

魚類の始原生殖細胞を利用した新たな発生工学技法の展開

吉崎悟朗（東京水産大学 資源育成学科）

goro@tokyo-u-fish.ac.jp

始原生殖細胞(PGC)は、卵と精子の起源細胞であり、成熟・受精の過程を経て個体へと改変される。この細胞を利用した魚類の発生工学技法を確立するため、ニジマスのPGCを個体内で可視化し、単離・精製する技術を開発した。さらに単離したPGCを宿主胚に移植することで配偶子にまで分化させることにも成功した。本法は魚類の借り腹生産、遺伝子資源の保存、遺伝子改変等に応用可能である。

はじめに

in vitro で培養している植物細胞はカルスを介して個体に改変することが可能である。一方マウスでは株化された胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell; ES 細胞) を初期胚に移植すると、宿主胚に由来する細胞と移植された ES 細胞との 2 種類の細胞が混在するキメラマウスが形成される。マウスの ES 細胞は生殖細胞を含む全ての細胞系列に分化することができるので、生まれてきたキメラマウスの生殖腺内部には ES 細胞に由来する卵や精子が形成される。したがって、これらのキメラマウスを交配することで、ES 細胞に由来する卵と精子が受精すれば、完全に ES 細胞に由来するマウス個体を得ることができる。このことは、培養細胞内で遺伝子改変を行えば、改変された遺伝子を保持する個体を作成可能であることを意味している。実際、これらの技術は遺伝子導入や遺伝子ノックアウト等、多くの遺伝子工学的技術の開発に貢献してきた。しかし、魚類を含む他の生物では *in vitro* に単離した細胞から個体を作成する技術は未だ開発されていない。魚類においても、メダカやゼブラフィッシュを用いて多くの ES 細胞作出の試みがなされているが、これらの ES 細胞は様々な体細胞に分化できるものの、卵や精子に分化する能力は保持していない。そこで、著者らは全く新しい試みとして、卵や精子に分化することが既に決定付けられている生殖細胞系列の幹細胞である“始原生殖細胞 (Primordial Germ Cell, PGC)”を利用して、*in vitro* に単離した細胞から個体を作成するための技術開発を行った。

始原生殖細胞の可視化

魚類の PGC は、孵化前後の限られた時期に僅か 50 個程度の細胞集団として存在し、従来は組織学的に同定されているのみであった。著者らはまず最初に PGC を同定する分子マーカーとして、幅広い動物種の PGC で特異的に発現している *vasa* 遺伝子を利用した。魚類における *vasa* 遺伝子の機能は明らかではないが、シウジョウバエでは生殖細胞における mRNA の翻訳に関与する RNA ヘリカーゼ活性を有するといわれている。まず、*vasa* cDNA をニジマスからクローニングし、その発現解析を *in situ* ハイブリダイゼーション法で行ったところ、ニジマスの *vasa* 遺伝子も PGC で特異的に発現しており、PGC マーカーとして有効であることを明らかにした (図 1)^{1,2)}。この結果は、*vasa* 遺伝子の発現調節領域が PGC において特異的に活性化され、*vasa* mRNA の転写を促していること示している。そこで、生きたニジマス胚の中で PGC を可視化するため、*vasa* 遺伝子の発現調節領域をオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子に接続した組換え遺伝子を、マイクロインジェクション法³⁾によりニジマス受精卵へ導入し、得られた遺伝子導入ニジマスの系統化を行った^{2,4,5,6)}。その結果、GFP 遺伝子は PGC で特異的に発現し、緑色蛍光により生きた PGC を可視化することに成功した (図 2)。

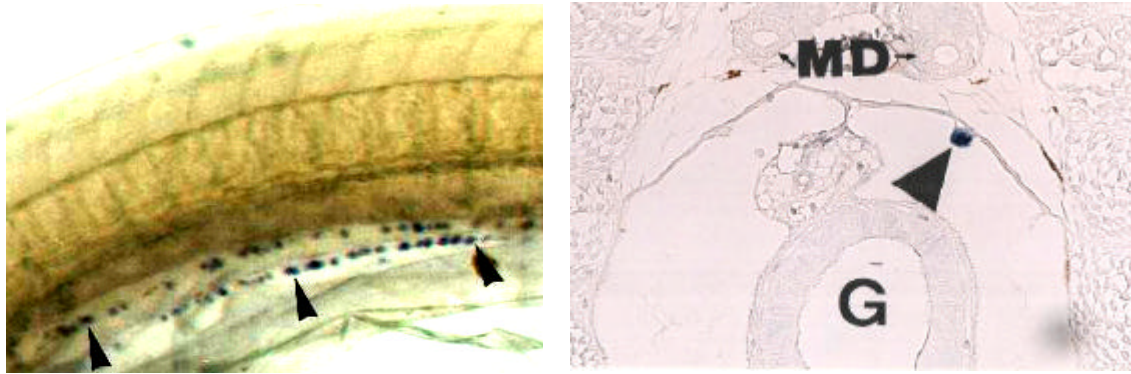


図 1.ニジマス孵化稚魚における *vasa* mRNA の分布。ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、腹腔背壁に 2 列に並ぶ始原生殖細胞(矢頭)で特異的に *vasa* mRNA の存在が観察された (左)¹⁾。同様に組織切片上でも生殖隆起内の始原生殖細胞 (矢頭) のみが *vasa* 遺伝子を発現していた (右)²⁾。MD;中腎管、G; 腸管。

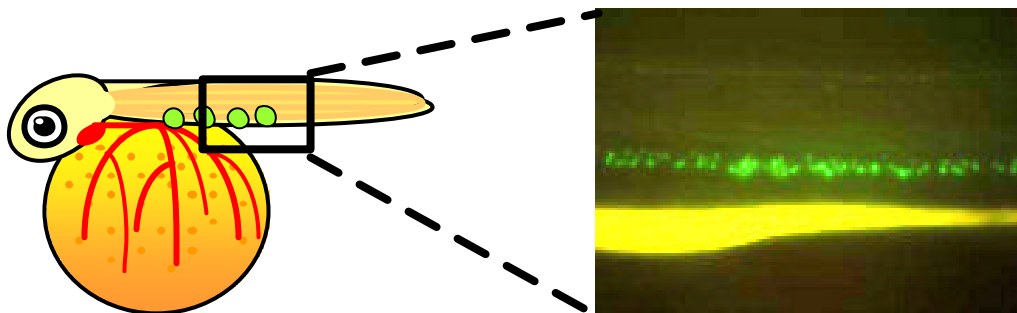


図 2.*vasa*-GFP 遺伝子のニジマス胚への導入による始原生殖細胞の可視化。*vasa* 遺伝子の発現調節領域を GFP 遺伝子に接続したキメラ遺伝子導入ニジマスでは、始原生殖細胞で特異的に GFP 遺伝子が発現し、緑色蛍光を発していた⁵⁾。

始原生殖細胞の単離・精製

次に著者らは、緑色蛍光を発している PGC と、生殖隆起 (未熟な生殖腺原基) 内で PGC を取り囲んでいる体細胞とを蛍光強度を指標にして分取することを試みた。まず、孵化稚魚から PGC を含む生殖隆起のみを大量に回収した。ニジマスの孵化稚魚は全長 1.5cm 程度と他の魚種と比較して極めて大きいため、実体顕微鏡下で解剖が可能である。さらに、生殖隆起内に含まれる PGC は緑色蛍光を発しているため、実体蛍光顕微鏡を用いると緑色蛍光を目印にして容易に生殖隆起を単離することができた。得られた生殖隆起はトリプシン溶液で単一細胞にまで解離し、セルソーターに供試した。蛍光強度解析により、強い蛍光を発している細胞集団が認められたので、この集団を分取した結果、得られた細胞は顆粒を多く含む大型の円形細胞であり、大型の核を有するという PGC の形態的特徴を良く示していた (図 3)⁴⁾。なお、生殖細胞マーカーである *vasa* 遺伝子は単離した蛍光陽性の細胞集団のみで発現していたうえ、生殖隆起を構成する体細胞マーカーの mRNA は全く検出されなかったことから、本法で回収した蛍光陽性細胞が間違いなく PGC であること、さらにこの細胞集団に体細胞はほとんど混入していないことが確認された。

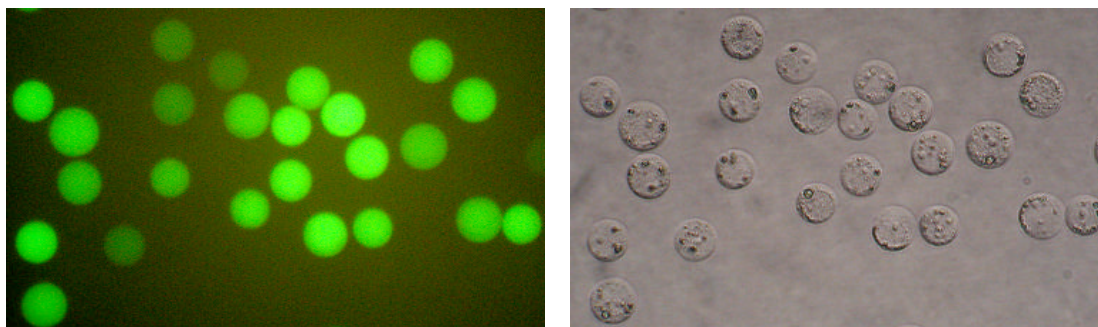


図 3. *vasa*-GFP 遺伝子導入ニジマスから単離した始原生殖細胞。左は蛍光像、右は明視野像⁵⁾。

始原生殖細胞の宿主への移植

PGC に由来する個体を得るためには、PGC を宿主個体に移植して、その生殖腺内で配偶子へと分化させる必要がある。著者らは孵化稚魚から単離した PGC を、孵化後 2 週間以内の稚魚の腹腔内にマイクロインジェクション法⁷⁾により移植した。移植された PGC は腹壁に接着後、仮足を伸長して生殖隆起に移動し、移植後 1 月程度で生殖隆起内部に取り込まれることを明らかにした⁸⁾。移植された PGC が宿主の腹腔内でどのような機構により生殖隆起に移動するかは現在のところ明らかではないが、生殖隆起から分泌される何らかの物質により誘引されているものと考えられる。また、生殖隆起に取り込まれた PGC は増殖した後、減数分裂を開始し、宿主の生殖細胞と同調して成熟が進み、機能的な配偶子へと分化することが確認された。実際にアルビノ個体から GFP を指標にして単離した PGC を野生型の宿主胚に移植したところ、成熟した宿主から GFP 遺伝子を保持する精子（移植細胞に由来する精子）を得ることができた。さらに、これらの精子を用いて次世代を作出した結果、PGC が GFP で標識されたアルビノ個体、すなわち移植した PGC に由来する個体を得られた。なお、この移植技法は少なくとも同属の異種間でも成立する。実際にヤマメの孵化稚魚に移植したニジマスの PGC が宿主生殖腺内に取り込まれ、増殖・分化することを確認している。

今後の展望

以上のように、著者らは全動物種を通じて初めて、PGC を生きた個体内で可視化し、これらの細胞を *in vitro* に単離・精製する技術、さらには宿主への移植を介して、この PGC を機能的な配偶子に改変するという一連の技術確立した。これらの技術は新たな養殖技術や魚類の遺伝子資源の保存に大きく貢献すると期待される^{9,10)}。例えばマグロのように親魚が大型で飼育が困難な魚種から PGC を単離し、サバのような小型の近縁種に移植することで、マグロの卵や精子を産出するサバの作出も可能である。この際、3 倍体等の不妊個体を宿主として用いれば、サバが水槽内で放卵・放精することでマグロの受精卵を得ることもできよう。この技術によりマグロの種苗生産が小型水槽でも可能になり、大幅な省力化、省コスト、省スペースにつながることを期待される。また、絶滅危惧種や有用品種の仔稚魚から単離した PGC を凍結保存しておけば、種や品種を蘇らせたいときに、解凍した PGC を近縁種に移植することで、絶滅種や有用種由来の卵や精子を得ることができる。先に述べたように、これら PGC の培養技術が確立すれば、ES 細胞の代用として魚類でも遺伝子ノックアウトやノックイン、さらにはコンディショナルターゲットング技法の利用も可能になる。このような技術開発が進めば、魚類の遺伝子改変による育種の進展が期待されるのみならず、脊椎動物の遺伝子機能解析系として、魚類の有用性が益々高まるであろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜った東京水産大学・隆島史夫学長に深く感謝いたします。また、本研究を進展させるにあたり貴重な御助言、ご協力をいただいた東京水産大学・竹内俊郎教授、同酒井 清助教授に心から御礼申し上げます。さらに、実験魚、および飼育施設に関して多くの便宜をはかってくださった東京水産大学大泉実験実習場技官熊沢 勝氏、三井拓也氏に謝意を表します。最後に多くの御協力をいただいた東京水産大学水族養殖学研究室の竹内 裕博士研究員を始め、研究室のメンバー諸氏に感謝致します。

業績リスト

- 1) Yoshizaki, G., S. Sakatani, H. Tominaga and T. Takeuchi. 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Develop.* 55: 364-371.
- 2) Takeuchi, Y., G. Yoshizaki, H. Tominaga, T. Kobayashi and T. Takeuchi. 2002. Visualization and isolation of live primordial germ cells aimed at cell-mediated gene transfer in rainbow trout. In *Aquatic Genomics* (Eds. by Shimizu and Aoki), Springer Verlag, Heidelberg (in press).
- 3) Yoshizaki, G., T. Oshiro and F. Takashima. 1991. Introduction of carp β -globin gene in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 819-824.
- 4) Yoshizaki, G., Y. Takeuchi, S. Sakatani and T. Takeuchi. 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.
- 5) Takeuchi, Y., G. Yoshizaki, T. Kobayashi and T. Takeuchi, 2002. Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the GFP gene driven by the vasa gene promoter. *Biol. Reprod.* 67: 1087-1092.
- 6) Yoshizaki, G., Y. Takeuchi, H. Tominaga, T. Kobayashi and T. Takeuchi. 2002. Visualization of primordial germ cells in transgenic rainbow trout carrying green fluorescent protein gene driven by vasa promoter. *Fish. Sci.* (in press).
- 7) Takeuchi, Y., G. Yoshizaki and T. Takeuchi. 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Develop.* 59: 380-389.
- 8) Yoshizaki, G., Y. Takeuchi, T. Kobayashi, S. Ihara and T. Takeuchi. 2002. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.* (in press).
- 9) 吉崎悟朗 . 2002 . 魚類の遺伝子操作 「動物発生工学」(岩倉洋一郎、佐藤英明、舘 鄰、東條英昭 編), 朝倉書店, 東京, pp. 238-251.
- 10) Yoshizaki, G. 2001. Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49: 137-142.

Fish Primordial Germ Cells as a Tool in Developmental Biotechnology

Goro Yoshizaki (Tokyo University of Fisheries, Department of Aquatic Biosciences)

goro@tokyo-u-fish.ac.jp