

魚の生殖細胞を人工的につくる技術を開発

～養殖の効率化や絶滅危惧種の保全に期待～

ポイント

- ・二つの遺伝子の活性化により魚の胚の細胞から生殖細胞をつくり出すことに成功。
- ・人工的につくり出した生殖細胞から機能的な精子と卵が産生されることを確認。
- ・借腹生産技術やゲノム編集技術の効率化に期待。

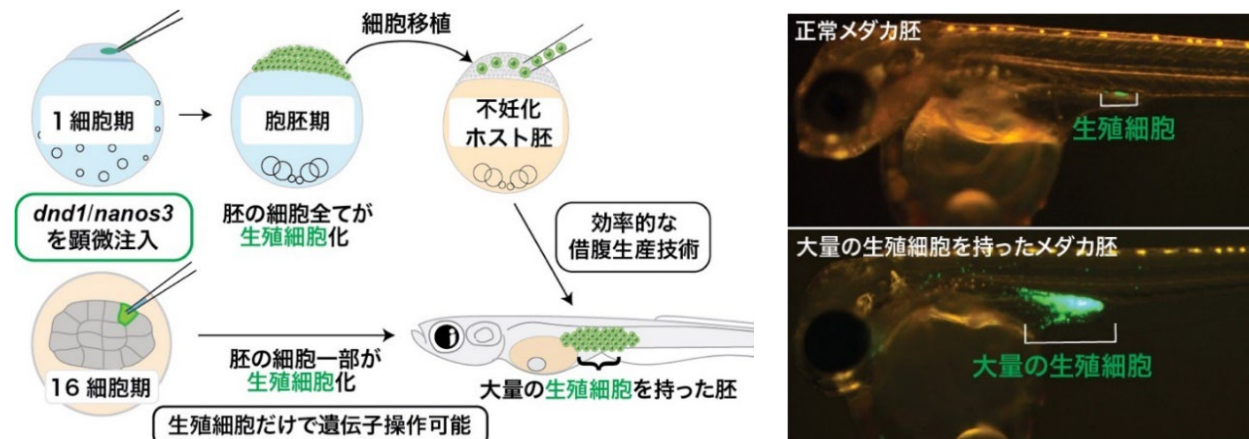
概要

北海道大学大学院水産科学研究院の西村俊哉助教、藤本貴史教授らの研究グループは、魚の初期胚の細胞から人工的に生殖細胞をつくり出す技術の開発に成功しました。

生殖細胞は、将来、卵や精子になる細胞です。生き物が次の世代に命を繋げるために欠かせない細胞ですが、これらがつくられる仕組みの多くは謎に包まれていました。研究グループは、メダカを用いた研究によって、生殖細胞をつくる上で鍵となる二つの遺伝子「*dnd1*」と「*nanos3*」を同定しました。これら二つの遺伝子をメダカの初期胚の細胞で活性化させ、それらの細胞を他のメダカ胚に移植したところ、驚くべきことに、移植したほぼ全ての細胞が生殖細胞と同様の特性を持ち、将来の精巣と卵巣になる生殖腺に定着しました。その結果、大量の生殖細胞を持ったメダカ胚が作出されました。このメダカが成長すると、妊性を持ったオスとメスとなり、次世代のメダカが誕生しました。このことは、*dnd1* と *nanos3* 遺伝子の活性化によってつくられた生殖細胞から機能的な精子と卵が産生されたことを意味しています。さらに、研究グループは、生殖細胞をつくる技術とゲノム編集技術^{*1}を組み合わせ、効率的に遺伝子の操作ができる手法も開発しました。

近年、マグロのように飼育が難しい魚や絶滅危惧種の精子と卵を、飼育が容易な魚につくらせる「借腹生産」技術の開発が進められています。従来、効率的な借腹生産のためには、胚や生殖腺から生殖細胞を選別・濃縮する必要があり、その工程には高度な技術を要しました。本研究で開発した生殖細胞をつくる技術は、受精卵へ *dnd1* と *nanos3* mRNA を顕微注入すれば、細胞の選別なしに細胞移植が可能のため、簡便で効率的な借腹生産技術に繋がります。

なお、本研究成果は、2025年2月8日（土）公開の *iScience* 誌に掲載されました。



魚の胚の細胞から生殖細胞をつくることに成功

【背景】

精子と卵の元となる生殖細胞は、生き物が次の世代に命を繋げるために欠かせない細胞です。身体を構成する体細胞は、1世代で死滅するのに対し、生殖細胞は次世代に繋がる限り、不滅の細胞と言えます。このような特殊な細胞がどのような仕組みでつくられるのか、この問いは、水産学のみならず生命科学における重要課題の一つです。魚類では、「生殖質」と呼ばれる特殊な細胞質が、卵がつくられる過程で蓄積します。受精後、胚発生過程において、生殖質を取り込んだごく一部の細胞のみが生殖細胞になります。生殖質の中には、生殖細胞の形成や維持に関わる mRNA やタンパク質が多数含まれており、構成因子となる多くの遺伝子がすでに同定されています。しかし、その中で生殖細胞をつくるための鍵となる遺伝子セットについては明らかになっていませんでした。

【研究手法】

研究グループは、生殖細胞をつくるために必要・十分な遺伝子の探索を行いました。必要な遺伝子を探索するためには、遺伝子の働きを抑制することで、生殖細胞ができないことを示す必要があります。そこで、生殖質を構成する既知の 30 遺伝子について、一つずつ機能を抑制していったところ、*dnd1* と *nanos3* の抑制時のみ、高い効率で生殖細胞が欠損しました。*dnd1* と *nanos3* は、ともに生殖細胞をつくるために必要な既知の遺伝子でしたが、二つの遺伝子を強制的に活性化（強制発現）させる実験は行われていませんでした。そこでこれらが生殖細胞をつくるために十分な遺伝子か検証するために、*dnd1* と *nanos3* の強制発現実験を行いました。

【研究成果】

dnd1 と *nanos3* の mRNA をメダカ受精卵の 1 細胞期に顕微注入し、強制発現させると、胚の全ての細胞で生殖細胞マーカーを高発現しました（図 1A、B）。しかし、その胚は発生が停止したため、これらの細胞が配偶子を産生できる能力を持った生殖細胞かどうかは分かりませんでした。そこで、*dnd1* と *nanos3* を強制発現させた細胞を正常な胚へ移植しました。すると、驚くべきことに、移植したほとんどの細胞が、将来、精巣・卵巣となる生殖腺に定着し、大量の生殖細胞を持ったメダカ胚が作出されました（図 1C）。これらのメダカが成長すると、オスは精巣を、メスは卵巣を持ち、妊性がありました。すなわち、*dnd1* と *nanos3* の強制発現によって作りだした生殖細胞から機能的な精子と卵が得られたことを意味しています。

1 細胞期に *dnd1* と *nanos3* の mRNA を顕微注入すると、胚が発生停止しました。これは、胚の細胞のほぼ全てが生殖細胞になってしまい身体を構成する体細胞が出現しなかったためだと考えられます。そこで、16 細胞期の一つの細胞に *dnd1* と *nanos3* の mRNA を顕微注入すれば、残りの 15 細胞は体細胞に分化できるため、発生が正常に進むのではないかと考えました。予想した通り、上記の方法で作出した胚は、16 細胞期の一つの細胞に由来する大量の生殖細胞がつくられ、正常に発生しました（図 2A）。また、*dnd1* もしくは *nanos3* mRNA を単独で導入した場合に比べて、*dnd1* と *nanos3* の mRNA を同時に導入すると圧倒的に多くの生殖細胞がつくられたため、*dnd1* と *nanos3* は協調して生殖細胞形成に関与していることが分かりました（図 2B）。さらに、メダカとは系統が離れたゼブラフィッシュ由来の *dnd1* と *nanos3* の mRNA をメダカ胚の 16 細胞期の一つの細胞に顕微注入すると、同様に大量の生殖細胞を持ったメダカ胚が作出できました（図 2B）。従って、*dnd1* と *nanos3* による協調した生殖細胞形成の仕組みは、幅広い魚種で保存されている可能性があります。

最後に *dnd1* と *nanos3* によって作出した生殖細胞において遺伝子改変が可能かどうか検証しました。16 細胞期の一つの細胞に *dnd1* と *nanos3* mRNA とともに CRISPR-Cas9^{*2} 試薬を顕微注入しま

した。その結果、従来の方法よりも高い効率で、生殖細胞の狙った遺伝子領域 (*vasa* 遺伝子) に緑色蛍光タンパク質遺伝子 *EGFP* を正確に挿入 (ノックイン) できました (図 3)。

【今後への期待】

本研究によって、魚類の生殖細胞をつくるための鍵となる遺伝子セットを同定し、初期胚の細胞から人工的に生殖細胞をつくる技術の開発に成功しました。これは、謎に満ちた生殖細胞がつけられる仕組みの解明に貢献できるだけでなく、ゲノム編集技術と組み合わせることで、遺伝子操作の効率化にも寄与します。また、近年、水産及び生物保全分野においては、マグロのように飼育が難しい魚や絶滅危惧種の配偶子 (精子と卵) を、飼育が容易な魚につくらせる「借腹生産技術 (代理親魚技術)」の開発が進められています。従来、効率的な借腹生産のためには、胚や生殖腺から生殖細胞を選別・濃縮する必要があり、その工程には高度な技術を要しました。本研究で開発した技術では、受精卵へ *dnd1* と *nanos 3* mRNA を顕微注入すれば生殖細胞の選別なしに細胞移植が可能のため、簡便で高効率的な借腹生産技術に繋がります。

【謝辞】

本研究成果は、日本学術振興会科学研究費助成事業 (科研費) 基盤研究 B (課題番号: JP21H02277、JP24K01846)、JST 創発的研究支援事業 (課題番号: JPMJFR210D)、地域中核・特色ある研究大学強化促進事業 (J-PEAKS) の支援を受けて実施されました。

論文情報

論文名	Generation of primordial germ cell-like cells by two germ plasm components, <i>dnd1</i> and <i>nanos3</i> , in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) (生殖質の構成因子 <i>dnd1</i> と <i>nanos3</i> によるメダカ始原生殖細胞様細胞の作出)
著者名	西村俊哉 ¹ 、藤本貴史 ¹ (¹ 北海道大学大学院水産科学研究院育種生物学分野)
雑誌名	iScience (オープンアクセスの総合学術誌)
DOI	10.1016/j.isci.2025.111977
公表日	2025年2月8日(土) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院水産科学研究院 助教 西村俊哉 (にしむらとしや)

T E L 0138-40-5535 メール tnishi@fish.hokudai.ac.jp

U R L <https://www2.fish.hokudai.ac.jp/faculty-member/nishimura-toshiya/?key=jp>

<https://researchmap.jp/tnishimedaka>

<https://sites.google.com/view/medaka-dojo-hassei-lab/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

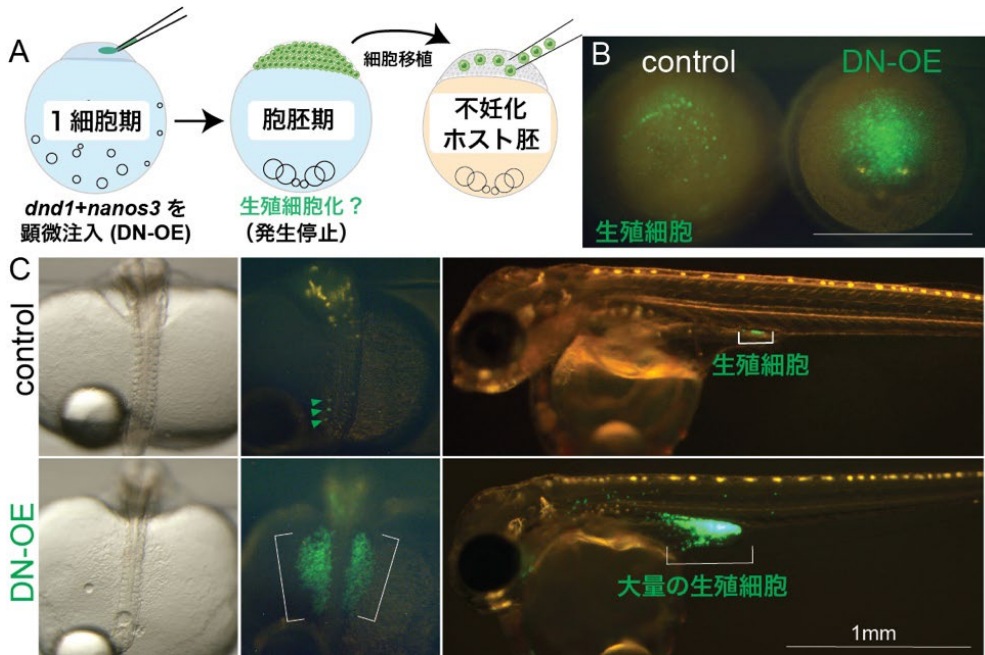


図 1. メダカ胚における *dnd1* と *nanos3* の強制発現による生殖細胞の作出

(A) 1細胞期における *dnd1* と *nanos3* mRNA の顕微注入と細胞移植実験の模式図。(B) メダカ胞胚期 (生殖細胞が形成される時期)。無処理の control 胚ではまばらに生殖細胞 (緑) が形成されるのに対して、*dnd1* と *nanos3* を強制発現 (DN-OE) した胚では、胚全体が緑の生殖細胞マーカーを発現した。(C) 細胞移植実験後のホストメダカ胚。上段: control 胚の細胞を移植するとわずかな生殖細胞が (矢尻) がホスト胚に取り込まれ、生殖腺へ定着した (角括弧)。下段: DN-OE 胚の細胞を移植すると、ホスト内で大量の生殖細胞が移動し、生殖腺へ定着した (角括弧)。

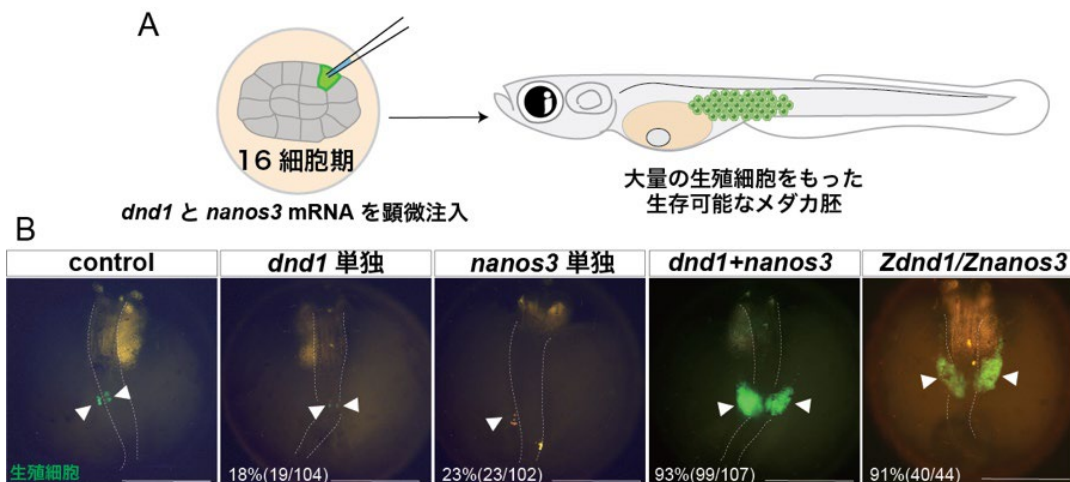


図 2. *dnd1* と *nanos3* による協調した生殖細胞形成

(A) 16細胞期の一つの細胞における *dnd1* 単独、*nanos3* 単独、もしくは *dnd1* と *nanos3* mRNA の顕微注入。(B) メダカ体節形成期 (生殖細胞が生殖腺へ移動する時期)。矢尻は生殖細胞 (緑) の位置を示す。*dnd1* 単独や *nanos3* 単独に比べて、*dnd1* と *nanos3* の強制発現によって圧倒的に多くの生殖細胞が形成した。ゼブラフィッシュ由来の *dnd1* と *nanos3* (Z*dnd1/Znanos3*) mRNA によってもメダカにおいて大量の生殖細胞が形成した。

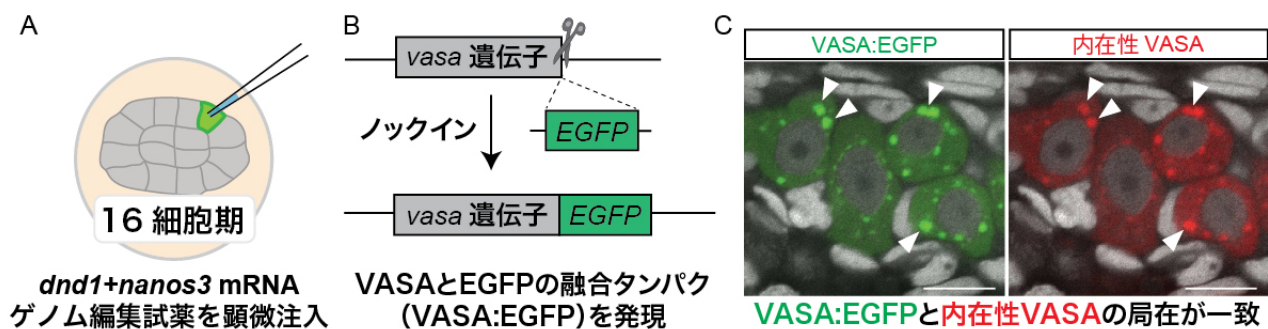


図 3. *dnd1* と *nanos3* による生殖細胞化とゲノム編集技術の融合

(A) 16 細胞期における *dnd1* と *nanos3* mRNA 及びゲノム編集試薬 (Cas9, gRNA, donor DNA) の顕微注入。(B) 生殖細胞マーカーである *vasa* 遺伝子座への緑色蛍光タンパク質遺伝子 *EGFP* のノックイン。*vasa* 遺伝子のタンパク質コード領域の末端が CRISPR-Cas9 によって切断され、その位置に相同組換によって正確に *EGFP* が挿入される。その結果、VASA と *EGFP* の融合タンパク質 (VASA:EGFP) が発現する。(C) 生殖細胞における VASA:EGFP (緑) と内在性 VASA (赤) タンパク質の共局在 (矢尻)。グレーは細胞の核を示す。スケールバー：10 μ m

【用語解説】

- *1 ゲノム編集技術 … DNA 切断酵素によって狙った DNA を切断し、その修復過程において、遺伝子に変異を導入したり、外来遺伝子を挿入する技術。
- *2 CRISPR-Cas9 … DNA の切断酵素である Cas9 タンパク質と切断箇所を決めるガイド RNA (gRNA) によって、特定の標的 DNA を切断するゲノム編集技術の一つ。