

学 位 論 文 題 名

The interactions between cell nucleus and cytoplasm
as revealed by nuclear transplantation in fish

(魚類の核移植によって顕示される核細胞質の相互作用)

学位論文内容の要旨

初期胚の細胞核を予め除核した成熟卵に移植することによって、核と卵細胞質の役割及び相互関係を明らかにするための細胞核移植実験は1938年に初めてドイツの発生学者 Hans spemann により提唱された。しかし、当時の設備、技術ではこのような実験ができなかった。その後フランスの生物学者 Commandon と de Fonbrune (1939) はアメーバーを用いて初めて核移植実験を行った。また1952年アメリカの発生学者 Briggs と King はこの技術を両生類に応用した。

Danielli (1952) は核移植によってアメーバーの核と細胞質の遺伝様式について研究した。2種類のアメーバー間の核移植実験の観察結果から三種類の遺伝様式が明らかとなった。1) 核の遺伝; 2) 細胞質の遺伝; 3) 核と細胞質の複合遺伝。それらの結果から Danielli はアメーバーの核と細胞質はともに遺伝に関与すると結論した。両生類では種間に不親和性が存在し、異種間の核移植実験が困難であるため、同種個体間に限って核移植実験が行われている。特に移植核の胚発生に於ける潜在能力を中心にして研究した Briggs と King (1952) およびその後の他の研究者は、両生類の核は分化の進行過程で発生の潜在能力が劣っていくこと、一方卵細胞質はいろいろな程度に移植核の全能性を回復させることを明らかにした。従って核移植を受けた卵が正常に発生するかどうかは核と細胞質の相互作用に依存すると考えられる。

一方、両生類における核移植研究の多くは同種個体間で行われており、遺伝的性状の決定が核によるものか、または細胞質によるものか不明である。僅かな例であるが、日本の生物学者 Kwamura と Nishioka (1963) はカエルを用いて異種間で核移植実験を行い、核細胞質雑種を得た。彼らの観察結果によると、雑種の性状はほとんどが核供与側の種と同じになるが、卵側の種の性状も、また両種の中間性状も多少出現した。これらの結果から両生類の発生、分化および遺伝には細胞質側の因子も重要であることが明らかにされた。

1963年から中国の我々の研究室(当時の担当者は発生学者童第周であった)では両生類の核移

植手法を魚類に応用し、いろいろな種間で核移植による核細胞質雑種の作出に成功した。これによって高等生物において核と細胞質の遺伝に対する様々な影響についての研究が再開された。現在まで、得られた核・細胞質（以下 NCH と略す）の組合せは以下の通りである。

I) 品種間の組合せ：

1. フナ (Carassius auratus, $2n=100$) 核×キンギョ (Carassius auratus, $2n=100$) 卵細胞質

NCH は成体まで成長した。主な表現型はフナと同じであったが、一部の形態学的または生化学的な形質について中間的な形質も現れた。

II) 属間の組合せ：

2. コイ (Cyprinus carpio, $2n=100$ コイ属) 核×フナ (Carassius auratus, $2n=100$ フナ属) 卵細胞質

NCH は成体まで成長した。主な表現型はコイと同じであったが、一部の形態学的または生化学的な形質について中間的あるいは細胞質の影響を受けた形質も現れた。

3. フナ核×コイ卵細胞質

NCH は成体まで成長した。主な特徴はフナの表現型と同じであった。

III) 亜科間の組合せ：

4. ソウギョ (Ctenopharyngodon idellus, $2n=48$ レンギョ亜科) 核×メガロブラマ (Megalobram amblycephala, $2n=48$ アブラミス亜科) 卵細胞質

NCH は成体まで成長した。主な表現型はソウギョと同じであるが、アイソザイム及び血清の免疫泳動の分析では多少の相違が認められた。

IV) 科間の組合せ：

5. キンギョ (Carassius auratus, $2n=100$ コイ科) 核×ドジョウ (Paramisgurnus dabryanus, $2n=48$ ドジョウ科) 卵細胞質

キンギョに類似の NCH 幼魚が得られた。

6. ドジョウ核×キンギョ卵細胞質

ドジョウの形質をそなえた早期 NCH 幼魚が得られた。

7. ゼブラ (Brachydanio rerio, $2n=50$ コイ科) 核×ドジョウ (Paramisgurnus dabryanus, $2n=48$ ドジョウ科) 卵細胞質

ゼブラまたはドジョウのいずれとも判断困難な後期 NCH 幼魚が得られた。

V) 目間の組合せ：

8. テラピア (Oreochromis nilotica, 2 n = 44 スズキ目) × キンギョ (Carassius auratus, 2 n = 100 コイ目) 卵細胞質

早期の NCH 幼魚が得られた。蛋白質合成についての電気泳動分析では変異が見られた。

9. テラピア (Oreochromis nilotica, 2 n = 44 スズキ目) 核 × ドジョウ (Paramisgurnus dabryanus, 2 n = 48 コイ目) 卵細胞質

テラピアまたはドジョウのいずれとも判定困難な後期 NCH 幼魚が得られた。

VI) 綱間の組合せ：

10. ハツカネズミ (Mus musculus, 2 n = 40 哺乳綱) 核 × ドジョウ (Paramisgurnus dabryanus, 2 n = 48 硬骨魚綱) 卵細胞質

早期の NCH が得られた。

以上の実験結果に基づいた結論は下記のとおりである。

- 1) 魚類では遠縁間 (魚類と哺乳類との綱間) でも核移植実験が可能であった。これらの NCH は少なくとも囊胚期まで発生が進んだ。従って魚類では異種間で核と卵細胞質との相互作用によって初期胚発生が阻止されるような核・細胞質不適合性は存在しない。このような現象は両生類では知られないので、恐らく魚類特有の現象と考えられる。
- 2) 移植核と卵との間の類縁関係が遠ければ遠いほど NCH 胚の発生の不親和性が強く現れる。従って、いろいろな組合せの違いによって成魚まで成長するものの、幼魚又は胚体で死亡するものなど様々な NCH が得られた。本研究で核供与側の染色体数と卵細胞質提供側の染色体数が近い、あるいは同じ時、NCH 胚の発生における核・細胞質の不適合性が弱くなる傾向が認められた。つまり、類縁関係が遠くても、供与核と卵核の染色体数が同じであれば NCH 胚は比較的正常に発生する可能性があると考えられる。一方、ある NCH 幼魚が成魚まで成長できなかった原因としては核供与側の種と卵細胞質側の種との間で幼魚の発育と摂餌行為に違いがある (卵黄吸収のタイミングと摂餌開始のタイミングの違い等) ためと推察した。
- 3) 成魚まで発生した属間または科間の NCH (コイ × フナおよびソウギョ × メガロブラマ) は成熟又は繁殖が可能である。NCH 魚の形質は主に核供与側の形質に依存するが、一部の形質は卵細胞質供与側の形質と同じで、他の一部は中間型であった。また、一部の NCH 幼魚あるいは成魚にはまったく新しい形質も現れた。これらの変化は多分核と卵細胞質との間の相互作用、つまり NCH 核遺伝子とその周囲の細胞質の中の調節因子との間の相互作用によるものと考えられる。従って、これらの NCH 魚は水産増殖上有用な新しい品種作出の素

材となり得る。

- 4) クロン魚は実験材料として魚の遺伝子導入の研究にとって重要である。しかし水産上有用な魚種は成熟周期が比較的長く、伝統的な兄妹交配では短期間にクロンの作出は困難である。しかし、核移植の手法を用いて、一つの囊胚から遺伝的にまったく同じ核を除核卵に移植すれば短期間に単性のクロン NCH 魚が得られる。これらのクロンは魚の遺伝子導入の研究に理想的なモデルを提供できるだろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 崎 文 雄

副 査 教 授 高 橋 裕 哉

副 査 教 授 後 藤 晃

動物個体の形質発現には経時的または同時に活性化する核遺伝子の働きが不可欠であるが、卵細胞質および核と卵細胞質との相互作用も形質発現にとって極めて重要であることが知られている。これら核・細胞質の相互作用に関しては、両棲類において Briggs と King(1952), Gurdon ら (1960) の一連の研究によって明らかにされてきた。これらの結果から両棲類では異種間では核と卵細胞質との不親和性が存在し、核移植実験は困難だとされている。しかし、同種間では核移植実験が可能であり、分化の進行過程で失われる核の全能性が、卵細胞質によって回復することが知られている。また、卵が移植核によって正常に発生するかどうかは移植核と卵細胞質の相互作用によって決まることが知られている。

魚類の核と卵細胞質の相互作用に関しては両棲類と同様に核移植実験によって明らかにする必要があるが、申請者は中国科学院で世界で初めて魚類の核移植を成功させた童第周の後を継ぎ、魚卵の除核法を開発した。更に発生途上の卵割球から核を取り出して、これを除核卵に移植する極めて緻密な手法によって無精的に発生させることに成功した。

申請者は上記の手法を用いて、魚類の品種間（フナ核×キングヨ卵細胞質）、属間（コイ核×フナ卵細胞質）、亜科間（ソウギヨ×Megalobram 卵細胞質）、科間（ゼブラ核×ドジョウ卵細胞質）、目間（テラピア核×キングヨ卵細胞質）、綱間（ハツカネズミ核×ドジョウ卵細胞質）で核・細胞質雑種の作出を試みた。これらの実験から、魚類の卵は、移植核と卵細胞質の相互作用

によって発生が無精的に進行することを明らかにした。本研究は魚類の発生研究史の中で特筆すべき内容を有しており、高い評価を与えることができる。

審査員は本研究の中で特に次のような点を評価した。1. 魚類の卵は両棲類の卵と異なり、遠縁間の核であっても移植によって発生は誘導されること、この事実から、魚類の卵には異種間で核・卵細胞質との相互作用によって初期胚発生が阻止されるような核・細胞質不適合性は存在しないことを明らかにした。この結論は魚類の発生誘導機構が両棲類とは極めて異なるものであることを示唆しており、動物進化の観点から興味ある事実として注目に値する。更にハツカネズミの初期胚由来の核をドジョウの除核卵に移植して、初期卵割を誘導して、綱間の組み合わせによる核・細胞質雑種の作出に成功したのは本研究が初めてであり、核・細胞質の相互作用による卵割始動の機構を考察する上で重要な知見を与えるものとして高く評価される。2. 移植核と卵との間の類縁関係が遠ければ遠いほど核・細胞質雑種胚の発生には核・卵細胞質の不親和性が強く現れる。しかし、核供与側の染色体数と卵細胞質供与体側の染色体数が近い、あるいは同じ時、核・細胞質雑種胚の発生における核・卵細胞質の不適合性が弱くなる傾向のあることを明らかにした。この観察結果は更に詳細に検討する必要がある。しかし、核染色体が細胞質要素である紡錘子と接続して、両極に移動する際に染色体中の遺伝物質に係わりなく、染色体の数によって、規定される機構のあることを示唆した点は注目に値する。3. 成魚まで発生する属間または科間の核・細胞質雑種の内、コイ核×フナ卵細胞質およびソウギョ核×Megalobram卵細胞質雑種は成熟し、雑種内で交配が可能であることを明らかにした。この結果は成熟可能な核・細胞質雑種が新しい養殖対象魚になり得ることを示したものとして注目に値する。更に雑種の形質を分析し、雑種の形質が主に核供与側の形質に依存することを示した点は従来の考え方を支持するものであるが、評価すべき新しい点の一部の形質が卵細胞質供与側の形質と同じか、または中間の形質を示すこと、また、卵細胞質供与側、および核供与側にみられない全く新しい形質が部分的に現れることを明らかにした点である。これらの観察結果は発生における核遺伝子とその周囲の卵細胞質中の調節因子との間の相互作用を示すものとして極めて貴重な知見である。4. 核・細胞質雑種作出の技術はクローン魚の作出を可能にする技術でもある。クローン魚は、魚の遺伝子導入の研究等に極めて貴重な実験材料となるが、現在までクローン化された魚は極めて限られており、申請者はこの点を重視して、一つの胚期の細胞から、遺伝的に全く同じ核を除核卵に移植することにより、単性のクローン魚が得られることを示唆した点は、今後の新しい研究の道を拓くものとして評価できる。

審査員一同は以上の諸点を総合し、本研究が魚類の発生と遺伝および核と細胞質の相互作用、

卵割開始機構の解明に寄与するところ大きいと判断し、博士（水産学）の学位に相当する業績として十分な内容を有すると評価した。