

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H00426  
研究課題名(和文) 二枚貝の脳ホルモンが制御する性分化と性成熟—その分子機構と種苗生産への展開—  
研究課題名(英文) Sex differentiation and sexual maturation regulated by brain hormones in bivalves: Molecular mechanism and its application to seed production  
研究代表者  
尾定 誠 (Osada, Makoto)  
東北大学・農学研究科・教授  
研究者番号：30177208  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホタテガイは、産卵後においても $vasa$ 遺伝子を発現する未分化な初期の生殖細胞を保持し、再び発達させることを明らかにした。ホタテガイ中枢神経における2種類の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(pyGnRH11aaPro-NH<sub>2</sub>、pyGnRH12aaGly-OH)は雄で優勢な前者と雌で優勢な後者が特徴付けられた。それぞれの雌雄における性分化と生殖細胞発達の促進と相互の拮抗する関係を明らかにした。ホタテガイとヒトのキメラエストロゲン受容体のみが応答するホタテガイ生殖巣のエストロゲン様物質の存在が明らかになり、内因性エストロゲン様分子の仲介による生殖を制御するGnRHシグナルの作用機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
害的生物による食害や感染による斃死、環境激変による資源量や養殖生産量の激減によって、二枚貝養殖の持続的生産が危ぶまれている。それを解決するためには、二枚貝の人工種苗生産技術の開発が急務である。本研究では、二枚貝における性分化・性成熟に関する生殖内分泌調節機構を解明し、性統御及び人工催熟へ適用することにある。脳ホルモンであるGnRHペプチドとステロイドホルモンによる性分化と生殖細胞発達の制御メカニズムが明らかになり、この基盤情報を人工種苗生産技術として応用する意義は、食料としての水産物増産のみならず、生殖内分泌機構に関わる生物の普遍的なメカニズムとその進化の解明においても非常に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Scallops retain undifferentiated early germ cells expressing the  $vasa$  gene even after spawning and then redevelop them through their reproductive cycle. Two gonadotropin-releasing hormones (pyGnRH11aaPro-NH<sub>2</sub> and pyGnRH12aaGly-OH) in the scallop central nervous system were characterized, the former predominant in males and the latter in females. The promotion of sexual differentiation and germ cell development in males and females of each GnRH was suggested and revealed a mutually antagonistic relationship between the two hormones. The presence of estrogen-like substances in scallop gonads that are responsive only to chimeric estrogen receptors in scallops and humans was found. The existence of a mechanism of action of GnRH signaling to control reproduction mediated by endogenous estrogen-like molecules was suggested.

研究分野：水産増殖学

キーワード：二枚貝 性分化 生殖細胞 GnRH ステロイドホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 二枚貝類は、環境への負荷の極めて少ない無給餌が特徴的な産業である。しかし、害的生物による食害や原虫や細菌の感染による斃死、地球規模の温暖化や環境激変による資源量や養殖生産量の激減による持続的な二枚貝の増養殖が危ぶまれている。二枚貝の資源量の回復と安定した生産を実現するためにも、計画性のある種苗の供給や激変する環境に適した形質を持つ種苗の開発が不可欠である。生殖内分泌調節機構の知見を深化させることによって、二枚貝類に広く適用でき、育種技術の開発に不可欠な高度化した人工種苗生産を実現させる必要がある。

(2) 二枚貝類の生殖周期において、毎年産卵後に、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone, GnRH) 受容体を持つ血球 (Nagasawa et al., Agri Gene, 2017) による残った生殖細胞の排除によって完全に初期化された生殖巣に、再び出現する生殖細胞の起源については未だ明らかにされていない。侵入する血球による生殖細胞排除をとまなう生殖細胞の運命と出現する生殖幹細胞の同定は、二枚貝の生殖周期における生殖細胞の出現とその性分化プロセスを明らかにする上で極めて重要な課題である。

(3) 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone, GnRH) は、動物界に広く GnRH スーパーファミリーを形成して保有されている。我々は、ホタテガイの精原細胞増殖に、中枢神経の GnRH 様ペプチドが強く関与していることを見出したことに端を発し (Nakamura et al., MRD, 2007)、GnRH ペプチドこそが精原細胞増殖の制御の鍵であり、その働きはエストロゲン分泌とエストロゲン受容体を介していることを推測した (Treen et al., GCE, 2012, Osada & Treen, GCE, 2013, Nagasawa et al., Gene, 2015)。さらに、ホタテガイの GnRH ペプチドには 11 アミノ酸残基 pyGnRH (pyGnRH11aaPro-NH<sub>2</sub>、以降 pyGnRH11aa) と 12 アミノ酸残基 pyGnRH (pyGnRH12aaGly-OH、以降 pyGnRH12aa) の 2 種類が存在し、pyGnRH11aa が精子形成促進と雌から雄への性の再分化を引き起こした (Nagasawa et al., Peptides, 2015, Nagasawa et al., PLoS ONE, 2015)。この成果は、GnRH ペプチドとその下流にあるステロイドホルモンの関係において性分化プロセスを理解する新たな展開へと導く極めて重要な課題である。同時に、カンブリア紀から始まるステロイドの進化や脳下垂体を持たない二枚貝類を含む無脊椎動物のステロイドホルモン合成制御メカニズムを理解する上でも重要な知見をもたらす。

(4) 哺乳類培養細胞で発現させたホタテガイ GnRH 受容体 (pyGnRH 受容体) は、pyGnRH11aa に応答し pyGnRH12aa には応答性を示さない (Nagasawa et al., GCE, 2019)。雌雄異体種のホタテガイで、雌雄ともに 2 種類の pyGnRH ペプチドを持っていながら、pyGnRH11aa が雄性化をもたらしたことは、一方で雌性化をもたらす神経因子として、もう一つのペプチドである pyGnRH12aa の存在が非常に興味深い。同定した pyGnRH 受容体上で、2 種類のペプチド pyGnRH11aa と pyGnRH12aa がどのように振舞っているのかを知ることは、生殖細胞の性分化プロセスと発達の制御の核心に迫る重要な課題である。さらに、既に多くの二枚貝類で同定している GnRH ペプチドとの pyGnRH 受容体の応答性を検討することによって、主要な養殖二枚貝類に汎用的に機能する配列の GnRH ペプチドを設計することは性統御・人工催熟技術を広範に適用させるために重要な課題である。

これらの問いに対する解答を得ることによって、神経内分泌因子によって操る、雌雄判別のための侵襲的な生検を必要としない性統御と、計画的な交配のための母貝仕立てによる人工催熟に基づく高度化した人工種苗生産技術の社会実装を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の背景を解決すべく、人工種苗生産の高度化の確立を目的に、研究期間内に以下の目標を立てて実施した。

(1) ホタテガイの生殖細胞の運命の解析を、産卵後の生殖細胞の細胞死、血球浸潤による生殖細胞の排除に依存した生殖巣の初期化、生殖細胞の出現による配偶子形成の再開始、生殖細胞の性分化のプロセスを、血球マーカー・生殖(幹)細胞マーカー・性分化マーカー遺伝子を指標にして細胞学的に明らかにする。

(2) ホタテガイの 2 種類の pyGnRH ペプチド、pyGnRH11aa と pyGnRH12aa の卵巣と精巣における性の表現系の発達と再分化への影響を、中枢神経におけるそれら 2 種の神経細胞体の分布と組成比の定量解析から推測し、生殖巣組織培養系への添加および個体に対する徐放性の投与実験によって、相互作用も合わせて検討し、生殖細胞の定量的な変化、性分化マーカー遺伝子、ステロイドホルモン合成経路を構成する遺伝子群の発現動態によって明らかし、エストロゲン分泌の pyGnRH による支配とその下流で起こる GnRH による性統御及び人工催熟の手法として確立する。

(3) 哺乳類培養細胞に発現させたホタテガイ pyGnRH 受容体に対する 2 種類の GnRH ペプチド、pyGnRH11aa と pyGnRH12aa の応答とその相互作用も合わせて試み、それらの受容体上での働きを明らかにする。整備してあるホタテガイトランスクリプトームデータセット及び公開されているホタテガイゲノムデータベースから GnRH 受容体のアイソフォームの探索も並行して行い、2 種類の pyGnRH と受容体の新たな関係の存在の可能性を並行して進める。

(4) pyGnRH の下流で作用するホタテガイ自身の持つエストロゲンの候補分子の存在を、ホタテガイのエストロゲン受容体の応答をもとに活性画分を絞り込み、高い精度で解析できる LC-

MS/MS によってホタテガイ生殖巣中の内因性エストロゲンの構造決定を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 生殖周期に伴う生殖細胞の消長と血球の分布及び生殖幹細胞の出現と性分化 (尾定・長澤)  
定期的に北海道噴火湾で採取したホタテガイの卵巢と精巣の組織学、免疫組織学、分子生物学的に観察を行い、生殖周期に伴う細胞学的な生殖細胞の発達と産卵後の初期化における血球浸潤、その後の生殖 (幹) 細胞の出現及びその性分化の一連のプロセスを、マガキゲノムデータベースからの検索及びホタテガイ血球 RNA-seq 解析による血球マーカー (Tal-1/Scl、GATA、hatching enzyme-like、 $\beta$ -crystallin B2-like、TGF- $\beta$ -induced protein ig-h3-like、metalloproteinase inhibitor 2-like、protein singed-like)、生殖幹細胞/生殖細胞マーカー (Vasa、Nanos、Piwi) と性分化マーカー (Dmrt2、Sox-H、Foxl-2、Fem1) を用いて詳細に検討する。

(2) ホタテガイの 2 種類の pyGnRH ペプチド、pyGnRH11aa と pyGnRH12aa の卵巢と精巣における性分化と生殖細胞の発達への影響 (尾定)

2 種類の pyGnRH ペプチドに対する特異抗体を用いた免疫染色による細胞レベル及び時間分解蛍光免疫測定法による定量的な解析によって、雌雄のホタテガイ中枢神経におけるそれらの分布の異なる成長及び成熟段階での相違や組成比の性的二型を検討する。さらに、これら 2 種類の pyGnRH ペプチドの in vivo 投与および in vitro 生殖巣組織培養による生殖細胞発達及び性とステロイドホルモン合成への影響を、組織学的観察、性特異的遺伝子及びステロイドホルモン合成関連酵素遺伝子の転写量をもとに詳細に解析し、性分化と性成熟における pyGnRH の果たす役割を明らかにする。

(3) ホタテガイ pyGnRH 受容体の 2 種類の pyGnRH ペプチドに対する応答と相互作用 (佐竹)  
すでに同定しているホタテガイ pyGnRH 受容体遺伝子を HEK293 細胞に導入し、pyGnRH11aa に対する受容体の応答への pyGnRH12aa の影響を調べ、受容体上での競合の可能性を検討する。佐竹らにより開発された機械学習による予測プログラム (Shiraishi et al., PNAS, 2019) を用いて pyGnRH12aa の受容体候補の探索を並行して試み、候補受容体遺伝子を発現させた HEK293MSR 細胞への応答をセカンドメッセンジャーである細胞内  $Ca^{2+}$  と cAMP 動態の両面から検討し、pyGnRH12aa に対する受容体の探索も試みる。

(4) ホタテガイの内因性エストロゲンの構造決定 (原口)

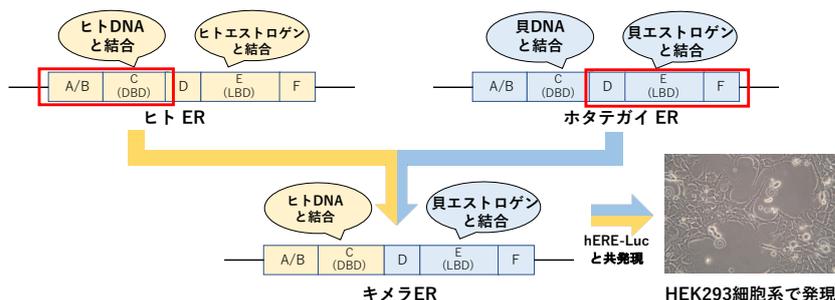


図 1 ヒト ER の DNA 結合ドメインとホタテガイ ER のリガンド結合ドメインで構成されるキメラ ER のルシフェラーゼアッセイ系の構築

ホタテガイエストロゲン受容体 (ER) のリガンド結合領域とヒト ER $\alpha$  の DNA 結合領域を融合させたキメラ ER と ERE-ルシフェラーゼ (Luc) を共発現させた HEK293 細胞によるホタテガイの内因性エストロゲンを特異的に認識し、ヒト ERE に特異的に結合するルシフェラーゼによるレポーターアッセイ系を構築する

(図 1)。ホタテガイ卵巢・精巣から抽出したステロイド画分を、逆相 HPLC によって繰り返し分画し、レポーターアッセイ系に特異的に応答する画分を絞り込み、ホタテガイ内因性のエストロゲン候補分子を探索する。

### 4. 研究成果

(1) 生殖周期に伴う生殖細胞の消長と血球の分布及び生殖幹細胞の出現と性分化 (尾定・長澤)

北海道噴火湾で定期的に採取されたホタテガイを用いて、生殖周期に伴う生殖細胞の消長を詳細に検討した。ホタテガイは一般的に、秋季からの卵原細胞と精原細胞の増殖、分化した卵母細胞の成長と精母細胞・精細胞・精子への発達、春季に産卵期を迎える。産卵を経た後の夏の退縮期・未分化期に見られる雌雄の不明な細胞に生殖細胞特異的に発現する Vasa 遺伝子が確認され、基本的に毎年の雌雄性が保持されているホタテガイでは、未分化ではあっても生殖細胞は常に保持しており、次の生殖に備えていることが明らかになった。興味深いことに、生殖周期を複数年に渡って調査した結果、大量斃死が起こった年級群の生殖周期は、春の産卵後に小規模ではあるが、夏に再び成熟を開始し産卵、退縮を起こすことが明らかになった。この事象は、異常成熟が大量斃死の予兆として捉えられる画期的な発見である (図 2)。

産卵後のホタテガイの生殖巣、特に卵巢では、残る卵母細胞はネクロシスによる崩壊に続いて、未成熟卵母細胞のアポトーシスによる退縮が起こる。その際に、残存する配偶子の排除のために浸潤してくる血球に特異的な遺伝子として、特に、Tal-1/Scl、hatching enzyme-like、 $\beta$ -crystallin B2-like、TGF- $\beta$ -induced protein ig-h3-like、metalloproteinase inhibitor 2-like、protein singed-like の 6 遺伝子を同定した。Tal-1/Scl を除く後者の 5 遺伝子は、循環器に加えて生殖小胞周辺に常在する血球細胞にも認め、侵入することが推測されたことから、血球による退縮期の残存生殖

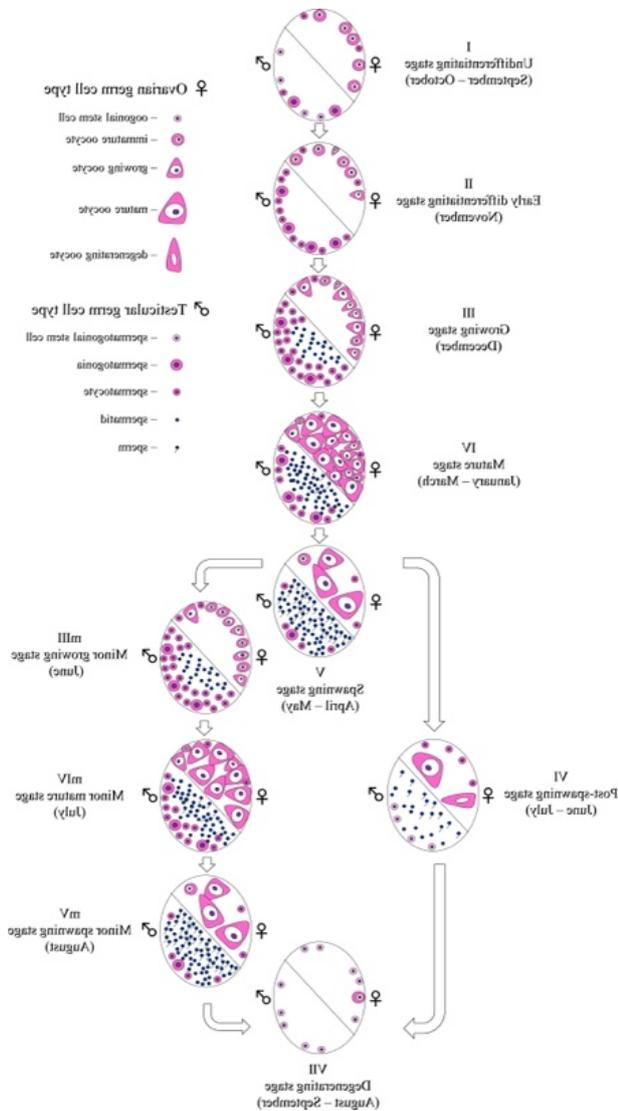


図2 ホタテガイの生殖周期における生殖細胞の発達と異常生殖

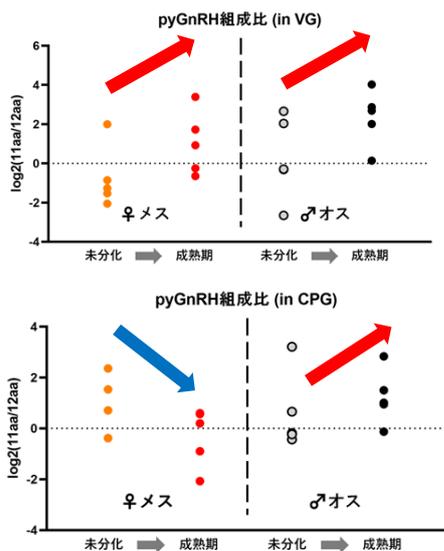


図3 ホタテガイ VG と CPG における雌雄の pyGnRH11aa/pyGnRH12aa 比

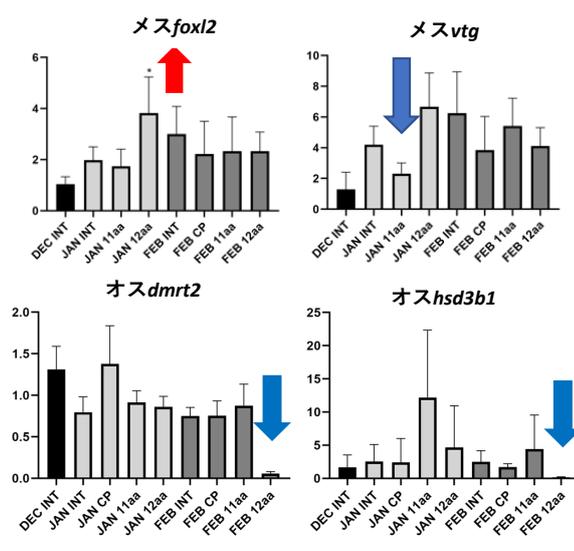


図4 ホタテガイの性特異的遺伝子、ステロイドホルモン合成遺伝子発現に対する pyGnRH11aa と pyGnRH12aa 投与の影響

を示した。組織学的な観察を支持するように、精巣では pyGnRH12aa は雄に特異的、優勢な *dmrt2*、*hsd3b1*、*sox-h* の発現を強く抑制し、雌に特異的な *vtg* の発現を誘導した。卵巣では、pyGnRH12aa は雌特異的な *foxl2* の発現を誘導した一方、pyGnRH11aa は雌に特異的な *vtg* の発現を強く抑制し、雌に優勢なステロイド合成酵素遺伝子 *hsd17b11* を抑制する傾向にあった (図 4)。

細胞の排除が示唆された。

退縮期・未分化期に認められた *Vasa* 遺伝子を発現している生殖細胞の雌雄の性表現を確認するために、発達初期の生殖細胞において発現する性特異的遺伝子の特定を行なった。*Dmrt2* は相対的に精原細胞特異的ではあったが卵原細胞にも弱く発現し、*Sox-H* は雄には特異的ではあったが精母細胞以降の後期の発達段階での発現であったことから、精原細胞分化の指標とはならなかった。一方卵巣では、*Foxl-2* は生殖小胞の体細胞に発現し、*Fem1* は雌に特異的ではなく、卵原細胞分化の指標にはならなかった。その他の雌の生殖細胞に特異的に発現する候補遺伝子 (*FoxE*、*Sc6a5b*) の細胞レベルでの発現が弱すぎ、未分化期の *Vasa* 陽性の生殖原細胞での発現を示すことはできず、未分化期から雌性の分化の瞬間を捉えることはできなかった。

(2) ホタテガイの2種類の pyGnRH ペプチド、pyGnRH11aa と pyGnRH12aa の卵巣と精巣における性分化と生殖細胞の発達への影響 (尾定)

ホタテガイの頭部側部神経節 (CPG)、内臓神経節 (VG) には雌雄ともに幼貝ですでに、免疫組織学的には pyGnRH11aa と pyGnRH12aa ペプチド神経細胞の分布が完了していた。成貝にかけて CPG で性成熟に伴う両神経細胞の発達が認められた。さらに、定量的な両ペプチドの雌雄における成熟期の組成比が、CPG において雌で pyGnRH12aa が優勢である一方、雄では pyGnRH11aa が優勢であったことから、すでに報告しているように pyGnRH11aa による雄性化を支持し、pyGnRH12aa が雌性化に働くことを示唆した (図 3)。

この結果を受けて、培養精巣組織への pyGnRH11aa の in vitro 添加が雄特異的遺伝子 *dmrt2* と雄に優勢なステロイド合成酵素遺伝子 *hsd3b1* を誘導した。さらに、雄ホタテガイへの pyGnRH11aa と pyGnRH12aa の in vivo 投与は、それぞれ精子形成の促進と逆に抑制の効果

pyGnRH11aa による雄性化促進、pyGnRH12aa による雌性化促進機能と相互に拮抗する機能を持つことが強く示唆された。

これらの成果に付随して、pyGnRH によって発現誘導、抑制されるこれら遺伝子群の機能を実際に働いている二枚貝で検証するための二枚貝類の培養細胞系を樹立することに成功した。さらに、二枚貝類や哺乳類培養細胞で広く過剰発現によって遺伝子機能を検証するための強力なプロモーターをマガキ感染性ウイルスから見出し、OsHV-1promoter と命名した。これによって、これまで困難を伴っていた海産軟体動物遺伝子の機能解析が実現した。

### (3) ホタテガイ pyGnRH 受容体の 2 種類の pyGnRH ペプチドに対する応答と相互作用 (佐竹)

ホタテガイ pyGnRH 受容体遺伝子を導入した HEK293 細胞の pyGnRH11aa による細胞内  $Ca^{2+}$  誘導応答に対して、pyGnRH12aa は拮抗作用を示さなかったことから、pyGnRH12aa に対する別の受容体の存在が示唆された。pyGnRH12aa に特異的に親和性を持つ受容体を探索するために、データベースに登録されている 434 個の GPCR (G タンパク共役型受容体) 候補遺伝子から機械学習による予測プログラムを用いて pyGnRH12aa の受容体候補の探索を試み、上位 11 個の候補受容体遺伝子を選択した。HEK293MSR 細胞に発現させ、pyGnRH12aa に対応する応答性を調べた結果、セカンドメッセンジャーとしての  $Ca^{2+}$  と cAMP のいずれにも応答反応が認められず、世界で類を見ない初めての amid 化されていないペプチドホルモンの受容体を見出すことができなかった。応答しなかったこれら受容体を機械学習に加えて探索する範囲を広げる必要がある。

### (4) ホタテガイの内因性エストロゲンの構造決定 (原口)

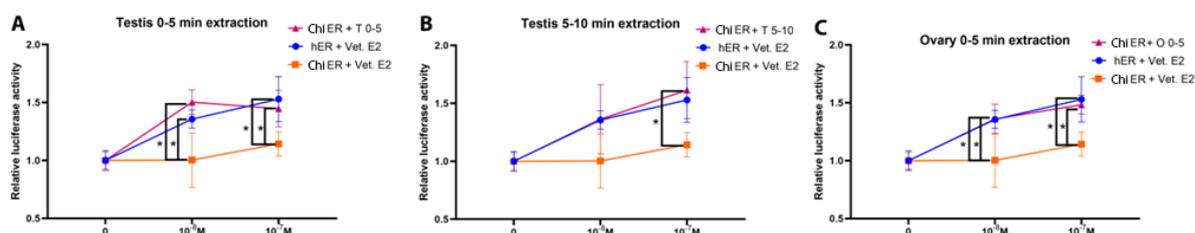


図5 キメラ (Chi) ER のホタテガイ内因性エストロゲン様物質に対する特異的な応答  
逆相 HPLC による精巣抽出物 0-5 分、5-10 分画分と卵巣抽出物 0-5 分画分に見られる強い応答

脊椎動物型エストロゲン  $E_2$  に対してヒト  $ER\alpha$ -ERE-Luc HEK293 細胞のみが用量依存的に応答し、キメラ ER-ERE-Luc HEK293 細胞は応答しなかった。一方、ホタテガイ卵巣、精巣から抽出したステロイド画分に対しては、キメラ ER-ERE-Luc HEK293 細胞が応答したことから、これらキメラ ER とヒト  $ER\alpha$  のリガンドに対する特異性と、脊椎動物型とは異なるエストロゲン様物質をホタテガイが生殖巣に保有していることが示唆された (図 5)。

卵巣と精巣のステロイド抽出画分には、ヒト  $ER\alpha$  が応答する脊椎動物型エストラジオール 17 $\beta$  とは別に、キメラ ER が応答する内因性エストロゲン様分子の存在が確認された。ホタテガイ ER が本来応答する内因性エストロゲン様分子の仲介による GnRH シグナルの作用機構の存在が支持された。

#### <引用文献>

- (1) Kazue Nagasawa, Kouta Muroi, Tongchai Thitiphuree, Yuki Minegishi, Naoki Itoh, Makoto Osada. *Agri Gene*, 3, 46-56, 2017
- (2) Satoshi Nakamura, Makoto Osada and Akihiro Kijima. *Mol. Reprod. Dev.*, 74, 108-115, 2007
- (3) Nicholas Treen, Naoki Itoh, Hanae Miura, Ippei Kikuchi, Takenori Ueda, Keisuke G. Takahashi, Takayoshi Ubuka, Kazutoshi Yamamoto, Peter J. Sharp, Kazuyoshi Tsutsui, and Makoto Osada. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 176, 167-172. 2012
- (4) Makoto Osada and Nicholas Treen. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 181, 254-258, 2013
- (5) Kazue Nagasawa, Nicholas Treen, Reki Kondo, Yurika Otoki, Naoki Itoh, Jeanette M. Rotchell and Makoto Osada. *Gene*, 564, 153-159, 2015
- (6) Kazue Nagasawa, Tomohiro Osugi, Iwao Suzuki, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi, Honoo Satake, Makoto Osada. *Peptides*, 71, 202-210, 2015
- (7) Kazue Nagasawa, Hitoshi Oouchi, Naoki Itoh, Keisuke G. Takahashi, Makoto Osada. *PLoS ONE*, 10(6): e0129571. 2015
- (8) Kazue Nagasawa, Shin Matsubara, Honoo Satake, Makoto Osada. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 282, 113201, 2019
- (9) Akira Shiraiishi, Toshimi Okuda, Natsuko Miyasaka, Tomohiro Osugi, Yasushi Okuno, Jun Inoue, and Honoo Satake. *PNAS*, 116, 7847-7856, 2019

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hiradate, Yuki; Harima, Ryua; Yanai, Rin; Hara, Kenshiro; Nagasawa, Kazue; Osada, Makoto; Kobayashi, Tomoe; Matsuyama, Makoto; Kanno, Shinichiro; Yasui, Akira; Tanemura, Kentaro	4. 巻 21
2. 論文標題 Loss of Axdnd1 causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reprod. Med. Biol	6. 最初と最後の頁 e12452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12452	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 Wenbin Gu, Tongchai Thitiphuree, Yurika Otoki, Emily C. Marquez, Takeshi Kitano, Naoki Itoh, Kazue Nagasawa, Makoto Osada	4. 巻 231
2. 論文標題 Expression and functional analyses for estrogen receptor and estrogen related receptor of Yesso scallop, Patinopecten yessoensis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 106302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsbmb.2023.1063	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 Jeongwoong YOON, Wen-Bin GU, Mizuki KONUMA, Mutsuko KOBAYASHI, Hayato YOKOI, Makoto OSADA, Kazue NAGASAWA	4. 巻 119
2. 論文標題 Gene delivery available in molluscan cells: Novel strong promoter was discovered from bivalve-infectious virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2209910119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2209910119	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 Tomohisa Ogawa, Rie Sato, Takako Naganuma, Kayeu Liu, Saho Sato, Shizuka Sakaue, Makoto Osada, Kyosuke Yoshimi and Koji Muramoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Diversified Biomineralization Roles of Pteria penguin Pearl Shell Lectins as Matrix Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031081	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 Mariia Mokrina, Kazue Nagasawa, Makoto Kanamori, Masafumi Natsuike, Makoto Osada	4. 巻 19
2. 論文標題 Seasonal composition of immature germ cells in the Yesso scallop identified by vasa-like gene (my-vlg) and protein expression, with evidence of irregular germ cell differentiation accompanied with a high mortality event	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture Reports	6. 最初と最後の頁 100613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aqrep.2021.100613	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 Mizuki Konuma, Kazue Nagasawa, Mariia Mokrina, Mutsuko Kobayashi, Makoto Osada	4. 巻 787
2. 論文標題 Gonadal somatic cell-specific transforming growth factor- superfamily member in the Yesso scallop reveals gonadal somatic cell distribution during the reproductive phase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145627	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 Kazue Nagasawa, Makoto Kanamori, Jeongwoong Yoon, Mutsuko Kobayashi, Mariia Mokrina, Takahiro Kato, Makoto Osada	4. 巻 137
2. 論文標題 Hemocytes of Yesso scallop characterized by cytological, molecular marker, and functional analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Shellfish Immunol	6. 最初と最後の頁 108751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2023.108751	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 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 顧文彬・尾定誠・長澤一衛
2. 発表標題 糖タンパク質ホルモンと受容体FSHRによるホタテガの生殖腺発達への制御機構
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾定誠・長田知大・長澤一衛・顧文彬・堀雅敏・内木敏人・寺井しま
2. 発表標題 二枚貝浮遊幼生の着底・変態の神経支配と光による制御
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gu Wenbin・Shenelle Pamela Bairan Lim・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイの濾胞刺激ホルモン(Fsh)および受容体(Fshr)様分子の探索と生殖巣発達への影響
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON・Mizuki KONUMA・Gu WEN-BIN・Mutsuko KOBAYASHI・Makoto OSADA・Kazue NAGASAWA
2. 発表標題 ホタテガイ生殖巣の初代培養およびエレクトロポレーションによる遺伝子導入の試み
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小沼瑞・尾定誠・Jeongwoong Yoon・小林睦子・長澤一衛
2. 発表標題 マイクロインジェクションを用いた二枚貝類受精卵への遺伝子導入法の開発
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野里穂・Jeongwoong Yoon・小林睦子・小沼瑞・尾定誠・長澤一衛
2. 発表標題 二枚貝類における組織移植技術(グラフト)の開発
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤一衛・Mariia Mokrina・金森誠・夏池真史・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ血球の細胞学的解析と造血組織特定への試み
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mariia Mokrina, Kazue Nagasawa, Makoto Kanamori, Masafumi Natsuike, Makoto Osada
2. 発表標題 Quantitative analysis of reproductive status and evidences of “minor” spawning event in Mizuhopecten yessoensis in Funka Bay
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田渉・小泉慎太郎・吉田達・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 雄ホタテガイのpyGnRH11AA及びpyGnRH12AAペプチドホルモンの性分化と精子形成に及ぼす影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ養殖の未来を考える
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島隆広・Tongchi Thitiphuree・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイにおける2種類のpyGnRHの性分化と卵形成に及ぼす影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小沼瑞・長澤一衛・Mokrina Mariia・小林睦子・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ生殖巣において体細胞特異的に発現する遺伝子の同定
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長田知大・加藤元一・内木敏人・寺井しま・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 二枚貝浮遊幼生の着底・変態における神経ホルモンの影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 顧文彬・Shenelle Pamela Bairan LIM・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイの糖タンパク質ホルモンと受容体Fshr-1の制御経路の解明と生殖巣発達への影響
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 顧文彬・Mariia Mokrina・Shenelle Pamela Bairan LIM・小林睦子・栖原健吾・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイの2種類のpyGnRHペプチドによる性分化と生殖細胞発達への影響
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 長澤一衛（東北大院農）・金森誠（北総研機構）・小林睦子・Mokrina Mariia・Yoon Jeongwoong・加藤嵩大・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ血球の形態・性状と遺伝子発現に関する研究
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 Jeongwoong YOON・Wen-Bin GU・小沼瑞・小林睦子・横井勇人・尾定誠・長澤一衛
2. 発表標題 水産軟体動物細胞で機能するウイルスプロモーターの発見
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 長澤一衛・金森誠・小林睦子・Mokrina Mariia・Yoon Jeongwoong・加藤嵩大・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイ血球の細胞学的解析とRNA-Seq解析およびグラフトによる細胞性免疫の解析
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jeongwoong YOON・Wen-Bin GU・小沼瑞・小林睦子・横井勇人・尾定誠・長澤一衛
2. 発表標題 海産軟体動物由来の初代細胞培養の樹立と二枚貝感染ウイルスプロモーターを用いた遺伝子導入系の確立
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 GU WENBIN・原口省吾・長澤一衛・尾定誠
2. 発表標題 ホタテガイの内因性エストロゲン様分子の探索
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Osada, Kazue Nagasawa
2. 発表標題 Gonadotropin-releasing hormone, GnRH, in invertebrates -Functional evolution and diversity-
3. 学会等名 Tohoku University-OIST 3rd Joint Workshop on Biodiversity: From Genes and Species to Ecosystem Services and Resilience (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾定誠
2. 発表標題 二枚貝の生殖生物学と種苗生産
3. 学会等名 日本水産学会東北支部例会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 YOON Jeongwoong、栖原健吾、門上雄亮、尾定誠、長澤一衛
2. 発表標題 ディープラーニング物体検出を活用した魚介類生殖腺の組織画像解析の効率化
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤嵩大、YOON Jeongwoong、小林睦子、尾定誠、中村智治、長澤一衛
2. 発表標題 海産二枚貝類における生殖細胞移植技術の開発
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂口あかり、伊藤直樹、安齋 賢、澤山英太郎、顧文彬、尾定誠、長澤一衛
2. 発表標題 日本産ホタテガイのゲノムワイド関連解析（GWAS）で明らかになった性関連領域における性鑑別プライマーの開発
3. 学会等名 第23回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Makoto Osada, Toshie Matsumoto	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Apple Academic Press	5. 総ページ数 406
3. 書名 Chapter 6 “Endocrine control of gametogenesis and spawning in bivalves” in Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology, Volume 1: A Collection of Reviews in the Post-Genomic Era.	

1. 著者名 Ryusaku Deguchi, Makoto Osada	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 379
3. 書名 Chapter 7 “Gametogenesis, Spawning, and Fertilization in Bivalves and Other Protostomes.” In Reproduction in Aquatic Animals	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

-

## 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	佐竹 炎  (Satake Honoo)  (20280688)	公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・主幹研究員   (74408)	
研究分担者	原口 省吾  (Haraguchi Shogo)  (20592132)	昭和大学・医学部・講師   (32622)	
研究分担者	長澤 一衛  (Nagasawa Kazue)  (50794236)	東北大学・農学研究科・助教   (11301)	

## 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
---------	---------