

細胞表面抗原を利用した魚類生殖細胞の可視化およびその追跡

市田健介 (岩手大学 農学部)

ichida@iwate-u.ac.jp

小型の近縁種に大型魚の生殖幹細胞を移植し、卵や精子を得る代理親魚技術は、クロマグロの効率的な種苗生産や、絶滅危惧魚種の保全に有効である。本技術の開発には、移植細胞の可視化が不可欠であり、これまでは Gfp が用いられていた。筆者らは、魚類の生殖幹細胞を含む生殖細胞系列を標識する様々な抗体を新たに作成し、非遺伝子導入魚の実用的な可視化技術を確立した。また本抗体群は、幹細胞の精製や培養系の構築にも貢献可能であった。本稿では上記一連の取り組みについて紹介する。

はじめに

近年、魚類の代理親魚技術の水産分野や保全分野への研究展開が注目されている。代理親魚技術とはドナーとなる個体の未分化な生殖細胞を、宿主となる近縁の異種、あるいは同種異系統宿主へと移植すると、移植した細胞が宿主生殖腺中に取り込まれ、増殖分化をへたのち、宿主が機能的な配偶子を作成するという技術である¹⁾。本技術をクロマグロへと応用し、クロマグロ生殖細胞を近縁種である小型のサバ科宿主に移植することで、サバにマグロを生ませることも可能となり、マグロの卵や精子を作る労力、スペース、コストを大幅に節約することが期待される^{1,2)}。また本技術を生殖細胞の凍結保存技術や *in vitro* 培養技術と組み合わせることで、凍結細胞から個体を復元させることが可能となり、絶滅危惧種や有用系統の遺伝子資源の半永久的な保存も可能となる^{1,3,4)}。

本技術では生殖細胞系列の中でも一部の未分化な細胞集団である A 型精原細胞、卵原細胞、始原生殖細胞のみが移植後、宿主生殖腺内への生着能を有することが明らかとなっていることから¹⁾、未分化生殖細胞をいかに可視化したのち単離して効率的に細胞操作を行うか、ということが極めて重要となる。しかし、実際に酵素分散を施しバラバラにした生殖細胞は顕微鏡観察のみで細胞種を分類することが極めて難しく、どの細胞が生殖細胞系列であるかを判断することすら容易ではない。そのため、これまでは未分化生殖細胞のみで Gfp の緑色蛍光を発現する遺伝子導入ニジマスを用いて未分化生殖細胞の可視化しを行っており、本系統は代理親魚技術の樹立およびその後の研究展開にはなくてはならないツールとなっている⁵⁾。そのため上記一連の技術を他魚種に展開するためには各魚種の遺伝子導入系統が必要となると考えられるが、多岐にわたる対象魚種の 1 つ 1 つで遺伝子導入魚を樹立してゆくのは非現実的である。加えて放流を前提とした絶滅危惧種やクロマグロのような種苗生産、1 対 1 交配の難しい魚種では遺伝子導入系統の樹立自体が困難となる。そこで筆者らは遺伝子導入技術を用いずに生殖細胞を可視化する技術の開発に取り組んだ。

クロマグロ A 型精原細胞を抗原とするモノクローナル抗体群の樹立

遺伝子導入技術を用いずに特定の細胞集団を可視化する方法論として、細胞表面抗原に着目した。もし魚類の生殖細胞の膜表面に特異的に局在するタンパク質、糖鎖などを単離できればそれに結合する特異抗体を作成することで、生きた細胞の表面に抗体を結合させることが可能となる。更なる抗体を事前に蛍光物質で標識しておけば、遺伝子導入技術を用いずに生きた細胞を蛍光標識することも可能となる。近年、特定の細胞のマーカー遺伝子の同定に種々のオミクス解析が汎用されるが、生殖

細胞のように酵素処理で分散する必要がある細胞種では抗原タンパク質も消化されてしまうため、実際に利用可能な細胞表面マーカーの単離は非常に難しかった。そこで、生きた未分化生殖細胞を濃縮し、細胞を丸ごとのままマウスに免疫して抗体を作成することが、実用可能な抗体を得るうえで最も信頼できる方法論であるとの結論に至った。魚種には上記の「サバにマグロを生ませるプロジェクト」の対象種であるクロマグロを用いて A 型精原細胞の細胞表面抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成に取り組んだ。まずは免疫抗原となるクロマグロ A 型精原細胞の単離技術の樹立を行った。A 型精原細胞は大型で円形の核を持つ特徴的な形態をしているため、その特徴を利用してフローサイトメーターを用いて光学的にクロマグロ A 型精原細胞を検出可能か解析した。その結果、前方散乱光のシグナル強度が高く、側方散乱光のシグナル強度の低い細胞集団、すなわち比較的大型かつ内部構造が単純な細胞集団の分画が観察されたため、それらの分画に存在する細胞を単離して精原細胞マーカーである *vasa* 遺伝子により精原細胞率を評価した。その結果、単離した細胞の 80-90%程度が *vasa* 陽性細胞であり、クロマグロ A 型精原細胞を光学的に高純度で濃縮することが可能となった⁶⁾。次にクロマグロ A 型精原細胞を単離、濃縮したのちそれらの細胞をマウス 5 匹に直接免疫を行った。そして免疫したマウスから 1152 種のハイブリドーマを作成し、それらから高い抗体の力価を示した 385 クローンを選抜することで、クロマグロ A 型精原細胞を抗原とするモノクローナル抗体のライブラリーを樹立した⁷⁾。

細胞表面抗原を認識する抗体を用いた A 型精原細胞の可視化、単離、追跡

続いて樹立した抗体ライブラリー中からクロマグロ A 型精原細胞の細胞表面抗原を認識する抗体の探索を行った。探索は全種類の抗体を酵素分散したクロマグロの精巣細胞に結合させ、蛍光標識させたのち蛍光顕微鏡あるいはフローサイトメーターで解析を行った。その結果、No152 および No180 の 2 つの抗体は一部の大型細胞を生きた状態のまま光らせることができることが明らかとなった。そこで抗体陽性、陰性細胞を分取してマーカー遺伝子を用いた RT-PCR や *in situ* hybridization を行った結果、抗体陽性分画において A 型精原細胞が濃縮されており、抗体陽性細胞の 90%以上が *vasa* 陽性であることが明らかとなった。さらに本抗体で免疫組織染色を行ったところ、No152 および No180 抗体は A 型精原細胞に特異的に結合することが明らかとなった。以上、クロマグロ A 型精原細胞の細胞表面に結合する抗体を樹立し、それを用いて生きた A 型精原細胞の可視化に成功したと結論付けた⁷⁾。

次に抗体を用いた細胞の追跡が可能かを調べた。クロマグロ精巣細胞に対して Alexa488 で直接標識した抗体を結合させ、A 型精原細胞を緑色蛍光で標識させたのち、それらをニベ孵化仔魚腹腔内へと移植した。そして移植 14 日後に宿主を開腹し宿主生殖腺を観察したところ、移植前に可視化した精原細胞が可視化された状態のまま宿主生殖へと移動し、取り込まれている様子が観察された。これにより

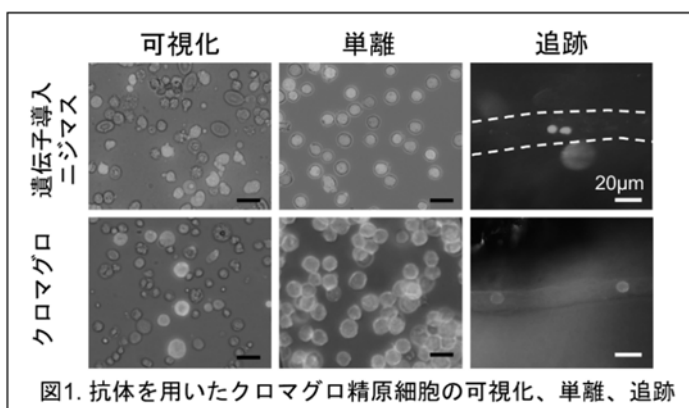


図1. 抗体を用いたクロマグロ精原細胞の可視化、単離、追跡

移植 14 日後においても蛍光が維持されることと、No152 抗体の結合が少なくとも細胞の移動、取り込み能は阻害しないことが明らかとなった。一方、驚くべきことに No180 抗体で標識した細胞を移植した宿主では移植細胞が宿主生殖腺へ取り込まれている様子が全く観察されなかった。No152 抗体の蛍光が明瞭に観察されたことから、蛍光が消失したことや抗原が代謝

されきったことは考えづらく No180 抗体が細胞の移動、取り込み機能の何かしらを阻害したと考えられる。今後は本抗体の認識する抗原タンパク質の同定することで、どのような機能が阻害されたかを明らかにしたいと考えている。また No152 抗体で標識した細胞の移植成功率についても従来の細胞追跡法と比較して全く遜色がないことが明らかとなった⁷⁾。以上、細胞表面抗原を認識する抗体を用いた A 型精原細胞の可視化、単離、追跡技術の樹立に成功し遺伝子導入技術を用いずとも遺伝子導入魚を用いたかのように細胞を取り扱うことが可能となった(図 1)。

抗体を用いた移植後のクロマグロ生殖細胞の長期追跡

抗体を用いた更なる技術として移植をした細胞を宿主生殖腺の中で長期にわたって追跡できるかを調べた。移植した細胞が宿主生殖腺内で卵や精子に分化するまで最低半年から 1 年程度の時間が必要となるが、上記の追跡方法では移植前に標識した蛍光が最大 1 か月程度で消失してしまうため原理上短期間の追跡しかできない。そこで宿主生殖腺の組織切片上で宿主の生殖腺は染めず、移植したクロマグロの生殖細胞だけを染める抗体があれば長期追跡ができると考え、免疫組織染色で条件に合致する抗体を新たに選抜した。その結果クロマグロ生殖細胞を認識しかつスマ生殖細胞を認識しない No149 抗体、マサバ生殖細胞を認識しない No351 抗体を発見した。そこで実際にクロマグロ精巣細胞をスマおよびマサバ宿主へと移植し、その宿主を 4 か月飼育したのち、それぞれの抗体を用いた免疫組織染色により移植したクロマグロ生殖細胞の長期追跡が可能かを調べた。No149、No351 抗体で染色を行った結果、多量のスマ、サバ宿主自身の生殖細胞の中で一部の細胞のみ、すなわち移植され宿主生殖腺内へと取り込まれたクロマグロ生殖細胞のみが染まることが明らかとなった⁸⁾。これにより移植したクロマグロの細胞がスマおよびサバ宿主の生殖腺の中に確かに存在していることが明らかとなり、4 か月という長期間でも宿主生殖腺内におけるクロマグロ生殖細胞の追跡が可能となった(図 2)。

また更なる長期追跡として、クロマグロ精子を特異的に検出可能かも調べた。最終的に移植を行った宿主が成熟して精子を作る際に、宿主はクロマグロ精子と多数の宿主自身の精子の双方を作ることが考えられる。そこでクロマグロ精子をエチジウムブロマイドで事前に染色し、これをスマ、サバ精子と混ぜることで、宿主精子の中でクロマグロ精子だけが赤く染まった塗抹標本作製した。そして

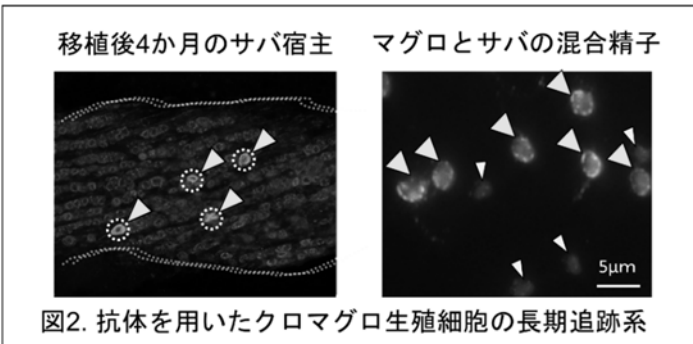


図2. 抗体を用いたクロマグロ生殖細胞の長期追跡系

塗抹標本を同抗体で染色を行った結果、宿主精子中からでもマグロ精子のみを抗体で染色できることが明らかとなった⁹⁾。以上、複数の抗体を使い分けることでクロマグロ生殖細胞の可視化から追跡までの一連の検出系の樹立に成功した(図 2)。

抗体の交差性による他魚種への展開および今後の展望

現在、我々は上記のクロマグロ抗体に加え、全く同じ方法論で作成したニジマス A 型精原細胞を免疫抗原とする 2 つの抗体ライブラリーを保有している⁹⁾。そこでそれら抗体群の他魚種への応用を目的に交差性を調べたところ、特に水産有用種においてはタイセイヨウサケ属魚類であるタイセイヨウサケやブラウントラウトにおいてニジマス抗体が交差性を有していたほか¹⁰⁾、アジ科、アカメ科¹¹⁾、フグ科、シマイサキ科、メダカ科、キュウリウオ科、コイ科⁹⁾など幅広い分類群でその交差性を有していることが明らかとなった。今後、本抗体群が様々な魚種で生殖細胞研究を展開してゆく際の基盤

技術となることを願ってやまない。そして最終的には上記のような様々な魚種で生殖細胞操作や細胞培養などの実験があらゆるラボで当たり前のようにできるようになることを目指したい。

謝辞

上記でご紹介した一連の研究につきまして、指導教官として公私にわたり様々なことを粘り強くご指導を賜りました東京海洋大学 教授 吉崎悟朗先生に心からの感謝を申し上げます。また本受賞に至るまで様々なご支援を賜りました東京海洋大学 教授 矢澤良輔先生、同東京海洋大学 准教授 林 誠先生、金沢大学 教授 竹内裕先生、スラナリー工科大学 教授 Surintorn Boonanuntanasarn 先生、そして本受賞にご推薦いただきました先生方、選考委員の先生方はじめご指導ご鞭撻いただきましたすべての方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Yoshizaki, G., Yazawa, R. Application of surrogate broodstock technology in aquaculture. *Fish. Sci.* 2019; 85, 429-437.
- 2) Kawamura W, Yazawa R, Takeuchi Y, Kamio S, Ichida K, Hattori RS, Morita T, Hayashi, Yoshizaki G. Bluefin tuna sperm production is hastened by surrogacy in small *Euthynnus*. *Nat. Commun.* 2024; 15, 8128-8128.
- 3) Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, Yoshizaki G. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110, 1640-1645.
- 4) Iwasaki-Takahashi Y, Shikina S, Watanabe M, Banba A, Yagisawa M, Takahashi K, Fujihara R, Okabe T, Valdez Jr DM, Yamauchi A, Yoshizaki G. Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Commun. Biol.* 2020; 3, 308.
- 5) Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, Takeuchi T. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int J Dev Biol.* 2000; 44, 323-326.
- 6) Ichida K, Kise K, Morita T, Yazawa R, Takeuchi Y, Yoshizaki G. Flow-cytometric enrichment of Pacific bluefin tuna type A spermatogonia based on light-scattering properties. *Theriogenology.* 2017; 101, 91-98.
- 7) Ichida K, Kawamura W, Miwa M, Iwasaki Y, Kubokawa T, Hayashi M, Yazawa R, Yoshizaki G. Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye conjugated antibodies. *Biol. Reprod.* 2019; 100, 1637-1647.
- 8) Yazawa R, Kubokawa T, Ichida K, Kawamura W, Tani R, Kamio S, Morita T, Yoshizaki G. Establishment of a tracing technique for transplanted bluefin tuna germ cells in recipient's gonads using monoclonal antibodies specifically recognizing bluefin tuna spermatogenic cells. *Fish. Sci.* 2021; 87, 105-112.
- 9) Hayashi M, Ichida K, Sadaie S, Miwa M, Fujihara R, Nagasaka Y, Yoshizaki G. Establishment of novel monoclonal antibodies for identification of type A spermatogonia in teleosts. *Biol. Reprod.* 2019; 101, 478-491.
- 10) Ichida K, Matsushita Y, Amano Y, Miwa M, Nagasawa K, Hayashi M, Mizutani H, Takahashi M, Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G. Visualization and tracking of live type a spermatogonia using a fluorescence-conjugated antibody in *Salmo* species. *Aquaculture.* 2021; 533, 736096.
- 11) Ichida K, Tani R, Sreebun S, Jangprai A, Pasomboon P, Yazawa R, Yoshizaki G, Boonanuntanasarn S. Development of spermatogonial cell transplantation in barramundi (Asian seabass: *Lates calcarifer*). *Aquaculture.* 2024; 579, 740152.