

博士学位論文

トラフグ配偶子を生産する  
クサフグ代理親魚生産法の開発

Production of Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*)  
Offspring from Grass Puffer (*Takifugu niphobles*)  
Parents

平成 23 年度  
(2012 年 3 月)

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

濱崎 将臣

トラフグ配偶子を生産する  
クサフグ代理親魚生産法の開発

目次

	頁
緒論	27
引用文献	29
第1章 クサフグ三倍体の生殖腺発達状況とその妊性 (Gonadal development and fertility of triploid grass puffer <i>Takifugu niphobles</i> induced by cold shock treatment)	31
Abstract	31
Introduction	31
Material and Methods	33
Results	35
Discussion	37
References	40
Figure Legends	44
Figures	46
第2章 クサフグ三倍体へのトラフグ精原細胞移植	51
緒言	51
材料と方法	52
結果	55
考察	56
引用文献	59
図説明	61
図表	63
総括	72
引用文献	75
謝辞	76

## 緒 論

トラフグ *Takifugu rubripes* は、東シナ海、黄海、瀬戸内海、日本海から太平洋沿岸の各地に広く分布し、ふぐ料理の高級食材として珍重されることから延縄漁業、一本釣り漁業等の重要な漁獲対象魚種の一つとなっている。本種の養殖は、1930年代に岡山県において天然で漁獲された個体を蓄養したことから始まった(藤田, 1988)。その後、1989年には本種の養殖生産量は1,657トンであったものが1992年には4,000トンを超え、それ以降は2008年まで約4,000トンから5,000トン前後で安定した生産が続いている(農林水産省, 1989-2008)。これには、歯切りによる歩留まりの向上、餌の改良等の養殖技術の進歩の寄与が大きい。さらに、本種の種苗生産技術が確立し、完全養殖が可能になったことで、人工種苗が安定的に供給できる体制が整ったことも大きな要因である(Chuda et al., 1997)。一方、天然トラフグの漁獲量は240トン(2008年)であり、養殖トラフグのわずか6%にすぎない。近年、中国産の養殖トラフグの輸入量が増加し、2001年には2,000トンを超え、2004年には4,800トンと国内養殖量を上回った。これにより、国内産トラフグの価格が暴落し養殖トラフグ業者は大きな危機を迎えた。しかし、2006年に「残留農薬等に関するポジティブリスト制度」を導入したことがきっかけとなり、中国からの輸入量は2008年では2,000トンと減少している(財務省, 2001-2008)。現在のところ、トラフグの需要は日本および韓国に限られているが、フグ食が禁止されている中国では日本からのフグ管理制度を導入しフグ食の解禁を目指しており、近い将来中国での需要拡大が期待される。しかし、現時点において養殖トラフグの価格は天然魚の漁獲量、中国産の輸入量により大きく左右されるうえ、昨今の原油の高騰により採算割れする事態も見受けられる。これを、打開するために、高品質(優良形質)のトラフグの生産が産業上必要となっている。具体的には、雄の成熟が早い、成長が早い、肉質が良い、そして病気に強い等の表現型が求められている。

このような高品質のトラフグ種苗を生産していく、すなわち育種を行っていくことで、養殖トラフグの価格の安定化と中国産トラフグとの差別化が図られ、我が国がトラフグ養殖国としての優位性を保つことが可能になると期待される。

トラフグはゲノムサイズがヒトの8分の1程度とコンパクトなため(Brenner et al., 1993)、魚類の中ではゲノム配列が最も早く解読された(Aparicio et al., 2002)。このため、このゲノム情報を利用した育種への期待が高まっている。しかしながら、トラフグの育種を行っていくうえで2つの大きな課題がある。1つ目は、トラフグは成熟までに雌が3年、雄が2年を要するため、品種作製に必要な交配に多くの時間を費やすことになる。2つ目は親魚のサイズが非常に大きいことである。実際に、一般的なトラフグ養殖においては種苗導入から1年半で0.6~1 kgのサイズで出荷しているのに対し、トラフグ親魚は2年以上かけ2~5 kgのサイズまで飼育する必要がある。トラフグ育種に用いる親魚を維持管理していくためには通常の養殖より、時間、広大な飼育設備と労力が必要となってくる。そこで、トラフグの世代時間の短縮と親魚サイズの縮小ができる技術があれば、この課題を解決できトラフグ育種に大きく貢献できると期待される。

本研究室では、クロマグロ *Thunnus orientalis* のように親魚養成や成熟誘導が困難な魚種に対して代理親魚技法を用いることで、効率よくかつ簡便に人工種苗を得ようとする研究に取り組んでいる。代理親魚技法とは、ある魚の配偶子を別種の個体または同一種の別個体に生産させる方法である。この技術により、商品価値の高い魚種を小型で飼育が容易な近縁種に生ませることや、絶滅危惧種を近縁種に生ませることが可能になると期待されている。本研究室では、これまでに、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* 精原細胞を、同属のヤマメ *Oncorhynchus masou* または同科のイワナ *Salvelinus leucomaenis* 稚魚に移植することで、代理親魚ヤマメおよびイワナにニジマスの配偶子を生産させる精原細胞移植技術を確立している

(Okutsu et al., 2007, 奥津ら, 2008)。精原細胞移植技術は、現在では海産魚に展開されており、同種間のニベ *Nibea mitsukurii* -ニベ (岩田, 2010)および同科間のマアジ *Trachurus japonicus* -ブリ *Seliola quinqueradiata* (吉崎ら, 2011)の研究において、ドナー由来の配偶子を得られたが、異科間であるニベ-ブリ (Higuchi et al., 2011)およびマサバ *Scomber japonicus* -ニベ (Yazawa et al., 2010)ではドナー由来の配偶子を得られていない。このように、淡水魚、海産魚に関わらず同属間または同科間である近縁種間において、精原細胞移植により宿主からドナー由来の配偶子を得ることに成功しているが、異科間では成功していない。つまり、ドナーの種と遺伝的距離を考慮した宿主の選択が精原細胞移植成功の重要な要因となっている。

そこで、本研究ではトラフグの代理親候補として同属であるクサフグ *Takifugu niphobles* に着目し、トラフグ精原細胞移植によりクサフグ代理親魚からトラフグ配偶子を得ることを試みた。クサフグとトラフグは正逆交雑により生残性の交雑フグが誕生し、正常に生育した後、発生能力のある配偶子を生産する (Miyaki, 1992)。このため、トラフグとクサフグの遺伝的距離は非常に近いことが推測される。さらに、クサフグの成熟年齢はトラフグより若く、雄では最短で 10 ヶ月齢で排精することが確認されている (濱崎, 未発表)。この成熟に達する期間は、トラフグの約半分である。しかも、クサフグは、最小でトラフグの成熟サイズの約 150 分の 1 のサイズである 13g で成熟する。育種を行うには、何代もの世代の交配をしていく必要があるため、成熟年齢の短縮と親魚サイズの縮小が大きな利点となる。したがって、クサフグは、トラフグ育種を目的とした代理親魚としての必要な条件を十分に満たしていると考えられる。

宿主 (代理親魚) がドナー由来の配偶子を生産するために有効なことは、宿主自身が生産する配偶子を減少、もしくは完全に除去し不妊化することである。Okutsu ら (2007) は、サケ科魚類において宿主の不妊化が、ドナー由来の配偶子を形成させるために有効であることを明らかにしている。

さらに、ドナーである二倍体の精原細胞を不妊化宿主に移植すると、宿主の不妊性は完全に回復し機能的なドナー由来の配偶子を生産し、その繁殖能力は二倍体と同等であることが明らかになっている (Yoshizaki et al., 2011)。このため、宿主として選択したクサフグを不妊化することを考えた。これまでの魚類の不妊化方法として、*dead end* 遺伝子の翻訳阻害 (Saito et al., 2008) と三倍体化 (Felip et al., 2001)、および異種交雑 (Suzuki, 1963; Murata, 1998) が報告されている。しかし *dead end* 遺伝子の翻訳阻害に必要な *antisense dead end morpholino oligonucleotide* を受精卵 1 粒ずつに顕微注入するという技術は、代理親魚技術の実用化を見据えた場合、煩雑であり適切ではない。また異種交雑については、前述したようにトラフグとクサフグの正逆交配による交雑フグには妊性がある。また、その他のトラフグ属間でも、トラフグとコモフグ *Takifugu poecilonotus*、トラフグとシマフグ *Takifugu xanthopterus*、ヒガンフグ *Takifugu pardalis* とコモフグ、そしてシマフグとマフグ *Takifugu porphyreus* といったように容易に正逆交雑ができるため (宮木, 1998)、これら全ての妊性を調査し、不妊になる組み合わせを探し出していくことは、多大な労力と時間がかかることが予想される。そこで、これまで多くの海産魚で作出実績もあり (Tiwary et al., 2004)、簡便な方法で大量作出が可能であると考えられる三倍体化をクサフグに適用し、不妊化することを考えた。そのために、本研究では第 1 章で、クサフグを三倍体化するための最適条件を検討し、得られた三倍体の妊性を調査した。続いて、第 2 章では宿主クサフグ三倍体へのトラフグ精原細胞移植方法を検討し、宿主から得られた配偶子がドナーであるトラフグ由来であるかを検証した。また、得られた配偶子を用いて交配試験を行い、得られた次世代中にドナー由来のトラフグが出現するかを検証した。

## 引用文献

- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, MD., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S.F., Clark, M.S., Edwards, Y.J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S.V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y.H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., and Brenner, S. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301-1310.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S. (1993). Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366:265-268.
- Chuda, H., Matsuyama, M., Ikeda, Y., and Matsuura, S. (1997). Development of the maturation- and ovulation-induction method in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi* 63:728-733.
- Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., and Zanuy, S. (2001). Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J Exp Zool* 290:384-395.
- 藤田矢郎. (1988). 日本近海のフグ類, 日本水産資源保護協会, 東京, pp.8-49.
- Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., and Yoshizaki, G. (2011). Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fish Sci* 77:69-77.
- 岩田岳. (2010). 海産魚における同種間精原細胞移植技術の開発～3 倍体不妊化宿主を利用したドナー由来次世代個体の作出～. 卒業論文, 東京海洋大学.
- Miyaki, K. (1992). Biological study of hybrid pufferfishes of the genus *Takifugu*, Tetraodontidae. Ph.D. Thesis, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.
- 宮木廉夫. (1998). 交雑フグの初期形態. 長崎県水産試験場研究報告 24:27-68.
- Murata, O. (1998). Studies on the breeding of cultivated marine fishes. *Bull Fish Lab Kinki Univ* 6:49-56.
- 農林水産省. (1989-2008). 漁業・養殖業生産統計年報.
- 奥津智之・小林輝正・竹内裕・吉崎悟朗. (2008). 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.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2007). Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317:1517.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., and Yamaha, E. (2008). Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 78:159-166.
- Suzuki, R. (1963). Hybridization experiments in cyprinid fishes. IV. Reciprocal crosses between *Biwia zezera* and *Gnathopogon elongatus elongatus*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 29:655-657.
- Tiway, B.K., Kirubagaran, R., and Ray, A.K. (2004). The biology of triploid fish. *Rev Fish Biology and Fisheries* 14:391-402.

Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., and Yoshizaki, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol Reprod* 82: 896-904.

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., and Takeuchi, Y. (2011). Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 6:55-61.

吉崎悟朗・三輪美砂子・竹内裕・森田哲朗・森島輝・三星亨. (2011). ブリ精原細胞を移植したマアジ宿主からのブリ次世代の生産. 平成23年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p57.

財務省. (2001-2008). 普通貿易統計.

## 第1章

クサフグ三倍体の生殖腺発達状況と  
その妊性

**(Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment): *Marine Biotechnology* (2012).**

### Abstract

Tiger puffer *Takifugu rubripes* is one of the most valuable fish species in Japan; however, there has not been much progress in their selective breeding until recently, despite their potential in aquaculture. Their long generation time and the large body size of their broodstock make breeding difficult. Recently, we made a surrogate broodstock, which produce gametes of different species in salmonids. Therefore, by using closely-related recipients, which have small body sizes and short generation times, it is possible to accelerate breeding of the tiger puffer. Thus, we considered the grass puffer *Takifugu niphobles*, which has a short generation time and a small maturation size, as a potential recipient for gamete production of the tiger puffer. Furthermore, if sterile triploid individuals are used as recipients, the resulting surrogate broodstock would produce only donor-derived gametes. Therefore, we examined conditions for inducing triploidy by suppressing meiosis II to retain the second polar body in grass puffer. We found that cold shock treatment, which is 5°C for 30 min starting from 5 min after fertilization, is optimal to obtain high triploidization and hatching rates. Although the resulting triploid grass puffers produced small amounts of gametes in both sexes, the offspring derived from the gametes could not live for over 3 days. Furthermore, we found that triploid grass puffer showed normal plasma sex steroid levels compared with diploids. These are important characteristics of triploid grass puffer as surrogate recipients used for germ cell transplantation.

## Introduction

The tiger puffer *Takifugu rubripes* is one of the most valuable fish species in Japan. To date, techniques for broodstock management, artificial induction of maturation and ovulation, and seed production have been well established (Miyaki et al. 1992; Chuda et al. 1997; Matsuyama et al. 1997). However, there has been little progress in selective breeding until recently despite its importance for future aquaculture. Therefore, the production of strains carrying desired genetic traits, such as high growth performance or disease resistance, is a pressing issue.

The genome of the tiger puffer was selected as the first model species used for genome sequencing (Aparicio et al. 2002) because of its compact genome size, which is about one eighth that of the human genome (Brenner et al. 1993). Since a high density genome map is available, the selective breeding of this species is expected to be developed rapidly (Kikuchi et al. 2007; Hosoya et al. 2008). However, there are two major obstacles to selective breeding the tiger puffer. First, they have a long generation time of 3 years until maturation, and second, the parental tiger puffer has a large body size of about 2 to 5 kg, which is two to eight times larger than the average market size (0.6-1 kg). Therefore, lots of time and space are required to maintain their broodstock compared to the production of market-sized fish. Thus, if there are techniques to reduce the generation time and body size of parental fish, it would accelerate the selective breeding of the tiger puffer.

Previously, we developed an interspecies germ cell transplantation technique to create salmon broodstock that could produce functional trout gametes (Takeuchi et al. 2004; Okutsu et al. 2007). Donor-derived trout type A spermatogonia (A-SG), which reside singly surrounded by Sertoli cells, were microinjected into the peritoneal cavities of newly hatched salmon larvae. Donor A-SG actively migrated toward, and subsequently colonized, the recipient genital ridges. We

also found that A-SG can differentiate into functional sperm and eggs depending on the sex of the recipient fish (Okutsu et al. 2006). If the A-SG of tiger puffer could be transplanted into a closely related species with a small body size and short generation time, they could potentially proliferate and differentiate into mature eggs and sperm in the gonads of the surrogate parent fish. Thus, by using surrogate broodstock, we could overcome the obstacles of long generation time and large body size of the tiger puffer.

The selection of suitable recipients is an important factor when developing a spermatogonial cell transplantation system. Previously, we succeeded in achieving the production of gametes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the masu salmon *Oncorhynchus masou* and Japanese charr *Salvelinus leucomaenis* as recipients (Okutsu et al. 2007, 2008a, b). However, producing gametes of the yellowtail *Seliola quinqueradiata* from surrogate nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipients has not yet been achieved (Higuchi et al. 2011). In the former two cases, intrafamily transplantation was performed, while in the latter case, interfamily transplantation was performed. Therefore, we considered the grass puffer *Takifugu niphobles* as a candidate recipient for gamete production of the tiger puffer, which belongs to the same genus, *Takifugu*. In fact, grass puffer can be hybridized with tiger puffer, and reciprocal hybrids are viable and fertile, suggesting that the genetic distance between the two is relatively close (Miyaki 1992). More importantly, the egg size of grass puffer is quite similar to that of the tiger puffer (Miyaki 1992). Furthermore, the maturation age of the grass puffer is less than that of the tiger puffer (Uno, 1955). Grass puffer males mature as early as 10 months of age (Hamasaki, unpublished data), which is about half that of the tiger puffer. In addition, grass puffer can be reared in small spaces, because their maturation size is 13 g, which is less than 1/150 of that of mature tiger puffer. Thus, the grass puffer fulfills all the conditions required to be a surrogate parent to produce gametes of the tiger

puffer.

In addition to the selection of suitable recipients, another important step for success in spermatogonial cell transplantation is sterilization of the recipient fish. Okutsu et al. (2007) reported efficient donor-derived gametogenesis by using sterilized recipient salmonids. Furthermore, we found that their sterility was fully rescued, that they produced functional donor-derived gametes, and that their fecundity was quite similar to that of control diploid fish (Yoshizaki et al. 2011). To date, various sterilization methods, such as knock-down of the *dead end* genes (Ciruna et al. 2002; Weidinger et al. 2003), triploidization (Felip et al. 2001a), and inter-species hybridization (Suzuki, 1963; Murata, 1998; Yamaha et al. 2003; Wong et al. 2011) have been reported. In grass puffer, however, microinjection to deliver an antisense *dead end* morpholino oligonucleotide into fertilized eggs has not been established. Furthermore, mass production of knocked-down fish is impractical. Hybrids between the grass puffer and tiger puffer produce fertilizable gametes, and offspring made using the gametes are viable (Miyaki, 1992). Therefore, in this study, we tried to achieve sterilization of grass puffer recipients by the induction of triploidy. It is noteworthy that triploids can be produced in large quantities by a relatively simple procedure.

The induction of triploidy has been achieved in many fish species by treatment designed to prevent extrusion of the second polar body of fertilized eggs (Maxime, 2008). Preventing this extrusion can be achieved by applying cold, heat, or pressure shocks (Felip et al. 2001b; Tiwary et al. 2004). Triploids are generally sterile due to the irregular meiotic division of chromosomes, resulting in reduced gonadal development (Piferrer et al. 2009). However, gonadal development and gametogenesis of triploids are highly variable between species or sexes (Felip et al. 2001b; Piferrer et al. 2009). In this paper, we examined the optimal conditions for inducing triploidy in grass puffers by preventing extrusion of the second polar body.



Furthermore, we examined the gonadal development of the resulting triploids and the fertility of their gametes.

## Materials and Methods

### *Broodstock and Gamete Collection*

Three hundred parental grass puffers were collected with a settled net from Omura Bay, Nagasaki, Japan in December 2009. The sex ratio of these fish was about 1:1, and the body weight was 20 to 120 g. They were transferred to the Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki, Japan, and were kept in indoor tanks (12,000 L) with a flow of seawater under natural conditions until maturation. In May and June of 2009 and 2010, which is the spawning season of the grass puffer, a total of 52 females with oocyte diameters of 650 to 800  $\mu\text{m}$  were injected into their dorsal muscles with 500 IU human chorionic gonadotropin (hCG) per kg body weight. Oocytes used for diameter measurement were biopsied using a polypropylene cannula via oviduct. Forty-eight to 72 h after hCG injection, all fish that were found to have ovulated were stripped manually, and eggs were fertilized with milt. Milt was collected by pressing the abdomen of males without hCG treatment during this period.

### *Growth and Survival Rates of Cold Shock-Treated Eggs*

After fertilization, a single clutch of eggs was treated with 0.05% tannic acid for 15 s to remove the adhesiveness of the eggs (Miyaki et al. 1998). Then the eggs were separated into two groups. Eggs in group 1 were incubated in seawater at a temperature of 20°C and used as a control group. Group 2 received a 30-min cold shock at 5 min after fertilization, and designated as the cold shock group. The effects of temperature during cold shock treatment on the developmental and hatching rates were examined at 2 h postfertilization (hpf) (two-cell stage) and 280 hpf (hatching stage), respectively.

Group 2 was divided into three temperature gradients: 0°C ( $0.06 \pm 0.06^\circ\text{C}$ ), 3°C ( $2.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ), and 5°C ( $5.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) cooled by a chiller (CL-80R; Taitec, Saitama, Japan). The eggs cold-shocked at 0°C and 3°C were obtained from two females, and the 5-°C cold-shocked eggs were obtained from four females. After the cold shock treatment, the eggs were reared at 20°C. For both group 1 and 2, 100 larvae were placed in 10-l tanks under natural water temperatures (19-21°C). The total lengths were measured for five larvae. The total length and survival rate of larvae were recorded at 3, 10, 20, 30, 60, 80 days after hatching. All experiments were performed for four times using different pairs of parental fish. Survival data are represented as the mean of individual tank ( $n = 4$ )  $\pm$  SEM. Since growth difference was not observed among the four replicates, we showed mean ( $\pm$  SEM) of total length for all individual fish without considering tanks effects ( $n = 20$ ).

### *Ploidy Determination*

Four-month-old 5-°C cold shock-treated grass puffers ( $n = 30$ ) and control grass puffers ( $n = 16$ ) were used for counting the number of chromosomes to determine the ploidy. The method of chromosome preparation used in this study is similar to that of Ojima and Kurishita (1980). The fish were injected with 0.1 ml of 0.05% colchicine solution into the dorsal muscle at 20°C for 4 h. Then they were sacrificed and the kidneys were removed for chromosome preparations. Kidneys were transferred into 0.075 M KCl solution, minced to dissociate the cells, and held for 45 min at room temperature. After centrifugation ( $155 \times g$  for 7 min at 4°C), the supernatant liquid was replaced by freshly prepared Carnoy's solution (methanol:glacial acetic acid = 3:1), and fixed for 60 min. After being dripped on glass slides, preparations were stained in 5% Giemsa solution (Sigma-Aldrich-Japan, Tokyo, Japan) for 60 min, and finally observed, counted, and photographed under a  $\times 1,000$  light microscope (BX51; Olympus, Tokyo, Japan). Three chromosome images per

individual fish were counted to determine the ploidy.

In order to determine the ploidy of each fish rapidly, we tested the relationship between the number of chromosomes and the diameters of erythrocytes. Blood smears were prepared from either 1-year-old diploid grass puffers ( $n = 3$ ) or triploid grass puffers ( $n = 3$ ), whose ploidies were predetermined by the number of chromosomes. The blood was drawn from the heart and fixed with Tissue-Tek Ufix (Sakura Finetech U.S.A. Inc., Torrance, CA) with the same volume of blood. The fixed blood was smeared onto a clean microscope slide, dried, and then stained with 5% Giemsa solution for 45 min at room temperature. The erythrocyte diameters were measured and photographed under a  $\times 1,000$  light microscope (BX51; Olympus). Ten erythrocyte diameters per individual fish were measured. After confirming the validity of this method, we used it to determine ploidy for the rest of this study.

### ***Gonad Histology***

The fish used for histological analysis were 1- and 2-year-old diploid and triploid grass puffers. The gonadosomatic index (GSI; [gonad weight in grams/body weight in grams]  $\times 100$ ) was used to measure gonadal development of fish. The gonads of grass puffers were fixed with Bouin's fixative, cut into 5- $\mu\text{m}$ -thick sections using the standard paraffin-embedding method, and stained with hematoxylin-eosin (HE). Histological sections were examined using a light microscope (BX51; Olympus) equipped with a digital camera (DP-25; Olympus).

### ***Measurement of Plasma Steroid Levels***

Nineteen-month-old (non-spawning season) and 2-year-old (spawning season) diploid and triploid grass puffers were used for measuring plasma sex steroid hormone levels. Blood samples collected from the heart into heparinized syringes were centrifuged ( $644 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ ). The plasma was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use for steroid analysis. Plasma levels of 11-

ketotestosterone (11KT) and estradiol- $17\beta$  (E2) were assayed using the 11KT EIA Kit and the Estradiol EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions, respectively.

### ***Fertility Assessment of Gametes from Triploid Grass Puffer***

Milt was collected from diploid ( $n = 8$ ) and triploid ( $n = 10$ ) grass puffer males matured at 1 year of age under natural conditions. These sperm were fixed with 70% ethanol, stained with HE, and observed under a  $\times 1,000$  light microscope (BX51; Olympus). Head lengths of 30 spermatozoa obtained from diploids ( $n = 3$ ) and triploids ( $n = 3$ ) were measured. For measuring sperm concentrations, 100  $\mu\text{l}$  of sperm were diluted with 1:1,000 balanced salt solutions (13.5 g/l NaCl, 0.6 g/l KCl, 0.25 g/l  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 g/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0.35 g/l  $\text{MgCl}_2$ ). The number of spermatozoa was counted by a Thoma cytometer (Hirshmann Laborgerate, Eberstadt, Germany). To investigate sperm motility of diploids ( $n = 4$ ) and triploids ( $n = 5$ ), 5  $\mu\text{l}$  of marine water was added to 1  $\mu\text{l}$  of the diluted sperm, and the motility time was measured under a  $\times 100$  light microscope (BX50; Olympus). The motility times were measured until 95% of spermatozoa stopped moving. The measurements of motility time were repeated three times.

The relative DNA content per sperm nucleus obtained from 10-month-old triploid grass puffers was measured by flow cytometry using the DNA-binding dye propidium iodide (PI). For PI staining, 5  $\mu\text{l}$  of either fresh blood or semen was diluted with 5 ml of 0.6% NaCl solution in a test tube. Then, 45 ml of 77% ice-cold ethanol was added to the tube and gently mixed. Fixed cells were rinsed with PBS three times, resuspended in 450  $\mu\text{l}$  PBS, incubated with RNaseA (final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 15 min, treated with PI (final concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and incubated for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Fluorescence intensities of PI-stained cells were measured with a flow cytometer (Epics Altra, Beckman-Coulter, Hialeah, FL) equipped

with a 488 nm argon laser. For internal standards, sperm and blood cells of normal diploid grass puffers were used to provide haploid ( $1n$ ) and diploid ( $2n$ ) values, respectively.

The sperms obtained from either triploid or diploid males were used to fertilize eggs from diploid females to assess their fertility. A single clutch of eggs from a diploid female were split into 14 groups, and these were fertilized with sperm from four diploid males and 10 triploid males. Independent fertilization tests were repeated twice using different females. After fertilization, the respective eggs were incubated at 20°C. The developmental rates of fertilized eggs were determined at 2 hpf (2-cell stage), 74 hpf (20-somite stage), and 280 hpf (hatching stage). Larvae were observed and photographed with a light microscope (SteREO Lumar. V12; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a digital camera (DP12; Olympus). Fertilization experiments were duplicated using eggs obtained from two different females.

Two-year-old diploid and triploid grass puffer females were used to assess the fertility of eggs. The eggs were collected from five diploid females and eight triploid females by hCG treatment as described previously. In order to calculate the number of eggs ovulated, the total number of eggs was estimated by egg mass weights using the number of eggs per 0.1 g. These eggs were fertilized with sperm from the same diploid male to assess their fertility. The respective fertilized eggs were incubated at 20°C. The diameters of fertilized eggs from five diploids (20-80 eggs per individual fish) and eight triploids (20-60 eggs per individual fish) were measured at 2 hpf by a profile projector (V-12; Nikon, Tokyo, Japan). Those from three diploids (ten eggs per individual fish) and three triploids (ten eggs per individual fish) were measured at 74 hpf by the same method. The developmental rates of fertilized eggs were determined at 2, 74, and 280 hpf. The fertilized eggs and larvae were photographed with a light microscope (SteREO Lumar. V12; Carl Zeiss) equipped with a

digital camera (DP12; Olympus).

### **Statistical Analysis**

All data are presented as the means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons test, was used to determine significant differences between three or more group means. In order to analyze data sets between two groups, Student's *t*-test was used.

## **Results**

### **Induction of Triploidy in Grass Puffer by Cold Shock Treatment**

The developmental rates of fertilized eggs after three different cold shock temperatures, the determination of triploidy, the induction rate of triploidy, and the long-term growth and survival of cold shock-treated embryos are summarized in Fig. 1. The hatching rates of the 0- and 3-°C cold-shocked groups were 0% and 0.4%, respectively. In the 5-°C cold-shocked group, the hatching rate was  $47 \pm 17\%$ , which were not significantly different with the control (Fig. 1a) ( $P > 0.05$ ). The chromosomal number of the 5-°C cold-shocked group was counted to determine whether triploidy was induced (Fig. 1b, c). Because the chromosomal number of diploids is 44 (Miyaki et al. 1995), the chromosomal number of triploids should be 66. The variation of chromosomal numbers in the 5-°C cold-shocked and control groups observed in this study is summarized in Fig. 1d. The chromosomal number of the control group ranged between 41 and 45, and 50% of individuals had 44 chromosomes (Fig. 1b, d). Thus, fish with 41 to 45 chromosomes were determined as being diploid. On the other hand, the chromosomal numbers in the 5-°C cold-shocked group ranged between 42 and 67, and 90% of them possessed 62 to 67 chromosomes. Thus, fish with 62 to 67 chromosomes were determined as being triploid (Fig. 1c, d). The total length and mortality within the 5-°C cold-shocked

group were not significantly different from the controls until 80 days after hatching (Fig. 1e, f) ( $P > 0.01$ ).

Representative micrographs of erythrocytes obtained from diploids and triploids are presented in Fig. 1g, h, respectively. As shown in Fig. 1i, the diameters of erythrocytes from triploids ( $n = 3$ ) were 1.54 times larger than those of diploids ( $n = 3$ ) ( $P < 0.01$ ). These results showed that triploidy could be clearly determined by measurement of the diameters of erythrocytes. Therefore, we used this method to determine ploidy for the rest of this study.

#### ***Gonadal Development of Triploid Grass Puffers***

To determine the fertility of triploids, the gonadal maturation profiles of diploids and triploids were examined by the GSI and histological observations in the first and second spawning seasons for 1- (1 yr) and 2-year-old (2 yrs) (Fig. 2). The GSI of triploids was significantly lower than that of diploids in both males and females during the experimental period ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2a). In triploid males, the GSI represented 38% and 42% of that of diploids at 1 yr and 2 yrs, respectively. While the GSI and gonadal size of triploid males was lower than that of diploids, the testes of diploids and triploids were similar in shape with a white color (Fig. 2b). In triploid females, the ovaries were small and remained immature at 1 year. However, at 2 years, the GSI exponentially increased and represented 58% of that of diploids (Fig. 2a). The external features of triploid ovaries were similar to those of diploids (Fig. 2b).

Histological observations revealed that spermatogenesis was completed in triploid testes as well as diploid testes at both 1 and 2 years (Fig. 2c-j). In addition, all diploid and triploid males observed in this experiment released sperm upon gentle abdominal pressure during the spawning period. In 1-year females, diploid ovaries consisted of perinucleolus oocytes and early vitellogenic oocytes (Fig. 2k, o), whereas oocytes of triploids were found to reach perinucleolar stage (Fig.

2l, p). In 2-year-old females, oocytes of diploids and triploids completed vitellogenesis, and oocytes with migratory nuclei were observed (Fig. 2m, n, q, r).

#### ***Plasma Steroid Hormone Levels in Triploid Grass Puffer***

Plasma levels of 11KT and E2 in both diploids and triploids were examined in the non-spawning season (19-month-old) and spawning season (2 years) by an EIA method (Fig. 3). In males, plasma levels of 11KT at 19 months were low and showed no significant differences between diploids and triploids ( $P > 0.01$ ) (Fig. 3a). However, the plasma levels of 11KT in 2-year-old triploid males exponentially increased as well as in diploid males (Fig. 3a). Plasma levels of E2 in both triploid males and females at 19-month-old age were significantly lower than those of diploids ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3b). However, at 2 years, plasma levels of E2 in triploid females were similar to those of diploids.

#### ***Fertility and Developmental Ability of Sperm Obtained from Triploid Grass Puffer***

Milt of 1-year diploid and triploid males were collected by gentle abdominal pressure. The colors of the milts were similar when 5  $\mu$ l of milt were dropped on a glass slide and observed under a light microscope (Fig. 4a). The shape of spermatozoa obtained from triploids (Fig. 4c) was similar to those obtained from diploids (Fig. 4b), whereas the major axis head lengths of spermatozoa obtained from triploids ( $2.26 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) were approximately 10% longer than those of spermatozoa obtained from diploids ( $2.07 \pm 0.02 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0.01$ ). The sperm concentration of triploids was significantly lower than that of diploids, representing 59% of that of diploids (Fig. 4d). Sperm motility times of diploids and triploids were  $81.5 \pm 7.4 \text{ s}$  ( $n = 4$ ) and  $92.0 \pm 7.7 \text{ s}$  ( $n = 5$ ), respectively ( $P > 0.05$ ). Relative fluorescence histograms for propidium iodide-stained sperm from diploids and triploids are summarized in Fig. 4e. The dominant peak of sperm obtained from triploid

corresponded to  $1.5n$  as determined from sperm and blood cells of diploid individuals. Sperm obtained from triploid males could fertilize eggs, and the resulting fertilized eggs developed until 74 hpf (20-somite stage) equally as well as eggs sired by sperm obtained from diploid males. However, the fertilized eggs using sperm obtained from triploids barely hatched (2.2%), and no fry survived longer than 72 h after hatching (Fig. 4f). The fry sired by triploid males had morphological defects such as small heads and eyeballs (Fig. 4h), whereas siblings sired by diploid males hatched and grew normally (Fig. 4g).

#### ***Fecundity, Egg Diameter, Fertility, and Developmental Ability of Eggs Obtained from Triploid Grass Puffers***

By ovary biopsy using a catheter method, eight out of ten triploid females (2 years) were confirmed to possess fully grown oocytes with a diameter of 650 to 800  $\mu\text{m}$ . Eggs were obtained from eight females by hCG treatment. The number of eggs ovulated by triploid females was fewer than that of diploid females, which represented 14% of that of diploids (Fig. 5a). At that time, the mean body weight of diploid females was  $67.0 \pm 4.4$  g, and that of triploid females was  $73.7 \pm 3.3$  g. Eggs obtained from triploids were fertilized with sperm obtained from diploid males (Fig. 5b, f, h, j). The developmental rate of fertilized eggs derived from triploid females at 2 hpf represented 20% of that of diploid females. At 74 hpf (20-somite stage) and 280 hpf (hatching stage), developmental rates decreased to  $4.6 \pm 2.1\%$  and  $0.7 \pm 0.5\%$ , which represented 6.3% and 1.2% of that of siblings derived from diploid females (Fig. 5b).

The diameter of fertilized eggs at the 2-cell stage obtained from triploid females (Fig. 5f) was inhomogeneous and showed a broad distribution (0.8-1.2 mm) compared to that obtained from diploids (0.85-1.05 mm) (Fig. 5e). The mean diameter of fertilized eggs at the two-cell stage obtained from triploid females was  $1.03 \pm 0.8$  mm and larger than that of fertilized eggs

obtained from diploid females ( $0.95 \pm 0.03$  mm) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5c). In addition, the mean diameter of 20-somite stage eggs obtained from triploid females at 74 hpf was  $1.06 \pm 0.01$  mm and showed significant differences with those from diploid females ( $1.01 \pm 0.01$  mm) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5d, g, h). In total, four hatchlings were observed from about 600 fertilized eggs obtained from eight triploid females; however, none of them survived longer than 72 h after hatching (Fig. 5j). The fertilized eggs from diploid females hatched normally and developed to fully viable fry (Fig. 5i).

#### **Discussion**

In this study, we produced triploid grass puffers with high survival and triploidization rates by cold shock treatment, which was  $5^\circ\text{C}$  for 30 min starting from 5 min after fertilization. Although the resulting triploid grass puffers produced small amounts of abnormal gametes, both in males and females, offspring produced using these gametes could not survive after hatching. These characteristics of triploid grass puffers, which are low fecundity and production of gametes without developmental abilities beyond larval stages, fulfill the requirement for surrogate recipients used for germ cell transplantation.

In previous studies with marine teleosts, such as the red sea-bream *Pagrus major* (Arakawa et al. 1987; Sugama et al. 1992), black sea-bream *Acanthopagrus schlegeli* (Arakawa et al. 1987), European sea-bass *Dicentrarchus labrax* (Felip et al. 1997), and turbot *Scophthalmus maximus* (Piferrer et al. 2000), the cold shock temperatures used for triploidization were 0 to  $3^\circ\text{C}$ , and in most cases chilled seawater preset by crushed ice and sea water was used for shocking the eggs. In this study, however, the hatching rate was extremely low when cold shock temperatures of  $0^\circ\text{C}$  and  $3^\circ\text{C}$  were applied to the fertilized eggs of grass puffers. We used a cold shock of  $5^\circ\text{C}$  and achieved both a high triploidization rate (90%) and a relatively high

hatching rate (80%). The spawning temperature of grass puffers is approximately 20°C, and thus, the difference between the optimal cold shock temperature in this study and the spawning temperature was 15°C. Interestingly, in tiger puffers, a high triploidization rate and hatching rate were achieved only when fertilized eggs were cold-shocked at 3°C; however, the hatching rate was extremely low at 0°C (data not shown). Since the spawning temperature of the tiger puffer is approximately 18°C, the difference between the optimal cold shock temperature and spawning temperature was also 15°C. These data suggest that the optimal cold shock temperature that can achieve high triploidization and hatching rates is strongly affected by the optimal spawning temperature of the target species. A similar tendency has also been observed in previous studies with marine species such as the European sea-bass (Felip et al. 1997) and turbot (Piferrer et al. 2000). As shown in this study, slight differences in cold shock temperatures have a strong effect on the survival of treated eggs. Therefore, it is desirable to use a water temperature control device that is able to adjust the sea water temperature used for cold shock treatment rather than to use sea water with crushed ice in order to obtain a high success rate.

In previous studies, triploid males of *Cypriniformes* (Ueno, 1985; Kawamura et al. 1999; Koedprang and Na-Nakorn, 2000), *Siluriformes* (Tiwarly et al. 2000), *Pleuronectiformes* (Purdom, 1972; Tabata et al. 1989), and *Perciformes* (Mogami et al. 1991; Wills et al. 2000) displayed testes similar to those of diploids, and reached sexual maturation but produced dilute, abnormal, and aneuploid sperm. In this study, we revealed that triploid males of the grass puffer, a member of *Tetradontiformes*, also possess the above-mentioned characteristics commonly observed in triploid males. Although previous studies reported that triploid males often produce sperm with two tails (Ueno, 1985; Mogami et al. 1991) or without a tail (Tabata et al. 1989), triploid males of the grass puffer produced sperm having normal

external morphology other than their head size, which was 1.1 times larger in the major axis than sperm of diploids. Similar results were also observed in rainbow trout, *O. mykiss* (Carrasco et al. 1998) and Atlantic cod *Gadus morhua* (Feindel et al. 2010).

In this study, we found that triploid grass puffers showed normal plasma levels of 11KT when compared with diploids. Together with the fact that triploid males could produce motile sperm, this suggested that the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is at least partially functional even in triploid grass puffer males. This was also suggested by studies with masu salmon *O. masou* (Nakamura et al. 1993) and the blue tilapia *Oreochromis aureus* (Mol et al. 1994) and Indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Tiwarly et al. 2000). This is a desirable characteristic as a recipient used for germ cell transplantation because the recipients have to support donor-derived spermatogenesis and spermiogenesis after spermatogonial transplantation.

The plasma levels of E2 in diploid males at 19 months were significantly higher than those of triploid males ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3b). It has been reported that E2 acts on multiplication of spermatogonia in testes (Miura et al. 1999) and this might be a reason for the high plasma E2 levels of diploid males. In 2-year triploid grass puffer females, the plasma levels of E2 were similar to those of diploids. In addition, vitellogenesis occurred in synchrony with the increase of GSI, and finally mature eggs were produced. Although the number of eggs ovulated from triploids represented 14% of that of diploids, we observed ovulation in all of the hCG-injected triploid females. In general, however, triploid females are known not to proceed with meiosis and exhibit low plasma levels of E2, even during spawning season (Felip et al. 2001a; Tiwarly et al. 2004). The high plasma levels of E2 seem to be a main reason for full vitellogenesis observed in 2-year grass puffer females. Investigations into the differences between these two groups of triploid females would be useful to understand the mechanism of sterilization of triploid females.

Triploid females had not been able to produce offspring that survive beyond larval stages. Again, this is a useful characteristic for surrogates used for germ cell transplantation.

The final goal of this study was to achieve gametogenesis of tiger puffers using surrogated triploid grass puffer recipients. Therefore, the reproductive characteristics of triploid grass puffers revealed in this study made them desirable as recipients. In species having an XY sex-determining system, female recipients receiving XY spermatogonia produce functional Y eggs (Yoshizaki et al. 2010). The YY “super-male” can be obtained from Y eggs and can be used to generate all-male populations if crossed to normal homogametic females (the XX-type). This is very useful for spermatogonial transplantation in fish species in which males are more commercially valuable than females. In Japan, the tiger puffer is a desired species for all-male production, because the selling price of tiger puffer testis is about 10,000 Japanese yen per kilogram, which is three times higher than their fillet at local fish markets. Recently, by performing genome-wide linkage chromosomal analysis, Kikuchi et al. (2007) revealed that the sex of the tiger puffer is determined by a single region on linkage group 19 in an XX/XY system. Until now, masculinization of tiger puffers has been examined with methods such as a methyltestosterone treatment (Kakimoto et al. 1994) and an aromatase inhibitor treatment (Rashid et al. 2007); however, there is no report on the production of Y eggs in tiger puffers. Therefore, towards all-male seed production in tiger puffers, a spermatogonial transplantation technique can be a powerful tool for the production of YY “super-males”, and the triploidization method of grass puffer established in this study could play an important role to produce sterilized grass puffer recipients that can produce only donor-derived tiger puffer seeds.

## References

- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, MD., Roach, J., Oh, T., Ho, I.Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S.F., Clark, M.S., Edwards, Y.J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S.V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y.H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., and Brenner, S. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301-1310.
- Arakawa, T., Takaya, M., Inoue, K., Takami, I., and Yamashita, K. (1987). An examination of the condition for triploid induction by cold shock in red and black sea breams. *Bull Nagasaki Pref Inst Fish* 13:25-30.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S. (1993). Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366:265-268.
- Carrasco, L.A.P., Doroshov, S., Penman, D.J., and Bromage, N. (1998). Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Reproduction and Fertility* 113:197-210.
- Chuda, H., Matsuyama, M., Ikeda, Y., and Matsuura, S. (1997). Development of the maturation- and ovulation-induction method in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by hormonal treatments. *Nippon Suisan Gakkaishi* 63:728-733.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., and Schier, A.F. (2002). Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:14919-14924.
- Feindel, N.J., Benfey, T.J., and Trippel, E.A. (2010). Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquacult Environ Interact* 1:47-55.
- Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., and Zanuy, S. (2001a). Comparison of the gonadal development and plasma levels of sex steroid hormones in diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J Exp Zool* 290:384-395.
- Felip, A., Zanny, S., Carrillo, M., Martinez, G., Ramos, J., and Piferrer, F. (1997). Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 152:287-298.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., and Piferrer, F. (2001b). Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111:175-195.
- Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., and Yoshizaki, G. (2011). Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fish Sci* 77:69-77.
- Hosoya, S., Kaneko, T., Suzuki, Y., and Hino, A. (2008). Individual variations in behavior and free cortisol responses to acute stress in tiger pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish Sci* 74:755-763.
- Kakimoto, Y., Aida, S., Arai, K., and Suzuki, R. (1994). Neuters occurred in methyltestosterone treated ocellated puffer *Takifugu rubripes*. *Fish Genet Breed Sci* 20:63-66.
- Kawamura, K., Ueda, T., Aoki, K., and Hosoya, K.



- (1999). Spermatozoa in triploids of the rosy bitterling *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *J Fish Biol* 55:420-432.
- Kikuchi, K., Kai, W., Hosokawa, A., Mizuno, N., Suetake, H., Asahina, K., and Suzuki, Y. (2007). The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* 175:2039-2042.
- Koedprang, W. and Na-Nakorn, U. (2000). Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. *Aquaculture* 190:211-221.
- Matsuyama, M., Chuda, H., Ikeda, Y., Tanaka, H., and Matsuura, S. (1997). Induction of ovarian maturation and ovulation in cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* by different hormonal treatments. *Suisanzoshoku* 40:67-73.
- Maxime, V. (2008). The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries* 9: 67-78.
- Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M.R., Todo, T., and Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17 $\beta$  stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 264:230-234.
- Miyaki, K. (1992). Biological study of hybrid pufferfishes of the genus *Takifugu*, *Tetraodontidae*. Ph.D. Thesis, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.
- Miyaki, K., Chuda, H., Watanabe, T., Mizuta, K., Tsukashima, Y., Yoshida, N., and Tabeta, O. (1998). Treatment of tiger puffer, *Takifugu rubripes*, eggs with tannic acid to eliminate their adhesiveness for seed production. *Suisanzoshoku* 46:97-100.
- Miyaki, K., Tabeta, O., and Kayano, H. (1995). Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fish Sci* 61:594-598.
- Miyaki, K., Tachihara, K., Ebisu, R., Tsukashima, Y., Matsumura, Y., Fujita, S., Hayashida, G., and Tabeta, O. (1992). Induction of ovarian maturation of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* by gonadotropic hormone injections. *Suisanzoshoku* 40:439-442.
- Mogami, Y., Miyaki, K., and Arakawa, T. (1991). Spermatozoa of triploid Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*. *Bull Nagasaki Pref Inst Fish* 17:47-49.
- Mol, K., Byamungu, N., Cuisset, B., Yaron, Z., Ofir, M., Melard, Ch., Castelli, M., and Kuhn, E.R. (1994). Hormonal profile of growing male and female diploids and triploids of the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in intensive culture. *Fish Physiol Biochem* 13:209-218.
- Murata, O. (1998). Studies on the breeding of cultivated marine fishes. *Bull Fish Lab Kinki Univ* 6:49-56.
- Nakamura, M., Tsuchiya, F., Iwahashi, M., and Nagahama, Y. (1993). Reproductive characteristics of precociously mature triploid male masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Zool Sci* 10:117-125.
- Ojima, Y., and Kurishita, A. (1980). A new method to increase the number of mitotic cells in the kidney tissue for fish chromosome studies. *Proc. Japan Acad* 56:610-615.
- Okutsu, T., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2008a). Identification of donor-derived germ cells and spermatozoa in xenogeneic recipient using species-specific primers against *vasa* gene in germ cell transplantation experiments. *Fish Genet Breed* 37:29-36.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., and

- Yoshizaki, G. (2007). Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317:1517.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). 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.
- Okutsu, T., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2008b). Spermatogonial transplantation in Fish: Production of trout offspring from salmon parents. *Fisheries for Global Welfare and Environment*. TERRAPUB, Tokyo, pp 209-219.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Alvarez-Blazquez, B., Sanchez, L., and Martinez, P. (2000). Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188:79-90.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguiere, J.C., Flajshans, M., Haffray, P., and Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125-156.
- Purdom, C.E. (1972). Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* 29:11-24.
- Rashid, H., Kitano, H., Lee, K.H., Nii, S., Shigematsu, T., Kadomura, K., Yamaguchi, A., and Matsuyama, M. (2007). Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sexual Development* 1:311-322.
- Sugama, K., Taniguchi, N., Seki, S., and Nabeshima, H. (1992). Survival, growth and gonadal development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck Schlegel): use of allozyme markers for ploidy and family identification. *Aquaculture Research* 23:149-159.
- Suzuki, R. (1963). Hybridization experiments in cyprinid fishes. IV. Reciprocal crosses between *Biwia zezera* and *Gnathopogon elongatus elongatus*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 29:655-657.
- Tabata, K., Gorie, S., and Kawamura, Y. (1989). Growth, survival and maturation in the induced triploid hirame *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 36:267-276.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004). Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430:629-630.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., and Ray, A.K. (2000). Gonadal development in triploid *Heteropneustes fossilis*. *J Fish Biol* 57:1343-1348.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R., and Ray, A.K. (2004). The biology of triploid fish. *Rev Fish Biology and Fisheries* 14:391-402.
- Ueno, K. (1985). Sterility and secondary sexual character of triploid *Gnathopogon elongatus caeruleus*. *Fish Genet Breed Sci* 10:37-41.
- Uno, Y. (1955). Spawning habit and early development of a puffer, *fugu* (*Torafugu niphobles*) (Jordan et Snyder). *J Tokyo Univ Fish* 41:169-183.
- Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 13:1429-1434.
- Wills, P.S., Sheehan, R.J., and Allen, S.K., Jr. (2000). Reduced reproductive capacity in diploid and triploid hybrid sunfish. *Trans Am Fish Soc* 129:30-40.

Wong, T.T., Saito, T., Crodian, J., and Collodi, P. (2011). Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biol Reprod* 84:1190-1197.

Yamaha, E., Murakami, M., Hada, K., Otani, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Sakao, S., Kimura, S., Sato, S., and Arai, K. (2003). Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica* 119:121-131.

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., and Takeuchi, Y. (2011). Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 6:55-61.

Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., and Takeuchi, Y. (2010). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim Reprod* 7:187-196.

## Figure Legends

**Fig. 1** Induction of triploid grass puffers using cold shock treatment. **a** Effect of cold shock temperature on the developmental rate of fertilized eggs at 2 hpf (two-cell stages) and 280 hpf (hatching stages). **b, c** Karyotypes of diploid and triploid grass puffers. The numbers of chromosomes were 44 and 66 in diploids (**b**) and triploids (**c**), respectively. Bars = 5  $\mu$ m. **d** Chromosomal numbers of controls and 5- $^{\circ}$ C cold-shocked grass puffers. **e, f** Comparison of total length and survival rate of controls and the 5- $^{\circ}$ C cold shock treatment group until 80 days after hatching. **g, h** Erythrocytes of diploid (**g**) and triploid (**h**) grass puffers. Bars = 10  $\mu$ m. **i** Erythrocyte diameters of diploid and triploid grass puffers. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate a significant difference in erythrocyte diameters between diploid and triploid grass puffers ( $P < 0.01$ )

**Fig. 2** Gonadal development of 1- and 2-year-old (1 yr and 2 yrs) diploid and triploid grass puffers in spawning season (May). **a** Gonadosomatic index (GSI) of diploid and triploid grass puffers. Data are represented as means  $\pm$  SEM ( $n = 7-15$ ). Different letters for either the male or female groups indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **b** External features of gonads of 1- and 2-year diploid and triploid grass puffers. In each photograph, the gonads of diploids are placed *above* and those of triploids are placed *below*. The posterior end of the gonads is to the left. **c-r** Transverse histological sections of testes (**c-j**) and ovaries (**k-r**) of grass puffers in spawning season. **c** One-year diploid male, **d** 1-year triploid male, **e** 2-year diploid male, **f** 2-year triploid male, **k** 1-year diploid female, **l** 1-year triploid female, **m** 2-year diploid female, and **n** 2-year triploid female. Images of **c-f** and **k-l** are shown at higher magnifications in **g-j** and **o-r**, respectively. SC spermatocytes, SZ spermatozoa, PO perinucleolus oocytes, VO vitellogenic oocytes. Bars = 10 mm (**b**),

200  $\mu$ m (**c-f** and **k-n**), 20  $\mu$ m (**g-j**), and 100  $\mu$ m (**o-r**)

**Fig. 3** Plasma steroid hormone levels of diploid and triploid grass puffers in non-spawning season (19-month-old) and spawning season (2 yrs). **a** Plasma 11-ketotestosterone levels in 19-month-old and 2-year grass puffers. **b** Plasma estradiol-17 $\beta$  levels in 19-month-old and 2-year grass puffers. Data are represented as means  $\pm$  SEM ( $n = 6-15$ ). Different letters for either the male or female groups indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). N.D. indicates values that were below the detection limits of the EIA assay

**Fig. 4** Fertility and developmental ability of sperm obtained from triploid grass puffer. **a** Milt of diploid and triploid grass puffers dropped on a glass slide. Triploid males produced whitish milt similar to that of diploids. **b, c** Sperm obtained from diploid (**b**) and triploid (**c**) grass puffers were smeared on a slide glass and stained with HE. Bars = 5  $\mu$ m. **d** Concentration of sperm obtained from diploid and triploid grass puffers. **e** Relative fluorescence histogram for propidium iodide-stained nuclei of sperm from diploid and blood cells. **f** Developmental rate of fertilized eggs using sperm obtained from diploid and triploid grass puffer males. In both cases, eggs obtained from the same diploid grass puffer females were used. **g, h** Hatched larvae produced using sperm obtained from diploid (**g**) and triploid (**h**) grass puffer males. Bars = 700  $\mu$ m. Data are represented as means  $\pm$  SEM. Asterisks indicate significant differences between two groups ( $P < 0.01$ )

**Fig. 5** Fecundity, egg diameter, fertility, and developmental ability of eggs obtained from triploid grass puffers. **a** Number of eggs ovulated by diploid and triploid grass puffer females. **b** Developmental rate of fertilized eggs obtained from diploid and triploid grass puffer females. In both cases, sperms obtained from the same diploid grass puffer males were used. **c** Diameter of fertilized eggs from diploid and triploid grass puffer

females at 2 hpf. **d** Diameter of fertilized eggs obtained from diploid and triploid females at 74 hpf. **e, f** Two-cell stage eggs (2 hpf) of diploid female × diploid male (**e**) and triploid female × diploid male (**f**). **g, h** Twenty-somite stage eggs (74 hpf) of diploid female × diploid male (**g**) and triploid female × diploid male (**h**). Only small-sized eggs indicated by *arrowheads* survived the 20-somite stage. **i, j** Hatched larvae obtained from fertilized eggs of diploid female × diploid male (**i**) and triploid female × diploid male (**j**). Data are represented as means ± SEM. *Asterisks* indicate significant differences between two groups ( $P < 0.01$ ). *Different letters* for the diameter of eggs indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). *Bars* = 400 μm

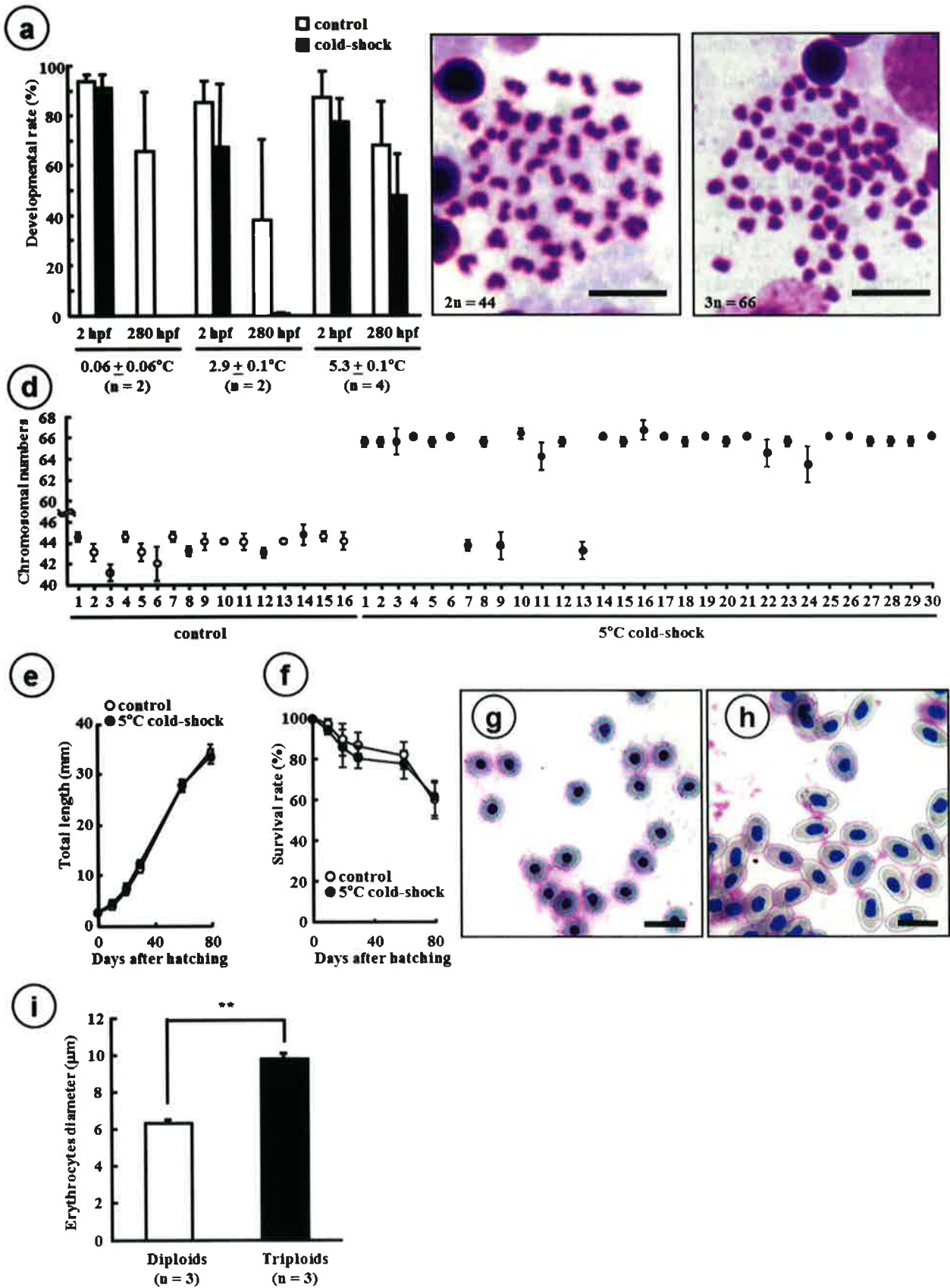


Fig. 1 Induction of triploid grass puffer using cold shock treatment.

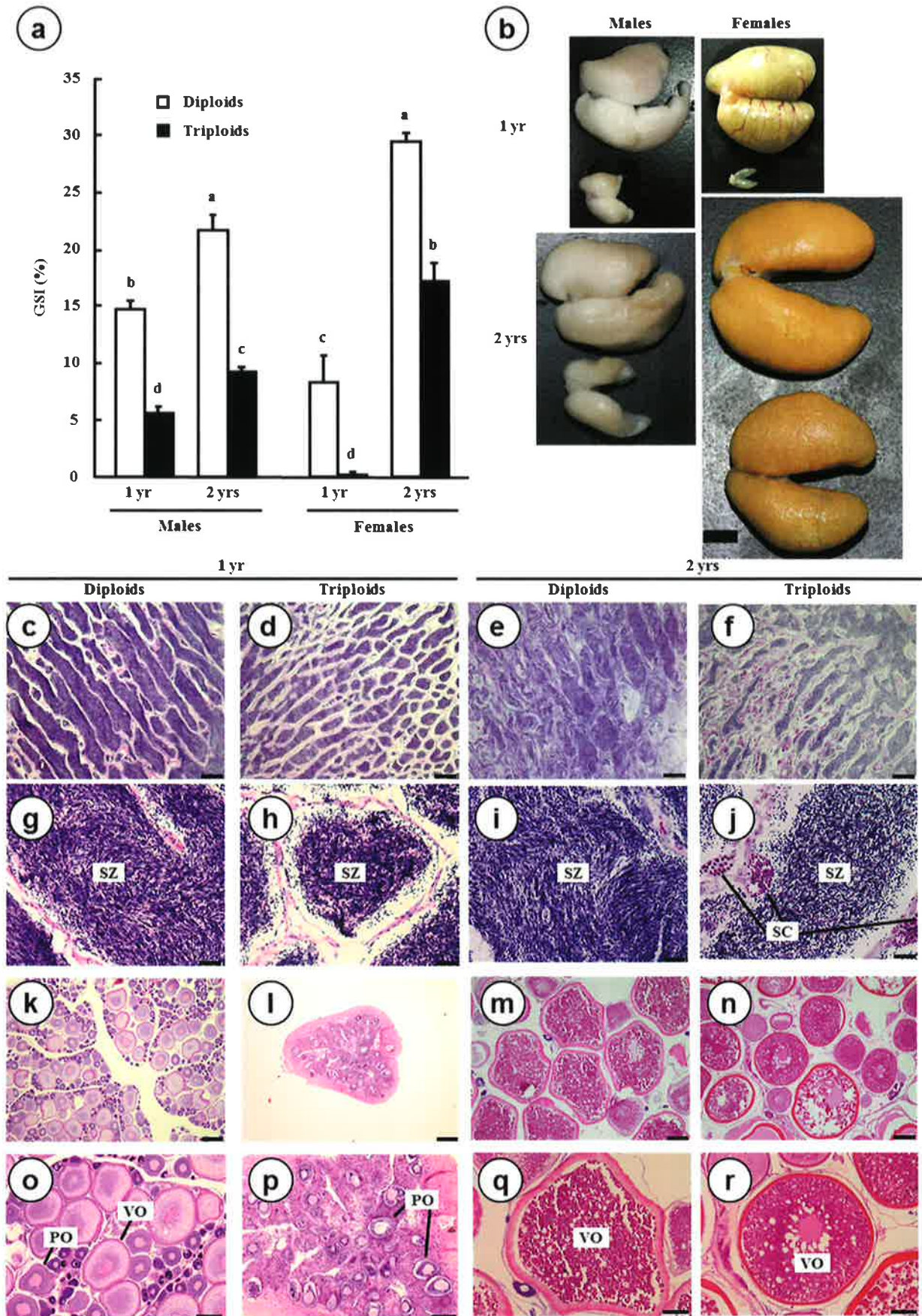


Figure 2. Gonadal development of 1- and 2-year-old (1 yr and 2 yrs) diploid and triploid grass puffer in spawning season (May).

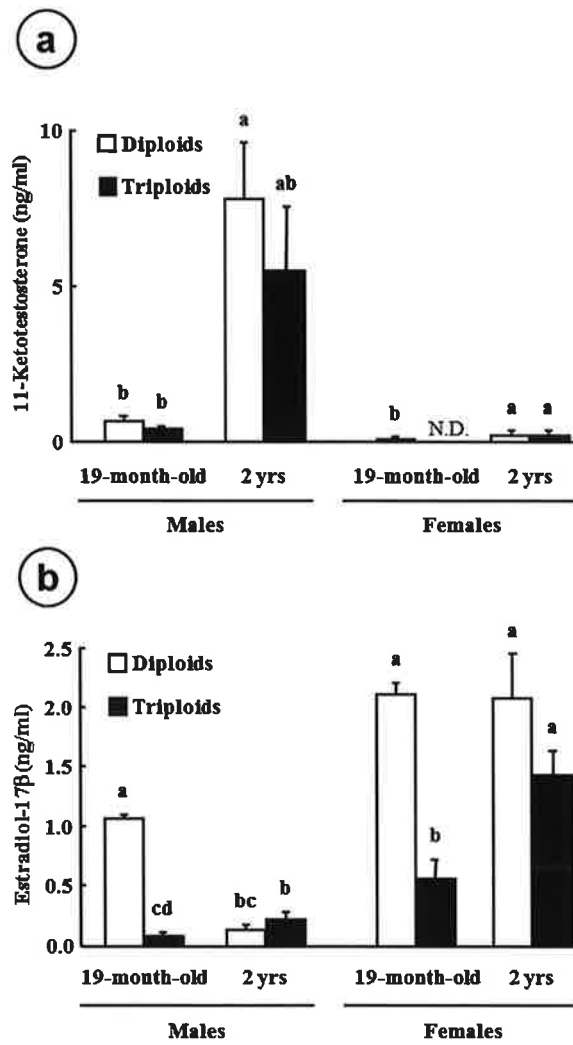


Figure 3. Plasma steroid hormone levels of diploid and triploid grass puffer in non-spawning season (19-month-old) and spawning season (2 yrs).



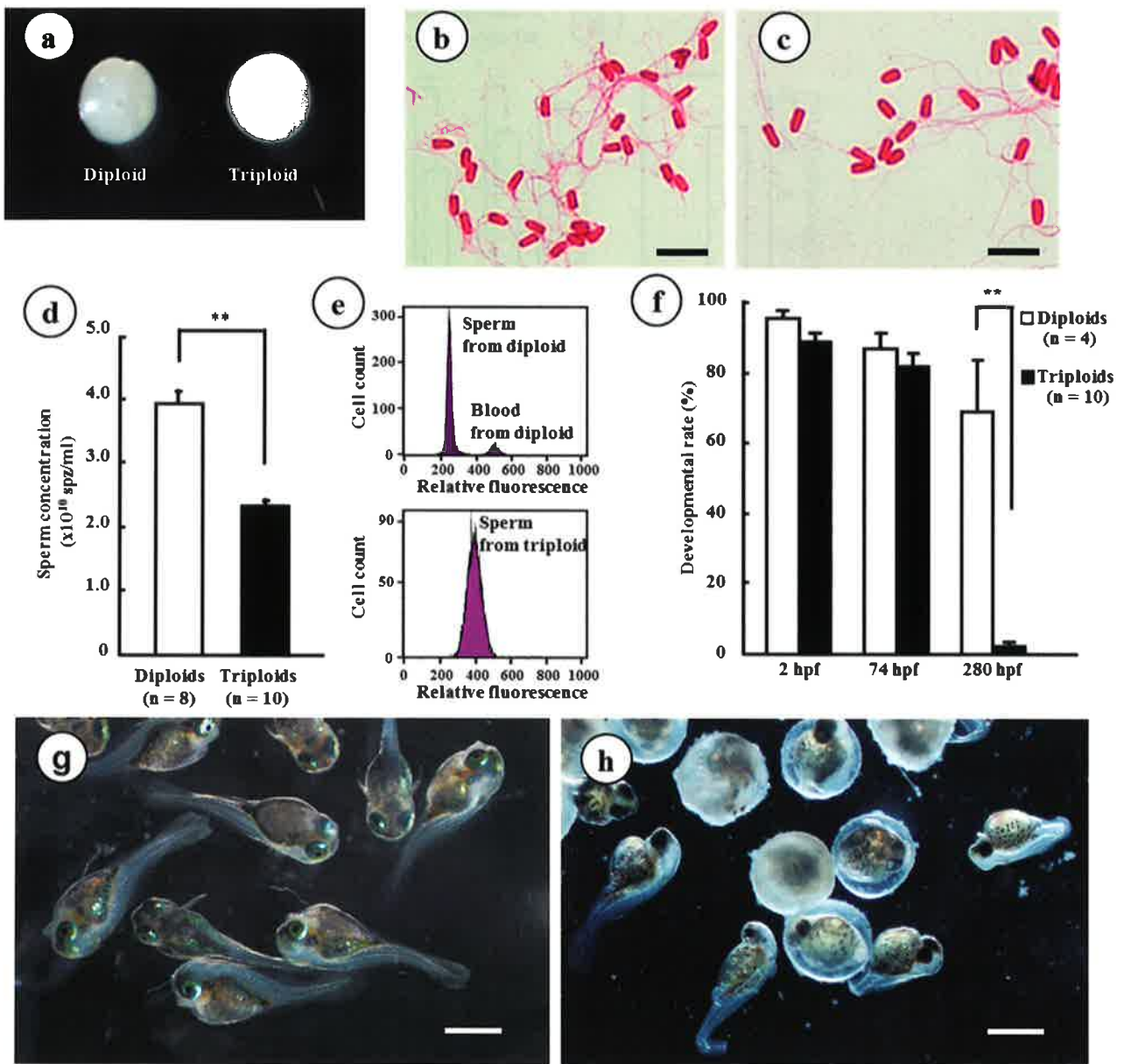


Figure 4. Fertility and developmental ability of sperm obtained from triploid grass puffer.

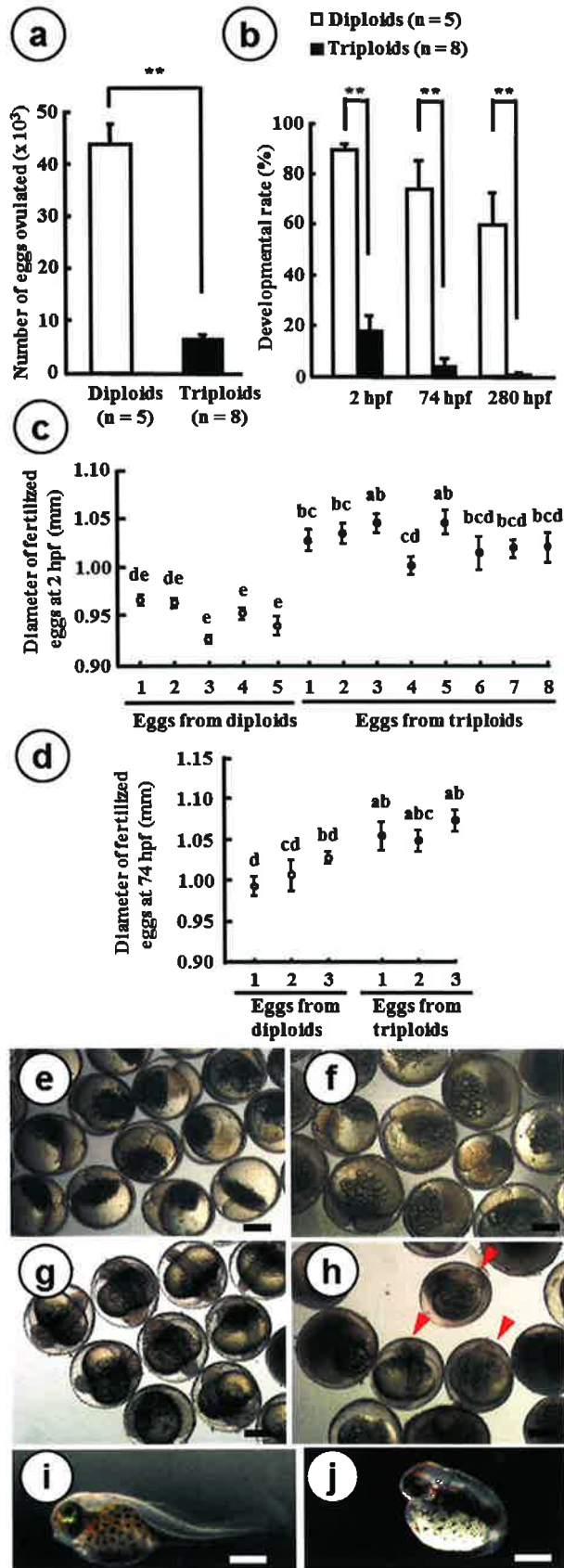


Figure 5. Fecundity, egg diameter, fertility, and developmental ability of eggs obtained from triploid grass puffer.

## 第2章

### クサフグ三倍体へのトラフグ精原細胞移植

#### 緒言

第1章では、クサフグの三倍体化技術を確立し、得られたクサフグ三倍体が雌雄ともに生残性の配偶子を生産しないことを明らかにした。その一方で、産卵期におけるクサフグ三倍体雌の血中エストラジオール-17 $\beta$  (E2)、雄の血中11-ケトテストステロン (11KT)の分泌量は、二倍体と有意な差がないことを明らかとした。クサフグ三倍体が、少量ながらも配偶子を形成することと血中ホルモンレベルが二倍体と同等であることから、クサフグ三倍体の視床下部-下垂体-生殖腺系は生殖細胞の分化および機能を支持するために十分な微小環境を備えていることが予想された。したがって、二倍体由来のトラフグ精原細胞をドナー細胞としてクサフグ三倍体を宿主として用いた場合、宿主の生殖腺内へ生着したドナー細胞が正常な配偶子へ分化する環境が整っていることが期待される。実際に、サケ科魚類においては、宿主に三倍体を用いることでドナー由来の正常な配偶子を得ることに成功している (Okutsu et al., 2007)。本研究で宿主とするクサフグ三倍体の配偶子には、ふ化期以降の発生能力がないことから、宿主から得られるドナー由来の配偶子から生産された次世代のみが正常に発育していくことが考えられる。このため、クサフグ三倍体は精原細胞移植の宿主として有効であることが示唆される。緒論にも述べたように、現在、養殖トラフグの価格の安定化と中国産トラフグとの差別化を図るため、トラフグ育種が産業上強く望まれている。クサフグ三倍体を宿主に用いてトラフグを生産させることで、トラフグの世代時間の短縮および飼育スペースの縮小が可能となり、トラフグ育種に必要なコストが大幅に削減できると期待される。Okutsuら (2006)がサケ科魚類において開発した精原細胞移植技術は、現在では分離浮遊卵産出型のスズキ目魚類で

あるニベ *Nibea mitsukurii* やマサバ *Scomber japonicus* へも展開され、移植技術が確立されている (Takeuchi et al., 2009; Yazawa et al., 2010; Higuchi et al., 2011)。以上のことから、第2章では、海産魚へ応用された精原細胞移植技術を用いてクサフグ三倍体を宿主としたトラフグ精原細胞移植を行い、宿主クサフグにドナー由来であるトラフグの機能的な配偶子を生産させる技術の開発を試みた。

精原細胞移植を行う際には、どの発生段階 (すなわち日齢)のクサフグ三倍体が宿主として適しているのか、その移植適期を決定することが重要である。ドナーである始原生殖細胞または精原細胞を宿主腹腔内へ移植するうえでの移植適期は、宿主自身の生殖腺が形成される以前であり、始原生殖細胞の移動期であることが明らかにされている (Takeuchi et al., 2003, 2009)。したがって、本章では、クサフグ三倍体の仔魚期における始原生殖細胞の移動期を組織学的観察により明らかにし、移植適期を推定した。また、推定した移植適期の宿主クサフグ三倍体に対してトラフグ精原細胞移植を行い、移植後の宿主生残率およびドナー細胞の宿主生殖腺内への生着率を調べることで移植適期を決定した。さらに、この移植適期に移植を行ったクサフグ三倍体を親魚まで養成し、得られた精子とトラフグ卵を交配させ次世代を作出した。その結果として、得られた次世代中にドナー由来トラフグ稚魚が出現するか否かを外部形態的特徴とDNAの Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)解析により判定した。以上の実験を行い、宿主クサフグ三倍体がドナー由来の機能的なトラフグ配偶子を生産したかを検証した。

## 材料と方法

### 精原細胞移植

1) クサフグ仔魚期における生殖腺発達過程の観察  
長崎県総合水産試験場において、自然水温で継代飼育されているクサフグの2歳親魚から搾出法により採取した精子と魚体重1kgあたり500 IUのヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(動物用ゴナトロピン5000, あすか製薬株式会社, 東京)注射により排卵させた卵を乾導法により受精させた(宮木ら, 1992)。受精30秒後に、0.05%タンニン酸海水に15秒間浸漬させ受精卵の粘着性を除去した(宮木ら, 1998)。その後、受精から5分後に、チラー(CL-80R, タイテック株式会社, 埼玉)を用いて5°Cに調整した海水に30分間浸漬した後、速やかに20°Cの飼育水槽に移し、ふ化させ飼育した。3、7、10および14日齢魚を経時的にサンプリングし、全長測定後ブアン固定液に浸漬し、4°Cにて一晚固定を行った。固定した仔魚をエタノール系列にて脱水後、レモゾール(和光純薬株式会社, 大阪)にて透徹を行い、パラフィン包埋装置(ディスペンシング・コンソールIV, サクラファインテックジャパン, 東京)を用いてパラフィン包埋した。パラフィンブロックは、回転式マイクロトーム(RM2135, LEICA, Germany)により5µmの厚さに切片化し、パラフィン伸展器(PO-2, 萱垣医理工業株式会社, 東京)を用いて伸展させ、MASコート済みスライドグラス(松浪硝子工業株式会社, 大阪)に貼付した。組織切片は100%エタノールからDWに段階的に移して水和し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。得られた組織切片を生物顕微鏡(BX51, オリンパス株式会社, 東京)で観察し、生殖腺の発達過程の組織像を撮影した。

### 2) ドナー精原細胞の調製

長崎県総合水産試験場で生産した人工種苗トラフグの12ヶ月齢雄個体をドナー(全長: 184.8±4.1 mm, 体重: 194.7±17.9 g, 生殖腺指数(GSI): 0.086±0.007%, n=5)として用いた。ドナートラフグを海水水中で麻酔を施した後、外科的に精巣を摘出し

た。摘出した精巣はLeibovitz's L-15 Medium(以下L-15)(Gibco Invitrogen Co., NY, USA)に移し、実体顕微鏡下で精巣間膜および精巣間膜に付随する血管を、ピンセットを用いて剥離した。その後、ウェッケルシザーズ(MB-41, 株式会社夏目製作所, 東京)を用いて細かく切断し、精巣破片を調製した。得られた精巣破片を5%ウシ胎児血清(Gibco Invitrogen Co.)、10%コラゲナーゼType 2(Worthington Biochemical Corp., NJ, USA)、0.05%DNase I(Roche Diagnostics, Germany)を含む0.25%トリプシン(Worthington Biochemical Corp.)/PBS(+)溶液中に移し、20°Cにおいて4時間の酵素処理を施した。酵素処理中、精巣破片の解離を促進するため、30分ごとにピペッティング処理を行った。得られた精巣細胞懸濁液を目開き100µmのナイロンメッシュで濾過し、不完全な解離により生じた細胞塊を除去した。濾過後の細胞懸濁液を冷却遠心(200×g, 5分間)に供し、懸濁液中の細胞を沈殿させた。これらの細胞を回収し、L-15培地中に再懸濁させ、精原細胞を含む精巣細胞懸濁液を得た。次に、PKH26(Sigma-Aldrich Inc., MO, USA)を用い、添付のプロトコールに従い、最終濃度10µMで染色反応を行った。染色を施した細胞懸濁液は、冷却遠心により沈殿させた後、L-15培地中に再懸濁し、移植を行うまでの間、氷上で保管した。

### 3) ドナー精原細胞の移植

細胞移植用ガラスピペットは、芯入硝子管(GD-1, 株式会社成茂科学器械研究所, 東京)をプーラー(PC-10, 株式会社成茂科学器械研究所)に供して作製した。作製したガラスピペットの先端の内径は、研磨器(EG-400, 株式会社成茂科学器械研究所)を用いて40~60µmに調整した。実体顕微鏡下に設置したマイクロマニピュレーター(MP-2R, 株式会社成茂科学器械研究所)およびマイクロインジェクター(IM-9B, 株式会社成茂科学器械研究所)を用いて4,000~6,000細胞を含む約40nlのドナー細胞懸濁液をガラスピペット内に吸引し、これを5°Cの低温処理により得られた5、6および7日齢の宿主ク

サフグ腹腔内へと顕微注射した。宿主魚は、5%寒天を塗布したシャーレ上に置き移植操作を行った。その後、移植操作を施した宿主魚および対照区として同一ロットの非移植魚を 20°C で飼育した。移植から 24 時間、2 週間および 4 週間経過した各宿主魚および非移植魚の生残率を測定した。この実験は、親魚の異なる宿主クサフグを用いて、3 回繰り返した。

#### 宿主生殖腺内におけるドナー精原細胞の追跡

##### 1) 蛍光観察

移植操作を施した宿主内でのドナー細胞は、PKH26 の赤色発光によってその挙動を追跡することが可能である。そこで、移植から 4 週間後に蛍光顕微鏡 (BX-51N-34FL, オリンパス株式会社) にて宿主生殖腺の観察を行った。宿主の頭部を切断後、28.6 μM DAPI を含むユフィックス (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京) に浸漬し、氷上で 5 分間固定した。固定した宿主を開腹し、ピンセットを用いて生殖腺を剥離した後、1 穴スライドガラス上に移して蛍光観察を行った。また、PKH26 陽性細胞が確認された生殖腺については、共焦点顕微鏡 (FV1000, オリンパス株式会社) を用いて PKH26 陽性細胞が有する細胞核の形態観察を行った。

##### 2) 排精宿主クサフグのフローサイトメーターによる倍数性の解析

移植から 11 ヶ月後に排精した宿主クサフグが三倍体であるか否かをフローサイトメーターによる血球の DNA 量解析から判定した。排精宿主クサフグの血液とあらかじめ染色体標本から判定したクサフグ三倍体および二倍体の血液を用いて DNA 量を測定した。血液 5 μl を 0.6% NaCl 溶液 5 ml で希釈し、その後 77% エタノール 45 ml を添加することで血球細胞を固定した。固定した血球細胞液を PBS で洗浄後、Cell cycle reagent (Millipore Corp., MA, USA) 200 μl 中で 30 分間反応させフローサイトメーター (Guava PCA-96, Millipore Corp.) にて DNA 量を測定した。

##### 3) Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) による宿主精液の解析

宿主クサフグ三倍体雄がドナー由来のトラフグ精子を生産したか否かを PCR-RFLP により判定した。成熟した宿主クサフグ三倍体雄、トラフグ、クサフグとクサフグ三倍体より採取した精液 1 μl から、PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra systems Inc., MN, USA) を用い、添付のプロトコルに従ってゲノム DNA を抽出した。PCR 反応は、プライマー (FW: 5'-GTGCTTGTGAGAGCCGATG-3', RV: 5'-CAGGAGCTCAGGGGACAT-3') (菊池ら, 未発表) を用い、前述の DNA 溶液 1 μl を鋳型として 1 μM の各プライマー、200 μM の dNTP および 0.5U の *Takara La Taq* (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を含む 1×*La Taq* buffer 中で、94°C で 3 分間熱変性を行った後、一連のサイクル (94°C 30 秒, 64°C 30 秒, 72°C 30 秒) を 35 回繰り返す、さらに最終伸張反応を 72°C で 3 分間行った。

得られた各遺伝子の増幅断片を鋳型として、*Mlu* I (タカラバイオ株式会社) 消化を行った。酵素消化は、20 μl の酵素消化反応液 (蒸留水 16 μl, 10×H Buffer 2 μl, *Mlu* I 1 μl, 鋳型 DNA 1 μl) 内で、37°C にて 1 時間行った。酵素処理後の溶液を 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、得られたバンディングパターンから、解析した精液 DNA 中にトラフグ DNA が含まれるか否かを検証した。

#### 交配試験

上述の PCR スクリーニングによって宿主クサフグ三倍体の精液ゲノム DNA 中にトラフグ型の遺伝子が検出された雄宿主 (宿主 No.11) から採取した精液をトラフグ卵に媒精した。対照区として同腹のトラフグ卵にトラフグ精子 (ポジティブコントロール) およびクサフグ精子 (ネガティブコントロール) をそれぞれ媒精した。受精 30 秒後に、0.05% タンニン酸海水に 15 秒間浸漬させ受精卵の粘着性を除去した (宮木ら, 1998)。

受精卵の発生率を測定するため、500 ml の紫外線殺菌海水中に各受精卵 150 粒を入れ、1 日 1 回飼

育水をほぼ全量置換し、ふ化まで18°Cのインキュベーター (MIR-253, 三洋電機株式会社, 東京)内で管理した。受精から4時間後 (受精率)、61時間 (胚体形成率)、168時間後 (ふ化率)にそれぞれ発生率を測定した。また、ふ化魚の成長および生残率を測定するために、各受精卵約19,000粒を100 Lアルテミアふ化槽に収容した後、18°Cの流水で卵管理し、ふ化させた。3日齢において、宿主クサフグ由来の次世代 (以下、F<sub>1</sub>世代とする)と対照区トラフグ (ポジティブコントロール)各2,000尾を500 Lパンライトに収容し、同一飼育条件下で30、60日齢の成長と生残率を比較した。

### F<sub>1</sub>世代稚魚における種判別解析

宿主クサフグ三倍体の次世代にトラフグが誕生したか否かを、外部形態およびDNA解析により検証した。

#### 1) 外部形態 (斑紋, 背鰭鰭条数)による次世代の解析

宿主クサフグ三倍体がトラフグ精子を生産していた場合、トラフグとの交配試験で得られる次世代中には、宿主自身であるクサフグ三倍体由来の精子とトラフグ卵の受精卵、およびドナーに由来するトラフグ精子とトラフグ卵の受精卵の2種類が得られることになる。通常クサフグ三倍体由来の精子とトラフグ卵の受精卵は正常に発生しないが、例外的に、宿主クサフグ三倍体が生残性のクサフグ精子を生産した場合、F<sub>1</sub>世代にはトラクサ雑種 (トラフグ卵×クサフグ精子)が誕生する。したがって、次世代に誕生すると考えられるトラフグとトラクサ雑種の種判別を行うために、外部形態的特徴である斑紋の観察および背鰭鰭条数の計数を行った。

交配試験で得られたトラフグ (ポジティブコントロール)、トラクサ雑種 (ネガティブコントロール)、宿主クサフグ由来のF<sub>1</sub>世代を138日齢でサンプリングし、外観観察および軟エックス線写真撮影に供した。軟エックス線写真は、定法に従い軟エックス線発生装置 (CMBW-2, ソフテックス株式

会社, 神奈川)を用いて30 kV、30 mAの条件で20秒間撮影を行い (小泉, 1979)、得られた画像を用いて背鰭鰭条数を計数した。

#### 2) PCR-RFLPによる次世代の解析

核ゲノムDNAを用いた種判別PCRを行い、F<sub>1</sub>世代の稚魚がトラフグであるか判定を行った。F<sub>1</sub>個体および対照区としてトラフグ、クサフグ、トラクサ雑種の筋肉からDNA抽出を行い、上述の「PCR-RFLPによる宿主精液の解析」と同様の方法でPCR-RFLP解析を行った。

### 統計処理

データは、平均値 ± 標準誤差 (SEM)で表している。3つの母集団間の比較する場合は一元配置分散分析 (one-way ANOVA)後、Tukey法により有意差を検定した。また、2つの母集団間についてはt検定を用いて有意差を検定した。

## 結 果

### クサフグ仔魚期における生殖腺発達過程の観察

本実験には、第1章で確立した条件にて作出した3、7、10および14日齢のクサフグ仔魚を用いた。各仔魚の全長は、それぞれ $2.58 \pm 0.05$  mm (n=20)、 $3.83 \pm 0.05$  mm (n=20)、 $4.81 \pm 0.06$  mm (n=20)、 $5.58 \pm 0.17$  mm (n=20)であった。3、7日齢では生殖腺原基は形成されておらず、始原生殖細胞が腹膜上に点在していることが観察された(図1A, B)。一方、10、14日齢の仔魚においては、生殖腺を構成する体細胞が始原生殖細胞をしっかりと取り囲み生殖腺原基を形成していることが観察された(図1C, D)。この結果、生殖腺原基が形成される腹腔内背側の領域に向かって始原生殖細胞が移動中であると考えられる7日齢以前を、移植適期と推定した。

### トラフグ精原細胞を移植した宿主クサフグの生残率

トラフグ精巢1 mgあたり約10,000~40,000細胞の精原細胞を含む生細胞が回収され、ほぼ全ての細胞がPKH26により強く標識された(図2A, B)。移植時の宿主クサフグの全長は、5日齢区 $3.10 \pm 0.04$  mm (n=327)、6日齢区 $3.12 \pm 0.07$  mm (n=152)および7日齢区 $3.83 \pm 0.05$  mm (n=64)であった(図2C)。移植直後に蛍光観察を行ったところ、腹腔内にPKH26陽性細胞が注入されている様子が観察された(図2D)。移植から24時間後の生残率は、5日齢区 $91.8 \pm 3.7\%$  (n=3)、6日齢区 $72.5 \pm 2.5\%$  (n=3)および7日齢区 $76.3 \pm 13.8\%$  (n=3)であり、5日齢区が高いものの各区において有意な差はなかった( $P > 0.05$ ) (図3)。移植から4週間後の生残率は、5日齢区 $56.2 \pm 5.6\%$  (n=3)、6日齢区 $38.4 \pm 8.4\%$  (n=3)、7日齢区 $42.5 \pm 17.5\%$  (n=3)および非移植区 $51.0 \pm 9.5\%$  (n=3)となり、各区間に有意な差は認められなかった( $P > 0.05$ ) (図3)。各移植区における移植から4週間後までの生残率と同期間の非移植区の生残率に有意差は認められなかったことから、移植操作が宿主クサフグの生残率に影響を及ぼさない

ことが明らかとなった。

### 宿主生殖腺内におけるドナー精原細胞の追跡

移植から4週間後において宿主の生殖腺を剥離して観察した結果、ドナー由来のPKH26陽性細胞が観察された(図4C, D)。宿主生殖腺内に、PKH26陽性細胞が観察された個体数は、5日齢区では15個体(15/15)、6日齢区では9個体(9/15)、7日齢区では0個体(0/5)であった(表1)。このうち、PKH26陽性細胞が確認された生殖腺を用いて、共焦点顕微鏡による縦断面の観察を行った(図5)。その結果、矢尻で示した宿主生殖腺内に取込まれたドナー由来のPKH26陽性細胞(図5B)は生殖細胞に特徴的な円形かつ大型の核を有することが明らかとなった(図5C, D)。PKH26像とDAPI像の2重蛍光観察の結果、ドナー由来の生殖細胞が宿主生殖腺内に確認できた個体数は、5日齢区では5個体(5/15)、6日齢区では0個体(0/15)であった(表1)。

### 宿主クサフグ雄の解析

#### 1) 宿主クサフグの倍数性の解析

移植から11ヵ月後、宿主クサフグ34尾中11尾(32%)から精液が得られた。これらの排精個体が三倍体であるかフローサイトメーターにより検証した結果、全ての個体が三倍体であることを確認した(図6)。

#### 2) 宿主クサフグ三倍体雄から得られた精液の解析

本実験で種判別に用いたプライマーで増幅される265bpの断片は、トラフグでは*Mlu*I認識配列により130bpと135bpの2つに切断されるが、クサフグでは切断されない(図7)。この種間多型を利用することで、トラフグとクサフグの種判別が可能であった。排精が確認された11尾の宿主クサフグ三倍体のうち宿主No.11(TL 95 mm, BW 20 g)の精液DNAを鋳型としたPCR-RFLP解析を行った結果、クサフグバンドに加えて、130bpと135bpのバンドを検出した(図7)。したがって、宿主クサフグが生産した精液からトラフグゲノムDNAが含まれることを確認した。

トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄 (宿主 No.11) を交配して得られた F<sub>1</sub> 世代の解析

### 1) 交配試験結果

宿主クサフグ三倍体雄 (宿主 No.11) より得た精液をトラフグ卵に媒精して得られた F<sub>1</sub> 世代の受精率は 79.4% であり、ふ化率は 61.2% と正常にふ化した (表 2)。受精卵約 19,000 粒からふ化した F<sub>1</sub> 世代は、約 12,000 尾であった。ふ化後、F<sub>1</sub> 世代は順調に生育して対照区であるトラフグとほぼ同様の成長を示した (図 8A)。60 日齢における全長は、F<sub>1</sub> 世代  $39.4 \pm 0.6$  mm、対照区トラフグ  $37.3 \pm 0.6$  mm となり有意な差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。また、60 日齢における生残率は F<sub>1</sub> 世代が 18% となったのに対し、対照区トラフグが 28% であった (図 8B)。

### 2) F<sub>1</sub> 個体の外部形態解析

本実験では、交配試験により得られた 138 日齢における F<sub>1</sub> 個体、トラフグ、トラクサ雑種を用いた。全長は、F<sub>1</sub> 個体  $101.5 \pm 16$  mm (n=20)、トラフグ  $110.7 \pm 21$  mm (n=20) およびトラクサ雑種  $101.0 \pm 11$  mm (n=8) であり、各個体に有意な差はなかった ( $P > 0.05$ )。観察した 20 尾全ての F<sub>1</sub> 個体には、トラフグ特有の連続した白く縁取られた黒紋があり、トラクサ雑種と容易に識別できた (図 9A)。また背鰭鰭条数 (軟条数) を計数した結果、トラフグ D16 (n=20)、トラクサ雑種 D15 (n=8) であったのに対し、全ての F<sub>1</sub> 個体は D16 (n=20) となり、トラフグと同数を示した (図 10)。これら、斑紋および背鰭鰭条数の解析から、F<sub>1</sub> 個体はトラフグの外部形態的特徴を示すことが明らかとなった。

### 3) F<sub>1</sub> 個体の DNA 解析

F<sub>1</sub> 個体 (n=12) の筋肉から抽出した DNA を鋳型とした PCR-RFLP 解析を行ったところ、解析した全ての F<sub>1</sub> 個体からトラフグゲノム DNA のみが検出された (図 11)。また、トラクサ雑種では、クサフグとトラフグの両方のバンドが検出された (図 11)。したがって、DNA 解析の結果からも F<sub>1</sub> 世代はトラフグであることが明らかとなった。宿主クサフグ三倍体から得られた F<sub>1</sub> 世代のトラフグは形態異

常、発育不全等の異常は認められず、通常のトラフグ同様に生育した (図 12)。

## 考 察

トラフグ精原細胞を移植した宿主クサフグ三倍体は 11 ヶ月後に 34 尾中 11 尾が排精し、さらにその中の 1 尾 (9%) の精液ゲノム DNA 中にドナー由来のトラフグゲノム DNA を検出した。また、この精子を用いて次世代にトラフグのみを誕生させることに成功した。この結果、宿主クサフグ三倍体雄は、11 ヶ月という短期間でドナー由来の機能的なトラフグ精子を生産することが示された。得られた次世代は、形態異常、発育不全等は認められず、通常のトラフグ同様に成長した。以上の結果より、フグ目魚類において精原細胞移植技術による代理親魚生産技術が応用可能であることが明らかとなり、トラフグ配偶子を生産する代理親魚としてクサフグ三倍体が有効であることが示された。

本研究では、宿主クサフグ三倍体への移植適期を組織学的な観察により 7 日齢以前と推定し、5、6 および 7 日齢 (全長約 3 mm) において移植を行った。宿主クサフグ三倍体へのトラフグ精原細胞移植を行ううえで、全長 3 mm 代の宿主の体表にガラスピペットを挿入しにくいという問題があった。しかし、宿主を載せる移植寒天台の濃度を従来の 2% (Takeuchi et al., 2009) から 5% へと改変し寒天の強度を強くしたところ、宿主へガラスピペットを挿入しやすくなり移植操作に有効であった。興味深いことに、組織学的な観察により移植適期ではないと判断した全長 4 mm 以上のクサフグ宿主の体表には、ガラスピペットを容易に挿入できた。クサフグでは、全長 4 mm 以降から鱗の表面に棘が出現し、表皮組織が硬化していくことが明らかになっている。クサフグでは、全長 3 mm から 4 mm の成長過程における表皮組織の硬化時期とガラスピペットの挿入のしやすさが関連していると考えられる。今後、組織学的に表皮組織の発達状況を調査していくことで、ガラスピペットが挿入しやすい



場所を特定することが可能になると期待される。クサフグのように、仔魚期に体表へのガラスピペットの挿入が困難な魚種の場合、移植適期と表皮組織の硬化時期とのタイミングが課題となるが、移植台の寒天濃度の検討や表皮組織の硬化状況を把握することによって改善できると考えられる。

移植から4週間後に宿主生殖腺内にドナー由来の生殖細胞が取込まれた個体は、5日齢移植区のみで確認され、さらに、この区の中で成熟に至った個体からドナー由来のトラフグ精子を得ることができた。以上の結果から、クサフグを宿主として用いる場合5日齢が移植適期であることが明らかとなった。また、5日齢移植区において移植から4週間後の生残率は56%であり、非移植魚の生残率と有意な差がなかった。さらに、このときの宿主クサフグの生残率は、ニベ移植適期における3週間後の宿主ニベ生残率(20.6%)に比べ高かった(Takeuchi et al., 2009)。これらのことより、クサフグは移植操作によるダメージを受けにくい魚種であると言え、この特徴は精原細胞移植の宿主として有益である。

本研究において、宿主クサフグ三倍体雄がドナー由来の機能的なトラフグ精子を生産することを確認した。また、ドナー由来のトラフグ精子は、11ヶ月というトラフグの成熟年齢の約1/2の期間で生産された。これまで、Takeuchiら(2004)はニジマス始原生殖細胞を移植した宿主ヤマメが1歳で機能的なニジマス精子を生産したことを報告している。通常ヤマメは1歳で排精することから、宿主ヤマメの成熟年齢に従ってドナー由来のニジマス精子が生産されたという解釈も成立する。ニジマスは通常2歳で成熟し排精するが、成熟年齢は生息環境によって著しく異なり、1歳魚で排精する個体も存在する(太田ら, 1965)。この事実を考慮するとTakeuchiら(2004)の実験では、宿主ヤマメの成熟年齢に従ってドナー由来のニジマス精子が生産されたとは断言できない。一方、これまでトラフグ雄の最短成熟年齢は2歳と言われており、11ヶ月という短期間で排精したという報告はない(中田ら, 1997)。本研究の結果は、ドナー由来の配偶子

(トラフグ精子)の生産が宿主(クサフグ)の成熟年齢に依存していることを明瞭に示している。したがって、代理親魚としてクサフグを利用することで、緒言で述べたようなトラフグ世代時間の短縮が可能となり、トラフグ育種の高速化につながることを期待される。

宿主クサフグ三倍体由来の精液をトラフグ卵に交配させた受精卵のふ化率は61%であり、これはトラフグ×トラフグの対照区に対して79%とわずかに低かった。この背景には、第1章で述べたように、宿主であるクサフグ三倍体の精子に受精能力があることが原因として考えられる。宿主から得られた精液には、PCR解析によってクサフグ三倍体由来の精子とドナー由来のトラフグ精子の両方が含まれることが確認された。このため、宿主由来の受精卵には、クサフグ三倍体由来精子との受精卵とドナー由来のトラフグとの受精卵が存在する。しかし、クサフグ三倍体由来精子との受精卵はふ化期以降発生しないため、宿主由来のふ化率は対照区より低くなったと考えられる。しかし、通常のトラフグ種苗生産時においても、ふ化率は18~76%とばらつきがあり、卵質の影響を大きく受けることが報告されている(中田ら, 1997)。したがって、今回得られたふ化率61%の受精卵も実用的なレベルで十分利用可能である。本実験において、移植から4週間後のドナー生殖細胞の生着数は多くても3個しか観察できなかった。しかし、ドナー由来の数万尾の次世代を得られたことから、これら宿主に取込まれた数個のドナー細胞がクサフグ三倍体の精巣内で精原幹細胞として正常に機能し、大量の精子へと分化したことを示している。一般に、精子形成過程において、視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンが放出され、これに反応し脳下垂体からは精巣を直接刺激する生殖腺刺激ホルモンが分泌される(小林・金子, 2002)。さらに生殖腺刺激ホルモンは精巣内のライディッヒ細胞を刺激し、アンドロゲンの分泌を促す(小林・金子, 2002)。したがって、本研究の結果は、宿主クサフグ三倍体において上記の種々のホルモンが正常に機能し、精巣内の体細胞、特に

セルトリ細胞およびライディッヒ細胞を正常に発達させたこと、さらに、クサフグ三倍体精巣内の体細胞から分泌されたアンドロゲンおよびエストロゲン等のホルモンがトラフグ生殖細胞へ正常に作用したことを示唆している。

交配試験で得られた次世代は、斑紋と背鰭鰭条数およびゲノムDNAからトラフグであることを明らかにした。今回の実験において、連続した白く縁取られた黒紋が明瞭な背鰭鰭条数D16であるトラフグをドナー魚および次世代作出用の親魚として使用した。このため、次世代には両親の表現型を受け継いだ連続した白く縁取られた黒紋が明瞭な背鰭鰭条数D16のトラフグのみが出現し、外部形態のみでトラフグとトラクサ雑種の判別が可能であった。斑紋等に現れる外観は両親の表現型を受け継ぐため、トラフグ特有の連続した白く縁取られた黒紋が明瞭ではない両親を交配に用いた場合、トラフグとトラクサ雑種を斑紋だけで判別することは困難である(宮木, 1998)。また、背鰭鰭条数はトラフグではD16~18、クサフグではD12~14と種差がある(藤田, 1988)。トラクサ雑種の背鰭鰭条数は、親魚として用いたトラフグおよびクサフグの背鰭鰭条数の中間の値を示すことが報告されている(宮木, 1998)。例えば、トラフグD18の雌とクサフグD14の雄を交配させると、次世代にトラクサ雑種D16が誕生する。この雑種は、背鰭鰭条数だけで判断するとトラフグになってしまう。PCRを用いた種判別が容易に実施できない場合には、背鰭鰭条数および斑紋からトラフグとトラクサ雑種を確実に判別できるように、使用するトラフグおよびクサフグを選択する必要がある。具体的には、連続した白く縁取られた黒紋が明瞭で、かつ背鰭鰭条数がD16であるトラフグをドナー魚および次世代作出用の親魚と使用するか、または背鰭鰭条数D12のクサフグを宿主として使用することで、次世代の種判別が外部形態のみで可能になると予想される。

本研究において、移植から4週間後にドナー由来の生殖細胞が宿主生殖腺内に生着した割合は33%(5/15)であり、さらにドナー由来のトラフグ精

子を生産した個体の割合は、排精した宿主個体数の9%(1/11)であった。今後、宿主にドナー由来の配偶子を効率的に生産させる技術開発が必要と考えられる。その方法として、ドナー細胞の濃縮が挙げられる。これまでニジマス精巣内において、A型精原細胞のみが宿主生殖腺内へ生着する能力を有していることが明らかにされている(Yano et al., 2008)。また、これら宿主生殖腺内へ生着能を有する細胞は精原幹細胞として機能することが示されている。そして、宿主生殖腺内に取り込まれたドナー由来の精原幹細胞は生涯にわたりドナー由来の配偶子へと分化していくことが期待され、産業上多いに役立つと期待される(Okutsu et al., 2006)。このように精原細胞移植では、A型精原細胞を大量に含むドナー細胞を宿主腹腔内へ移植することが、ドナー由来の配偶子を効率よく得るために必要である。本研究において、サケ科魚類で開発されたフローサイトメーターを用いたA型精原細胞を濃縮する技術がニベやクロマグロの海産魚へ適用できることが明らかとなっている(木瀬, 2009; Kise et al., 2012)。このA型精原細胞濃縮技術を応用し、トラフグ精原細胞を濃縮することが、ドナー由来の配偶子を生産する宿主の割合を向上させるために非常に有効であると考えられる。

本研究では、宿主クサフグ三倍体雌がトラフグ卵を生産するか否かについては確かめられていない。クサフグの雄は1年、雌は2年で成熟することが報告されており(Uno, 1955)、本研究において、1年間飼育した宿主クサフグ個体の中では、成熟した雌個体はなかった。これまでの研究において、精原細胞は雄宿主に移植すると精子へ、雌宿主へ移植すると卵へ分化することが明らかとされている(Yoshizaki et al., 2010)。したがって、本研究における宿主クサフグ三倍体雄がトラフグ精子を生産していることから、さらに1年間同一ロットの宿主クサフグを飼育することで、雌宿主が成熟に達しさえすればトラフグ卵が生産される可能性は高いと期待される。

引用文献

- 小林牧人・金子豊二.(2002). 内分泌. 「魚類生理学の基礎」(会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.128-154.
- Braat, A.K., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D. (1999). Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol.* 43:745-760.
- 中田久・松山倫也・池田義弘・松浦修平.(1997). トラフグ養成親魚からの採卵技法の開発. *日本水産学会誌* 63:728-733.
- Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., and Yoshizaki, G. (2011). Colonization, proliferation, and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fish Sci* 77:69-77.
- 木瀬和芳.(2009). フローサイトメーターを用いた魚類精原細胞濃縮技法の開発. 修士論文, 東京海洋大学大学院.
- Kise, K., Yoshikawa, H., Sato, M., Tashiro, M., Yazawa, R., Nagasaka, Y., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2012). Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type-A spermatogonia based on light-scattering properties. *Biol Reprod* DOI: 10.1095/biolreprod.111.093161.
- 小泉菊太.(1979). 「X線とソフテックス写真」, 共立出版株式会社, 東京, pp.47-65.
- 宮木廉夫.(1998). 交雑フグの初期形態. *長崎県水産試験場研究報告*, 24:27-68.
- 宮木廉夫・中田久・渡邊孝裕・水田浩二・塚島康生・吉田範秋・多部田修.(1998). タンニン酸処理によって粘着性を除去したトラフグ卵のふ化について. *水産増殖* 46:97-100.
- 宮木廉夫・立原一憲・蛭子亮制・塚島康生・松村靖治・藤田矢郎・林田豪介・多部田修.(1992). ホルモン処理によるトラフグ天然親魚の成熟促進. *水産増殖* 40:439-442.
- 藤田矢郎.(1988). トラフグ. 「日本産稚魚図鑑」(沖山宗雄編), 東海大学出版会, 東京, pp.981-983.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2007). Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317:1517.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). 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.
- 太田勲・山本喜一郎・高野和則・坂口任一.(1965). ニジマスの成熟に関する研究—II 1年魚の精巢の発達について. *日本水産学会誌* 31:597-605.
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., and Yoshizaki, G. (2009). Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii*. *Biol Reprod* 81:1055-1063.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod* 69:1142-1149.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., and Takeuchi, T. (2004). Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430:629-630.
- Uno, Y. (1955). Spawning habit and early development of a puffer, *fugu* (*Torafugu*) *niphobles* (Jordan et Snyder). *J Tokyo Univ Fish* 41:169-183.
- Yano, A., Suzuki, K., and Yoshizaki, G. (2008). 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.

Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N., and Yoshizaki, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. Biol Reprod 82: 896-904.

Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., and Takeuchi, Y. (2010). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. Anim Reprod 7:187-196.

## 図説明

図1. クサフグ仔魚期における生殖腺発達過程 (縦断面図).

5°Cの低温処理により得られた3、7、10および14日齢クサフグ仔魚の腹腔内背側の領域を拡大した組織切片像を示す。(A)3日齢クサフグ(全長2.6 mm)。(B)7日齢クサフグ(全長3.8 mm)。(C)10日齢クサフグ(全長4.8 mm)。(D)14日齢クサフグ(全長5.6 mm)。青矢印で始原生殖細胞を示す。スケールバーは全て10 μmである。3、7日齢では、始原生殖細胞が腹膜上に点在しており、生殖腺原基へ移動中であることが観察された。一方、10、14日齢では生殖腺を構成する体細胞によって、始原生殖細胞が取り囲まれ生殖腺原基を形成していた。g: 腸、p: 腹膜。

図2. トラフグ精巣懸濁液の宿主クサフグへの移植。

分散したトラフグ精巣由来のドナー細胞と宿主クサフグへの腹腔内移植の様子を示す。(A)1歳トラフグの精巣を分散し、PKH26で標識したドナー細胞の明視野像。(B)(A)の蛍光視野像。(C)マイクロピペットを用いて、ドナー細胞を5日齢宿主クサフグの腹腔内へ移植している様子。(D)ドナー細胞移植直後の宿主の蛍光視野像。腹腔内に移植されたドナー細胞が観察された。矢尻は、マイクロピペットを示す。スケールバーは30 μm(A, B)と1 mm(C, D)である。

図3. トラフグ精原細胞を移植した宿主クサフグの生残率。

5°Cの低温処理により得られた5、6および7日齢宿主クサフグ腹腔内へトラフグ精巣懸濁液を移植し、24時間、2週間および4週間経過した時点での各宿主の生残率を示す。○: 非移植魚の生残率(対照区)、△: 5日齢に移植した宿主魚の生残率、□: 6日齢に移植した宿主魚の生残率、●: 7日齢に移植した宿主魚の生残率を示す。5、6と7日齢宿主クサフグへ移植したときの生残率は、移

植から4週間後まで非移植魚の生残率と有意な差はなかった(one-way ANOVA,  $P > 0.05$ )。

図4. 移植から4週間後における宿主クサフグの生殖腺蛍光観察。

移植から4週間後において宿主の生殖腺を剥離して観察した結果を示す。(A)非移植区クサフグ生殖腺の明視野像。(B)(A)の蛍光視野像。(C)5日齢移植区宿主クサフグ生殖腺の明視野像。(D)(C)の蛍光視野像。矢尻は、PKH26陽性細胞を示す。スケールバーは全て10 μmである。

図5. 共焦点顕微鏡による宿主クサフグの生殖腺縦断面観察。

PKH26陽性細胞が確認された生殖腺を用いて、共焦点顕微鏡による縦断面の観察を行った結果を示す。(A)微分干渉観察像。(B)(A)の蛍光観察PKH26像。(C)(A)の蛍光観察DAPI像。(D)(B)と(C)を重ね合せた像。矢尻は、PKH26陽性の生殖細胞を示す。スケールバーは10 μmである。生殖腺内に取込まれたPKH26陽性のドナー細胞は、円形で大型の核を有することから生殖細胞であることを確認した。

図6. 排精宿主クサフグのフローサイトメーターによる倍数性の解析。

フローサイトメーターによる排精宿主クサフグの血液解析結果を示す。(A-K)排精宿主個体No.1~11の血液を用いて作成した細胞あたりのDNA量を示す。(L)クサフグ三倍体の血液を用いて作成した細胞あたりのDNA量を示す(ポジティブコントロール)。(M)クサフグ二倍体の血液を用いて作成した細胞あたりのDNA量を示す(ネガティブコントロール)。排精した宿主11個体全てにおいてDNA量のピークがクサフグ三倍体のDNA量のピークと一致することから、これらの宿主は全て三倍体であることが確認された。

図7. 宿主クサフグ三倍体から得られた精子のPCR-RFLPによるDNA解析。

宿主クサフグ三倍体から得られた精子のDNAを用いて、PCR-RFLPにより種判別解析を行った。レーン1：クサフグ精子ゲノムDNA(ネガティブコントロール)、2：トラフグ精子ゲノムDNA(ポジティブコントロール)、3：クサフグ三倍体精子ゲノムDNA(ネガティブコントロール)、4：宿主No.11精子ゲノムDNAを鋳型に用いたPCR産物の泳動像。レーン4(宿主No.11の精子)においてトラフグ型のバンディングパターンを示した。

図8. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の成長と生残率。

F<sub>1</sub>個体(トラフグ雌×宿主No.11雄)とトラフグ(対照区)を同一条件にて飼育し、3、30と60日齢における全長と生残率を比較した。(A)全長の比較。(B)生残率の比較。○：トラフグ(対照区)、●：F<sub>1</sub>個体。F<sub>1</sub>個体は、対照区トラフグと比較して成長や生残率に大きな差は認められず、正常に発育することが確認された。

図9. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の外部形態解析(斑紋)。

F<sub>1</sub>個体(トラフグ雌×宿主No.11雄)、トラフグ(ポジティブコントロール)およびトラクサ雑種(ネガティブコントロール)の外観写真を示す。(A)F<sub>1</sub>個体、(B)トラフグおよび(C)トラクサ雑種をそれぞれ示す。各写真の下段は斑紋付近の拡大である。F<sub>1</sub>個体にはトラフグ特有の連続した白く縁取られた大きな黒紋があり、トラクサ雑種と大きく異なることが観察された。

図10. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主

No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の外部形態解析(背鰭鰭条数)。

F<sub>1</sub>個体(トラフグ雌×宿主No.11雄)、トラフグ(ポジティブコントロール)およびトラクサ雑種(ネガティブコントロール)の背鰭の軟エックス線写真を示す。(A)F<sub>1</sub>個体、(B)トラフグおよび(C)トラクサ雑種の軟エックス線写真をそれぞれ示す。矢尻で鰭条を示し、その下に鰭条番号を付している。F<sub>1</sub>個体の鰭条数は、トラフグと同数のD16であった。

図11. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体のPCR-RFLPによるDNA解析。

PCR-RFLPにより、F<sub>1</sub>個体(トラフグ雌×宿主No.11雄)を種判別解析に供した。レーン1-12：F<sub>1</sub>個体筋肉ゲノムDNA、T：トラフグ筋肉ゲノムDNA(ポジティブコントロール)、G：クサフグ筋肉ゲノムDNA(ネガティブコントロール)、TG：トラクサ筋肉ゲノムDNA(ネガティブコントロール)それぞれを鋳型に用いたPCR産物の泳動像。F<sub>1</sub>個体全てからトラフグ型のゲノムDNAのみを検出した。

図12. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体と宿主クサフグ三倍体。

F<sub>1</sub>トラフグ(トラフグ雌×宿主No.11雄)の9ヶ月齢個体(全長262mm、体重434g)を示す(写真上)。宿主クサフグ三倍体雄(写真下)から得られたF<sub>1</sub>トラフグは正常な形態を示し、順調に生育した。スケールバーは10cmである。

表1. 移植から4週間後における宿主生殖腺へのドナー生殖細胞の取り込み個体数

移植 日齢	供試 魚数	ドナー細胞取り込み個体数		ドナー細胞 非取り込み 個体数
		生殖細胞	体細胞	
5	15	5 (33%)	10 (66%)	0
6	15	0	9 (60%)	6 (40%)
7	15	0	0	15 (100%)

表2. クサフグ三倍体宿主から得られた次世代の発生率

精子	卵	受精率 (%)	胚体形成率 (%)	ふ化率 (%)
宿主 No.11	トラフグ	79.4 (81/102)	65.3 (81/124)	61.2 (74/121)
対照区トラフグ	トラフグ	87.6 (92/105)	78.4 (105/134)	77.9 (102/131)
対照区クサフグ	トラフグ	85.6 (89/104)	70.5 (86/122)	68.5 (85/124)

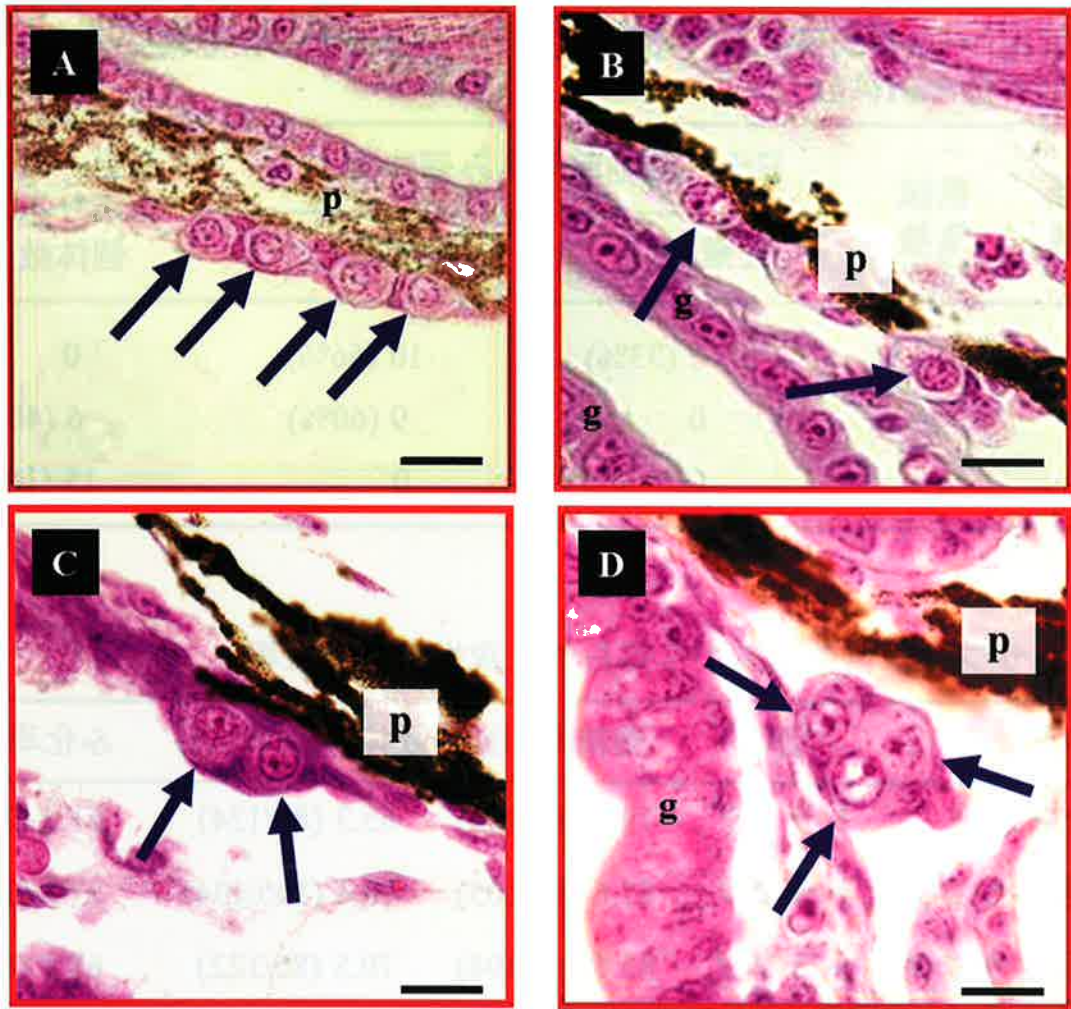


図1. クサフグ仔魚期における生殖腺発達過程（縦断面図）.



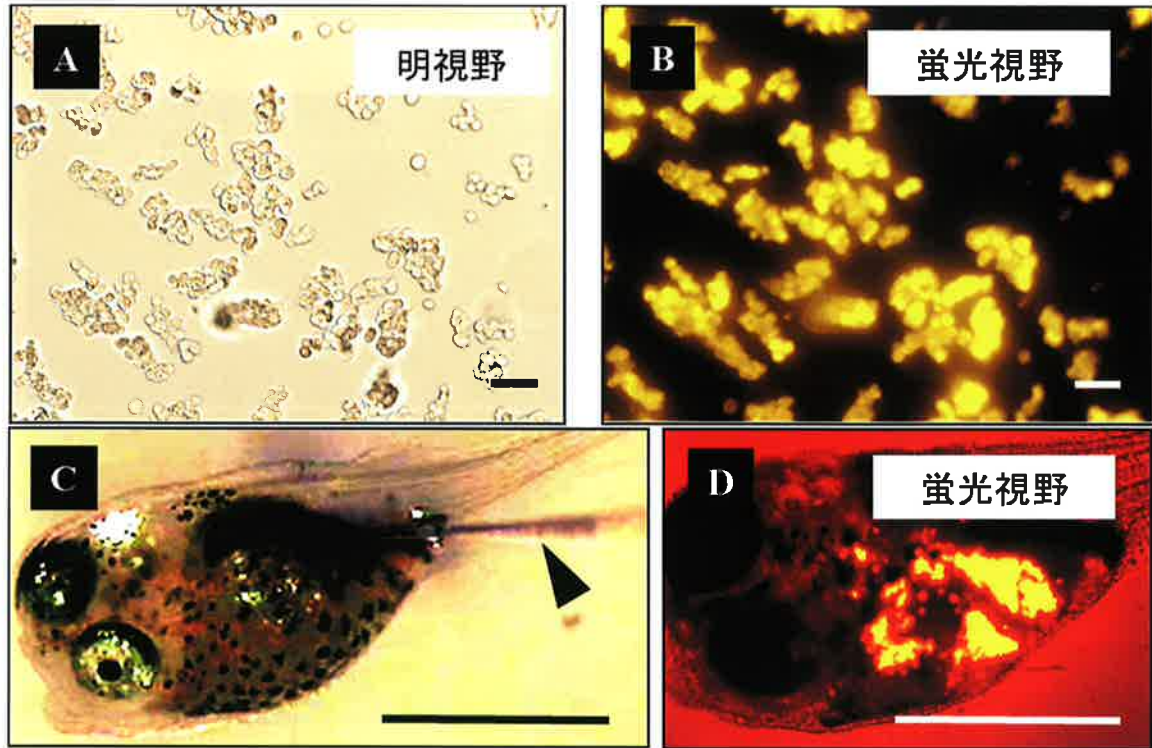


図2. トラフグ精巢懸濁液の宿主クサフグへの移植.

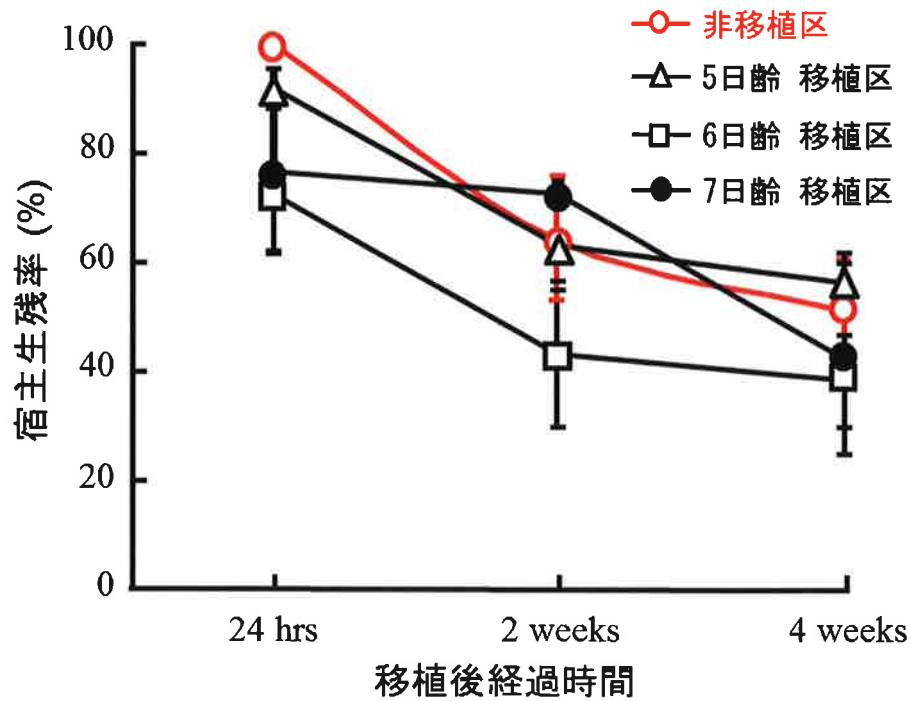


図3. トラフグ精原細胞を移植した宿主クサフグの生存率.

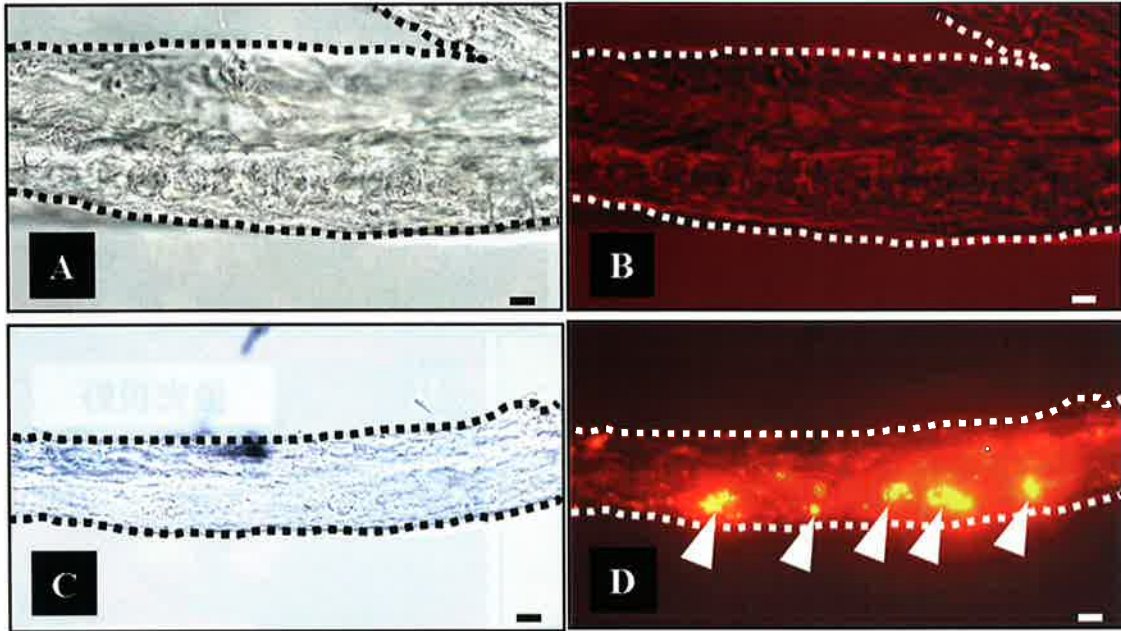


図4. 移植から4週間後における宿主クサフグの生殖腺蛍光観察.

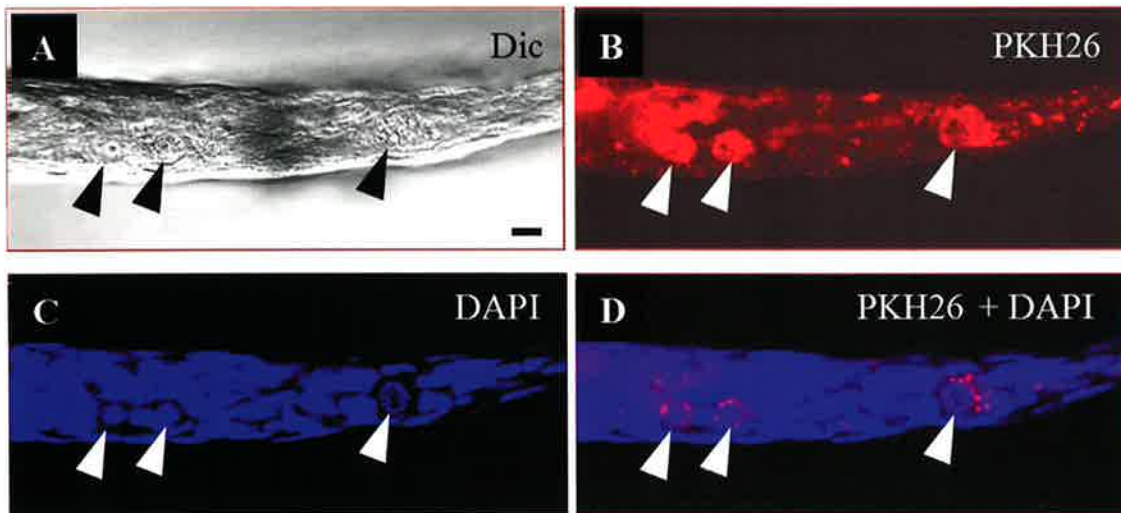


図5. 共焦点顕微鏡による宿主クサフグの生殖腺断面観察.

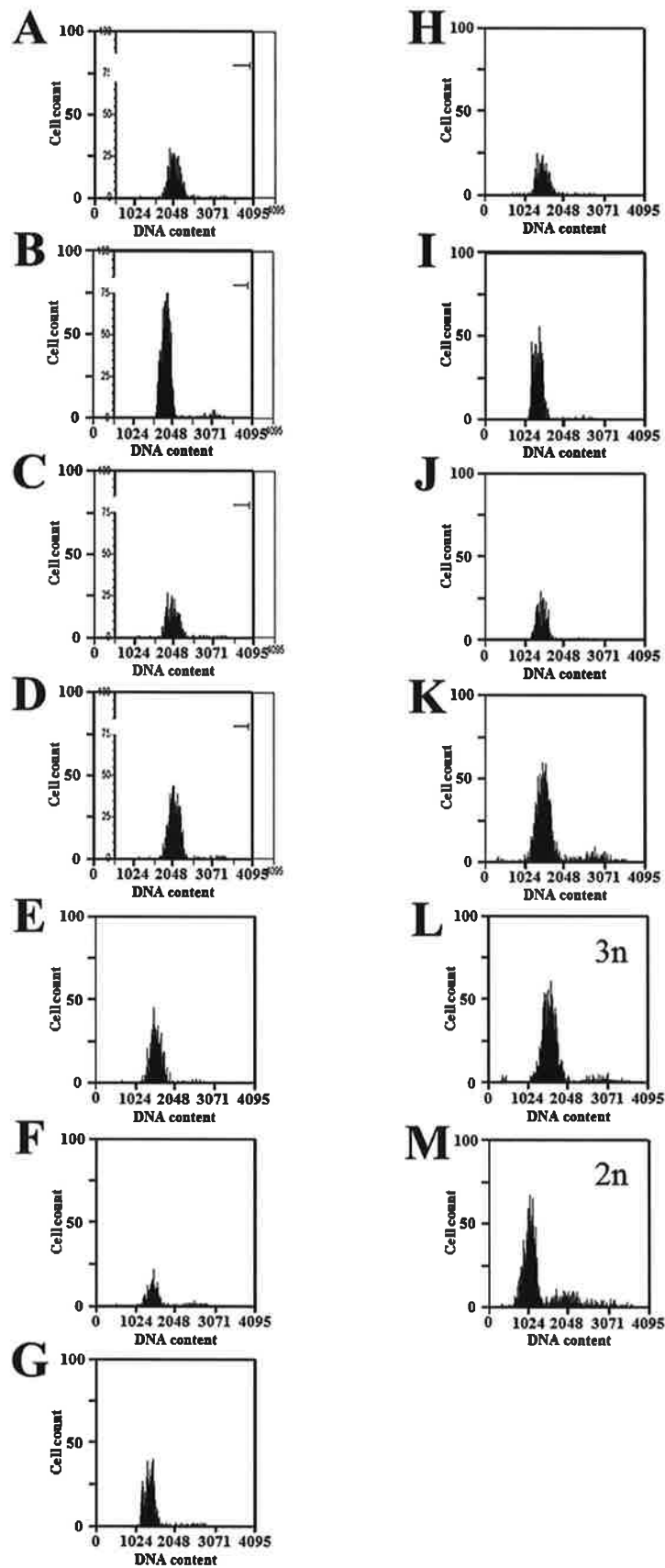


図6. 排精宿主クサフグのフローサトメーターによる倍数性の解析.



図7. 宿主クサフグ三倍体から得られた精子のPCR-RFLPによるDNA解析.

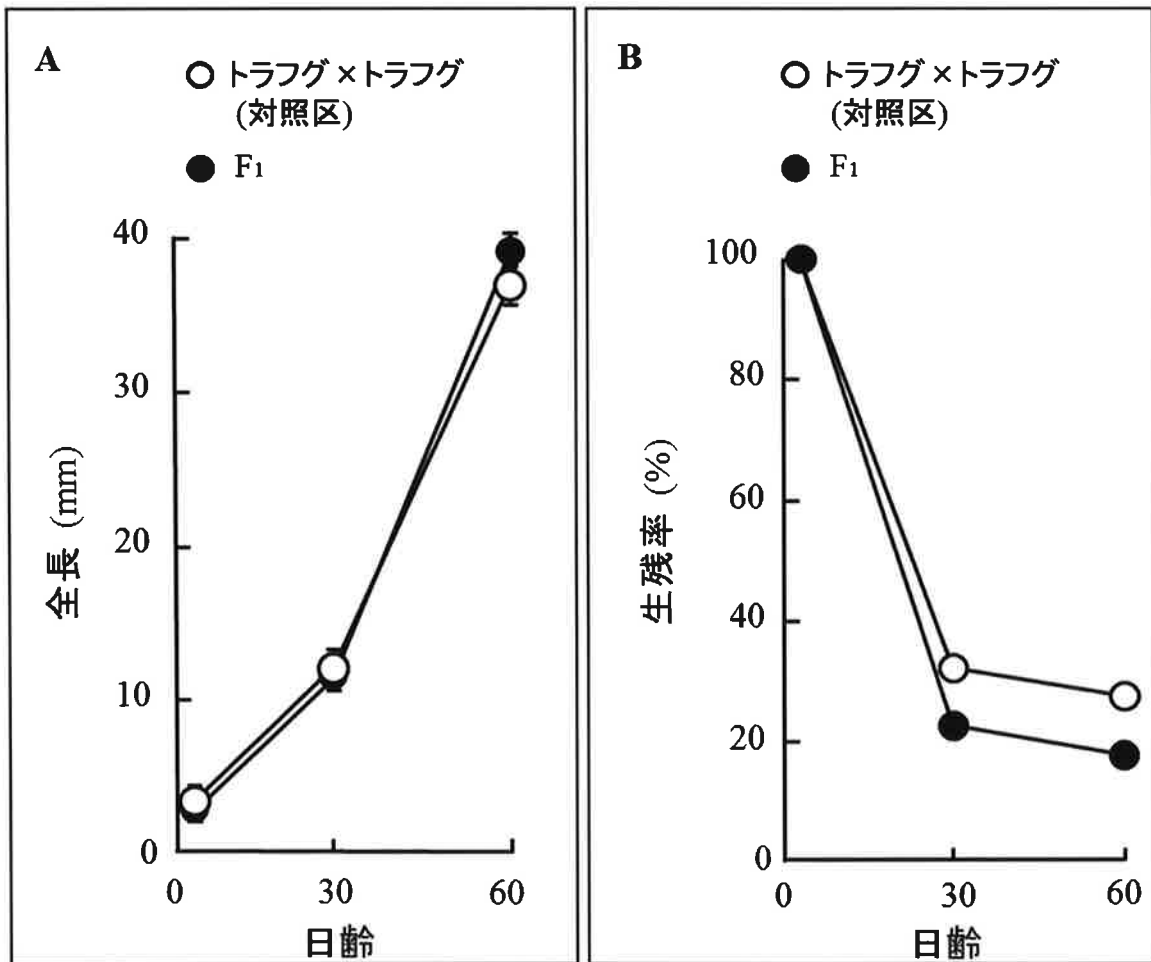


図8. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄(宿主No.11)を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の成長と生残率.

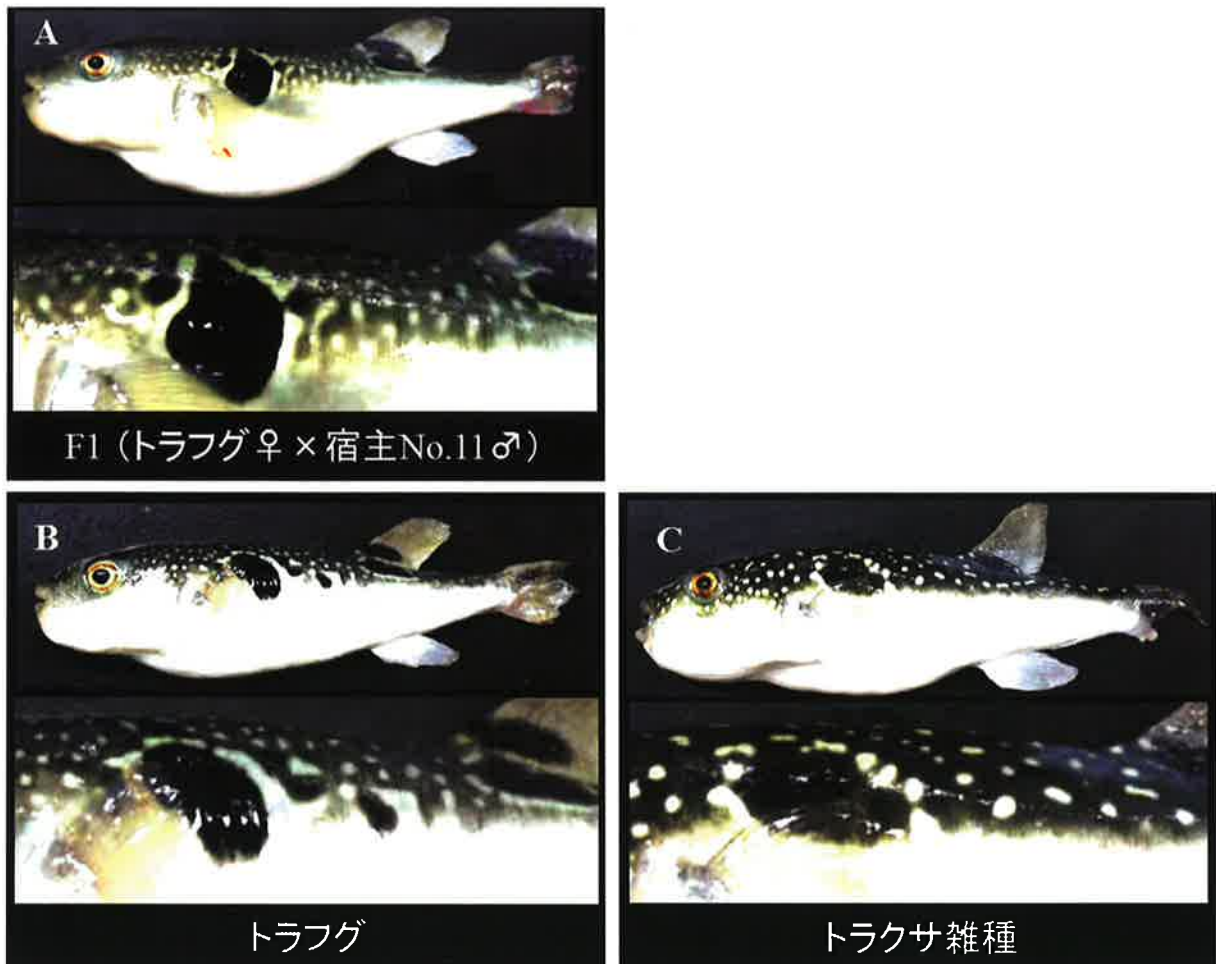


図9. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄（宿主No.11）を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の外部形態解析（斑紋）。

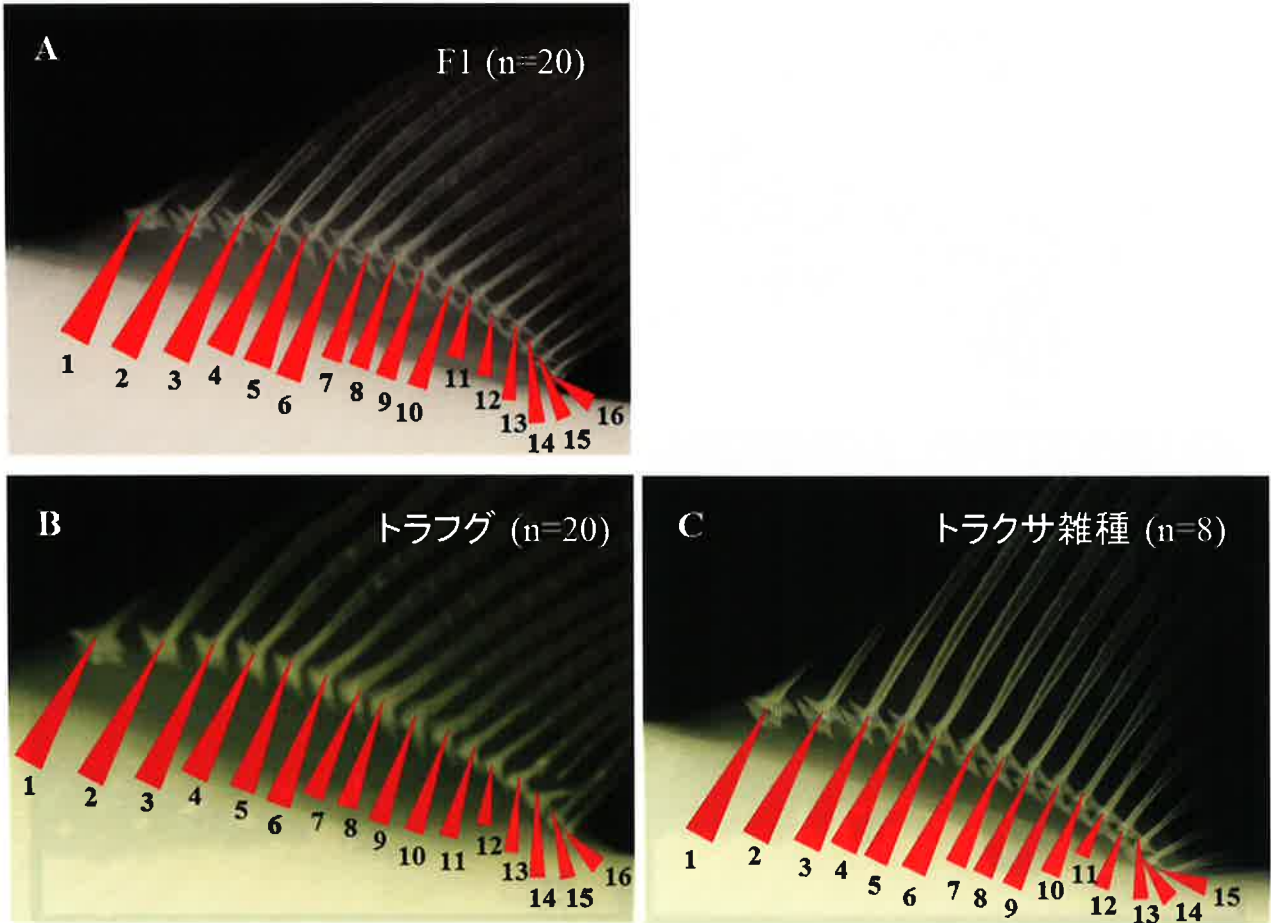


図10. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄（宿主No.11）を交配して得られたF<sub>1</sub>個体の外部形態解析（背鳍鳍条数）。

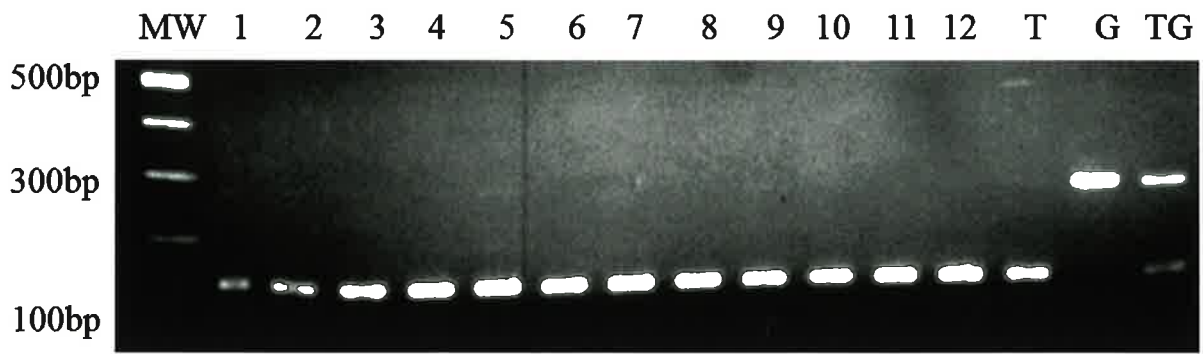


図11. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄（宿主No.11）を交配して得られたF<sub>1</sub>個体のPCR-RFLPによるDNA解析.



図12. トラフグ雌と宿主クサフグ三倍体雄（宿主No.11）を交配して得られたF<sub>1</sub>個体と宿主クサフグ三倍体.

## 総 括

第1章では、トラフグ精原細胞移植の宿主として用いるクサフグ三倍体を高率で作出するための最適条件を確立した。作出したクサフグ三倍体は、雄では1歳、雌では2歳において二倍体と比べて少量の配偶子形成を行った。しかし、これらの配偶子には、ふ化期以降の発生能力がないことが明らかとなった。以上のことから、クサフグ三倍体が精原細胞移植の宿主としての条件を満たしていることが明らかとなった。また、クサフグ受精卵に対して低温処理による三倍体作出技術を行う際には、産卵適水温より15°C低い処理水温を設定することで高三倍化率かつ高ふ化率が得られることが示された。この三倍体作出技術は、フグ目魚類の育種において得られた優良形質を保持する系統の流失を防止するために、優良系統を不妊化させる技術として利用できると期待される。

続いて第2章では、クサフグ三倍体を宿主に用いてトラフグ精原細胞移植を行い、ドナー由来配偶子を生産させることを試みた。その結果、トラフグ精原細胞を移植した宿主クサフグ三倍体雄は、宿主の成熟年齢である11ヶ月齢でドナー由来のトラフグ精子を生産した。さらに、得られた精子をトラフグ卵と受精させることで次世代にドナー由来のトラフグのみが得られることを確認した。したがって、フグ目魚類において精原細胞移植技術による代理親魚技術が応用可能であること、また、トラフグ配偶子を生産する代理親魚としてクサフグ三倍体が有効であること、が示された。今回、排精した宿主クサフグ三倍体のうちドナー由来トラフグ精子を生産できた個体の割合は9% (1/11) であり、今後、より効率良くドナー由来配偶子を生産する宿主を誕生させる技術開発が必要であると考えられる。Kiseら(2012)によって開発されたドナー細胞の濃縮技術は、遺伝子組み換え個体や種特異的な細胞表面抗原の抗体を作製する必要がなく、細胞自身の光学的特徴を利用して高純度で容易に、かつ短時間にA型精原細胞を濃縮させるため、多くの魚種に応用可能な技術であ

ると期待されている。この技術を用いて、ドナーであるトラフグA型精原細胞を濃縮することが、宿主クサフグ三倍体からドナー由来の配偶子を効率的に得るために有効であると考えられる。

トラフグの成熟期間は2~3年であり、品種作製に必要なF<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>を得るだけでも6~9年が必要になる。さらに、この間の飼育管理をしていくための、餌飼料、施設の管理費のコストが膨大になってくる。クサフグはトラフグの約1/2の期間で成熟に達し、最小でトラフグ成熟サイズの約1/150である13gで成熟する(濱崎, 未発表)。また、クサフグはトラフグのように噛み合いを起こすような攻撃性はなく、高密度で飼育することが可能である(Hosoya et al., 2008)。したがって、クサフグ代理親魚の利用によりトラフグ親魚維持に要するスペース、コスト、および労力の削減、さらに、世代時間の短縮によるトラフグ育種の高速化が可能となる。これまで、環境条件操作(光周期や水温)やホルモン処理により春期発動を制御できる魚種が知られている。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Bromage and Duston, 1987)、オヒョウ *Scophthalmus maximus* (Imsland et al., 1997)、ヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax* (Zanuy et al., 2001) および大西洋タラ *Gadus morhua* (Hansen et al., 2001) では、光周期を調節することで春期発動を人為的に制御することが可能である。さらに、ニジマスでは、通常年1回しか産卵しないが、光周期と水温を調節し1年に3回産卵させることが可能であることが報告されている(Bromage and Duston, 1987)。また、ホルモン処理による春期発動として、ニジマス(Goos et al., 1986)、ヨーロッパスズキ(Zanuy et al., 1999) およびマダイ *Pagrus major* (Kumakura et al., 2003) が報告されている。マダイでは生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の単独投与により、16ヶ月齢の幼魚に排卵させたことが報告されている(Kumakura et al., 2003)。この結果は、通常マダイの成熟年齢は2~3年であるため、成熟年齢を約半分に短縮することが可能であることを示している。このようにクサフグの春期発動を人為的に制御し、成熟年齢を



6ヶ月程度に短縮させることができれば、トラフグ育種の高速化が大幅に期待できる。

トラフグ種苗は、養殖対象用としてだけでなく、栽培漁業対象用としても重要である。トラフグは、天然資源の減少から2005年に資源回復計画が策定されて以来、日本海沿岸、有明海等において年間約130万尾の種苗が放流されている(九州・山口北西海域トラフグ資源回復計画)。しかし、現在のトラフグ種苗生産では、1尾の卵に1~2尾の精子を受精させており、種苗に遺伝的な偏りが生じることが懸念されている(谷口,2007)。また、国際連合食糧農業機関(FAO)は人工種苗生産において近交の影響を防止し、遺伝変異の低下をもたらさないために、親魚を継代しないという条件では親魚数50尾以上が必要であると、継代するという条件では親魚数500尾以上が必要であるという目安を提唱している(FAO/UNEMP,1981)。しかし、50尾または500尾以上のトラフグ親魚を維持管理し、種苗生産を行うことは飼育スペースやコストの面から実現困難である。そこで、複数個体由来のトラフグ精原細胞を混合した後に宿主へ移植すれば、1尾の宿主から、用いたドナー尾数と同等の遺伝的多様性を保持した配偶子を得られることが考えられる。実際にニジマスでは、複数系統のドナー細胞を混合し移植した結果、宿主生殖腺内に複数系統由来のドナー細胞の生着が確認され、1尾の宿主から複数系統由来の配偶子を生産できる可能性が示されている(佐藤ら,2011)。したがって、複数のトラフグドナー魚の利用によって、トラフグ人工種苗の遺伝的多様化が可能となり、放流用種苗における現在の課題も解決できると期待される。

トラフグ以外のフグ目魚類で食用とされている魚種として、コモンフグ *Takifugu poecilonotus*、ヒガンフグ *Takifugu pardalis*、ショウサイフグ *Takifugu snyderi*、ナシフグ *Takifugu vermicularis*、マフグ *Takifugu porphyrenus*、シロサバフグ *Lagocephalus wheeleri* およびイシガキフグ *Chilomycterus affinis* が挙げられる(阿部・多部田,1994)。これらの魚種は、現在まとまった漁獲がな

いためトラフグのような市場が存在しないが、今後、種苗生産技術を確立し養殖種として安定した生産が可能になれば、新たな市場を開拓できると考えられる。種苗生産を行うために必要な活力の高い親魚を入手することは、漁獲が少ないため困難である。しかし、クサフグを代理親魚とした技術を利用すれば、原理的には雄1尾が確保できれば十分であるため、これらの魚種の種苗生産も可能になると期待される。さらに、クサフグは上記フグ目魚類よりも成熟期間が短いため、優良形質探索を行うための代理親魚としても利用できる。

本研究室のニジマスを用いた先行研究では、雌宿主に移植された精原細胞は機能的な卵を生産することが報告されている(Okutsu et al.,2006)。したがって、精原細胞は性的両能性があり、宿主が雄なら精子へ、雌なら卵へと分化することが明らかとなっている。さらに、XX/XY型の性決定様式を持つニジマスでは、ドナー精原細胞の染色体を保持したY卵が生産され、Y卵と通常の精子を授精させ、次世代中にYY型の「超雄個体」を作出した。この「超雄個体(YY)」と通常の雌個体(XX)を交配させると、次世代は全て雄になるという全雄生産が可能となっている(Yoshizaki et al.,2010)。この技術は、雄が雌より商品価値が高い魚種については非常に有用な利点である。日本において、トラフグの精巢は、身の約3倍以上となる約10,000円/kg程度で取引されることから、トラフグの全雄生産技術が確立されれば高い経済効果をもたらすと予想される。これまでトラフグの雄化については、メチルテストステロン処理(Kakimoto et al.,1994)、アロマターゼインヒビター処理(Rashid et al.,2007)および低温飼育(服部ら,2010)等が試みられているが、未だトラフグ雄化の技術は不安定である。また、近年Kikuchiら(2007)によって、トラフグの性決定はXX/XY型の遺伝様式であることが明らかとされたが、雄から雌への性転換誘導によってY卵ができたという報告はない。上述のように、ホルモンまたは温度処理により、遺伝的雌(XX)を雄にしようとする、致死性のある猛毒な卵巣と精巢の両方(両性生殖腺)

を持つ個体が出現する可能性が大きく、実際に上述の雄化の報告にも両性生殖腺の出現頻度は高いと報告している。食中毒の防止を図る観点から食品衛生法第4条第2項に基づく厚生省環境衛生局長通知(平成5年2月3日衛乳第23号)により、両性生殖腺は有毒部位と位置づけられており販売が禁止されている。したがって、両性生殖腺ではない精巣にのみ高い商品価値があり、このためには精巣を持つ個体が遺伝的にも雄(XY)であることが重要である。精原細胞移植によりF1世代中に生産されるYY型超雄トラフグのF<sub>2</sub>世代は、前述のように全てXY染色体を持ち、通常の雄と遺伝的に何ら変わりがない雄が生産できる。したがって、現時点でトラフグ全雄生産の実現には、精原細胞移植技術により作出したY卵を用いる戦略が最も適していると考えられる。

以上のように、本研究で開発されたトラフグ精原細胞移植技術により、「世代時間の短縮によるトラフグ育種期間の短縮とコスト削減」、「栽培漁業用トラフグ種苗の遺伝的多様性の確保」、「新規のフグ目魚類の養殖による新しい市場の開拓」および「超雄トラフグの作出による全雄種苗生産」が期待され、水産業における経済波及効果は大きいと考えられる。

## 引用文献

- 阿部宗明・多部田修.(1994). フグ目. 「改訂 日本近海産フグ類の鑑別と毒性」(厚生省生活衛生局乳肉衛生課編), 中央法規出版株式会社, 東京, pp.3-43.
- Bromage, N. and Duston J. (1987). Circannual rhythms of reproduction and their entrainment by photoperiod in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen Comp Endocrinol 66:28.
- FAO/UNEMP. (1981). Conservation of the genetic resources of fish: Problems and recommendations. FAO Fish Tech Pap 217: 1-43.
- Goos H.J.T., de Leeuw, R., Cook, H., and van Oordt P.G.W.J. (1986). Gonadotropic hormone-releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of the immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*: the effect of testosterone. Gen Comp Endocrinol 64:80-84.
- Hansen, T., Karlsen O., Taranger, G.L., Hemre, G.I., Holm, J.C., and Kjesbu O.S. (2001). Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. Aquaculture 203:51-67.
- 服部亘宏・根来央・宮下盛・阿川泰夫・村田修・熊井英水・澤田好史.(2010). 人工ふ化トラフグの低水温飼育による雄性化. 平成22年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p31.
- Hosoya, S., Kaneko, T., Suzuki, Y., and Hino, A. (2008). Individual variations in behavior and free cortisol responses to acute stress in tiger pufferfish *Takifugu rubripes*. Fish Sci 74:755-763.
- Imsland, A.K., Folkvord, A., Jonsdottir, O.D.B., and Stefansson, S.O. (1997). Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 159:125-141.
- Kakimoto, Y., Aida, S., Arai, K., and Suzuki, R. (1994). Neuters occurred in methyltestosterone treated ocellated puffer *Takifugu rubripes*. Suisan Ikusyu 20:63-66.
- Kikuchi, K., Kai, W., Hosokawa, A., Mizuno, N., Suetake, H., Asahina, K., and Suzuki, Y. (2007). The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. Genetics 175:2039-2042.
- Kise, K., Yoshikawa, H., Sato, M., Tashiro, M., Yazawa, R., Nagasaka, Y., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. (2012). Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type-A spermatogonia based on light-scattering properties. Biol Reprod DOI: 10.1095/biolreprod.111.093161.
- Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K., and Kagawa, H. (2003). Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal-axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). Gen Comp Endocrinol 131:264-273.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. (2006). 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.
- Rashid, H., Kitano, H., Lee, K.H., Nii, S., Shigematsu, T., Kadomura, K., Yamaguchi, A., and Matsuyama, M. (2007). Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. Sexual Development 1:311-322.
- 佐藤菜菜・吉崎悟朗.(2011). 代理親魚技法を用い

た人工種苗の遺伝的多様性の創出. 平成22年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p159.

谷口順彦. (2007). 魚類集団の遺伝的多様性の保全と利用に関する研究. 日本水産学会誌 73:408-420.

Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., and Takeuchi, Y. (2010). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim Reprod* 7:187-196.

Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodriguez, L., Blazquez, M., Ramos, J., and Piferrer, F. (2001). Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 202:187-203.

Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., and Kah, O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 177:21-35.

## 謝 辞

本研究の遂行および論文の作成にあたり、終始丁寧なご指導、ご鞭撻、およびご校閲を賜りました東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科水族生理学研究室教授 吉崎悟朗博士に深甚なる謝意を表する。

本論分のご高閲を賜り、有益なご教示を頂きました東京海洋大学学長 岡本信明博士、東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科ゲノム科学研究室教授 廣野育生博士、同水族病理学研究室准教授 坂本崇博士、同水族栄養学研究室教授 佐藤秀一博士に厚く御礼を申し上げる。

研究遂行に際して適切なご助言、ご指導、およびご校閲を賜りました東京海洋大学先端科学技術研究センター准教授 竹内裕博士に厚く御礼を申し上げるとともに今後のご活躍をお祈り致します。また、研究遂行にあたり多大なるご協力を頂いた水族生理学研究室および館山ステーションの学生、卒業生、技官の皆様に対し心から感謝の意を表する。

本研究に対して適切なご助言、ご指導、およびご協力を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所助教 菊池潔博士に厚く御礼を申し上げる。

本研究の機会を与えて頂くとともに、ご指導を賜りました長崎県総合水産試験場種苗量産技術センター所長 藤井明彦博士、同センター科長 宮木廉夫博士に心から御礼を申し上げる。

最後に、本研究を円滑に遂行できるように支えていただきました家族に心から感謝の意を表し、また、多大な迷惑をお掛けしたことを深くお詫び申し上げます。