

学位論文題名

Experimental-embryological studies on goldfish and crucian carp (*Carassius auratus*), with special reference to establishment of dorso-ventral axis during the pre-gastrula stage.

(キングヨ、およびフナにおける実験発生学的研究：とくに囊胚期以前の背腹軸の確立について)

学位論文内容の要旨

硬骨魚類の胚は、一部の割球を除去しても正常に発生すること (Hoadley, 1928 他)、発生の過程で不規則かつ大規模な細胞の混合が観察されること (Kimmel and Law, 1985)、他の胚の一部の割球を移植された胚も正常に発生すること (Ho, 1992他) 等の観察及び実験結果より調節能力に富むことが示されている。しかしながら、哺乳類で知られている、複数の胚の集合胚も正常に発生するような調節性の存在は魚類では確認されていない。また、このように調節性の高い細胞群から構成される胚盤がどのような過程を経て定められた形態形成を行うのかは明らかではない。この調節性に対し、初期卵割期の植物極側卵黄の除去が異常な胚体形成を引き起こすこと (Tung and Tung, 1944他)、中期胞胚期までに卵黄が除去された胚盤は胚体を形成しないが、それ以降では胚体構造が形成されること (Kostomarova, 1969) 等、形態形成に関する因子の卵黄部におけるモザイク性を示唆する結果も得られている。Stachel et al. (1993) は背方化のシグナルである *gooseoid* 遺伝子が後期胞胚期に胚の周縁域の一部に発現することをゼブラフィッシュで見だし、この遺伝子の発現が卵黄側からの誘導の結果生じると考えた。この考え方は、調節性の高い胚盤の胚発生を卵黄が支配するという点で、調節性、モザイク性を示す知見と両立し得るものである。

本研究では、材料としてキングヨとフナ、*Carassius auratus* を用い、(1) 囊胚期以前の胚発生の段階で起こる種々の現象の出現時期を、形態学的、生化学的に明らかにし、硬骨魚類の発生の典型であるゼブラフィッシュの発生の段階との比較を可能にすること、(2) 胚軸の形成機構が調節性とモザイク性のどちらに依っているかを検討すること、(3) 胞胚期における胚軸の形成機構が誘導現象に依っているかを明らかにすること、を目的とした。

組織学的、細胞学的、生化学的変化と発生ステージ

1) 同調的卵割から非同調的卵割への移行 (中期胞胚期遷移: MBT) は、9回

の同調的分裂の後、受精後 6 時間に起こり、この時期を中期胞胚期と定めた。レポート遺伝子 *pmiwZ* の発現を β -galactosidase の活性として調べたところ、受精後 5 時間より発現の観察された卵が出現した。この結果より、ゲノムの遺伝子がこの時期に発現を開始している可能性が示唆された。

2) *gooseoid* 遺伝子の発現は受精後 8 時間に検出された。この時期を後期胞胚期と定めた。*gooseoid* の発現は周縁質を除く胚盤に限られるというゼブラフィッシュでの報告 (Stachel et al., 1993) より、受精後 8 時間で胚盤の一部の細胞の分化の方向性が決定されている可能性が示唆された。

3) 受精後 8 時間より細胞の自律的な混合が起こること、深層細胞の系列が受精後 9 時間以降にも確立されることが観察され、この時期以降でも一部の胚細胞に調節性が維持されている可能性が示唆された。

受精直後胚、及び初期卵割胚におけるモザイク性の検討

1) 受精 20 分以内に電氣的に融合された融合卵より、2 つの卵に由来する胚盤が並置し 1 つの胚盤を持つようになった胚が 35% (77/218) の頻度で得られた。この胚には 1 つ (16%, 13/77) 或は 2 つ (84%, 64/77) の胚軸が形成された。鱗にグアニンを持つ系統と持たない系統の融合卵より正常に発生した 3 個体では、グアニンを持たない鱗は左側面のみ分布した。これらの結果より、キンギョの卵の中には、胚軸の形成に関して調節されない因子が存在する可能性が示唆された。

2) 初期卵割期に胚の植物極側の卵黄半球を取り除いた断片胚、及び 2 細胞期に第 1 卵割面に沿って胚を 2 分した胚断片を作成した。この両者から形態的に類似した奇形胚が発生した。最も多く出現した奇形胚は回転相称を示し、その発生の過程で、胚盤葉下層は形成されるものの胚盾が形成されないことが確認された。また、これと正常胚との中間形と考えられる、頭部欠損胚や単眼胚が出現した。卵黄半球の除去の時期が遅くなるにしたがって正常胚の出現の頻度が増し、32 細胞期での除去では殆ど全てが正常な胚を形成した。2 細胞期に 2 つの断片に分けた場合、一方が回転相称になる頻度は 74% で、一方が正常胚になる頻度は 44% であった。これらの結果より、胚盾の形成に関わる因子が、初期卵割期に既に植物極側の卵黄の中に部域的な局在性をもって存在していることが示唆された。同様な奇形胚の存在が知られている *Xenopus* における結果より、この因子は背側の構造を誘導する因子と推察され、この因子を持たない回転相称胚は腹方化した胚と考えられた。

3) 受精 10 分後 2189 × g の遠心処理を行った受精卵より発生した胚の殆どが無軸の形態を示した。また、受精直後より 30 分後の遠心処理からは、無軸あるいは頭部構造の欠落した胚が得られたが 40 分以降の処理ではその頻度が減少した。これらの結果より、受精直後の遠心処理によって、胚盾の形成に関わる因子は胚盤の細胞質と分離されるが、受精 40 分までに細胞質に信号が移されるか、因子の存在状態が変わることによって、分離できなくなると考えられた。

胚軸形成の過程

1) 中期、及び後期の胚盤を周縁質上部で水平に切断し、水平に 180° 回転させた胚では、前者で 10%、後者で 36% の 2 軸胚が出現した。この 2 軸の一方が正常で、他方は頭部欠落胚である胚が 91.3% を占めた。中期と後期胞胚の胚盤の周縁部分を無軸化された胚に移植した場合、前者に 40%、後者に 70% の頻度で軸を回復する能力があった。後期胞胚を胚盤部分と卵黄細胞部分に分け、それぞれを同時期の無軸化した胚の卵黄細胞部分、或は胚盤部分と組み合せた時、正常胚の卵黄部分と無軸胚の胚盤の組み合わせからは 70.6% の、逆の組み合わせからは 10.8% の正常仔魚が出現した。これらの結果より、胞胚期の胚盤部分にも将来胚軸に成ることを決定されている割球が存在し、中期から後期にかけてその量が増すこと、この胚軸になる能力は自律的に獲得されるのではなく、卵黄半球側からの何等かのシグナルによる誘導により獲得されることが明らかとなった。

2) Li 処理胚の胞胚期の胚盤の周囲部分の割球は、移植された時、無軸胚に軸を回復する能力を有し、宿主内部で主に背索前板及び背索に分化した。無軸化処理胚の胚盤の周囲部分も Li 処理により軸を回復させる能力を得たが、その能力は同処理の正常胚の胚盤の周囲部分の割球よりも質的に弱かった。これらの結果より、Li 処理はキングョにおいてもゼブラフィッシュと同様、*gooseoid* の異常発現を正常胚のみならず無軸化処理胚でも引き起こすと考えられた。*gooseoid* を発現した移植片は無軸胚に軸を回復する能力を持つが、この遺伝子のみの発現で完全な軸は回復しない。故に、卵黄半球からのシグナルは *gooseoid* の発現を誘導するだけでなく、その他の軸形成に関連した遺伝子の発現をも誘導するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山崎文雄 副査 教授 山内皓平
副査 教授 原 彰彦 副査 助教授 後藤 晃

学位論文題名

Experimental-embryological studies on goldfish and crucian carp (*Carassius auratus*), with special reference to establishment of dorso-ventral axis during the pre-gastrula stage.

(キンギョ、およびフナにおける実験発生学的研究：とくに囊胚期以前の背腹軸の確立について)

硬骨魚類の胚は、一部の割球を除去しても正常に発生し、また、胚の一部を移植しても正常に発生が進行することから、調節能力に富んでいると考えられているが、一方では初期卵割期に植物極側の卵黄を除去すると胚体形成が起こらないことから卵のモザイク性が示唆されている。

申請者は、キンギョを用いて胚体形成の基本となる胚軸の決定が調節性とモザイク性のどちらに依存しているかを明らかにすること、また、囊胚期以前の段階で起こる種々の発生現象の出現時期を形態的、生化学的に明らかにして、胚軸の形成に誘導性が関与しているか否かを明らかにすることを目的として本研究を行ったもので審査員は下記の点について評価した。

1. 受精卵は受精後 6時間までに 9回の同調的卵割を行い、この後に非同調的卵割へ移行することを確かめ、この時期を中期胞胚期と定義した。この時期はレポーター遺伝子 *pmiw 2* の発現に関する実験結果から、ゲノム遺伝子の発現開始時期であることを示唆した。更に胚軸決定に関与すると考えられる *gooseoid* 遺伝子の発現時期が受精後 8時間にあり、この時期に胚盤の一部の細胞の分化の方向が決定されること、これ以降、胚盤細胞に自律的混合が起こり胚に強い調節性が現れることを明確にした。

2. 初期卵割胚における調節性の有無を検討するために、受精20分以内に 2個の卵を融合させて胚盤形成、特に胚軸の数を調べた。その結果 2つの胚軸が形成される割合が84%に達し、初期胚はモザイク性であることを強く示唆した。この点を更に検討するために、初期卵割胚の植物極側の卵黄半球を除去した断片胚を作出し、胚軸の形成を調べた結果、いずれの断片胚も胚盤葉下層は形成されるが、正常な胚盾は形成されず、背側軸を欠いた奇形胚が形成されること、卵黄半球除去の時期を遅らせると正常胚の出現頻度が増し、32細胞期での除去ではほとんど全てが正常に発生することを確かめ、この結果から初期卵割期の卵黄半球に胚軸形成に関わる因子が存在することを推論した。またこの因子は2細胞期に第一卵割面に沿って胚を2分した胚断片の培養結果から、植物極側の卵黄部分に部域的な局在性を持って存在していることを示し

た。これらの結果は少なくとも初期卵割胚は明らかなモザイク的調節を受けていることを実証したものとして評価される。

3. 胚軸形成に関わる因子は卵割の進行に伴って動物極側へ移動すると考えられることから、受精10分後に2189gの遠心処理を行い、移動を阻止すると無軸胚が形成されるが、受精40分以降の処理ではその頻度が減少することから、胚軸形成に関わる因子は胚盤の細胞と分離されるが、受精後40分までに、胚葉細胞質に信号として移されるか、因子の存在状態が変わることにより、分離できなくなる可能性を示唆した。

4. 中期、および後期胞胚の胚盤を周縁質上部で水平に切断し、水平に180回転させた実験を行い、その結果、中期胚で10%、後期胚で36%の胚に2軸が形成されること、この2軸胚の一方が正常で他方が異常である胚が91.3%占めること、更に中期と後期胞胚の胚盤の周縁部分を卵黄半球を除去して無軸化した胚に移植した場合、前者では40%後者では90%の頻度で軸を回復させる能力のあること、正常胚の卵黄部分と無軸胚の胚盤を組み合わせた場合70.6%の割合で正常胚が出現するが、その逆の組み合わせからは89.2%の異常胚が出現することを示し、これらの結果から、胞胚期の胚盤部分に将来胚軸になることを決定されている割球が存在するが、その量は中期から後期胞胚期にかけて増加すること、この胚軸になる能力は自律的に獲得されるのではなく、卵黄半球側からの何らかのシグナルによって誘導されることにより、獲得されることを示唆し、胚軸形成に誘導現象のあることを明らかにした点は評価される。

5. リチウム(Li)は軸形成に関与する遺伝子を活性化作用のあることが知られており、キンギョにおいてもLi処理をした胞胚期の胚盤の周囲部分の割球を、無軸胚に移植すると胚軸が回復することを明らかにした。また無軸化処理胚の胚盤の周囲部分もLi処理により、軸を回復させる能力を有するが、その能力は同処理をした正常胚の胚盤の周囲部分の割球よりも質的に弱いことから推察して、Li処理がgooseoid遺伝子の発現を誘起するが、この遺伝子のみの発現で完全な軸は形成されず、このため正常な軸形成は卵黄半球からのシグナルがgooseoid遺伝子の発現を誘導するだけでなく、その他の軸形成に関連した遺伝子の発現も同時に誘導する可能性を指摘した点は今後の問題点を示唆するものとして評価した。

本研究はキンギョとフナにおいて新しい胚の断片化、融合、移植等の発生工学的手法を開発し、実験を論理的に積み重ねて魚の胚軸形成にモザイク性と調節性の2つの機構が関与することを明確にするとともに、シグナルによる遺伝子発現の誘導を示唆し、更にキメラ胚作出に新しい道を拓くものとして、審査員一同は博士(水産学)の学位に相当する業績と判断した。