

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770072

研究課題名(和文) メダカ成体卵巣内生殖幹細胞とニッチの細胞学的解析

研究課題名(英文) Cell biological analysis of GSCs/niche in medaka ovary

研究代表者

中村 修平 (NAKAMURA SHUHEI)

基礎生物学研究所・生殖遺伝学研究室・特別協力研究員

研究者番号：00510611

研究成果の概要(和文)：

脊椎動物の成体卵巣に、生殖幹細胞が存在するかは不明であった。我々はメダカ成体卵巣内に、精巣とよく似た *sox9b* 発現細胞と、卵形成初期の生殖細胞で構成されるネットワーク構造が存在することを見だし、*ovarian cord* と名付けた。さらにネットワーク構造内の生殖細胞がクラスターを形成している領域を *germinal cradle* と名付け、*cre/loxP* システムを用いた細胞系譜解析を行ったところ *germinal cradle* 内に卵を供給し続けることのできる生殖幹細胞が存在することが明らかとなった (Nakamura et al., Science, 2010)。

研究成果の概要(英文)：

There is no direct evidence that germline stem cells and their niche are present in the vertebrate adult ovary. We identified the testis cord-like network structure, termed ‘ovarian cords’, which is composed of *sox9b*-expressing cells and germ cells of early stage oogenesis in medaka ovary. In the ovarian cord, the regions in which germ cells are clustered are present (termed ‘germinal cradle’). Clonal analysis using *cre/loxP* system revealed that germline stem cells supplying functional eggs exist in germinal cradle (Nakamura et al., Science, 2010). Our results provide insight into germline stem cell biology of medaka and provide a model system for studying vertebrate stem cell niches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：組織構築、幹細胞、*sox9*、GSCs、メダカ、卵巣

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は多分化能を保ったまま自己複製的分裂を繰り返す一方で、分化した細胞を作り出す能力を持つ。このような自己複製的な分裂による多分化能の維持と分化の balan

スは、幹細胞の周りにある特殊な微小環境(ニッチ)によって制御されていると想定されている。生殖腺における生殖幹細胞は配偶子を形成し続ける上で極めて重要な細胞であり、ショウジョウバエの精巣・卵巣を用い

た解析、脊椎動物における精巢の精原幹細胞の解析により多くの知見が得られてきた。一方、脊椎動物では、古くから卵巣に生殖幹細胞の存在が示唆されてきたものの、現在までのところ成体卵巣の生殖幹細胞とそのニッチの存在を示す実験的証拠はない。

我々は、メダカ成体卵巣の germinal epithelium に、*sox9b* 遺伝子発現細胞と卵形成初期の全ての生殖細胞で構成される単位が存在することを見だし、この単位に Germinal cradle と名前を付けた。さらに Germinal cradle 同士は *sox9b* 発現細胞によって互いに繋がっており、全体としてネットワークを構成していた (ovarian cord と名付けた)。個々の germinal cradle に存在する生殖細胞は形態的に 3 種類に分けられる。1 つ目は一つ一つの生殖細胞が *sox9b* 発現細胞に取り囲まれて独立している生殖細胞 (Gs 型)、2 つ目は複数の生殖細胞が intercellular bridge でつながったシストとして存在し、この複数の生殖細胞が単位となって *sox9b* 発現細胞に取り囲まれているシスト型生殖細胞 (Gcys 型)、3 つ目は減数分裂のディプロテン期にはいった生殖細胞 (Gdip 型) で、このディプロテン期生殖細胞では一つ一つが再び *sox9b* 発現細胞に取り囲まれている。また Gcys 型には同調した体細胞分裂を行っているものと、減数分裂を行っているものの 2 種類が存在した。しかし注目すべきは、どのタイプの germinal cradle にも必ず 1 個以上 5 個以下の Gs 型生殖細胞が存在しているということであった。これらのことから、Gs 型生殖細胞が最も未分化な卵原細胞なのではないかと予期されたが、ここに卵を作り続けることができる生殖幹細胞が存在するかについては不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、germinal cradle の細胞学的解析によりメダカ成体卵巣に卵を作りつづけることのできる生殖幹細胞とそのニッチが存在するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

・候補遺伝子の発現解析により germinal cradle 内の Gs 型生殖細胞でのみ発現する遺伝子を同定し、cre-loxP を用いて Gs 型生殖細胞の細胞系譜解析を行った。

・多くの組織幹細胞の分裂は非常にゆっくり

であることが知られている。BrdU 取り込み実験により germinal cradle 中の生殖細胞の細胞周期を調べ、このような特徴をもつ細胞が存在するか検証した。

・哺乳類精巣では、放射線や薬剤、高温により未分化型精原細胞 (As, Apr, Aa1) しか残っていない精巣から、完全な精子形成が再生することが分かり、未分化型精原細胞内に幹細胞が存在していることが明らかとなった。そこで busulfan 処理後のメダカ卵巣を観察し、卵形成を回復される能力のある生殖細胞が存在するか解析した。

## 4. 研究成果

以前、我々の研究室では、*nanos2* 遺伝子が精原細胞および卵原細胞で発現していることを見いだしていた。そのため germinal cradle 内での *nanos2* の発現を調べたところ、Gs 型生殖細胞のみで発現していることが明らかとなった。これらのことから、我々は *nanos2* 発現細胞の中に配偶子幹細胞が存在しているのではないかと考え、*nanos2* 発現細胞のクローン解析を行ったところ、次世代に寄与する卵はすべてこの *nanos2* 発現細胞が供給していることが明らかとなった (図 1)。

また、BrdU (Bromodeoxyuridine) 取り込み実験によって細胞周期を調べたところ、*nanos2* を発現する Gs 型生殖細胞には、比較的早く分裂している細胞集団と、非常にゆっくり分裂を行う 2 種類の細胞集団が存在することも分かってきた。

また、一定濃度、期間、成体卵巣を busulfan 処理すると、成体卵巣には *nanos2* を発現する Gs 型の生殖細胞のみが残るが、3 ヶ月後にはシスト型生殖細胞をもつ germinal cradle が回復するという結果が得られた。

これらの結果は、*nanos2* 発現細胞の中に配偶子幹細胞が存在していることを示唆していると同時に、*sox9b* 発現細胞から構成される germinal cradle には、生殖幹細胞ニッチが何らかの形で存在していることを示している (Nakamura et al., Science, 2010)。

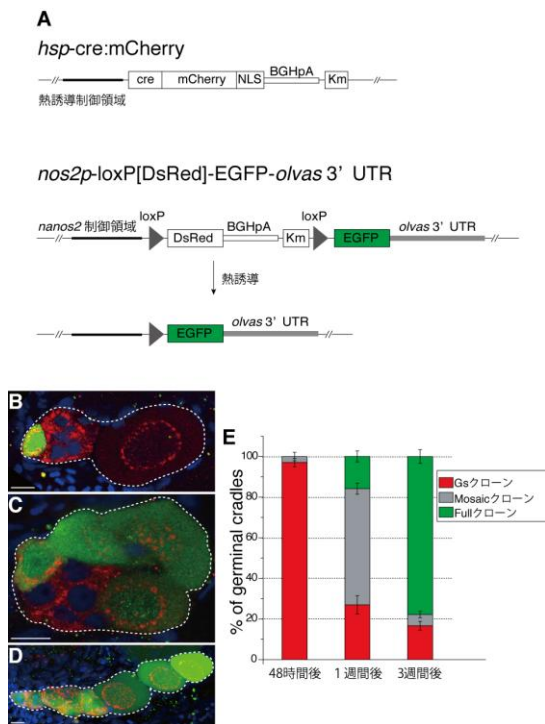


図1 *nanos2* 発現細胞の細胞系譜解析

(A) 配偶子幹細胞クローン解析のためのコンストラクト。(B-D) 熱誘導後みられる3つの germinal cradles のパターン。単独型生殖細胞のみがラベルされた germinal cradle (B, ‘Gs クローン’ と呼ぶ)。単独型生殖細胞とシスト型生殖細胞、もしくはディプロテン期生殖細胞がラベルされたもの(C, ‘mosaic クローン’ と呼ぶ)。Germinal cradle 内のすべての生殖細胞がラベルされたもの(D, ‘full クローン’ と呼ぶ)。最終的に、熱誘導後 full クローンタイプとなった germinal cradle が徐々に出現したため、germinal cradle 内に配偶子幹細胞が存在することが示された。(E) 熱誘導後48時間、1週間、3週間後の各クローンタイプの germinal cradle 内での割合。

## 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7件)

① Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., and Tanaka, M. (2011). Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Biol Sci* 7, 403-409. (査読無)

② 中村修平、小林佳代、西村俊哉、田中実

(2010) 「メダカ卵巣の配偶子幹細胞」 *細胞工学* 29, 664-669. (査読無)

③ Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S., and Tanaka, M. (2010).

Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* 328, 1561-1563.

(査読有)

④ Herpin, A., Braasch, I., Kraeussling, M., Schmidt, C., Thoma, E.C., Nakamura, S., Tanaka, M., and Schartl, M. (2010). Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene

duplicate by transposable elements. *PLoS Genet* 6, e1000844. (査読有)

⑤ Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y., and

Tanaka, M. (2009). Expression and syntenic analyses of four *nanos* genes in medaka. *Zool Sci* 26, 112-118. (査読有)

⑥ Nakamura, S., Kurokawa, H., Asakawa, S., Shimizu, N., and Tanaka, M. (2009). Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing theca cells. *Dev Dyn* 238, 2652-2657. (査読有)

⑦ Herpin, A., Nakamura, S., Wagner, T.U., Tanaka, M., and Schartl, M. (2009). A highly conserved cis-regulatory motif directs differential gonadal synexpression of *Dmrt1* transcripts during gonad development. *Nucleic Acids Res* 37, 1510-1520. (査読有)

[学会発表] (計3件)

① Shuhe Nakamura, Ikuko Watakabe, Atsushi Toyota, Yoshihito Taniguchi and Minoru Tanaka

「*Sox9b* function in Germline Stem Cell niche in the ovary of teleost fish, medaka」 Cold Spring Harbor Laboratory, Germ cell meeting, 2010, Oct. 5-9<sup>th</sup>, Cold Spring Harbor Laboratory (New York, USA)

② 中村修平、小林佳代、西村俊哉、東島眞一、田中実「メダカ(*Oryzias latipes*) 卵巣生殖幹細胞の同定」第81回日本動物学会大会、2010年9月23日、東京大学・駒場キャンパス

③ Shuhe Nakamura, Kayo Kobayashi, Toshiya Nishimura, Thomas Czerny, Shin-ichi

Higashijima & Minoru Tanaka 「Identification of

unique anastomosing structures containing  
germline stem cells in medaka ovary」第32回 日  
本分子生物学会年会、2009年 12月 9日、パ  
シフィコ横浜（神奈川県）

〔図書〕（計 1 件）

田中実、小林佳代、中村修平  
「生物機能モデルと新しいリソース・リサー  
チツール」(2011年2月) 編集：小幡裕一、城  
石俊彦、芹田忠夫、田中啓二、米川博通  
「BAC や fosmid を用いたトランスジェニ  
ックメダカ作製法」pp.573-578. エル・アー  
ル・シー ISBN 978-4-9000487-48-2

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/press/100521/100521.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 修平 (NAKAMURA SHUHEI)  
基礎生物学研究所・生殖遺伝学研究室・特別  
協力研究員  
研究者番号：00510611