

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15317

研究課題名(和文)ホタテガイの生殖細胞は毎年どこからやってくるのか？二枚貝生殖腺の再形成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a mechanism of gonad regeneration process in Yesso scallop throughout the annual reproductive cycle

研究代表者

長澤 一衛 (Nagasawa, Kazue)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：50794236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、産卵を終えたホタテガイ成貝の生殖巣が翌年の産卵に向かってどのように再形成されるのかを未分化生殖細胞の挙動を解析することで研究した。ホタテガイ生殖細胞を検出するための分子マーカーとして、*vasa*、*piwi*、*nanos*を新規に同定し、抗体の作製にも成功した。これによりホタテガイ精巣および卵巣内における精原細胞、卵原細胞、初期卵母細胞を簡便に可視化・同定するためのツールを整備した。また、ホタテガイ血球の解析手技を開発し、フローサイトメトリーやその他の形態解析が可能になる技術基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホタテガイは日本の主要水産物の一つであり、今後も持続的な食糧生産が可能な養殖生物である。しかし、近年の多くの生産地でホタテガイの斃死が報告されており、漁業者やその価格に大きな影響を与えている。そのため、安定した養殖生産技術の確立が必要とされているが、ホタテガイの成熟と産卵に関わる生殖機構に関する情報は非常に乏しい。本研究では、ホタテガイどのように毎年成熟し、その起源となる生殖細胞が毎年どのように生まれているのかを解明することで効率的な水産増養殖業の発展に寄与できる情報基盤の構築と解析に必要なツールを整備した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this project was to provide the fundamental knowledge about germ cell renewal system in Yesso scallop throughout the annual reproductive cycle. This project mainly aimed to visualize the undifferentiated germ cells (e.g., primordial germ cells, spermatogonia, and oogonia) which are the progenitor of gametes by using molecular markers. First, by using the germ cell markers (i.e., *vasa*, *piwi*, *nanos*), we successfully identified and analyzed the distribution of undifferentiated germ cells in the scallop gonad throughout the year. Second, we established the cytologic analysis methods for the scallop hemocytes that contain *vasa*-expressing hemocytes. Withdrawn live hemocytes were subjected to flow cytometric analysis by nuclear DNA staining. The result showed that the circulating hemocytes might consist of single population that has similar cytological structure.

研究分野：水産学、繁殖生物学、細胞生物学、生殖工学、遺伝子工学

キーワード：ホタテガイ 精原細胞 精原幹細胞 生殖細胞 血球 *vasa* *piwi* *nanos*

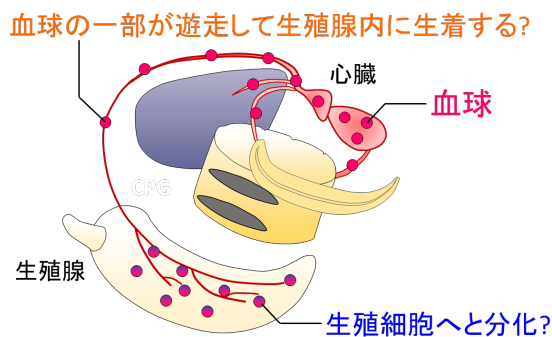
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホタテガイ等の海産二枚貝養殖は環境への負荷が少なく、今後も持続的な食糧生産が可能な産業である。しかし近年、日本沿岸のホタテガイ生産地で原因不明の斃死が報告されており、生産者に大きな被害を与えている。現在ホタテガイの養殖生産は天然採苗に完全に依存しており、本種における人工種苗生産技術は十分に確立されていない。そこで母貝の性や成熟を制御できれば、天然の母貝集団が夏の高水温や伝染性の病気により大量斃死した場合でも、生残個体から種苗を得ることが可能となる。さらに、有用形質をもった個体同士を人為催熟し交配させることで、選抜育種された種苗が将来的には生産可能になる。これらの目標を達成するためには、二枚貝類の生殖巣形成機構を理解し、これを応用した人為催熟技術の開発が必要である。しかし、二枚貝類の繁殖生理機構に関する知見はいまだ乏しく、特に分子に注目した生殖細胞生物学的な知見は非常に少なかった。

2. 研究の目的

海産二枚貝類の安定生産の実現に向け「二枚貝類の性成熟を制御する技術」の確立を目指した研究を行っている。その過程で私は、ホタテガイは繁殖を終えると、生殖細胞を生殖巣からほぼ全て排出し、生殖細胞が消失した生殖巣を有するを見出した。しかし生殖細胞を欠いたこのホタテガイが、次回の繁殖期に向け、いつ、どのように生殖細胞を体内で作りだしているのが全くの謎であった。これに対し私は、生殖細胞の供給源がヘモリンパ液中の細胞にあることを示唆する結果を得ており、二枚貝が開放血管系を介した生殖巣の再形成機構があるのではないかと着想した。この仮説を証明するために、本申請課題では「ホタテガイの生殖腺が性成熟に伴ってどのように再形成されるのか？」を研究した。これら知見を、将来的には有用二枚貝類の人為催熟の基盤技術の開発に応用したい。



ホタテガイ生殖細胞の再構成過程(仮説)

3. 研究の方法

本研究では、ホタテガイ生殖巣が非繁殖期から繁殖期へ向かう間、どのように生殖細胞が再形成されていくのかに注目し、ホタテガイ生殖細胞の分布や、生殖細胞への分化能を有する細胞集団の特定を行った。同時に、ホタテガイの血球を介した生殖腺再形成機構の解明を目指した。具体的には、生殖細胞マーカーとなりうる候補遺伝子の分子クローニングにより同定し、複数の生殖細胞マーカーにより繁殖周期に伴った生殖細胞の分布を解析した。またホタテガイの血球を細分化し、その中に生殖細胞への分化能を有する細胞の有無を解析した。さらにアロ血球移植により、血球の中に生殖細胞への分化能を有する細胞の有無を機能的な検証を試みた。

4. 研究成果

(1)生殖細胞マーカー分子の同定と、繁殖周期に伴った生殖細胞の検出系の開発

研究代表者らがすでに構築していたローカルプラストを用い、ホタテガイのトランスクリ

プトームデータから生殖細胞マーカーとなりうる候補分子として既知 *vasa*, *piwi1,2*, *nanos1,2,3*, *oct3/4* に高い相同性を示す cDNA 配列を得た。ISH による mRNA の発現解析の結果から、*vasa*, *piwi1*, *nanos3* がホタテガイの生殖細胞マーカーとして利用できることが明らかになった。これら分子に対するペプチド抗原および大腸菌タンパク質発現系を用いたリコンビナントを作製し、*Vasa* および *Piwi1,2* タンパク質に対する特異抗体の作製に成功した。これにより精巣および卵巣内における精原細胞、卵原細胞、初期卵母細胞を簡便に可視化・同定するためのツールが整った。特に精巣を解析した結果、*vasa* mRNA 陽性の精原細胞のうち、一部の生殖細胞集団においてのみ *nanos3* mRNA 陽性の細胞集団が存在することが明らかになった。よってこれら *nanos3* 陽性の生殖細胞集団が成員の生殖巣において未分化な細胞集団であることが示唆された。現在、2018 年～2019 年において毎月サンプリングしたホタテガイ生殖巣を用い、各種マーカーで検出される陽性細胞集団の分布パターンや、形態や細胞数の変化等の定量的な解析を実施中である。

(2)ホタテガイ血球の形態的差異を利用した分画化

これまでに研究代表者は、ホタテガイ血球において生殖細胞マーカーである *vasa* mRNA の発現を確認していたことから、*vasa* mRNA 陽性の血球細胞集団の特定を試みた。本研究ではまず、ホタテガイ血球を形態的な差異を指標にフローサイトメトリー（以下、FCM）で分画化することを試みた。ホタテガイ血球は採血後速やかに凝集することから、血液凝固防止剤の検討を行った。その結果、血球の凝集阻止と生残率を維持するためには、Alsever's solution の使用が最も適していることが分かった。これらの血球を顕微鏡観察したところ多くの細胞が非常によく似た形態であることが明らかになった。よって細胞の「大きさ」と「内部構造の複雑さ」のパラメーターのみでは分画化できないと考えられた。そこで蛍光色素（SYBR）で生きたホタテガイ血球の核を標識し、その染色性の違いから特定の細胞集団を分画化できないかを試みた。その結果、蛍光強度や細胞の直径、内部構造の複雑さから分離できるポピュレーションは確認できず、ホタテガイの血球集団は非常に均一な性質の形態的特徴を有する集団であることが明らかとなった。そのため明瞭な血球細胞集団の分画化および生殖細胞マーカーを発現する集団の特定には、Hoechst 33258 等、種々の核染色試薬を再検討し、血球集団を分画化できる手法の開発が必要であると考えられた。

(3)ホタテガイにおけるアロ血球移植

血球中に生殖細胞への分化能を有する細胞集団があるのか？を機能的に検証するため、ホタテガイにおけるアロ血球移植実験を実施した。その第一段階として脱血区および輸血区の生残率を比較した。その結果、脱血区でも移植区でも大きな生残率の低下は確認されなかった。このことから、脱血およびアロ血球移植がホタテガイを斃死させる直接の原因にならないことが示めされた。しかし採血で回収した循環血以外に、組織にどのくらいの血球が残存しているのかは未だ不明である。続いて、移植した血球を宿主個体内でトレースするため、生細胞蛍光ラベルによるホタテガイ血球の染色を試みた。しかし染色過程において多くの細胞が死滅してしまうことから、貝類の血球細胞に特化した手技の確立が今後必要であると考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. **Nagasawa K.**, Thitiphuree T. & Osada M. (2019) Phenotypic stability of sex and expression of sex identification markers in the adult Yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis* throughout the reproductive cycle. **Animals** accepted (IF=1.654) **査読有り**
2. Thitiphuree T., **Nagasawa K.** & Osada M. (2019) Molecular identification of steroidogenesis-related genes in scallops and their potential roles in gametogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** 186:22-23 (IF=4.095) **査読有り**
3. **長澤一衛**・尾定誠, (2018) シリーズ 実験動物紹介 ホタテガイ. **比較内分泌学**, 44(164), 54-57. **査読なし**
4. **Nagasawa, K.** (2017) Identification of mitotic germ cells in aquaculture species by using molecular markers. **Nippon Suisan Gakkaishi** (Japanese Edition) 83: 558-561. **査読なし**

〔学会発表〕(計8件)

1. **長澤一衛**・Mariia Mokrina・吉田浩隆・金森誠・尾定 誠, 二枚貝類の多分化能を有する細胞集団の探索, 平成 31 年度日本水産学会春季大会, 平成 31 年 3 月 (品川 東京海洋大学). **ポスター発表**
2. **長澤一衛**・Tongchai Thitiphuree・吉田浩隆・尾定誠, ホタテガイの未分化生殖細胞、性分化と血球に関する解析, 平成 30 年度青函水産試験研究交流会議, 平成 30 年 12 月 (函館市 国際水産・海洋総合研究センター). **口頭発表**
3. **長澤一衛**・Tongchai Thitiphuree・尾定 誠, ホタテガイの性分化過程と性の可塑性の解析: 生殖巣における *dmrt2* と *foxl2* の発現解析, 第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム, 平成 30 年 11 月 (仙台 東北大学). **ポスター発表**
4. 吉田浩隆・**長澤一衛**・尾定 誠, ホタテガイの未分化生殖細胞に発現する *nanos* 遺伝子の発現解析, 第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム, 平成 30 年 11 月 (仙台 東北大学). **ポスター発表**
5. **長澤一衛**・尾定 誠, ホタテガイにおける *Piwi* および *Vasa* タンパク質の局在, 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 平成 30 年 3 月 (品川 東京海洋大学). **ポスター発表**
6. 吉田浩隆・**長澤一衛**・尾定 誠, ホタテガイの未分化生殖細胞に発現する *nanos* 遺伝子の発現解析, 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 平成 30 年 3 月 (品川 東京海洋大学). **ポスター発表**
7. **長澤一衛**, マーカー分子を利用した水産生物における生殖細胞の可視化, 日本水産学会東北支部 受賞講演, 平成 30 年 2 月 (仙台市 東北大学). **招待講演**
8. **長澤一衛**, 二枚貝類の繁殖生理機構～ホタテガイの性と生殖細胞について～, 第 55 回東北大学農学カルチャー講座「貝にまつわる愉快? な話」, 平成 30 年 1 月 (仙台市 東北大学). **招待講演**

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院 農学研究科 水圏動物生理学分野

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/zoshoku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。