

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19138

研究課題名（和文）トランスフェリン受容体を利用した新たな魚類精原細胞可視化技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel method for visualizing fish spermatogonia using transferrin receptor

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） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：所属研究室は、魚類の精原細胞を近縁種の魚に移植することで、ドナー精原細胞に由来する次世代個体を作成する代理親魚技術の樹立に成功しており、様々な応用が期待されている。代理親魚技術においては移植したドナー細胞集団のうち一部の精原細胞のみが配偶子形成に進むことが分かっている。そのため、精原細胞を生きた状態のまま簡便に可視化し、これの単離、定量、追跡という一連の細胞操作を効率的に行うことが極めて重要となる。そこで課題では、精原細胞で特異的に発現しているトランスフェリン受容体を介して、蛍光標識した鉄イオン、トランスフェリンを精原細胞内へと取り込ませることで、精原細胞特異的な生体染色技術の樹立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスフェリン受容体を利用した精原細胞の可視化技術は全く報告がない挑戦的な試みとなった。蛍光トランスフェリンを用いた生体染色では、トランスフェリン特異抗体を用いた染色パターンとの一致は見られなかったが、特異抗体を用いたニジマス精原細胞の細胞操作は可能となり、代理親魚技術における有用な技術の1つになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our laboratory previously have been established surrogate broodstock technology and it is expected to be applied to various kinds of species and situations. In this technology, the small portions of spermatogonial population can be incorporated into the recipient gonads. therefore, it is important to visualize, isolate and trace the donor cells through the series of experimental process. In this study, we have tried to establish the live cell staining techniques of spermatogonia by transferrin or iron, which are labeled with fluorescent substrate, via binding and endocytosis of transferrin receptor1.

研究分野：魚類発生工学

キーワード：トランスフェリン受容体 細胞表面抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らの研究室では魚類の精原細胞を単離し、それらを宿主となる近縁種や同種異系統の魚に移植することで、ドナー精原細胞に由来する次世代個体を作成する代理親魚技術の樹立に成功している。さらに本技術を精原細胞の凍結保存技術、および *in vitro* 培養技術と組み合わせることによって、絶滅危惧種の凍結保存しておいた精原細胞を *in vitro* 培養で増殖させ、その細胞を代理親となる近縁種に移植することで、凍結精原細胞から絶滅危惧種の個体を復活させることが可能となる。本技術で最も重要な点は、ドナー生殖腺に存在する精原細胞を単離したのち、それらを *in vitro* で確実に増殖させること。さらに、増殖させた精原細胞を適切な数、宿主となる孵化仔魚腹腔内に移植し宿主生殖腺中で配偶子へと分化誘導させることである。そのため、精原細胞の可視化を行い、それらの単離、移植、追跡などの一連の細胞操作を様々な種で容易に行うことが可能となれば、今後、代理親魚技術を個々の絶滅危惧種へ応用してプロセスを大幅に加速することができる。申請者らはこれまで、遺伝子組み換え技術や特異抗体を用いた精原細胞の可視化技術を行ってきた。これらの研究で樹立した生殖細胞の可視化技術は精原細胞を高精度で認識できるものの、いずれも個々の魚種ごとに限定されたものとなっており、あらゆる魚種に応用可能なユニバーサルな展開は原理的に困難を伴う。

2. 研究の目的

そこで、本応募では実際の絶滅危惧種においても利用可能な精原細胞のユニバーサルな可視化技術の開発を行う。申請者らはこれまでにトランスフェリン受容体がニジマス精原細胞の細胞膜表面において特異的に強発現していることを見出している。トランスフェリンは鉄イオンと結合し、トランスフェリン受容体を介して細胞内に鉄イオンを輸送する機能を持つが、この過程は広い生物種で保存されていることが知られている。そこで鉄イオンおよびトランスフェリンを蛍光色素で標識し、トランスフェリン受容体を介して精原細胞内へと取り込ませることで、精原細胞を優占的に生体染色することが可能ではないかと考えた。本技術を樹立することで、精原細胞を含む細胞懸濁液に、蛍光標識した鉄イオンとトランスフェリンを添加するという非常に簡便な操作だけで、あらゆる魚の精原細胞を蛍光標識可能となる。そこで本課題では各種サケ科魚類をモデルに用い、トランスフェリン受容体を介したユニバーサルな生体染色法を樹立し、代理親魚の作出効率の改善を目指した。

3. 研究の方法

代理親魚技術を高効率に成功させるためには、全精巣細胞中に含まれる A 型精原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必要となる。申請者らはニジマスの未成熟精巣においてトランスフェリン受容体が精原細胞の細胞膜特異的に発現していることを明らかにしている。そこでトランスフェリン受容体を細胞表面抗原マーカーとすることで、それを認識する抗体を樹立し、差抗体を用いた細胞の染色が可能かを検討した。さらにトランスフェリンや鉄イオンを細胞内へ取り込むというトランスフェリン受容体の特徴を利用し、蛍光物質で標識したトランスフェリンや鉄イオンを取り込ませることで、A 型精原細胞の生体染色を試みた。

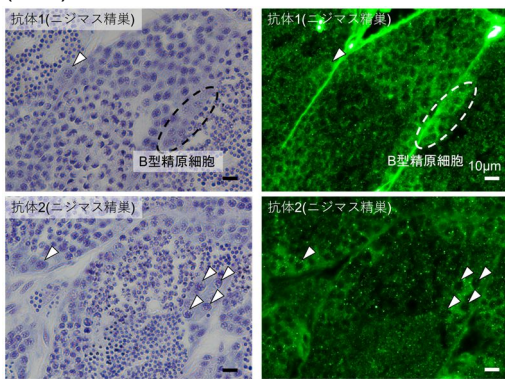
まず *in situ* hybridization や免疫染色により mRNA, タンパク質レベルでニジマスのトランスフェリン受容体 (*tfr1*) の発現解析を行った。さらにトランスフェリンを蛍光物質で標識した AcidiFluor ORANGE を用いた蛍光標識を行い、ニジマス A 型精原細胞の可視化、単離、移植後の追跡が可能かの検証を行った。

4. 研究成果

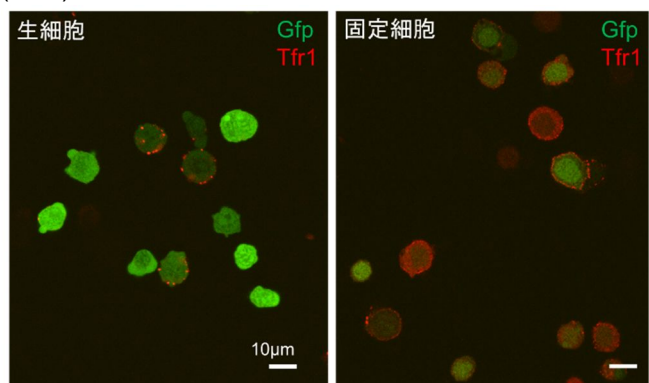
申請者らは本分子の特性を用いて蛍光標識トランスフェリンおよび蛍光標識鉄を A 型精原細胞に取り込ませることによる生体染色の樹立を最終目標として、実際に *tfr1* のニジマス精巣および精巣細胞に対しての発現解析を行った。当該遺伝子の RNA プローブを作成し *in situ* hybridization を行い mRNA の局在を観察した結果、*tfr1* はニジマス精巣における A 型精原細胞にて優先的に、B 型精原細胞にて弱く発現していることが明らかとなり、当初の目的を遂行する

上で有利な遺伝子であることが示された。さらに *tfr1* アミノ酸の細胞膜領域外 2 か所に対しポリクローナル抗体を作成し、タンパク質に対しての発現解析を行った。その結果、組織切片においては *in situ* hybridization と同様の発現パターンが観察され、タンパク質においても mRNA と同様に A 型精原細胞において優先的に発現していることが明らかとなった(図 1)。全ての精原細胞でさらにそれらの抗体を用いてニジマス精巣細胞を酵素分散した生細胞に対して *tfr1* 抗体を用いて染色した結果、一部の A 型精原細胞のみをヘテロに染色することが明らかとなった(図 2)。また固定細胞を染色した結果、全ての精原細胞でシグナルが得られた。すなわち *Tfr1* は潜在的に全ての細胞で発現しているが、一部の細胞のみで細胞膜表面に提示されていることが明らかとなった(図 2)。さらに、*tfr1* 抗体を用いて染色した一部の A 型精原細胞を分取し、ニジマス孵化稚魚に対する移植実験を行った結果、*tfr1* 抗体陽性の A 型精原細胞は抗体陰性の A 型精原細胞と比較して高い値を示し、*tfr1* は生着能の高い細胞を標識できる可能性が示唆された(図 3、4)。しかしながら生体染色を行うため蛍光標識トランスフェリンである AcidiFluor ORANGE を用いて、ニジマス精原細胞の染色を試みたが、ニジマス生殖細胞特異的、あるいは *tfr1* 抗体と一致する形のシグナルは得られなかった(図 5)。

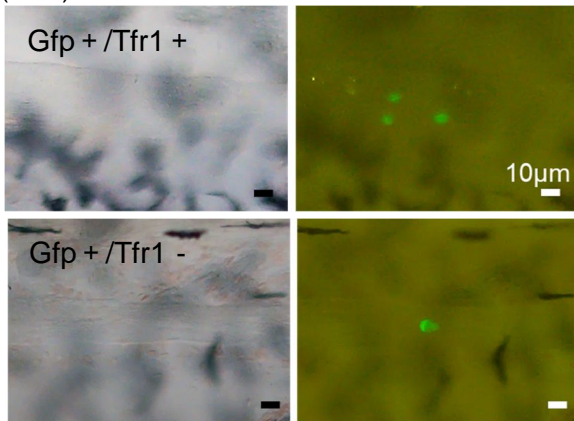
(図 1)ニジマス精巣における免疫染色像



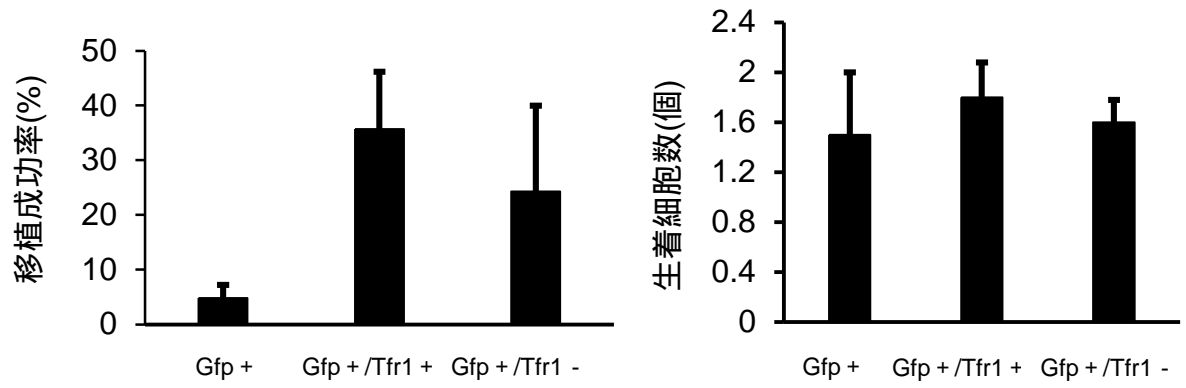
(図 2)ニジマス分散細胞における免疫細胞染色像



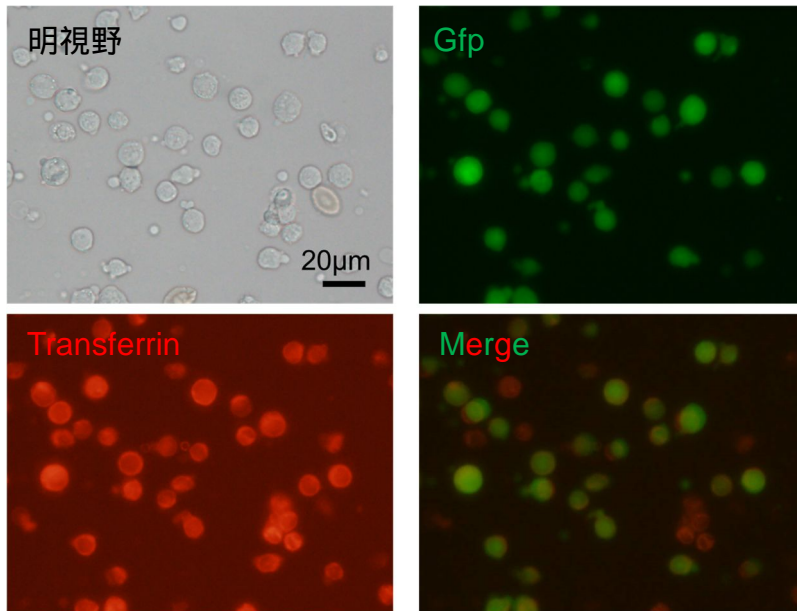
(図 3) *Tfr* 陽性細胞を移植した宿主生殖腺の蛍光観察像



(図4) Tfr 陽性細胞の移植成功率および生着細胞数



(図5) AcidiFluor ORANGE を用いて生体染色したニジマス生殖細胞



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Surintorn Boonanuntanasarn, Somkiat Sreebun, Kullanan Booncherd, Pongsawan Khaosa-art, Treerat Sooksawat, Kensuke Ichida, Nopadon Pirarat, Ryosuke Yazawa	4. 巻 570
2. 論文標題 Cryopreservation of testicular cell in striped catfish (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) and its effects on apoptosis, germ-cell specific gene expression and germ cell transplantability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 739370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2023.739370	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 Fang Yang, Kensuke Ichida, Goro Yoshizaki	4. 巻 552
2. 論文標題 Gametogenesis commencement in recipient gonads using germ cells retrieved from dead fish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 737952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2022.737952	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 Ryo Fujihara, Naoto Katayama, Sakiko Sadaie, Misako Miwa, Gabriela Angelica Sanchez Matias, Kensuke Ichida, Wataru Fujii, Kunihiko Naito, Makoto Hayashi and Goro Yoshizaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Production of germ cell-less rainbow trout by dead end gene knockout and their use as recipients for germ cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 417-429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-022-10128-w	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 Fang Yang, Kensuke Ichida, Goro Yoshizaki.	4. 巻 552
2. 論文標題 Gametogenesis commencement in recipient gonads using germ cells retrieved from dead fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 737952
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kensuke Ichida, Araya Jangprai, Pongsawan Khaosa-art, Goro Yoshizaki, Surintorn Boonanuntanasarn.	4. 巻 234
2. 論文標題 Characterization of a vasa homolog in Mekong giant catfish (Pangasianodon gigas): 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 106869
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

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 猿田裕典、山川宏樹、市田健介、吉崎悟朗
2. 発表標題 nanos-gfp導入ニジマスにおける機能的精原幹細胞の濃縮
3. 学会等名 令和6年度 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿久津崇、塩澤佳奈子、鈴木究真、天野雄一、鈴木弘貴、市田健介、吉崎悟朗
2. 発表標題 代理親魚技術により生産したアユの成長と性成熟
3. 学会等名 令和6年度 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市田健介、鈴木弘貴、天野雄一、山川宏樹、松下芳之、丸山瑠太、阿久津崇、渡辺峻、塩澤佳奈子、鈴木究真、吉崎悟朗
2. 発表標題 アユ代理親魚技術の構築
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 Ichida Kensuke, Suzuki Koki, Amano Yuichi, Maruyama Ryuta, Matsushita Yoshiyuki, Akutsu Takashi, Shiozawa Kanako, Watanabe Shun, Suzuki Kyuma, Yoshizaki Goro
2. 発表標題 Production of offspring derived from cryopreserved spermatogonia by surrogate broodstock in ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)
3. 学会等名 12th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市田健介、三輪美砂子、吉崎悟朗
2. 発表標題 ニジマス生殖腺におけるstm遺伝子の発現解析
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 鈴木弘貴, 天野雄一, 山川宏樹, 松下芳之, 丸山瑠太, 阿久津崇, 渡辺峻, 塩澤佳奈子, 鈴木究真, 市田健介, 吉崎悟朗
2. 発表標題 代理親魚技術による凍結細胞からのアユの生産
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 高瀬研志, 市田健介, 小祝敬一郎, 吉崎悟朗, 廣野育生, 近藤秀裕
2. 発表標題 抗生殖細胞抗体を利用した免疫学的不妊化技術の検討
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 市田健介, Rangsung Duangkaew, Surintorn Boonanuntasarn, 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 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 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

〔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
---------	---------