

## ヒラメにおける精原細胞移植による代理親魚技術の開発

相川英明・長谷川理・王俊杰・坂本 崇・河合 純・鈴木 直子・竹内 裕

Development of the transplantation method by intraperitoneal microinjection of spermatogonial cell in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*Hideaki AIKAWA\*・Osamu HASEGAWA\*\*・Junjie WANG\*\*\*・Takashi SAKAMOTO\*\*\*  
・Jun KAKAI\*\*\*\*・Naoko SUZUKI\*\*\*\*・Yutaka TAKEUCHI\*\*\*\*\*

## 結 言

ヒラメは全国で毎年約 1,500 万尾の種苗が放流され<sup>1)</sup>、マダイとともに栽培漁業の最重要な対象魚種の一つである。本県においても毎年約 20 万尾の種苗が県下の浅海域に放流されている<sup>2)</sup>。近年、栽培漁業においては地域の遺伝的多様性に配慮した人工種苗を生産し、放流することが求められている。そのため、国の指針では親魚は野生魚を用い、雌雄比を 1:1 とした上で 50 尾以上保有することを基本としている<sup>1)</sup>。

神奈川県水産技術センター(以下、「当センター」)では、地元産の天然魚由来のヒラメ種苗の放流に取り組んでいるが、当センターには 50 尾もの成魚を親魚として養成するような大型水槽は施設的な制約から設置不可能であるため保有していない。そこで、産卵期に近傍の魚市場において放卵間近と思われる腹部が膨満した天然魚を購入し、2 t FRP 水槽に収容して短期間養生した後採卵しているが、自然採卵は望めず、腹を絞って人工的に採卵しているため、一尾から得られる卵量は少なく<sup>3)</sup>、二十万尾の放流用種苗を生産するのに必要な受精卵の確保は困難である。また、天然魚を搾出法で採卵して種苗生産した場合、DNA 分析を用いた親子鑑定によると採卵に用いた親魚のうち、生産した種苗に関与するものは 18%に限られていたとの報告もある<sup>4)</sup>。さらに、人工採卵では卵を確保できる時期が遅れるため、種苗生産した稚魚が放流サイズである 7~8 cm に達

するのは 7 月下旬<sup>2)</sup>となるが、夏季は相模湾においてヒラメ稚魚の餌料となるアミ類の個体群密度が大幅に低下する時期となる<sup>5)</sup>。アミ類の出現時期から見た本県におけるヒラメ種苗放流適期は 5 月~6 月と考えられ、餌料環境的にも好ましい時期ではない。このようなことから、地元の天然魚由来のヒラメ種苗の放流は事実上不可能な状態にありほとんど行われていないのが現状である。

一方、当センターでは理化学研究所、東京海洋大学の 3 機関との連携研究に取り組み、1000 個以上のマイクロサテライト DNA マーカーを掲載した「ヒラメの遺伝子地図」の作製と、ヒラメの雌性発生魚からリンホシスチス症の耐性を有する系統魚を開発している<sup>6~11)</sup>。また、この系統魚は民間の種苗生産施設において養殖用種苗として生産されている<sup>12)</sup>。また、近年、温暖化により、ヒラメなどの養殖業においては、夏季に水温が著しく上昇するなどして飼育環境の悪化が指摘されているが、この適応対策として、当センターでは高温耐性形質のヒラメ系統魚の開発にも取り組んでいる<sup>13)</sup>。当センターが開発したこれらの系統魚は、0.5~2 t の水槽に数尾~数十尾を収容して周年飼育しているため、継代飼育を重ねていくうちにこのような狭い環境下でも成熟し、熟卵や精子を容易に確保可能という特性を有するに至っている。

そこで、遺伝的多様性に富む放流用のヒラメ種

2020. 11. 9 受理 神水セ業績 No. 21-3

脚注 \*栽培推進部、\*\*内水面試験場

\*\*\*東京海洋大学 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

\*\*\*\*理化学研究所 横浜研究所 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

\*\*\*\*\*金沢大学理工学域能登海洋水産センター 〒927-0552 石川県鳳珠郡能登町字越坂 11-4-1

苗を効率良く、安定的に生産するため、マス類、ブリ、フグ及びニベ<sup>14~17)</sup>において研究開発された代理親魚技術を応用して、当センターで保有する系統魚に天然魚の遺伝子を有した配偶子を生産させる技術の開発を行った。

### 材料および方法

#### 系統魚からの代理親魚候補の作出

精原細胞を移植する代理親魚候補を作出するために、2016年3月28日～4月25日に耐病性を有する系統魚<sup>18, 19)</sup>間において人工交配を行った。人工交配で得た受精卵には染色体処理(受精3分後に0℃海水に45分間浸漬し、第二極体の放出を阻止)を行い、3倍体魚<sup>20)</sup>となるようにして不稔性を持たせた。染色体処理による倍数性は、Cystain PI absolute T kits (Partec製)により、仔魚のDNAにPI(ヨウ化プロピジウム)染色を施し、フローサイトメーター (Guave PCA96, Millipore, Billerica, MA製)により確認した<sup>21)</sup>。

#### 精原細胞の移植と代理親魚の養成

精原細胞のドナーとする天然魚由来の若令魚を作出するために、2015年4月16日に本県沿岸で漁獲された天然魚同士を交配した。交配で得た仔魚を1年間飼育後、2016年4月15日～5月13日に5尾の雄魚から未成熟の精巣を摘出し、ディスペーゼを用いて細胞を分散し、移植用精原細胞(ドナー細胞)を調整した<sup>22)</sup>。これらの細胞を15μLずつ(約2万細胞)マイクロマニピュレーター(NARISHIGE製)を用いて、前述の代理親魚候補の仔魚の腹腔内に移植した。移植後の仔魚はパンライト水槽に収容して、飼育を継続し、代理親魚に養成した。

#### 代理親魚の精子に含まれるドナー由来の複数のハプロタイプ(遺伝子型)の検出

ヒラメ仔魚への精原細胞の最適な移植時期の解明や移植成否の判定用のDNAマーカーの開発を行った2013年のヒラメの代理親魚研究<sup>23)</sup>で保管していたサンプルセット(天然魚(ドナーの両親)9個体の鱭、代理親魚3個体の鱭とこれから得られた精子)(なお、このサンプルセットにはドナーの自身のサンプルは無い)からDNAを抽出してMHC

(主要組織適合遺伝子複合体のα鎖およびβ鎖)遺伝子の次世代シーケンサー解析<sup>23)</sup>により、代理親魚1尾の精子にドナー由来の複数のハプロタイプ(遺伝子型)が含まれているか調べた。

#### ドナーから次世代魚(F1魚)へ引き継がれるハプロタイプ(遺伝子型)の検出

代理親魚の遺伝子が次世代魚へ引き継がれるか確かめるため、2016年5月12日に精原細胞を移植した3倍体の代理親魚から得られた精子を、2倍体の系統魚の未受精卵に媒精し、次世代魚(以下、F1魚)の作出を行った。上記と同様にMHC遺伝子の次世代シーケンサー解析により、遺伝子型が代理親魚由来であるかドナー由来であるか判別した。

### 結 果

#### 系統魚からの代理親魚候補の作出

染色体処理により作出した代理親魚の鱭におけるフローサイトメーターの蛍光強度は、2倍体魚の1.5倍(2倍体魚(2n)の相対的なDNA量を1,000とした場合、1.5倍量の1,500)であったことから代理親魚が3倍体であることが確認された(図1)。

#### 精原細胞の移植と代理親魚の養成

2016年4月15日～5月13日に移植用精原細胞を、マイクロマニピュレーターを用いて日齢12～15日のヒラメ仔魚4ロット計229尾の腹腔内に移植した。2017年3月13日の時点でこれらの仔魚は58尾生残し、このうちロット2の1尾及びロット3の5尾の計6尾から精子を採取した(表1)。そのうち、ロット3の5尾の精子のフローサイトメーターの蛍光強度は通常の2倍体魚の精子(1N)と同じく500を示し、3倍体の代理親魚自身に由来することのないドナーの精原細胞由来の精子を産出していることが確認された(図1)。

#### 代理親魚の精子に含まれるドナー由来の複数のハプロタイプ(遺伝子型)の検出

2013年のヒラメの代理親魚研究のサンプルセットの解析の結果、ドナーの両親のハプロタイプ

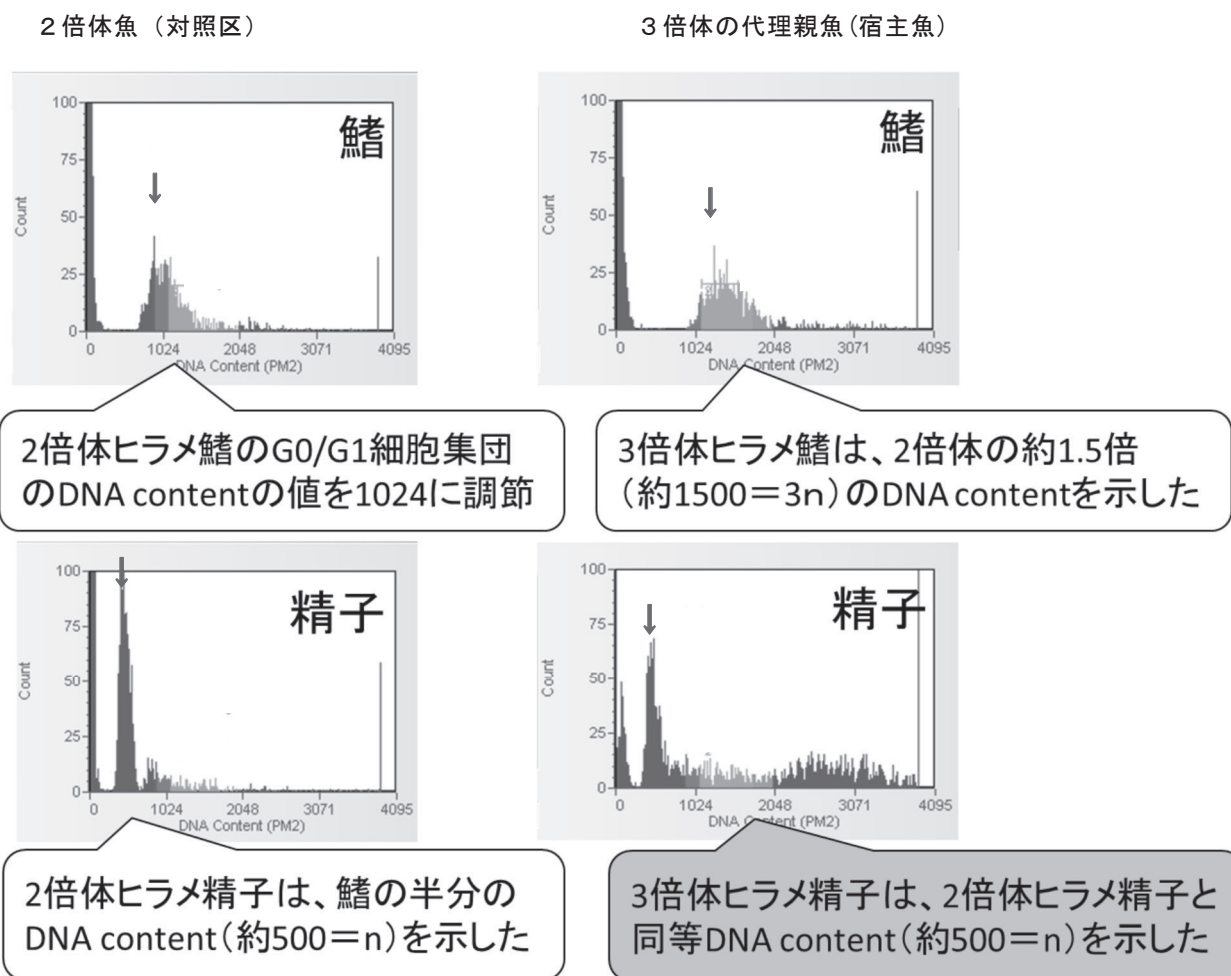


図1 2倍体魚および3倍体の代理親魚の鰭と精子のDNA量

X軸はDNA量（蛍光強度）、Y軸は細胞数を表す。ヒラメの2倍体魚（2n）の鰭を基準にして、DNA量（DNA content）のピークを1,000にフローサイトメーターを調整して測定した。2倍体魚の精子のDNA量は500で倍数性は1n、3倍体の代理親魚の鰭は1,500（2倍体魚の鰭の1.5倍量）で3nとなった。3倍体の代理親魚の精子のDNA量は、2倍体魚の精子と同じく500であったので1nとなり、3倍体の代理親魚自身に由来することのないドナー魚の精原細胞由来の精子を産出していることが確認された。

表1 精原細胞の移植と代理親魚（宿主魚）の養成

ロット	受精日	宿主			日齢	倍数性	ドナーの尾数	移植尾数	2016.06.03			2017.03.13	
		移植日	Stage	飼育水温					残存尾	残存尾	排精尾数		
1	2016年3月28日	2016年4月15日	D~E	16°C	13	3n	5	30	3	3			
2	2016年4月4日	2016年4月19日	B~C	16°C	12	3n	5	51	5	3	1		
3	2016年4月25日	2016年5月12日	D~E	18°C	14	3n	5	54	45	26	5		
4	2016年4月25日	2016年5月13日	D~E	18°C	15	3n	5	94	71	26			
								229	124	58	6		

（ドナーにおけるハプロタイプの集合体）のうち、代理親魚の精子には代理親魚自身に由来する3つハプロタイプ（3, 9, 10）を除くと、ドナーの両親由来の4つハプロタイプ（1, 2, 5, 6）が検出された（図2）。このサンプルセットではドナー自身のサンプルを作らなかったため、ドナーの遺伝

子型（2つのハプロタイプの組み合わせパターン）が不明であるが、少なくとも2尾分（1, 2, 5, 6の4つのハプロタイプのうち、2つずつ保有するドナーが2尾の場合）、最大で4尾分（ハプロタイプを1つずつ保有するドナーが4尾の場合）のドナーのハプロタイプが代理親魚1尾の精子に

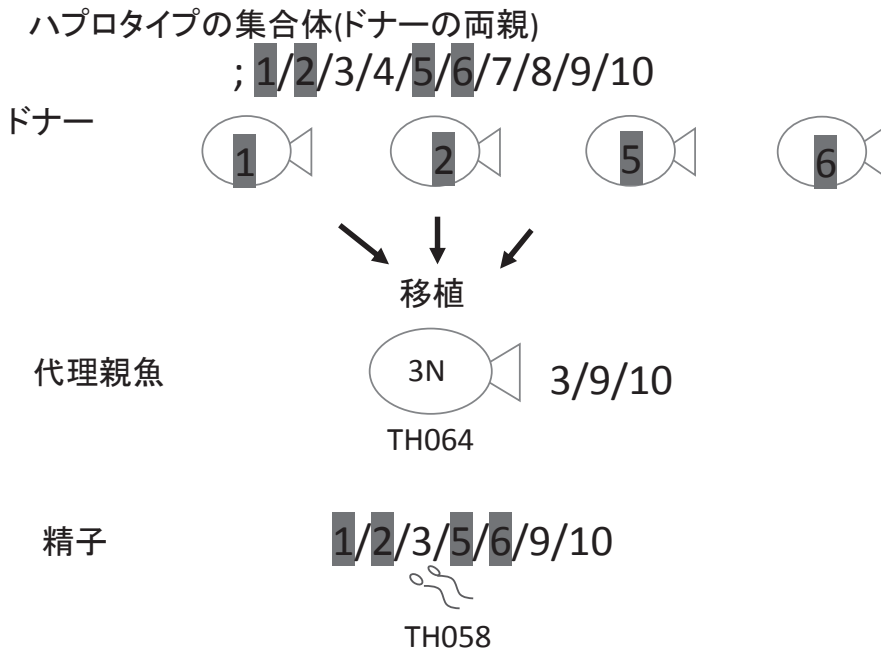


図2 代理親魚の精子に含まれるドナー由来の複数のハプロタイプ(遺伝子型)の検出

精子の中には代理親魚自身に由来する3つハプロタイプ(3, 9, 10)を除くとドナー由来のハプロタイプ(赤色)の4種類(1, 2, 5, 6)が検出された。

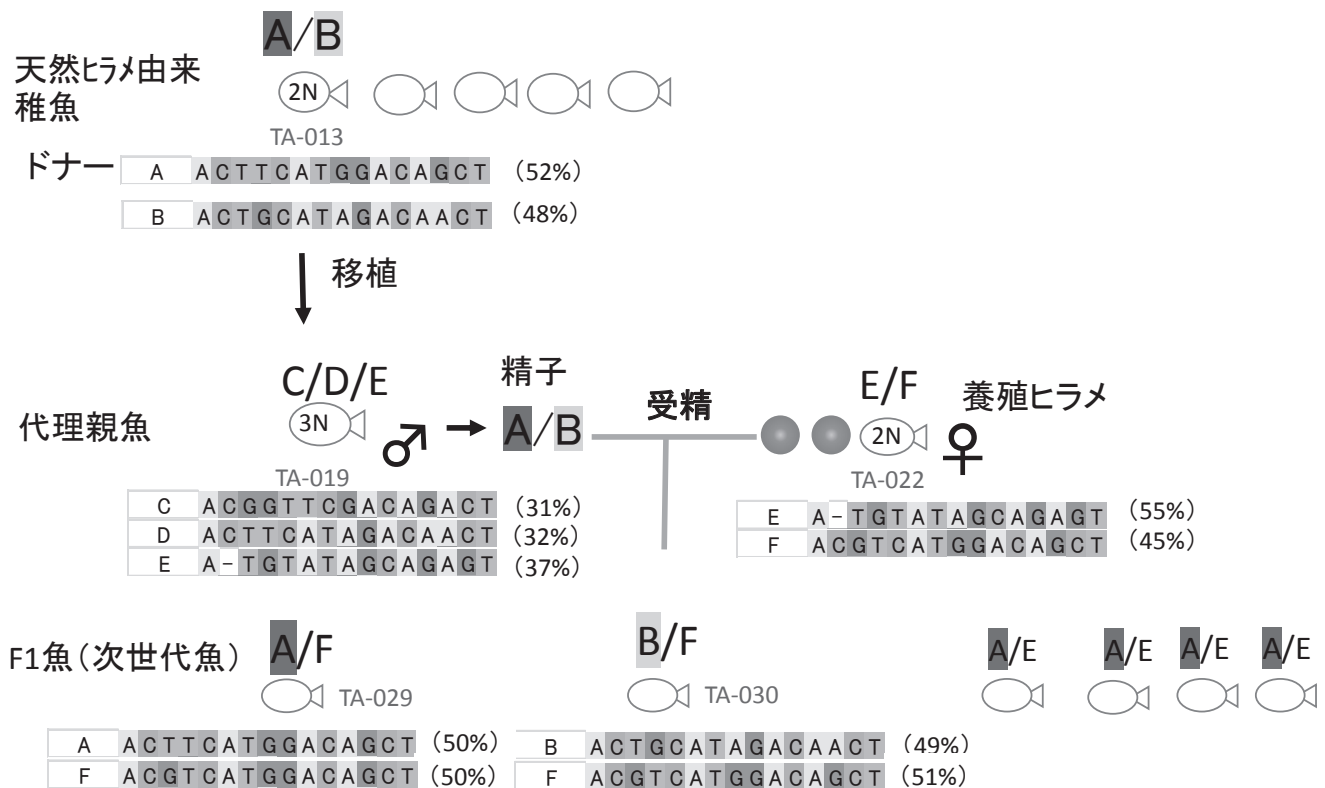


図3 F1魚のMHCハプロタイプ解析結果

TA-029~TA034のF1魚のすべてに、ドナーのハプロタイプ(天然魚由来の遺伝子型)が引き継がれていることが分かる。( )の数値はそれぞれのサンプルに含まれる比率を表す。

含まれることが分かった。なお、上記以外に代理親魚の精子には3つハプロタイプ(3, 9, 10)が含まれるが、これらのハプロタイプは代理親魚自身とドナーの両親(ドナーにおけるハプロタイプの集合体)に共通するので、両者のどちらに由来するか判別できなかった。

### ドナーから次世代魚(F1魚)へ引き継がれるハプロタイプ(遺伝子型)の検出

次世代シーケンサー解析の結果を図3に示す。この図からドナーのTA-013のハプロタイプAがF1魚のTA-029に、同様にドナーのハプロタイプBがF1魚のTA-030に引き継がれていることが分かった。また、調べたF1魚の6尾すべてにドナーのハプロタイプ(天然魚由来の遺伝子型)が引き継がれており、代理親魚由来のハプロタイプはみられず、移植が成功していることが明らかになった。

## 考 察

異種間移植法による代理親魚技術では、代理親魚自身の配偶子を形成させず、ドナー(移植した精原細胞)由来の配偶子のみを効率的に生産するために、不妊化した3倍体魚が用いられている<sup>22, 24, 25)</sup>。この方法を応用し、本研究ではヒラメにおいて、天然魚由来の精原細胞を3倍体の系統魚へ移植したところ、これらの雄魚から天然魚由来の遺伝子型を保有する精子を作出することができた。さらに、代理親魚1尾の精子には、複数の天然魚に由来する遺伝子型が含まれることが明らかになった。

一方、本研究では3倍体の代理親魚の精子には代理親魚自身とドナーの両親(天然魚)に共通する遺伝子型が含まれる場合、これらが両者のどちらに由来するか判別できなかった。ヒラメの3倍体魚の精子を媒精した卵のふ化率は0%となること<sup>20)</sup>、3倍体のヒラメの代理親魚の精子と通常の2倍体魚の雌との交配で作出した仔魚には、代理親魚自身のものではなく、ドナーの遺伝子型のみが確認されていることから<sup>23)</sup>、本研究の場合も、3倍体の代理親魚の精子と通常の2倍体魚の雌との交配で次世代魚を作成すれば、代理親魚自身のものではなく、ドナー由来の遺伝子型を有する

稚魚のみが誕生するので、これら稚魚の遺伝型を調べれば代理親魚自身あるいはドナー由来のどちらかであるか判別できるものと推察される。

現在までのところ、雌の代理親魚から卵が得られていないが、ヒラメの雌は3歳魚から産卵するとされていることから<sup>26)</sup>、雌の代理親魚の飼育を継続することで、2021年春には卵が確保できるであろう。

本研究によって複数の天然魚からの精原細胞を混合し、これらを1尾の代理親魚に移植すれば、少ない親魚にでも遺伝的多様性が担保された放流用ヒラメを効率良く生産可能なことが示された。また、このことは代理親魚1尾が複数の天然親魚の役割を担うため、親魚の飼育施設の省スペース化も図られるものと期待される。

天然魚を種苗生産用の親魚とする場合、飼育施設への病原体の持ち込みが懸念されるが、今回の手法では、天然魚はドナーとして精原細胞のみに利用するため、天然魚を親魚に養成することは不要となる。このように、天然魚を精原細胞の供給源としてのみ利用すれば、病原体の飼育施設への侵入リスク<sup>27)</sup>を低減でき、魚類防疫上の利点もある。

ニジマスでは凍結保存した精原細胞においても代理親魚へ移植可能なことから<sup>24)</sup>、ヒラメについても同様の方法が応用できれば、優良な形質を有する系統魚を遺伝資源として保存する方法として活用することも考えられる。これらの技術は、遺伝的多様性を維持したヒラメの栽培漁業の推進にあたって有益な手段となることが考えられ、今後その可否を検討することも必要であろう。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ヒラメの採卵や飼育では、栽培推進部の神山公男氏、木村トヨ子氏、金子栄一氏、吉田幸正氏にはたいへんお世話になりました。ここに深く御礼申し上げます。次世代シーケンサー解析にご尽力くださいました理化学研究所の川島麗氏、中村久美氏、田上道平氏に厚く御礼申し上げます。当センターのヒラメに関する研究を進めるにあたり、御鞭撻を賜りました横浜美術大学岡本信明学長に心より感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 水産総合研究センター・水産庁(2015)：人工種苗放流に係る遺伝的多様性への影響リスクを低減するための技術的な指針，人工種苗放流の遺伝的多様性に関する指針検討委員会，16-17.
- 2) 神奈川県 (2015)：平成 26 年度神奈川県水産技術センター業務概要，40.
- 3) 田内大(1980)：天然ヒラメ親魚からの採卵についてⅡ，神奈川県水産試験場研究報告，1，55-57
- 4) 相川英明(2016)：ヒラメの親魚、種苗、漁獲物の遺伝的関係の調査-2，平成 27 年度広域種資源造成型栽培漁業推委託事業年度報告書，6，4-7.
- 5) 片山知史・一色竜也・渡辺諭史・福田雅明・工藤孝浩・山田敦(2005)：相模湾砂浜浅海域におけるヒラメ 0 歳魚とアミ類の種間関係，黒潮の資源海洋研究，6，49-56.
- 6) 神奈川県 (2006)：DNA マーカーを利用した病気に強く育てやすいヒラメ優良品種の革新的遺伝的作出方法の開発，平成 17 年度「バイオ技術を活用した食の安全・安心を確保する独創的技術の開発」研究成果報告書．29-36.
- 7) 神奈川県 (2007)：DNA マーカーを利用した病気に強く育てやすいヒラメ優良品種の革新的遺伝的作出方法の開発，平成 18 年度「バイオ技術を活用した食の安全・安心を確保する独創的技術の開発」研究成果報告書．13-20.
- 8) 神奈川県 (2008)：DNA マーカーを利用した病気に強く育てやすいヒラメ優良品種の革新的遺伝的作出方法の開発，平成 19 年度「バイオ技術を活用した食の安全・安心を確保する独創的技術の開発」研究成果報告書．13-20.
- 9) 神奈川県 (2009)：DNA マーカーを利用した病気に強く育てやすいヒラメ優良品種の革新的遺伝的作出方法の開発，平成 20 年度「バイオ技術を活用した食の安全・安心を確保する独創的技術の開発」研究成果報告書．19-37.
- 10) 神奈川県 (2010)：ヒラメ耐病性優良系統魚の作出技術開発，平成 21 年度 産学公地域総合研究成果報告書．9-24.
- 11) 神奈川県 (2011)：ヒラメ耐病性優良系統魚の作出技術開発，平成 22 年度 産学公地域総合研究成果報告書．35-51.
- 12) 成田篤史(2014)：マリンテック(株)の種苗生産体制とリンホ耐性のヒラメの生産，養殖ビジネスよくわかる種苗生産と育種，97-99.
- 13) 神奈川県 (2014)：平成 25 年度神奈川県水産技術センター業務概要，40-41.
- 14) Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G (2009)：Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction*, 81, 1055-1063.
- 15) Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G (2007)：Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317, 1517.
- 16) Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G (2009)：Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction*, 81, 1055-1063.
- 17) Morita T, Kumakura N, Morishima K, Mitsuboshi T, Ishida M, Hara T, Kudo S, Miwa M, Ihara S, Higuchi K, Takeuchi Y, Yoshizaki G (2012)：Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of Reproduction*, 86, 1-11.
- 18) 岡本信明・小林一展・藤加奈子・長谷川理(2006)：リンホシスチス病抵抗性のヒラメの識別方法，特許公報第 3861170 号，日本国特許庁，1-10.
- 19) 岡本信明・坂本崇・小林加奈子・長谷川理・河合純・倉田修(2013)：ヒラメのエドワジェラ症感受性判別方法，特許公報第 5344389 号，日本国特許庁，1-7.
- 20) 田畑和男・五利江重昭・川村芳浩(1989)：3 倍体ヒラメの飼育特性と成熟，水産増殖，36，267-276.
- 21) Yoshikawa H, Takeuchi Y, Ino Y, Wang J, Iwata G, Kabeya N, Yazawa R, Yoshizaki

- G(2016): Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, *Nibe croaker* (*Nibea mitsukurii*), *Aquaculture*, online 13 May 2016.
- 22) 竹内裕 (2012) : 精原細胞の移植法を用いた水産有用海産魚類における代理親魚技術の確立, 日本水産学会誌, 78, 673-676.
- 23) 長谷川理・竹内 裕・坂本 崇・河合 純・田上 道平・鈴木 直子 (2016) : 遺伝的多様性に配慮した放流用ヒラメ種苗の生産技術開発、神奈川重点実用化研究（平成24年度-平成26年度）実施内容説明書 <https://www.pref.kanagawa.jp/docs/r5k/cnt/f4898/documents/770713.pdf> ; (2020.02.16 取得)
- 24) 吉崎悟朗 (2015) : 代理親魚技法の構築とその応用に関する研究, 日本水産学会誌, 81, 383-388.
- 25) 濱崎将臣 (2015) : 代理親魚技術を用いたトラフグ全雄種苗生産, アクアネット, 2015年9月号, 36-40.
- 26) 山口県水産課 (2012) : ヒラメ, 栽培漁業のてびき (改訂版), 12-24.
- 27) 有瀧真人 編 (2013) : 沿岸魚介類資源の増殖とリスク管理, 水産学シリーズ 177, 47-51.