

氏 名 齋藤憲二

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第1161号

学位授与の日付 平成20年3月19日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Characterization of type A spermatogonia and
development of the culture system in zebrafish

論文審査委員 主 査 教授 上田 龍
教授 相賀 裕美子
教授 倉田 のり
助教 浅岡 美穂
教授 長濱 嘉孝

論文内容の要旨

Continuation of spermatogenic process throughout life relies on a proper regulation of self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells which is present in a special cellular organization called a niche. In spite of biological significance of the spermatogonial stem cells, little is known about their behavior and properties because of a lack of model system to approach the stem cell maintenance and differentiation in several organisms.

In this study, I show the presence of subpopulations in zebrafish type A spermatogonia which is classically considered homogeneous population, varying in size, location pattern and cell cycle phase. Morphological analysis showed two types of type A spermatogonia that are localized distant from basement membranes (termed type A_{dt}) and close to basement membranes (A_{cl}). The thymidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation experiments showed that duration of cell cycle of the type A_{cl} spermatogonia was longer than that of the type A_{dt} spermatogonia. Tracing label-retaining cells (LRCs), after 4 weeks of chase, I observed occasionally BrdU-positive type A_{cl} spermatogonia. Immunohistochemical analysis using antibody against zebrafish homologue of Synthetic lethal mutant of *dpb11-1* (*zSld5*) which is able to distinguish between the quiescent cells and the proliferation cells showed that type A_{cl} spermatogonia could be divided into two subpopulations. One population is *zSld5*-positive type A_{cl} spermatogonia and the other is *zSld5*-negative type A_{cl} spermatogonia. In addition, many LRCs are contained in a latter population. All the results suggest that *zSld5*-negative type A_{cl} spermatogonia are most undifferentiated type A spermatogonia.

It is generally known that spermatogonial stem cells have ability to restore spermatogenesis when a testis was damaged by a drug or irradiation. To elucidate the characterization of type A spermatogonia, I examined the effect of cytotoxic reagent busulfan on male germ cells. As a result, only type A_{cl} spermatogonia survived after treatment of busulfan, and then recovered spermatogenesis. The morphological observation suggests that type A_{cl} spermatogonia are the most resistant cell population against busulfan in the zebrafish testis. Detailed analysis revealed that the number of *zSld5*-positive type A_{cl} spermatogonia increased transiently after busulfan treatment, while the number of *zSld5*-negative type A_{cl} spermatogonia relatively stabilized. These results suggest that both *zSld5*-negative and *zSld5*-positive type A_{cl} spermatogonia would possess a feature of spermatogonial stem cells, like a actual stem cell and a potential stem cell, respectively.

Furthermore, I developed the *in vitro* culture condition for supporting the maintenance and proliferation of type A spermatogonia by the use of Sertoli feeder ZtA6-6 cells for 1 month or so.

This study represents the first step towards further understanding the character

of spermatogonial stem cells and molecular mechanisms to maintain the undifferentiation status in teleosts.

精子は動物の生殖期を通じて形成され続ける。これは精原細胞（生殖幹細胞）の自己複製および精子への分化が適切に調節されているからである。しかし生殖幹細胞のこのような性質の実体にはまだ不明な点が多い。斎藤さんはゼブラフィッシュの精原細胞に着目し、その維持と分化の調節機構を明らかにするため、まずその形態的特徴、増殖パターンの解析やマーカー遺伝子の開発など、精原細胞の基本的な性質について研究をおこなった。

ゼブラフィッシュ精巣形成期においては、セルトリ細胞が一個の精原細胞を包んだシストが精細管内に造られ、精子形成はこのシスト内でおこなわれる。シスト内の一個の精原細胞（タイプ A 精原細胞）の分裂より生じたタイプ B 精原細胞は減数分裂を経て成熟精子へと分化する。

連続切片を詳細に観察すると、タイプ A 精原細胞には基底膜に密着する Acl 型と基底膜より離れて内腔に位置する Adt 型の 2 種類が存在した。BrdU のパルスチェイス実験を様々な条件下でおこなったところ、Acl は Adt やタイプ B 精原細胞よりも顕著に長い細胞周期を持つこと、さらに Acl の中に label retaining cell が存在することが判明し、Acl が幹細胞としての性質を持つと推測された。

すなわち、これまで均一と考えられたタイプ A 精原細胞にはその組織内の位置や細胞周期から複数の種類が存在すると予想され、それらを識別する分子マーカーを探すため、斎藤さんは DNA 複製に着目し、prereplicative complex の構成要素、Sld5 のゼブラフィッシュホモログ（zSld5）を単離した。Sld5 は酵母で発見されたが、真核生物全般に良く保存され、細胞周期に入った細胞では常に強く発現することが知られている。zSld5 の抗血清を得、ゼブラフィッシュ培養細胞で Sld5 発現を検討した。zSld5 は血清の除去、および再添加における細胞周期の停止、および再開に非常に美しく対応した発現を示した。この zSld5 抗血清を用いて精巣の組織染色をおこなった結果、Acl の 49% は zSld5 ネガティブであったが、Adt ではそのほとんど（92%）が zSld5 ポジティブであった。すなわち、Acl の約半数は G0 期にとどまっているが、Adt はそれと対照的に、活発な細胞分裂をおこなっている集団であるという結果を得た。

斎藤さんはさらに、増殖中の分化過程の生殖細胞を Busulfan 処理によって精巣内より除去し、その後、精子形成が再生する過程におけるシストを観察した。Acl は 1 週間ほどで 3 倍以上増加し、その後減少すると共に精子形成の後期過程がリストアされた。一過的に増加した Acl の Sld5 発現を調べると、ネガティブ細胞数は一定であるのに対し、ポジティブ細胞が 5 倍程度に増加しており、Acl の自己複製が昂進していることが示唆された。

斎藤さんはこの Busulfan 処理後の精巣よりタイプ A 精原細胞を分離し、in vitro 培養系の開発も試みた。BrdU および生殖細胞マーカーである Vasa 蛋白質の発現より、タイプ A 精原細胞が 1 ヶ月のあいだ、生存し増殖する条件を見つけている。

このように斎藤さんは発生学的な様々な解析から「タイプ A 精原細胞には Acl-Sld5-細胞、Acl-Sld5+細胞、および Adt 細胞の少なくとも 3 種類が存在する」ことを発見し、精子形成修復時の観察と合わせ、それぞれが dormant stem cell、potential stem cell、および differentiating A type spermatogonia に対応している可能性を示した。これらは今後の生殖幹細胞研究の発展の基盤となる重要な記載である。またこれらの問題をより詳細

に解析できる in vitro 培養系の開発にも成功した。以上より齋藤さんの論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。