九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Development of reproductive technologies for gonad sterilization and ectopic gametes production using two marine fish models

八尋, 逸清

https://hdl.handle.net/2324/7182526

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名　：八尋　逸清

論文題名　：Development of reproductive technologies for gonad sterilization and ectopic gametes production using two marine fish models
（海産魚 2 種をモデルとした不妊化機構と異所性配偶子生産に関する研究）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

世界の水産養殖生産量は過去 25 年で約 5 倍と著しく増大しており、人口増加に伴う安定的かつ良質な動物性タンパク質の供給源として、更なる生産性や持続可能性の向上が期待されている。一方、日本の海面養殖生産量は 1980 年代より横ばいであり、広大な排他的経済水域を有する我が国の食料安全保障の観点からも、海産養殖魚の生産性を向上させるための生産技術や育種技術の開発が急がれる。

本論文の前編では養殖品種の知的財産権の保護、および生産場からの逃亡よる遺伝子撹乱を防ぐための解決策として不妊化に着目し、海産魚の不妊化機構の解明とその誘導法の開発を目的とした。精子および卵の起源となる始原生殖細胞（PGCs）は個体発生の初期に中胚葉で形成され、生殖腺原基へ移動することで生殖腺を形成する。この移動の細胞遊走因子として、SDF-1（Stromal cell-derived factor 1）/CXCR4（C-X-C chemokine receptor type 4）シグナルがある。PGC は受容体である CXCR4 を発現し、ケモカイン（SDF-1）の濃度勾配に従って移動することから、このシグナルを阻害することで生殖細胞欠損個体の作出が可能であると予想された。そこで、飼育環境調節による周年採卵が可能で、世代時間が約 4 か月と短いカタクチイワシ（*Engraulis japonicus*）を用いて研究を行った。

まず、カタクチイワシの SDF-1/CXCR4 シグナルに関与する各遺伝子配列を同定し、それらのアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った結果、各遺伝子はニシン目やコイ目を含む条鰭亜綱の骨鰾区（Otocephala）の間で特に高い相同性を示した。次に、PGC の移動時期を調べた結果、受精後 16 から 32 時間に移動が起こり、同時期に *sdf-1a/b*, *cxcr4a/b* の発現が上昇した。さらに、*sdf-1a* mRNA 過剰発現および CXCR4 拮抗薬処理を行った結果、いずれも PGC の移動が阻害され、特に拮抗薬の浸漬処理により、簡便に生殖細胞欠損型の不妊化個体を作出することに成功した。一方、その拮抗作用は個体差が大きく、妊性を持つ個体が一定の割合で出現した。ヒトの医薬品として分子量や分子構造が様々な CXCR4 拮抗薬が開発されていることから、より高い効果を持つ拮抗薬を効率的にスクリーニングするため、*in silico* において CXCR4 の 3D モデルを作成し、各種拮抗薬とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、高い結合親和性を持つ拮抗薬が見出された。本拮抗薬は、*in vivo* での顕微注入や浸漬処理によって PGC の移動に対する高い阻害効果が確認されたことから、本スクリーニング法の有用性が示された。

後編では完全養殖系が確立されており、外科手術を伴う実験が可能なマサバ（*Scomber japonicus*）を用いて生殖腺組織の体側筋内移植技術の開発を行った。鳥類や哺乳類では生殖腺移植により他家由来の異所性配偶子を生産した報告例があり、魚類においても幼魚期の未熟な生殖腺を性成熟した個体へ移植して短期間で配偶子を作出できれば、世代時間を短縮できるとともに複数個体由来の配偶子を同一の親魚から効率的に得るなどの画期的な育種技術への応用が期待される。

そこでまず、生殖腺組織を体側筋内へ移植する手法を自家移植により確立した。メスでは移植した卵巣組織が著しく退行したのに対し、オスでは一旦退行したものの、6 か月後までに精巣構造が

再構築されて精子形成が確認された。これらの精子を用いて人工授精を行った結果、受精能を持つ機能的な配偶子であった。次に、若齢期の未熟な生殖腺組織を他個体の成魚に他家移植した。その結果、移植 3 か月後のオス宿主 3 個体中 1 個体で精巣が再構築され、精子形成が認められた。他家由来の異所性精子の生産については海産魚では初の報告となり、本移植法による養殖魚の世代時間短縮の可能性が示唆された。

ところで、他家移植による低い移植成功率は宿主の免疫拒絶が原因であると予想されるが、海産魚での組織移植時の免疫システムに関する知見は乏しい。そこで、移植 1 週間後の移植部位について RNA-seq 解析を行い、発現変動遺伝子（DEG）を比較した。その結果、自家移植と他家移植にそれぞれ特異的な DEG が抽出され、他家移植では細胞性免疫や MHC Class I に関連する遺伝子が著しく向上した。すなわち、海産魚における急性免疫拒絶の存在が示唆され、他家移植における成功率向上のための基盤的知見が得られた。

以上、海産モデル魚 2 種を用いて不妊化に関わる機構の解明および簡便な不妊化方法の開発を行うとともに、生殖腺組織の体側筋内への移植法を確立して他家配偶子の生産に成功した。本成果は今後の海産養殖魚の効率的な生産および育種技術の開発に寄与するものと期待される。