

戦略的創造研究推進事業  
発展研究（SORST）

## 研究終了報告書

研究課題

「魚類精原幹細胞株からの個体の作出」

研究期間：平成 18 年 4 月 1 日～  
平成 21 年 3 月 31 日

吉崎悟朗

（東京海洋大学・海洋科学部・准教授）

## 1. 研究課題名

魚類精原幹細胞株からの個体の作出

## 2. 研究実施の概要

本研究では、*in vitro* で培養している細胞株から魚類個体を創生する技術の構築を目指した。研究代表者の過去の研究から、ニジマスの精原幹細胞を免疫系が未熟な孵化直後の腹腔内へと移植すると、移植細胞はケモタキシスにより宿主生殖腺内へと移動し、そこに取り込まれることを見出した。さらに、宿主生殖腺内へと取り込まれた移植細胞は、増殖・分化を開始し、最終的には機能的な配偶子を生産することも確認している。特筆すべき点として、雌宿主へと移植した精原幹細胞は雌性生殖細胞へと分化転換し、最終的には機能的な卵を生産することを明らかにしている。すなわち、精原細胞を雌雄の宿主へと移植すれば、移植細胞に由来する卵・精子が生産可能であり、これらを受精させることで最終的には精原細胞を個体へと改変することが可能になっている。そこで、本研究ではこのように個体へと改変可能な精原幹細胞の *in vitro* 培養系の構築を目指した。

魚類において、卵や精子への分化能を維持したままの状態での精原幹細胞を培養する実験の実施例は皆無であったため、1) 精原幹細胞の基礎培養条件の探索、2) 精原幹細胞の増殖や生残を促す魚類由来の各種増殖因子の組換え体生産、およびその培養実験への利用 3) 精原幹細胞の増殖や生残を促す支持細胞の探索、4) 効率的に精原幹細胞から個体を生産するための移植実験系の改良、に焦点を絞って研究を行った。これらの実験には、上記のような移植実験系が魚類で唯一構築されているニジマスを材料に用いた。なお、このニジマスに *vasa-Gfp* 遺伝子を導入することで、精原幹細胞を含む A 型精原細胞のみが緑色蛍光で標識された遺伝子導入個体を実験に供した。

精原幹細胞の基礎培養条件の探索、については精原幹細胞を高濃度で含有する GFP 陽性の A 型精原細胞を高効率で生残・増殖させるための条件検討を行った。精巣を解離して得られた全精巣細胞を培養に用いると、精巣体細胞が極めて速い速度で増殖し、精原細胞を駆逐してしまう現象が頻繁に観察された。そこで、本研究では生殖細胞と体細胞の基質接着性の違いを利用して精原細胞を濃縮する技術の開発に成功した。しかし、本法で得られた細胞のみを培養した結果、培養開始 1 週間程度で精巣体細胞が活発に増殖を開始し、2 週間後には、再び体細胞がドミナントになってしまうことが問題となった。そこで、体細胞の増殖を抑制し、精原細胞の増殖や生残に悪影響を与えない培養条件を探索した結果、L-15 培養液をベースに、含有するウシ胎児血清の濃度を 10% から 1% に低下させるとともに、0.5% のウシ血清アルブミンと 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のグルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、シスチンを加えた培養液を用いることが最適であることを明らかにした。さらに、この培養液をベースに種々の添加物の効果を検討した結果、0.25% サケ科魚類血清、200  $\mu\text{M}$  アデノシン、1ng/ml 塩基性繊維芽細胞増殖因子、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のニジマス胚抽出液および 30ng/ml のプロゲステロンを加えたものが、長期間の精原細胞の増殖、および生残をサポートすることを明らかにした。また、この条件下で 42 日間培養したニジマス精原細胞は、明瞭な GFP 陽性を示していたうえ（すなわち *vasa* 遺伝子の発現が維持されていた）宿主孵化稚魚の腹腔内へと移植すると、宿主生殖腺内へと取り込まれ、増殖を開始する様子も確認された。研究代表者の過去の研究から、移植実験により宿主生殖腺に取り込まれる細胞は幹細胞能を維持していることが明らかになっているため（Okutsu et al., PNAS, 2006）これらの培養細胞も、少なくともその一部は精原幹細胞としての特徴を維持していたものと推測された。

精原幹細胞の増殖や生残を促す魚類由来の各種増殖因子の組換え体生産、およびその培養実験への利用については、哺乳動物等において始原生殖細胞や精原細胞の増殖や生残促進に効果があることが知られている種々の成長因子のニジマスホモログの cDNA クローニングを行い、組み換え体生産を試みた。その結果、白血病阻害因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）、グリア細胞株由来神経細胞栄養因子（GDNF）、血小板由来増殖因子、幹細胞因子（SCF）の組み換え体生産に成功した。さらに上記の培養系を用いたパイオアッセイを行った結果、bFGF と GDNF に精原細胞の増殖促進活性が認められたが、他の因子に関して

は、その増殖促進活性および生残促進活性ともに認められなかった。なお、bFGF と GDNF の精原細胞増殖促進活性は両因子に対して生産した特異抗体により完全に中和されたことから、この作用はこれらの因子に特異的なものであることが確認された。しかし、今回の研究期間内において、これらの因子を用いた精原細胞の長期間培養、およびその後の移植実験を行うことができなかった。bFGF および GDNF は近年、マウスにおいて樹立された生殖系列幹細胞株 (GS 細胞) の樹立にも必須の因子であることから、これらの因子を用いたニジマス精原細胞の長期培養実験は今後の重要な課題である。

精原幹細胞の増殖や生残を促す支持細胞の探索実験では、ニジマス精巢繊維芽細胞株 (TF)、初代培養 ニジマス精巢体細胞 (PTS)、ニジマス脾臓細胞株 (RTS) を樹立したのに加え、既存の魚類由来株化細胞を計 9 株用いた。その結果、ニジマス生殖腺体細胞株 (RTG)、TF、RTS を用いた場合において精原細胞の生残が促進された。また、RTG および TF に関してはその培養上清を用いた場合においても同様の効果が認められた。しかし、これらの細胞を用いて 2 週間の培養を行った精原細胞は、移植後の宿主生殖腺への生着率が低く、これらの培養期間中に幹細胞能が低下したことが示唆された。一方、RTS を支持細胞として培養を行った精原細胞を用いた場合は、支持細胞なしで培養した精原細胞を移植した場合より、宿主生殖腺への生着効率が有意に高い値を示した。今後は上記の増殖因子の添加と、RTS の支持細胞としての利用を組合わせた培養系を構築することで、精原細胞の増殖・生残を一層高めることが可能になると期待される。

魚類精原細胞は *in vivo* においてはセルトリ細胞に完全に包まれて精巢内に存在している。したがって、このセルトリ細胞は精原幹細胞のニッチを形成し、その増殖や生残を支持していることが予測される。そこで、本研究ではセルトリ細胞で特異的に発現している *inhibin* の発現制御領域に *DsRed* を接続したコンストラクトを作成し、赤色蛍光によりセルトリ細胞を可視化することを試みた。その結果、精原細胞を取り囲むセルトリ細胞は明瞭な赤色蛍光を示し、セルソーターを利用することでその単離・精製も可能となった。また、得られたセルトリ細胞の培養条件の至適化を行ったところ、培養液には E-RDF を用い、ウシ胎児血清を 15% 添加するのが適していることが明らかとなった。この条件を用いることで現在までに 2 カ月以上の培養が可能となっており、3 回の継代を行った後も、増殖速度は衰えないことが明らかとなった。また、これらの培養セルトリ細胞もそのマーカー分子である *インヒビン* や *GSDF* の発現を維持していた。本研究期間内にこのセルトリ細胞を支持細胞に用いた精原細胞の培養条件の至適化を行うことができなかったが、これらの細胞を駆使することで、今後精原細胞の特徴をより忠実に維持した状態での *in vitro* 培養が可能になると期待される。

将来、上記の実験によって精原細胞の株化が期待されるが、これらの細胞を個体に改変する際には宿主個体への移植実験が必要になる。前述のように移植した精原幹細胞は宿主の生殖腺内で卵あるいは精子へと分化するが、通常のニジマス個体へと移植を行うと、培養精原細胞由来の配偶子に加え、宿主自身の配偶子も生産される。また、ニジマスの 3 倍体雄は異数性の精子を生産することが知られており、宿主としては適切ではない。そこで、異種のヤマメを宿主に用い、より効率的に精原幹細胞から個体を生産するための技術開発を行った。ヤマメ宿主とニジマスを受精させれば、宿主由来の配偶子が受精した雑種は致死となるため、自動的に培養精原細胞由来の個体が濃縮されることが期待される。実際に 3 倍体化処理により不妊化したヤマメ宿主を両親としてニジマス精原細胞移植を行った結果、得られた宿主ヤマメ両親を交配することで、次世代にニジマスのみを大量に生産することが可能であった。将来的にはこの異種間の精原細胞移植系と培養系を組合わせることで、効率的に培養細胞由来の個体のみを大量生産することが可能になると期待される。

### 3. 研究構想

本研究では、*in vitro* で培養している細胞株から個体を創生する技術の構築を目指した。良く知られているとおり、細胞を個体に改変する実験系としては、キメラマウスを介した ES 細胞の系がある。この実験系の構築により、*in vitro* で培養している細胞に対し遺伝子改変を加え、目的の改変が施された細胞のみを薬剤選抜により単離し、これを個体へと改

変することが可能になっている。ノックアウトマウスの作成は、この原理を駆使した好例であるが、残念なことにこの実験系は、一部のマウス系統以外では実用化していない。魚類においても、1990年前後から多くの研究室において、メダカとゼブラフィッシュを用いてES細胞の樹立例が報告されているが、これらの細胞はすべて体細胞系列には分化するものの、生殖系列へ分化するといった事例は全く知られていない。

そこで研究代表者は、細胞から個体を作出するにあたり、用いる細胞に求められる重要な条件は、ES細胞のような多能性ではなく、“生殖細胞への分化能”であるとの考えの下、生殖細胞を用いた新たな発生工学系の構築を目指した研究に着手した。すなわち、キメラ個体を介して細胞を個体へと改変する際に、ドナー細胞は体細胞へと分化する必要は全くなく（すなわち多能性は必要なく）、生殖細胞への分化能力のみが要求されるという発想である。特に本研究では精原幹細胞に注目した。研究代表者の過去の研究から、ニジマスの精原幹細胞を、免疫系が未熟な孵化直後の腹腔内へと移植すると、移植細胞はケモタキシスにより宿主生殖腺内へと移動し、そこに取り込まれることを明らかにした。さらに、宿主生殖腺内へと取り込まれた移植細胞は、増殖・分化を開始し、最終的には機能的な配偶子を生産することも確認している。特筆すべき点として、雌宿主へと移植した精原幹細胞は雌性生殖細胞へと分化転換し、最終的には機能的な卵を生産することも確認済みである。すなわち、精原細胞を雌雄の宿主へと移植すれば、移植細胞に由来する卵・精子が生産可能であり、これらを受精させることで最終的には**精原細胞を個体へと改変することも可能**になっている（Okutsu et al., PNAS, 2006）。そこで、本研究ではこのように“個体へと改変可能な精原幹細胞”の *in vitro* 培養系の構築を目指した。

魚類において、卵や精子へと改変可能な精原幹細胞 *in vitro* で長期間培養するという実験の実施例は皆無であったため、下記の4点に焦点を絞って研究を遂行した。

- 1) 精原幹細胞の基礎培養条件の探索
  - 2) 精原幹細胞の増殖や生残を促す魚類由来の各種増殖因子の組換え体生産、およびその培養実験への利用
  - 3) 精原幹細胞の増殖や生残を促す支持細胞の探索
  - 4) 効率的に精原幹細胞から個体を生産するための移植実験系の改良
- これらの実験には、上記のような移植実験系が魚類で唯一構築されているニジマスを用いた。なお、このニジマスに *vasa-Gfp* 遺伝子を導入することで、精原幹細胞を含む A 型精原細胞のみが緑色蛍光で標識された遺伝子導入個体を実験に供した。

#### 4. 研究実施内容

##### (1) 実施の内容

1) 精原幹細胞の基礎培養条件の探索、については精原幹細胞を高濃度で含有する GFP 陽性の A 型精原細胞を高効率で生残・増殖させるための条件検討を行った。実験開始当初、精巣を解離することで得られた細胞を、生殖細胞と体細胞に分離することなく、全精巣細胞を材料に用いて培養を開始すると、培養直後から精巣体細胞（特に繊維芽細胞）が極めて速い速度で増殖を始め、実験開始当初は 20-40%程度の割合で含有していた精原細胞を駆逐してしまう現象が頻繁に観察された。そこで、最初の実験として生殖細胞系列で特異的に発現する *vasa* 遺伝子の *cis* 領域の制御下で発現する *Gfp* 遺伝子をニジマスへと導入し、精原細胞が特異的に発する GFP 蛍光を指標に、フローサイトメーターにより精原細胞の単離を行った。しかし、この方法で得られた細胞は物理的損傷が激しく、長期間にわたり培養可能な細胞を精製することが不可能であった。そこで次に精原細胞は体細胞と比較し、ゼラチンコートをしたシャーレ底面への接着性が低い、という特性を利用することで、短期間培養により底面へ接着しなかった細胞のみを回収することで、95%程度の純度で精原細胞を濃縮する技術の開発に成功した。しかし、本法で濃縮された精原細胞を培養した結果、培養開始 1 週間程度で、実験開始当初わずかに混入していた精巣体細胞が活発に増殖を開始し、2 週間後には培養皿内のほとんどが体細胞によって占拠されてしまうことが問題となった。そこで次に、精巣体細胞の増殖を極力抑制し、精原細胞の増殖や生残に悪

影響を与えない培養条件を探索した。その結果、L-15 培養液をベースに、培養液に添加するウシ胎児血清の濃度を原法の 10% から 1% にまで低下させるとともに、0.5% のウシ血清アルブミンと 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のグルタミン酸、アスパラギン酸、プロリン、シスチンを加えた培養液を用いることで、精原細胞の生残率を低下させることなく、精巢体細胞の増殖をほぼ完全に抑制することに成功した ( 図 1 )。

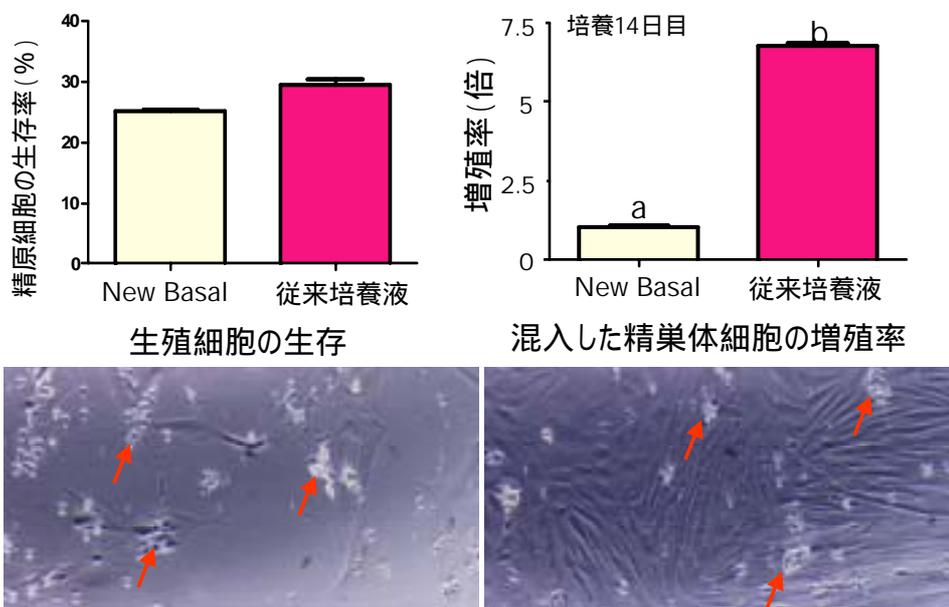


図1. 精巢体細胞の増殖を阻害しつつ精原細胞を維持する培養条件の探索  
 新たな培養条件 ( 左 ) では従来法 ( 右 ) と比較し、精巢体細胞、特に繊維芽細胞の増殖が明瞭に抑制されている。矢印は精原細胞のコロニー。

さらに、この培養液をベースに種々の各濃度の添加物 ( 栄養性因子とその他補助因子としてビタミン混合溶液、ピルビン酸ナトリウム、L- グルタミン、アデノシン、2-メルカプトエタノール、セレン酸ナトリウム、ビタミン C、ステロイドとしてエストラジオール 17b、プロゲステロン、テストステロン、17 $\beta$ , 20 $\alpha$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン、ペプチド性因子としてヒト basic fibroblast growth factor、マウス stem cell factor、ラット glial cell-derived neurotrophic factor、マウス ESGRO、ヒト insulin-like growth factor-I、-II、ウシ transferrin、ウシ insulin、マウス epidermal growth factor、各種ニジマス組織抽出液として肝臓抽出液、脳抽出液、精巢抽出液、卵巣抽出液、ニジマス 20 日齢胚抽出液 ) の効果を検討した結果、0.25% サケ科魚類血清、200  $\mu\text{M}$  アデノシン、1ng/ml 塩基性繊維芽細胞増殖因子、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のニジマス胚抽出液および 30ng/ml のプロゲステロンを加えたものが、長期間の精原細胞の増殖、および生残をサポートすることを明らかにした ( ニジマス由来の各種増殖因子の添加実験については時間的に本実験の終了後にその生産を完了したため、個別の実験として結果を下に掲載する )。また、この条件下で 42 日間培養したニジマス精原細胞は、明瞭な GFP 陽性を示していたうえ ( すなわち生殖細胞系列のマーカである vasa 遺伝子の発現が維持されていた ) 宿主孵化稚魚の腹腔内へと移植すると、宿主生殖腺内へと取り込まれ、増殖を開始する様子も確認された。研究代表者の過去の研究から、移植実験により宿主生殖腺に取り込まれ、そこに生着する能力を保持している細胞は、幹細胞能を維持していることが明らかになっているため ( Okutsu et al., PNAS, 2006 ) 本条件で培養した精原細胞も、少なくともその一部は精原幹細胞としての特徴を維持していたものと推測された ( 図 2 )。

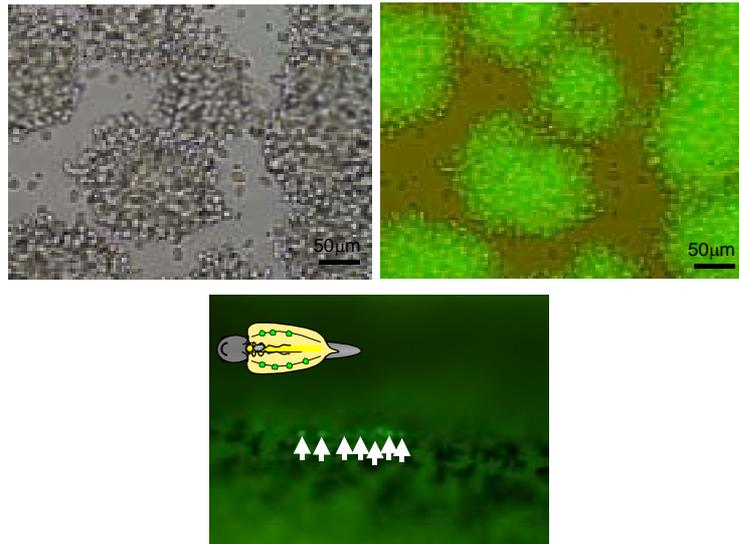


図2. *in vitro*培養後のニジマス精原細胞（上段）と培養後の精原細胞を移植した宿主ニジマスの生殖腺の蛍光観察像  
42日間の培養後も*vasa*遺伝子の発現を示す明瞭なGFP蛍光を維持していた（上段右）。これらの細胞は宿主腹腔内へと移植すると生殖腺へと移動し、そこに取り込まれた（矢印）。

2) 精原幹細胞の増殖や生残を促す魚類由来の各種増殖因子の組換え体生産、およびその培養実験への利用、については、哺乳動物等において始原生殖細胞や精原細胞の増殖や生残促進に効果があることが知られている種々の成長因子のcDNAをニジマスからクローニングし、その組み換え体生産を試みた。なお、上記1)の実験から哺乳動物由来の増殖因子のほとんどは、ニジマス精原細胞に対して生理活性を示さないことが明らかとなっている。その結果、白血病阻害因子(LIF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、グリア細胞株由来神経細胞栄養因子(GDNF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、幹細胞因子(SCF)の組み換え体生産に成功した。さらに上記の培養系を用いたバイオアッセイを行った結果、bFGFとGDNFに精原細胞の増殖促進活性が認められたが、他の因子に関しては、その増殖促進活性および生残促進活性ともに認められなかった。ただし、bFGFに関しては精巢体細胞を完全に除去すると精原細胞の増殖促進活性は消失したことから、本因子は精巢内の体細胞を刺激した後、第二の因子が精原細胞の増殖を間接的に促していることが示唆された。一方、GDNFについては、精巢体細胞と精原細胞の共培養実験、および精製後の精原細胞のみを用いた培養実験の両方でその増殖促進活性が認められたことから、GDNFは精原細胞に直接作用していることが示唆された。また、GDNFは精巢内においてはセルトリ細胞での発現が確認され、その受容体であるGFR-1については精原細胞で特異的に発現していたことから、*in vivo*においてはGDNFがセルトリ細胞から分泌され、これが傍分泌により精原細胞を直接刺激しているものと予測された。なお、bFGFとGDNFの精原細胞増殖促進活性は両因子に対して生産した特異抗体により完全に中和されたことから、この作用は両因子に特異的なものであることが確認された(図3)。しかし、今回の研究期間内において、これらの因子を用いた精原細胞の長期間培養、およびその後の移植実験を行うことができなかった。bFGFおよびGDNFは近年、マウスにおいて樹立された生殖系列幹細胞株(GS細胞)の樹立にも必須の因子であることから、これらの因子を用いたニジマス精原細胞の長期培養実験は今後の重要な課題である。

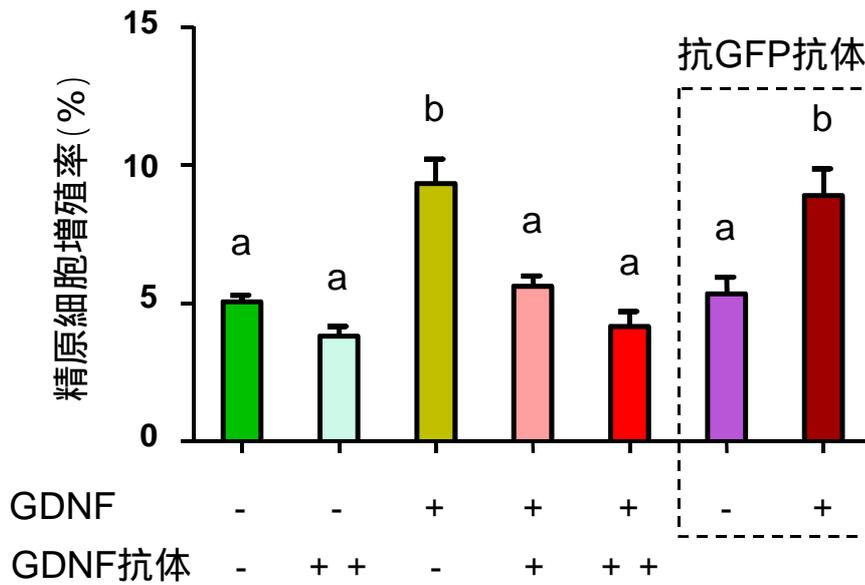


図3. 組換えGDNFによるニジマス精原細胞の増殖促進  
 GDNF (100ng/ml) による増殖促進は、その特異抗体により中和されている。GFP抗体はネガティブコントロールとして用いた。

3) 精原幹細胞の増殖や生残を促す支持細胞の探索実験では、ニジマス生殖腺体細胞株 (RTG)、ニジマス精巣繊維芽細胞株 (TF)、初代培養のニジマス精巣体細胞 (PTS)、ニジマス脾臓細胞株 (RTS)、コイ胸腺由来細胞株 (KT)、コイ鰭由来細胞株 (KF)、ギンブナ胸腺由来細胞株 (CT)、ギンブナ鰭由来細胞株 (CF)、ヒラメ胚由来細胞株 (HINAE) (これらのうちTF、PTS、RTSは本研究において新たに樹立)を用いた。その結果、RTG、TF、RTSを用いた場合において、特異的に精原細胞の生残が促進された(図4)。

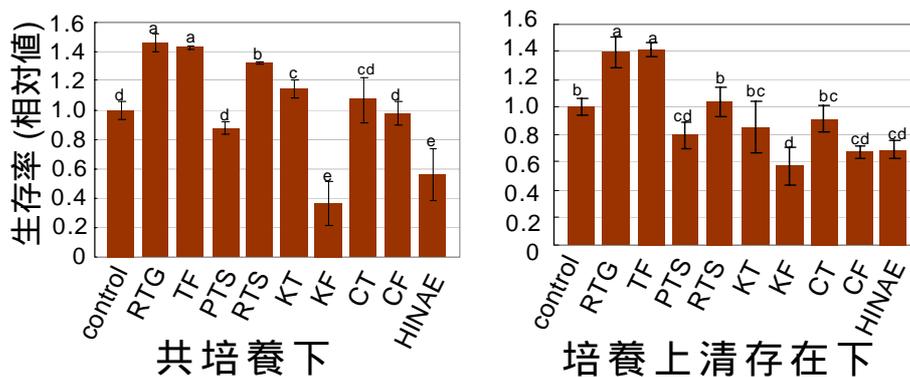


図4. 各種支持細胞存在下(左)および培養上清存在下における精原細胞の生存率

また、RTGおよびTFに関してはその培養上清(Conditioned medium)を用いた場合においても同様の効果が認められた。これらの結果はRTGおよびTFについては細胞から分泌された何らかの液性因子が精原細胞の生残を促したが、RTSについては膜結合型の増殖因子の関与等、RTSと精原細胞の直接の接触が重要であることを示唆している。しかし、RTGとTF細胞を用いて2週間の培養を行った後の精原細胞は、宿主へと移植した際の宿主生殖腺への生着率が、支持細胞なしで培養した対照区より有意に低かった。この事実は、これらの

両支持細胞を用いて精原細胞を培養した場合、培養期間中に精原細胞の幹細胞能が低下したことを示唆している。一方、RTS を支持細胞として用いて培養した精原細胞を移植した場合は、支持細胞なしで培養した対照区の精原細胞を移植した場合より、有意に高い移植性効率を示した(図5)。さらに、培養期間中に増殖した精原細胞へ BrdU を取り込ませることで、培養期間中に新たに増殖した精原細胞が、どの程度の効率で宿主生殖腺へと取り込まれるかを解析した結果、支持細胞を用いなかった対照区の精細胞に比べ、2 倍以上の効率で宿主生殖腺へと取り込まれることが明らかとなった(図6)。このことは RTS 細胞を支持細胞として用いて培養したニジマス精原細胞は、その一部が分裂を行わずに幹細胞能を維持していたのではなく、in vitro で新たに増殖した細胞が高い幹細胞能を維持していたことを示唆している。今後は上記の増殖因子の添加と、RTS の支持細胞としての利用を組み合わせた培養系を構築することで、精原細胞の増殖・生残を一層高めることが可能になると期待される。

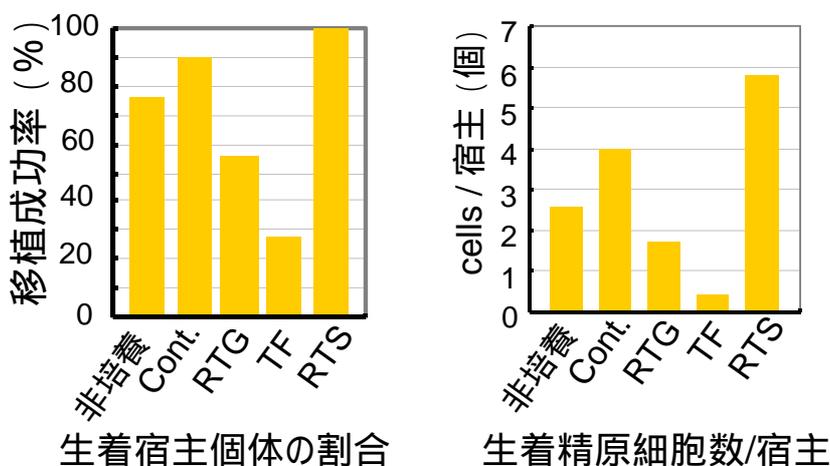


図5. 各種支持細胞を用いて培養した精原細胞の宿主生殖腺への生着効率(左)および宿主1個体あたりに生着した精原細胞数(右) RTSを用いた場合は培養を行っていない精原細胞および支持細胞を用いずに培養した精原細胞より高い移植効率および移植細胞数を示した。

	移植数	Donor-BrdU % (数)	平均生着数/尾	生着-BrdU % (数)
control	5,000	42.3% (2115)	4.00	22.5% (0.9)
RTG	5,000	21.1% (1050)	1.72	9.6% (0.17)
TF	5,000	25.8% (1290)	0.44	16.8% (0.07)
RTS	5,000	40.4% (2020)	5.53	32.95% (1.82)

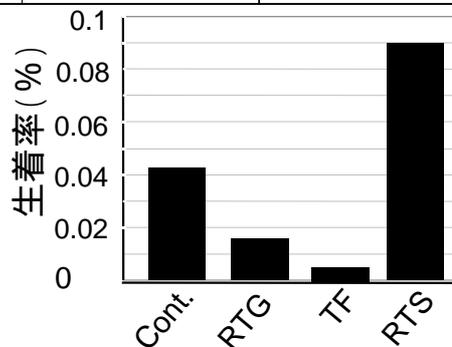


図6. 各種支持細胞を用いて培養した際にin vitroで新たに増殖した精原細胞の宿主生殖腺への生着効率 RTS存在下で増殖した精原細胞は支持細胞非存在下で増殖した精原細胞(Cont)より高い移植効率を示した。

魚類精原細胞は in vivo においてはセルトリ細胞に完全に包まれて精巢内に存在してい

る。したがってセルトリ細胞は、少なくとも精原幹細胞のニッチに一部を担っており、その増殖や生残を支持していることが予測される。そこで、本研究ではセルトリ細胞で特異的に発現している *inhibin* の発現制御領域に DsRed を接続したコンストラクトを作成し、このプラスミドをニジマスへ導入した遺伝子導入ニジマス系統を作出することで、赤色蛍光によりセルトリ細胞を可視化することを試みた。その結果、得られた遺伝子の導入ニジマス系統の精巣においては、精原細胞を取り囲むセルトリ細胞が特異的に明瞭な赤色蛍光を示すことが確認された（図7）。また、この赤色蛍光を指標にしたフローサイトメトリーにより、セルトリ細胞の単離・精製も可能となった。さらに、得られたセルトリ細胞の培養条件の至適化を行ったところ、培養液にはウシ胎児血清を 15% 添加した E-RDF 培地が適していることが明らかとなった。この条件を用いることで現在までに 2 月以上の長期間にわたりセルトリ細胞を培養することが可能となっており、3 回の継代を行った後も、増殖速度は衰えないことも確認済みである。また、これらの培養セルトリ細胞もそのマーカー分子であるインヒビンや GSDF の発現を維持していた（図8）。本研究期間内にこのセルトリ細胞を支持細胞に用いた精原細胞の培養条件の至適化を行うことができなかったが、これらの細胞を駆使することで、今後精原細胞の特徴をより忠実に維持した状態で精原細胞の *in vitro* 培養が可能になると期待される。また、図7に示したように研究代表者が既に樹立している *vasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマスと本遺伝子導入ニジマス系統を交配することで、雄では精原細胞とセルトリ細胞がそれぞれ緑色と赤色に、雌では卵原細胞と卵母細胞が緑色に、顆粒膜細胞が赤色に標識されたニジマスを樹立することに成功している。これらの 2 重遺伝子導入ニジマスは、生殖細胞と支持細胞の挙動を *in vivo* で明らかにできる研究ツールとして極めて有用であると期待される。

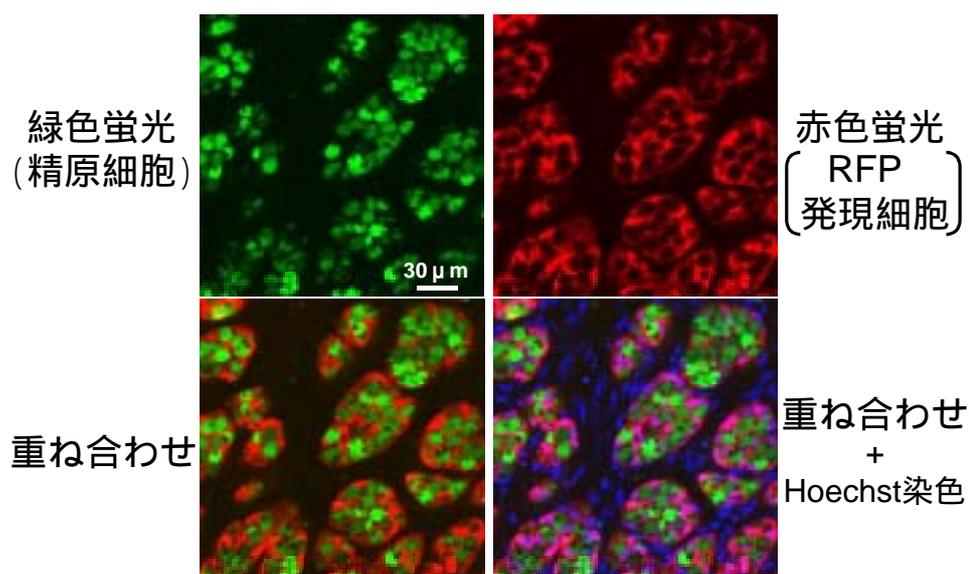


図7. *Inhibin-DsRed* 遺伝子導入ニジマスの精巣の蛍光観察像  
*Vasa-GFP* 遺伝子導入ニジマスとのダブルトランスジェニックにしているため、生殖細胞が緑に、セルトリ細胞は赤に可視化されている。

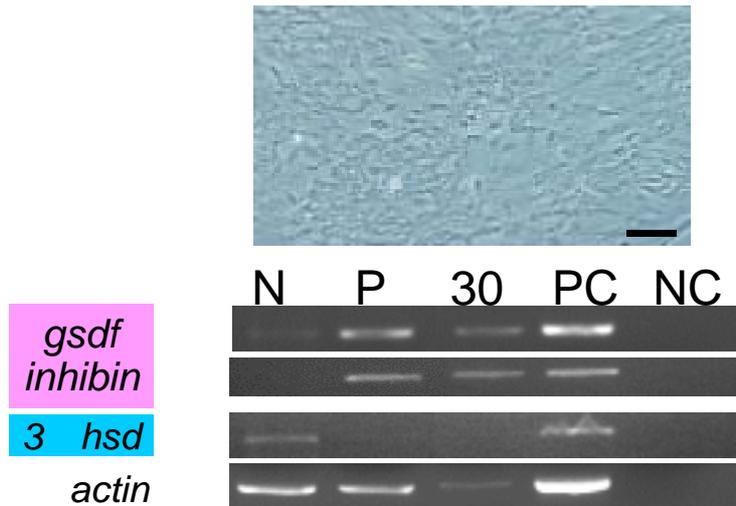


図8. Inhibin-DsRed遺伝子導入ニジマスから単離したセルトリ細胞の培養  
培養30日目においても増殖は継続し（上段）、セルトリ細胞マーカ  
ーであるgsdfおよびinhibinを発現している（下段）。Nはフローサイトメ  
ーで単離した直後のDsRed陰性細胞、Pは陽性細胞、30は培養30日目のセルト  
リ細胞、PC、NCはそれぞれ陽性、陰性対照を示す。

4) 将来、上記の実験によって精原細胞の株化が期待されるが、これらの細胞を個体に改変するには宿主個体への移植実験が必要になる。前述のように移植した精原幹細胞は宿主の生殖腺内で卵あるいは精子へと分化するが、通常ニジマス個体へと移植を行うと、培養精原細胞由来の配偶子に加え、宿主自身の配偶子も同時に生産される。当然必要な配偶子は、移植に用いたドナー由来の配偶子、すなわち培養精原細胞由来の配偶子のみである。そこで不妊の3倍体宿主を利用することを研究代表者は検討したが、ニジマスの3倍体（特に雄個体）は異数性の精子を生産することが知られており、宿主としては適切ではなかった。そこで、同属異種のヤマメを宿主に用い、より効率的に精原幹細胞から個体を生産するための技術開発を行った。ヤマメ宿主から得られた配偶子を通常ニジマス個体から得られた配偶子と受精させれば、宿主由来の次世代、すなわちヤマメ自身の配偶子がニジマス配偶子と受精した次世代は、致死性の雑種となるため、自動的に移植細胞由来の個体（培養精原細胞由来の個体）が濃縮されると期待される。実際に3倍体処理により不妊化したヤマメ宿主にニジマス精原細胞移植を行い、得られたヤマメ宿主を成熟させるまで継続飼育し、これらのヤマメ宿主両親を交配した結果、次世代にはニジマスのみを大量に生産することが可能であった（図9）。将来的には本研究で開発した異種間の精原細胞移植系と精原細胞の培養系を組み合わせることで、効率的に培養細胞由来の個体のみを大量生産することが可能になると期待される。

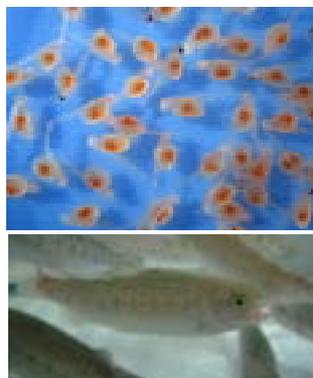


図9. ニジマス精原細胞を移植されたヤマメ宿主両親から生まれたニジマス次世代個体 孵化稚魚（上段）と若齢魚（下段）。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

今回至適化した培養条件を用いて培養した精原細胞は宿主個体へと移植可能な状態を維持することが可能であった。前述のように、移植実験において宿主生殖腺へ着生可能な細胞は、幹細胞能を保持した細胞のみであることから、本培養系において精原幹細胞の生残・増殖を促すことが可能であったと考えることができる。このように移植可能な生殖細胞の長期培養例はマウスのGS細胞(Shinohara et al., Biol. Reprod. 2003)以外は報告されておらず、ニジマス精原幹細胞の培養系がさらにブラッシュアップされ、株化が可能になれば、魚類発生工学の極めて重要なツールになることが予想される。

このような培養系が構築されれば、3の研究構想で述べたように、魚類の遺伝子改変ツールとして有用であるのみならず、水産業へも大きく貢献することが期待される。たとえば、親魚の大きさが数百kgと大型で、その飼育に多大なるスペースと労力、コストを必要とするクロマグロの精原幹細胞を *in vitro* で無限に増殖させることが可能になれば、シャーレ内のマグロ細胞を、小型で飼育が容易なサバのような代理の宿主に移植することで、小型施設内でクロマグロの稚魚を容易に大量生産することが可能になる(すなわちシャーレ内の細胞とサバからマグロを作る技術)。クロマグロが成熟するまでには通常4年前後を要するが、サバは1年で成熟させることが可能であるため、この技法を用いることでクロマグロの稚魚生産に要する時間をも短縮することが可能になる。さらに、これらの培養下の精原幹細胞を液体窒素内で凍結保存することで、魚類の遺伝子資源を半永久的に保存することも可能になると期待される。魚類の卵は大型で脂肪分に富むため、その凍結保存技術が全く開発されていないが、精原幹細胞は卵・精子の両者へと分化可能であるため、本細胞の凍結保存は両性の配偶子の凍結保存と同じ意味を持つと考えられる。

一方、本研究において精原細胞の増殖に関わる増殖因子の生産や、精原細胞の基礎培養条件の開発、さらには支持細胞の充実が図られたうえ、効率的な精原細胞の移植実験系が構築されたため、ニジマスが精原細胞の生物学研究の新たなモデルになると期待される。特に *in vitro* 培養系と移植実験系を駆使することで、様々な因子が精原細胞の幹細胞能に与える影響を調査することも可能になると期待される。特に、本研究では精原幹細胞のニッチ構成に大きな影響を及ぼしていると考えられるセルトリ細胞の単離培養技術も構築された。魚類は高等動物とは異なり、セルトリ細胞の役割が分業化されており、幹細胞の維持・増殖、減数分裂誘起、精子変態等、精子形成における種々の役割を専用のセルトリ細胞が司っている。したがって、本研究で樹立した *inhibin-DsRed* 遺伝子導入ニジマスから、精原幹細胞を包含しているセルトリ細胞のみをフローサイトメトリーにより単離することで、ニッチ形成の詳細な解析も可能になると期待される。また本研究においてセルトリ細胞の大量精製が可能になったが、同様の実験は雌の生殖細胞の支持細胞である顆粒膜細胞でも可能である。したがって、*vasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマスからの精原細胞や卵原細胞の大量精製技術を組み合わせることで、生殖細胞の性や支持細胞の性、さらには再構築培養系等の利用や移植実験系により、これらの細胞の性的可塑性にも迫れるものと予想される。

## 5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

マウスにおいては、2003年に京都大学の篠原らにより移植可能な精原幹細胞の *in vitro* 培養系が構築されている。本細胞系は生殖系列の生物学研究のツールのみならず、ES細胞に代わる遺伝子改変個体作成の手段としても大いに注目されている。しかし、マウスの精原細胞およびGS細胞は、卵へと分化誘導する方法論が構築されておらず、この点に関しては本研究課題で行ったニジマス精原細胞の系のオリジナルな点である。また、シンガポール大学のHongらにより、メダカの精原幹細胞株が樹立されている。さらにこの研究では培養条件を操作することで、*in vitro* で精子形成も誘起しているが、得られた精子の受精能に関しては未だ明らかにされていない。なお、マウスの実験同様、本実験系においても卵の誘導は報告されていない。一方、国立遺伝学研究所の酒井らの研究により、ゼブラフィッシュの精原細胞を *in vitro* 培養することも可能になっているが、精原幹細胞の株化には至っていない。以上のように、卵・精子両者へと分化させることが可能な生殖細胞の培養系は、本研究で用いたニジマスの精原細胞の系が唯一のものである。また、魚類において精原幹細胞の増殖に作用する増殖因子や支持細胞に関する研究は、ウナギの器官培養系

と上記のゼブラフィッシュの培養系を用いてわずかに行われているのみであり、本研究で発見したbFGFとGDNFの作用、およびその作用機序は新規の発見である。さらに、異種宿主にドナー種由来の卵・精子を生産させる生殖細胞移植系の構築は、本研究が全動物種を通じて初めての例である。

## 6. 研究実施体制

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
吉崎悟朗	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	准教授	実験計画・実験総括	H18.4～H21.3
識名信也	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	D	精原細胞培養	H18.4～H21.3
山口一馬	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	M	増殖因子生産	H18.4～H21.3
高橋加純	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	M	支持細胞樹立	H18.4～H20.3
木瀬和芳	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	M	精原細胞培養	H18.4～H21.3
伊原祥子	東京海洋大学・ 海洋生物資源 学科	実験補助 員	細胞培養全般	H18.4～H21.3

## 7. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2007/8/9-10	第二回生殖 細胞の会	東京海洋大 学・大泉ステー ション	40名	ショウジョウバエ・ニジマス・ ウナギ・ニワトリ・マウスと 様々な生物を対象に生殖細胞 研究を行っている研究者 が集まり、最新の研究情報 の交換を行った。

### (2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

## 8 . 発展研究による主な研究成果

### (1)論文発表 ( 英文論文 9 件 邦文論文 1 件 )

A. Yano, K. von Schalburg, G. Cooper, BF. Koop, G. Yoshizaki. Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev.*, 76, 246-254 (2009).

S. Boonanuntanasarn, S. Panyim, G. Yoshizaki. Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. *Transgenic Research*, in press.

S. Shikina, S. Ihara, G. Yoshizaki. Culture conditions for maintaining survival and mitotic activity of rainbow trout transplantable A-type spermatogonia. *Molecular Reprod. Dev.*, 75, 529-537 (2008).

奥津智之・小林輝正・竹内裕・吉崎悟朗. 異種間生殖細胞移植実験における vasa 遺伝子の種特異的プライマーを利用したドナー由来生殖細胞および精子の検出法. *水産育種.* 37, 29-36 (2008).

T. Okutsu, Y. Takeuchi and G. Yoshizaki. Spermatogonial Transplantation in Fish: Production of trout offspring from salmon parents. *Fisheries for Global welfare and environment 5th World Fisheries Congress 2008 Proceedings*, 209-219 (2008).

E. Sawatari, S. Shikina, T. Takeuchi, and G. Yoshizaki. A novel transforming growth factor-superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Develop. Biol.*, 301, 266-275 (2007).

T. Okutsu, S. Shikina, M. Kanno, Y. Takeuchi, G. Yoshizaki. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317, 517p-1517(2007).

A. Yano, K. Suzuki, G. Yoshizaki. Flow-Cytometric Isolation of Testicular Germ Cells from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Carrying the Green Fluorescent Protein Gene Driven by Trout vasa Regulatory Regions. *Biology of reproduction*, 78, 151-158 (2008).

T. Kobayashi, Y. Takeuchi, T. Takeuchi, G. Yoshizaki. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development.*, 74, 207-213 (2006).

T. Okutsu, A. Yano, K. Nagasawa, S. Shikina, T. Kobayashi, Y. Takeuchi, G. Yoshizaki. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 685-693 (2006).

### (2)口頭発表

学会

国内 30 件, 海外 25 件

その他

国内 3 件, 海外 0 件

学会

G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: Production of trout offspring from salmon parents. *WFC2008 5th World Fisheries Congress*, Yokohama, October, 2008.

G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents. *Colloque franco-japonais d'Océanographie 2008*, Marseille&Paris, France, September, 2008.

G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: Application to aquaculture. *Australasian*

- Aquaculture 2008, Brisbane, Australia, August, 2008.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish. Second National Symposium on Aquaculture Biotechnology 2008, Bogor, Indonesia, August, 2008.
- M. Ichikawa, G. Yoshizaki. Ovarian germ cells can produce functional sperm in rainbow trout. 6th International Symposium on fish endocrinology, Calgary, Canada, June, 2008.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish. Sex Determination and Gametogenesis in Fish:Current Status and Future Directions. Honolulu, USA, May, 2008.
- G. Yoshizaki. Interspecies spermatogonia transplantation in fish: Can salmon make trout? World Congress on Reproductive Biology, Hawaii, USA, May, 2008.
- G. Yoshizaki. Developmental and sexual plasticity of spermatogonia in fish. SSR 2008 41st Annual Meeting, Kailua-Kona, USA, May, 2008.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish. Forum on Fishery Science and Technology, 中国青島, 2007年10月.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: basic biology and biotechnological applications. Research on Fish Models in Utrecht, Utrecht, Netherlands, May, 2007.
- G. Yoshizaki. Testicular germ cells can produce functional eggs. Harvard University Genetics and Genomics Training Program Symposium 2007, Boston, USA, April, 2007.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: Application to aquaculture. 8th International Marine Biotechnology Conference, Israel, March, 2007.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish. Ecophysiology in Marine Organisms, Taiwan, October, 2006.
- G. Yoshizaki. Germ cell transplantation in fish: a novel technique for fish bioengineering. National Symposium of Biotechnology in Aquaculture 2006, Bogor, Indonesia, July, 2007.
- K. Tsunemoto, K. Higuchi, R. Yazawa, M. Miwa, Y. Takeuchi, G. Yoshizaki. Production of Giant croaker sperm from Nibe croaker broodstock by spermatogonial transplantation. WFC2008 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan, October, 2008.
- K. Nagasawa, Y. Takeuchi, M. Miwa, K. Higuchi, T. Morita, T. Mitsuboshi, Y. Miyaki, K. Kadomura, and G. Yoshizaki. cDNA cloning and expression analysis of a vasa-like gene in pacific bluefin tuna (BtVLG). Sex Determination and Gametogenesis in Fish:Current Status and Future Directions, Honolulu, USA, May, 2008.
- S. Shikina and G. Yoshizaki. Effects of feeder cells and conditioned medium on maintaining the survival and mitotic activity of in vitro-cultured type A spermatogonia in rainbow trout. Sex Determination and Gametogenesis in Fish:Current Status and Future Directions, Honolulu, USA, May, 2008.
- S. Shikina and G. Yoshizaki. Culture Conditions for Maintaining the Survival and Mitotic Activity of Rainbow Trout Transplantable Type A Spermatogonia. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, Saint Malo, France, June, 2007.
- A. Yano, G. Yoshizaki, K. von Schalburg, G. Cooper, BF. Koop. Identification of molecular marker for type A spermatogonia in rainbow trout. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, Saint Malo, France, June, 2007.

K. Nagasawa and G. Yoshizaki. Identification of germ cell-specific cell-surface antigen by spermatogonial EST analysis: Aim to purify viable germ cells from non-transgenic fish using specific antibody. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, Saint Malo, France, June, 2007.

T. Okutsu and G. Yoshizaki. Production of all donor-derived offspring from surrogate parents by interspecies transplantation of spermatogonia with sterile recipient. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of fish, Saint Malo, France, June, 2007.

E. Sawatari, G. Yoshizaki, T. Takeuchi. GSDF, a novel member of the TGF-B superfamily, enhances proliferation of primordial germ cell and spermatogonia in rainbow trout. Society for the Study of Reproduction 39th Annual Meeting, Omaha, Nebraska, July, 2006.

T. Kobayashi, G. Yoshizaki and T. Takeuchi. Generation of offspring from cryopreserved primordial germ cells in rainbow trout. 38th Annual meeting of the Society for the Study of Reproduction., Quebec, Canada, July, 2006.

T. Okutsu, G. Yoshizaki and T. Takeuchi. Production of salmon that generates only trout offspring; Use of sterilized triploid as recipient. 38th Annual meeting of the Society for the Study of Reproduction., Quebec, Canada, July, 2006.

G. Yoshizaki. Developmental and sexual plasticity of spermatogonia and oogonia in fish. CDB Symposium 2007 "Germ Line Versus Soma: Towards Generating Totipotency", Kobe, Japan, March, 2007.

識名信也・吉崎悟朗. ニジマス精原細胞の *in vitro* での生存を促す因子の探索. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 品川, 東京, 2009 年 3 月.

山口一馬・木瀬和芳・識名信也・河口友美・三輪美砂子・吉崎悟朗. ニジマス GDNF の発現解析および精原細胞に対する増殖促進効果の検討. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 品川, 東京, 2009 年 3 月.

長澤一衛・竹内裕・森田哲朗・三星亨・吉崎悟朗. 非遺伝子導入個体からの精原細胞の単離法-3 クロマグロ CD205 遺伝子は精原細胞で特異的に発現する. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 品川, 東京, 2009 年 3 月.

識名信也・吉崎悟朗. 代理親魚養殖を目指した ニジマス精原細胞の *in vitro* 培養技術の開発 各種魚類 feeder 細胞株が精原細胞の生存と増殖に与える影響. 第 101 回 日本繁殖生物学会大会. 福岡, 福岡, 2008 年 9 月.

大橋宏史・竹内裕・吉崎悟朗. クロマグロ生殖腺体細胞由来増殖因子 (GSDF) は A 型精原細胞を取り囲むセルトリ細胞で特異的に発現する. 第 101 回 日本繁殖生物学会大会. 福岡, 福岡, 2008 年 9 月.

番場晃・高橋加純・猿渡悦子・吉崎悟朗. セルトリ細胞を可視化した遺伝子導入ニジマスの系統化. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 清水, 静岡, 2008 年 3 月.

市川真幸・奥津智之・吉崎悟朗. ニジマス卵巣細胞移植技術を用いた次世代におけるドナー由来個体の作出: 卵巣細胞から精子を作る. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 清水, 静岡, 2008 年 3 月.

長澤一衛・吉崎悟朗. 非遺伝子導入個体からの精原細胞の単離法- ニジマス生殖細胞で特異的に発現する膜タンパク質に対する抗体の作製. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 清水, 静岡, 2008 年 3 月.

木瀬和芳・吉崎悟朗. フローサイトメーターを用いた非遺伝子導入魚からの精原細胞濃縮. 日本繁殖生物学会, 東京, 2007年10月.

長澤一衛・吉崎悟朗. 魚類精原細胞トランスクリプトーム解析による生殖細胞特異抗原の同定と抗体作製. 日本繁殖生物学会, 東京, 2007年10月.

樋口健太郎・三輪美砂子・竹内裕・吉崎悟朗. 海産魚における代理親魚養殖を目指した精原細胞移植技術の開発. 第6回日本水産増殖学会, 品川, 東京, 2007年7月.

木瀬和芳・吉崎悟朗. 非遺伝子導入個体からの精原細胞の単離 フローサイトメーターを用いたサケ科魚類の精原細胞濃縮. 2007年度日本水産学会春季大会, 品川, 東京, 2007年3月.

奥津智之・坂本 崇・望月万美子・吉崎悟朗. 精原細胞移植による機能的 Y 卵および超雄個体の作出. 2007年度日本水産学会春季大会, 品川, 東京, 2007年3月.

猿渡悦子、識名信也、竹内俊郎、吉崎悟朗. 魚類において特異的に存在する新規サイトカイン GSDF はニジマス始原生殖細胞および A 型精原細胞の増殖を促進する. 日本分子生物学会 2006 フォーラム [ 分子生物学の未来 ], 名古屋, 愛知, 2006年12月.

矢野文香・鈴木健介・吉崎悟朗. vasa-GFP 遺伝子導入ニジマスにおける各種精巣細胞集団の単離. 第99回日本繁殖生物学会, 名古屋, 愛知, 2006年9月.

吉崎悟朗・奥津智之. 魚類精原幹細胞の可塑性. 第12回小型魚類研究会, 静岡, 2006年9月.

猿渡悦子、識名信也、竹内俊郎、吉崎悟朗. ニジマス生殖腺体細胞で特異的に発現する新規サイトカイン GSDF は始原生殖細胞および精原細胞の増殖を促進する. 日本繁殖生物学会大会, 愛知, 2006年8月.

鈴木健介 奥津智之 矢野文香 小林輝正 吉崎悟朗. フローサイトメーターを用いたニジマス精原幹細胞集団の濃縮. 第9回リパ イテクトロジ -学会大会, 品川, 東京, 2006年5月.

奥津智之・坂本崇・望月万美子・吉崎悟朗. ニジマス雌宿主に移植した精原細胞は Y 卵に分化する-新たな全雄集団作出法の開発. 第9回リパ イテクトロジ -学会大会, 品川, 東京, 2006年5月.

識名信也・吉崎悟朗. ニジマス精原細胞の in vitro 培養技術の開発. 第9回リパ イテクトロジ -学会大会, 品川, 東京, 2006年5月.

長澤一衛・吉崎悟朗・竹内俊郎. 精原細胞 EST 解析による細胞表面抗原マーカーの同定-特異抗体を用いた魚類生殖細胞の単離を目指して. 第9回リパ イテクトロジ -学会大会, 品川, 東京, 2006年5月.

吉崎悟朗. 魚類生殖細胞の性: 精原細胞から卵を作る. 魚類生殖細胞の性: 精原細胞から卵を作る. 第3回 生殖研究ワークショップ, 三崎, 神奈川, 2008年8月.

吉崎悟朗. 魚類精原幹細胞の性的可塑性. 特定領域「性分化機構」第3回「冬のワークショップ」, 東京, 2008年3月.

吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞移植を用いた新たな発生工学. 特定領域「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」 発足記念キックオフシンポジウム, 東京, 2008年3月.

吉崎悟朗. 魚類精原幹細胞株からの個体の作出. JST サイエンス・ナイトカフェ～最先端の科学技術に触れる～. 東京, 2008年3月.

吉崎悟朗. ニジマスからピワマスは生まれるか? 魚類生殖細胞移植を用いた絶滅危惧種の保存. 第4回びわこ国際バイオセミナー「湖水の生き物に学ぶ～ゲノムから産業へ～」, 長浜, 滋賀, 2007年11月.

吉崎悟朗. 生殖細胞移植を用いた魚類の発生工学. 第100回繁殖生物学会大会 第100回記念シンポジウム, 東京, 2007年10月.

吉崎悟朗. 生殖細胞移植により明らかとなった魚類生殖細胞の可塑性. 2007年度 国立遺伝学研究所 研究会「生殖細胞と生殖腺形成の普遍性と多様性」, 三島, 静岡, 2007年7月.

吉崎悟朗. 発生工学を用いて魚を殖やす. 第10回マリンバイオテクノロジー学会 市民講座, 山形, 2007年5月.

吉崎悟朗. 単離生殖細胞からの魚類個体の作出. 平成18年度日本農学会シンポジウム-動物・微生物における遺伝子工学研究の現状と展望, 日本水産学会関東支部シンポジウム  
吉崎悟朗. 魚類精原幹細胞の可塑性. 第77回日本動物学会シンポジウム「魚類研究のクロストーク」, 島根, 2006年10月.

吉崎悟朗. 魚類生殖細胞を用いた発生工学: シャーレの中の細胞から個体を作る. 日本水産学会関東支部シンポジウム, 栃木, 2006年8月.

吉崎悟朗. 生殖細胞移植を用いた魚類の発生工学. 第4回最先端動物遺伝育種セミナー, 京都, 2006年7月.

吉崎悟朗. アジからマグロは産まれるか?! 魚類始原生殖細胞用いた発生工学研究 期待される資源確保、代替ES細胞作出への応用. 東京テクノフォーラム研究交流会, 東京, 2006年5月.

(3)特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

件数

国内出願 0

海外出願 0

計 0

(4)その他特記事項

プレス発表および報道

2009年2月21日 日本経済新聞 技術で越える サバがマグロを産む日

2009年2月7日 Fremantle Herald (Australia) Surrogacy a fishy business

2009年1月1日 日経産業新聞 サバがマグロを生む!?

2008年12月30日 日刊工業新聞 サバがマグロを生む!?! ウナギ完全養殖研究

2008年11月3日 日経ビジネス 技術フロンティア

魚の「借り腹養殖」サバにマグロを産ませる

2008年10月30日 読売新聞 明日へ サカナを育む(1)「マグロを生むサバ」研究

2008年8月30日 文化放送「大村正樹のサイエンスキッズ」

「サバがマグロを生む話」

2008年8月23日 文化放送「大村正樹のサイエンスキッズ」

「ヤマメがニジマスを生む話」

2008年8月14日 Jurnal Sukabumi (Indonesia) Ikan Kembung Beranak Tuna  
 2008年7月29日 東京新聞 サイエンスレポート 絶滅危惧種を救う技術  
 2008年7月29日 中日新聞 サイエンスレポート 絶滅危惧種を救う技術  
 2008年7月1日 第169回国会(常会)提出 平成19年度水産の動向  
 平成20年度水産施策  
 2008年6月1日 サイエンスチャンネル The Brand-new Science NEWS 科学技術振興機構 #01 ニジマスしか生まない代理ヤマメ両親の作出に成功  
 2008年5月1日 AQUARAMA MAGAZINE Deep-frozen assets with far-reaching potential  
 2008年4月1日 朝日新聞社 論座 SEA 風土記 ニジマスの母がヤマメ! ?  
 2008年3月10日 (株)ゼネラル・プレス POCO21 サバがマグロを産む!  
 2008年1月4日 The New York Times Spawning Something Fishy  
 2007年12月1日 独立行政法人科学技術振興機構 JST News ヤマメにニジマスを産ませた訳。  
 2007年12月1日 NHK サイエンスゼロ  
 2007年11月13日 NHKラジオ第2 What's Up Japan 「サイエンス&テクノロジー」  
 2007年11月1日 兵庫教育 第58巻第8号 サバはマグロを産むか? 魚類生殖細胞を用いた発生工学  
 2007年10月19日 NHK おはよう日本 NHK おはよう日本  
 2007年10月17日 NHK ニュースまるごと山梨 大泉ステーションから、ヤマメをニジマスの代理親にして稚魚を誕生させる研究について紹介。  
 2007年10月15日 National Public Radio Surrogate fish could save endangered brethren  
 2007年10月2日 日本経済新聞 ハイテクで新味 サバからマグロ現実味  
 2007年9月28日 NHK 首都圏放送センター ゆうどきネットワーク  
 2007年9月27日 Telegraph.co.uk Scientists manage to breed trout from salmon  
 2007年9月26日 [www.dailymail.co.uk](http://www.dailymail.co.uk) Scientists breed healthy trout from salmon to boost endangered fish stock  
 2007年9月24日 文教ニュース ニジマスの稚魚しか生まない代理ヤマメ両親の作出に成功  
 2007年9月18日 Bloomberg.com Sperm transplantation between fish may preserve endangered Species  
 2007年9月18日 SeaFood intelligence.com Japanese scientists produce trout from triploid salmon parents; Next? Tuna from mackerel parents  
 2007年9月14日 The Scientist.com Salmon parents, trout offspring  
 2007年9月14日 Yahoo!NEWS Salmon spawn baby trout in experiment  
 2007年9月14日 Scientific American Salmon spawn trout  
 2007年9月14日 ScienceNow  
 2007年9月14日 Science museum Sperm transplant hope for endangered species  
 2007年9月14日 朝日新聞 両親ヤマメ 子はニジマス精子のもと雌雄に移植  
 2007年9月14日 産経新聞 サバからマグロも? ヤマメが両親 子供はニジマス  
 2007年9月14日 水産経済新聞 東京海洋大や北大が新技術紹介  
 2007年9月14日 東京新聞 ヤマメからニジマス誕生細胞移植で「代理親」づくり希少種保護にも活用  
 2007年9月14日 水産経済新聞 「マグロをサバに生ませる」大きな一歩ヤマメからニジマス稚魚のみ生産に成功  
 2007年9月14日 読売新聞 ヤマメがニジマス産んだマグロ養殖応用に期待  
 2007年9月14日 毎日新聞 ニジマスしか産まないヤマメ次はサバからマグロ! ?  
 2007年9月14日 日本経済新聞 ヤマメからニジマスふ化  
 2007年9月14日 NATIONAL GEOGRAPHIC NEWS Sterile salmon produce baby trout  
 2007年9月14日 Nation World Can a surrogate fish save a species?  
 2007年9月14日 Nation World Surrogate Technique Technique could help revive fish stocks  
 2007年9月14日 VIDA Salmoes estereis concebem trutas

2007年9月14日 TBS みのもんたの朝ズバッ！ 細胞移植でヤマメからニジマス誕生  
2007年9月14日 フジテレビ FNNスーパーニュース サバからマグロが産まれる。  
2007年9月14日 TBS テレビ イブニングニュース TBS テレビ イブニングニュース  
2007年9月14日 NHK テレビ ニュース 細胞の移植技術を利用して、ヤマメからニジ  
マスを誕生させることに成功  
2007年9月13日 [news@nature.com](http://news@nature.com) Salmon parents give birth to trout Genetic technique  
creates viable fish sperm and eggs.  
2007年9月1日 日経トレンディ サバから生まれたマグロ  
2007年7月31日 産経新聞 マグロ鮮度保つ新技術サバに産ませて量確保  
2007年6月25日 読売新聞 オスから卵ニジマス繁殖  
2007年6月24日 日本経済新聞 細胞移植でサバからマグロ  
2007年1月3日 朝日小学生新聞 サバからまぐるがうまれるかも：最先端技術で絶滅か  
ら守る  
2007年1月1日 東京新聞 代理親で絶滅にひんする魚を救う  
2006年11月28日 朝日新聞 マグロ 消費国こそ資源保護を  
2006年6月4日 読売新聞 トビがタカを産めるかも：ヤマメからニジマスの卵、借り腹  
技術で養殖も  
2006年4月13日 日経産業新聞 養殖魚排泄のアンモニア半減

## 受賞

### 第3回 生殖研究ワークショップ ベストプレゼンテーション賞受賞

吉崎悟朗. 魚類生殖細胞の性：精原細胞から卵を作る. 魚類生殖細胞の性：精原細胞から卵  
を作る. 第3回 生殖研究ワークショップ, 三崎, 神奈川, 2008年8月.

## 9. 結び

本研究期間において残念ながらニジマス精原幹細胞の株化を実現することはできなかつたが、それを目指した過程において、多くの技術開発、改良を行うことができた。特に移植可能な精原細胞の基礎培養系の構築や、精原細胞の生残や増殖をサポートするニジマス由来の種々の増殖因子の生産、支持細胞株の樹立に成功した。また、本研究で開発したニジマスのセルトリ細胞の可視化、単離、培養技術は今後の魚類の繁殖生理研究において極めて重要なステップになったと考えられる。また、移植実験の改良過程において異種間での生殖細胞移植系を構築できた点も、本技術の産業応用を考えただけでは大きな前進と考える。

さきがけ時代から SORST までの一連のサポートにより、研究代表者が行ってきた魚類生殖細胞を用いた発生工学的技術の開発の根幹となる多くの発見や技術開発を導くことができた。この場を借りて感謝の意を表したい。今後はこれらの技術の産業応用に加え、魚類精原細胞の幹細胞能の研究、さらに生殖系列幹細胞とその支持細胞の性に関する研究にも着手していきたい。