

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22588

研究課題名(和文) 魚類生殖幹細胞の“見える化”～代理親魚技術の普及を目指して～

研究課題名(英文) Visualization of germ line stem cells in fish

研究代表者

市田 健介 (ichida, kensuke)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：70882637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：代理親魚技術の実用化を目指し、A型精原細胞をユニバーサルに“見える化”する技術の樹立をするために、A型精原細胞の細胞表面抗原に対する抗体が認識する抗原分子の同定に着手した。マグロA型精原細胞特異抗体を用いた2次元電気泳動により抗原タンパク質の単離を行った。その結果、抗体陽性のスポット2つを分離することに成功したため、そちらを質量分析に供した。質量分析およびin silico解析の結果、合計26の膜タンパク質が同定された。その後のスクリーニングの結果、1遺伝子についてマグロA型精原細胞における特異的なシグナルを観察することに成功し、マグロA型精原細胞特異抗体の抗原である可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で魚類のA型精原細胞の細胞表面に特異的に発現しているタンパク質の同定に成功し、かつ本研究室が保有するA型精原細胞特異抗体の抗原である可能性が強く示唆された。本タンパクが当該抗体の抗原であると確認されれば、これは魚類において抗原として使用可能な分子を初めての同定したことになり、あらゆる魚種において容易にA型精原細胞の細胞操作を可能とするツールとなると期待できる。この4-5年間で生殖細胞移植に関する研究発表数は急増しており、本技術の水産、保全生物学の分野における貢献が世界的に着目されている。そのような背景の中、上述のようにあらゆる魚種に応用可能な細胞操作技術の波及効果は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：To establish the visualization techniques for ASGs aiming for spreading of surrogate broodstock, the identification of the epitope of antibody which are specifically recognize cell surface antigen of ASGs, were conducted. Firstly, we attempted to isolate the antibody-positive protein by 2D electrophoresis with western blotting. As a result, 2 antibody-positive spots could be isolated. Next, mass spectrometry were conducted against these extracted antibody-positive gel-fractions. Consequently, 26 proteins out of 172 total proteins possessing transmembrane regions via in silico analysis. Further, to screen the identification of genes which specifically express in ASGs and not express the other kinds of testicular cells, RT-PCR analysis and in situ hybridization were conducted. As a result, 1 gene were specifically expressed tuna ASGs indicating the possibility that it is the epitope of this antibody.

研究分野：発生工学

キーワード：A型精原細胞 生殖細胞移植 細胞表面抗原 魚類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

所属研究室では、ドナーとなる魚類の生殖幹細胞を、宿主となる異種の腹腔内に移植することで、成熟した異種の宿主からドナー由来の配偶子を生産する代理親魚技術を確立している (Takeuchi et al., 2004; Okutsu et al., 2007)。本技術を用いて、クロマグロのような大型で種苗生産の難しい種の生殖幹細胞を、サバのような小型かつ飼育の容易な種に移植することで、クロマグロを生むサバを作出することが可能となると期待される。本技術により、種苗生産に必要なスペース、時間、労力を大幅に削減できることに加え、宿主となる小型魚は日長や水温等、人為的な環境調整が容易な陸上水槽で飼育可能であるため、ドナーとなる魚種の人為催熟、1対1交配を容易に行えるうえ、世代の加速も可能となる。これにより種苗生産の難しい魚種の育種を飛躍的に加速させることが可能になると期待されている。

これまでの研究より代理親魚技術において、移植後に宿主の生殖腺に生着可能な細胞は、精原幹細胞と呼ばれる一部の未分化な生殖幹細胞であることが明らかとなっている (Yano et al., 2008)。つまり、代理親魚技術を成功させるためには、全精巢細胞中に含まれる精原幹細胞を単離すること、次いで適切な量のドナー細胞を移植操作に供すること、さらに移植された精原幹細胞が宿主生殖腺に生着し、配偶子形成へと向かうかを経時的に観察すること、という一連の細胞操作が極めて重要となる。しかし現行法においては、移植を施した宿主魚においてこれら一連の細胞操作のプロセスが成功しているかは、その宿主魚が成熟し、配偶子生産を行うまでわからない。そのため最終的な移植実験の成功の可否を判断するのに多大な時間を必要とすることや、適切な宿主魚を得るために、必要数以上の移植魚の飼育をしなくてはならないことが本技術を普及するうえでの大きな障壁となっている。そのため、精原幹細胞を生きた状態のまま簡便に“見える化”することができればこれら一連の細胞操作の成功の可否をリアルタイムで判断することが可能となり、代理親魚技術の普及、効率化を進めるうえで強力なツールとなる。

そこで生殖幹細胞の“見える化”技術として、細胞表面抗原の利用に着目した。一般的に細胞膜表面には、細胞種特異的なタンパク質や糖鎖が存在する。そのため生殖幹細胞特異的な細胞表面のタンパク質や糖鎖に対する抗体を作成し、それらを蛍光標識することで、標的細胞特異的に生きた状態のまま“見える化”することが可能となる。申請者らは既に、ニジマス、クロマグロの2種の生殖細胞の細胞表面抗原を特異的に認識可能な抗体ライブラリーを樹立し、それを用いて精原幹細胞の“見える化”技術を樹立することに成功している (Ichida et al., 2019; Hayashi et al., 2019)。しかしながらこれらの抗体群はニジマス、クロマグロ以外で応用することができない。そこで申請者は、様々な魚種で利用可能なユニバーサルな“見える化”技術の樹立を目指し、各抗体が認識する抗原を同定し、その各種魚種のオースログ抗原に対する新規抗体の作成をすることでユニバーサルな“見える化”の樹立をすることが可能となると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、様々な水産有用魚種における精原細胞の“見える化”技術の樹立を最終目的とした。具体的には魚類の精原細胞の細胞表面に特異的に発現しているタンパク質を同定し、それに対する抗体を作成することで、ユニバーサルに利用可能な細胞表面抗原に対する抗体を作成できると考えた。最終的にはこの“見える化”技術の抗体および移植のマニュアルのみで世界中の誰もが高効率に代理親魚技術を利用可能になることを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究ではニジマス、クロマグロの生殖細胞特異抗体ライブラリーを保有している (Ichida et al., 2019; Hayashi et al., 2019)。本ライブラリーは、それぞれの魚種のA型精原細胞を単離し、細胞が生きた状態のままマウスに免疫をして作成したモノクローナル抗体のライブラリーである。本ライブラリーにはクロマグロのA型精原細胞の細胞表面抗原を特異的に標識可能なNo152抗体が含まれている (Ichida et al., 2019)。本抗は生きた細胞自体を免疫して作成したものであり、その抗原は明らかとなっていない。そこで魚種を超えて利用可能な細胞表面抗原単離を目指し、No152抗体の抗原タンパク質同定を試みた。まずクロマグロ精巢の膜タンパク質分画においてNo152抗体をもちいたウェスタンブロッティングにより抗原タンパク質の検出を試みた。さらに検出されたタンパク質を2次元電気泳動に供し当該タンパク質を濃縮し、MALDI/TOFMSで質量分析に供することで抗原の同定を行った。さらに、得られた候補遺伝子の *in silico* 解析、RT-PCR、*in situ* hybridization により、本抗体が認識する抗原の絞り込みを行った。

### 4. 研究成果

まずは本抗体が認識するタンパク分子の可視化を目的としたウェスタンブロッティングを行った。タンパク質調整法および様々な条件での検討を行った。主にタンパク質の抽出法について検討した結果、クロマグロ精巢組織の膜分画から非還元バッファー、あるいは膜タンパク抽出に優れたCHAPSを用いたバッファーで抽出し、30-40%硫酸分画を行った膜分画タンパクにおけるウェスタンブロットにおいて、2つの85kDa、60kDa以下の分子量の明瞭なシグナルを得ることに

成功した。さらにそもそも本抗体が認識する抗原がタンパク質であるのか糖鎖であるかを判断するために、Nグリコシダーゼ、Oグリコシダーゼを用いて抗原を処理したのち、同条件によるウェスタンブロットに供した。その結果、Nグリコシダーゼで処理した区は明瞭なシグナルの分子量の遷移が見られたのに対し、Oグリコシダーゼで処理した区においてはシグナルの遷移は見られず、いずれの試験区においてもシグナルの消失は見られなかった。すなわち、本抗体が認識する抗原分子は糖鎖ではなくタンパク質を認識する可能性が高いことが示唆された。そこで、本抗体が認識する抗原分子を濃縮しプロテインシーケンスに供することによる抗原分子の同定を目指して、その条件をもとに2次元電気泳動による抗原タンパク質の単離を行ったのちNo152抗体を用いたウェスタンブロットに供した結果、抗体陽性のスポット2つを分離することに成功した。さらにそちらの切り出しを行ったのちに質量分析に供した。質量分析の結果はマグロ全ゲノムのデータベースの予測タンパク質を参照した結果、合計173の抗原タンパク質候補が得られた。それら候補遺伝子の *in silico* 解析を行った結果、26のタンパク質が膜貫通領域を保持しており、膜タンパク質であることが示唆された。さらにそれらの候補の中からA型精原細胞において強発現しており、かつ生殖腺体細胞などで発現していない遺伝子を、抗体陽性および陰性細胞分画 cDNA を用いた RT-PCR にて確認した。その結果、5遺伝子においてA型精原細胞における特異的かつ強い発現が確認された。さらにそれらの遺伝子のうち、*in situ* hybridization によりマグロA型精原細胞での局在を確認した結果、1遺伝子についてマグロA型精原細胞における特異的なシグナルを観察することに成功し、マグロA型精原細胞特異抗体の抗原である可能性が強く示唆された(図2)。今後は本遺伝子の組み換えタンパク質を作成し、それが抗体が結合するかを確かめることで、本遺伝子が抗原であるかの確認を行う予定である。

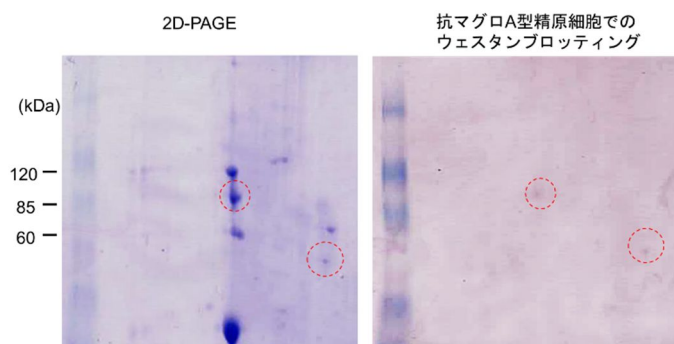


図1. 2次元電気泳動に対する152抗体を用いたウェスタンブロットング象。赤破線は抗体陽性のスポットを示す。

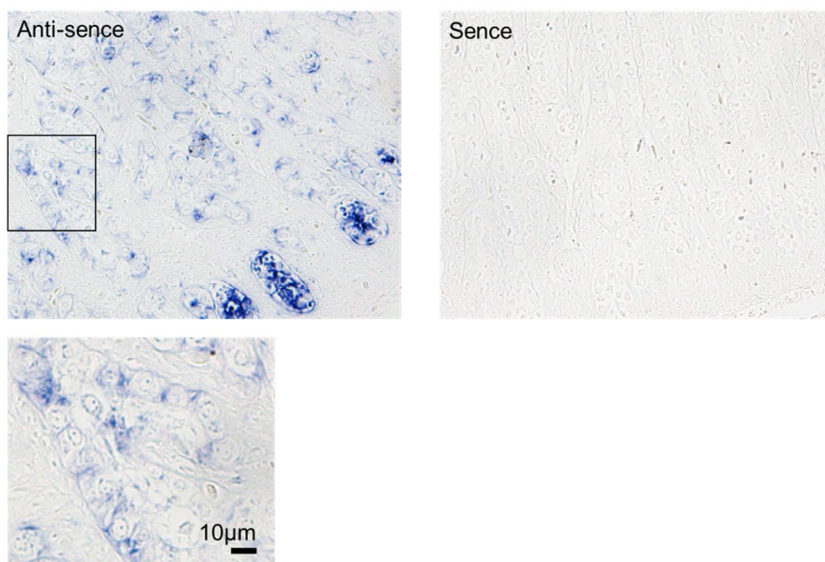


図2. No152抗原候補遺伝子の *in situ* hybridization 象。青色がRNAプローブのシグナルを示す。

#### 引用文献

Hayashi M, Ichida K, Sadaie S, Miwa M, Fujihara R, Nagasaka Y, Yoshizaki G (2019) Establishment of novel monoclonal antibodies for identification of type A spermatogonia

in teleosts. *Biol Reprod* 101:478-491

Ichida K, Kawamura W, Miwa M, Iwasaki Y, Kubokawa T, Hayashi M, Yazawa R, Yoshizaki G (2019) Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye-conjugated antibodies. *Biol Reprod* 100:1637-1647

Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki, G (2007) Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317: 1517.

Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T (2004) Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430: 629-630.

Yano, A., Suzuki, K., Yoshizaki, G (2008) Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol Reprod*, 78, 151-158.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 K Ichida, A Jangprai, P Khaosa-art, G Yoshizaki, S Boonanuntasarn.	4. 巻 106869
2. 論文標題 Characterization of a vasa homolog in Mekong giant catfish ( <i>Pangasianodon gigas</i> ): Potential use as a germ cell marker.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anireprosci.2021.106869	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 R Yazawa, T Kubokawa, K Ichida, W Kawamura, R Tani, S Kamio, T Morita, G Yoshizaki.	4. 巻 87
2. 論文標題 Establishment of a tracing technique for transplanted bluefin tuna germ cells in recipient's gonads using monoclonal antibodies specifically recognizing bluefin tuna spermatogenic cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-020-01486-2	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 K Ichida, Y Matsushita, Y Amano, M Miwa, K Nagasawa, M Hayashi, H Mizutani, M Takahashi, S Boonanuntasarn, G Yoshizaki	4. 巻 533
2. 論文標題 Visualization and tracking of live type a spermatogonia using a fluorescence-conjugated antibody in <i>Salmo</i> species.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 736096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2020.736096	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 R Duangkaew, F Kezuka, K Ichida, S Boonanuntasarn, G Yoshizaki	4. 巻 155
2. 論文標題 Aging-and temperature-related activity of spermatogonial stem cells for germ cell transplantation in medaka.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 213-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2020.05.049	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市田健介, Rangsong Duangkaew, Surintorn Boonanuntanasarn, 吉崎悟朗
2. 発表標題 生殖細胞移植を用いたメコンオオナマズの配偶子生産
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野雄一, 鈴木弘貴, 渡辺峻, 阿久津崇, 丸山隆太, 市田健介, 吉崎悟朗
2. 発表標題 アユの遺伝子資源保存に向けた生殖細胞凍結技術および移植技術の至適化
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村亘, 神尾茂治, 市田健介, 矢澤良輔, 森田哲朗, 吉崎悟朗
2. 発表標題 小型代理親魚が生産したドナー由来クロマグロ精子の濃縮法
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang Fang, Kensuke Ichida, Goro Yoshizaki
2. 発表標題 Successful transplantation of donor spermatogonia derived from postmortem rainbow trout
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市田健介, 谷怜央人, Araya Jangprai, Ponsawang Kaosad, 矢澤良輔, 森田哲郎, 吉崎悟朗, Surintorn Boonanuntasarn
2. 発表標題 アジアスズキ遺伝子資源の長期保存を目指した生殖細胞移植条件の最適化
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野雄一, 鈴木弘貴, 渡辺峻, 阿久津崇, 丸山隆太, 市田健介, 吉崎悟朗
2. 発表標題 アユの代理親魚技術構築のための生殖細胞移植条件の最適化
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村亘, 神尾茂治, 矢澤良輔, 市田健介, 森田哲郎, 吉崎悟朗
2. 発表標題 生きたクロマグロ精子を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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

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
---------	---------