki et al., 2005, プライマー一覧)、およびVect-APIプライマーとNestedプライマー (Vect-AP2, プライマー一覧)を用いて3'RACE法を行った。PCR反応は、イワナ卵巣cDNA0.1μlを鋳型に、上述の*EX Taq*を用いた系で、IIの条件で行った (PCR反応条件一覧)。これにより約700bpのDNA断片②を得た。

•DNA断片③；図2A-③

DNA断片①および②の塩基配列情報を元に、断片①と断片②の間をカバーするように作成したプライマー (*vasa* common Fw, *vasa* common Rv; プライマー一覧)を用い、RT-PCRを行った。PCR反応は、イワナ卵巣cDNA0.1μlを鋳型に、*EX Taq*を用いた系で、IIIの条件で行った (PCR反応条件一覧)。これにより約330bpのDNA断片③を得た。

•DNA断片④；図2A-④

DNA断片①の塩基配列を元に、イワナ *vasa* 遺伝子特異的プライマー (GSP1およびGSP2; プライマー一覧)を設計し、5'RACE法によりcDNA5'側の領域を増幅した。PCR反応は、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kitを用いて合成したイワナ卵巣cDNA溶液1μlを鋳型とし、キットに付属の0.4mM Universal Primer A Mix long (UPM; プライマー一覧)、および1μM GSP1を用い、*Ex Taq* の系で、IVの条件で行った (PCR反応条件一覧)。つづいて、非特異的に増幅したなバンドを除去するために、得られたPCR産物を鋳型にNested PCRを行った。PCR反応は、1st PCR産物0.01μlを鋳型に、キットに付属の1μM Nested Universal Primer A Mix (NUP; プライマー一覧)、1μM GSP2、0.4mM dNTP、2.5mM MgCl₂、および0.5unitsの*TaKaRa LA Taq*を含む1×*LA Taq* (タカラバイオ株式会社)バッファー10μl中にて、Vの条件で行った (PCR反応条件一覧)。これにより約900bpのDNA断片④を得た。

4. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は、全て以下の方法で行った。RT-PCR によって増幅した PCR 産物を、0.5×TBE 緩衝溶液を含む 2%アガロースゲルを担体として 100V の定電圧で電気泳動に供した。電気泳動後、目的の DNA 断片を含むゲル片をメスにて切り出し、Ultra Clean 15 DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories Inc) を用い、添付のプロトコールに従って目的の DNA 断片の精製を行った。精製した DNA 断片を pGEM-T Easy Vector (プロメガ株式会社) へ組み込んだ。ライゲーション反応は、RT-PCR で得られた DNA 断片 100ng、pGEM-T Easy Vector 25ng、T4 DNA Ligase (プロメガ株式会社) 1μl を含む 10μl の混合液を作成し、16°C で 1 晩反応した。このうち 5μl を用いて、中山ら (2005b) の方法にもとづき、コンピテントセル (大腸菌株 DH5α 株) にトランスフォーメーションを行った。その後、形質転換された大腸菌株を 2×YT 液体培地で培養し、培養液から Flexi Prep Kit (GE Healthcare Life Science) によりプラスミド DNA を精製した。その後、Thermo SequenaseTM Cy5 Dye Terminator Kit (GE Healthcare Life Science) を用いてシーケンシング反応を行った。標識反応は、プラスミド DNA 1.5μl を鋳型に、universal primer または、reverse primer (プライマー一覧) 0.2μM を用い、VI の条件で行った (PCR 反応条件一覧)。反応終了後、エタノール沈殿を行い、反応溶液を精製した。精製反応溶液に、キットに付属の Stop solution を 6μl ずつ加え、73°C で 3 分間熱変性した後、氷上で急冷した。その後、これらの反応液を Long-Read TowerTM DNA Sequencer (GE Healthcare Life Science) により塩基配列を決定した。

5. ニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマーの作成

得られたイワナ *vasa* 遺伝子の塩基配列と既知のニジマス *vasa* 遺伝子の塩基配列を遺伝子配列解析プログラム Genetyx 3.1.0 (ソフトウェア開発株式会社) により比較し、イワナ *vasa* 遺伝子は増幅せず、ニジマス *vasa* 遺伝子のみを特異的に増幅する PCR プライマー (RT F6 および RT R5, プライマー一覧) を設計した。このプライマーがニジマス *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、ニジマス精巣 cDNA、イワナ卵巣 cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。PCR 反応は、EX

Taq の系を用い、Ⅶの条件で行った(PCR 反応条件一覧)。また、cDNA (mRNA)をもとに決定した塩基配列にはイントロン配列が削除されているため、ゲノム DNA を鋳型に PCR を行った場合、cDNA から得られた塩基配列から予想される分子量よりも大きいサイズのコンドになる可能性がある。そこで、ゲノム DNA を鋳型に PCR を行った際に得られるコンドサイズを確認するために、イワナの精子ゲノム DNA、およびニジマスの精子ゲノム DNA を用いて PCR を行った。PCR 反応は、精子ゲノム DNA 0.1μl を鋳型に、*EX Taq* の系を用い、Ⅷの条件で行った(PCR 反応条件一覧)。

6. イトウ *vasa* 遺伝子断片の単離およびイトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーの作成

・DNA 断片①、②、③

RT-PCR は、合成したイトウ精巢 cDNA を鋳型とし、イトウ *vasa* 遺伝子断片の単離と同じプライマーを用い、同様の条件で行った。これにより、約 900bp の DNA 断片①、約 700bp の DNA 断片②、および約 330bp の DNA 断片③を得た(図 2B-①、②、③)。得られた DNA 断片の塩基配列の決定は、前述の方法で行った。

・イトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーの作成

得られたイトウ *vasa* 遺伝子の塩基配列と既知のニジマス *vasa* 遺伝子の塩基配列を *Genetyx3.1.0* により比較し、ニジマス *vasa* 遺伝子は増幅せず、イトウ *vasa* 遺伝子のみを特異的に増幅する PCR プライマー(I/*vasa*-F1 および I/*vasa*-R1; プライマー一覧)を設計した。このプライマーがイトウ *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、ニジマス精巢 cDNA、イトウ精巢 cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。PCR 反応は、cDNA 0.1μl を鋳型とし、*EX Taq* の系でⅨの条件で行った(PCR 反応条件一覧)。

7. ニジマス精巢細胞の移植

・細胞懸濁液の調整

p*vasa*-*Gfp* 遺伝子導入ニジマス 10 ヶ月齢雄を 500ppm の 2-フェノキシエタノール(和光純薬

工業株式会社)溶液中で麻酔を施した後、外科的に精巣を摘出した。この精巣を等張液中に移し、実体顕微鏡下で精巣間膜およびそれに付随する血管を、ピンセットを用いて剥離した。また、蛍光実体顕微鏡(SZX12, オリンパス株式会社)下で得られた精巣を観察し、緑色蛍光を指標として、生殖細胞が含まれない部位を、ウェッケルシザーズ(MB-41, NAPOX 夏目製作所)を用いて切断した。このようにして得られた精巣片をさらに細かく切断し、精巣碎片を調整した。得られた精巣碎片(25~35mg)を 500 μ l の 0.5%トリプシン(Worthington Biochemical Corp, 150U/mgP, 88% Protein)溶液中に移し、20℃で 2 時間インキュベートした。インキュベート中、精巣碎片の分散を促進するために、30 分ごとにピペッティング処理を施した。得られた精巣細胞懸濁液を目開き 42 μ m のナイロンメッシュで濾過し、不完全に分散した細胞塊を除去した。得られた細胞はスイングローターを用いた冷却遠心(1500rpm, 5 分間)により沈殿させ、上清を除いた後に、5%のウシ胎児血清(Gibco invitrogen cell culture)を含む MEM 培地(日水製薬株式会社)中に再懸濁させた。細胞懸濁液を 1 つ穴血液反応板(株式会社 三商)に移し、移植を行うまでの間 10℃のインキュベーター内で保管した。

・顕微注入法による精巣細胞移植

細胞移植用のガラスピペットは、芯入硝子管(GD-1, ナリシゲ)をプーラー(PW-6, ナリシゲ)により作成した。ガラスピペットの先端の内径が 70~80 μ m になるように研磨器(EG-3, ナリシゲ)を用いて研磨した。実体顕微鏡に設置したマイクロマニピュレーター(BP-1, ナリシゲ)およびマイクロインジェクター(IM-9A, ナリシゲ)を用いて、ガラスピペット内に 13,000~20,000 細胞を含む、およそ 15nl の精巣細胞懸濁液を吸引し、これをイワナ孵化稚魚の腹腔内へ顕微注入した。移植を施した 100 尾の宿主は、水温 10℃で飼育した。

8. イワナ宿主の精子スクリーニングおよび交配試験

移植操作を施した成熟宿主(雄)が、ドナー由来精子を生産する生殖系列キメラであるか否かを確認するため、精液中におけるドナー精子に特異的な *Gfp* 遺伝子の検出を試みた。成熟宿主

より採取した精液 1 μ l から、PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Inc.) を用い、添付の
プロトコールにしたがってゲノム DNA を抽出した。PCR 反応は、精子ゲノム DNA 1 μ l を鋳型に、
1 μ M の EGFP プライマー (GFP-FW および GFP-RV; プライマー一覧) を用いた *EX Taq* の系で、
X の条件で行った (PCR 反応条件一覧)。また、同じ宿主精子ゲノムサンプルを鋳型に、前述の
ニジマス *vasa* 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行った (PCR 反応条件一覧, VIII)。PCR
により陽性のバンドが検出されたイワナ宿主の精子と野生型ニジマス卵を受精し、F1 世代を作成
した。得られた F1 は孵化まで 10°C の流水にて飼育した。

9. イトウ PGC の移植

・細胞懸濁液の調整

イトウの孵化稚魚 (360~450°C $\cdot$ day) を、実体顕微鏡下にてウェッケルシザーズおよびピンセツ
トを用いて開腹し、生殖隆起を摘出した。得られた 50~130 対の生殖隆起は、第1章で確立した
方法により、凍結 (12~36 時間)、および解凍し、PGC を含むドナー細胞懸濁液を調整した。

・顕微注入法による PGC の移植

前述の精原細胞移植と同様の方法で、ガラスピペットに 10~17 個の PGC を含む細胞懸濁液
を吸引し、ニジマス孵化稚魚 (32~35°C $\cdot$ day) の腹腔内へと移植した。また、対照区として、凍結
処理を行っていないイトウ PGC を同様の方法にて移植した。作成した宿主 (凍結保存区 110 尾、
対照区 90 尾) は 10°C の流水で飼育した。

10. イトウ PGC 移植宿主生殖腺のコロナイズスクリーニング

宿主の生殖腺内に、移植したイトウの PGC に由来する生殖細胞が存在するか否かを調べるた
めに、宿主の生殖腺から cDNA を合成し、これを鋳型にイトウ *vasa* 遺伝子特異的なプライマーを用
いて RT-PCR を行った。

・宿主生殖腺 cDNA の合成

移植 1 ヶ月後、宿主を実体顕微鏡下で、ウェッケルンザース、ピンセットを用いて解剖し、生殖腺を摘出した(凍結保存区 32 尾, 対照区 24 尾)。摘出の際、サンプル間での RNA のコンタミを防ぐために、用いた器具は、各個体を処理することに実験用洗剤で洗浄した。摘出した生殖腺は、宿主ごとに 50 μ l の ISOGEN の入ったスクリーキャップチューブに入れ、ドライアイス上で急速凍結した。解凍後、チューブに 350 μ l の ISOGEN を加え、激しくボルツェックス処理を施すことで組織を溶解させた。このサンプルから、前述の方法で RNA 抽出、および DNase 処理を行った。得られた全 RNA を鋳型とし、First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare Life Science)を用い、添付のプロトコールに従って cDNA を合成した。また、移植 3 ヶ月後、同様にして宿主の生殖腺をサンプリングした(凍結保存区 28 尾, 対照区 26 尾)。解剖の際、生殖腺の形態を観察し、卵巣の特徴であるラメラ構造を指標に各宿主の雌雄を判別した。cDNA は、得られた全 RNA のうち 1 μ g を鋳型として合成した。

・RT-PCR

PCR 反応は、合成した宿主生殖腺 cDNA の原液 1 μ l を鋳型とし、前述のイトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマー (I/*vasa*-F1 および I/*vasa*-R1) 各 1 μ M を用いた *Ex Taq* の系で、IX の条件で行った (PCR 反応条件一覧)。また、鋳型量の差の指標として、イトウ・ニジマス両種の *β -actin* 遺伝子に共通のプライマー (RT-Actin F および RT-Actin R; プライマー一覧) を用い、*Ex Taq* の系で、XI の条件で RT-PCR を行った (PCR 反応条件一覧)。RT-PCR により検出された陽性のバンドが、イトウの *vasa* 遺伝子に由来するものであるか否かを確認するために、バンドを切り出し、前述の方法により塩基配列を決定した。

結 果

1. イワナ *vasa* 遺伝子のクローニングおよびニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマーの作成

イワナ *vasa* 遺伝子のアミノ酸翻訳領域 1989bp、5'非翻訳領域 59bp、および 3'非翻訳領域 684bp の塩基配列を決定した(図 3)。このイワナ *vasa* 遺伝子の塩基配列と既知のニジマス *vasa* 遺伝子の塩基配列(Yoshizaki et al., 2000a)を比較したところ、非翻訳領域を含む全領域の相同性は 92.2%、翻訳領域の相同性は 93.4%であった。また、得られた塩基配列から推定されるイワナ *vasa* 遺伝子のアミノ酸配列は 662 残基で、DEAD ボックス RNA ヘリカーゼに保存された 8 つの保存領域が存在し、ニジマス *vasa* 遺伝子のアミノ酸配列との相同性は 91.9%であった(図 4, 5)。

次に、イワナ・ニジマス間の *vasa* 遺伝子の多型をもとに、ニジマス *vasa* 遺伝子のみを増幅するようにプライマーを作成した(図 6; プライマー一覧)。このプライマーがニジマス *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、ニジマス精巣 cDNA およびイワナ卵巣 cDNA を鋳型に、RT-PCR を行った結果、イワナ卵巣 cDNA を鋳型とした区では、バンドが検出されなかったが、ニジマス精巣 cDNA を鋳型として用いた区において予想サイズ(270bp)のバンドが検出された(図 7A)。以上の結果、このプライマーはニジマス *vasa* 遺伝子に特異的であることが明らかとなった。また、精子ゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、ニジマス精子ゲノム DNA を鋳型として用いた区において、約 1.8kb のバンドが確認された(図 7B)。この結果は、ゲノム上のニジマス *vasa* 遺伝子では、プライマー配列で認識される配列間に 1500bp 程度のイントロンが存在していることを示している。

2. ニジマス精原細胞を移植したイワナ宿主の精子スクリーニングおよび交配試験

移植後 2 年で、40 尾の生残宿主のうち 10 尾の雄宿主が成熟した。これら 10 尾の精子ゲノム

DNA を鋳型に *Gfp* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR スクリーニングを行った結果、3 尾の宿主精子に由来するゲノム DNA を鋳型とした区において、*Gfp* 遺伝子に特異的なバンドが検出された(図 8A)。続いて、イワナ・ニジマス間の *vasa* 遺伝子の多型を利用してドナー由来生殖細胞の検出が可能か否かを確認するために、同じ 10 尾の精子ゲノム DNA を鋳型として、前述のニジマス *vasa* 遺伝子に特異的なプライマー(RT F6 および RT R5; プライマー一覧)を用いて PCR を行った。その結果、*Gfp* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR でバンドが検出された 3 尾の精子ゲノム DNA を鋳型に用いた区において陽性のバンドが検出された(図 8B)。

PCR で陽性のバンドが検出された宿主が、実際に正常なニジマスを作出するか否かを確認するために、これら 3 尾のうち 2 尾の精子を野生型のニジマス卵と受精させ、交配試験を行った。その結果、多くの F1 は 360~380°C・day で孵化する雑種(イワニジ)であったが、その中に、320~340°C・day で孵化する正常なニジマスが得られた(表1)。

3. イトウ *vasa* 遺伝子のクローニングおよびイトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーの作成

イトウ *vasa* 遺伝子のアミノ酸翻訳領域 1181bp、および 3' 非翻訳領域の一部に相当する 138bp の塩基配列を決定した(図 9)。得られたイトウ *vasa* 遺伝子の部分塩基配列とニジマス *vasa* 遺伝子の相同領域の塩基配列を比較した結果、非翻訳領域を含む領域の相同性は 95%、翻訳領域の相同性は 96.3%であった。また、得られたイトウ *vasa* 遺伝子翻訳領域の部分塩基配列から推定されるアミノ酸配列は 391 残基であり、イワナ *vasa* 遺伝子と同様、DEAD ボックスファミリーの RNA ヘリカーゼに共通の 8 つの保存領域が確認された(図 10)。アミノ酸配列の相同性は、イトウ・ニジマス間では 95.4%、イトウ・イワナ間では 95.9%であった(図 5)。

イトウ・ニジマス間の *vasa* 遺伝子の多型をもとに、イトウ *vasa* 遺伝子に特異的になるようにプライマーを作成した。このプライマーがイトウ *vasa* 遺伝子に特異的であることを確認するために、ニジマス精巣 cDNA およびイトウ精巣 cDNA を鋳型に RT-PCR を行った結果、ニジマス精巣 cDNA を鋳型に用いた区ではバンドが検出されなかったが、イトウ精巣 cDNA を鋳型として用いた区に

において予想サイズ(199bp)のバンドが検出された(図 11A)。イトウ鰭ゲノム DNA を鋳型に PCR した結果、約 400bp のバンドが検出されたことから(図 11B)、ゲノム上のイトウ *vasa* 遺伝子では、プライマーで認識される配列間に約 200bp のイントロンが存在すると考えられる。

4. イトウ PGC を移植したニジマス宿主の生殖腺コロナイズスクリーニング

宿主生殖腺を鋳型とした RT-PCR の結果、凍結保存区、対照区の両区において、イトウ *vasa* 遺伝子に特異的な 199bp のバンドが検出された(図 12、表 2)。得られたバンドがイトウの *vasa* 遺伝子を鋳型として増幅した DNA 断片であることを確認するために、宿主 9 番のバンドを切り出し、塩基配列を調べた。その結果、この DNA 断片の塩基配列は、ドナーであるイトウ *vasa* 遺伝子の塩基配列と一致していた(図 13)。

考 察

第2章では、まず、イワナおよびイトウの *vasa* 遺伝子の部分塩基配列を決定した。これらを既知のニジマス *vasa* 遺伝子の塩基配列と比較した結果、非常に高い相同性が認められた。また、得られた塩基配列から推定されたアミノ酸の1次構造も、3魚種間で相同性が非常に高く、DEADボックスファミリーRNAヘリカーゼの特徴である8つの保存領域(Linder et al., 1989; Pause et al., 1992; Yoshizaki et al., 2000a)が認められたことから、得られた塩基配列は、間違いなくイワナ、イトウの *vasa* 遺伝子であると考えられた。しかしながら、塩基配列、アミノ酸配列とも、イワナ・ニジマス間の相同性が、イトウ・ニジマス間の相同性よりも低いという結果が得られた。これは、イワナ・ニジマス間で *vasa* 遺伝子アミノ酸配列のN末端側の相同性が低いことに起因すると考えられる。本実験で得られたイワナ *vasa* 遺伝子のアミノ酸配列とニジマス *vasa* 遺伝子のアミノ酸配列を比較すると、ニジマス *vasa* 遺伝子では、N末端側の16残基が欠損していた。ゼブラフィッシュでは、2つのグループが *vasa* 遺伝子の単離を報告しており、Yoonら(1997)は716残基のアミノ酸をコードする配列、Olsenら(1997)はそれよりもN末端側が16残基短い700残基をコードする配列を報告している。また、ティラピアでは、2つの isoform (long form: 601 残基、short form: 577 残基)が報告されており、short form のN末端側に欠損が認められている(Kobayashi et al., 2002)。これらの事実から、本実験で得られたイワナ *vasa* 遺伝子は long form であり、Yoshizakiら(2000a)が単離したニジマス *vasa* 遺伝子は short form である可能性が示唆される。一方、イトウ *vasa* 遺伝子の単離では、翻訳領域の3'側のみを単離し、アミノ酸配列のN末端側をコードする5'側の配列を単離していない。翻訳領域の3'側には Vasa タンパクの機能に重要な保存された領域が多く存在するため、ニジマス *vasa* 遺伝子と比較した際に相同性が高くなったと考えられる。

続いて、得られた塩基配列の多型をもとに、ドナー魚種(ニジマス、およびイトウ)の *vasa* 遺伝子に特異的なプライマーを作成した。RT-PCRの結果、ドナー魚種の生殖腺 cDNA を鋳型とした区でのみ、予想サイズのコピー数が検出されたことから、このプライマーはニジマスあるいはイトウの

vasa 遺伝子に特異的であることが確認された。本実験で作成したニジマスとイトウのプライマーは、どちらも *vasa* 遺伝子の翻訳領域の中央部に位置している(図 3, 6, 9)。通常、構造遺伝子内の DNA 多型は、翻訳領域よりも非翻訳領域に多く存在している。本実験においても、図 3 および図 9 に見られるように、多型は非翻訳領域に多く認められた。しかしながら、この非翻訳領域の多型を利用してプライマーを作成し、ドナー生殖細胞の検出を試みたところ、ドナー魚種を特異的に検出することができなかった。また、イワナ-ニジマス間においては、翻訳領域の 5'側にも比較的多くの多型が認められたため、この領域にニジマス *vasa* 遺伝子に特異的になるようにいくつかのプライマーを作成したが、これらも供試した全てのニジマスを検出することはできなかった(予備的実験結果)。おそらく、非翻訳領域や翻訳領域でも相同性が低い 5'端に近い領域の変異は、Vasa タンパク質の機能に大きく影響しないため、同種内でも変異が蓄積されやすいのではないかと考えられる。したがって、今後、PGC の移植において *vasa* 遺伝子の多型を利用してドナー由来生殖細胞を検出する場合、種間・種内を通じて保存性が高い翻訳領域の 3'側に存在する多型を利用してプライマーを作成する必要があるだろう。

ニジマス精原細胞の移植実験では、ドナーに *pvasa-Gfp* ニジマス系統を用いたことにより、第 1 章と同様に、*Gfp* 遺伝子に特異的なプライマーを用いてイワナ宿主の精液中にニジマスの精子を検出することができた。しかし、前述のように、遺伝子組換え系統が存在しない絶滅危惧魚種や養殖魚種では、この方法を用いることができない。本実験では、ニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマーを用いることで、*Gfp* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR とまったく同じ結果を得ることができた(図 8)。この結果は、遺伝子組換え系統が存在しない魚種をドナーに用いた場合においても、ドナー魚種と宿主魚種の内在性 *vasa* 遺伝子の種間多型を利用することで、ドナー由来精子の検出が可能であることを示唆している。また、成熟した雌宿主から得られた卵を用いて F1 世代を作成し、F1 個体のゲノム DNA を鋳型に同様の PCR を行えば、ドナー由来の卵が得られたか否かについても確認が可能であろう。

イトウをドナーとした移植実験では、宿主生殖腺のスクリーニングの結果、移植後 1 ヶ月および

3ヶ月目のニジマス宿主生殖腺内にイトウの *vasa* mRNA が存在していることが確認された(図 12、13)。この結果は、移植したイトウの PGC が、3ヶ月間、拒絶されることなくニジマス宿主の生殖腺内に生着していたことを示している。このことから、ドナー種の *vasa* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて、宿主生殖腺 cDNA を鋳型 RT-PCR を行うことで、宿主が成熟する以前に、移植の成否を確認可能であることが明らかとなった。魚類では、成熟に年数を要する魚種が少なくない。本実験で使用した、ニジマスやイワナの場合、オスでは成熟に最低1年、メスでは2年を要する。イトウはさらに長く、オスで3-4年、メスでは5-6年を必要とする(川村, 1996)。したがって、宿主の成熟を待たずに移植の成否を確認する本方法は、遺伝子組換え系統の存在しない絶滅危惧魚種や養殖魚種において PGC の移植を行ううえで非常に有効な手段となるだろう。

また、凍結保存したイトウの PGC を移植した宿主の生殖腺において、イトウ *vasa* 遺伝子の存在が確認されたことから、ニジマスを用いて確立した PGC の凍結保存方法が、絶滅危惧魚種であるイトウの PGC の保存にも有効であることが明らかとなった。本実験では、北海道大学から供与された養殖イトウを供試魚としたが、天然のイトウは、平成15年に環境省のレッドデータブックで絶滅危惧IBに指定された魚種である(環境省, 2003)。したがって、イトウの PGC が凍結保存可能であったという事実、および、解凍したイトウ PGC をニジマス宿主の生殖腺に取り込ませることができたという事実は、第1章で確立した方法が絶滅危惧魚種の保存に有効であることを示唆している。サケ科の魚種では、発生速度の違いはあるものの、異種間においても胚の形態やその発生様式が非常に類似している。本実験では、ニジマスの生殖隆起摘出と全く同様の方法でイトウの生殖隆起を摘出することが可能であった。さらに、ヤマメ(*Oncorhynchus masou*)およびブラウントラウト(*Salmo trutta*)においても、同様にして、生殖隆起の摘出、PGC の移植が可能である(Yoshizaki et al., 2005)。したがって、第1章で確立した PGC の凍結保存方法は、イトウ以外のサケ科の魚種にも適応可能と考えられる。

本実験では、*vasa* 遺伝子の種間多型を利用して非遺伝子組換えドナー由来生殖細胞の検出を試みた。生殖細胞で特異的に発現している遺伝子には *vasa* 遺伝子以外にも、*Nanos*

(Köprunner et al., 2001)、*dead end* (Weidinger et al., 2003)、*cxcr4* (Knaut et al., 2003)、*Ziwi* (Tan et al., 2002)、*Rtili* (矢野, 2004)、*scp3* (矢野, 2004)、*shippo1* (矢野, 2004)などが報告されている。しかし、これらの遺伝子は、発現時期が特定の性、または分化段階に限定されている。一方、*vasa* 遺伝子は、生殖細胞の分化過程において非常に長い間発現し続けており、ヨーロッパフナでは精子以外の全ての生殖細胞でその発現が確認されている (Xu et al., 2005)。したがって、*vasa* 遺伝子の多型を利用する方法は、宿主生殖腺内に存在するドナー由来の精子以外の全ての生殖細胞を検出可能であるという点で、非常に有効な方法といえる。しかしながら、*vasa* 遺伝子の発現を検出するだけでは、ドナーの生殖細胞が宿主の生殖腺内で減数分裂を行い、機能的な配偶子への分化を進めているか否かを知ることはできない。今後は、*vasa* 遺伝子だけでなく、*scp3* 遺伝子 (減数分裂マーカー) や *shippo1* 遺伝子 (精細胞および精子マーカー) など、複数の生殖細胞特異的遺伝子の発現を検出することで、ドナー由来生殖細胞の分化についても確認する必要があるだろう。また、絶滅危惧魚種や養殖魚種の PGC の凍結保存する際に、生殖隆起を保存することに加えて、ドナー魚種、宿主魚種の *vasa*、*scp3*、*shippo1* 遺伝子の塩基配列を入手しておくことで、移植後のドナー生殖細胞の追跡が容易になることが期待される。

参考文献

- Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., and Crum, C.P. (2000). The human *VASA* gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9585-9590
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furukawa, M., and Noce, T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12258-12262.
- Hay, B., Jan, L.K., and Jan, N.Y. (1988). A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicase. *Cell* 55:577-587.
- 川村洋司・原 彰彦・寺西哲夫・松坂 洋 (1996). イトウの養殖技術. 新魚種開発協会.
- 環境省 (2003). 水絶滅危惧魚種情報(動物種の詳細情報) 汽水淡水魚類 イトウ. レッドデータブック URL: http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., , S., Nüsslin-Volhard, C., and The Tübingen 2000 Consortium. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421:279-282.
- Knaut, H., Steinbeisser, H., Schwarz, H., and Nusslein-Volhard, C. (2002). An evolutionally conserved region in *vasa* 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the Zebrafish. *Curr Biol* 12:454-446.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y. (2002). Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech Dev* 111:167-171.

- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001). A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev* 15:2877-2885.
- Komiya, T. and Tanigawa, Y. (1995). Cloning of a gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 207:405-410.
- Komiya, T., Itoh, K., and Furusawa, M. (1994). Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 162:354-363.
- Nakano, H. (1999). Isolation and characterization of a *Bombyx vasa*-like gene. *Dev Genes Evol* 209:312-319.
- 中山広樹・西方敬人 (1995a). バイオ実験イラストレイテッド ①分子生物学実験の基礎. pp.113-120 秀潤社 東京.
- 中山広樹・西方敬人 (1995b). バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎. pp.83-87 秀潤社 東京.
- Lasko, P. F. and Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335:611-617.
- Leroy, P., Alzari, P., Sassoon, D., Wolgemuth, D., and Fellous, M. (1989). The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell* 57:549-559.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121-122.
- 奥津智之 (2003). ニジマス精原幹細胞移植によるドナー由来配偶子の作出. 東京水産大学大学院 修士論文 pp.1-19.

- Olsen, L.C., Aasland, R., and Fjose, A. (1997). A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech Dev* 66:95-105.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J* 11:2643-2654.
- Roussell, D.L. and Bennett, K.L. (1993). Ghl-1, a germ line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9300-9304.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Hamaguchi, S. (2000). The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Develop Growth Differ* 42:317-326.
- 多湖康子 (2002). GFP-*vasa* RNA による魚類始原生殖細胞の可視化、単離、および異種宿主への移植. 東京水産大学大学院 修士論文 pp.21-26.
- Takeuchi, Y., Kobayshi, T., Yoshizaki, G., 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.
- Tan, C.H., Lee, T.C., Weeraratne, S.D., Korzh, V., Lim, T.M., and Gong, Z. (2002). Ziwi, the zebrafish homologue of the *Drosophila piwi*: co-localization with *vasa* at the embryonic genital ridge and gonad-specific expression in the adults. *Mech Dev*

119:S221-224.

谷口順彦・高木基裕 (1997). 7.DNA 多型と魚類集団の多様性解析. 「魚類の DNA 分子生物学的アプローチ」(青木 宙・隆島史夫・平野哲也 編) pp. 117-137 共立出版 東京.

Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. (2000). Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127:2741-2750.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 13:1429-1434.

Wolke, U., Weidinger, G., Köprunner, M., and Raz, E. (2002). Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the Zebrafish. *Curr Biol* 12:289-294.

Xu, H., Gui, J., and Hong, Y. (2005). Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev Dyn* 233:872-882.

矢部弘美 (2000). ニジマス卵の媒精法の検討 -1.1%NaHCO₃ 溶液浸漬法-. 東京水産大学大学院 修士論文 pp.3-10.

矢野文香 (2004). フローサイトメーターを用いたニジマス精原細胞集団の単離. 東京水産大学大学院 修士論文 pp.6-23.

Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124:3157-3166.

- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., and Takeuchi, T. (2000a). Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev* 55:364-371.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., and Takeuchi, T. (2000b). 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.
- Yoshizaki, G., Tago, Y., Takeuchi, Y., Sawatari, E., Kobayashi, T. and Takeuchi, T. (2005). Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in Salmonidae. *Biol Reprod* 73:88-93.

図の説明

図 1. PGC の異種間移植における宿主生殖腺内の様子および生殖細胞発現遺伝子の塩基配列(模式図).

A) 宿主生殖腺内の様子。宿主の生殖腺内には、宿主自身の生殖細胞および体細胞に、ドナーの生殖細胞と体細胞が混在している可能性が考えられる。**B)** 宿主およびドナーの生殖細胞と体細胞の模式図。生殖細胞・体細胞とも、宿主とドナーの間で形態的な差はない。発現している遺伝子の種類は生殖細胞と体細胞で異なるものがある。**C)** 生殖細胞で特異的に発現している *vasa* 遺伝子 mRNA の塩基配列の模式図。発現する遺伝子は同じでも、その塩基配列は種間によって異なる部分(多型)が存在する(赤字)。ドナー魚種の多型の部分に PCR プライマーを作成する(矢印)。**D)** 宿主生殖腺 cDNA を鋳型にドナー魚種 *vasa* 遺伝子特異的プライマー(矢印)を用いて RT-PCR を行った場合の泳動像(模式図)。レーン N:SDW(ネガティブコントロール)、P:ドナー魚種生殖腺 cDNA(ポジティブコントロール)、1-4:宿主生殖腺 cDNA を鋳型とした区。バンドが検出された宿主の生殖腺にはドナー由来の生殖細胞が存在していると考えられる(矢尻)。

図 2. *vasa* 遺伝子の単離に用いたプライマー設計部位と増幅断片。

A) ニジマス *vasa* 遺伝子から予想される cDNA の模式図(黄ボックス)。**B)** イワナ *vasa* 遺伝子。**C)** イトウ *vasa* 遺伝子。黒線:塩基配列を決定した領域、緑ボックス:プライマーを設計した領域、青線:RT-PCR により増幅された DNA 断片。

図 3. イワナ *vasa* 遺伝子の塩基配列。

赤字:アミノ酸翻訳領域 1989bp、黒字:5'非翻訳領域 59bp および 3'非翻訳領域 684bp。青太字:ニジマス *vasa* 遺伝子との多型。下線はニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマーを作成した領域の相同配列。

図 4. イワナ *vasa* 遺伝子の全アミノ酸配列。

662 残基の中に RNA ヘリカーゼに共通の DEAD ボックス、ATP-A、ATP-B モチーフを含む 8 つの保存領域(赤字)が保存されている。

図5. *Vasa*関連遺伝子のアミノ酸系統樹.

Vasa: ラット(Komiya and Tanigawa, 1995)、マウス(Fujiwara et al., 1994)、ヒト(Castrillon et al., 2000)、ゼノパス(Komiya et al., 1994)、フナ(Xu et al., 2005)、ゼブラフィッシュ(Olsen et al., 1997, Yoon et al., 1997)、メダカ(Shinomiya et al., 2000)、ウキゴリ(AB098252)、ニジマス(Yoshizaki et al., 2000a)、ティラピア(Kobayashi et al., 2002)、ニワトリ(Tsunekawa et al., 2000)、カイコ(Nakano, 1999)、ハエ(Hay et al., 1988; Lasko and Ashburner, 1988)。**Glh** (Germ Line Helicase): センチュウ(Roussell and Bennet, 1993)。**Pl10**: マウス(Leroy et al., 1989)、ゼブラフィッシュ(Olsen et al., 1997)。系統樹はヒトP68(X52104)をもとに、UPGMA法により作成した。

図6. イワナ*vasa*遺伝子部分塩基配列(青字)とニジマス*vasa*遺伝子(黒字)の相同領域の比較.

*は相同塩基を示している。この比較により、塩基配列の異なる部分(多型)に、ニジマス*vasa*遺伝子のみを増幅するようなPCRプライマーを設計した(黄ボックス)。

図 7. ニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR.

A) 生殖腺 cDNA を鋳型とした RT-PCR。レーン N:SDW & forward/reverse 両プライマー (ネガティブコントロール)、1:ニジマス精巣 cDNA & forward/reverse 両プライマー、2:ニジマス精巣 cDNA & forward プライマーのみ、3:ニジマス精巣 cDNA & reverse プライマーのみ、4:イワナ卵巣 cDNA & forward/reverse 両プライマー。**B)** 精子ゲノム DNA を鋳型とした PCR。レーン N:SDW (ネガティブコントロール)、1-2:イワナ精子ゲノム DNA、3-4:ニジマス精子ゲノム DNA。

図 8. イワナ宿主精子ゲノム DNA を鋳型とした PCR.

A) *Gfp* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR。**B)** ニジマス *vasa* 遺伝子特異的プライマー

を用いた PCR。レーン N1:SDW (ネガティブコントロール)、N2:イワナ精子ゲノム DNA (ネガティブコントロール)、P1:イワナ精子ゲノム DNA:ニジマス精子ゲノム DNA=0:1、P2:イワナ精子ゲノム DNA:ニジマス精子ゲノム DNA=10:1、P3:イワナ精子ゲノム DNA:ニジマス精子ゲノム DNA=100:1、1-7:宿主精子ゲノム DNA。C) ニジマス・イワナに共通の β -Actin 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR。鋳型量が均一であることがわかる。

図 9. イトウ *vasa* 遺伝子の部分塩基配列。

赤字:アミノ酸翻訳領域の部分配列 1181bp、黒字: 3'非翻訳領域の部分配列 138bp。青太字: ニジマス *vasa* 遺伝子との多型。黄ボックス: イトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーを作成した領域。

図 10. イトウ *vasa* 遺伝子の部分アミノ酸配列。

RNA ヘリカーゼに共通の DEAD ボックス、ATP-A、ATP-B モチーフを含む 8 つの保存領域 (赤字) が保存されている。

図 11. イトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR 結果。

A)レーン N:SDW&forward/reverse 両プライマー (ネガティブコントロール)、1:ニジマス精巢 cDNA&forward/reverse 両プライマー、2:イトウ精巢 cDNA&forward/reverse 両プライマー、3:イトウ精巢 cDNA&forward プライマーのみ、4:イトウ精巢 cDNA&reverse プライマーのみ。B)レーン M:Molecular Weight Marker、N:SDW (ネガティブコントロール)、1:イトウ精巢 cDNA、2:イトウ鰭ゲノム DNA、3:ニジマス精巢 cDNA、4:ニジマス精子ゲノム DNA。

図 12. 凍結イトウ PGC 移植魚のコロナイズスクリーニング結果。

A)イトウ *vasa* 遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR。レーン N1: SDW (ネガティブコントロール)、N2: ニジマス精巢 cDNA、P: イトウ精巢 cDNA、1-14: 凍結イトウ PGC を移植したニジマス宿主 (移植後 3 ヶ月) の生殖腺 cDNA。

B)イトウ、ニジマス両種に共通の β -Actin 遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR 結果。

鋳型量の差を示している。

図 13. 凍結イトウ PGC を移植した生殖腺 cDNA を鋳型とした RT-PCR で得られたバンドの塩基配列。

図 12 の宿主 No.9 で確認された DNA 断片 (199bp) を切り出し、塩基配列を決定した。黒字: イトウ・ニジマス共通配列、青字: イトウ特異的な配列、オレンジ: ニジマス特異的な配列。宿主 No.9 の塩基配列はイトウの *vasa* 遺伝子の塩基配列と一致している。

プライマー配列 一覧

オリゴ (dT):	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)×18-3'
<i>vasa</i> -F1:	5'-ATGGCNTGYGCNCARACNG-3'
<i>vasa</i> -R2a:	5'-CCDATYCTRGNACRTAYTC-3'
RT <i>vasa</i> 3'UTR F:	5'-TGGGAGTGATGATGCACATCTACATA-3'
Vect-AP1:	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Vect-AP2:	5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3'
<i>vasa</i> common Fw:	5'-ACAACATTGATGAGTACGTCCACC-3'
<i>vasa</i> common Rv:	5'-ATGTAGATGTGCATCATCACTCCCA-3'
GSP1:	5'-ATCAGCTGCTGCAGGATGGGCAGTA-3'
GSP2:	5'- ATGCAGCCGTTTTCCCAGATCCAGT-3'
Universal Primer A Mix long (UPM):	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Nested Universal Primer A (NUP):	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
シーケンス標識反応用 universal primer:	5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3'
シーケンス標識反応用 reverse primer:	5'-GGAATTGTGAGCGGATACA-3'
RT F6:	5'-TCTTGGTCGATGTCAGCGGC-3'
RT R5:	5'-GGATCTCGCTGAACTGACTA-3'
I/ <i>vasa</i> -F1:	5'-TCAGCTACTGGAGGTCCTCAAGACC-3'
I/ <i>vasa</i> -R1:	5'-CACCAGGACAGGACACTTTCCT-3'
GFP-FW:	5'-GACGTAAACGGCCACAAGT-3'
GFP-RV:	5'-TCCAGCAGGACCATGTGAAT-3'
RT-actin F:	5'-ACTACCTGATGAAGATCCTG-3'
RT-actin R:	5'-TTGCTGATCCACATCTGTTG -3'

PCR 反応条件 一覧

vasa 遺伝子断片

I. DNA断片①	94°C:3 分－(94°C:30 秒－56°C:30 秒－72°C:60 秒)×35－72°C:4 分
II. DNA断片②	94°C:3 分－(94°C:30 秒－61°C:30 秒－72°C:60 秒)×35－72°C:4 分
III. DNA断片③	94°C:3 分－(94°C:30 秒－62°C:30 秒－72°C:60 秒)×35－72°C:4 分
IV. DNA断片④	94°C:10 分－(94°C:30 秒－72°C:60 秒)×5－(94°C:30 秒－70°C:6 秒) ×5－(94°C:30 秒－63°C:30 秒－72°C:180 秒)×25－72°C:4 分
V. DNA断片④	94°C:3 分－(94°C:30 秒－68°C:30 秒－72°C:120 秒)×25－72°C:4 分

塩基配列の決定

VI. 標識反応	95°C:2 分－(95°C:30 秒－60°C:30 秒－72°C:80 秒)×35
----------	---

プライマー確認 PCR

VII. ニジマス cDNA	94°C:3 分－(94°C:30 秒－64°C:30 秒－72°C:30 秒)×35－72°C:4 分
VIII. ニジマスゲノム DNA	94°C:3 分－(94°C:30 秒－64°C:30 秒－72°C:180 秒)×35－72°C:4 分
IX. イトウ	94°C:3 分－(94°C:30 秒－62°C:30 秒－72°C:30 秒)×35－72°C:4 分

スクリーニング

X. EGFP	94°C:3 分－(94°C:30 秒－64°C:30 秒－72°C:30 秒)×35－72°C:4 分
XI. <i>β-actin</i>	94°C:3 分－(94°C:30 秒－60°C:30 秒－72°C:30 秒)×35－72°C:4 分

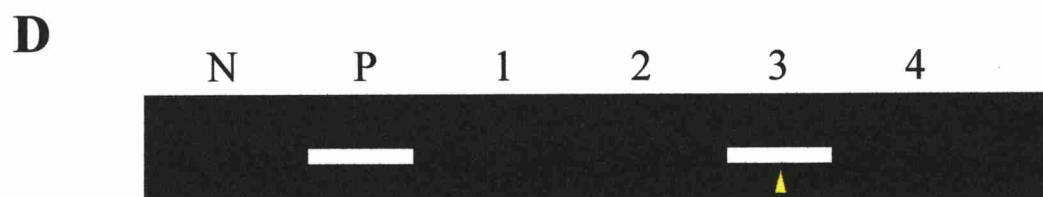
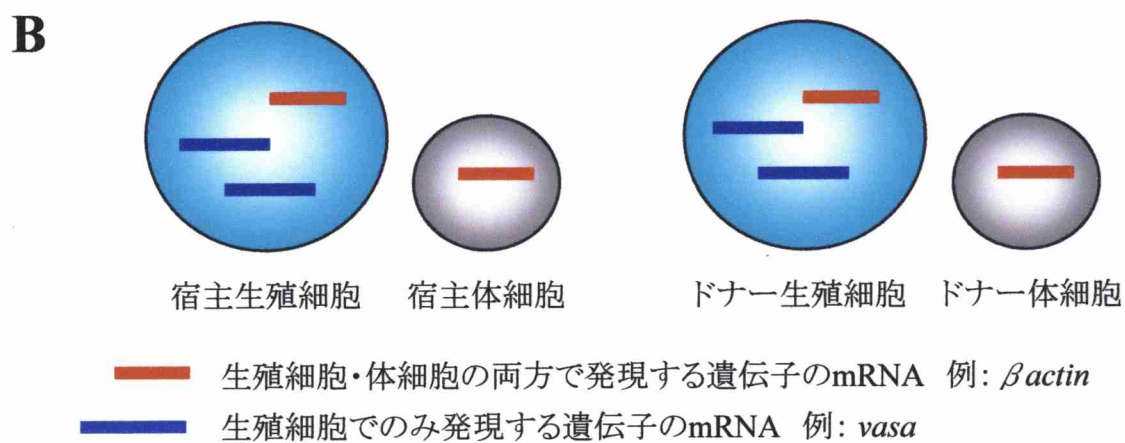
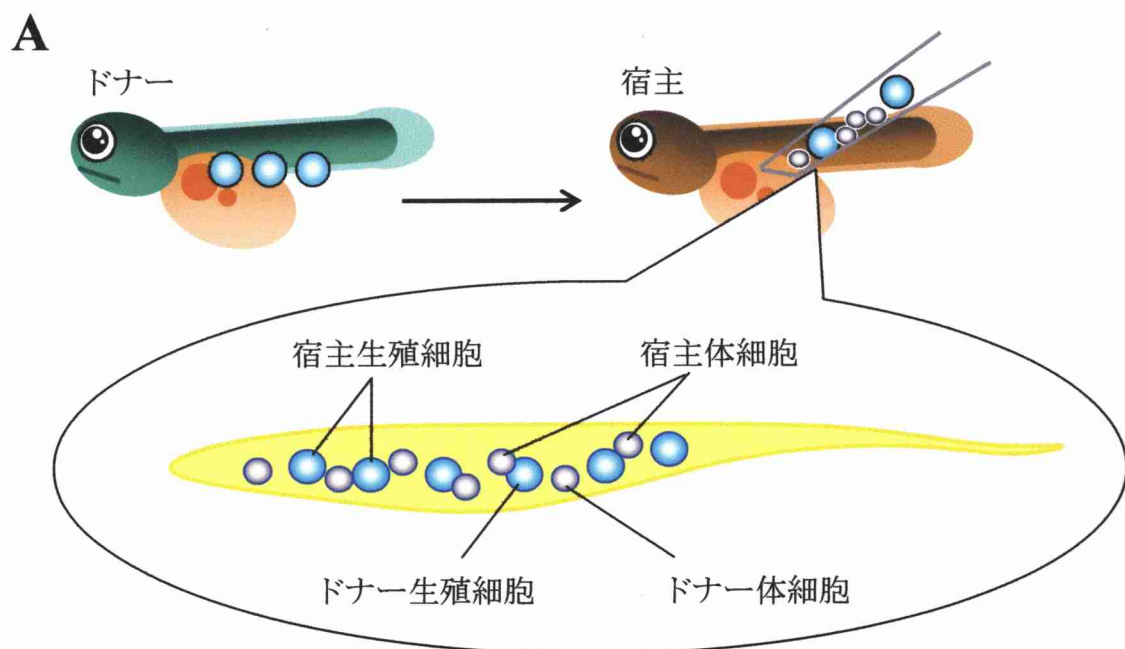
表 1. ニジマス精原細胞を移植したイワナ宿主の交配試験結果

宿主 No.	正常ニジマス F1 尾数 / 全 F1 尾数
2	60 / 1921
4	200 / 1863

表 2. イトウ PGC 移植宿主生殖腺の RT-PCR スクリーニング結果

実験区	PCR 陽性宿主尾数／供試尾数	
	移植後 1 ヶ月	移植後 3 ヶ月
対照区	2 / 24	2 / 26 (♂2 尾)
凍結保存区	2 / 34	3 / 28 (♀3 尾)

図1

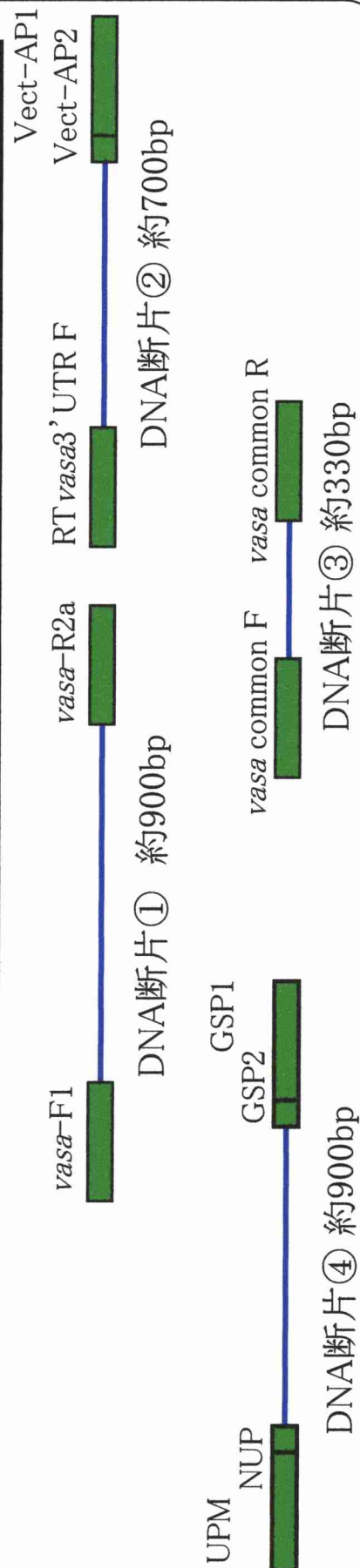


A

5' UTR 55bp	アミノ酸翻訳領域 1944bp	3' UTR 610bp
-------------	-----------------	--------------

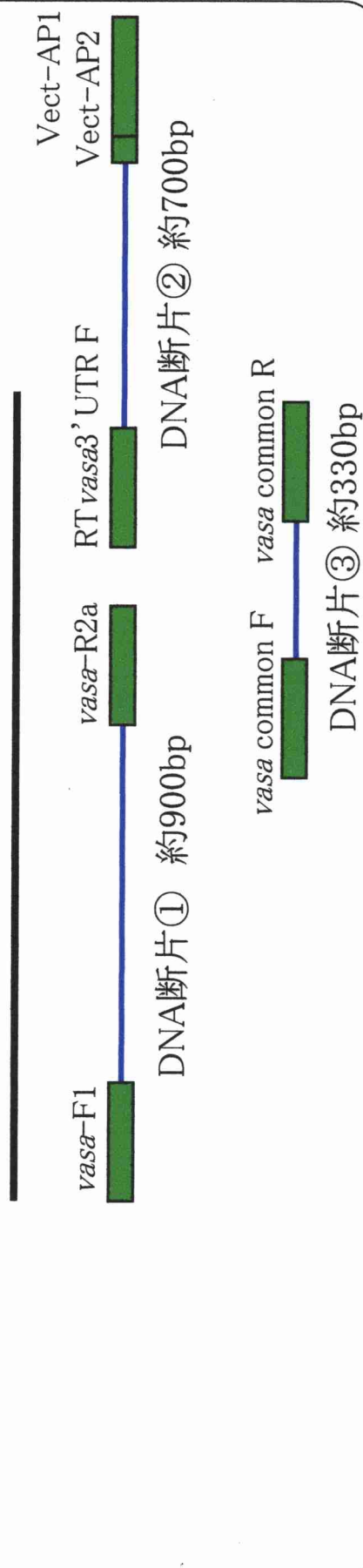
B

イワナ *vasa*



C

イトウ *vasa*

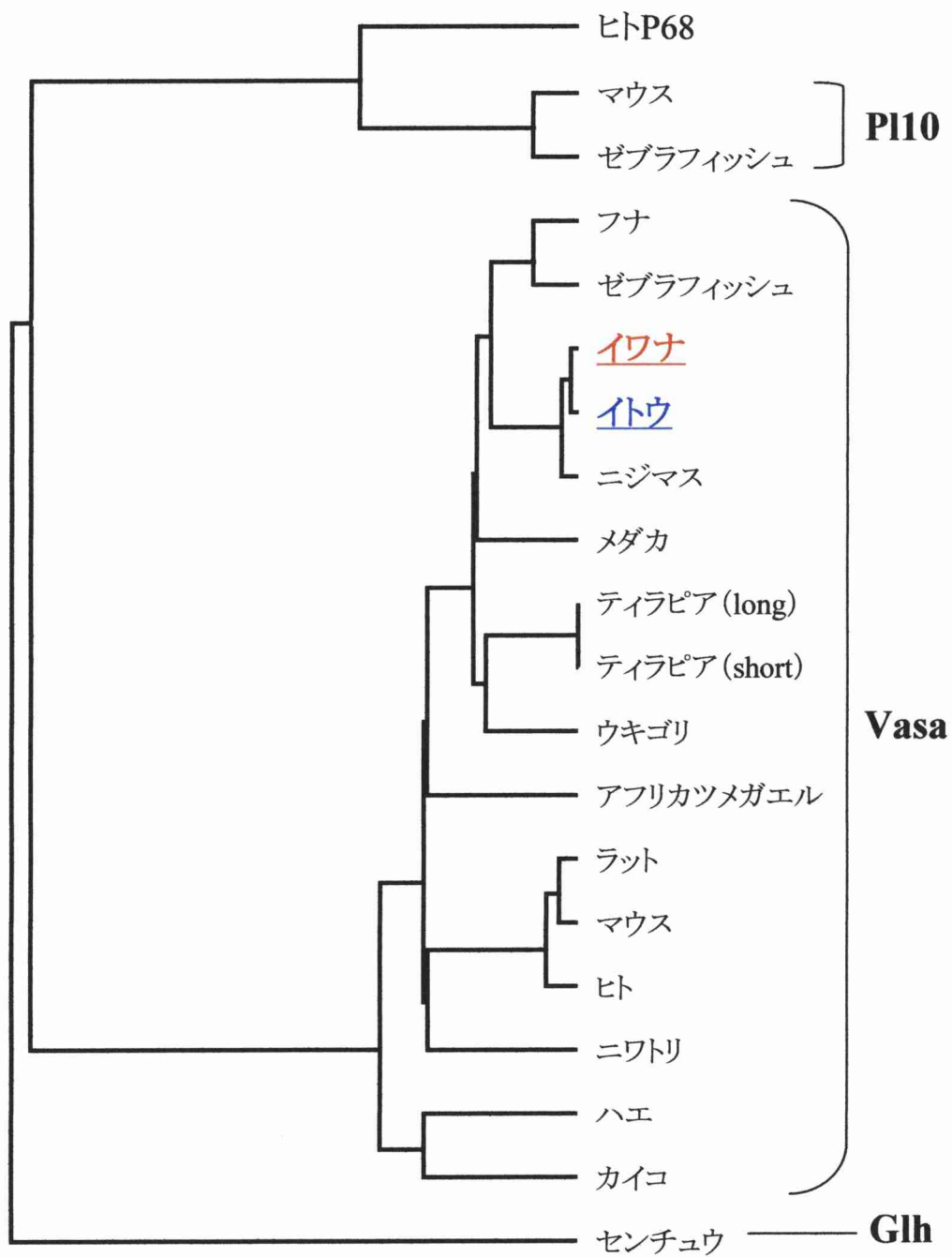


TTGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

MDNWDEVTTT NESGMSSWTS GQSSSFGRP TDNKVSSWNS GGDFGGGRDK VSSWNSGGDG 60
GFGGGRGRRS RGGGDFKSF SSGADKNGNE DKGSSWNSGE GGFRGRGRGG GRGSRGGGIR 120
NGDDGNDGGF GSGRGGFRSG GGDGGGFGGG GYRGRDEEVF SKGSTTDGEG GGDGNGPGPP 180
KVTYIPKALC EEESIFAHY ESGINFDKYD DILVDVSGSN PPKAIMGFEE AALCESLNRN 240
VSKSGYKKPT PVQKHGPII AGRDLMACA QTGSGKT VAF LLPILQQLMV DGVAASKFSE 300
VQEPEVIVA PTRELINQIY MEARKFAHGT CVRPVVVYGG ISTGHTIREI LKGCNVLCGT 360
PGRLLMDIIGR GKIGLSKLRY LVLDEADRML DMGFEPAMRN VVGSPGMPAK EDQTLMFSA 420
TYPEDIQKLA GDFLKKDYLF LAVGVVGGAC SDVEQVVVQV TKFSKRDQLL EVLKTTSER 480
TMVFVETKRQ ADFIATFLCQ EKVNTTSIHG DREQREREQA LGDFRSGKCP VLVATSVAAAR 540
GLDIKDVQHI VNFDLPNNID EYVHRIGRTG RCGNTGRAVC FFDPEADSNL ARSLVKVLSG 600
AQQEVPKWLE EAAFAHGTT GFNPGRIFA STDSRKGGSF QRDGASHLAA ALSSGADDDE 660
WE

```



0.1

```

681 AAGTACGATGACATCTTGGTCGATGTCAGTGGTAGCAATCCGCCAAAGGCCATCATGGGTTTTGAAGAGGCTGCCCTG
632 AAGTACGATGACATCTTGGTCGATGTCAGCGGCAGCAATCCGCCAAAGGCAATCATGGGTTTTGAAGAGGCTGCCCTG
*****
758 TGTGAATCTCTGAACAGGAACGTCAGTAAGTCTGGCTATAAGAAGCCCCACCCAGTACAGAAGCATGGCATTCCCAT
710 TGTGAATCTCTGAACAGGAACATCAGTAAGTCTGGCTATAAGAAGCCCCACCCAGTACAGAAGCATGGCATTCCCATC
*****
837 ATCGCTGCTGGCCGGGACCTCATGGCCTGTGCCCAGACTGGATCTGGGAAAACGGTTGCATTCTACTGCCCATCCTG
788 ATCGCTGCTGGCCGGGACCTCATGGCCTGTGCCCAGACTGGA TCTGGGAAAACGGGTGCATTCTTACTGCCCATCCTG
*****
837 CAGCAGCTGATGGTGGACGGCGTGGCAGCCAGTAAGTTCAGCGAGGTCCAGGAGCCAGAGGTTATT
788 CAGCAGCTGATGGTGGACGGCGTGGCAGCTAGTCAGTTCAGCGAGATCCAGGAGCCAGAGGTTATT
*****

```

图7

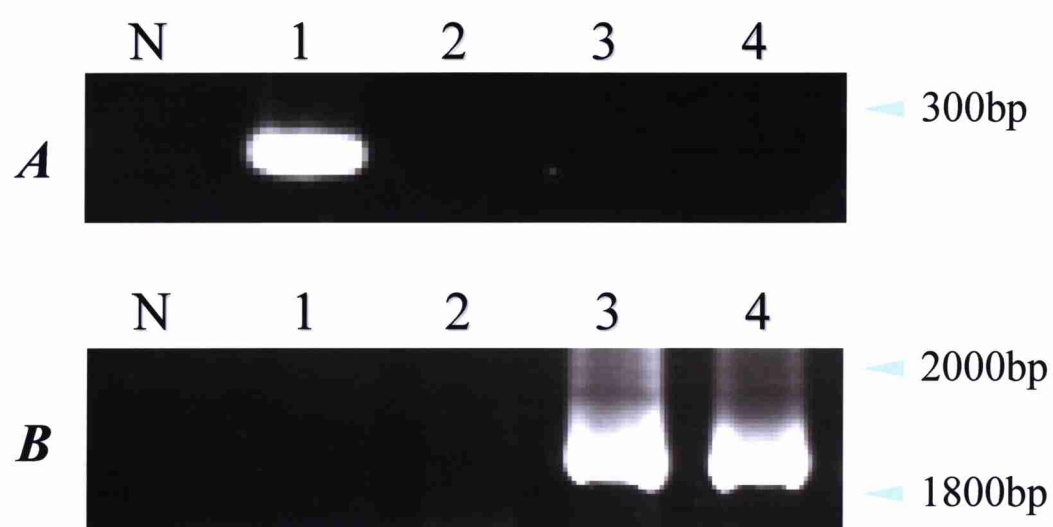
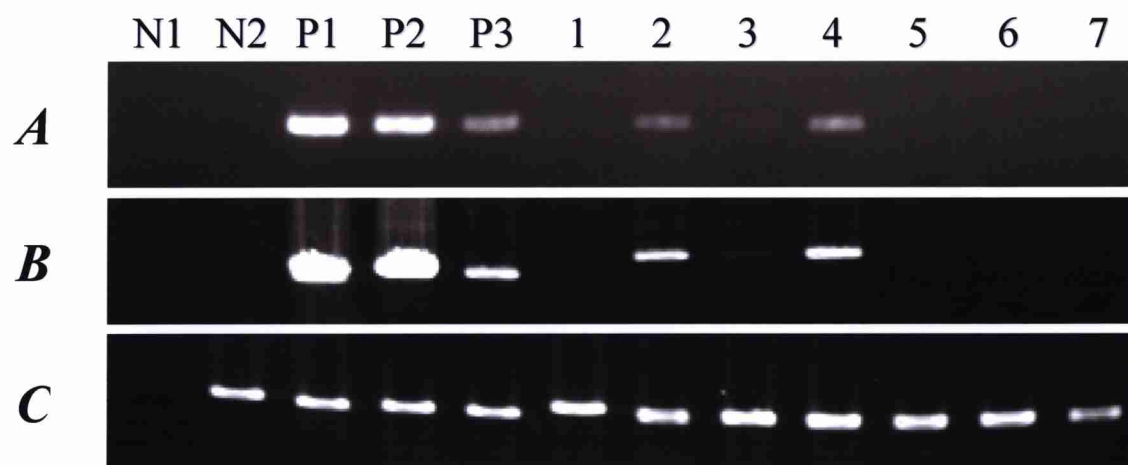


图8



AGAC**CC**GGATCTGGGAAAACGGCTGCATT**CT**ACTGCCCATCCTGCAGCAGCTGATGGTGA**T**GGCCTGGCAGCTAGTCAGTTCAGCGAG**G**TCCAGGAGCC 100
 AGAGGTTATTATAGTGGCCCCAACCCAGGGAGCTGATCAACCAGATCTACATGGAAGCC**A**GGAAAGTTTGCCCATGGGACTTGTGTGCGTCC**A**GTGGTGGTT 200
 TACGGTGGCATAGCACCCGGT**T**ACACCAATTCGCGAGATACTGAAGGGCTGCAATGTGCTGTGTGGACTCCAGGAAGACTGATGGACATTATTGGAAAGAG 300
 GAAAGATTGGCTTGAGCAAGCTGCGTTACCTGGTCTGGACGAGGCTGACAGGATGCTGGACATGGGCTTTGAGCCCTGCGATGCGCAAGCTGGTGGGGTC 400
 CCCAGGCATGCCAGCTAAAGAGGA**CC**GCCAGACCCTTATGTTCAGCGCTACCTACCCGAGGACATCCAAAAACTGGCTGCTGACTTCCTGGAAGAAGGAC 500
 TATCTGTTCCTTGCTGTGGG**CG**TGGTGGCGGAGCCTGCAGTG**A**CGTGGAGCAGGTGCTGGTTCAGGTGACCAAGTTCTCCAAAAAGAG**A**TC**A**GCTACTGG 600
 AGGTCCT**CA**AGAC**CC**ACAGGGTCTGAACGCACAAATGGTCTTTGTGGAAACCAAGAGGCGAGGCTGACTTTATCGCAACGTTCCCTGTGT**C**AGGAGAAGGTTAA 700
 TACTACTAGTATTCACGGTGACCGTGAGCAGAGGGAGCGTGAACAGGCGCTCGG**T**GACTTCGGCT**C**AGG**A**AGTGTCCTGCTGGTGCCACCTCTGTT 800
 GCTGCCCGCGGACTGGACATCAAGGATGTCCAACACATAGTCAACTTTGACCTCCCCAACAAACATTGATGAGTACGTCCACCGCATCGGGAGAACACAGGTC 900
 GCTGTGGGAACACCGG**A**AGAGCTGTGTGTTTCTTTGACCCGG**A**GG**CC**GAC**A**GCAACCTGG**C**ACGCTCCCTGGTCAAAGT**CC**TGTCTGGGGCC**CA**ACAGGA 1000
 GGTGCCCAAAATGGCTGGAGGAAGCTGCCTTCAGTGCTCATGGCAC**T**ACAGGGTTCAACCCAGGTGGAGAACCTTTGCCCTCCACTGATAGCAGGAAGGGT 1100
 GGATCT**TT**CCAGAGAGATGGGGCAAGT**CA**ACTAGCTGCTGCCCTGAGCAGTGGCGGCAGACGACG**A**G**T**GGGAGTGAT**G**ATGCACATCTACAT**TT**CTTT 1200
 TCGTTTTTGTGTT**TC**AAAC**T**AAAGTCATGTTTTGGTTCGAAT**G**TAAC**TT**CTTTTAGTG**TT**CTATCT**TT**TAAGAAAAAT**A**ATTTTGGCGCTGCTG 1300
 ATATTTCTGGAATGTGTATGCACAT_____ 1326

```

*****
*TGSGKTAAF LLPILQQLMV DGVAASQFSX VQEPEV I I VA PTREL INQIY MEARXFAHXT 59
CVRPVVYGG ISTGYTIREI LKGCNVLCGT PGRLMDI I GR GKIGLSKLRY LVLDEADRML 119
DMGFEPAMRK LVGSPGMPAK EDRQTLMFSA TYPEDIQKLA ADFLKKDYLYX LAVGVVGGAC 179
SDVEQVVVQV TKFSKRDQLL EVLKTTGSER TMXFVETKRQ ADFIATFLCQ EKXNTTSIHG 239
DREQREREQA LGDFRSGKXP XLVATSVAAR GLDIKDVQHI VNFDPNNID EYVHRIGRTG 299
RCGNTGRAVC FFDPEADSNL ARSLVKVLSG AQQEVPKWLE EAAFSAHGTT GFNPGGRTFA 359
STDSRKGGSF QRDGASQLAA ALSSGADDDE WE 391

```

図11

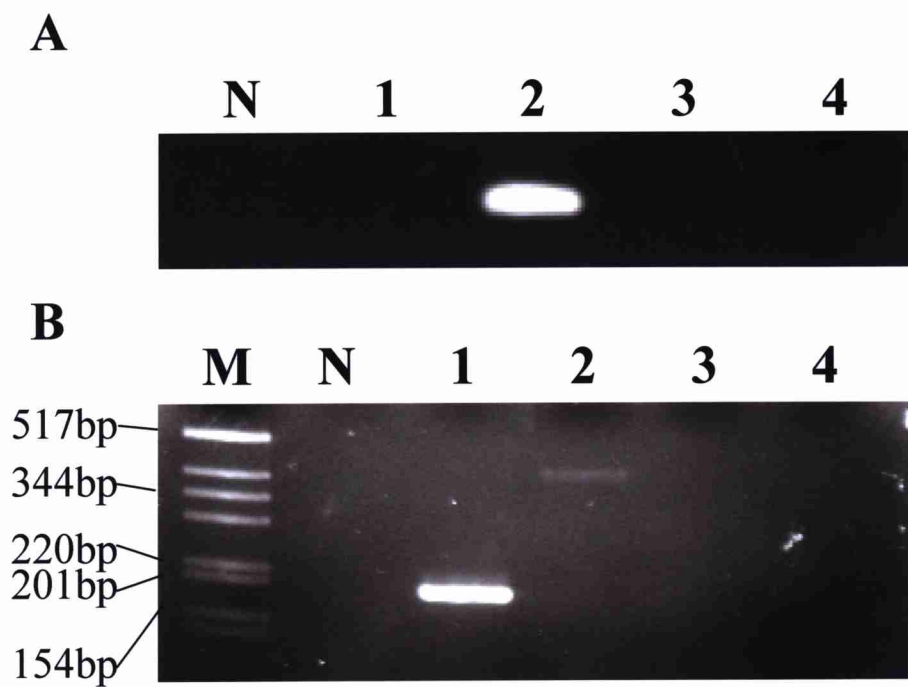
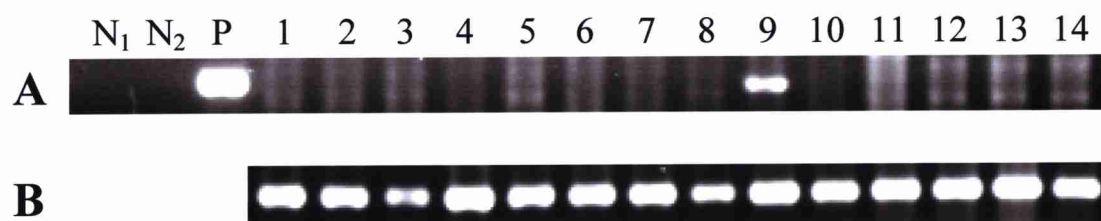


図12



No.9 TCAGCTACTGGAGGTCCTCAAGACCACAGGGTCTGAACGCACAA
 イトウ TCAGCTACTGGAGGTCCTCAAGACCACAGGGTCTGAACGCACAA
 ニジマス CCAACTACTGGAGGTCCTGAAGACTACAGGGTCTGAACGCACAA

No.9 TGGTCTTTGTGGAAACCAAGAGGCAGGCTGACTTTATCGCAACG
 イトウ TGGTCTTTGTGGAAACCAAGAGGCAGGCTGACTTTATCGCAACG
 ニジマス TGGTCTTTGTGGAAACCAAGAGGCAGGCTGACTTTATAGCAACG

No.9 TTCCTGTGTCAGGAGAAGGTTAATACTACTAGTATTCACGGTGA
 イトウ TTCCTGTGTCAGGAGAAGGTTAATACTACTAGTATTCACGGTGA
 ニジマス TTCCTGTGTCGGGAGAAGGTTAATACTACTAGTATTCACGGTGA

No.9 CCGTGAGCAGAGGGGGCGTGAACAGGCGCTCGGTGACTTCCGCT
 イトウ CCGTGAGCAGAGGGAGCGTGAACAGGCGCTCGGTGACTTCCGCT
 ニジマス CCGTGAGCAGAGGGAGCGTGAACAGGCGCTCGGCGACTTCCGCT

No.9 CAGGAAAGTGTCTGTCCTGGTG
 イトウ CAGGAAAGTGTCTGTCCTGGTG
 ニジマス CCGGAAGGTGTCTGTCCTGGTG

総 括

第 1 章では、まず、ニジマス PGC の凍結保存方法を確立した。緒論で述べたように、これまで魚類においては、卵および胚の凍結保存方法が確立されていなかったために、母系遺伝子資源（ミトコンドリア DNA）の保存が不可能とされていた。しかし、卵への分化能を有した PGC を凍結保存することによって、核に由来する遺伝子資源のみならず、母系遺伝子資源の保存が可能となった。いったん -196°C に保存した細胞は、原理的に変化しないとされており、実際に、羊の胚の凍結保存では、11 年間保存した胚から正常な個体を再生することに成功している。(Forgaty et al., 2000)。したがって、魚類の遺伝子資源を PGC として凍結保存することで、小さなチューブの中で、安価で安全に、しかも長期間保存するシステムが確立した。これまで絶滅危惧魚種や養殖における優良系統の保存は、個体の維持によって行われてきた。しかし、これらの魚種や系統の遺伝子資源を PGC として保存すれば、個体の維持に必要な労力、時間、スペース、コストを大きく削減できるだけでなく、疾病や飼育装置の事故から回避することも可能になると期待される。

続く実験では、凍結保存した PGC を、宿主を介して機能的な卵に分化させ、得られた卵を凍結精子と受精させることにより、生殖能力を有した正常な次世代を作出することに成功した。これにより、凍結保存した PGC が個体に変換可能であることが実証された。魚類では、卵や胚の凍結保存方法が確立されていなかったために、凍結精子を用いて、雄性発生のような特殊な方法により、個体を再生する試みがなされてきた (Scheerer et al., 1996; Scheerer et al., 1991; Babiak et al., 2002)。しかし、凍結 PGC から機能的な卵の作出が可能になったことにより、凍結精子を用いて、通常の受精により個体を再生することが可能となった。このように凍結保存した資源から次世代を生産しうる魚類個体を作出したのは、今回が世界ではじめての報告である。

凍結乾燥した種から個体の再生が可能な植物では、将来の絶滅に備えて現存するあらゆる

る種の種子を保存する種子バンクが設立されている。魚類においても、あらゆる魚種の PGC を保存する PGC バンクができれば、将来、ある魚種が絶滅してしまったとしても、凍結 PGC を近縁の宿主を介して蘇らせることができるであろう。本研究において、サケ科内の同種間（ニジマス - ニジマス）および同属間（ニジマス - イワナ、イトウ - ニジマス）で生殖細胞の移植が可能であったことから、今回開発した方法がサケ科全般の魚種に応用可能であることが示唆された。しかし、今後魚種の PGC バンクを実現させるためには、上述の方法がサケ科以外の魚種にも適応可能か否かを検証する必要がある。

PGC の移植を多くの魚種に応用するためには、遺伝子組換えを用いずに、移植の成否を確認する手法が必要であった。そこで、第 2 章では、*vasa* 遺伝子の種間多型を利用して、非遺伝子組換えドナーに由来する生殖細胞の検出方法を確立した。本技法は、生物自身がつ塩基配列を利用するため、どのような魚種、系統にも適応可能であり、PGC 移植において非常に有効な手法である。したがって、PGC バンクを作成する際は、各魚種の PGC を凍結保存すると同時に、*vasa* 遺伝子を単離し、配列情報を記録しておく必要がある。

以上、本研究において、PGC を利用した新たな魚類遺伝子資源保存方法を確立することができた。今後、本研究において確立した方法が多くの魚種に応用され、絶滅危惧魚種の保存、および優良系統の維持に貢献していくことが期待される。

本実験で得られた技術を他の魚種に応用していくにはさらなる改善も必要と考えられる。本実験では、サケ科をモデルとして用いたため、胚サイズが 15mm 程度と大きく、生殖隆起の摘出や移植などの胚操作が比較的容易に行うことができた。しかしながら、多くの魚種の胚は、サケ科のそれと比べ、小さく発生の速度も速いものが多い。したがって、使用する魚種の初期発生、特に PGC の発生について事前に調べる必要があるだろう。また、PGC は数の少ない細胞である（～100/胚程度, Braat et al., 1999）。そこで、PGC を *in vitro* で増殖させることができれば、遺伝子資源を増幅することが可能になる。さらに、*in vitro* で PGC に遺伝子組換えを施した後に、個体に変換すれば、効率的に遺伝的な優良系

統を作出することも可能になるであろう。したがって、今後は、PGC の培養方法を確立することも重要な課題である。

また、近年、奥津らがニジマス未成熟雄の精巣から調整した細胞をニジマス孵化稚魚の腹腔に移植することにより、ドナー生殖細胞（精原幹細胞）に由来する機能的な精子、および卵の作出を報告している（奥津, 2003; Okutsu et al., 2006）。この結果は、雄の生殖腺内に PGC と同等の能力を持つ細胞が存在することを示唆している。さらに、精巣の摘出は、生殖隆起の摘出に比べ容易であり、雄 1 尾から多量のドナー細胞が調整できるため、PGC の入手が困難な場合、精巣細胞が PGC の代用として利用可能かもしれない。精巣の凍結保存については Cloud ら（2003）が報告しているが、組織の状態で保存し、そのまま移植しているため、実際にどれほどの精原細胞が生残しているか定かではない。したがって、今後は、精巣細胞の凍結保存条件についても詳しく検討していく必要があると考えられる

参考文献

- Babiak, I., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Brzuzan, P., and Ciesielski, S. (2002). Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factor. *Theriogenology* 57:1229-1249.
- Braat, A.k., Speksnijder, J.E., and Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol* 43:745-760.
- Cloud, J.G. (2003). Cryopreservation and transplantation of sexually immature gonads of rainbow trout. *Fish Physiol Biochem* 28:459-462.
- Forgaty, N.M., Maxwell, W.M., Eppleston, J., and Evans, G. (2000). The viability of transferred embryos after long-term cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 12:31-37.
- 奥津 智之 (2003) ニジマス精原幹細胞移植によるドナー由来次世代の作出. 東京水産大学大学院 修士論文 pp.1-19.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci USA* (in press).
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., Allendorf, F.W., and Knudsen, K.L. (1986). Androgenetic rainbow trout produced from inbred and outbred sperm sources show similar survival. *Aquaculture* 57:289-298.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H., and Allendorf, F.W. (1991). Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J Exp Zool* 260:382-390.

謝 辞

本研究の遂行および論文の作成にあたり、終始丁寧なご指導、ご鞭撻、および御校閲を賜りました東京海洋大学海洋生物資源学科水族養殖学研究室教授竹内俊郎博士、同水族生理学研究室助教授吉崎悟朗博士に厚く御礼を申し上げます。

また、実験魚の飼育に際し多大なるご厚情を賜った東京海洋大学水圏フィールド教育センター大泉ステーション熊沢 勝技官、三井拓也技官、佐久間賢志技官に深く感謝する。

最後に、研究の遂行および、さまざまな場面で御助言、御協力をいただいた竹内 裕博士、森田哲郎博士、水族養殖学研究室・水族生理学研究室の卒業生、修了生、学生各位に心から感謝の意を表する。