

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年9月29日(29.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/118225 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) A01K 67/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/001762
- (22) 国際出願日: 2011年3月25日(25.03.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-070049 2010年3月25日(25.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京海洋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5-7 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 矢澤 良輔 (YAZAWA, Ryosuke) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 竹内 裕 (TAKEUCHI, Yutaka) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 岩田 岳 (IWATA, Gaku) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 吉崎 悟朗 (YOSHIZAKI, Goro) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR ENGRAFTING GERM CELLS

(54) 発明の名称: 生殖細胞の生着方法

(57) Abstract: The object is to provide a method for improving the engraftment ability of transplanted germ cells to the germ gland of a host and thus increasing the transplantation efficiency in transplanting the separated germ cells, in the case of, for example, farm-rising a surrogate parent, i.e., transplanting separated germ cells of a fish to a host fish and inducing the differentiation of the transplanted cells into a germ cell line. As a means for achieving the aforesaid object, disclosed is a method comprising intraperitoneally transplanting separated germ cells into a peri-hatching host fish individual, said separated germ cells being donated by a fish differing in family or species from the host fish, to thereby induce the differentiation of the separated germ cells into a germ cell line, wherein the transplanted host fish individual is raised in a temperature zone, which corresponds to the growth temperature range in the juvenile/fry stage of the fish donating the separated germ cells and in which the host fish can be raised, to thereby improve the engraftment ability of the separated germ cells to the germ gland of the host fish and increase the transplantation efficiency in transplanting the separated germ cells.

(57) 要約: 本発明は、魚類の分離生殖細胞を宿主魚類に移植して生殖細胞系列への分化誘導を行う代理親魚養殖等において、移植した生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させて、分離生殖細胞の移植による移植効率を増大する方法を提供することを課題とする。その課題を解決する手段として本発明は、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することにより分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上し、分離生殖細胞の移植による移植効率を増大する方法からなる。



WO 2011/118225 A1

明 細 書

発明の名称：生殖細胞の生着方法

技術分野

[0001] 本発明は、宿主魚類を用い、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類の分離生殖細胞を宿主魚類に移植して生殖細胞系列への分化誘導を行う代理親魚養殖等における分離生殖細胞の移植による生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植した分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上させ、移植効率を増大する方法に関する。

背景技術

[0002] 従来より、魚類のES細胞株樹立の試みは、多くの研究者によりなされており、形態学的、生化学的特徴はマウス由来のES細胞に類似した細胞株がメダカ（蛋白質核酸酵素, 40, 2249-2256, 1995; Fish Phys. Biochem. 22, 165-170, 2000）、ゼブラフィッシュ(Methods Cell Biol. 59: 29-37, 1999)、及びヨーロッパヘダイ(Biomolecular Engineering, 15, 125-129, 1999)の胞胚細胞から樹立されている。これらの細胞を胞胚期前後の宿主胚に移植すると、移植細胞は種々の体細胞に分化することは既に確認されている。

[0003] しかし、上記のように魚類のES細胞株樹立の試みは、多くの研究者によりなされているが、魚類ES様細胞が生殖細胞系列に分化し、次世代の作出に貢献したという論文は発表されていなかった。実際にはin vitroで数日間しか培養していない細胞は生殖系列にも分化するが(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2261-2266, 2001)、培養期間を延長すると生殖細胞への分化能力は急激に消失する。

[0004] 一方で、魚類において、分離した細胞を宿主胚等に移植し、生殖系列に組込んで、個体作出に利用するという試みも報告されている。例えば、ニジマスにおける、分割球(Blastomere)の移植による生殖細胞系列キメラの作出について、FITC-dextranを導入されたニジマス卵由来の胚盤葉細胞を分散した後を取得し、該細胞を宿主胚に移植すると、移植され、ラベルされた細胞

は、生殖系列に組み込まれ子孫がうまれたことが報告されている (Mol. Rep. Dev., Vol. 59, p. 380-389, 2001)。この報告の方法の場合、キメラは限られた近縁種でないと作製できないという技術的問題がある。また、メダカにおいてメダカvasa遺伝子プロモーターにGFP遺伝子をつないだ遺伝子構築物を、発現ベクターに組み込み、卵に導入するトランスジェニックメダカの作製について報告されている。該報告には、トランスジェニックメダカで、GFPが腸間膜裏側のPGCに強く発現することが報告されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, No. 5, p. 2544-2549, 2001)。

[0005] 更に、金魚とフナの中の胚葉移植によるgerm-line chimeraの作成方法において、フナ由来のprimordial germ cellsを金魚の胚、胚葉の中央部に移植すると、移植されたPGCは生殖隆起に移動し、更に生殖細胞を含めた種々の細胞に分化することが報告されている (Genetica, Vol. 111, No. 1-3, p. 227-236, 2001)。これらの報告のものは、魚類から分離した細胞を、他の魚類に移植する方法に関するものではあるが、魚類から分離した生殖細胞を、他の魚類の宿主魚類個体に移植し、生殖腺内で分離生殖細胞を生殖細胞系列へ分化誘導するというような魚類の分離細胞の移植を報告するものではない。

[0006] 魚類の生殖細胞がどのような機構によって他の体細胞から分化してくるかは未だ明らかではないが、近年、親の卵巣内で成熟途上の卵内に蓄積されたRNAやタンパク質等の母性因子が、生殖細胞系列の決定に重要な役割を果たしている可能性を示唆するデータが示されている (月刊海洋, 31-5, 266-271, 1999)。そして、これらの母性因子が受精卵中に不均一に存在するため、細胞分裂により一部の割球のみがこの因子を受け取ることとなる。その結果、母性因子を受け取った一部の細胞のみが、将来生殖細胞系列へと分化していくと考えられている。一方、ES細胞が生殖細胞系列に分化することが知られているマウスでは、未分化な状態を維持している細胞集団が、周辺細胞からの刺激により生殖細胞へと分化していくと考えられている (蛋白質核酸酵素, 43, 405-411, 1998)。

[0007] 従来より、魚類のような脊椎動物においても、トランスジェニック動物や

クローン動物の作製のための動物個体の改変やクローン化の試みがなされてきた。しかし、魚類のような脊椎動物の場合は、このように遺伝的に改変した、或いはクローン化を目的とした細胞を、宿主個体に移植し、これを分化誘導して、新たな個体として変換する技術が確立していなかった。したがって、魚類のような脊椎動物において、その個体を遺伝的に改変して、或いはクローン化して、その育種を行い或いはクローン動物の作製を行うためには、改変或いは分離した細胞を、宿主個体に移植し、これを分化誘導して、新たな個体として変換する技術の確立が重要な課題となっていた。

[0008] そこで、先に、本発明者らは、特に魚類のような変温脊椎動物において、遺伝的に改変した或いは分離した細胞を、宿主個体に移植し、これを生殖細胞系列へ分化誘導する方法、及び、該分化誘導法を用いて、魚類のような脊椎動物の増殖或いは育種を行う方法について、鋭意検討する中で、（１）魚類のような脊椎動物においては、親の卵巣内で成熟途上の卵内に蓄積されたRNAやタンパク質等の母性因子が、生殖細胞系列の決定に重要な役割を果たしており、そして、これらの母性因子が受精卵中に不均一に存在するため、細胞分裂により一部の割球のみがこの因子を受け取ることとなり、その結果、母性因子を受け取った一部の細胞のみが、将来生殖細胞系列へと分化していくと考えられること、（２）このような生殖細胞系列の決定機構を考慮すると、魚類のような脊椎動物の場合は“生殖細胞への分化を決定する母性因子を含むこと”であること、（３）以上のような事実を考慮すると、魚類のような脊椎動物において、遺伝的に改変した或いは分離した細胞を、宿主個体に移植し、これを生殖細胞系列へ分化誘導する際に用いるべき細胞（すなわち、宿主個体に移植後、卵子又は精子に分化し、次世代個体に改変可能な細胞）は、未分化な胚細胞ではなく、将来生殖細胞に分化することが決定付けられている生殖細胞の幹細胞、すなわち始原生殖細胞（生殖細胞）であることをつきとめた。

[0009] そして、該生殖細胞を、魚類のような脊椎動物の孵化前後の魚類個体に移植することにより、生殖細胞を、生殖細胞系列へ分化誘導することができる

こと、即ち、魚類のような脊椎動物由来の分離生殖細胞を、宿主脊椎動物の孵化前後の魚類個体へ移植することにより、特に、孵化前後の発生段階にある魚類個体の腹腔内腸管膜裏側へ移植することにより、該生殖細胞を生殖細胞系列へ分化誘導することが可能であることを見出し、魚類の分離生殖細胞（分離始原細胞）の生殖細胞系列への分化誘導方法の確立に成功した（特許第4300287号公報）。

[0010] 魚類においては精原細胞と考えられていた精巣内の細胞であっても、孵化前後の魚類個体へ移植することにより、始原生殖細胞と同様に生殖細胞系列へ分化誘導することができることを見い出された（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 2725-2729, 2006）。この過程においては、移植された精原細胞は、孵化前後の雌の魚類個体へ移植することにより、卵細胞へと分化することから、性的可塑性を有していることが明らかになり、これにより当該方法は生殖細胞一般の移植技術として確立するようになった。

[0011] また、これらの移植は必ずしも同種の魚類ではなく、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類でも成功するため、生殖細胞を異種の宿主魚類に移植することにより、宿主魚類から、宿主魚類とは異系統又は異種の生殖細胞由来の魚類を作出する、いわゆる代理親魚を用いた魚類の作出をすることもできるようになった。しかし、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類においては移植が成功しないことも多く、移植が成功するための条件についてはまったく未知であった。特にマグロ類では難しく、養殖魚として重要な魚種でありながら、クロマグロの生殖細胞を用いた場合には、ニベ、マサバ、ゴマサバ、マアジ、ブリ、マダイなどいずれにおいてもこれまでのところ移植したクロマグロの生殖細胞が生着せず、移植に成功した魚類の報告はなかった。

[0012] 上記のような魚類の分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法を実施するに際しては、宿主魚類に導入した生殖細胞の生着率を向上させる必要がある。

従来、細胞の生着を促進する方法として、いくつかの方法が開示されている。例えば、特表2000-500327号公報には、精子を含む試料をア

ラビノース、ガラクトース、及び／又はヘキスロン酸を含有する多糖を含む溶液と接触させて、精子回収の際の精子の受精の可能性を高める方法について開示されている。また、特開平8-27011号公報には、IgA産生促進効果を有するビフィドバクテリウム属の菌体を有効成分とする妊娠動物用の胎児定着増強剤を用いて、胎児の発育異常と脱落防止を図り、胎児の定着を安定化する方法が開示されている。更に、特表2009-517078号公報には、骨髄移植（BMT）等において、細胞生着能を高めるために、細胞集団を、所定量のニコチンアミドで処理する方法について開示されている。しかしながら、これらの方法は、いずれも、上記のような、魚類の分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法における移植後の生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の向上に適用できるものではない。

先行技術文献

特許文献

- [0013] 特許文献1：特開平8-27011号公報。
特許文献2：特表2000-500327号公報。
特許文献3：特表2009-517078号公報。
特許文献4：特許第4300287号公報。

非特許文献

- [0014] 非特許文献1：蛋白質核酸酵素, 40, 2249-2256, 1995。
非特許文献2：Fish Phys. Biochem. 22, 165-170, 2000。
非特許文献3：Methods Cell Biol. 59: 29-37, 1999。
非特許文献4：Biomolecular Engineering, 15, 125-129, 1999。
非特許文献5：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2261-2266, 2001。
非特許文献6：Mol. Rep. Dev., Vol. 59, p. 380-389, 2001。
非特許文献7：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 98, No. 5, p. 2544-2549, 2001。
。非特許文献8：Genetica, Vol. 111, No. 1-3, p. 227-236, 2001。
非特許文献9：月刊海洋, 31-5, 266-271, 1999。

非特許文献10：蛋白質核酸酵素，43，405-411，1998。

非特許文献11：Proc. Natl. Acad. Sci. USA，103，2725-2729，2006。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0015] 本発明の課題は、宿主魚類を用い、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類の分離生殖細胞を宿主魚類に移植して生殖細胞系列への分化誘導を行う代理親魚養殖等において、移植した分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させて、分離生殖細胞の移植による生殖細胞系列への分化誘導における移植効率を増大する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0016] 本発明者らは、宿主魚類を用い、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類の分離生殖細胞を宿主魚類に移植して生殖細胞系列への分化誘導を行う代理親魚養殖等において、移植した分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させる方法について鋭意検討する中で、移植を受けた宿主魚類個体を飼育する温度が、移植された分離生殖細胞の宿主内の移動や、生着に関与するタンパク質因子の活性に影響を与え、かつ、宿主魚類自体の、移植による障害からの回復や、移植した生殖細胞の移動能力や分裂活性を維持する能力に影響を与え、これらの因子が移植した分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能に重大な影響を与えることを見出した。
- [0017] そして、生殖細胞を孵化前後の宿主魚類の腹腔内へ移植した後、移植を受けた宿主魚類を、生殖細胞の由来の魚類の生育温度、特に、産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯に近い温度帯で飼育することにより、移植された分離生殖細胞の宿主内の移動や、生着に関与するタンパク質因子の活性が保持され、なおかつ、宿主魚類の飼育温度を維持することにより、宿主魚類自体の、移植による障害からの回復や、移植した生殖細胞の移動能力や分裂活性等の生着に関与する環境が保持され、分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着率を大幅に増大することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0018] すなわち、本発明は、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することを特徴とする分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法からなる。本発明において、分離生殖細胞としては、分離生殖細胞の由来となる魚類の始原生殖細胞、精原細胞、及び卵原細胞を挙げることができる。
- [0019] 生殖細胞移植による代理親魚技術を成功させるためには、腹腔内に移植したドナー由来の生殖細胞が宿主の生殖腺へと自発的に移動し、そこに生着することが必須である。本発明により、生殖細胞が孵化前後の宿主魚類の腹腔内へ移植された後、生殖細胞由来の魚類の生育温度に近い温度帯で飼育することにより、細胞への傷害の影響を軽減し、細胞の移動の効率を高め、細胞分裂の活性を維持し、分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着率を大幅に増大することが可能であることが見いだされた。
- [0020] 移植の操作は宿主魚類個体の腹腔などに物理的に空隙を空けて移植すべき分離生殖細胞であるドナー細胞を打ち込むため、移植直後の宿主魚類個体は、腹腔内など移植を受けた場所に大きな傷害を持つことになる。この傷害は多くのタンパク質分解酵素などの誘導を通じて、移植された分離生殖細胞にも傷害を与えうる。また移植された分離生殖細胞には、宿主魚類ケモカインをはじめとする、生殖細胞の移動・生着に関与するタンパク質因子が本来の活性を保持できるため、移植された分離生殖細胞は本来あるべき温度帯において最も傷害から回復する修復する効率、移動する能力、分裂活性を維持する能力が高く、移植後においてもその温度帯に置かれることが細胞の傷害からの効率よく回復し、移動し、分裂活性を維持することができ、生着能を高めることができる。
- [0021] 本発明においては、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来と

なる魚類の生育温度帯で飼育することが要件となるが、該飼育温度帯としては、特に、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度が採用される。該生育温度の採用によって、移植を受けた宿主魚類個体内で、移植した分離生殖細胞に、該分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する環境を与えることができる。宿主魚類の飼育可能温度帯は、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ の範囲が望ましい。特に望ましくは、仔稚魚期に該当する最適生育温度の $\pm 1^{\circ}\text{C}$ の範囲が採用される

[0022] 本発明においては、移植を受けた宿主魚類個体の飼育温度として、分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯の飼育温度が採用される。移植を受けた宿主魚類個体の飼育可能温度を採用することにより、宿主魚類自体の、移植による障害からの回復や、生殖細胞の移動能力や分裂活性等の移植した生殖細胞の生着に關与する環境が保持される。分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度帯と、宿主魚類の飼育可能温度帯の飼育温度との条件を満足するためには、移植する分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度帯に対応して、該生育温度帯に飼育可能温度帯のある宿主魚類を選定して、該生育温度で移植を受けた宿主魚類を飼育することにより達成することができる。

[0023] すなわち、本発明の1つの態様として、分離生殖細胞として、クロマグロのようなマグロ類由来の分離生殖細胞を用い、宿主魚類としてハガツオ又はスマのようなハガツオ類又はスマ類の魚類を選定し、該マグロ類由来の分離生殖細胞を該ハガツオ類又はスマ類の孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により該宿主魚類個体に移植し、該移植を受けた宿主魚類個体を、該分離生殖細胞の由来となるマグロ類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度 26°C の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ で飼育することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法を挙げることができる。

[0024] また、本発明は、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植するこ

とからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導における分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上する方法を包含する。

[0025] すなわち、具体的には本発明は（１）宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することを特徴とする分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法や、（２）宿主魚類の飼育可能温度帯が、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ の範囲であることを特徴とする上記（１）記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法からなる。

[0026] また本発明は、（３）分離生殖細胞が、分離生殖細胞の由来となる魚類の始原生殖細胞、精原細胞、或いは卵原細胞であることを特徴とする上記（１）又は（２）記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法や、（４）分離生殖細胞がマグロ類由来の分離生殖細胞であり、宿主魚類としてハガツオ類又はスマ類の魚類を用い、マグロ類由来の分離生殖細胞をハガツオ類又はスマ類の孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により該宿主魚類個体に移植し、該移植を受けた宿主魚類個体を、該分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度 26°C の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ で飼育することを特徴とする上記（１）又は（２）記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法からなる。

[0027] 更に本発明は、（５）マグロ類由来の分離生殖細胞が、クロマグロ由来の

分離生殖細胞であり、ハガツオ類又はスマ類の宿主魚類が、ハガツオ又はスマであることを特徴とする上記（４）記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法からなる。

[0028] また本発明は、（６）宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することを特徴とする分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導における分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上する方法からなる。

発明の効果

[0029] 本発明により、宿主魚類を用い、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類の分離生殖細胞を宿主魚類に移植して生殖細胞系列への分化誘導を行う代理親魚養殖等において、移植した分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させて、分離生殖細胞の移植による生殖細胞系列への分化誘導方法における移植効率を増大することができ、例えば、マグロ類由来の分離生殖細胞をハガツオ類をはじめとする宿主魚類に移植し、生殖細胞系列への分化誘導をすることができる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1] 図1は宿主腹腔内のドナー細胞の追跡を示した図である。
[図2] 図2は共焦点顕微鏡によるドナー細胞の詳細な観察を示した図である。
[図3] 図3はクロマグロvasaプローブによる in situ hybridizationを示した図である。

発明を実施するための形態

[0031] 本発明は、宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた

宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することによって、分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法からなる。

[0032] 本発明において、移植に用いられる魚類の分離生殖細胞としては、移植して生殖細胞系列へと分化する能力を持つ細胞であればいずれの細胞でも用いることができるが、始原生殖細胞、精原細胞、及び卵原細胞などが例示される。特に分化の活性が高い点では始原生殖細胞が好ましく、また、入手しやすく、数多く準備できるという点では精原細胞が好ましい。

[0033] 該分離生殖細胞の由来となる魚類としては、任意のものを選択することができるが、特に有用性のある魚類として、マグロ類を挙げることができる。マグロ類は、スズキ目 サバ亜目 サバ科 マグロ属の魚の総称であり、クロマグロ (*Thunnus orientalis*)、メバチマグロ、ミナミマグロ、キハダマグロ、ビンナガマグロ、タイセイヨウマグロ、コシナガを具体的に例示することができ、中でもクロマグロ (*Thunnus orientalis*) を好適に例示することができる。

[0034] 本発明において用いられる宿主魚類としては、ドナー細胞の移植に耐えて飼育できる孵化仔魚であればどのような魚類でも用いることは可能であるが、移植した分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させるためには、分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度帯で飼育することが可能である魚類を宿主として選択することができる。すなわち、分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度帯と同様な温度で産卵が行われ、同様の海域で仔稚魚期を過ごすことができる魚類であることが望ましい。

[0035] 例えば、クロマグロのようなマグロ類の分離生殖細胞を移植するには、宿主魚類として、ハガツオ類や、スマ類の魚を選択することができる。ハガツオ類は、スズキ目 サバ亜目 サバ科 ハガツオ属の魚の総称であり、ハガツオ (*Sarda orientalis*)、サバガツオ、シマガツオ、スジガツオ、ホウセン、モルディブ・フィッシュを具体的に例示ことができ、中でもハガツオ (S

arda orientalis) を好適に例示することができる。また、スマ類は、スズキ目 サバ亜目 サバ科 スマ属の魚の総称であり、中でもスマ (Euthynnus affinis) を好適に例示することができる。

[0036] クロマグロのようなマグロ類の分離生殖細胞を移植する場合について説明すると、クロマグロ由来の分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能を向上させるためには、クロマグロと同様に高水温域で産卵が行われ、同様の海域で仔稚魚期を過ごす魚類が好ましく、このような条件に合致する魚類として例えばサバ科ハガツオ属のハガツオやサバ科スマ属のスマを宿主として選択することが望ましい。通常、クロマグロは26℃で仔稚魚が生育するのに対して、ハガツオやスマでは25℃で飼育を行うことができる。一方、これまで成功しなかったニベ、マサバ、ゴマサバでは通常、20℃から22℃で飼育を行い、25℃から26℃では飼育することが難しい。

[0037] 本発明の、移植を受けた宿主魚類個体を飼育する温度は、分離生殖細胞の由来となる魚類の生育温度と近い温度帯で飼育する必要がある。魚類は水温に敏感であり、数度の温度差でも飼育することが格段に難しくなることがある。特に分離生殖細胞の修復する効率、移動する能力、分裂活性を維持する能力が高く、移植後においてもその温度帯に置かれることが細胞の傷害からの効率よく回復し、移動し、分裂活性を維持することができ、宿主魚類個体において生着能を高めるためには、分離生殖細胞が本来の発生の過程で生殖細胞系列へと分化する温度であるドナーとなる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する温度と、移植を受けた宿主魚類個体を飼育する温度が近いことが望ましく、これらの温度差が±5℃以内であることが好ましいが、より好ましくは±3℃以内、更に好ましくは±1℃以内であることが望ましい。

[0038] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0039] 本研究では、葛西臨海水族園から譲渡されたハガツオ受精卵を25℃で飼育し、以後の実験に用いた。まず、移植適期を推定するため、全長4.0、

5. 2、6. 8mm(3、5、7日齢)のハガツオ仔魚生殖腺の発達を組織学的に調べた。次に、クロマグロ精巣を酵素分散し、得られたドナー精巣細胞をPKH26により蛍光標識した後、ハガツオ、ニベ、マサバ、ゴマサバのそれぞれの仔魚腹腔内に移植した。移植後、ハガツオ(25℃)、スマ(25℃)、ニベ(22℃)、マサバ(22℃)、ゴマサバ(22℃)を飼育し、移植10日後に、移植個体の生残率、及び、宿主生殖腺内にドナー細胞が生着した個体の割合を調べた。結果を表1に示す。

[0040] [表1]

クロマグロ精巣細胞移植生着率

魚種	移植個体数	観個察体数	生着個体数	生着率(%)
ニベ	1754	504	0	0
ゴマサバ	275	62	0	0
マサバ	617	128	0	0
ハガツオ	140	6	2	33.3
スマ	1870	104	20	19.2

[0041] 生着したドナー細胞が生殖細胞であるかを調べるため、細胞形態の観察を行った。結果を図1及び図2に示す。図1において、中段左は微分干渉顕微鏡像を、中段右は蛍光顕微鏡像を示す。中段図中の点線は生殖腺を、中段右図中の三角矢印はPKH26により染色されるPKH+の細胞を、下段図中の三角矢印はその拡大図である。下段左は微分干渉顕微鏡像を、右は蛍光顕微鏡像を示す。図2において、上段左は微分干渉顕微鏡像を、上段右はPKH26を観察するための蛍光顕微鏡像を、下段左はDAPIを観察するための蛍光顕微鏡像を、下段右はPKHの観察像とDAPIの観察像を重ねたものを示す。また、クロマグロ vasa プローブを用いて in situ hybridization によりドナー生殖細胞の検出を行った。結果を図3に示す。図3において、右側はPKH+の個体のうちの1つを、左側はPKH+の個体のうちのもう1つを観察したものである。上段は微分干渉顕微鏡像を、中段はPKH2

6を観察するための蛍光顕微鏡像を、下段はクロマグロ vasa プローブを用いた in situ hybridization による観察像を示す。

[0042] 全長5.2mm(5日齢)のハガツオ仔魚では、移動を完了した始原生殖細胞が生殖隆起に取り込まれる直前であったことから、この時期が移植適期であると推定された。クロマグロ精巣細胞を移植適期のハガツオ仔魚140個体に腹腔内移植したところ、移植10日後まで6個体(4.2%)が生残し、そのうち2個体(33.3%)でPKH26陽性細胞の宿主生殖腺内への生着が確認された。生着したドナー細胞は、生殖細胞に特徴的な大型で円形の核を有し、クロマグロ vasa 陽性を示したことから、ドナー由来のクロマグロ生殖細胞であることが判明した。

[0043] 同様にして、スマでは、移植10日後まで104個体が生残し、そのうち20個体(19.2%)でPKH26陽性細胞の宿主生殖腺内への生着が確認された。このように、高水温で飼育可能なハガツオやスマの仔魚を宿主として用いることで、クロマグロ精原細胞を宿主生殖腺へ生着させることが可能となった。以上の結果より、ハガツオやスマがクロマグロ生産用代理親魚の有力候補であることが示唆された。

産業上の利用可能性

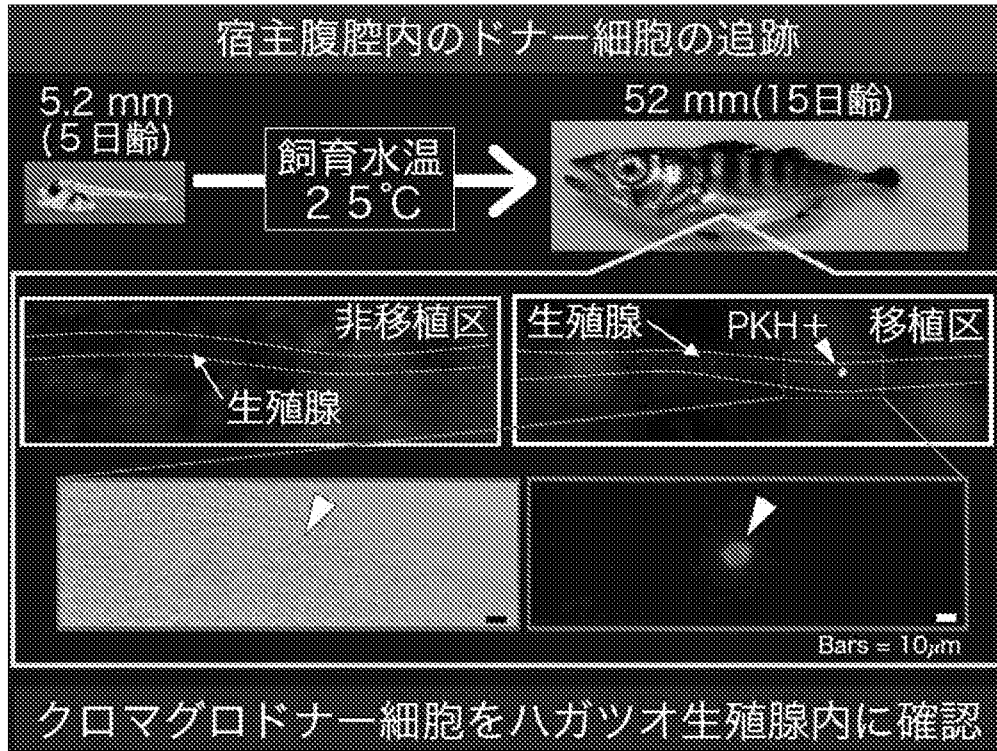
[0044] 本発明によれば、これまで宿主魚類とは異系統又は異種の魚類においては移植が成功しないマグロ類などの魚類において、代理親魚を用いて、その増殖や育種が可能となり、マグロのような巨大な種の生殖細胞を小型の魚類に移植することで、小型水槽でマグロのような巨大な魚類の種苗生産が可能となる。

請求の範囲

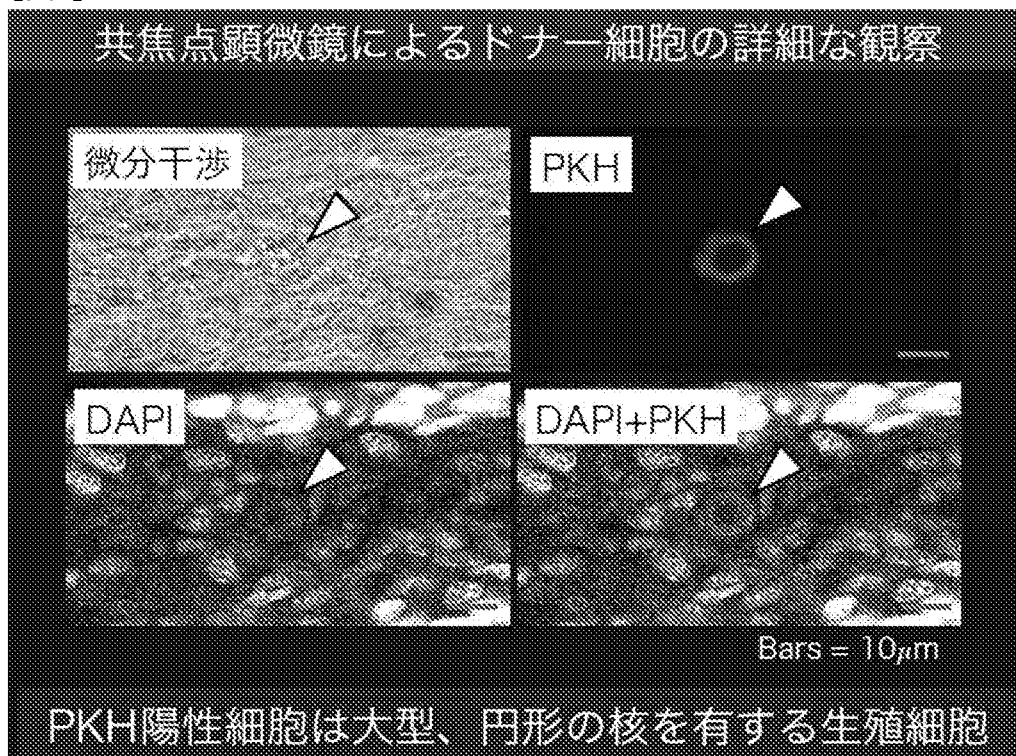
- [請求項1] 宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することを特徴とする分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法。
- [請求項2] 宿主魚類の飼育可能温度帯が、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ の範囲であることを特徴とする請求項1記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法。
- [請求項3] 分離生殖細胞が、分離生殖細胞の由来となる魚類の始原生殖細胞、精原細胞、或いは卵原細胞であることを特徴とする請求項1又は2記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法。
- [請求項4] 分離生殖細胞がマグロ類由来の分離生殖細胞であり、宿主魚類としてハガツオ類又はスマ類の魚類を用い、マグロ類由来の分離生殖細胞をハガツオ類又はスマ類の孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により該宿主魚類個体に移植し、該移植を受けた宿主魚類個体を、該分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する最適生育温度 26°C の $\pm 3^{\circ}\text{C}$ で飼育することを特徴とする請求項1又は2記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法。
- [請求項5] マグロ類由来の分離生殖細胞が、クロマグロ由来の分離生殖細胞であり、ハガツオ類又はスマ類の宿主魚類が、ハガツオ又はスマであることを特徴とする請求項4記載の分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上した分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法。

[請求項6] 宿主魚類とは異系統又は異種の魚類由来の分離生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類の腹腔内への移植により宿主魚類個体に移植することからなる分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法において、移植を受けた宿主魚類個体を、分離生殖細胞の由来となる魚類の産卵から仔稚魚期に該当する生育温度帯であり、かつ、宿主魚類の飼育可能温度帯で飼育することを特徴とする分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導における分離生殖細胞の宿主魚類生殖腺への生着能を向上する方法。

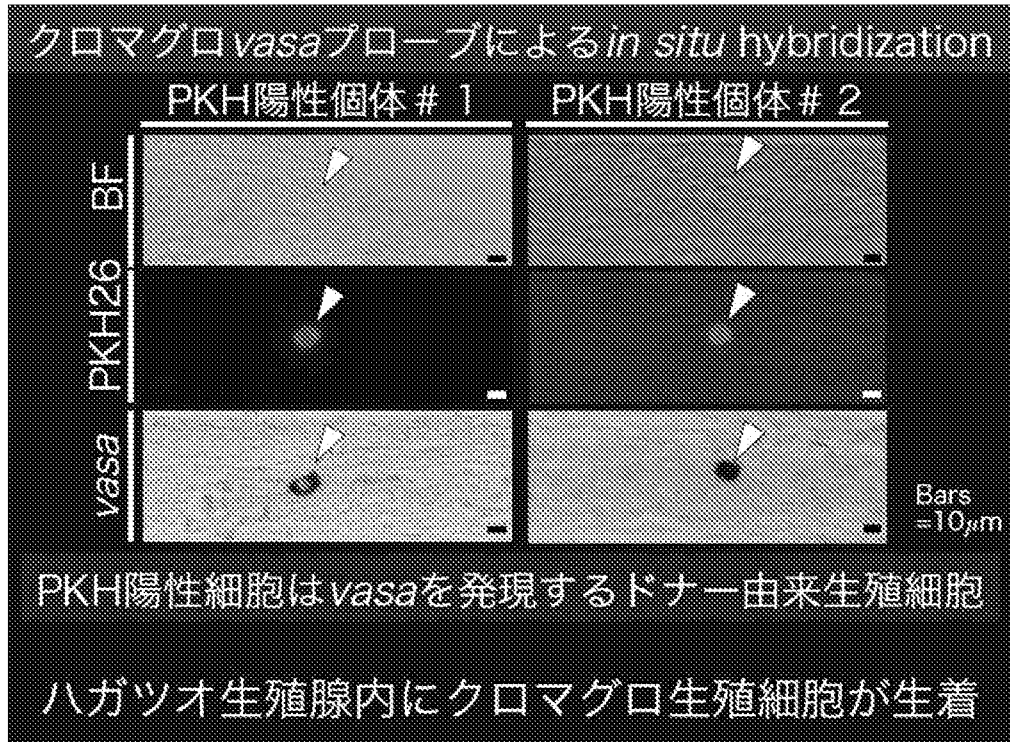
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, A01K67/02(2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/00-7/08, C12N15/09, A01K67/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 4300287 B2 (Tokyo University of Marine Science and Technology), 01 May 2009 (01.05.2009), & JP 2003-235558 A	1-6
Y	Nobuhiro SUZUKI et al. "Effect of water temperature on the maturation of the oriental goby <i>Acanthogobius flavimanus</i> ", <i>Aquacultuer Science</i> , 1989, vol.37, no.4, pages 267 to 274	1-6
Y	Naotaka OGI, "Study on cold water fish and environment", <i>Hokkaido Electric Power Co., Inc. Sogo Kenkyusho Kenkyu Nenpo</i> , 21 October 2005 (21.10.2005), vol.36, pages 80 to 89	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 June, 2011 (20.06.11)

Date of mailing of the international search report
28 June, 2011 (28.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001762

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yasuhiro FUJIOKA, "Honmoroko no Shoki Seicho ni Oyobosu Shiiku Suion no Eikyo", Shiga-Ken Suisan Shikenjo Kenkyu Hokoku, 2008, vol.52, pages 27 to 31	1-6
Y	Shukei MASUMA, "Suisan Sogo Kenkyu Center Maguro Kenkyusho ga Torikumu Kuro Maguro no Zoyoshoku Kenkyu", Yoshoku, 2008, vol.570, pages 16 to 18	1-6
Y	Yutaka TAKEUCHI et al., "Biotechnological applications of spermatogonial cell transplantation in economically important marine teleostes", Deep Ocean Water Research, 2009, vol.10, no.1, pages 49 to 53	1-6
Y	Masahiko MORI, "Correlation between Sexual Maturity of Bigeye Tuna and Water Temperature in the Indian Ocean", The journal of the Shimonoseki University of Fisheries, 1998, vol.46, no.4, pages 175 to 181	1-6
A	OKUTSU, T., et al., "Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation" J.Reprod.Dev., 2006, Vol.52, No.6, p.685-693	1-6
A	OKUTSU, T., et al., "Production of trout offspring from triploid salmon parents" Science, 2007, Vol.317, p.1517 and Supporting online material	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, A01K67/02(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N1/00 - 7/08, C12N15/09, A01K67/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 4300287 B2 (国立大学法人東京海洋大学) 2009.05.01, & JP 2003-235558 A	1-6
Y	鈴木伸洋 他 「マハゼの成熟に及ぼす水温の影響」水産増殖, 1989, Vol.37, No.4, p.267-274	1-6
Y	尾木直隆 「冷水性魚類と環境に関する研究」北海道電力株式会社 総合研究所研究年報, 2005.10.21, Vol.36, p.80-89	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 20.06.2011	国際調査報告の発送日 28.06.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 水落 登希子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	藤岡康弘 「ホンモロコの初期成長に及ぼす飼育水温の影響」 滋賀県水産試験場研究報告, 2008, Vol. 52, p. 27-31	1-6
Y	升間主計 「水産総合研究センターマグロ研究所が取り組むクロマグロの増養殖研究」 養殖, 2008, Vol. 570, p. 16-18	1-6
Y	竹内裕 他 「海産魚の種苗生産効率化を目指した精原細胞移植技術の利用」 海洋深層水研究, 2009, Vol. 10, No. 1, p. 49-53	1-6
Y	毛利雅彦 「インド洋におけるメバチの成熟状態と水温の関係」 水産大学校研究報告, 1998, Vol. 46, No. 4, p. 175-181	1-6
A	OKUTSU, T., et al., " Manipulation of fish germ cell: Visualization, cryopreservation and transplantation" J. Reprod. Dev., 2006, Vol. 52, No. 6, p. 685-693	1-6
A	OKUTSU, T., et al., " Production of trout offspring from triploid salmon parents" Science, 2007, Vol. 317, p. 1517 and Supporting online material	1-6