

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年9月28日(28.09.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/164391 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/075 (2010.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/012112
- (22) 国際出願日: 2017年3月24日(24.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-060914 2016年3月24日(24.03.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京海洋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 Tokyo (JP). 国立大学法人 筑波大学(UNIVERSITY OF TSUKUBA) [JP/JP]; 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者: 林 誠(HAYASHI Makoto); 〒3058577 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内 Ibaraki (JP). 岩崎 佳子(IWASAKI Yoshiko); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 林哲太郎(HAYASHI Tetsutaro); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 海老澤 昌史(EBISAWA Masashi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 笹川 洋平(SASAGAWA Yohei); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 芳村 美佳(YOSHIMURA Mika); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 二階堂 愛(NIKAIIDO Itoshi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 市田

健介(ICHIDA Kensuke); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 吉崎 悟朗(YOSHIZAKI Goro); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 永井 浩之, 外(NAGAI Hiroshi et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目6番6号 日本生命丸の内ビル 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MARKER FOR IDENTIFYING GERM CELLS HAVING ENGRAFTABILITY AT HOST GONAD

(54) 発明の名称: 宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカー

(57) Abstract: The present invention relates to a marker for identifying germ cells, comprising (I) a marker for identifying germ cells having engraftability at a host gonad and/or (II) a marker for identifying germ cells not having engraftability at a host gonad. The present invention provides a germ cell marker that can identify the presence or absence of engraftability at a host gonad in fish.

(57) 要約: 本発明は、(I)の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーおよび/または(I I)の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを含んでなる、生殖細胞識別マーカーに関する。本発明は、魚類の宿主生殖腺への生着能の有無を識別できる生殖細胞マーカーを提供する。



WO 2017/164391 A1

明 細 書

発明の名称：

宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカー

関連出願の参照

[0001] 本特許出願は、先に出願された日本国特許出願である特願2016-60914（出願日：2016年3月24日）に基づくものであって、その優先権の利益を主張するものであり、その開示内容全体を参照することによりここに組み込まれる。

発明の背景

[0002] 技術分野

本発明は、代理親魚技法に関し、特に、代理親魚技法において、移植する分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の有無を識別する生殖細胞識別マーカーに関する。また本発明は、本発明の生殖細胞識別マーカーを用いた、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法に関する。

[0003] 背景技術

欧米での健康志向の高まりや中国等の経済発展により、世界の食用水産物消費量は年々増加を続け、その結果、天然水産資源量の減少が問題となっている。特に、高級魚として需要の高いウナギおよびクロマグロなどは、乱獲による天然資源量の減少が著しく、絶滅が危惧される状態にまで至っている。そのため、水産資源量の増加を目的とした種苗生産および人工種苗（稚魚）放流が検討されている。一般的に、種苗生産では、近親交配や特定疾病の発症による全滅を避けるために、親魚となる個体の遺伝的多様性が必要とされ、従って、多数の親魚を育成する必要がある。しかしながら、魚種によっては、種苗生産は難しい。例えば、クロマグロでは親魚は体重100kg以上と大型であり、遊泳方法から広い飼育環境を必要とする。また、チョウザメでは精子や卵の成熟に長い年月を要する。人為催熟が技術的に難しい魚種や、1対1交配が難しい魚種もいることから、多数の親魚を人為的な管理下

で育成し、精子や卵を採取することは、コスト的および技術的に極めて難しい。

[0004] 魚類の種苗生産技術として、本発明者らは、宿主（レシピエント）魚類とは異なる異種の魚類（ドナー魚類）由来の生殖細胞を、孵化前後の宿主魚類個体の腹腔内へ移植することによって、生殖細胞を生殖細胞系列へ分化誘導することができることを見だし、異種の宿主魚類での分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導に成功している（例えば、特許文献 1 参照）。この技術は、代理親魚技法または借り腹養殖技法とも呼ばれ、親魚の飼育に問題の多い魚類の精子や卵を、飼育しやすい異種の宿主魚類によって生産し、交配することにより低コストで簡便な種苗生産を可能にする技術であるとして期待されている。

[0005] 特許文献 1 では、移植する生殖細胞として始原生殖細胞を用いている。具体的には、始原生殖細胞に対して特異的に発現する *v a s a* 遺伝子の調節領域に G F P（Green Fluorescent Protein：緑色蛍光タンパク質）遺伝子を導入した遺伝子組換えニジマスの孵化胚から得た生殖隆起組織の懸濁液を原料に、緑色蛍光を指標としたフローサイトメトリー解析により蛍光強度の強い細胞集団を始原生殖細胞として分離している。しかしながら、始原生殖細胞は、孵化前後の極めて若い胚に由来し、その数は孵化稚魚 1 尾当たり 6 0 個程度と大変少ないものであるため、商業的な量産化には向かない。

[0006] 商業的な量産化を目的として、移植する分離生殖細胞の数を十分確保するために、例えば、非特許文献 1 には、ドナー魚類の生殖腺である精巢の細胞懸濁液から、生殖細胞を分離し、その分離生殖細胞を、代理親魚技法において、宿主魚類個体の腹腔内に移植する方法が開示されている。しかしながら、移植する分離生殖細胞として、精巢由来の分離生殖細胞を用いた場合の宿主生殖腺への移植細胞の生着した個体の割合は、始原生殖細胞を用いた場合より低かった。

[0007] 非特許文献 2 には、ニジマス精原細胞を孵化稚魚腹腔内に移植すると、一部の A 型精原細胞（A－S G）のみが宿主生殖腺へと生着し、ドナー由来の

機能的配偶子を生産することから、高い生着能を有しているA型精原細胞は、精原幹細胞（SSC）であるという考えのもと、精原幹細胞のSide Population（SP）に着目した、宿主生殖腺への高い生着能を有しているA型精原細胞の濃縮方法が開示されている。しかしながら、この方法では精原幹細胞の濃縮率が不十分であり、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを得るには至っていない。よって、代理親魚技法において、移植する分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の有無を判断するためには、実際に孵化前後の宿主魚類個体に移植して確認する以外、識別する方法は存在しない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特許第4300287号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 103(8), 2725-2729.

非特許文献2：Hayashi, M., Sato, M., Nagasaka, Y., Sadaie, S., Kobayashi, S., & Yoshizaki, G. (2014). Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. *Biology of reproduction*, 91(1), 23.

発明の概要

[0010] このように、魚類の宿主生殖腺への生着能の有無を識別できる生殖細胞マーカー、特に、代理親魚技法の実用化に必要な、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞を、移植前に、検出、分離できる生殖細胞マーカーは、発明者らが知る限り報告されていない。

[0011] 本発明者らは今般、ドナー魚類の精巣由来の分離生殖細胞を宿主魚類個体の腹腔内に移植し、宿主生殖腺に生着したことが確認された、生着直後の、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞（すなわち、生着細胞）を生きのまま回収し、この細胞での遺伝子発現を網羅的に解析したところ、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞と、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞とをそれぞれ検出できる、生殖細胞識別マーカーの開発に成功した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

[0012] すなわち、本発明は、新規な生殖細胞識別マーカー、特に移植する分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の有無を識別する生殖細胞識別マーカーを提供することをその目的とする。また、本発明の生殖細胞識別マーカーを用いた宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法を提供することもその目的とする。

[0013] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

（１）下記（１）の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーおよび／または（１１）の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを含んでなる、生殖細胞識別マーカー：

（１）下記（ａ）～（ｆ）から選択される１または２以上のポリヌクレオチドからなる宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカー：

（ａ）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（ｂ）配列願号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（ｃ）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌ

クレオチド、

(d) 配列番号 1～74 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 1～74 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(f) 前記 (b)～(e) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(11) 下記 (g)～(l) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなる宿主生殖腺への生着能を有さない分化生殖細胞識別マーカー：

(g) 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(i) 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(j) 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性を有する塩基配列

で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(k) 配列番号75～101のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(l) 前記(g)～(k)のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

(2) 生殖細胞識別マーカーが、宿主生殖腺への生着能の有無を識別する生殖細胞識別マーカーである、(1)に記載のマーカー。

(3) (1)の(a)～(f)から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなる、生殖細胞識別マーカーが宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーである、(1)または(2)に記載のマーカー。

(4) 宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーが、精原幹細胞(SSC)マーカーである、(1)～(3)のいずれかに記載のマーカー。

(5) (4)に記載のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、SSC遺伝子検出用プライマーまたはプローブ。

(6) (1)の(g)～(l)から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなる、生殖細胞識別マーカーが宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーである、(1)または(2)に記載のマーカー。

(7) (1)～(4)のいずれかに記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、

魚類の精巣または卵巣から、発現が有るもしくは発現が高い細胞を分離する

ことを含んでなる、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法。

(8) (1)、(2) または (6) に記載の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、

魚類の精巣または卵巣から、発現があるもしくは発現が高い細胞を分離する

ことをさらに含んでなる、(7) に記載の未分化生殖細胞生産方法。

(9) 魚類が、サケ科魚類である、(7) または (8) に記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法。

(10) (1) ～ (4) のいずれかに記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーがコードするタンパク質の一部に結合する、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別抗体。

[0014] 本発明の生殖細胞識別マーカーを用いることにより、生殖細胞の状態、特に、代理親魚技法において、移植前に、移植する分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の有無を識別することができる。また本発明の生殖細胞識別マーカーを用いることにより、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞を効率良く生産することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] Q u a r t z - s e q 解析で得られたシーケンス結果のデータ処理のスキームである。

[図2] データ処理での、全サンプル（移植細胞 94 細胞と生着細胞 14 細胞）の全リード数の数を示す。

[図3] データ処理での、全サンプル（移植細胞 94 細胞と生着細胞 14 細胞）のGC含有率を示す。

[図4] データ処理での、全サンプル（移植細胞 94 細胞と生着細胞 14 細胞）のマッピング比を示す。

[図5] PCA解析のPCA ペアプロットの結果を示す。

[図6] PCA解析のファクターローディングのランキングを示す。

[図7] SPアレイとQ u a r t z - s e q 解析との比較を示す。

[図8] B l a s t 検索の結果を示す。a) 生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個の配列のフグに対するB l a s t 検索の結果。b) 生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個の配列のティラピアに対するB l a s t 検索の結果。c) 生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個の配列のマグロに対するB l a s t 検索の結果。d) 非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列のフグに対するB l a s t 検索の結果。e) 非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列のティラピアに対するB l a s t 検索の結果。f) 非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列のマグロに対するB l a s t 検索の結果。

[図9] q R T - P C R の S P 細胞および非 S P 細胞でのそれぞれのトランスクリプトの発現量の結果を示す。グラフの*および#は、S t u d e n t ' s t - t e s t により算出したP値を示し、*は、 $P < 0.05$ (S P 細胞と非 S P 細胞に有意な差が認められる)、#は、 $P > 0.1$ (S P 細胞と非 S P 細胞に有意な差が認められない)を示す。

[図10]免疫組織化学染色の結果を示す。蛍光顕微鏡写真(左)、H E 染色の写真(右)。

発明の具体的説明

[0016] 本発明によれば、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーおよび／または宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを含んでなる、生殖細胞識別マーカーが提供される。本発明の好ましい態様によれば、生殖細胞識別マーカーは、宿主生殖腺への生着能の有無を識別する生殖細胞識別マーカーである。

[0017] 「代理親魚技法」とは、ドナー魚類から分離された分離生殖細胞を、孵化前後の宿主(レシピエント)魚類個体の腹腔内へ移植し、宿主魚類個体の生殖腺において、移植した生殖細胞を生殖細胞系列(配偶子)へ分化誘導することを意味する(特許文献1参照)。

[0018] 「生殖細胞」とは、有性生殖のための配偶子またそれらのもととなる細胞を意味する。生殖細胞は、魚類の場合、例えば、始原生殖細胞、卵原細胞、

精原細胞、卵母細胞、精母細胞、精細胞、卵および精子が包含される。

[0019] 「宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞」とは、代理親魚技法において、宿主魚類個体の腹腔内へ移植するドナー魚類由来の分離生殖細胞であって、移植後、宿主生殖腺へ生着できる分離生殖細胞を意味し、生着生殖細胞ともいわれる。このような生殖細胞として、始原生殖細胞と、一部のA型精原細胞および一部の卵原細胞とが挙げられる。A型精原細胞の中でも、宿主生殖腺への生着能を有するA型精原細胞は、1%に満たないといわれている。生殖細胞が、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞であるか否かは、本発明の、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞マーカーにより判断するか、あるいは、代理親魚技法において、宿主生殖腺に移植した際の生着能の有無により判断することができる。

[0020] 「A型精原細胞」とは、未分化精巢（未成熟精巢）において体細胞と共に存在する未分化生殖細胞であり、該A型精原細胞は、成熟を開始した精巢または成熟精巢において、B型精原細胞、精母細胞、精細胞、精子へと分化する細胞である。A型精原細胞には、精原細胞を複製し続ける精原幹細胞（SSC）が含まれる。さらに、SSCは、細胞膜透過性の核染色試薬であるHoechst 33342で染色することにより染色性の薄い分画に濃縮される。本発明において、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞としてのA型精原細胞は、好ましくは、精原幹細胞である。

[0021] 「卵原細胞」とは、未分化卵巢（未成熟卵巢）に体細胞と共に存在する未分化生殖細胞であり、成熟に従って卵母細胞、卵へと分化する細胞である。卵原細胞は、卵原細胞を複製し続ける卵原幹細胞（OSC）が含まれる。本発明において、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞としての卵原細胞は、好ましくは、卵原幹細胞である。

[0022] 本発明の生殖細胞識別マーカーを用いることにより、代理親魚技法において、移植する分離生殖細胞の宿主生殖腺への生着能の有無を識別できる。すなわち、本発明の一つの態様によれば、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーが提供される。またもう一つの態様によれば、宿主生殖腺

への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーが提供される。

[0023] 本発明の一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記（a）～（f）から選択される１または２以上のポリヌクレオチドからなるものである：

（a）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（b）配列願号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（c）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（d）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列と少なくとも７０％の同一性を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（e）配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

（f）前記（a）～（e）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0024] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、配列番号１～７４のヌクレオチド配列から選択さ

れる1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドである。
また、本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカは、配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドである。

[0025] 配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドとしては、上記(b)～(f)から選択されるポリヌクレオチドが挙げられる。

[0026] (b)のポリヌクレオチドにおいて、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドは、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列の発現を妨げない限り、他のヌクレオチド配列を含んでいてもよく、他のヌクレオチド配列は当業者であれば適宜選択することができる。(b)のポリヌクレオチド配列の長さは、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列の長さに対して、好ましくは500%、より好ましくは400%、さらに好ましくは300%、さらに好ましくは200%、さらに好ましくは100%、さらに好ましくは70%、さらに好ましくは50%、さらに好ましくは30%、さらに好ましくは10%、さらに好ましくは5%、さらに好ましくは1%長いものであってもよい。

[0027] (c)のポリヌクレオチドにおいて、「1もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、または天然に生じ得る程度の1～複数個の数の塩基の置換等により改変がなされたことを意味する。塩基の改変の個数は、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましく

は1～2個である。(c)のポリヌクレオチドにおいて、「その一方または両末端への塩基の付加がなされた」とは、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列の発現を妨げない限り、そのヌクレオチド配列の一方または両末端へ、他のヌクレオチド配列が付加されていてもよく、他のヌクレオチド配列は当業者であれば適宜選択することができる。他のヌクレオチド配列は、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列の長さに対して、好ましくは500%、より好ましくは400%、さらに好ましくは300%、さらに好ましくは200%、さらに好ましくは100%、さらに好ましくは70%、さらに好ましくは50%、さらに好ましくは30%、さらに好ましくは10%、さらに好ましくは5%、さらに好ましくは1%の長さの配列であってもよい。

[0028] (c)のポリヌクレオチドの改変は、図8において、フグ、ティラピア、マグロのcDNA配列を比較した際の相違数が大きい部位で行われるものが好ましい。

[0029] (d)のポリヌクレオチドは、配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列からなるものである。この配列同一性は、好ましくは少なくとも好ましくは75%以上、より好ましくは少なくとも85%以上、さらに好ましくは88%以上、さらに好ましくは89%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは91%以上、さらに好ましくは92%以上、さらに好ましくは93%以上、さらに好ましくは94%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上である。

[0030] 上記配列同一性は、公知の手法によって決定されるものであり、かかる手法としては、例えば、実施例の例2に記載のBLAST検索(Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.)等が挙げられる。

また、このアルゴリズムBLASTに基づく、BLASTNやBLASTXを用いることもできる。

[0031] (e) のポリヌクレオチドにおいて、「オルソログ遺伝子」とは、オーソログ遺伝子ともよばれ、祖先遺伝子が共通の他種間で同一機能を担うホモログ遺伝子である。配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と同等の機能を有する限り、特に制限されず、当業者であれば公知の手法によって容易に特定することができる。例えば、BLASTXやポリヌクレオチドがコードするアミノ酸配列を用いたBLASTP検索により特定されたホモログ遺伝子に対して、系統樹解析を行うことで特定することができる。

[0032] 好ましい態様によれば、(e) のポリヌクレオチドにおいて、「オルソログ遺伝子」は、好ましくは、配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%以上、より好ましくは少なくとも85%以上、さらに好ましくは88%以上、さらに好ましくは89%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは91%以上、さらに好ましくは92%以上、さらに好ましくは93%以上、さらに好ましくは94%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなるものである。

[0033] (f) のポリヌクレオチドは、(a)～(f)のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドに高ストリンジентな条件でハイブリダイズするものから選択することができる。ここで、「高ストリンジентな条件でハイブリダイズする」とは、高ストリンジентな条件下で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、標的ヌクレオチド以外のヌクレオチドにはハイブリダイズしないことを意

味する。「高ストリンジেন্টな条件」は、ポリヌクレオチドと標的ヌクレオチドとの二本鎖の融解温度（℃）および溶液の塩濃度等に依存して決定できる。標的配列を選択した後にそれに応じたストリンジेंटな条件を設定することは当業者に周知の技術である（例えば、Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)等）。

[0034] ハイブリダイゼーション法は、公知の方法に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

[0035] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記（a）～（f）から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなるものである：

（a）配列番号1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（b）配列願号1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（c）配列番号1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個（例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を

有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性（好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% の同一性）を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(f) 前記 (a) ～ (e) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0036] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記 (a) ～ (f) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(a) 配列番号 1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列願号 1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73 のヌクレオチド配列から選択される 1

または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個（例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性（好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性）を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコー

ドするポリヌクレオチド、および

(f) 前記 (a) ~ (e) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0037] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記 (a) ~ (f) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(a) 配列番号 9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列願号 9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列において、1 もしくは数個（例えば、1 ~ 20 個、好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 5 個、さらに好ましくは 1 ~ 4 個、さらに好ましくは 1 ~ 3 個、特に好ましくは 1 ~ 2 個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性（好ましくは

少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性)を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(f) 前記(a)～(e)のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0038] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記(a)～(f)から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(a) 配列番号9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列願号9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個(例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個)の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩

基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性（好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% の同一性）を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(f) 前記 (a) ～ (e) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0039] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、下記 (a) ～ (f) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(a) 配列番号 25、28、47 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(b) 配列願号 25、28、47 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 25、28、47 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列において、1 もしくは数個（例えば、1 ～ 20 個、好ましくは 1 ～ 10 個、より好ましくは 1 ～ 5 個、さらに好ましくは

1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個)の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号25、28、47のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性(好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性)を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号25、28、47のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(f) 前記(a)～(e)のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0040] 本発明のより好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、配列番号1～7、9、11～13、18～28、31～33、35～39、42～49、51～60、63～66、70、73のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73であり、さらに好ましくは、配列番号9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70であり

、さらに好ましくは、配列番号 9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65 であり、特に好ましくは、配列番号 25、28、47 である。また、本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、上記配列番号のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドである。上記配列番号のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドの用語は、上記 (b) ~ (f) のポリヌクレオチドの用語について説明された本明細書の内容において、ポリヌクレオチドの対象となる配列番号を、それぞれの配列番号に置き換えることにより理解することができる。

[0041] 本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、生着生殖細胞識別マーカーとも呼ばれる。本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いることにより、代理親魚技法において、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞を移植細胞として検出、分離することができる。また、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いることにより、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞として、宿主生殖腺への生着能を有する A 型精原細胞（精原幹細胞を含む）および宿主生殖腺への生着能を有する卵原細胞（卵原幹細胞を含む）を検出、分離することができる。すなわち、本発明の一つの態様によれば、宿主生殖腺への生着能を有する A 型精原細胞識別マーカー（すなわち、A 型精原細胞中で、宿主生殖腺への生着能を有する A 型精原細胞を識別するためのマーカー）、精原幹細胞識別マーカー、宿主生殖腺への生着能を有する卵原細胞識別マーカー、卵原幹細胞識別マーカーが提供されうる。本発明の好ましい態様によれば、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、宿主生殖腺への生着能を有する A 型精原細胞識別マーカーである。

[0042] 本発明のもう一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さ

ない生殖細胞識別マーカーは、下記（g）～（l）から選択される１または２以上のポリヌクレオチドからなるものである：

（g）配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（h）配列願号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（i）配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列において、１もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（j）配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（k）配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および （l）前記（g）～（k）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0043] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーは、配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドである。また、本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着

能を有さない生殖細胞識別マーカーは、配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドである。

[0044] 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドとしては、上記 (g)～(l) から選択されるポリヌクレオチドが挙げられる。

[0045] (h)～(i) のポリヌクレオチドの用語は、上記 (b)～(f) のポリヌクレオチドの用語について説明された本明細書の内容において、ポリヌクレオチドの対象となる配列番号および機能を、配列番号 75～101 および宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能に置き換えることにより理解することができる。

[0046] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーは、下記 (g)～(l) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(g) 配列番号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 配列願号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(i) 配列番号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列において、1 もしくは数個（例えば、1～20 個、好ましくは 1～10 個、より好ましくは 1～5 個、さらに好ましくは 1～4 個、さらに好ましくは 1～3 個、特に好ましくは 1～2 個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、

および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(j) 配列番号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70 % の同一性（好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、さらに好ましくは少なくとも 95 % の同一性）を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(k) 配列番号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(l) 前記 (g) ～ (k) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0047] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーは、下記 (g) ～ (l) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(g) 配列番号 75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 配列願号 75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(i) 配列番号75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個（例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(j) 配列番号75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性（好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性）を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(k) 配列番号75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(l) 前記(g)～(k)のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0048] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーは、下記(g)～(l)から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなるものである：

(g) 配列番号75、78、81、83、86、88、98のヌクレオチ

ド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（ｈ）配列願号７５、７８、８１、８３、８６、８８、９８のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（ｉ）配列番号７５、７８、８１、８３、８６、８８、９８のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列において、１もしくは数個（例えば、１～２０個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～４個、さらに好ましくは１～３個、特に好ましくは１～２個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（ｊ）配列番号７５、７８、８１、８３、８６、８８、９８のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列と少なくとも７０％の同一性（好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、さらに好ましくは少なくとも９５％の同一性）を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（ｋ）配列番号７５、７８、８１、８３、８６、８８、９８のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

（ｌ）前記（ｇ）～（ｋ）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0049] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を

有さない生殖細胞識別マーカ－は、下記（g）～（l）から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなるものである：

（g）配列番号78、81、83、86、88のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（h）配列願号78、81、83、86、88のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（i）配列番号78、81、83、86、88のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個（例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1～2個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（j）配列番号78、81、83、86、88のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性（好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の同一性）を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（k）配列番号78、81、83、86、88のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

（l）前記（g）～（k）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺

への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0050] 本発明のさらに好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカは、下記（g）～（l）から選択される１または２以上のポリヌクレオチドからなるものである：

（g）配列番号 78、86 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（h）配列願号 78、86 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（i）配列番号 78、86 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列において、１もしくは数個（例えば、１～２０個、好ましくは１～１０個、より好ましくは１～５個、さらに好ましくは１～４個、さらに好ましくは１～３個、特に好ましくは１～２個）の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（j）配列番号 78、86 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の同一性（好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% の同一性）を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（k）配列番号 78、86 のヌクレオチド配列から選択される１または２以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

（l）前記（g）～（k）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェ

ントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[0051] 本発明のより好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、配列番号 75～84、86、88、91～99 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号 75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98 であり、さらに好ましくは、配列番号 75、78、81、83、86、88、98 であり、さらに好ましくは、配列番号 78、81、83、86、88 であり、特に好ましくは、配列番号 78、86 である。また、本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーは、上記配列番号のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドである。上記配列番号のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと実質的に同等な宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチドの用語は、上記 (h) ～ (i) のポリヌクレオチドの用語について説明された本明細書の内容において、ポリヌクレオチドの対象となる配列番号を、それぞれの配列番号に置き換えることにより理解することができる。

[0052] 本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーは、非生着生殖細胞識別マーカーとも呼ばれる。本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを用いることにより、代理親魚技法において、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞を移植細胞として検出、分離することができる。本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーをネガティブマーカーとして用いることにより、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞を移植細胞として分離することができる。

[0053] 本発明の別の態様によれば、生殖細胞識別マーカーとしてのプライマーおよびプローブが提供される。

[0054] 本発明によるプライマーおよびプローブは、本発明によるポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、本発明の生殖細胞識別遺伝子の全部または一部を、核酸増幅法により増幅することができる。従って、本発明によるプライマーおよびプローブは、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞遺伝子検出マーカーまたは宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞遺伝子検出マーカー（ネガティブマーカー）としてのプライマーおよびプローブとして用いることができる。また、本発明によるプライマーおよびプローブは、宿主生殖腺への生着能を有するA型精原細胞遺伝子検出マーカー、精原幹細胞遺伝子検出マーカー、宿主生殖腺への生着能を有する卵原細胞遺伝子検出マーカーまたは卵原幹細胞遺伝子検出マーカーとして用いることができる。

[0055] 本発明によるプライマーおよびプローブは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）等からなるものを意味する。

[0056] 本発明によるプライマーは、本発明の生殖細胞識別遺伝子の全部または一部を核酸増幅法により増幅することができればよい。例えば、本発明によるポリヌクレオチドのヌクレオチド配列またはその相補配列の連続する少なくとも10個、好ましくは、少なくとも15個、より好ましくは、少なくとも20個、さらに好ましくは、少なくとも21個の塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるものが挙げられる。本発明によるプライマーは、本発明によるポリヌクレオチドのヌクレオチド配列またはその相補配列の連続する10～30個、12～30個、15～30個、20～30個、または21～30個のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドからなるものであってもよい。

[0057] 本発明によるプライマーの長さは、少なくとも10塩基であることができ、好ましくは少なくとも15塩基、より好ましくは少なくとも20塩基、さらに好ましくは少なくとも21塩基である。本発明によるプライマーの長さ

は、12～30塩基、20～30塩基、または21～30塩基であってもよい。

[0058] 本発明によるプライマーは、二種類以上の本発明によるプライマーを組み合わせてなるプライマーセットとして使用してもよい。

[0059] 本発明によるプライマーおよびプライマーセットは、PCR法 (Saiki, R. K., Bugawan, T. L., et al. (1986) Nature, 324, 163-166)、NASBA法 (Comptom, J. (1991) Nature, 650, 91-92)、TMA法 (Kacian, D. L., and Fultz, T. J. (1995) US. Patent 5, 399, 491)、SDA法 (Walker, G. T., Little, M. C., et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392-396)、PCR-SSCP法 (Orita, M., Iwahara, H., et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2776-2770)等の公知の核酸増幅法において、常法に従ってプライマーおよびプライマーセットとして用いることができる。

[0060] 本発明によるプローブとしては、本発明によるポリヌクレオチドの塩基配列にハイブリダイズすることができるものが挙げられる。

[0061] 本発明によるプローブの長さは、少なくとも10塩基である。本発明によるプローブの長さは、そのプローブの用途により適宜調整することができ、in situハイブリダイゼーション法に用いる場合は、好ましくは100～500塩基である。

[0062] 本発明によるプローブは、ノーザンブロット法、サザンブロット法、in situハイブリダイゼーション等の公知の方法において、常法に従ってプローブとして使用することができる。

[0063] 本発明によるプライマーおよびプローブは、本明細書に開示した塩基配列に基づき、化学合成できる。プライマーの調製方法は周知であり、常法に従って実施できる。

[0064] 本発明の別の態様によれば、本発明の生殖細胞識別マーカーを用いた、生殖細胞、特に宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞に特異的に結合する抗体が提供される。抗体の調製方法は、周知であり、常法に従って実施できる。例えば、このような抗体として、本発明の生殖細胞識別マーカーがコード

するタンパク質の一部に結合する、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別抗体が挙げられ、このような抗体は、生殖細胞識別マーカーがコードするタンパク質の一部に対応するペプチドを合成し、そのペプチドを動物に免疫して抗血清として得ることができる。該ペプチドは、好ましくは、PKWETDSKISCEQT（配列番号：308）である。

[0065] 本発明の別の態様によれば、本発明の生殖細胞識別マーカーを含んでなる、生殖細胞識別キット、特に宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別キットが提供される。キットの調製方法は、周知であり、常法に従って実施できる。

[0066] 本発明の一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、魚類の精巣または卵巣から、発現が有るもしくは発現が高い細胞を分離することを含んでなる、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法が提供される。すなわち、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、魚類の精巣または卵巣から、発現が有るもしくは発現が高い細胞を分離することを含んでなる、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞濃縮方法が提供される。

[0067] 本発明の好ましい態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法は、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、魚類の精巣または卵巣から、発現があるもしくは発現が高い細胞を分離することをさらに含んでなる。このような方法として、例えば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーをネガティブマーカーとして用いて、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞から、宿主生殖腺への生着能を有さない細胞を分離し、除去することが挙げられる。

- [0068] 本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法において、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーをポジティブマーカーとして用いた分離と、本発明の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーをネガティブマーカーとして用いた分離は、分離方法に準じて、同時におこなってもよいし、別々におこなってもよく、あるいは連続におこなってもよく、その順番はいずれであってもよい。本発明の好ましい態様によれば、ネガティブマーカーで宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞を除去した後に、ポジティブマーカーによる濃縮をする方法である。
- [0069] 本発明において、本発明の生殖細胞マーカーを用いた生殖細胞の分離方法としては、フローサイトメトリー解析や、密度勾配遠心法、運動能や接着能など細胞の性質を利用した解析、細胞表面抗原に対する抗体を利用した解析による細胞分離が挙げられる。
- [0070] 本発明の一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法により得られた生殖細胞を、ドナー魚類由来の分離生殖細胞として、孵化前後の宿主魚類個体の腹腔内へ移植することを含んでなる、分離生殖細胞の生殖細胞系列への分化誘導方法が提供される。
- [0071] 本発明の分化誘導方法における宿主魚類とドナー魚類の種類は、同種であってもよいし、異種であってもよい。異種の魚類としては同属異種の魚類や異属の魚類を挙げることができ、例えば、ドナー魚類がニジマスの場合、同属異種のレシピエント魚類としてヤマメを、異属のレシピエント魚類としてブラウントラウト、イワナを具体的に例示することができ、ドナー魚類がクロマグロの場合、同属異種のレシピエント魚類として、メバチマグロ、ビンナガマグロ、キハダマグロ、メバチマグロ等を、異属のレシピエント魚類としてスマ、マサバを具体的に例示することができ、ドナー魚類がブリやカンパチの場合、異属のレシピエント魚類として、マアジやニベを例示することができる。また、ドナー魚類がハタ、ウナギの場合は、近縁の飼育が容易な異種の魚類を用いることができる。異種の魚類を用いる場合、例えばドナー魚類由来の未成熟生殖細胞として、成魚までの育成が比較的高コスト、高労

力である魚類（例えばレシピエント魚類より大型の魚類）の未成熟生殖細胞を用い、レシピエント魚類として、成魚までの育成が比較的低コスト、低労力である魚類（例えばドナー魚類より小型の魚類）を用いると、移植後のレシピエント魚類を育成することによって、ドナー魚類の卵や精子を、例えば比較的小型の水槽を用いて、比較的低コスト、低労力で分化誘導することが可能となる。このメリットを享受するために好ましいドナー魚類とレシピエント魚類の組み合わせとしては、クロマグロ（ドナー）とマサバ（レシピエント）の組み合わせを例示することができる。

[0072] 本発明において魚類は、本発明のポリヌクレオチドを特異的に発現する魚類である限り特に限定されず、例えば、サケ科魚類（例えば、ニジマス、サケ、ヒメマス、マスノスケ）、アジ科魚類（例えば、ブリ）、フグ科魚類（例えば、トラフグ）、サバ科魚類（例えば、クロマグロ、ミナミマグロ）、タイ科魚類（例えば、マダイ）、カワスズメ科魚類（例えば、ティラピア）、ウナギ科魚類、シーラカンス科魚類などが挙げられる。本発明において魚類は、海水魚であっても、淡水魚であってもよい。

[0073] 本発明の分化誘導方法によって、ドナー魚類由来の精子及び／又は卵を形成せしめることよりなる。すなわち、本発明の一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法により得られた生殖細胞を、ドナー魚類由来の分離生殖細胞として、孵化前後の宿主魚類個体の腹腔内へ移植し、ドナー由来の精子または卵を得ることを含んでなる、ドナー魚類の精子または卵の生産方法が提供される。また、本発明の一つの態様によれば、本発明の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法により得られた生殖細胞を、ドナー魚類由来の分離生殖細胞として、孵化前後の宿主魚類個体の腹腔内へ移植し、ドナー由来の精子または卵を得て、該卵または精子を用いて受精卵を作製し、これを孵化させてドナー魚類の新規個体を作製することを含んでなる、ドナー魚類の生産方法が提供される。

[0074] 本発明の分化誘導法の利用例として、魚類の遺伝子資源の保存への利用が考えられる。具体的には、希少種、絶滅危惧種の未成熟生殖細胞を凍結保存

し、必要な時に飼育が容易な近縁種の宿主に移植すれば、これらの宿主は希少種、あるいは絶滅危惧種（場合によっては既に絶滅した種）に由来する卵や精子を作出することが可能となる。また、今後遺伝子導入等の技術により様々な有用系統・品種が作出された場合、個体の継代飼育を行わなくてもこれらの維持が可能であり、必要なときに宿主胚への移植により個体へ改変することが可能となる。

実施例

[0075] 本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

[0076] 例 1：生殖細胞識別マーカーの作製

宿主生殖腺への生着能の有無を識別できる生殖細胞識別マーカーを作製するために、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞を単離し、この細胞で特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析して、生殖細胞識別マーカーを得た。具体的には以下の通りである。

[0077] (1) 宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞（生着細胞）の単離

非特許文献 1 の方法に従って、ドナー魚類として、15 個体の *v a s a - G F P* 遺伝子導入ニジマス（雄）から精巢を摘出し、トリプシン酵素（Worthington Biochemical Corporation 製）処理による分散後、A 型精原細胞を含む細胞集団を得た。得られた細胞集団を、代理親魚技法において、宿主魚類個体に移植する分離生殖細胞（移植細胞）として用いた。宿主魚類個体として、ニジマス仔魚（受精後 29 日目）を 230 尾用いた。

[0078] 得られた分離生殖細胞を、引用文献 1 の方法に従って、宿主魚類個体の腹腔内へ一定細胞数ずつ移植した。移植後 14 日目に、蛍光顕微鏡を用いて、移植した *G F P* 陽性の生殖細胞の生着が確認できた宿主生殖腺を、ピンセットを用いて実体顕微鏡下で単離した。単離した生殖腺を、トリプシン酵素（Worthington Biochemical Corporation 製）処理による分散後、*G F P* 蛍光を指標に、生着した移植生殖細胞を単離、回収した。

[0079] (2) *Q u a r t z - s e q* 法による解析

単離された生着細胞から網羅的な遺伝子発現解析を行うために、1細胞から解析できるQ u a r t z - s e q法 (Sasagawa et. al., Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. Genome Biol. 2013 Apr 17;14 (4) 参照) に従って、解析を行った。具体的には、上記 (1) により得られた生着細胞 14細胞と、移植に用いた精巢から得られた細胞集団に含まれる細胞 (移植細胞) 94細胞に対して、Q u a r t z - s e q法による遺伝子発現の比較を行った。

[0080] Q u a r t z - s e q法とは、1細胞RNAシーケンス法の一つである。具体的には、得られた細胞を、細胞融解液として、最終濃度0.5%に希釈した10%NP-40 (Thermo Scientific社製) と0.4unit (1unit/μl) のRNasin Plus RNase Inhibitor (Promega社製) とが含まれる溶液を用いて融解し、逆転写反応により該mRNAに相補的なcDNAを得て、逆転写されたcDNAの3'末端にターミナルトランスフェラーゼを用いてpoly-Aを付加し、poly-A鎖に結合されたタギングプライマーからの伸長反応により相補的な鎖 (第2鎖) を合成し、抑制PCRにより目的のRNA由来のcDNAの増幅を行い、増幅されたcDNAを精製した。

[0081] 得られた精製cDNAについてシーケンスを行い、データ処理は図1のスキームに従って行った。具体的には、シーケンスアダプター配列の除去、遺伝子発現量の定量の順にデータ処理を行った。結果を図2~4に示す。

[0082] 図2に示されるように、生着細胞では、一部リード数にばらつきが見られた。図3に示されるようシーケンスのGC含有率は、均一であった。図4に示されるように、マッピング比は均一であった。

[0083] これらの結果に基づいて、WTA (whole transcript amplification) および/または細胞生存に影響が考えられる生着細胞1細胞は解析対象から除去し、遺伝子発現差を解析した。その結果、解析に用いたニジマスの全トランスクリプトは175,285個であり、移植細胞と生着細胞との間で発現

に有意な差があったトランスクリプトは2, 904個であることがわかった。

[0084] その後、PCA（主成分分析）を行った。PCAとは、多変量を低次元に次元圧縮を行う解析であり、この解析を行うことにより細胞がどのように分類されるかがわかる。また分類された細胞に対して、機能的に寄与が大きな遺伝子を因子負荷量（factor loading）の大小から得ることができる。具体的には、移植細胞94細胞と生着細胞13細胞とを、あわせて107細胞について、移植細胞と生着細胞の間で発現に有意な差があった2904遺伝子の発現情報をもとにペアプロットを描画した。プロットの結果を図5に示す。また、PCAでのファクターローディングのランキングを。図6に示す。図6に示されているように、第一主成分に寄与の大きな遺伝子が見える。

[0085] PCA解析の結果、生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個と、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個が得られた。

[0086] (3) SPマイクロアレイとの比較

非特許文献1で開示されているように、高い生着能を有しているA型精原細胞は、精原幹細胞であると考えられる。上記(1)で得られた生着細胞は、宿主生殖腺に生着した直後の細胞であることから、精原幹細胞(SSC)そのものとしての遺伝子を発現していると考えられる。そこで、精原幹細胞で着目されるSP細胞で有意に発現するマイクロアレイおよび非SP細胞で有意に発現するマイクロアレイ解析の結果と、上記(2)で得られたQuartz-seq解析の結果とを比較した。

[0087] SP細胞で有意に発現するマイクロアレイおよび非SP細胞で有意に発現するマイクロアレイ解析の結果は、非特許文献2に開示されているものを用いた。ここで、SP (Side Population) 細胞とは、細胞膜透過性の核染色試薬であるHoechst 33342で染色した際に、染色性の低い細胞集団であり、宿主生殖腺への生着能の高い細胞が濃縮されていることが知られている。これらのマイクロアレイは、具体的には、非特許文献2の濃縮方法に従って、フローサイトメトリ解析で、ヘキストブルーとヘキストレッド展

開に基づいて、生着能が高いS P細胞集団と、生着能が低い非S P細胞集団とを分離し、S P細胞と非S P細胞間でのマイクロアレイによる遺伝子発現解析により得られたものである。S P細胞で有意に強く発現するマイクロアレイトランスクリプトは8350個、非S P細胞で有意に強く発現するマイクロアレイトランスクリプト7798個である。

[0088] S P細胞を用いたマイクロアレイ解析と、Q u a r t z - s e q解析とを比較した結果を図7に示す。その結果、Q u a r t z - s e q解析で得られた、生着細胞を特徴づけるトランスクリプトのうち14個がマイクロアレイ解析においてS P細胞で有意に発現する遺伝子と重複し、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプトのうち8個がマイクロアレイ解析において非S Pで有意に発現する遺伝子と重複した。

[0089] 例2：他魚種との配列類似性の解析

上記例1（2）のQ u a r t z - s e q解析の結果得られた生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列について、ニジマス以外の魚種として、ティラピア、フグ、マグロのcDNA配列に対してB l a s t検索を行った。ティラピアのcDNA配列はE n s e m b l eのデータベース（ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-84/fasta/oreochromis_niloticus/）より、フグのcDNA配列はE n s e m b l eのデータベース（ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-84/fasta/tetraodon_nigroviridis/）より、マグロのcDNA配列は中央水産研究所のデータベース（http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ResearchCenter/5_AG/genomes/Tuna_DNAmicroarray/index_j.html）より得た。B l a s t検索はb l a s t n 2. 2. 31を用いた。

[0090] 結果を図8 a～fに示し、まとめを下記表1および2に示す。

[0091]

[表1]

生着細胞を特徴づけるもの			
	Total	blast で hit 有り(%)	% identity
フグ	74	22 (29.7)	73.53 ~ 89.75
ティラピア	74	25 (33.8)	73.1 ~ 91.46
クロマグロ	74	26 (35.1)	72.17 ~ 95.43

[0092] [表2]

非生着細胞を特徴づけるもの			
	Total	blast で hit 有り(%)	% identity
フグ	27	4 (14.8)	82.02 ~ 87
ティラピア	27	5 (18.5)	76.57 ~ 89.33
クロマグロ	27	5 (18.5)	75.39 ~ 88.93

[0093] 表1および2に示されているように、生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個中Blast検索の結果ヒットしたものは約30%、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個中Blast検索の結果ヒットしたものは20%弱であった。ヒットした配列の同一性は70%以上であった。

[0094] 配列番号1～74および75～101と、対応するトランスクリプトのシーケンス名を、それぞれ下記表3および4に示す。

[0095]

[表3]

配列番号 1	TCONS_00000365
配列番号 2	TCONS_00063827
配列番号 3	TCONS_00007739
配列番号 4	TCONS_00043022
配列番号 5	TCONS_00117364
配列番号 6	TCONS_00173490
配列番号 7	TCONS_00073341
配列番号 8	TCONS_00112887
配列番号 9	TCONS_00145990
配列番号 1 0	TCONS_00021583
配列番号 1 1	TCONS_00096363
配列番号 1 2	TCONS_00049412
配列番号 1 3	TCONS_00150070
配列番号 1 4	TCONS_00014426
配列番号 1 5	TCONS_00015040
配列番号 1 6	TCONS_00028358
配列番号 1 7	TCONS_00007685
配列番号 1 8	TCONS_00064366
配列番号 1 9	TCONS_00052946
配列番号 2 0	TCONS_00077936
配列番号 2 1	TCONS_00077769
配列番号 2 2	TCONS_00078416
配列番号 2 3	TCONS_00042870
配列番号 2 4	TCONS_00041119
配列番号 2 5	TCONS_00162389
配列番号 2 6	TCONS_00105702
配列番号 2 7	TCONS_00007644
配列番号 2 8	TCONS_00095523
配列番号 2 9	TCONS_00007682
配列番号 3 0	TCONS_00171719
配列番号 3 1	TCONS_00126939
配列番号 3 2	TCONS_00081758
配列番号 3 3	TCONS_00172162
配列番号 3 4	TCONS_00170731
配列番号 3 5	TCONS_00153086
配列番号 3 6	TCONS_00053141
配列番号 3 7	TCONS_00112332
配列番号 3 8	TCONS_00015044
配列番号 3 9	TCONS_00109983
配列番号 4 0	TCONS_00121439

配列番号 4 1	TCONS_00030943
配列番号 4 2	TCONS_00118932
配列番号 4 3	TCONS_00000371
配列番号 4 4	TCONS_00139479
配列番号 4 5	TCONS_00173443
配列番号 4 6	TCONS_00090339
配列番号 4 7	TCONS_00101612
配列番号 4 8	TCONS_00038767
配列番号 4 9	TCONS_00010460
配列番号 5 0	TCONS_00047509
配列番号 5 1	TCONS_00157221
配列番号 5 2	TCONS_00005674
配列番号 5 3	TCONS_00145644
配列番号 5 4	TCONS_00140890
配列番号 5 5	TCONS_00105161
配列番号 5 6	TCONS_00119186
配列番号 5 7	TCONS_00012506
配列番号 5 8	TCONS_00147715
配列番号 5 9	TCONS_00074969
配列番号 6 0	TCONS_00150068
配列番号 6 1	TCONS_00004385
配列番号 6 2	TCONS_00004268
配列番号 6 3	TCONS_00095171
配列番号 6 4	TCONS_00036534
配列番号 6 5	TCONS_00087691
配列番号 6 6	TCONS_00039286
配列番号 6 7	TCONS_00095563
配列番号 6 8	TCONS_00082539
配列番号 6 9	TCONS_00091095
配列番号 7 0	TCONS_00138506
配列番号 7 1	TCONS_00035323
配列番号 7 2	TCONS_00121355
配列番号 7 3	TCONS_00003456
配列番号 7 4	TCONS_00073970

[0096]

[表4]

配列番号 7 5	TCONS_00006275
配列番号 7 6	TCONS_00011573
配列番号 7 7	TCONS_00019733
配列番号 7 8	TCONS_00173676
配列番号 7 9	TCONS_00094001
配列番号 8 0	TCONS_00170026
配列番号 8 1	TCONS_00158352
配列番号 8 2	TCONS_00083784
配列番号 8 3	TCONS_00006277
配列番号 8 4	TCONS_00012392
配列番号 8 5	TCONS_00077763
配列番号 8 6	TCONS_00002882
配列番号 8 7	TCONS_00084241
配列番号 8 8	TCONS_00031990
配列番号 8 9	TCONS_00118931
配列番号 9 0	TCONS_00101035
配列番号 9 1	TCONS_00006274
配列番号 9 2	TCONS_00056062
配列番号 9 3	TCONS_00168154
配列番号 9 4	TCONS_00020405
配列番号 9 5	TCONS_00161192
配列番号 9 6	TCONS_00030331
配列番号 9 7	TCONS_00060825
配列番号 9 8	TCONS_00131058
配列番号 9 9	TCONS_00022951
配列番号 1 0 0	TCONS_00168167
配列番号 1 0 1	TCONS_00022380

[0097] 例 3 : q R T - P C R による解析

上記例 1 (2) の Q u a r t z - s e q 解析の結果得られた生着細胞を特徴づけるトランスクリプト 7 4 個の配列 (配列番号 1 ~ 7 4) について、非生着細胞濃縮分画の A 型精原細胞 (n o n S P 細胞 (非 S P 細胞)) に比べ、生着細胞濃縮分画の A 型精原細胞 (S P 細胞) で高発現しているか否かを確かめるために、また、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト 2 7 個の配列 (配列番号 7 5 ~ 1 0 1) について、生着細胞濃縮分画の A 型精原細胞 (S P 細胞) に比べ、非生着細胞濃縮分画の A 型精原細胞 (非 S P 細胞) で高発現しているか否かを確かめるために、リアルタイム定量 P C R (q R T - P C R、q P C R (q u a n t i t a t i v e r e a l - t i m e P

CR)) を行った。

[0098] qRT-PCRは、以下の方法に従って行った。まず、10ヶ月齢、11ヶ月齢、15ヶ月齢の未成熟のニジマスからそれぞれ、フローサートメーターを用いて、Hayashi, Makoto, et al. "Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost." *Biology of reproduction* 91.1 (2014): 23.の方法に従い、SP細胞と非SP細胞を分取した。分取した細胞から、RNeasy mini Kit (Qiagen) をもちいてRNAを精製したのち、逆転写反応の供することにより、cDNAを合成した。cDNA合成には、oligo-(dT)プライマー(5'-dT25VN-3')と、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

[0099] 得られたcDNAを用いて、qRT-PCR法により、遺伝子の発現量を解析した。qRT-PCRは、LightCycler 480 System II (日本ジェネティクス株式会社) と、Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を用いておこなった。qRT-PCRで使用した、生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個の配列(配列番号1~74)および非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列(配列番号75~101)に対応するプライマーを、下記表5および6に示す。また、全てのA型精原細胞で均一に発現することが知られており、発現量がA型精原細胞の生着能を相関がない遺伝子の代表としてvasaを用いた。サンプル間のRNA量の補正には、b-actin遺伝子を用いた。vasaおよびb-actinのプライマーを表7に示す。

[0100]

[表5]

トランスクリプト		F-プライマー		R-プライマー	
配列番号	シーケンス名	名前	配列	名前	配列
1	TCONS 0000365	Pos. 1Fw	GGTGGCTTCAATGTTGATGT	Pos. 1Rv	GGTGGCTTCAATGTTGATGTTTC
2	TCONS 0000367	Pos. 2Fw	GGGAGCGGATGACAAAT	Pos. 2Rv	GATGAAGCGGGTGAAGAAAT
3	TCONS 0000729	Pos. 3Fw	TTCACGCGTTTACGTCCTC	Pos. 3Rv	CTGGAGGATGACCTACTGTT
4	TCONS 0004302	Pos. 4Fw	GAGAGGAGTACCTTGCAC	Pos. 4Rv	GGTGGCTGACACACACCTGCT
5	TCONS 0011764	Pos. 5Fw	GGGAGCTAGACCTGGAGTG	Pos. 5Rv	TGCGGAGTACCTGCTGCT
6	TCONS 0017340	Pos. 6Fw	ATCAGGGGGAGGAGGAGA	Pos. 6Rv	TGAGGTATTTTGGGAGGTC
7	TCONS 0007334	Pos. 7Fw	GAGGCTGAAATCCTTGGATGA	Pos. 7Rv	CTGGGCTACATCCACCTTGT
8	TCONS 0011287	Pos. 8Fw	CTGGCTCATCTCTCTCTCT	Pos. 8Rv	CACCGTCCAGAAAGTCAATG
9	TCONS 0014590	Pos. 9Fw	ACCTTCACAAATGGGGAAG	Pos. 9Rv	AGGAGAGACCCGACACAGA
10	TCONS 0002153	Pos. 10Fw	AGGCTTGGGTAGCTGAGACA	Pos. 10Rv	TGTGGTCCAGCTGCTGATTA
11	TCONS 0009663	Pos. 11Fw	GGTACCTTGGCTGGGAAAT	Pos. 11Rv	GGATTTGGAATGGCTCAGTG
12	TCONS 0004842	Pos. 12Fw	CAGGAGGAGCTCAACCCGTA	Pos. 12Rv	AGAGGGAATCCAGTCCAGA
13	TCONS 0018007	Pos. 13Fw	CTGTGGTGGAGGCTTACAT	Pos. 13Rv	AGTCACTTGGAGGAGCT
14	TCONS 0001440	Pos. 14Fw	AAAGCTGGGAGAGAGACA	Pos. 14Rv	TGGGGGAAATATTTCTTG
15	TCONS 0001504	Pos. 15Fw	CTCTGCTGCTGCTGGCTTG	Pos. 15Rv	TGGCTCTTCCAGCTGAGC
16	TCONS 0002838	Pos. 16Fw	CAGGTGATCAGGATTTGGA	Pos. 16Rv	GATTGGTCCAGAAACCCATG
17	TCONS 0007685	Pos. 17Fw	CTCTCAGCTGACTGCTTC	Pos. 17Rv	CCAGTACGAGGCTGAGGTA
18	TCONS 0004366	Pos. 18Fw	GGTTTGACTCAGGTGAT	Pos. 18Rv	TGTGGTTCACTCCACAG
19	TCONS 0005346	Pos. 19Fw	TGTGGTCTATAGTGGCTA	Pos. 19Rv	TATATAGTCACTACTTTAGACAGA
20	TCONS 0007793	Pos. 20Fw	ATGAGGCTTASAGACATG	Pos. 20Rv	TAGAGCTTGGGGAGTAAC
21	TCONS 0007769	Pos. 21Fw	ATCAGATGAGACAGACA	Pos. 21Rv	GGTGGTCAAGATTCAGTTGG
22	TCONS 0007848	Pos. 22Fw	TGGGCTTACATTCAGCA	Pos. 22Rv	CAGAGAGCTTGGGGTTTA
23	TCONS 0004267	Pos. 23Fw	CTCATCAGAGATGCTGA	Pos. 23Rv	ATTGTAGGGTCCACACAG
24	TCONS 0004119	Pos. 24Fw	TCTCCACAAAGGTGACAG	Pos. 24Rv	TGGGACTTGGTGGTTGAT
25	TCONS 0016369	Pos. 25Fw	GGGTGAAACACAGCAGCT	Pos. 25Rv	CTGGTCTCCAGGCTCTCTC
26	TCONS 0010670	Pos. 26Fw	GGCAGTGAGGAGCAATGCT	Pos. 26Rv	TTCAGGCTGGTATCAGCA
27	TCONS 0000764	Pos. 27Fw	AAAGGAGGACCAATTTCTG	Pos. 27Rv	TAAAGCTTCCAGGAGGCTGT
28	TCONS 0008523	Pos. 28Fw	TGCTTAACTGCTTACGAGT	Pos. 28Rv	CTGACAGGCTAGCTCAGTCA
29	TCONS 0000762	Pos. 29Fw	TAAAGCTTGAAGAGCTCTGT	Pos. 29Rv	AAAGGAGGAGCAATTTCTG
30	TCONS 0017179	Pos. 30Fw	CTTCATTCATCAGGAGCT	Pos. 30Rv	CATCCAGGCAATGTGACAGC

31	TCONS 00126339	Posl 31Fw	ACAGCCAAATGGTCAATAGCC	162	Posl 31Rv	CCTGCGCTCATCATCAAA	163
32	TCONS 00081758	Posl 32Fw	AAGTGTGTCTGTGCTAGTGG	164	Posl 32Rv	CGTCAAGGCAAGCATACTCA	165
33	TCONS 00172162	Posl 33Fw	CATTCTGGAGAGAGAGAGAG	166	Posl 33Rv	TTTGAACATTTCCAGAGAGC	167
34	TCONS 00170731	Posl 34Fw	CGTCAGGCAAGCTTTGTAGC	168	Posl 34Rv	TTCCAGTTTGACATGGGGTGA	169
35	TCONS 00153086	Posl 35Fw	TACAGAGAGCCCGCATTTTC	170	Posl 35Rv	GGCTTCTCAACCTCTTGAAG	171
36	TCONS 00050141	Posl 36Fw	AGCCCAATATAGCCAGAGCA	172	Posl 36Rv	TTACACTGGGGTGCATTTA	173
37	TCONS 00112332	Posl 37Fw	TTTGTACATTTGCTTGGGA	174	Posl 37Rv	CAGCCACAGAGAGACACGHA	175
38	TCONS 00015044	Posl 38Fw	TTGTGTGTGGAGCTTTGCT	176	Posl 38Rv	TGGGCAATCTTGAATTTTGTG	177
39	TCONS 00109983	Posl 39Fw	CATGAGACAGGCGCTGATA	178	Posl 39Rv	TGTTGAGCAATGGTTTTCAC	179
40	TCONS 00121439	Posl 40Fw	TCTGGATGTGGAGCTTTCT	180	Posl 40Rv	ATGDACTTGGAGAGCTAGC	181
41	TCONS 00033043	Posl 41Fw	GCAAGACAGCTTCAATCTCC	182	Posl 41Rv	TGTGTGGTGAATGGGTGGTAG	183
42	TCONS 00118932	Posl 42Fw	CGACCAAGGTGGGATGTAAT	184	Posl 42Rv	TTTCCATCTGTTCCAGCTTC	185
43	TCONS 00000371	Posl 43Fw	GGTGGCTCAATGTTGATCT	186	Posl 43Rv	GGTGTCTCATGGTAAAGCTTC	187
44	TCONS 00139479	Posl 44Fw	ACAAGCCCTTTTCCGTGTTT	188	Posl 44Rv	ATGACACCCCTGTCACDAGT	189
45	TCONS 00172443	Posl 45Fw	AACGGGAGTGGCAATTGAA	190	Posl 45Rv	TCTGTGTCTGTGTGTGAAA	191
46	TCONS 00090339	Posl 46Fw	CATCCAGAGGCTTGGAGACA	192	Posl 46Rv	AGAGGCTCTGGAAAGCTTC	193
47	TCONS 00101612	Posl 47Fw	AGTGTGTGGGGGACATCTG	194	Posl 47Rv	TGCATCAGCTCAATCTGCTC	195
48	TCONS 00028767	Posl 48Fw	GGCCAGAAATGTCCTGTGAT	196	Posl 48Rv	GAGCTGAAGTCAACCGTGTCA	197
49	TCONS 00010460	Posl 48Fw	AAGAAATGCGGCAATGTGAC	198	Posl 48Rv	CTTGGTTTCAAGCGATGGTTT	199
50	TCONS 00047509	Posl 50Fw	GGGTGTGCACTGCACTTTT	200	Posl 50Rv	CGGTGTGGGCTAATGAAAGC	201
51	TCONS 00157221	Posl 51Fw	GACGTTCAAGAGGCAATTGAA	202	Posl 51Rv	TGCTAGCATCTGTCCTCT	203
52	TCONS 00005674	Posl 52Fw	GAAAAGCGCAGCTTTGTAGC	204	Posl 52Rv	CGCTGGTGGTGGAAATAGTG	205
53	TCONS 00145644	Posl 53Fw	ATCTTTTCCCTGGCTGTCT	206	Posl 53Rv	CGTTGGTTGGACTTCACTT	207
54	TCONS 00140890	Posl 54Fw	AGTGTCAAGGATACATCTC	208	Posl 54Rv	CAGGAAACCCCTTGGTGTTA	209
55	TCONS 00105161	Posl 55Fw	CGCATCCCAACTAAGAA	210	Posl 55Rv	GTTCCTGCTCACTTGGCTTG	211
56	TCONS 00119186	Posl 56Fw	CGTATGCAATGACAGTGGT	212	Posl 56Rv	TTCAAGCTGATGTCGGTGA	213
57	TCONS 00012506	Posl 57Fw	GGCAGTGTGCGACTGTGTA	214	Posl 57Rv	CTGGCGAGCTACATTCCAGA	215
58	TCONS 00147715	Posl 58Fw	CGAGGTTTCAATCCAGTTT	216	Posl 58Rv	CCATGTGGAAGACAGAAATG	217
59	TCONS 00074969	Posl 58Fw	AGATCAATGGCATGAGCAA	218	Posl 58Rv	ATGGAGGACTGGTCCAAAC	219
60	TCONS 00150638	Posl 60Fw	CTGTGTGGAGCGCTACAAAT	220	Posl 60Rv	GGTGGAGATAGCTTGAAC	221

61	TCONS 0004385	Pos: 61Fw	TGATTGTGGAGGACAGGTCA	222	Pos: 61Rv	TATGGATCCCATCTGGTTT	223
62	TCONS 0004268	Pos: 62Fw	GTATGTTTGTGTTTGGGCTTT	224	Pos: 62Rv	AAATGGAGACAGGCACAGG	225
63	TCONS 00085171	Pos: 63Fw	ACCAGTGATGTCAKAGGA	226	Pos: 63Rv	GGTCATGGGTACGTTGATC	227
64	TCONS 00036534	Pos: 64Fw	AACGACAGACGCGAGCTAT	228	Pos: 64Rv	GACGAGCATCTGGAAAGAG	229
65	TCONS 00087891	Pos: 65Fw	AGCTCTGCTGACCAAGGAA	230	Pos: 65Rv	CGACCACTTTGACCGTGAAT	231
66	TCONS 00039286	Pos: 66Fw	CAGAACGATGTTGAGCAGGA	232	Pos: 66Rv	GGGTATCTGGCAAGCTCAT	233
67	TCONS 00085563	Pos: 67Fw	GGCTAGTCCCAAGAAAGCTG	234	Pos: 67Rv	GCACAGGCACGCTCAATA	235
68	TCONS 00082539	Pos: 68Fw	GGGTGGCAACAGTTTGTAA	236	Pos: 68Rv	GACAGTGGGGCCAGAAAGTA	237
69	TCONS 00091095	Pos: 69Fw	TCTGGCAAAACAGATGAAGG	238	Pos: 69Rv	GGGGTGAAGATTTGTTGTT	239
70	TCONS 00138506	Pos: 70Fw	CAGCAAGGAGGAGGACAGTGG	240	Pos: 70Rv	CGATTGTCCAGGAGAGGAA	241
71	TCONS 00035323	Pos: 71Fw	CGATGCTTGACTTGGGTGAT	242	Pos: 71Rv	AGAGGTACATGTGGCAGTG	243
72	TCONS 00121355	Pos: 72Fw	TCTGCTGCTCTCTGTGGAT	244	Pos: 72Rv	TGCTCCAGGTAAATGCAGAC	245
73	TCONS 00003456	Pos: 73Fw	GACATCCATGACGTGTGAGC	246	Pos: 73Rv	ACGAAAGGTACGAGTAGGT	247
74	TCONS 00073970	Pos: 74Fw	CTATAGGGAGGCTTGGCAGA	248	Pos: 74Rv	TTTCCCAAGCCAGCTACAG	249

[0101]

[表6]

トランスクリプト		F-プライマー		R-プライマー	
配列番号	シーケンス名	名前	配列	名前	配列
75	TCONS_0006275	Nega 1Fw	GGACGATGACTTTCAGCT	Nega 1Rv	TTTTCTCCCAATTTGGTG
76	TCONS_00011573	Nega 2Fw	AAGACGACGAGAACACAG	Nega 2Rv	TGTGACGAGCTAAAGGGACT
77	TCONS_00019733	Nega 3Fw	AGGCGACGACATTAAGC	Nega 3Rv	GGGACTTCCCAAAATGGTCT
78	TCONS_00173676	Nega 4Fw	GTCATACCAATTGGGATTG	Nega 4Rv	CCGAGGACCTGACTAAACCA
79	TCONS_00094001	Nega 5Fw	GGGACTTCCCAAAATGGTCT	Nega 5Rv	GAGCGCGGACAGATATATA
80	TCONS_00173026	Nega 6Fw	CATCAGTCTAAGCGGCTTC	Nega 6Rv	CCCATAGGAGGAGTCAAGAA
81	TCONS_00156352	Nega 7Fw	CATCGATGGACAGAGTGG	Nega 7Rv	CGAATTTCTCGAGGCTCTG
82	TCONS_00083784	Nega 8Fw	GGCTGACGCTGTTGCTTAG	Nega 8Rv	TACATGGGCTTGGCTTACC
83	TCONS_00006277	Nega 9Fw	TGGAGGACGACACATGAAA	Nega 9Rv	TCTTTGTGCGCTAGCTGGTT
84	TCONS_00012382	Nega 10Fw	TCCGACTTACCTGCTAGATAGTC	Nega 10Rv	TTAGTGAGGTTCTCGATGG
85	TCONS_00077763	Nega 11Fw	GGAGGCGGACGCTATACAT	Nega 11Rv	AGGGTGAATGCACATGATGCG
86	TCONS_00002882	Nega 12Fw	CCGACCAATGATATGACGAG	Nega 12Rv	GGAGCGCTTTTACCTCAGC
87	TCONS_00084241	Nega 13Fw	AGGTGACCAAGCTGGTCAAT	Nega 13Rv	GGGCTTGATCGAGAAACAA
88	TCONS_00031990	Nega 14Fw	CAGTACTGAGGACGAGCA	Nega 14Rv	GGCGCTGCTGCTCATCGCT
89	TCONS_00118931	Nega 15Fw	CTACTACGACGACATCACTA	Nega 15Rv	GCTGATGTACGAGGCGCTATA
90	TCONS_00101035	Nega 16Fw	CGCTCGATTGGGACGACAG	Nega 16Rv	GGCGCTGACGCTATACCTTA
91	TCONS_00006274	Nega 17Fw	GGAGGCAATGACTTTCAGCT	Nega 17Rv	TTTTCTCCCAATTTGGTG
92	TCONS_00056062	Nega 18Fw	GACTTCTTCTGGGCGTCTG	Nega 18Rv	CACATGGGCGTGTGATGAC
93	TCONS_00188154	Nega 19Fw	CGTTAGGTTGAGCGCTGGTGT	Nega 19Rv	GCTCAGCCAAATGACCAACT
94	TCONS_00020405	Nega 20Fw	TTGATTGGCTTGGACAGGCT	Nega 20Rv	AGCAGCCAAAGACATCCAG
95	TCONS_00161192	Nega 21Fw	GATTGCTGGGCTGCTATCT	Nega 21Rv	CAGACAGACAGAGAGCCAAA
96	TCONS_00030331	Nega 22Fw	ACTTGGCTTACCGCGGACT	Nega 22Rv	AGGAGCTTGGCTGACTTTGT
97	TCONS_00080825	Nega 23Fw	TGAGAGACTTGGGAGTGTGG	Nega 23Rv	CGATGTTAATGAGGCGCTGT
98	TCONS_00131058	Nega 24Fw	AAGTTGAGCTGCTGCGGACT	Nega 24Rv	GGCTGTAGGTTGTGGGCTTC
99	TCONS_00022351	Nega 25Fw	TGGCTGAGCTGAGTGGATAG	Nega 25Rv	ATGGCTTACGACGCCATAGA
100	TCONS_00168167	Nega 26Fw	GGACTTACTGGCGCAAGGTC	Nega 26Rv	GGGCTAGAGGCTTACGATGG
101	TCONS_00022380	Nega 27Fw	AAGGAGTCAATATGCCAGGCT	Nega 27Rv	CCGAAATGGAGGCTTATCCA

[表7]

	Fプライマー			Rプライマー		
	名前	配列	配列番号	名前	配列	配列番号
vasa	vasa-fw	ATGTGCGGSAAGCCCTCTGTGAGA	304	vasa-rv	CAGCCTCTTCAAAAGCCATGATTGC	305
b-actin	b-actin-fw	TGCACAAGGAGATCACTCTCT	306	b-actin-rv	TTGCTGATCCACATCTGTG	307

[0102] PCRの条件は、95℃で15分間処理したのち、「95℃で15秒、60℃で1分」の反応を45回おこなった。データの解析は、Microsoft Excel (Microsoft) を用いて、 $\Delta\Delta C_t$ 法 (Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method." methods 25.4 (2001): 402-408.) によりおこなった。

[0103] qRT-PCRの結果に基づいて、それぞれのトランスクリプトのSP細胞と非SP細胞での発現量を比較した。Student's t-testにより、有意差検定もおこなった。このqRT-PCRでの比較は、blastでの対応付けを行う例1(3) SPマイクロアレイとの比較より、高い精度で解析することができる。また、例1(3) SPマイクロアレイでは、アレイ上にプロットされている限られた遺伝子しか解析できなかったのに対して、qRT-PCRでは、全ての候補遺伝子に対して解析を行うことができる。その結果、生着細胞を特徴づけるトランスクリプト74個の配列(配列番号1~74)に対して、SP細胞と非SP細胞との発現量に差が見られ、非SP細胞に比べてSP細胞で高発現する39個のトランスクリプト(配列番号1、3、4、6、9、11、12、18、21、22、24、25、26、27、28、31、32、33、35、37、38、43、44、45、46、47、49、51、52、53、54、56、57、58、60、63、65、70、73に対応する)が得られた。これらの中でも15個のトランスクリプト(配列番号9、11、18、25、28、32、35、37、38、44、47、49、52、65、70に対応する)では、発現量の差が2倍以上あることが確認されたか、あるいは、発現量の差は2倍以

下ではあるがS P細胞で有意に高発現することが認められた。発現量の差が2倍以上あることが確認されたのは、11個のトランスクリプト（配列番号9、11、25、28、35、37、44、47、49、52、65に対応する）である。これらの中でも特に、3個のトランスクリプト（配列番号25、28、47に対応する）では、発現量の差が2倍以上あることが確認され、かつ、S P細胞で有意に高発現することも認められた。

[0104] また、非生着細胞を特徴づけるトランスクリプト27個の配列（配列番号75～101）に対して、S P細胞と非S P細胞との発現量に差が見られ、S P細胞に比べて非S P細胞で高発現する19個のトランスクリプト（配列番号75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、86、88、91、92、93、95、96、97、98に対応する）が得られた。これらの中でも7個のトランスクリプト（配列番号75、78、81、83、86、88、98に対応する）では、発現量の差が2倍以上あることが確認されたか、あるいは、発現量の差は2倍以下ではあるが非S P細胞で有意に高発現することが認められた。発現量の差が2倍以上あることが確認されたのは、5個のトランスクリプト（配列番号78、81、83、86、88に対応する）である。これらの中でも特に、2個のトランスクリプト（配列番号78、86に対応する）では、発現量の差が2倍以上あることが確認され、かつ、非S P細胞で有意に高発現することも認められた。

[0105] 発現量の差が2倍以上あることが確認され、かつ、有意差も認められた、生着細胞を特徴づける、3個のトランスクリプト（配列番号25（TCONS_00162389）、配列番号28（TCONS_00095523）、配列番号47（TCONS_00101612））および非生着細胞を特徴づける、2個のトランスクリプト（TCONS_00173676、TCONS_00002882）および*v a s a*についての結果を図9に示す。

[0106] 例4：免疫組織化学染色

例3のq R T－P C R法により、S P細胞と非S P細胞間で発現に有意な差が認められ、かつ、非S P細胞に比べS P細胞で最も高発現していた配列番号28に対応するトランスクリプトについて、未成熟精巣において、一部

のA型精原細胞で高発現しているか否かを確かめるために、免疫組織化学染色をおこなった。まず、配列番号28がコードするタンパク質の一部に対する抗体を作成するために、ペプチド（PKWETDSKISCEQT（配列番号：308））を合成し、モルモットに免疫することで抗血清（GP8023）を得た。

[0107] 免疫組織化学染色を行うために、12.5ヶ月齢の未成熟ニジマスの精巣を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（PFA）で固定し、常法に従って、パラフィン切片を作成した。作成したパラフィン切片を、脱パラフィン、親水処理、HistovT ONE（ナカライテスク株式会社製）による抗原の賦活化、ブロックエース（雪印メグミルク株式会社製）によるブロッキングに供したのち、1次抗体反応をおこなった。1次抗体反応は、上記の抗体（GP8023）をCan Get Signal Solution B（T0Y0B0）を用いて1000倍希釈したものを用いて、4℃で16時間おこなった。2次抗体反応には、Alexa Fluor 488 conjugated anti-guinea pig IgGをCan Get Signal Solution A（T0Y0B0）を用いて200倍希釈したものを用いて、室温で1時間おこなった。

[0108] 蛍光顕微鏡（オリンパス社製）を用いて配列番号28に対応するトランスクリプトがコードするタンパク質の発現を観察したのち、ヘマトキシリンエオシン（HE）染色に供し、明視野観察により、細胞の形態を観察した。結果を図10に示す。

[0109] 図10に示されるように、配列番号28がコードするタンパク質の一部に結合する抗体は、未成熟精巣において、一部のA型制限細胞で強いシグナルが認められた。すなわち、配列番号28に対応するトランスクリプトがコードするタンパク質が、未成熟精巣において、一部のA型精原細胞で強く発現することが確認された。この強い発現が認められたA型精原細胞は、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞であると考えられる。

請求の範囲

[請求項1]

下記（Ⅰ）の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカー
および／または（Ⅱ）の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞
識別マーカーを含んでなる、生殖細胞識別マーカー：

（Ⅰ）下記（a）～（f）から選択される1または2以上のポリヌ
クレオチドからなる生殖細胞識別マーカー：

（a）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1ま
たは2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（b）配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1ま
たは2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであっ
て、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌ
クレオチド、

（c）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1ま
たは2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個の塩基が欠
失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／または
その一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で
表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する
生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（d）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1ま
たは2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有する
ヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺
への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（e）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1ま
たは2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子を
コードするポリヌクレオチド、および

（f）前記（a）～（e）のいずれかに示されるヌクレオチド配
列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと
高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

であって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(l l) 下記 (g) ～ (l) から選択される 1 または 2 以上のポリヌクレオチドからなる宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカー：

(g) 配列番号 7 5 ～ 1 0 1 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 配列願号 7 5 ～ 1 0 1 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(i) 配列番号 7 5 ～ 1 0 1 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(j) 配列番号 7 5 ～ 1 0 1 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列と少なくとも 7 0 % の同一性を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(k) 配列番号 7 5 ～ 1 0 1 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(l) 前記 (g) ～ (k) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有す

るポリヌクレオチド。

[請求項2] 生殖細胞識別マーカーが、宿主生殖腺への生着能の有無を識別する生殖細胞識別マーカーである、請求項1に記載のマーカー。

[請求項3] 下記（a）～（f）から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなる、生殖細胞識別マーカーが、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーである、請求項1または2に記載のマーカー：

（a）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（b）配列願号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（c）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（d）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（e）配列番号1～74のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

（f）前記（a）～（e）のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブ

リダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[請求項4] 宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーが、精原幹細胞（SSC）マーカーである、請求項1～3のいずれか一項に記載のマーカー。

[請求項5] 請求項4に記載のポリヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、SSC遺伝子検出用プライマーまたはプローブ。

[請求項6] 下記（g）～（l）から選択される1または2以上のポリヌクレオチドからなる、生殖細胞識別マーカーが、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーである、請求項1または2に記載のマーカー：

（g）配列番号75～101のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、

（h）配列願号75～101のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（i）配列番号75～101のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、付加、挿入または置換されたヌクレオチド配列、および／またはその一方または両末端への塩基の付加がなされたヌクレオチド配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

（j）配列番号75～101のヌクレオチド配列から選択される1または2以上のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有する塩基配列で表されるポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド、

(k) 配列番号 75～101 のヌクレオチド配列から選択される 1 または 2 以上のヌクレオチド配列からなる遺伝子のオルソログ遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および

(l) 前記 (g) ～ (k) のいずれかに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの相補配列からなるポリヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別機能を有するポリヌクレオチド。

[請求項7] 請求項 1～4 のいずれか一項に記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、

魚類の精巣または卵巣から、発現が有るもしくは発現が高い細胞を分離することを含んでなる、宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法。

[請求項8] 請求項 1、2 または 6 に記載の宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーを用いて、該宿主生殖腺への生着能を有さない生殖細胞識別マーカーの遺伝子の発現の有無および／または程度を検出して、

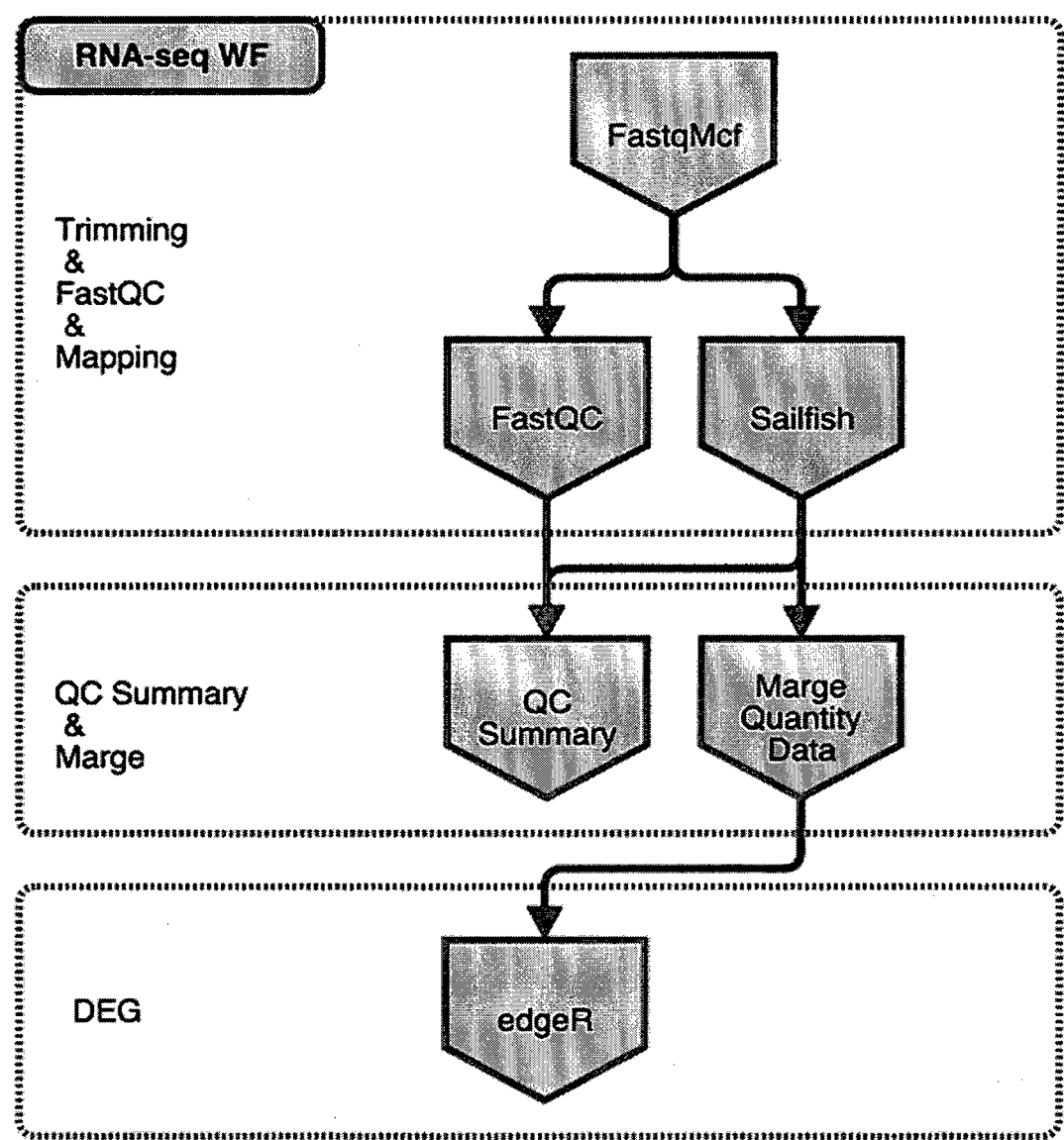
魚類の精巣または卵巣から、発現があるもしくは発現が高い細胞を分離することを含んでなる、請求項 7 に記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法。

[請求項9] 魚類が、サケ科魚類またはサバ科魚類である、請求項 7 または 8 に記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞生産方法。

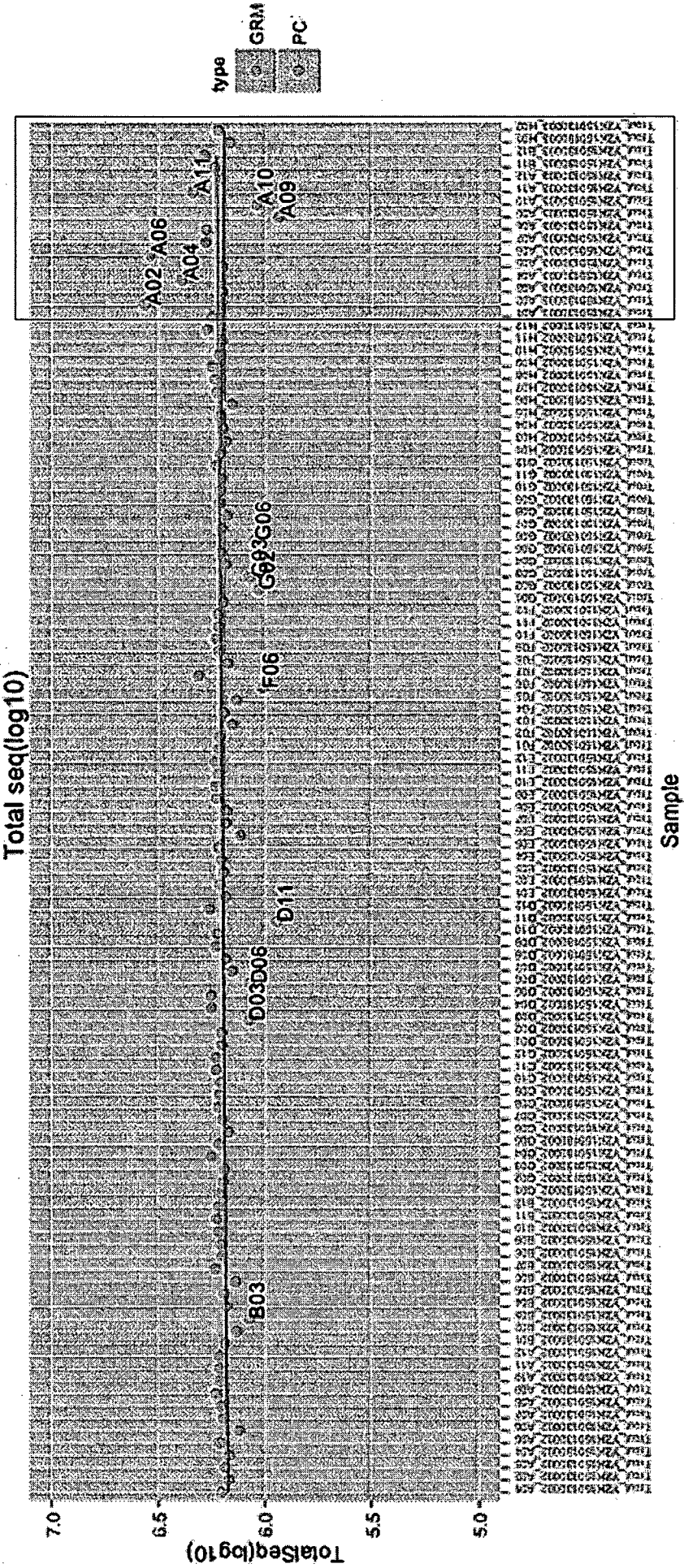
[請求項10] 請求項 1～4 のいずれか一項に記載の宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別マーカーがコードするタンパク質の一部に結合する、

宿主生殖腺への生着能を有する生殖細胞識別抗体。

[図1]



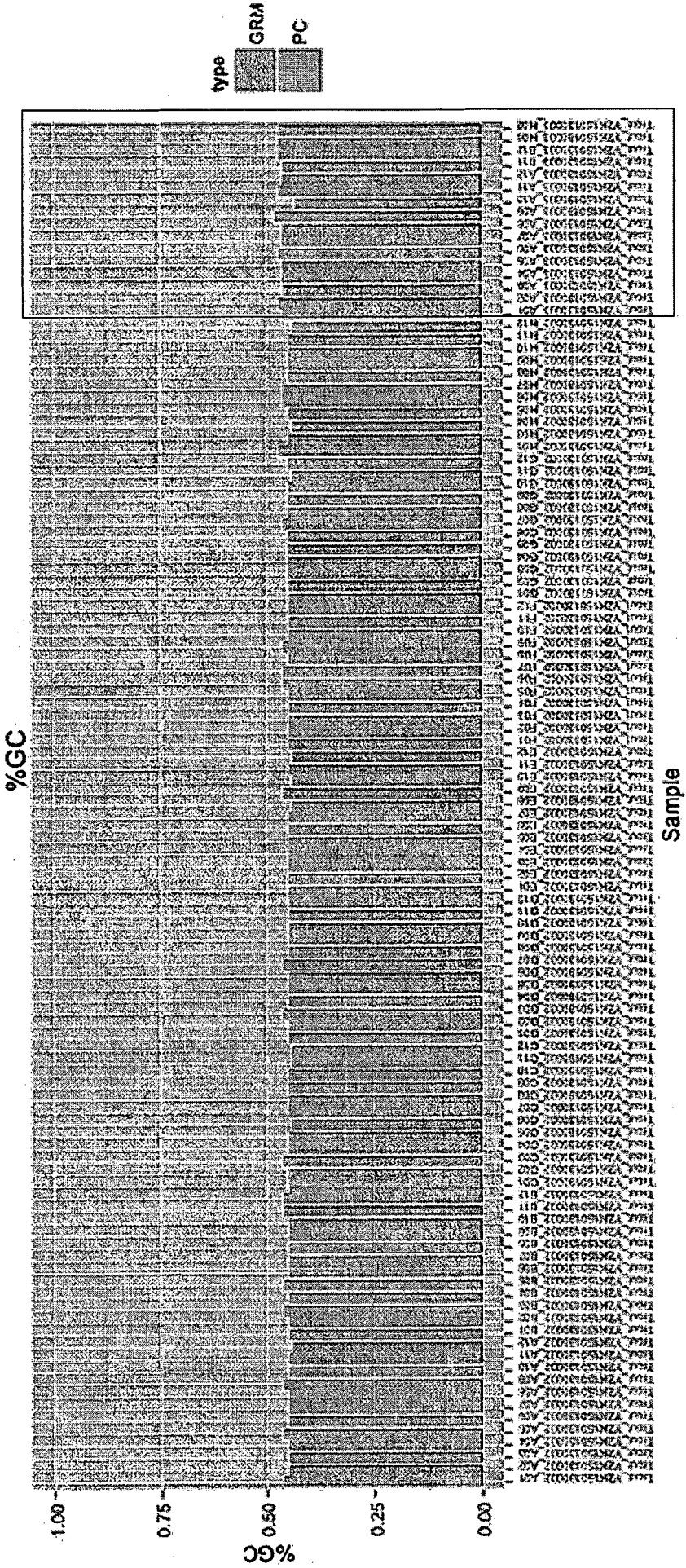
[図2]



生着後

生着前

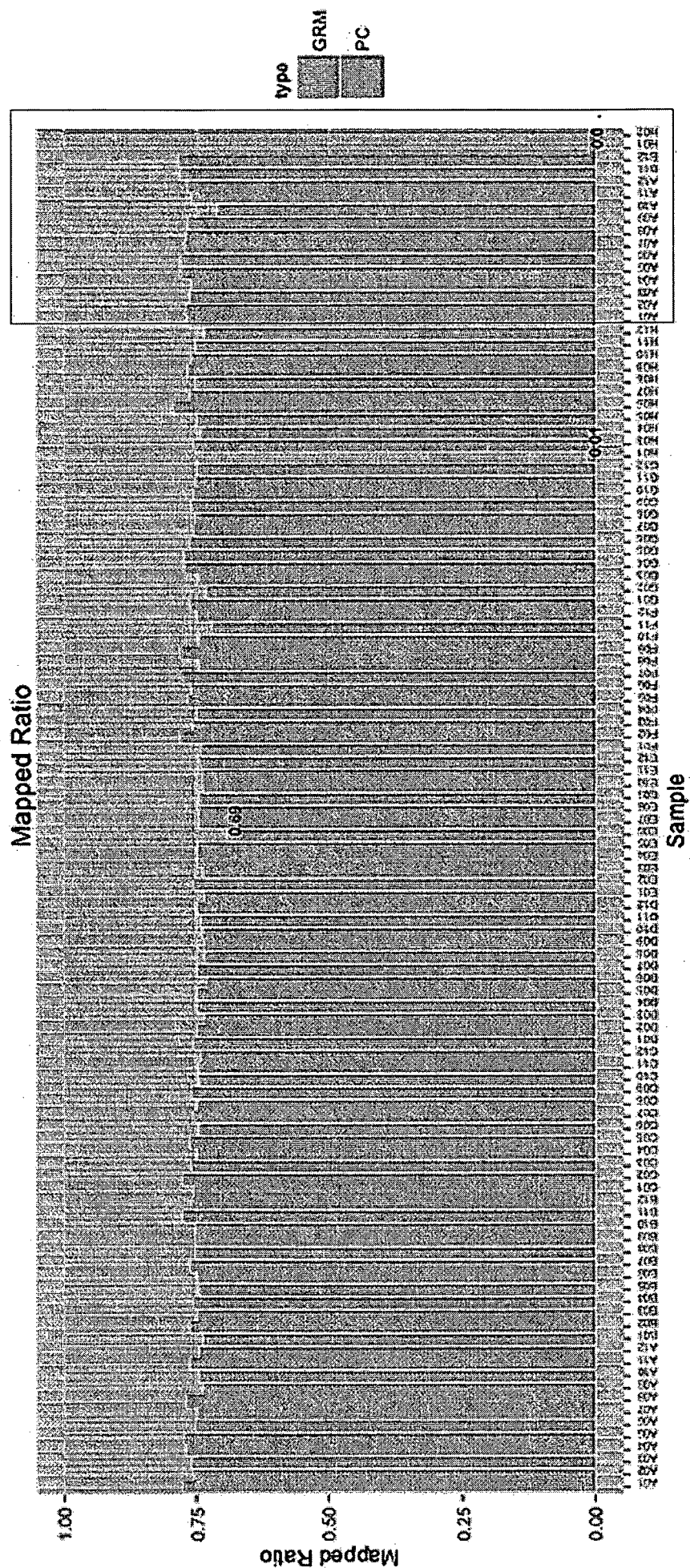
[図3]



生着後

生着前

[図4]

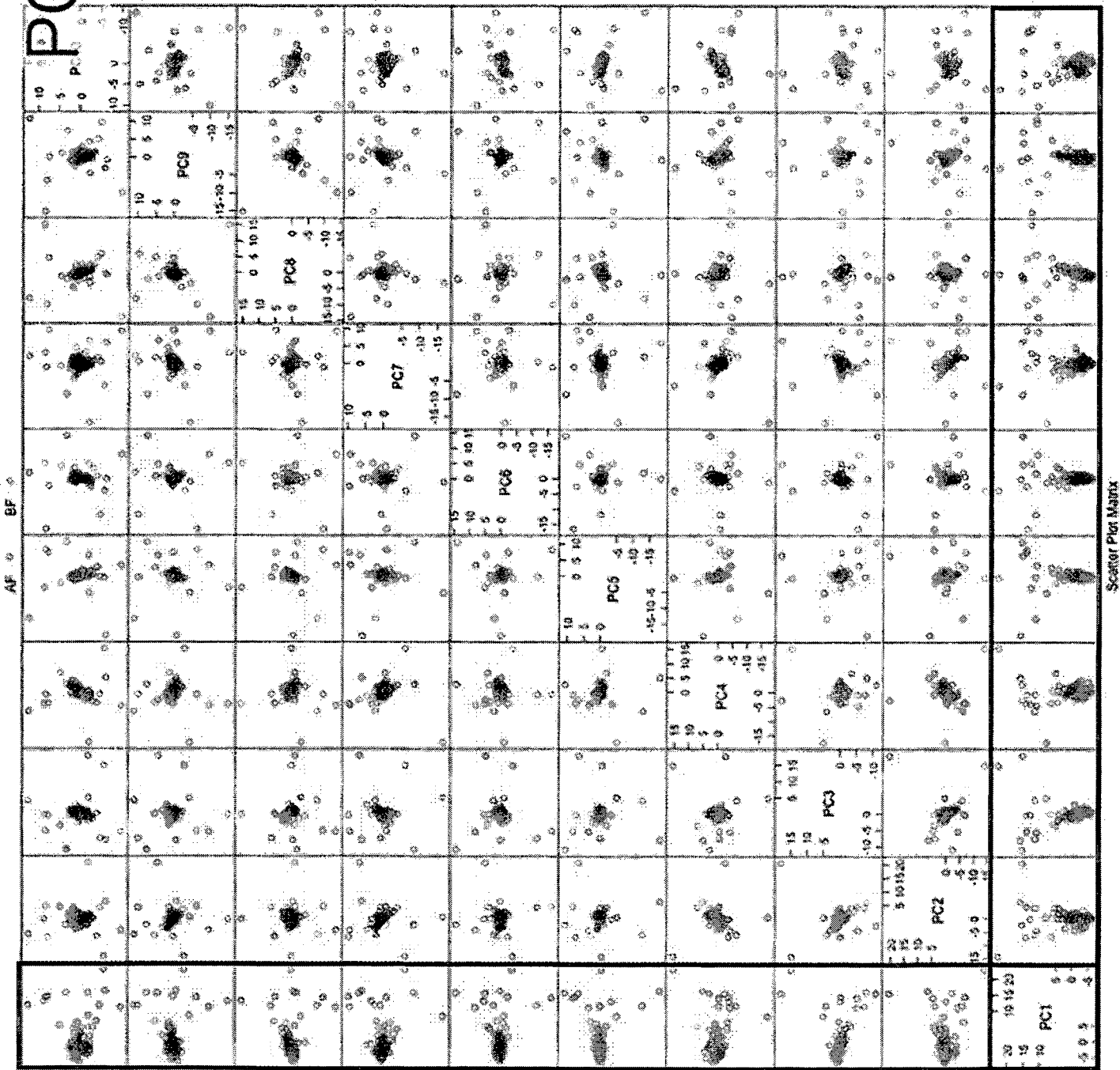


後着生

移植前

PCA pairplot [図5]

○移植細胞_94細胞
○生着細胞_13細胞
2904遺伝子



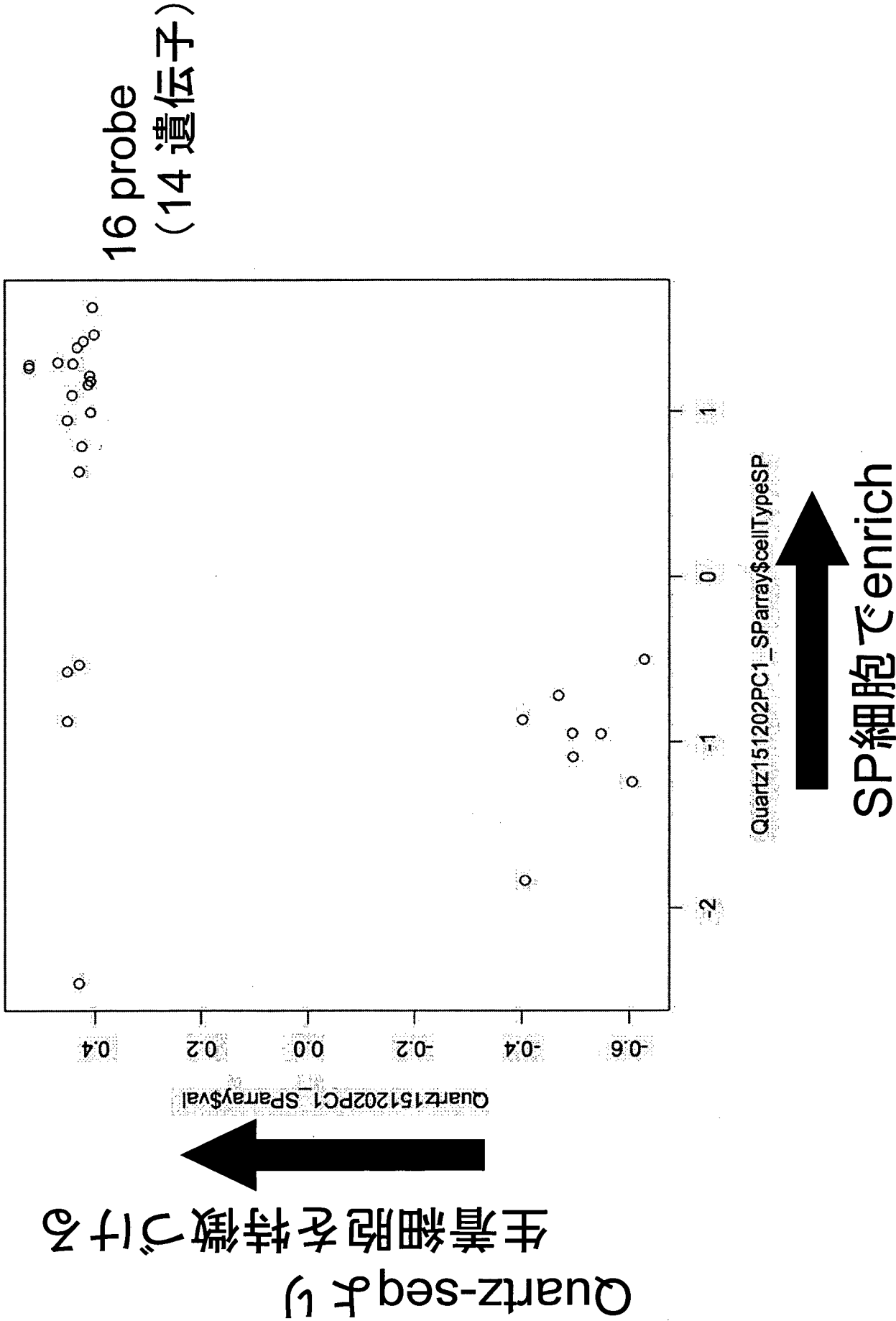
[図6]

Ranking of factor loading (PC1)

相関係数: $> 0.4 = 101$ 遺伝子/2904遺伝子

gene	val	smb1(zebrafish)	ortholog(all fish)	smb1 (all fish)	logFC
TCONS_00006275	-0.672543007	hsp70.1	ENSTNIP000000000201	hspa8	3.885931
TCONS_00011573	-0.639754993	prpf38b	ENSDARP00000112649	prpf38b	4.23302
TCONS_00019733	-0.636178098	NA	NA	NA	5.108401
TCONS_00173676	-0.635101767	zgc:158463	ENSDARP00000110127	zgc:158463	3.333929
TCONS_00094001	-0.631052938	NA	NA	NA	5.424907
TCONS_00170028	-0.628667778	NA	NA	NA	4.912697
TCONS_00158352	-0.627993434	NA	ENSXMAP0000000020420		1.982421
TCONS_00083784	-0.60529751	NA	NA	NA	4.781318
TCONS_00006277	-0.604520856	hsp70.1	ENSTRUP000000000051		9.91768
TCONS_00000365	0.595383486	tuba1b	ENSLOCP0000000004970	TUBA1C	-3.071992

[図7]



[図8-1]

a

Query ID	Subject ID	% identity	alignment len	mismatches	gap openings	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score
TCOXS_0000365	ENS_TMT00000015714.1	85.58	721	101	2	12	729	859	1379	0	752
TCOXS_0006367	ENS_TMT00000019770.1	86.59	245	33	0	535	790	1311	1066	3.00E-72	272
TCOXS_0007394	ENS_TMT00000020762.1	82.43	1406	235	10	1730	3128	208	1607	0	1218
TCOXS_00021563	ENS_TMT000000009941.1	86.92	214	19	6	205	415	882	1089	2.00E-59	231
TCOXS_00150070	ENS_TMT000000013541.1	86.05	1305	166	6	332	1620	91	1395	0	1387
TCOXS_00077769	ENS_TMT000000215566.1	88.79	348	39	0	1856	2203	2232	1885	2.00E-118	427
TCOXS_00079416	ENS_TMT000000008261.1	89.75	566	58	0	3	568	637	1402	0	725
TCOXS_00042870	ENS_TMT000000011078.1	85.7	1329	190	0	1	1329	47	1375	0	1402
TCOXS_00105702	ENS_TMT000000011591.1	83.6	1364	218	6	112	1470	66	1427	0	1266
TCOXS_00170731	ENS_TMT00000021438.1	83.81	105	15	2	1039	1162	480	503	2.00E-19	99
TCOXS_00109663	ENS_TMT000000018228.1	81.08	962	180	2	362	1322	154	1114	0	767
TCOXS_00121439	ENS_TMT000000014023.1	83.23	471	79	0	1	471	1066	1536	2.00E-120	433
TCOXS_00020371	ENS_TMT000000015714.1	85.61	709	99	2	522	1227	671	1379	0	741
TCOXS_00010460	ENS_TMT000000022810.1	78.73	832	154	16	1	828	1	813	3.00E-151	534
TCOXS_00012506	ENS_TMT000000014563.1	74.35	1349	278	53	385	1717	338	1634	5.00E-144	512
TCOXS_00147715	ENS_TMT000000020680.1	77.47	1052	213	19	14	1053	322	1361	6.00E-173	606
TCOXS_00150068	ENS_TMT000000013541.1	83.87	595	61	5	70	549	151	745	1.00E-156	550
TCOXS_00039256	ENS_TMT000000007794.1	83.95	393	61	0	318	597	136	515	7.00E-100	364
TCOXS_00055563	ENS_TMT000000007392.1	73.53	767	181	21	211	965	76	932	1.00E-71	272
TCOXS_00082559	ENS_TMT000000020330.1	79.59	1264	259	21	240	1489	1	1239	0	878
TCOXS_00091095	ENS_TMT000000018252.1	84.8	1342	190	6	448	1789	4	1332	0	1336
TCOXS_00073970	ENS_TMT000000007760.1	85.46	1348	194	2	3553	4896	18	1564	0	1402
TCOXS_00073970	ENS_TMT000000007760.1	82.59	1530	249	13	6885	8507	3081	4803	0	1382

[図8-2]

b

Query ID	Subject ID	% identity	alignment len	mismatches	gap openings	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score
TCONS_00000365	ENSONM10000000020450.1	88.31	676	79	0	13	688	899	1574	3.00E-74	311
TCONS_00000367	ENSONM10000000020950.1	88.61	254	32	2	580	782	1572	1320	3.00E-74	279
TCONS_00117364	ENSONM1000000004710.1	84.08	710	103	8	140	946	591	1293	0	676
TCONS_00117364	ENSONM1000000004710.1	79.31	203	28	11	1036	1240	1478	1874	5.00E-29	130
TCONS_00117340	ENSONM1000000000170.1	83.41	422	70	0	358	778	121	542	4.00E-108	332
TCONS_00073341	ENSONM10000000025428.1	84.51	1427	215	6	1709	3132	159	1582	0	1406
TCONS_00021583	ENSONM10000000016230.1	85.76	337	43	0	166	502	682	1018	7.00E-97	357
TCONS_00049412	ENSONM10000000007886.1	78.13	375	62	15	125	492	520	881	4.00E-56	229
TCONS_00150070	ENSONM10000000025501.1	88.04	1338	160	0	335	1672	1	1338	0	1585
TCONS_00077768	ENSONM10000000015658.1	83.89	1188	182	5	91	1253	355	1517	0	1107
TCONS_00078416	ENSONM10000000006374.1	88.75	560	57	1	3	582	812	1385	0	683
TCONS_00042870	ENSONM10000000035501.1	87	1338	174	0	1	1338	1	1338	0	1507
TCONS_00182389	ENSONM10000000011768.1	76.54	780	153	21	229	981	18	782	3.00E-110	359
TCONS_00105702	ENSONM10000000022106.1	84.43	1394	213	4	107	1498	119	1510	0	1389
TCONS_00125929	ENSONM10000000022743.1	79.53	601	110	8	580	1155	684	1256	6.00E-115	476
TCONS_00170731	ENSONM10000000006294.1	82.79	895	136	12	363	1253	188	1048	0	784
TCONS_00170731	ENSONM10000000006294.1	87.95	365	35	7	1414	1773	1216	1576	2.00E-116	422
TCONS_00170731	ENSONM10000000006294.1	97.73	193	13	6	2295	2443	1983	2142	8.00E-45	183
TCONS_00121439	ENSONM10000000006240.1	86.32	475	85	0	1	475	1219	1693	1.00E-145	518
TCONS_00000371	ENSONM10000000020360.1	88.27	685	78	0	522	1186	910	1574	0	797
TCONS_00000371	ENSONM10000000020360.1	86.09	381	52	1	90	489	265	845	7.00E-113	409
TCONS_00090339	ENSONM10000000005456.1	73.1	1052	228	38	16	1050	672	1885	2.00E-87	324
TCONS_00010460	ENSONM10000000023710.1	80.02	931	145	13	1	828	562	1374	2.00E-159	595
TCONS_00130088	ENSONM10000000018436.1	86.55	580	78	0	70	649	338	917	0	640
TCONS_00004385	ENSONM10000000025860.1	77.51	378	50	22	4785	5309	2842	3217	8.00E-48	195
TCONS_00082538	ENSONM10000000015380.1	77.24	1696	315	44	233	1893	281	1923	0	928
TCONS_00052539	ENSONM10000000015390.1	91.46	82	1	3	3880	3971	5342	5417	7.00E-22	106
TCONS_00091095	ENSONM10000000008572.1	87.02	1341	185	4	449	1789	1	1332	0	1504
TCONS_00000456	ENSONM10000000009488.1	78.84	372	71	3	104	473	6837	7206	7.00E-71	263
TCONS_00073870	ENSONM10000000008993.1	84.96	532	76	4	5912	6441	2539	3128	2.00E-150	536

[図8-3]

C

Query ID	Subject ID	% identity	alignment len	mismatches	gap openings	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score
TCONS_00000365	super_scaffold3a00001096.g1849	85.86	672	85	0	12	660	883	660	1.331	715
TCONS_00063827	super_scaffold3a00004310.g18653	85.94	249	33	2	535	1289	762	1289	5.00E-70	285
TCONS_00117364	super_scaffold3a00002718.g15094	84.2	709	105	5	141	843	843	19	726	682
TCONS_00173490	super_scaffold3a00000800.g1369	82.28	412	72	1	368	779	779	129	539	355
TCONS_00073341	super_scaffold3a00001335.g10113	84.69	1424	214	4	1709	3130	2130	96	1517	1419
TCONS_00021583	super_scaffold3a00002131.g12994	84.1	346	55	0	159	552	504	552	2.00E-90	335
TCONS_00086383	super_scaffold3a00002584.g14735	81.63	430	79	0	339	788	788	38	465	357
TCONS_00150070	super_scaffold3a00002540.g14895	88.79	1322	175	1	355	1685	1685	1	1322	1483
TCONS_00077769	super_scaffold3a00003764.g17834	87.18	273	35	0	273	1856	2128	273	1	311
TCONS_00078416	super_scaffold3a00002648.g19231	88.14	426	42	0	3	428	428	436	4.00E-157	555
TCONS_00078416	super_scaffold3a00004848.g19231	88.11	429	51	0	93	521	521	3037	1.00E-143	510
TCONS_00078416	super_scaffold3a00004848.g19231	81.35	104	8	0	450	553	553	3038	4.00E-33	143
TCONS_00042870	super_scaffold3a00002843.g14895	81.91	1332	172	1	1332	1	1331	1	1332	1300
TCONS_00105302	super_scaffold3a00000893.g1887	88.18	1114	154	0	241	1354	1354	1	1114	1208
TCONS_00108838	super_scaffold3a00003403.g18855	80.38	1060	171	24	119	1155	1155	436	1481	771
TCONS_00179231	super_scaffold3a00001087.g8384	83.88	823	118	11	363	1193	1193	331	1137	760
TCONS_00108883	super_scaffold3a00006892.g2123	82.15	947	151	7	383	1305	1305	93	1025	885
TCONS_00173443	super_scaffold3a00003452.g18869	83.9	323	52	0	250	572	572	218	540	309
TCONS_00080339	super_scaffold3a0000387.g4383	75.17	715	178	14	531	1230	1230	429	1137	198
TCONS_00010480	super_scaffold3a00003379.g16793	81.06	829	140	11	1	828	828	1	813	645
TCONS_00157221	super_scaffold3a00002726.g15114	79.2	851	162	11	3003	3841	3841	1336	2193	577
TCONS_00147715	super_scaffold3a00002011.g23011	82.92	1138	187	8	1	1134	1134	99	1239	1016
TCONS_00150068	super_scaffold3a00003174.g1859	95.77	577	58	0	73	649	649	81	637	739
TCONS_00150088	super_scaffold3a00001274.g1859	95.43	219	10	0	852	879	879	889	1107	350
TCONS_00082509	super_scaffold3a00002726.g15112	78.88	1358	240	16	235	1487	1487	184	1400	826
TCONS_00091095	super_scaffold3a00001763.g1075	86.7	1331	168	6	449	1778	1778	1	1322	1469
TCONS_00003468	super_scaffold3a00003709.g17534	74.11	781	168	15	104	953	953	6258	7007	294
TCONS_00013970	super_scaffold3a00000809.g1936	84.28	1527	230	6	6588	8307	8307	3823	5344	1432
TCONS_00073979	super_scaffold3a00000909.g1936	83.27	735	114	1	3050	4294	4294	177	902	667
TCONS_00073970	super_scaffold3a00000909.g1936	84.29	681	105	2	8235	8914	8914	5342	6021	664
TCONS_00073970	super_scaffold3a00000909.g1936	86.32	541	74	0	5905	6445	6445	3582	8.00E-187	590

[図8-4]

d

Query ID	Subject ID	% identity	alignment	len mismatches	gap openings	q_start	q_end	s_start	s_end	e-value	bit score
TCOVS_00006275	ENSTNT000000007062.1	83.25	800	116	2	92	890	344	1142	1.142	822
TCOVS_00006275	ENSTNT000000007062.1	82.02	486	77	4	813	1367	1402	1853	3.00E-105	383
TCOVS_00006277	ENSTNT000000006502.1	82.25	834	132	13	25	850	25	850	0	706
TCOVS_00006274	ENSTNT000000006502.1	82.25	834	132	13	184	882	25	850	0	706
TCOVS_00006062	ENSTNT0000000021406.1	87	823	96	7	41	862	1	813	0	917

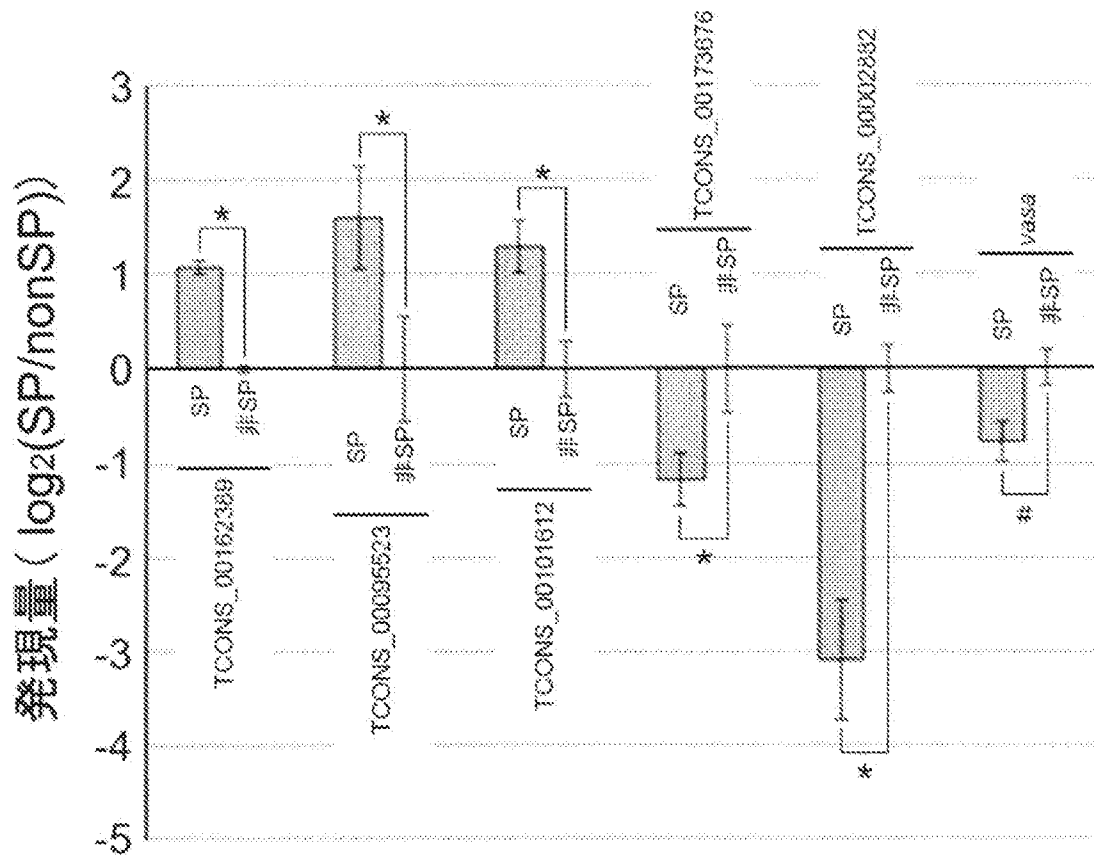
e

Query ID	Subject ID	% identity	alignment	len mismatches	gap openings	q_start	q_end	s_start	s_end	e-value	bit score
TCOVS_00006275	ENSONT0000000026773.1	87.41	683	84	2	93	774	345	1025	0	784
TCOVS_00006277	ENSONT0000000026773.1	85.79	556	76	3	25	579	25	578	4.00E-166	566
TCOVS_00006277	ENSONT0000000026773.1	89.33	253	27	0	585	850	855	967	2.00E-85	318
TCOVS_00006274	ENSONT0000000026773.1	85.79	556	76	3	164	718	25	578	4.00E-166	566
TCOVS_00006274	ENSONT0000000026773.1	89.33	253	27	0	737	989	855	907	2.00E-95	318
TCOVS_00005682	ENSONT000000002910.1	86.33	874	83	13	41	910	1	859	0	1031
TCOVS_00022851	ENSONT000000006417.1	76.57	1020	187	34	238	1222	490	1452	1.00E-143	512

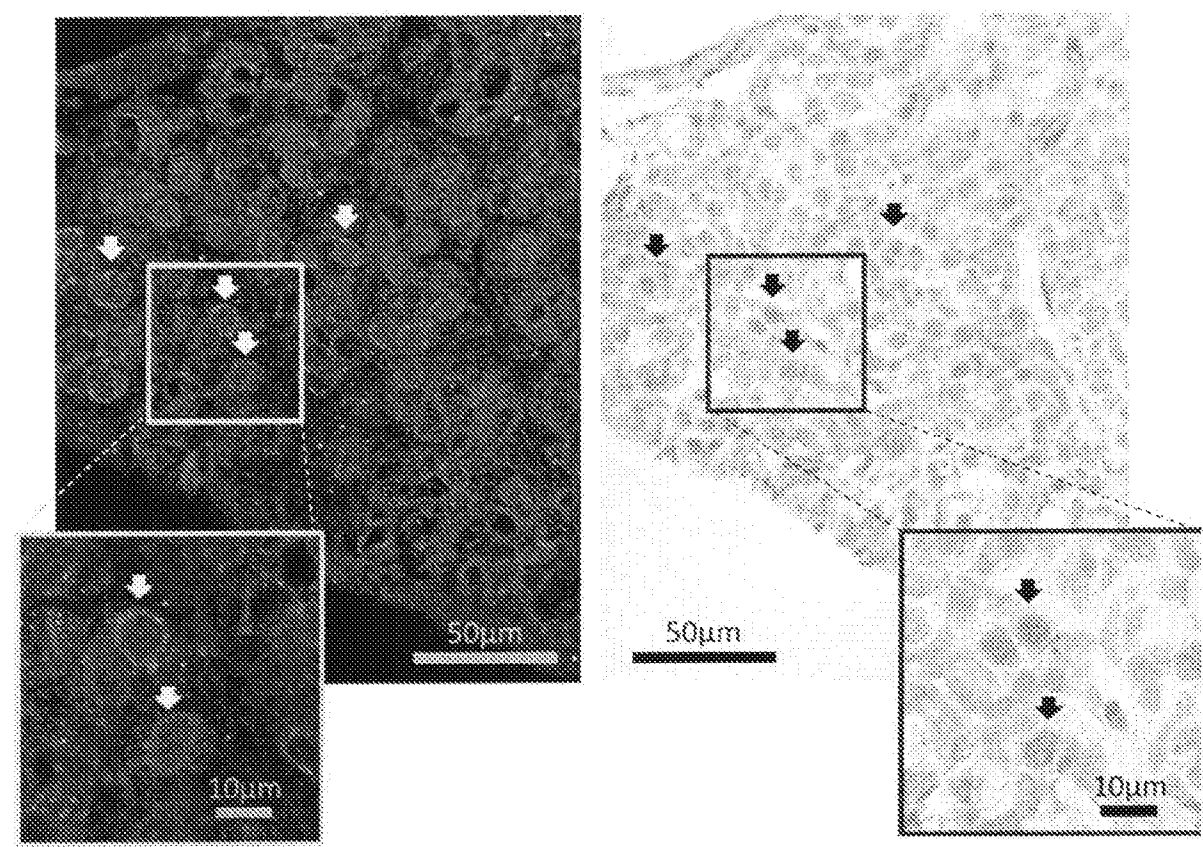
f

Query ID	Subject ID	% identity	alignment	len mismatches	gap openings	q_start	q_end	s_start	s_end	e-value	bit score
TCOVS_00006275	supercaffold8a00003352.g16725	88.91	810	104	2	82	890	334	1142	0	907
TCOVS_00006275	supercaffold8a00003352.g16725	82.32	476	77	5	822	1394	1411	1880	1.00E-112	405
TCOVS_00006277	supercaffold8a00003352.g16725	85.25	590	85	2	1	589	1	589	2.00E-172	608
TCOVS_00006277	supercaffold8a00003352.g16725	82.25	459	78	5	851	1318	1418	1880	1.00E-109	388
TCOVS_00006277	supercaffold8a00003352.g16725	88.93	253	28	0	598	850	655	907	4.00E-84	313
TCOVS_00006274	supercaffold8a00003352.g16725	85.25	590	85	2	140	725	1	569	2.00E-172	605
TCOVS_00006274	supercaffold8a00003352.g16725	82.28	488	76	5	990	1456	1418	1880	1.00E-109	398
TCOVS_00006274	supercaffold8a00003352.g16725	88.93	253	28	0	737	989	585	907	4.00E-84	313
TCOVS_00006062	supercaffold8a0000232.g16258	85.3	347	37	9	44	386	1	337	2.00E-94	348
TCOVS_00022851	supercaffold8a00003139.g16207	75.09	797	151	17	617	1304	255	987	4.00E-66	370

[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/075(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K16/18, C12N5/075, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CR373234 AGENAE Rainbow trout normalized testis library (tcbi) Oncorhynchus mykiss cDNA clone tcbi0029.e.11 5', mRNA sequence [11-SEP-2006] retrieved from GenBank [online] Accession no. CR373234.2 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/90100225?sat=1&satkey=37471065]	1-5
X	Salmo salar clone ssal-eve-547-353 Microfibrillar-associated protein 2 precursor putative mRNA, complete cds [24-AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT056416.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT056416]	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 May 2017 (26.05.17)

Date of mailing of the international search report
13 June 2017 (13.06.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012112

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Salmo salar clone ssal-rgb2-555-140 Thyroliberin type A precursor putative mRNA, complete cds [24-AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT048522.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT048522]	1-5
X	Salmo salar clone ssal-eve-507-163 Tubulin beta-2C chain putative mRNA, complete cds [24- AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT056899.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/bt056899]	1-5
X	1284580 NCCCWA 03RT Oncorhynchus mykiss cDNA clone 03RT117M12 3-, mRNA sequence [29-DEC- 2006] retrieved from GenBank [online] Accession no. CX144839.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/cx144839]	1-5
X	EST_omyk_evn_814168 omykevn RBC Oncorhynchus mykiss cDNA Oncorhynchus mykiss cDNA clone omyk_evn_508_376 5-, mRNA sequence [20-NOV- 2008] retrieved from GenBank [online] Accession no. GE826476.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/ge826476]	1-2, 4-6
X	TSA: Oncorhynchus mykiss mRNA, contig: YGL02.4929.C1, mRNA sequence [21-DEC-2012] retrieved from GenBank [online] Accession no. FX355071.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/fx355071]	1-2, 4-6
Y	Makoto HAYASHI et al., "Shukushu Seishokusen eno Takai Seichakuno o Yusuru Nijimasu Seigen Saibo no Noshuku", Abstracts for the Annual Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science, 2011, page 36, particularly, Object, Results	1-10
Y	HAYASHI, M., et al., Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost, Biol. Reprod., 2014, Vol. 91, No. 1, pp. 1-8, particularly, Summary, Introduction, 1st paragraph of Results	1-10
Y	Fumika YANO et al., "DNA Microarray-ho ni yoru Nijimasu Seigen Saibo de Tokuiteki ni Hatsugen suru Idenshi no Tansaku", Abstracts for the Annual Meeting of the Japanese Society of Fisheries Science, 2005, page 49, particularly, Object, Method, Results	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012112

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/118778 A1 (Tokyo University of Marine Science and Technology), 01 October 2009 (01.10.2009), claims; paragraphs [0003] to [0007]; examples (Family: none)	1-10
Y	YAZAWA, R., et al., The Pacific Bluefin Tuna (Thunnus orientalis) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia, Mol. Reprod. Dev., 2013, Vol. 80, pp. 871-880, particularly, Summary	1-10
A	SALEM, M., et al., Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches, BMC Genomics, 2010, Vol. 11, 564	1-10
A	Goro YOSHIZAKI et al., "Production of trout offspring from salmon parents", BIO INDUSTRY, 2008, vol.25, no.5, pages 70 to 77	1-10
P,A	WO 2016/042684 A1 (Tokyo University of Marine Science and Technology), 24 March 2016 (24.03.2016), entire text (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/075(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C07K16/18, C12N5/075, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	CR373234 AGENAE Rainbow trout normalized testis library (tcbi) Oncorhynchus mykiss cDNA clone tcbi0029.e.11 5', mRNA sequence [11-SEP-2006] retrieved from GenBank [online] Accession no. CR373234.2 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/90100225?sat=1&satk ey=37471065]	1-5

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.05.2017

国際調査報告の発送日

13.06.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川合 理恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

4 0 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Salmo salar clone ssal-eve-547-353 Microfibrillar-associated protein 2 precursor putative mRNA, complete cds [24-AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT056416.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT056416]	1-5
X	Salmo salar clone ssal-rgb2-555-140 Thyroliberin type A precursor putative mRNA, complete cds [24-AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT048522.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BT048522]	1-5
X	Salmo salar clone ssal-eve-507-163 Tubulin beta-2C chain putative mRNA, complete cds [24-AUG-2010] retrieved from GenBank [online] Accession no. BT056899.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/bt056899]	1-5
X	1284580 NCCCWA 03RT Oncorhynchus mykiss cDNA clone 03RT117M12 3-, mRNA sequence [29-DEC-2006] retrieved from GenBank [online] Accession no. CX144839.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/cx144839]	1-5
X	EST_omyk_evn_814168 omykevn RBC Oncorhynchus mykiss cDNA Oncorhynchus mykiss cDNA clone omyk_evn_508_376 5-, mRNA sequence [20-NOV-2008] retrieved from GenBank [online] Accession no. GE826476.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/ge826476]	1-2, 4-6
X	TSA: Oncorhynchus mykiss mRNA, contig: YGL02.4929.C1, mRNA sequence [21-DEC-2012] retrieved from GenBank [online] Accession no. FX355071.1 [retrieved on 25 May 2017] URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/fx355071]	1-2, 4-6
Y	林誠ほか, 宿主生殖腺への高い生着能を有するニジマス精原細胞の濃縮, 日本水産学会大会講演要旨集, 2011, p. 36, 特に, 目的, 結果	1-10
Y	HAYASHI, M., et al., Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost, Biol. Reprod., 2014, Vol. 91, No. 1, pp. 1-8, 特に, 要旨, 緒言, 結果の第1段落	1-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	矢野文香ほか, DNA マイクロアレイ法によるニジマス精原細胞で特異的に発現する遺伝子の探索, 日本水産学会大会講演要旨集, 2005, p. 49, 特に, 目的, 方法, 結果	1-10
Y	WO 2009/118778 A1 (国立大学法人東京海洋大学) 2009.10.01, 特許請求の範囲、[0003]–[0007]、実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	YAZAWA, R., et al., The Pacific Bluefin Tuna (<i>Thunnus orientalis</i>) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia, Mol. Reprod. Dev., 2013, Vol. 80, pp. 871-880, 特に, 要旨	1-10
A	SALEM, M., et al., Characterization of the rainbow trout transcriptome using Sanger and 454-pyrosequencing approaches, BMC Genomics, 2010, Vol. 11, 564	1-10
A	吉崎悟朗ほか, ニジマスしか生まないヤマメの作出, BIO INDUSTRY, 2008, Vol. 25, No. 5, pp. 70-77	1-10
P, A	WO 2016/042684 A1 (国立大学法人東京海洋大学) 2016.03.24, 全文 (ファミリーなし)	1-10