

トラフグおよびクサフグにおける *vasa* ホモログ遺伝子の 単離と発現解析

吉川廣幸[†], 井野靖子

Cloning and expression analysis of *vasa* homolog genes in tiger puffer *Takifugu rubripes* and grass puffer *Takifugu niphobles*

Hiroyuki Yoshikawa[†] and Yasuko Ino

Abstract : *Vasa* gene homologs of tiger puffer (*Takifugu rubripes*, *Tp-vasa*) and grass puffer (*T. niphobles*, *Gp-vasa*) were cloned and characterized for use as a molecular marker of germ cells in these species. Analysis of the nucleotide sequence revealed that open reading frames of *Tp-vasa* and *Gp-vasa* comprise 1,872 bp (encoding 623 amino acids) and 1,869 bp (encoding 622 amino acids), respectively. These deduced amino acid sequences contained arginine-glycine or arginine-glycine-glycine motifs and eight conserved motifs belonging to the DEAD-box protein family, and showed highly similarity and identity with *vasa* homologs of other teleosts. Tissue specific expressions of *Tp-vasa* and *Gp-vasa* were detected in testis and ovary. *In situ* hybridization analysis showed that *Tp-vasa* and *Gp-vasa* mRNA expressed in oogonia and oocytes in the ovary, and spermatogonia in the testis, while it was not detected in the primary and secondary spermatocytes, spermatid, spermatozoa or gonadal somatic cells. These findings suggest that *Tp-vasa* and *Gp-vasa* should be useful for studies of germ cells specification and differentiation in *Takifugu* puffers.

Key words : *Takifugu rubripes*, *Takifugu niphobles*, *vasa*, germ cell, transplantation

緒 言

トラフグ *Takifugu rubripes* は日本国内における重要な養殖対象種の一つであり、これまでに親魚管理、人為催熟、種苗生産などの技術開発が進められてきた¹⁻³⁾。一方で、高成長特性、産肉性、耐病性などの経済価値に関連する有用形質を有する養殖系統の樹立は未だ成されておらず、トラフグ養殖の価値をより高めていくためには、選抜育種などにより有用形質系統を作出していく必要がある。一般に、選抜育種では、親魚の交配の繰り返しと、それら親魚の維持管理が必要になるが、トラフグは成熟するまでに3年の養成期間が必要であり、これに伴いトラフグ親魚の体サイズは、平均的な販売サイズ (0.6–1kg) よりも大型 (約2–5kg) となる⁴⁾。つまり、トラフグ親魚の作出と維持・管理には、成熟に至るまでの長い養成期間と大規模なスペースが必要となるが、これらを改善できる育種技術

が開発されれば、有用形質系統を作出するための選抜育種を効率的に進めることが可能になると期待される。

近年、サケ科魚類では、ドナーとする異種の生殖細胞を宿主へと移植し、宿主からドナー由来の子孫を生産する代理親魚技術が開発されている^{5, 6)}。ドナーとなるニジマス *Oncorhynchus mykiss* の生殖細胞を孵化仔魚期の腹腔内へと移植されたヤマメ *O. masou* 宿主は、自身の生殖腺内にニジマスの生殖細胞を取り込んだ後、ドナーの生殖細胞をその生殖腺内で増殖・分化させ、ニジマスの配偶子を生産する。また、代理親魚技術において移植する精原細胞や卵原細胞は、宿主の性に依存して精子にも卵にも分化することが可能であることも明らかとなっている⁷⁻¹²⁾。よって、本技術をトラフグに適用できれば、本種の親魚管理に必要な時間やコストを大幅に削減できることが期待される。トラフグの近縁種であるクサフグ *T. niphobles* は、小

型で、成熟に必要な世代時間もトラフグの半分であることから、宿主候補として代理親魚技術への利用が検討されている⁴⁾。

トラフグにおける代理親魚技術の開発においては、分子マーカーを利用してドナーの生殖細胞を同定し、フローサイトメーターなどにより単離された生殖細胞を移植することで代理親魚作出の効率を高めることが有効になると考えられる。特に、宿主生殖腺へ着し配偶子へと分化可能な生殖幹細胞は精原細胞や卵原細胞に含まれることが知られているため⁹⁻¹²⁾、単離されたこれらのドナー細胞を宿主へと移植することで効率的な代理親魚作出が可能になる。また、生殖細胞移植後は、分子マーカーを利用してクサフグ宿主生殖腺内でのドナーや宿主の生殖細胞の分化過程を詳細に評価する必要もある。我々は、生殖細胞マーカーとして、ショウジョウバエで同定された*vasa* (DEAD [Asp-Glu-Ala-Asp] box polypeptide 4, *DDX4*) 遺伝子¹³⁻¹⁵⁾に着目した。*vasa* ホモログは、昆虫から哺乳類まで多くの生物種の生殖細胞で発現が認められている遺伝子であり¹⁶⁾、硬骨魚類ではゼブラフィッシュ¹⁷⁾、ニジマス¹⁸⁾、ナイルティラピア¹⁹⁾、メダカ²⁰⁾、キンギョ²¹⁾、シロウオ²²⁾、クロマグロ²³⁾などで生殖細胞特異的な発現が観察されている。本研究では、トラフグ代理親魚技術の開発に向け、生殖細胞を識別可能なマーカー遺伝子の候補として、トラフグおよびクサフグの*vasa* ホモログ遺伝子の単離を試みた。そして、単離された*vasa* ホモログmRNAの発現局在をRT-PCRおよび*in situ* ハイブリダイゼーションにより評価した。

材料および方法

供試魚

トラフグは、2016年4月に12ヶ月齢5個体 [全長 (平均±標準偏差, 以下同様): 24.1±1.6 cm, 標準体長: 20.4±1.2 cm, 体重: 303.3±38.2g, 生殖腺指数 (GSI): 0.22±0.08%] を山口県下松市の養殖業者より入手し本研究に供した。また、クサフグは、山口県下関市沿岸で採捕された成熟天然個体を親魚として種苗生産を行い、国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校内の飼育施設で養成された18ヶ月齢3個体 [全長: 9.8±0.5 cm, 標準体長: 8.8±0.5 cm, 体重: 19.4±4.3g, GSI: 1.68±0.36%] を2016年2月にサンプリングし本研究に供した。

RNA抽出およびcDNA合成

トラフグおよびクサフグより採取された筋肉、鰓、心臓、肝臓、脾臓、腸、卵巣および精巣からのtotal RNAは、ISOGEN (Nippon Gene) を用い、メーカー添付のプロトコルに従い抽出した。続いて、TURBO DNase (Ambion) による混入DNAの分解反応を行った後、精製処理されたtotal RNA 1 μgを鋳型としてPrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio) により、Nagasawa et al.²³⁾に記載のoligo (d' T) primer

(5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGCTGACGGCCCGGGCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を用いてfirst-strand cDNAの合成を行った。

クローニング

トラフグおよびクサフグの*vasa* ホモログ遺伝子配列を明らかにするため、両種の卵巣より合成したcDNAを鋳型として、トラフグのゲノム配列 (GenBank accession number: NW004072386, NW004070993) に予測された部分*vasa*遺伝子配列に基づき設計された2種類のプライマーセット (Fw1: 5' -GGCATCAACTTTGACAAGTATGATGAC-3', Rv1: 5' -CCTCTAACCATGAGGGCACTT-3' およびFw2: 5' -TCTGTCCCGCAAACAGCA-3', Rv2: 5' -GCAACAATGACGGCTTCAGG-3') を用いて*vasa*遺伝子断片をPCRにより増幅した。また、*vasa*遺伝子の3' 末端配列の増幅については、oligo (d' T) primer配列内に設計させたアダプタープライマー (Ap1: 5' -GTAATACGACTCACTATAGGG-3') とFw1のプライマーセットを用いた。PCR反応は、TaKaRa Ex Taq (Takara Bio) を用いて、94℃3分間の熱変性の後、94℃30秒間、60℃30秒間および72℃60秒間のサイクルを30回繰り返し、72℃5分間の最終伸長反応により行った。増幅された遺伝子断片は、ToPo TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen) を用いてサブクローニングし、Eurofins Genomics社のDNAシーケンスサービスを利用して塩基配列を決定した。

アライメントおよび系統解析

得られたcDNA配列より推定されるアミノ酸配列の相同性検索をNational Center for Biotechnology Informationのウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) にて行った。各配列のアライメントにはClustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) を使用し、近隣接合法による系統樹

をMEGA 6²⁴⁾を使用して作成した。配列間の距離はアミノ酸置換率に基づくp-distanceにより示し、系統樹の分岐は1,000回のブートストラップ解析により評価した。また、アライメント配列間の相同性と類似性をSIASプログラム (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) により求めた。

RT-PCR

トラフグおよびクサフグから採取された各組織（筋肉、鰓、心臓、肝臓、脾臓、腸、卵巣および精巣）より合成されたcDNAは、単離された*vasa*塩基配列に基づく*vasa* RT-PCR用プライマーセット（Fw-primer: 5'-GGCATCAAC TTTGACAAGTATGATGAC-3', Rv-primer: 5'-GCAACAATGACGGCTTCAGG-3'）および β -*actin*プライマーセット（Fw-primer: 5'-ACTACCTCATGAA GATCCTG-3', Rv-primer: 5'-TTGCTGATCCAC ATCTGCTG-3'）を用いたPCR反応に供した。PCR反応には、TaKaRa Ex Taq (Takara Bio) を用い、94°C3分間の熱変性の後、94°C30秒間、60°C30秒間および72°C30秒間のサイクルを35回繰り返し、72°C5分間の最終伸長反応により行った。得られたPCR産物は、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅産物を検出した。

in situ ハイブリダイゼーション

ブアン氏液により固定されたトラフグおよびクサフグの精巣および卵巣をパラフィン包埋し、厚さ4 μ mの組織切片を作成した。連続切片の一部をヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色すると共に、Nagasawa et al.²³⁾ に従い*vasa* 遺伝子に関する*in situ*ハイブリダイゼーションに供した。すなわち、*vasa* プロブ合成用プライマーセット（Fw: 5'-CACGCTAGATAACTGTTCACCATC-3', Rv: 5'-TCGGCTTGATATAACCGGACTT-3'）により増幅した*vasa* 遺伝子断片（トラフグ*vasa* 680 bp (12 - 691), クサフグ*vasa* 677bp (12 - 688)) をToPo TA Cloning kit のpCR 4-TOPOベクターへとサブクローニングし、RNAプロブの合成に使用した。センスおよびアンチセンスRNAプロブは、DIG RNA labeling mix (Roche), およびT7 RNA polymerase (Takara Bio) またはT3 RNA polymerase (Roche) を用いて合成し、*in situ* ハイブリダイゼーションに供した。DIG-RNA プロブの検出にはAnti-Digoxigenin-APを用い、4-nitroblue tetrazolium

chloride (NBT, 0.035mg/ml) および5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, 0.018mg/ml) を含むNTMT溶液 (100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 1mM Levamisole) により標本の発色反応を行った。作成された標本の観察は顕微鏡 (Leica DM2500) 下で行い、デジタルカメラ (Leica 120HD) により組織像を撮影した。

結 果

本研究ではトラフグおよびクサフグの*vasa*ホモログ遺伝子の単離を試み、それぞれ全アミノ酸翻訳領域 (ORF) を含む2,213 bpおよび2,212 bpのcDNA塩基配列を明らかにした (GenBank accession number: LC203034, LC203035)。ORFの長さは、トラフグでは1,872 bp, クサフグでは1,869 bpであり、得られた塩基配列より推定されたアミノ酸配列（トラフグ: 623残基, クサフグ622残基）内には、DEADボックスRNAヘリカーゼに保存されたATP-Aモチーフ (AXXXXGKT) およびATB-Bモチーフ (DEAD) を含む8ヶ所のコンセンサス配列²⁵⁾ が存在した (Fig. 1)。また、N末端領域には、アルギニン-グリシン (RG) およびアルギニン-グリシン-グリシン (RGG) の配列が、トラフグでは4回および7回、クサフグでは5回および6回と繰り返し存在した。これら推定されたアミノ酸配列に対する既報のショウジョウバエ*Vasa*¹⁴⁾ との相同性および類似性は、トラフグでは相同性42.4%および類似性56.8%, クサフグでは相同性42.3%および類似性56.6%であった。ゼブラフィッシュ*Vasa*ホモログ¹⁷⁾ に対しては、トラフグで64.8%, クサフグで65.0%の相同性がみられた (類似性はそれぞれ67.9%, 67.8%)。メダカ*Vasa*ホモログ²⁰⁾ に対しては、トラフグで70.5%, クサフグで70.3%の相同性がみられた (類似性はそれぞれ79.6%, 79.5%)。また、単離されたトラフグおよびクサフグの予測アミノ酸配列間での相同性は98.9%, 類似性は99.1%であった。DEADボックスタンパク質ファミリーに属する*Vasa*およびPL10に関する系統樹解析では、本研究により単離されたトラフグおよびクサフグの予測アミノ酸配列は、脊椎動物で報告されている*Vasa*と非常に強い関係性を示した (Fig. 2)。以上の結果は、本研究により単離されたトラフグおよびクサフグのcDNA配列が*vasa*ホモログであることを強く支持するものであった。

```

rubripes : MDDWEEEGTTTATTTSLTNHNLIEDGGRRGGDGFTYSFPSDEPLHINNW : 50
niphobles : MDDWEEEGTTTAAATTNLTNHNLIEDGGRRGGDGFTYSFPSDKPLDINNW : 50

rubripes : NNTGGEMGGFRGAGRGHFGRKDSSEFNGNNGHFENGLRGGYRGGRRGG : 100
niphobles : NNTGGEMGGFRGTGRGHFGRKDSSEFNGNNGHFENGLRGGYRG-RGGRRG : 99

rubripes : RGIRQGGDQDGNRGGFRGGYRGKDEEVFSQGEDTKKESNEEKPKVTYIPP : 150
niphobles : RGIRQGGDQDGNRGGFRGGYRGKDEEVFSQGEDTKKESNEEKPKVTYIPP : 149

rubripes : TLPEDDEESIFAHYETGINFDKYDDIMVEVSGVTPPQAI STFDDAELCESL : 200
niphobles : TLPEDDEESIFAHYETGINFDKYDDIMVEVSGVSPQAI STFDDAELCESL : 199

rubripes : RKSISKSGYIKPTPVQKHGPIIICAGRDLMACAQTGSGKTA AAFLLPILQK : 250
niphobles : RKSISKSGYIKPTPVQKHGPIIICAGRDLMACAQTGSGKTA AAFLLPILQK : 249
                                     ATP-A
rubripes : LMADGVAASSFSEIQEPEAVIVA PTRELIGQIFLEARKFSFGTCVRPVVV : 300
niphobles : LMADGVAASSFSEIQEPEAVIVA PTRELIGQIFLEARKFSFGTCVRPVVV : 299

rubripes : YGGVNTGFQLRELSRGCNVLCC TPGFMLDVIGRGKVGLSKVRYLVI DEAD : 350
niphobles : YGGVNTGFQLRELSRGCNVLCC TPGFMLDVIGRGKVGLSKVRYLVI DEAD : 349
                                     ATP-B
rubripes : RMLDMGFEPDMRRLVGTGPMPSKENRQTLMF SATFPEDIQRLARDFLRVD : 400
niphobles : RMLDMGFEPDMRRLVGTGPMPSKENRQTLMF SATFPEDIQRLARDFLRVD : 399

rubripes : YLFLTVGIVGGACTDVEQTFVKVTKFCKREQLLDIVKSTGTERTMVVFVET : 450
niphobles : YLFLTVGIVGGACTDVEQTFVKVTKFCKREQLLDIVKSTGTERTMVVFVET : 449

rubripes : KRQADFIAAHLAQENVPTT SIHGDREREREKALDFRSGRCPVLVATSV : 500
niphobles : KRQADFIAAHLAQENVPTT SIHGDREREREKALCDFRSGRCPVLVATSV : 499

rubripes : AARGLDIPDVQHVINFDLPNNISDYV HIRIGRTGRCGNIGRAVSFYDPDPTD : 550
niphobles : AARGLDIPDVQHVINFDLPNNISDYV HIRIGRTGRCGNIGRAVSFYDPDPTD : 549

rubripes : SPLAHSVLTILAKAQEQVPSWLEESAFSSPSIGKFNPPRKDFAALDSRKG : 600
niphobles : SPLAHSVLTILAKAQEQVPSWLEESAFSSPSIGKFNPPRKDFAALDSRKG : 599

rubripes : ELFPVNVSSRPAFQAATDEEEWE : 623
niphobles : ELFPVNVSSRPAFQAATDEEEWE : 622

```

Fig. 1. Comparison of the deduced amino acid sequences of *vasa* from *Takifugu rubripes* and *T. niphobles*. Identical sequences are shaded. Arginine-glycine repeats (RG) and arginine-glycine-glycine repeats (RGG) in the N-terminal region, which are well-conserved among the *vasa* orthologs of various species, are underlined and double underlined, respectively. Eight consensus sequences for the DEAD protein family, including an adenosine triphosphatase (ATP)-A motif and an ATP-B motif, are enclosed in boxes. Individual sequences data is available from GenBank (*T. rubripes*: LC203034, *T. niphobles*: LC203035).

単離されたトラフグおよびクサフグ *vasa* ホモログの cDNA塩基配列に基づき設計されたプライマーを用いて、各組織における *vasa* mRNA の発現を RT-PCR 解析により評価した (Fig. 3)。トラフグより採取された各組織では、卵巣および精巣において強い *vasa* 遺伝子の発現が検出されたものの、その他の組織については *vasa* 遺伝子の発現は認められなかった (Fig. 3A)。卵巣および精巣での特異的な *vasa* 遺伝子の発現は、クサフグにおいても同様に認められた (Fig. 3B)。

vasa mRNA の生殖腺内での局在を評価するため、トラフグおよびクサフグより採取した精巣に関して、*in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。未熟な 12ヶ月齢のト

ラフグ精巣の組織切片を HE 染色により観察したところ、精巣内に存在する生殖細胞は主に A 型精原細胞であり、僅かに B 型精原細胞も観察された (Fig. 4A, D)。HE 染色した組織に隣接する切片の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、コントロールとして使用した *vasa* センスプローブについてハイブリダイゼーションシグナルは検出されなかったものの (Fig. 4C)、精巣中の A 型および B 型精原細胞においてアンチセンスプローブにより *vasa* mRNA の局在が確認された (Fig. 4B, E)。A 型および B 型精原細胞、精母細胞、精細胞および精子といった全ての分化段階の生殖細胞を有する 18ヶ月齢のクサフグ精巣 (Fig. 5A, D) では、A 型および B 型精原細胞での *vasa* mRNA の局在が観察され

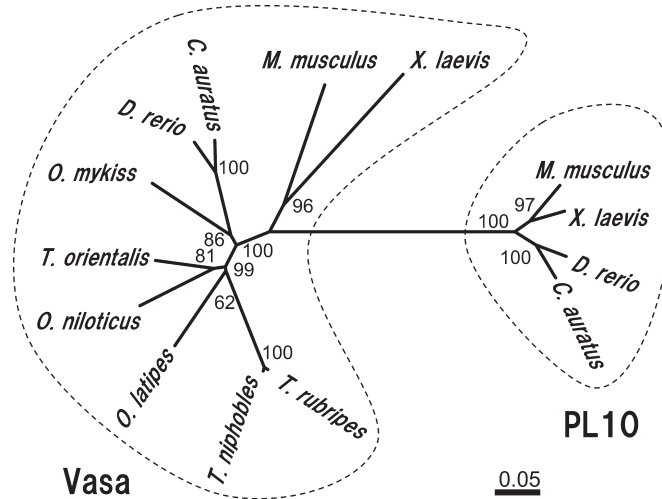


Fig. 2. Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of Vasa and PL10 constructed using the neighbor-joining method based on p-distance of MEGA 6 software. The number at each node represents the bootstrap probability (%). Scale bar, 0.05 substitutions per amino acid position. The GenBank accession numbers of the aligned deduced amino acid sequences and nucleic acid sequences were as follows: *vasa* (*Mus musculus*, AAI44761; *Xenopus laevis*, NP_001081728; *Danio rerio*, BAA22535; *Carasius auratus*, AAV70960; *Oryzias latipes*, BAB61047; *Oreochromis niloticus*, BAB19807; *Oncorhynchus mykiss*, BAA88059; *Thunnus orientalis*, ABY77970; *Takifugu rubripes*, LC203034; *T. niphobles*, LC203035) and *PL10* (*M. musculus*, AAA39942; *X. laevis*, NP_001080283; *D. rerio*, AAH59794; *C. auratus*, AAX46760).

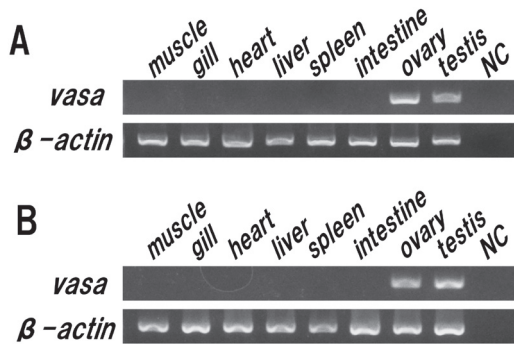


Fig. 3. RT-PCR analysis of various tissues using *vasa*-specific primer set. cDNA from various tissues (muscle, gill, heart, liver, spleen, intestine, ovary and testis) of *Takifugu rubripes* (A) and *T. niphobles* (B) were used for RT-PCR. NC was a negative control containing no cDNA template. β -actin primer set was also used as an internal control for RT-PCR amplification.

たのに対し、未熟なトラフグ精巢中に存在しなかった精母細胞、精細胞および精子については $vasa$ アンチセンスプローブ特異的なシグナルは認められなかった (Fig. 5B, C, E)。なお、精巢体細胞については、トラフグおよびクサフグ共に $vasa$ mRNAの局在は認められなかった。次に、トラフグおよびクサフグより採取した卵巣についても、同様に $vasa$ mRNAの卵巣内での局在を評価した。12ヶ月齢のトラフグ卵巣内には卵黄蓄積前にあたる周辺期の卵母

細胞が多くを占め、僅かに卵原細胞も存在していた (Fig. 6A, D)。卵巣体細胞での局在は認められなかったものの、これらの生殖細胞では、 $vasa$ アンチセンスプローブ特異的なシグナルが検出された (Fig. 6B, C, E)。18ヶ月齢のクサフグ卵巣では、卵原細胞と周辺期の卵母細胞に加え、卵黄蓄積を開始した卵黄球期の卵母細胞が存在しており (Fig. 7A, B)、トラフグと同じく卵巣体細胞でのシグナルは検出されなかったものの、これらいずれの分化段階の生殖細胞においても $vasa$ mRNAの局在が*in situ*ハイブリダイゼーションにより確認された (Fig. 7B, E, C)。

考 察

本研究では、トラフグ代理親魚技術の開発に向け生殖細胞を識別可能なマーカー遺伝子を得ることを目的として、トラフグおよびクサフグの $vasa$ ホモログ遺伝子の単離を行った。DEADボックスタンパク質ファミリーに属する $vasa$ 遺伝子は、ATP依存型RNAヘリカーゼ活性を有することが知られている¹⁴⁾。本研究で得られたトラフグおよびクサフグcDNAの予測アミノ酸配列にはDEADボックスタンパク質ファミリーに共通した、ATP-Aモチーフ (AXXXXGKT) およびATB-Bモチーフ (DEAD) を含む8つの保存配列が存在した²⁵⁾。また、これらの配列のN

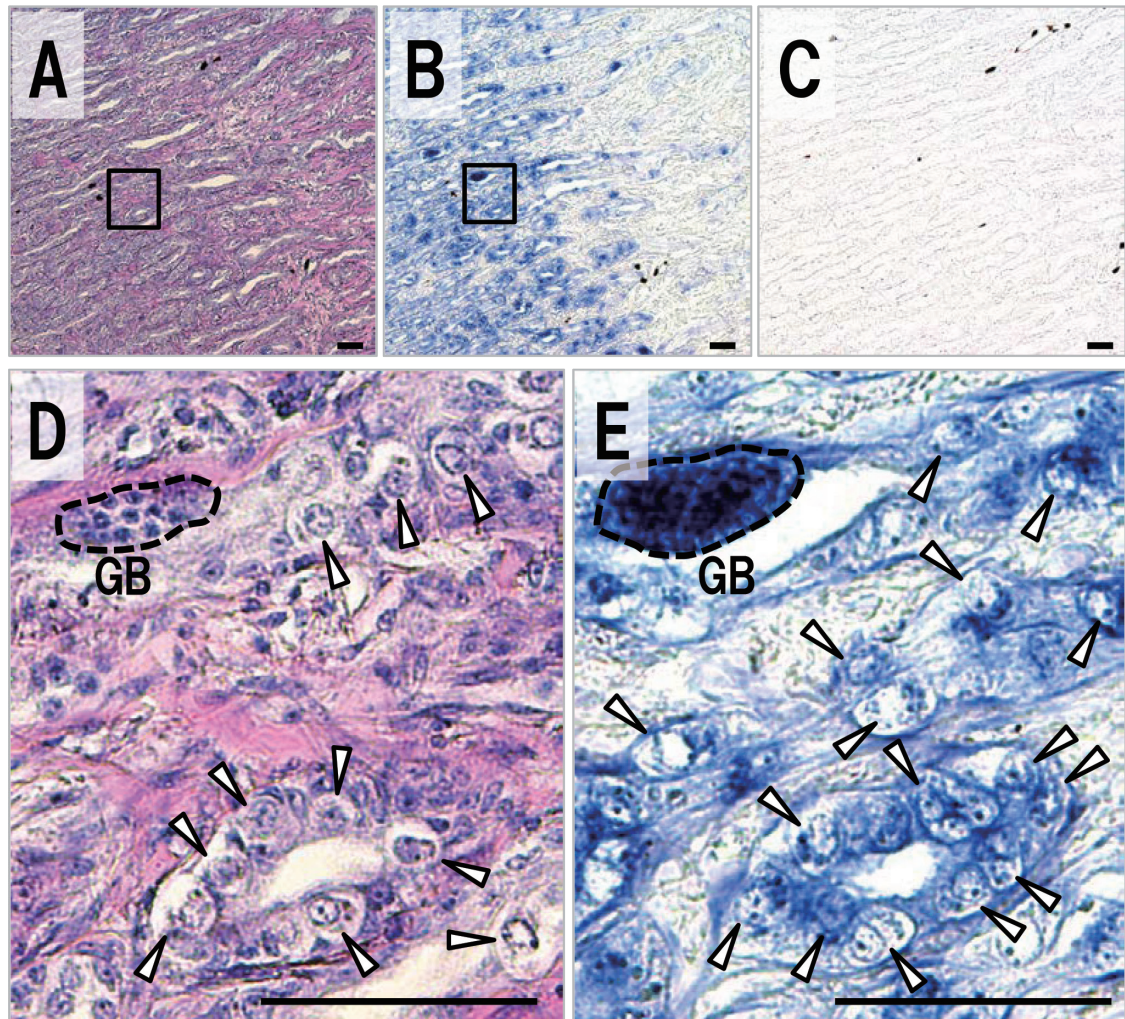


Fig. 4. Expression profile of *vasa* in testis of *Takifugu rubripes*. Sequence sections stained with HE (A, D) and hybridized with an antisense (B, E) and sense (C) *vasa* probe. Images of (D) and (E) are high magnification of the inset in (A) and (B), respectively. Arrowhead, type-A spermatogonium; GB, type-B spermatogonium. Scale bars indicate 50 μm .

末端領域には多種のVasaオースログ中にも存在するRGおよびRGGの繰り返し配列¹⁶⁾が存在した。これらの繰り返し配列は、RNAヘリカーゼのような一本鎖の核酸に結合するタンパク質の特徴であると考えられている²⁶⁾。さらに、DEADボックスタンパク質ファミリーに属する既知のVasaおよびPL10遺伝子ファミリーに関する系統解析では、トラフグおよびクサフグのcDNA配列が、*vasa*と強い関係性を持つことを示した。以上の結果は、本研究で得られたトラフグおよびクサフグのcDNAがATP依存型RNAヘリカーゼ活性を有するDEADタンパク質をコードした*vasa*ホモログであることを強く支持するものであった。

トラフグおよびクサフグの*vasa* mRNAに関するRT-PCR解析では、生殖腺において組織特異的な遺伝子発現が

確認された。生殖腺組織切片に対する*in situ*ハイブリダイゼーション解析を実施したところ、*vasa*陽性シグナルは両種の生殖細胞において観察されることが明らかとなった。クサフグ精巣では、精母細胞、精細胞および精子では検出されなかったものの、A型およびB型精原細胞において*vasa*陽性シグナルが検出された。一方トラフグは、供試個体が成熟に達していなかったため、精母細胞、精細胞および精子における*vasa* mRNAの局在は評価できなかったが、クサフグと同様、A型およびB型精原細胞での局在が認められた。また、卵巣では、トラフグおよびクサフグの両種において、卵原細胞および卵黄蓄積前の卵母細胞で*vasa* mRNAの局在が認められた。トラフグについては未成熟であったために卵黄蓄積後の卵母細胞における*vasa*

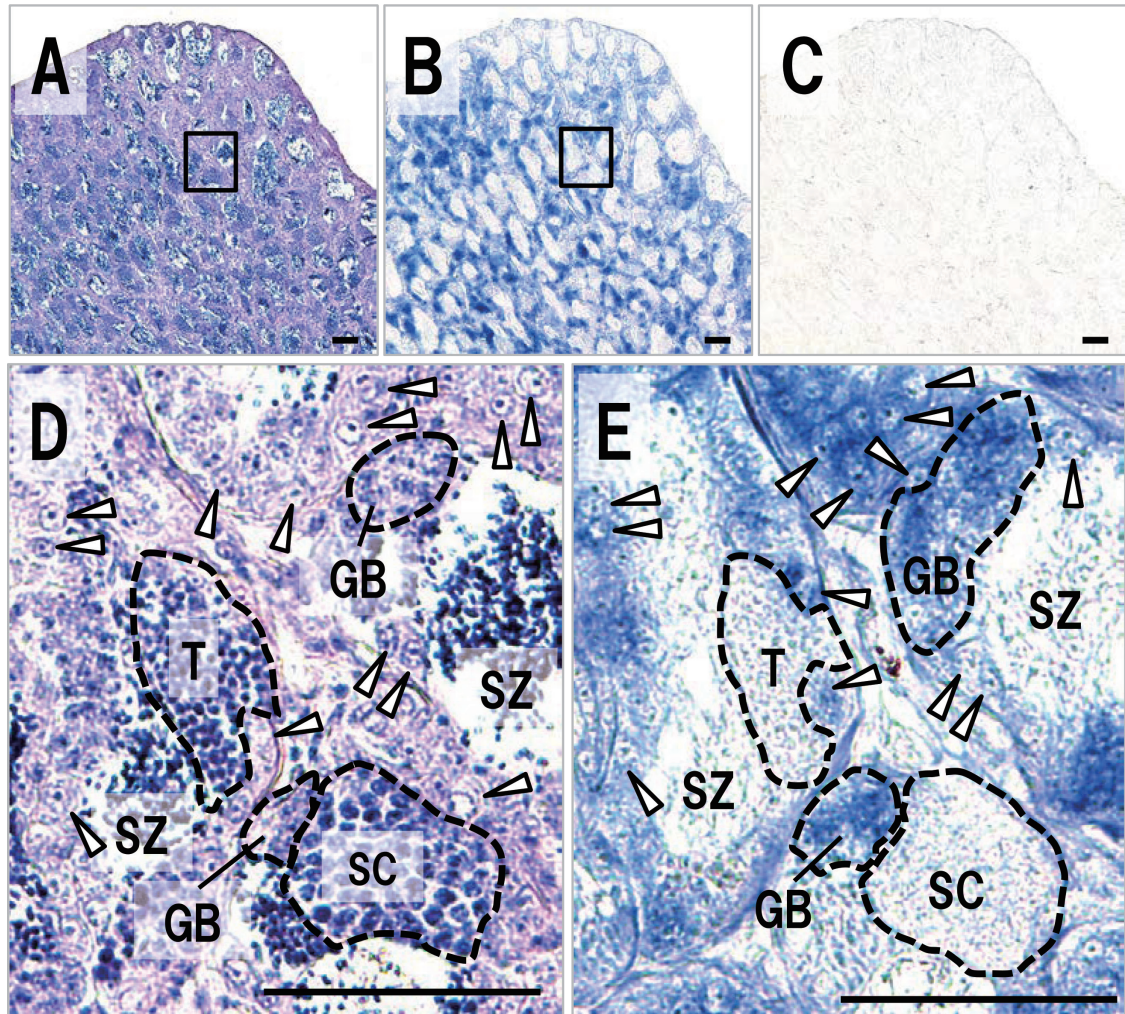


Fig. 5. Expression profile of *vasa* in testis of *Takifugu niphobles*. Sequence sections stained with HE (A, D) and hybridized with an antisense (B, E) and sense (C) *vasa* probe. Images of (D) and (E) are high magnification of the inset in (A) and (B), respectively. Arrowhead, type-A spermatogonium; GB, type-B spermatogonium; SC, spermatocyte; T, spermatid; SZ, spermatozoa. Scale bars indicate 50 μ m.

mRNAの局在を評価できなかったものの、クサフグでは卵巣中に存在した卵黄球期の細胞から *vasa* mRNA の陽性シグナルが検出されている。*vasa* mRNA に関する精巣内でのA型およびB型精原細胞における局在、および卵巣内での卵原細胞や卵母細胞における局在は、クロマグロ^{23, 27)} やティラピア¹⁹⁾ でも観察されており、今後、トラフグ属の生殖腺発達や生殖細胞の分化段階を評価する上で有用な遺伝子発現指標になると考えられる。

我々は、トラフグの有用形質系統作出に必要な親魚の養成期間や飼育スペースを削減できる可能性を秘めた技術として、サケ科魚類で開発された代理親魚技術^{5, 6)} に着目し、トラフグよりも小型で、かつ成熟に必要な世代時間も短い近縁種のクサフグを宿主とした代理親魚技術の開発

を進めている。近年、種々の海産魚で生殖細胞移植による代理親魚技術の開発が進められており、ブリ²⁸⁾ やニベ²⁹⁾ では同種異個体間での代理親魚技術の確立がされ、代理親魚から次世代子孫が生産されている。また、マアジを宿主としてブリの機能的精子生産が可能であることも報告されている³⁰⁾。生殖細胞移植により代理親魚を生産するには、宿主生殖腺内に生着した後に増殖・分化可能な生殖幹細胞を分取して、それらを移植することが有効であり、精巣細胞ではA型精原細胞に、卵巣細胞中では卵原細胞に生殖幹細胞として振舞う細胞集団の存在が報告されている⁹⁻¹²⁾。魚類において生殖幹細胞を特定することは現在のところ可能ではないものの、精原幹細胞を含む精原細胞を識別可能なマーカーとして *Ly75*³¹⁾、*dead end*^{27, 32)} が単離されてい

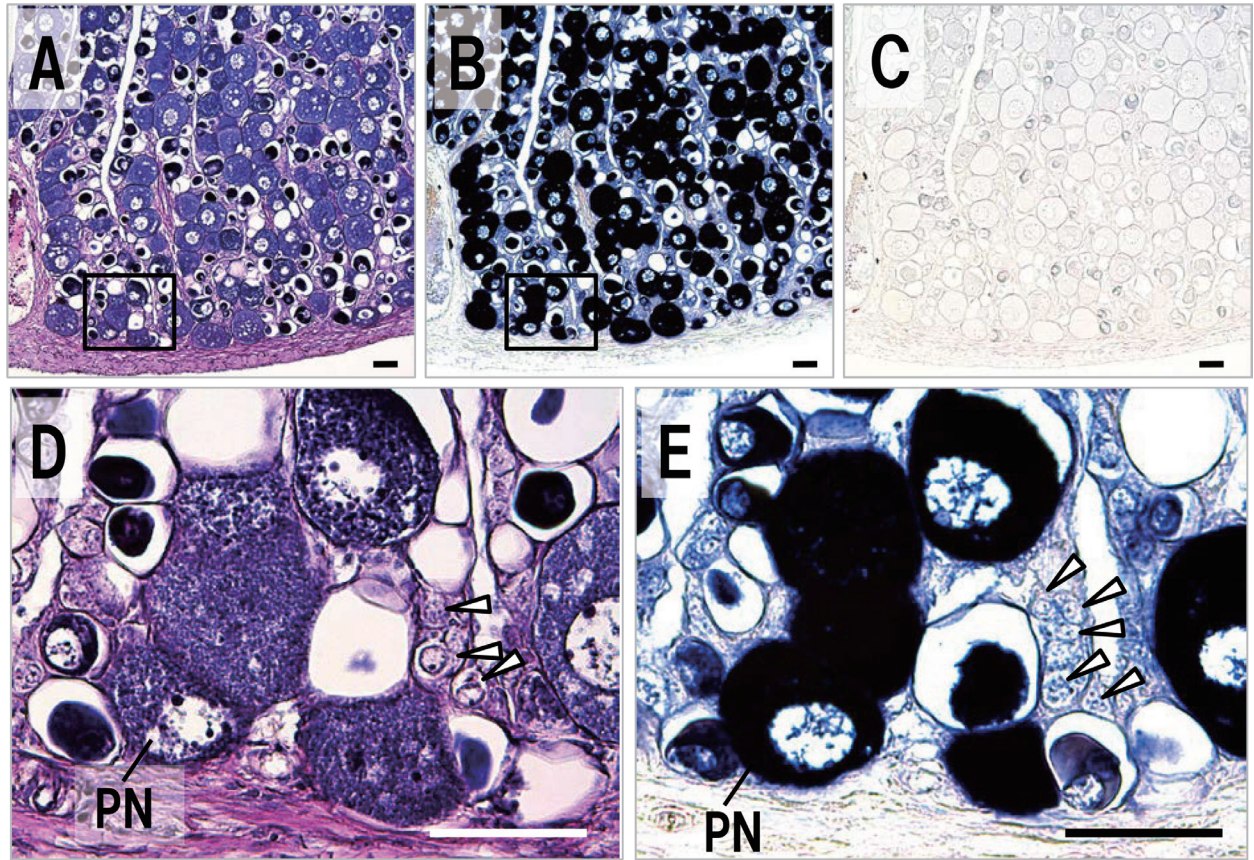


Fig. 6. Expression profile of *vasa* in ovary of *Takifugu rubripes*. Sequence sections stained with HE (A, D) and hybridized with an antisense (B, E) and sense (C) *vasa* probe. Images of (D) and (E) are high magnification of the inset in (A) and (B), respectively. Arrowhead, oogonium; PN, peri-nucleolus oocyte. Scale bars indicate 50 μ m.

る。これらの遺伝子と同様に、*vasa*遺伝子は精原細胞を特定するために有用なマーカー遺伝子であると考えられており、ニジマスでは緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を *vasa*遺伝子発現調節領域に接続したp *vasa*-GFP遺伝子導入個体から、フローサイトメーターにより緑色蛍光強度を指標とした始原生殖細胞や精原細胞の分取がなされている^{33, 34)}。本研究で明らかにしたトラフグ*vasa*遺伝子は、今後、精原細胞をフローサイトメーターなどにより分取してドナー細胞の調整を行う際に有効な遺伝子マーカーとして活用されることも期待される。

謝 辞

本研究はJSPS科研費JP26892033の支援を受け行われたものです。

文 献

- 1) Miyaki K: Biological study of hybrid pufferfishes of the genus *Takifugu*, Tetraodontidae. Ph.D. thesis, Nagasaki University, Nagasaki. (1992)
- 2) Chuda H, Matsuyama M, Ikeda Y, Matsuura S: Development of the maturation- and ovulation-induction method in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 63, 728-733 (1997)
- 3) Matsuyama M, Chuda H, Ikeda Y, Tanaka H, Matsuura S: Induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by different hormonal treatments. *Suisanzoshoku*, 40, 67-73 (1997)

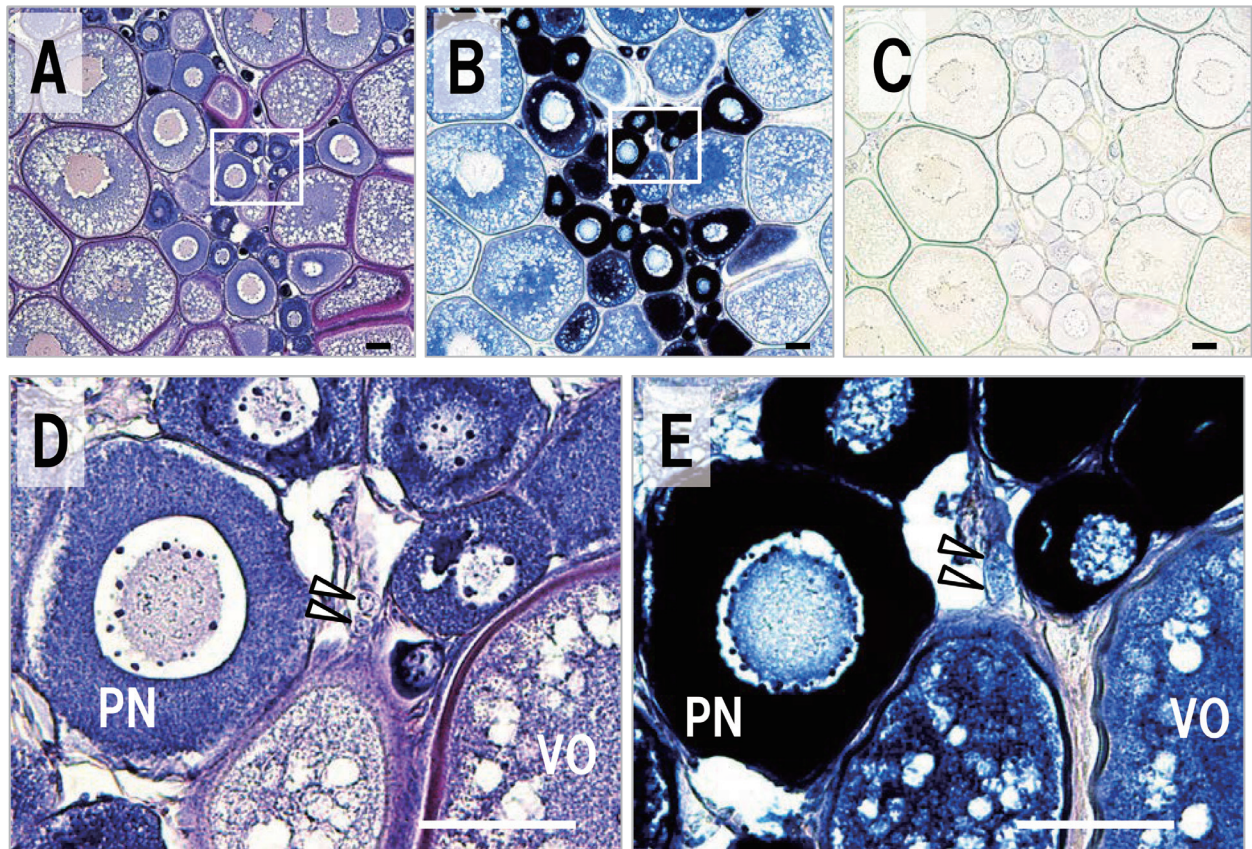


Fig. 7. Expression profile of *vasa* in ovary of *Takifugu niphobles*. Sequence sections stained with HE (A, D) and hybridized with an antisense (B, E) and sense (C) *vasa* probe. Images of (D) and (E) are high magnification of the inset in (A) and (B), respectively. Arrowhead, oogonium; PN, peri-nucleolus oocyte; VO, vitellogenic oocyte. Scale bars indicate 50 μm .

- 4) Hamasaki M, Takeuchi Y, Miyaki K, Yoshizaki G: Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment. *Mar Biotechnol*, **15**, 133-44 (2013)
- 5) Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T: Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, **430**, 629-630 (2004)
- 6) Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G: Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, **317**, 1517 (2007)
- 7) Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G: Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2725-2729 (2006)
- 8) Okutsu T, Takeuchi Y, Yoshizaki G: Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents. In: Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, Beard Jr. TD, Kaiser MJ (eds) *Fisheries for Global Welfare and Environment*, TERRAPUB, Tokyo, pp 209-219 (2008)
- 9) Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, Iwasaki Y, Miwa M, Shikina S, Okutsu T: Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, **137**, 1227-1230 (2010)
- 10) Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y: Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim Reprod* **7**, 187-196 (2010)
- 11) Yoshizaki G, Fujinuma K, Iwasaki Y, Okutsu T, Shikina S, Yazawa R, Takeuchi Y: Spermatogonial

- transplantation in fish: a novel method for the preservation of genetic resources. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, **6**, 55-61 (2011)
- 12) Yoshizaki G, Okutsu T, Morita T, Terasawa M, Yazawa R, Takeuchi Y: Biological characteristics of fish germ cells and their application to developmental biotechnology. *Reprod Domest Anim*, **47**, 187-192 (2012)
 - 13) Schupbach T, Wieschaus E: Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux's Arch Dev Biol*, **195**, 302-317 (1986)
 - 14) Hay B, Jan LY, Jan YN: A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicase. *Cell*, **55**, 577-587 (1988)
 - 15) Lasko PF, Ashburner M: The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*, **335**, 611-617 (1988)
 - 16) Raz E: The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* **3**, 1017.1-1017.6. (2000)
 - 17) Yoon C, Kawakami K, Hopkins N: Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, **124**, 3157-3165 (1997)
 - 18) Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, Takeuchi T: Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev*, **55**, 364-371 (2000)
 - 19) Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y: Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech Dev*, **99**, 139-142 (2000)
 - 20) Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, Hamaguchi S: The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, **42**, 317-326 (2000)
 - 21) Xu H, Gui J, Hong Y: Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev Dyn*, **233**, 872-882 (2005)
 - 22) Miyake A, Saito T, Kashiwagi N, Ando D, Yamamoto A, Suzuki T, Nakatsuji N, Nakatsuji T: Cloning and pattern of expression of the shiro-uo *vasa* gene during embryogenesis and its roles in PGC development. *Int J Dev Biol* **50**, 619-625 (2006)
 - 23) Nagasawa K, Takeuchi Y, Miwa M, Higuchi K, Morita T, Mitsuboshi T, Miyaki K, Kadomura K, Yoshizaki G: cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like gene in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish Sci* **75**, 71-79 (2009)
 - 24) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729 (2013)
 - 25) Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP: Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, **337**, 121-122 (1989)
 - 26) Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P: Localization of *vasa* protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development*, **120**, 1201-1211 (1994)
 - 27) Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, Ishida M, Yoshizaki G: The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) *dead end* gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Mol Reprod Dev*, **80**, 871-880 (2013)
 - 28) Morita T, Kumakura N, Morishima K, Mitsuboshi T, Ishida M, Hara T, Kudo S, Miwa M, Ihara S, Higuchi K, Takeuchi Y, Yoshizaki G: Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biol Reprod*, **86**, 176 (2012)
 - 29) Yoshikawa H, Takeuchi Y, Ino Y, Wang J, Iwata G, Kabeya N, Yazawa R, Yoshizaki G: Efficient production of donor-derived gametes from triploid recipients following intra-peritoneal germ cell transplantation into a marine teleost, Nibe croaker

- (*Nibea mitsukurii*). Aquaculture, In press (2016)
- 30) Morita T, Morishima K, Miwa M, Kumakura N, Kudo S, Ichida K, Mitsuboshi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G: Functional sperm of the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) were produced in the small-bodied surrogate, jack mackerel (*Trachurus japonicus*). Mar Biotechnol, 17, 644-654 (2015)
- 31) Nagasawa K, Miwa M, Yazawa R, Morita T, Takeuchi Y, Yoshizaki G: Characterization of lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) as a potential cell-surface marker on spermatogonia in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fish Sci, 78, 791-800 (2012)
- 32) Bar I, Smith A, Bubner E, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Yazawa R, Chen BN, Cummins S, Elizur A: Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. Reprod Fertil Dev, Doi: 10.1071/RD15136. (2015)
- 33) Takeuchi Y, Yoshizaki G, Kobayashi T, Takeuchi T: Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the *vasa* gene promoter. Biol Reprod, 67, 1087-1092 (2002)
- 34) Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G: Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions. Biol Reprod, 78, 151-158 (2008)