

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440166

研究課題名(和文)性転換魚の生殖原細胞における雌雄性調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of sexual difference in the gonial germ cells of the sex-changing fish

研究代表者

堀口 涼(Horiguchi, Ryo)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術職員

研究者番号：70452969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、性転換魚であるミツボシキウセンを用いて、その雌雄生殖原細胞の遺伝子発現を解析し、これまで未解明であった生殖細胞の性的可塑性や性差を生み出す分子機構の解明をめざしてきた。そのため、魚類の精巣や卵巣から生殖原細胞を分離する必要があり、フローサイトメトリーによる単離方法を検討した。生殖細胞にGFPを持つトランスジェニックメダカにおいて幹細胞マーカーを指標にして、また、GFPを持たないメダカにおいても2種類の幹細胞マーカーを利用することで、生殖原細胞(精原細胞)を単離することに成功した。今後、これらの方法を用いて、ミツボシキウセンの雌雄生殖原細胞を単離し、遺伝子解析を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of sexual plasticity and sex difference of germ cells, which had not been clarified before, by analyzing gene expression of the gonial germ cells of three-spot wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Therefore, it is necessary to separate the gonial germ cells from the testes and ovaries of fish, and the method for isolation using flow cytometry was examined. We demonstrated that methods to isolate the male gonial germ cells (spermatogonia) by using the stem cell marker as an indicator in transgenic medaka expressing GFP in germ cells and also by using two stem cell markers in non-transgenic medaka. In the future, we will isolate the gonial germ cells from the gonads of the wrasse using these methods and proceed with gene expression analysis.

研究分野：生物学

キーワード：生殖細胞 性決定 性転換 性的可塑性 ミツボシキウセン フローサイトメトリー 卵巣 精巣

1. 研究開始当初の背景

魚類の性決定システムは多様で、他の脊椎動物にみられる遺伝的な、或いは温度など環境的な要因による性決定システムだけではなく、成魚においても性を転換する性転換現象が存在する (Devlin and Nagahama, 2002)。性転換魚種の生殖腺を構成する生殖細胞や生殖腺体細胞 (支持細胞やステロイド産生細胞) は、高い性的可塑性 (性の変わりやすさ) をもち、主に性ステロイドホルモンの作用によって成体においても性転換することが可能となる。ほとんどの性転換魚種は、魚類の系統分類において散在してみられ、雌雄異体魚 (性転換しない) の中から多系統的に派生したものと考えられている。最近、雌雄異体魚であるティラピアやメダカの雌成体にアロマトラーゼ阻害剤処理をすることで、実験的に雄化を誘導できることが報告され (Bindhu et al., 2013)、このことから、性転換魚の生殖腺にみられる性的可塑性は性転換魚特有の形質ではなく、その変わりやすさは異なるものの、広く魚類に保存された形質であると推察される。

2. 研究の目的

これまでの研究で、雌から雄に性転換するミツボシキウセンの卵巣に精巣組織は存在しないが、性転換により生ずる精子の起源は卵巣内に存在する生殖原細胞であり、また隣接する未分化支持細胞がその雄化に関与する可能性を示してきた。しかし、この生殖原細胞が卵原細胞なのか、それとも雄化が可能な別の細胞群なのかは不明なままである。本研究では、性転換前後の生殖原細胞、未分化支持細胞についてトランスクリプトーム解析を行い、細胞種特異的に発現する遺伝子群や発現変動遺伝子群を同定する。さらに、これらの遺伝子群を解析することで、これまで未解明であった生殖細胞と支持細胞の性的可塑性や性差を生み出す分子機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究で用いるミツボシキウセンは地方の業者から購入し、人工海水中で実験まで飼育した。また、メダカは Qurt 系統と Olvas-GFP 系統をナショナルバイオリソースから分与されたものを実験まで飼育した。

(2) 精巣および卵巣からの細胞懸濁液の調製

ミツボシキウセンおよびメダカの雌雄生殖細胞を分離するために、以下の方法を用いて細胞懸濁液を調製した。雄成体から精巣を摘出し、PBS 中でミンスし、RNase A を含んだトリプシン溶液中で細胞を分散させた。一定時間後、細胞を PBS で洗い、ナイロンメッシュを通して夾雑物を除いたものを精巣細胞懸濁液とした。また、雌成体から卵巣を

摘出し、L-15 メディウム中でミンスし、ディスパーゼとコラゲナーゼの混合液中で細胞を分散させた。一定時間後、細胞を L-15 メディウムで洗い、ナイロンメッシュを通して夾雑物を除いたものを卵巣細胞懸濁液とした。

(3) フローサイトメーターを用いた生殖細胞の分離

フローサイトメーターは、FACSAria (BD: ベクトンデッキンソン) を用い、前方散乱 (FSC)、側方散乱 (SSC)、FITC/GFP、および Hoechst Blue、Hoechst Red のパラメーターを用いた。

① メダカ生殖細胞の解析と分離

生殖細胞特異的に GFP を発現するトランスジェニックメダカである Olvas-GFP 系統と GFP を持たない Qurt 系統のそれぞれから精巣を摘出し、前述の方法で精巣細胞懸濁液を調製した。次に、SP (side population) 活性を調べるために、SP 活性の阻害剤である Verapamil の存在下、非存在下で、Hoechst33342 による細胞の染色を行った。Olvas-GFP 系統の GFP の検出感度の調整は Qurt 系統の細胞との比較により行った。

② ミツボシキウセン生殖細胞の分離

ミツボシキウセンの生殖腺から生殖幹細胞を同定するために、ALDH 活性を指標とした幹細胞の分離を試みた。ミツボシキウセンの雌雄成体から精巣および卵巣を摘出した後、それぞれの細胞懸濁液を調製し、DEAB の存在下、非存在下において ALDH 試薬を用いて細胞を染色した。加えて、Hoechst を用いた SP アッセイを組み合わせ、ALDH 活性は FITC のパラメーターを、SP アッセイにおいては Hoechst Blue および Hoechst Red のパラメーターを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) フローサイトメーターを用いたメダカ生殖幹細胞の分離

はじめに、ミツボシキウセンの精巣細胞懸濁液から精原細胞を分離するために、精子形成過程の生殖細胞の大きさの違いに着目し、BSA 密度勾配遠心による細胞分画を試みた。しかし、分画後の細胞種ごとの境界が不明瞭で、また、酵素による分散が不十分な細胞塊 (ダブレット) の混在がみられた。本研究では生殖原細胞という特定の細胞集団の遺伝子発現解析を目指しているため、本法は適していないと判断した。

続いて、フローサイトメーターによる生殖細胞の分離法を確立するため、予備実験としてメダカ生殖腺を用いて条件検討を行った。生殖細胞を分離するためのマーカーとして、生殖細胞に特異的に GFP を発現する Olvas-GFP 系統を用いた。GFP を持たない Qurt 系統の細胞をコントロール (ネガティブ) に

して GFP の検出感度を設定した (図 1a)。それに対して Olvas-GFP 系統の生殖細胞は明らかに高い蛍光強度の集団として検出された (図 1b)。この GFP 陽性の細胞集団をソーティング (回収) し、蛍光顕微鏡で観察したところ、様々な大きさの生殖細胞が確認されたことから P1 画分には精子形成過程の精原細胞から精細胞までの細胞が含まれることが明らかになった (図 1d)。

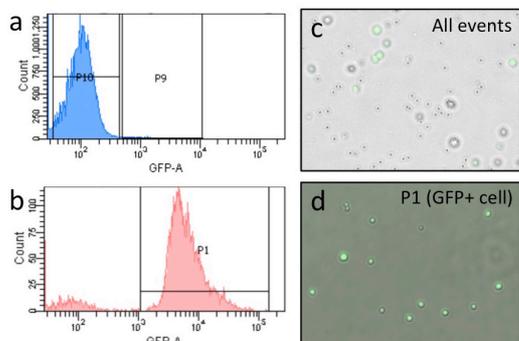


図 1 フローサイトメーターを用いたメダカ生殖細胞の分離 GFP パラメーターによる精巢細胞懸濁液のヒストグラム : Qurt 系統 (a) および Olvas-GFP 系統 (b)。 (c) Olvas-GFP 系統の精巢細胞懸濁液の顕微鏡像 (明視野+GFP)。 (d) ソーティングされた GFP 陽性細胞集団 (図 b の P1 画分) の顕微鏡像 (明視野+GFP)。

さらに Hoechst の細胞外排出をみる SP アッセイを組み合わせると、GFP 陽性の細胞集団のうち、特に蛍光強度の高い集団に SP 活性を示すことが明らかになった (図 2a-c)。SP 活性は幹細胞の示す特性として知られ、多くの幹細胞研究で用いられている。従って、図 2b で分離されてきた SP cell の集団は、生殖細胞 (GFP 陽性) のなかでも幹細胞性を持つ集団であることから、雄性の生殖原細胞 (精原細胞) であることが示唆される。

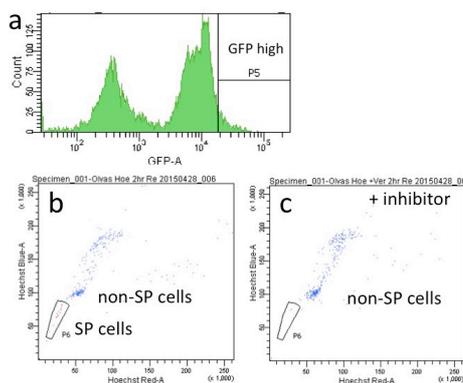


図 2 Olvas-GFP 系統の生殖細胞における SP アッセイ (a) Olvas-GFP 系統の精巢細胞を GFP パラメーターで展開し、蛍光強度の高い画分 (P5 : GFP high) をゲーティングした。 (b, c) GFP high 画分の SP アッセイ SP 活性の阻害剤である、verapamil の非存在下 (b)、存在下 (c) で Hoechst Blue (縦軸) および Hoechst Red (横軸) のパラメーターでプロットを展開した。阻害剤の非存在下でのみ SP 活性を持つ集団が観察された (b, SP cells)。

ミツボシキウセンはトランスジェニックの手法が確立していないため、Olvas-GFP の様な GFP を利用した生殖細胞の分離ができない。したがって、更なる生殖幹細胞分離の指標として、ALDH 活性による細胞の分離法の検討を行った。予備実験として、GFP をもたないメダカである Qurt 系統を用い、ALDH アッセイおよび SP アッセイを組み合わせた分離を行った。はじめに Qurt 系統の精巢細胞を FSC および SSC のパラメーターで展開し、Olvas-GFP 系統で生殖細胞が分布していた領域をゲーティングした。続いて、ALDH 活性を検出するために GFP/FITC パラメーターで展開し (図 3a, b)、阻害剤である DEAB の非存在下でのみ検出される細胞集団を ALDH 陽性画分とした (図 3a, ALDH+)。さらに ALDH 陽性画分を Hoechst Blue、Hoechst Red で展開し、SP 陽性画分を検出した (図 3c, d)。

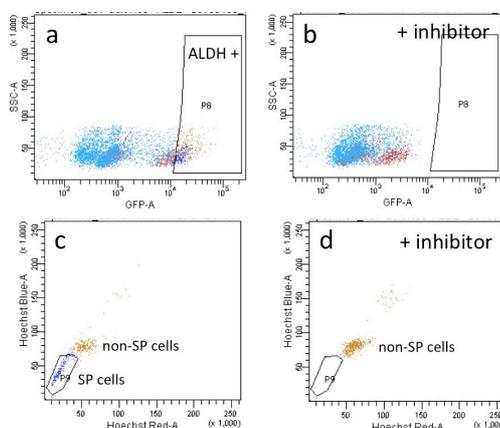


図 3 Qurt 系統の生殖細胞における ALDH アッセイおよび SP アッセイ

(a, b) ALDH アッセイ ALDH 活性の阻害剤である DEAB の非存在下 (a) および存在下 (b) におけるプロット。a において ALDH 陽性の細胞集団が観察された (ALDH+)。 (c, d) ALDH 陽性集団の SP アッセイ verapamil の非存在下 (c) および存在下 (d) におけるプロット

(2) フローサイトメーターを用いたミツボシキウセン生殖幹細胞の分離

このようにフローサイトメーターが生殖幹細胞の分離において有効な手段になることが確認されたことから、続いてミツボシキウセンの精巢および卵巣のそれぞれから生殖幹細胞 (生殖原細胞) の分離を試みた。その結果、ALDH アッセイにおいては陰性細胞集団と陽性細胞集団を明確に分離することができた。しかしながら、FSC および SSC におけるプロットはメダカのそれとは大きく異なり、細胞の大きさや内容物の構成が異なることが示唆される。また、メダカのように GFP を指標にした生殖細胞の分布パターンを調べることができないため、FSC および SSC パラメーターではミツボシキウセンの生殖細胞集団を特定することができなかった。すなわち、現段階で分離可能な ALDH 陽性の細胞集団には、生殖原細胞の他にも様々な幹

細胞が混在していることが推察される。今後、生殖細胞を生きた状態で特定できるようなマーカー（例えば、細胞外抗原）の探索をはじめ、更なる分離法の改善が必要であると考えている。そして、早急に、ミツボシキウセンの雌雄生殖原細胞の遺伝子発現解析を実行していきたい。

(4) 研究協力者

野津 了 (Nozu, Ryo)

中村 將 (Nakamura, Masaru)

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 2 件)

① Y. Kobayashi, R. Nozu, R. Horiguchi, M. Nakamura. Histological observation of doublesex- mab 3- related transcription factor 1 (DMRT1) localization in the adult testis of three-spot wrasse. Int. Aquat. Res. (2014) 6, 68. 査読有 DOI:10.1007/s40071-014-0068-4

② R. Nozu, R. Horiguchi, Y. Kobayashi, M. Nakamura. Expression profile of doublesex/male abnormal-3 related transcription factor-1 during gonadal sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Mol. Reprod. Dev. (2015) 82, 859-866. 査読有 DOI:10.1002/mrd.22527

[学会発表] (計 2 件)

① R. Horiguchi, R. Nozu, M. Nakamura. Expression patterns of the genes associated with female to male sex change in fish. 第 19 回静岡健康・長寿学術フォーラム、2014 年 11 月 7 日、静岡県・沼津市

② R. Horiguchi, R. Nozu, M. Nakamura. Changes in expression of sex differentiation-related genes during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 8th International Symposium on Fish Endocrinology (国際学会) 2016 年 6 月 28 日～7 月 2 日 Gothenberg, Sweden.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀口 涼 (HORIGUCHI, Ryo)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術職員

研究者番号：70452969

(2) 研究分担者

足立 直樹 (ADATI, Naoki)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術職員

研究者番号：70300853