

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03049

研究課題名(和文) 1細胞解析系と性転換モデルによる魚類生殖腺の性的可塑性に関する分子機構の解明

研究課題名(英文) Dissecting molecular mechanisms of gonadal sexual plasticity by combining experimental fish models with single-cell analysis

研究代表者

太田 耕平 (Ohta, Kohei)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10585764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：自らが構築した性転換モデル魚の実験系を用いて、生殖腺の性的可塑性の起点となると予想される生殖幹細胞と未分化体細胞を1細胞毎に単離し、シングルセルRNA-seq解析系を構築した。解析の結果、卵巢から精巣への転換に伴う生殖幹細胞の連続的な遺伝子発現の変化を明らかにするとともに、未分化体細胞が卵巢型から精巣型へと分化パターンを切りかえることを初めて見出した。また、雌雄異体の小型モデル魚と海産モデル魚を用いて比較解析した結果、生殖幹細胞の局在を明らかにするとともに、生殖幹細胞で発現するoct4遺伝子が幹細胞性の維持に関与すること、魚種間で生殖腺体細胞の性的可塑性に違いがあることなどを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性転換魚のモデル系などを用いて魚類生殖腺の性的可塑性のメカニズムを解析した結果、卵巢から精巣への転換に伴う生殖幹細胞の連続的な遺伝子発現変化を明らかにするとともに、未分化体細胞が卵巢型から精巣型へと分化パターンを切りかえることを初めて見出した。また、生殖幹細胞で発現するoct4遺伝子が幹細胞性の維持に関与すること、魚種間で生殖腺体細胞の性的可塑性に違いがあることなどを解明した。今後、これらの成果をもとに、生殖腺全体や個体での性を統御する機構へと理解を深めることが可能となり、脊椎動物一般の性的可塑性の分子・細胞機構の研究に貢献するとともに、水産における新たな性統御法の開発にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular and cellular mechanisms of gonadal sexual plasticity, we investigated the germ line stem cells (GSCs) and undifferentiated somatic cells (SSCs) in the gonad of a sex-changing fish. These GSCs and SSCs have been suggested to be the origin of testicular tissue during sex change from female to male. In this study, we performed single-cell RNA-seq analysis of GSCs and SSCs. As a result, we revealed the heterogeneity of GSCs and SSCs, respectively, and clarified the change in their gene expression patterns during gonadal sex change. More interestingly, we also found that SSCs switch the pattern of differentiation between ovarian somatic cells and testicular somatic cells. On the other hand, using gonochoristic fish, the involvement of oct4 gene in the maintenance of GSCs was demonstrated. Moreover, the result of in vitro culture experiment suggests the differences in sexual plasticity of gonadal somatic cells among fish species.

研究分野：魚類生殖学

キーワード：性的可塑性 生殖幹細胞 魚類 性転換 シングルセル解析

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに性決定・性分化の分子機構、さらには性成熟時に生成される性ステロイドの作用機序など、魚類の性に関わるメカニズムの理解が急速に進展してきた。また、性の可塑性に関して、性転換魚を用いたの遺伝子レベルの研究が進展してきた一方で、雌雄異体魚、さらに哺乳類においても研究が広がり、成体生殖腺の性的可塑性は、ある程度の範囲において、脊椎動物で広く保存されていると考えられるようになった<sup>①</sup>。こうした性的可塑性を理解する上で、性転換魚は優れた実験材料となる。さらに、性転換魚と雌雄異体魚との比較により、各細胞レベルでの性的可塑性のメカニズムを解明することができれば、将来はこれを軸として、生殖腺全体や個体での性を統御する機構へと理解を深めていくことができると考えられた。研究成果は脊椎動物一般の性的可塑性の分子・細胞機構の研究に貢献するのみならず、本研究が目指す、水産における新たな性統御法の開発にも繋がること期待された。

### 2. 研究の目的

これまでに自らが構築した性転換魚のモデル系などを用いて魚類生殖腺の性的可塑性の研究を進めた結果、生殖腺に2種の未分化な細胞集団(生殖幹細胞と未分化体細胞)が存在し、これらが生殖腺組織の卵巣と精巣との間の転換の起点となることが示唆された。本研究では、この2種の細胞集団に焦点を絞り、シングルセル解析系を導入することにより、成体生殖腺の性的可塑性の分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目的とする。細胞集団に含まれる1細胞毎の遺伝子発現プロファイルを元に集団内の細胞を分類し、生殖腺の転換に機能する“個々の細胞”を特定するとともに、細胞毎の増殖・分化の連続的変化と、それに関わる分子機構を解析する。さらに、雌雄異体魚との比較を行い、将来、全ての魚類において個体、生殖腺、及び細胞の性を自在に統御するために必要な“細胞の共通原理”に関する情報を得る。

### 3. 研究の方法

性転換魚を用いた生殖腺の組織解析および幹細胞と細胞増殖に関わる分子マーカー等の解析から、“生殖幹細胞”と“未分化体細胞”の局におよび性転換に伴う変化を明らかにする。一方で、それらの細胞を酵素分散して1細胞毎に分取する方法を確立するとともに、ゲノム情報を整備して性転換魚におけるシングルセル解析系を構築する。その後、雌雄および性転換個体の“生殖幹細胞”と“未分化体細胞”についてのシングルセル RNA-seq 解析を行う。得られた結果をもとに、細胞培養系や器官培養系により、これらの細胞の増殖および雌雄の生殖細胞への分化に関わるメカニズムを解析する。さらに、性ステロイドホルモン受容体のノックアウト系統を用いた解析が可能であり、性ステロイド処理により成体メスから成体オスへの人為的性転換を誘導できる小型モデル魚のメダカ、および性ステロイド処理による人為的性転換が困難な海産モデル魚のカタクチイワシについて解析を行い、性転換魚と雌雄異体魚との比較を行う。

### 4. 研究成果

性転換モデル魚であるホシササノハベラを用いて、性転換開始時の生殖幹細胞の細胞動態を解析した。細胞増殖マーカーの EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)を投与したメスに対して、水槽内の社会環境調節によりオスへの性転換を誘導後、生殖腺を採取した。その後、組織切片を作成し、組織上でEdU陽性細胞を検出するとともに、生殖細胞マーカーのVasaに対する免疫染色を行った。その結果、性転換開始の1週間後にEdUとVasaともに陽性の精原細胞が少数確認され、6週間後には精母細胞と精細胞を含むすべての雄性生殖細胞がEdU陽性を示した。すなわち、1週目までに卵巣組織の生殖幹細胞から増殖および分化した精原細胞がさらに増殖・分化して精巣組織の各雄性生殖細胞を形成すると考えられた。一方、卵母細胞ではEdU陽性は認められず、6週目までに完全に消失していた。加えて、各種ステロイドホルモンの血中量を解析した結果、性転換に伴い estradiol-17β の中間代謝物である estrone の減少と 11-ketotestosterone の中間代謝物である testosterone の増加が認められた。また、性転換開始直後にストレスホルモンである cortisol が一時的に減少することが明らかとなり、cortisol の低下が生殖幹細胞から

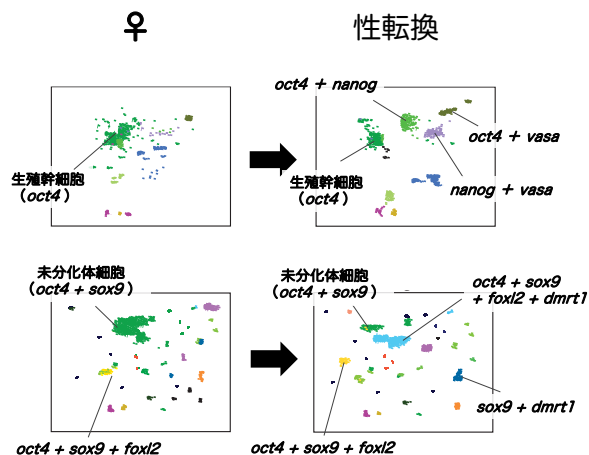


図1) シングルセルRNA-seq解析の結果  
メスおよび性転換中の生殖腺における生殖幹細胞  
と未分化体細胞。UMAPによるクラスタリング。

雄性生殖細胞への分化開始に関与する可能性が考えられた。

次に、シングルセル解析系を構築するため、生殖腺を酵素処理により細胞分散した後、幹細胞の指標となるアルカリフォスファターゼ蛍光基質により細胞標識した。それらの細胞集団からセルソーターを用いて生殖幹細胞と未分化体細胞の細胞画分を特定するとともに、1細胞毎に細胞を分取する方法を確立した。さらに、分取した細胞のシングルセル RNA-seq 解析を行うために、CEL-Seq2 法によるライブラリーを調整し、イルミナ社シーケンサーを用いてシーケンス解析を行った。一方で、情報解析のために、全ゲノムシーケンス解析、de novo ゲノムアセンブリ、および遺伝子のアノテーションを行い、ホシササノハベラのゲノム情報を取得して整備するとともに、生殖腺(卵巣、精巣、および性転換個体の生殖腺)の網羅的な遺伝子発現解析(RNA-Seq)により発現遺伝子データを取得した。これらのデータベースを利用してシングルセル RNA-seq 解析で得られた塩基配列データをマッピングし、正規化およびクラスタリング解析を行うことにより、1細胞毎の遺伝子発現データを取得することに成功した。

そこで、雌雄および性転換開始1週間後の生殖腺から得られた細胞集団についてのシングルセル RNA-Seq 解析を行った。その結果、生殖幹細胞を含む細胞集団においては、卵巣では *oct4* の発現に特徴付けられる細胞が多数を占めた。興味深いことに、性転換の開始に伴い *oct4* に加えて *nanog* を特徴的に発現する細胞群が顕著に増加した。また、*oct4* および *nanog* とともに *vasa* を発現する細胞もみられたことから、これらの細胞集団は生殖幹細胞およびそれらの細胞から分化する細胞集団であることが明らかとなった。一方、未分化体細胞を含む細胞集団においては、卵巣では *oct4* と *sox9* の特徴的な発現を示す細胞集団が多く認められた。加えて、*foxl2* を発現する細胞集団も存在していた。さらに性転換開始に伴い、それらの細胞集団に加えて *dmrt1* を発現する細胞集団が出現した。このことから、卵巣から精巣への転換に伴い、未分化体細胞を起点として卵巣の体細胞である顆粒膜細胞への分化パターンから、精巣の体細胞であるセルトリ細胞への分化パターンへと切り換えが起こることが示唆された。

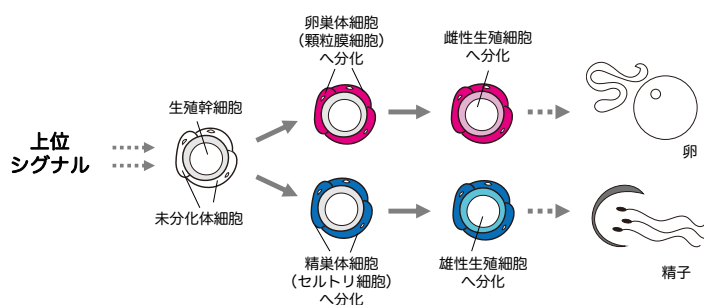


図2) 想定される生殖幹細胞および未分化体細胞の分化機構

小型モデル魚のメダカを用いた解析では、*oct4* および *vasa* の発現をそれぞれ赤色と緑色の蛍光タンパクで可視化したダブルトランスジェニック系統を作製して解析を行った結果、2つの遺伝子の発現挙動の違いにより、生殖幹細胞と分化の進んだ生殖系列細胞(卵原細胞または精原細胞)が明瞭に区別された。さらに、ステロイド処理と阻害剤を組み合わせた実験により、メダ

カ生殖腺において *oct4* が生殖幹細胞の維持に関与することが示唆された。加えて、性ステロイドホルモン受容体(アンドロゲン受容体とエストロゲン受容体)のノックアウトシステムを用いた解析により、エストロゲン受容体(*erb2*)が生殖細胞の性差に<sup>②)</sup>、アンドロゲン受容体(*arb*)がオスにおける二次性徴の発現に、それぞれ関与していることを明らかにした。

雌雄異体の海産モデル魚であるカタクチイワシにおいては、雌雄の生殖腺において *oct4* の発現が確認された。加えて、Oct4 に対する免疫染色を行った結果、それぞれ卵原細胞様およびA型精原細胞様の細胞での局在が示されたことから、これらが生殖幹細胞として機能することが示唆された。一方、興味深いことに、器官培養実験によりホシササノハベラとカタクチイワシの卵巣組織片をそれぞれアンドロゲンやエストロゲン合成阻害剤などとともに培養して比較した結果、ホシササノハベラの生殖腺では21日以内に精巣構造と雄性生殖細胞の出現が認められたのに対し、カタクチイワシ卵巣では精巣への組織構造の変化は認められなかったことから、生殖腺における細胞、特に生殖腺体細胞の性的可塑性に違いがあることが示唆された。

#### <引用文献>

- ① Yoshitaka Nagahama, Tapas Chakraborty, Bindhu Paul-Prasanth, Kohei Ohta, Masaru Nakamura. Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological Reviews*, 101, 1237-1308. doi:10.1152/physrev.00044.2019. 2021.
- ② Tapas Chakraborty, Sipra Mohapatra, Lin Yan Zhou, Kohei Ohta, Takahiro Matsubara, Taisen Iguchi, Yoshitaka Nagahama. Estrogen Receptor  $\beta$  2 Oversees Germ Cell Maintenance and Gonadal Sex Differentiation in Medaka, *Oryzias latipes*. *Stem Cell Reports*, 13, 419-433. doi:10.1016/j.stemcr.2019.07.013. 2019.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ogino Yukiko, Ohta Kohei (22人中15番目)	4. 巻 14
2. 論文標題 Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37026-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Chakraborty Tapas, Yamamoto Yume, Hanai Shoma, Hirano Mayumi, Mohapatra Sipra, Yamaguchi Akihiko, Takeda Tatsusuke, Matsuyama Michiya, Ohta Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Divulging the social sex change mechanism in a unique model system for studying the sexual plasticity of protogynous hermaphrodite fish, three bamboo leaf wrasse ( <i>Pseudolabrus sieboldi</i> )	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	6. 最初と最後の頁 1048506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2022.1048506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chakraborty Tapas, Mohapatra Sipra, Matsuyama Michiya, Nagahama Yoshitaka, Ohta Kohei	4. 巻 23
2. 論文標題 Sex Lethal Gene Manipulates Gonadal Development of Medaka, <i>Oryzias latipes</i> , through Estrogenic Interventions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15496 ~ 15496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232415496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagahama Yoshitaka, Chakraborty Tapas, Paul-Prasanth Bindhu, Ohta Kohei, Nakamura Masaru	4. 巻 101
2. 論文標題 Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 1237 ~ 1308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00044.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mohapatra Sipra, Chakraborty Tapas, Shimizu Sonoko, Ohta Kayoko, Nagahama Yoshitaka, Ohta Kohei	4. 巻 27
2. 論文標題 Estrogen and estrogen receptors chauffeur the sex-biased autophagic action in liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 3117 ~ 3130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-020-0567-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chakraborty Tapas, Mohapatra Sipra, Zhou Lin Yan, Ohta Kohei, Matsubara Takahiro, Iguchi Taisen, Nagahama Yoshitaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Estrogen Receptor 2 Oversees Germ Cell Maintenance and Gonadal Sex Differentiation in Medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 419 ~ 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Tapas Chakraborty, Sota Kawao, Kodai Mizumura, Akira Eguchi, Sipra Mohapatra, Takehiko Itoh, Atsushi Toyoda, Naoki Nagano, Kohei Ohta, Michiya Matsuyama
2. 発表標題 Gonadal stem cell: a possible solution of futuristic aquaculture
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yume Yamamoto, Shoma Hanai, Tapas Chakraborty, Atsushi Toyoda, Takehiko Itoh, Michiya Matsuyama, Yoshitaka Nagahama, Kohei Ohta
2. 発表標題 Involvement of the pituitary gland in social-environment-dependent sex change
3. 学会等名 International Conference on Responsible Aquaculture and Sustainable Fisheries Interact (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Kodai Mizumura, Tapas Chakraborty, Kazuki Tateyama, Shoma Hanai, Yoshihara Yuya, Yume Yamamoto, Sipra Mohapatra, Yumiko Yamasaki, Atsushi Toyota, Takehiko Itoh, Michiya Matsuyama, Yoshitaka Nagahama, Kohei Ohta
2. 発表標題	Gonadal stem cells in a sex changing fish, Pseudolabrus sieboldi
3. 学会等名	The International Symposium "Totipotency and Germ cell Development" (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	水村航大, Chakraborty Tapas, 八尋逸清, 太田耕平, 長濱嘉孝, 松山倫也
2. 発表標題	海産魚における生殖幹細胞の長期培養法
3. 学会等名	令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	山本優芽, 花井匠磨, Chakraborty Tapas, 豊田敦, 伊藤武彦, 松山倫也, 長濱嘉孝, 太田耕平
2. 発表標題	社会環境依存型の性転換における脳下垂体の関与
3. 学会等名	令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Kohei Ohta, Tapas Chakraborty, Kazuki Tateyama, Shoma Hanai, Kodai Mizumura, Yume Yamamoto, Yuya Yoshihara, Sipra Mohapatra, Michiya Matsuyama, Yoshitaka Nagahama
2. 発表標題	Molecular mechanism of sexual plasticity in fish: a viewpoint from a natural sex changing fish
3. 学会等名	Joint Conference of the 30th European Society for Comparative Endocrinology and the 9th International Society for Fish Endocrinology (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Tapas Chakraborty, Sipra Mohapatra, Kohei Ohta, Michiya Matsuyama, Yoshitaka Nagahama
2. 発表標題 Oct4 and sexual plasticity in fish gonad
3. 学会等名 Joint Conference of the 30th European Society for Comparative Endocrinology and the 9th International Society for Fish Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sipra Mohapatra, Tapas Chakraborty, Naoki Nagano, Yoshitaka Nagahama, Kohei Ohta, Michiya Matsuyama
2. 発表標題 Autophagy: an important player in germ cell maintenance and gonadal sexuality
3. 学会等名 Joint Conference of the 30th European Society for Comparative Endocrinology and the 9th International Society for Fish Endocrinology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江藤悠平・Tapas Chakraborty・北野 載・豊田 敦・伊藤武彦・松山倫也・太田耕平
2. 発表標題 カタクチイワシ <i>Engraulis japonicus</i> をモデルとした生殖腺の性差に関わるエピジェネティック修飾の解析法
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花井匠磨・Tapas Chakraborty・松山倫也・長濱嘉孝・太田耕平
2. 発表標題 ホシササノハベラ生殖腺の性転換に伴う細胞増殖動態と血中ステロイドの分泌パターン
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尋逸清・Tapas Chakraborty・太田耕平・松山倫也
2. 発表標題 マサバ <i>Scomber japonicus</i> の体側筋内に移植した生殖腺組織片における配偶子形成
3. 学会等名 日本動物学会・九州沖縄植物学会・日本生態学会 合同福岡例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甲斐公士・坂口圭史・太田耕平・松山倫也.
2. 発表標題 新奇海産モデル魚カタクチイワシを利用した不妊化-妊性回復技術の開発
3. 学会等名 日本水産増殖学会第 18 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Kai, Keishi Sakaguchi, Kohei Ohta, Michiya Matsuyama.
2. 発表標題 Luteinizing hormone -subunit gene knockout in Japanese anchovy ( <i>Engraulis japonicus</i> ) by TALEN-based genome editing
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tapas Chakraborty, Sipra Mohapatra, Sonoko Shimizu, Takahiro Matsubara, Kiyoshi Naruse, Kohei Ohta.
2. 発表標題 Comparative transcriptomics and Edwardsiellosis detection in fish: a study using medaka and Red Sea bream
3. 学会等名 10th International conference on Fisheries & Aquaculture, Toronto, 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Sipra Mohapatra, Tapas Chakraborty, Kohei Ohta.
2. 発表標題 Sex and sex steroids are eminent regulators of fish autophagy.
3. 学会等名 10th International conference on Fisheries & Aquaculture, Toronto, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sipra Mohapatra, Tapas Chakraborty	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 20
3. 書名 Genome Editing in Fish Reproduction. In: Pandey, P.K., Parhi, J. (eds) Advances in Fisheries Biotechnology.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学農学研究院海洋生物学分野HP <a href="https://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/marinebiology/">https://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/marinebiology/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	荻野 由紀子  (Ogino Yukiko)  (00404343)	九州大学・農学研究院・准教授   (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	C T a p a s  (Chakraborty Tapas)  (70715440)	九州大学・農学研究院・助教    (17102)	
研究分担者	M o h a p a t r a S i p r a  (Mohapatra Sipra)  (80715441)	九州大学・農学研究院・学術研究員    (17102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長濱 嘉孝  (Nagahama Yoshitaka)		
研究協力者	諸橋 憲一郎  (Morohashi Kenichirou)		
研究協力者	松山 倫也  (Matsuyama Michiya)		
研究協力者	山口 明彦  (Yamaguchi Akihiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関

中国	Southwest University			
----	----------------------	--	--	--