様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　１３　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2017
課題番号：　１５Ｋ１８５６７

研究課題名（和文）魚類の多様な繁殖様式を支える配偶子幹細胞の動態解析

研究課題名（英文）Analysis of Germ line stem cells playing pivotal roles in multiple reproductive strategies

研究代表者

林　誠（HAYASHI, MAKOTO）

筑波大学・生命領域学際研究センター・助教

研究者番号：５０７１４８３８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：魚類の多様な繁殖様式を担う配偶子幹細胞の研究において、配偶子幹細胞と分化を開始した細胞を識別するための分子マーカーの同定は必須である。そこで、本研究では、精子形成のもととなる精原幹細胞に着目し、ニジマスを用いて、その分子マーカーの同定を試みた。その結果、精原幹細胞のマーカーとして、3種類の転写産物を同定することに成功した。本研究で得られた成果は、魚類において、配偶子幹細胞の研究を行う上で基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In fish, reproductive strategies greatly differ: such as seasonal breeding, semelparity, iteroparity and so on. Germ line stem cells play pivotal roles in these reproductive strategies. In this study, we try to identify the molecular markers to identify spermatogonial stem cells. As a result, we successfully identify three transcripts preferentially expressed in spermatogonial stem cells. These finding will provide the basis for analyzing the germline stem cells in fish.

研究分野：　基礎生物学・発生生物学

キーワード：　配偶子幹細胞　精原幹細胞　ニジマス　魚類

１．研究開始当初の背景

魚類の繁殖様式は、他の動物群に比べ非常に多岐に渡ることが知られている。例えば、生涯において一度だけ配偶子を作り死亡する魚種もいれば、複数年にわたり繰返し配偶子を作る魚種もいる。また、明瞭な繁殖期を有する魚種では、繁殖期と非繁殖期において生殖腺の構造は大きく変化する。配偶子幹細胞はこれらの繁殖様式の根幹を担う細胞であるにも関わらず、その研究はほとんどされていない。その理由として、魚類の配偶子幹細胞を厳密に同定するための分子マーカーが単離されていないため、配偶子幹細胞と分化を開始した細胞を区別することが困難なことがあげられる。

これまでに、ニジマスを用いて、配偶子幹細胞の中でも、特に将来、数百億という精子を生産する精原幹細胞を機能的に同定する方法が開発されてきた。精巣生殖細胞を孵化稚魚腹腔に移植すると、一部の精原細胞のみが宿主生殖腺へと生着する。その後、生着した精原細胞は、宿主生殖腺内で増殖し、継続して精子を生産し続けることから、宿主生殖腺に生着した精原細胞こそが精原幹細胞であると考えられる。そこで、宿主生殖腺への生着能を有する精原幹細胞の分子マーカーを単離するために、フローサートメーターを用いて検出される Side population を指標とした方法や、マウス精原幹細胞の分子マーカーのホモログの解析などが行われてきた。しかし、これまで行われてきたいかなる方法においても、精原幹細胞の分子マーカーの単離には至っていないのが現状であった。

２．研究の目的

本研究では、ニジマスを用いて魚類精原幹細胞の分子マーカーを単離することを目的として研究を行った。そのために、高純度で濃縮された精原幹細胞、すなわち、宿主生殖腺に生着した直後の精原細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。

３．研究の方法

ニジマスを用いて、宿主生殖腺に生着した精原幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、精原幹細胞の分子マーカーの探索を試みた。宿主生殖腺に生着する精原幹細胞の数はごくわずかのため、従来の方法で網羅的な遺伝子発現解析を行うのに十分な数を得るのは困難であった。そこで、1 細胞レベルで網羅的に遺伝子発現解析をするための手法である Quartz-seq 法を用いて解析を行った。本法を用いることで、「移植に用いた全精原細胞（大部分が生着能をもたない）」と、「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」で、遺伝子発現を網羅的に比較した。

得られたデータを主成分分析（PCA 解析）に供することにより、精原幹細胞を特徴づけるのに寄与する遺伝子を探索した。

次に、精原幹細胞を特徴づけることが示唆された遺伝子について、qPCR 法により絞り込みを行った。これまでの研究から、宿主生殖腺への高い生着能をもつ細胞は、フローサイトメーターを用いて検出される Side population（SP）分画に濃縮されることが明らかになっている。そこで、精原幹細胞を特徴づけることが示唆された遺伝子について、SP 分画に含まれる細胞（SP 細胞）と、それ以外の細胞（非 SP 細胞）間で qPCR 法による発現量の比較を行った。

以上のスクリーニングにより、絞り込まれた遺伝子について、精巣組織において一部の精原細胞を特異的に標識するか否か明らかにするために組織染色を行った。

４．研究成果

全精原細胞に対して、宿主生殖腺に生着した精原幹細胞で有意に高発現する転写産物を同定するために、「移植に用いた全精原細胞（大部分が生着能をもたない）」を 94 細胞

と、「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」を 13 細胞単離し、Quartz-seq 法を用いて細胞ごとに遺伝子発現を網羅的に解析した。得られた結果を確認したところ、すべての細胞から、ほぼ均一に、1 細胞あたり約 150 万リードの情報が得られていることが明らかになった。さらに、ニジマスのトランスクリプトームデータへの map 率においても、すべての細胞で約 75%と均一な結果が得られた。以上の結果から、「移植に用いた全精原細胞（大部分が生着能をもたない）」と「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」のすべての細胞から、均一なデータが得られたことが示唆された。

そこで、得られたデータを解析し、「移植に用いた全精原細胞（大部分が生着能をもたない）」と「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」の間で遺伝子発現の比較を行った。その結果、2904 種類の転写産物において、これらの細胞間で発現に有意な差が認められた。

これら、2904 種類の転写産物の発現量情報を用いて、PCA 解析を行うことにより、「移植に用いた全精原細胞」と「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」の違いを特徴づけるのに寄与する転写産物の同定を試みた。その結果、第一主成分（PC1）においてこれらの二種類の細胞の違いが明瞭に識別されることが明らかになった。このことから、これら二種類の細胞の違いを特徴づけるのに寄与する遺伝子は、第一主成分（PC1）に対して高い相関を示す転写産物となる。そのような転写産物を探索したところ、相関係数が 0.4 以上のものが、101 種類同定された。さらに、そのうち 74 種類の転写産物は、「宿主生殖腺に生着した精原幹細胞」を特徴づけるのに寄与することが明らかになった。

次に、これら 74 種類の転写産物について絞り込みを行うために qPCR 法を用いて解析を行った。具体的には、宿主生殖腺への高い生着能を有する精原幹細胞が濃縮されることが明らかになっている SP 細胞と、非 SP 細胞間で、74 種類の転写産物の発現量を qPCR 法により比較した。その結果、非 SP 細胞にくらべ、SP 細胞で 2 倍以上高発現する転写産物を 11 種類同定することに成功した。これらの転写産物は、宿主生殖腺への高い生着能を有する精原幹細胞の分子マーカーの候補であると考えられる。

今後、これらの分子マーカーを用いて、精巣組織における発現解析を進めていく上で重要となるのは、組織染色において、精原幹細胞、すなわち、一部の精原細胞を特異的に標識することができるか否かである。そこで、これら 11 種類の転写産物をコードする遺伝子の発現を、*in situ* hybridization 法および免疫組織化学染色法により解析した。その結果、一部の精原細胞で特異的な発現が見られる遺伝子を 3 種類同定することに成功した。これらの遺伝子は、魚類において精原幹細胞を識別する分子マーカーとなり得ることが強く示唆された。

本研究の成果は、魚類精原幹細胞の動態を解析するに際し、精原幹細胞と分化を開始した細胞を識別するための分子マーカーを単離したことであり、今後の魚類の配偶子幹細胞研究の基礎となることが期待される。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　4　件）

(1) Hayashi, M., Sakuma, D., Yoshizaki, G.
Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout
Mol. Reprod. Dev., Vol. 85, pp155-162, 2018.
(査読有)
doi: 10.1002/mrd.22949.

(2) Sato, M., Hayashi, M., Yoshizaki, G.
Stem cell activity of type A spermatogonia is seasonally regulated in rainbow trout
Biol. Reprod., Vol. 96, pp1303-1316, 2017. **(査読有)**
doi: 10.1093/biolre/iox049.

(3) Katayama, N., Kume, S., Hattori-Ihara, S., Sadaie, S., Hayashi, M., Yoshizaki, G. Germ cell-specific excision of *loxP*-flanked transgenes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*
Biol.Reprod., Vol. 94, 79, 2016. **(査読有)**
doi: 10.1095/biolreprod.115.136929.

(4) Yoshizaki, G., Takashiba, K., Shimamori, S., Fujinuma, K., Shikina, S., Okutsu, T., Kume, S., Hayashi, M.
Production of germ cell-deficient salmonids by *dead end* gene knockdown, and their use as recipients for germ cell transplantation
Mol. Reprod. Dev., Vol. 83, pp298-311, 2016. **(査読有)**
doi: 10.1002/mrd.22625.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) **林誠, 北田凌太, 寺澤まどか, 勘坂弘治, 島森翔大郎, 佐藤茉菜, 吉崎悟朗**
タイヘイヨウサケ属魚類において精原細胞の消長を制御する機構の解析
平成 30 年度日本水産学会春季大会 204
東京海洋大学 2018 年 3 月

(2) **市田健介, 林誠, 吉崎悟朗**
タイセイヨウサケ属魚類の精原細胞の可視化
平成 30 年度日本水産学会春季大会 201
東京海洋大学 2018 年 3 月

(3) Hayashi, M., Iwasaki, Y., Hayashi, T., Ebisawa, M., Sasagawa, Y., Yoshimura, M., Ichida, K., Nikaido, I., Yoshizaki, G.
Identification of the molecular markers preferentially expressed in spermatogonial stem cells in fish
4th World Congress of Reproductive Biology 2P-1 Okinawa September 2017

(4) Hayashi, M., Iwasaki, Y., Hayashi, T., Ebisawa, M., Sasagawa, Y., Yoshimura, M., Ichida, K., Nikaido, I., Yoshizaki, G.
Identification of the molecular markers preferentially expressed in spermatogonial stem cells in fish
The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development *in vivo* and *in vitro* P-18 Fukuoka July 2017

(5) Sato, M., Hayashi, M., Yoshizaki., G.
Type A spermatogonia seasonally regulate their stem cell activity in adult rainbow trout
The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development *in vivo* and *in vitro* P-19 Fukuoka July 2017

(6) **林誠, 岩崎佳子, 海老澤昌史, 芳村美佳, 林 哲太郎, 笹川洋平, 二階堂 愛, 吉崎悟朗**
1 細胞 RNAseq を用いた魚類精原幹細胞マーカーの探索
平成 28 年度日本水産学会春季大会 238
東京海洋大学 2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

(1) **林誠, 市田健介, 吉崎悟朗.**
「ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A」
編集: 戸村道夫; 発行: 羊土社; 2017 年
担当部分:魚類(サケ・マス類、マグロ類、

ゼブラフィッシュやメダカなど)から調整した細胞のフローサイトメトリー解析やソーティングは可能でしょうか？
pp288-290

〔産業財産権〕

○出願状況（計　1　件）
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
発明者：林誠，岩崎佳子，林哲太郎，海老澤昌史，笹川洋平，芳村美佳，二階堂愛，吉崎悟朗
権利者：国立大学法人 東京海洋大学
国立大学法人 筑波大学
種類：特許
番号：特願 2016-60914
PCT/JP2017/12112
出願年月日：2016 年 3 月 24 日
国内外の別： 国際出願

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者　林 誠（HAYASHI MAKOTO）
筑波大学・生命領域学際研究センター
助教
研究者番号：50714838