

学 位 論 文 題 名

Cell Biological Analyses of Gametogenesis
in the Hybrid Medaka
between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*

（メダカとハンナンメダカ種間雑種の配偶子形成に関する
細胞生物学的解析）

学位論文内容の要旨

生殖細胞は個体を形成する細胞の中で唯一、次世代に生命を伝える細胞である。配偶子形成過程を通じて、生殖細胞は精子と卵に分化する。精子はゲノムを卵に運ぶ目的のため、凝縮した核・必要最小限の細胞質・遊泳能を保証する鞭毛を持つ。卵は胚発生に必要な遺伝情報や卵黄等の養分を蓄積する。これらが受精することで生命は連続する。配偶子形成過程は、生殖細胞自身の数を増やす体細胞分裂、ゲノム量を半減させる減数分裂、配偶子に特徴的な形態へと分化する過程（精子変態・卵成長）の3つからなる。これらの過程は、正常な配偶子を形成させるため、互いに強く関連していると考えられるが、その制御機構、特に脊椎動物における機構は未だ不明の点が多い。この最大の原因は、生殖における変異は致死となるため、他の複雑な生命現象の解明に絶大な威力を発揮している突然変異体を含む有力な実験・解析系が乏しいことにある。

メダカは小型の淡水魚で、1) 繁殖力が強い、2) 世代の長さが短い、3) 繁殖期を人為的に制御できる、などの性質から、配偶子形成機構を解析するための実験動物として非常に優れている。さらに、メダカ属では様々な種間雑種が作製され、それらの性質がすでに一部明らかにされている。たとえば、メダカとハイナンメダカの種間雑種の場合、雄は、頭部径が大きく鞭毛の微小管構造に異常が見られる精子様細胞を形成する。雌は、受精能を持つ卵を成熟させるが、この卵を両親種の精子で受精させると3倍体魚に発生するため、非還元卵(2n 卵)と考えられる。すなわち、この雑種はいわば、配偶子形成における突然変異体である。これを実験系に利用し、その配偶子形成不全の原因を探ることで、野生種における配偶子形成機構に迫ることができると期待される。

本研究はメダカ種間雑種の特徴的な配偶子形成を細胞生物学的に解析することで、未だ不明の点が多い配偶子形成の制御機構に関する新知見を得る目的で行われた。

第1章 メダカとハイナンメダカの種間雑種における精子形成

精子形成の制御機構を調べる目的で、異常精子を形成するメダカとハイナンメダカ種間雑種の精子形成過程を組織学的に解析した。種間雑種精巣の組織構築は両親種と変わりなく、精子様細胞が形成され、輸精管に放出された。しかし、減数分裂は第一中期に移行せず、精巣中に半数体性の細胞は観察されなかった。また、通常、減数分

裂後に開始されるプロタミン mRNA の発現も認められなかったことから、減数分裂が完了していないことが予想された。本雑種における精子形成過程をより詳細に観察するため、精母細胞の培養系を確立し、顕微鏡下で連続的に精子形成過程を観察した。正常（野生）メダカの前母細胞は、試験管内で減数分裂、精子変態を行い、4つの精子へと分化した。一方、種間雑種の前母細胞は、減数分裂を行うことなく1つの精子様細胞として分化した。以上の結果から、正常な減数分裂なしでも、精子変態は予定通り進行することが示された。これは減数分裂と精子変態は密接に関連するという従来の概念を破る発見である。

第2章 精子特異的塩基性核タンパク質プロタミンの生理学的意義

強く凝縮した精子核には特有の塩基性蛋白であるプロタミンが存在する。プロタミンは核凝縮時（精細胞期）に発現し、体細胞型ヒストンと置き換わることで核凝縮を誘起すると考えられている。しかし、第1章の研究で、メダカとハイナンメダカ種間雑種の精子形成過程では、プロタミン mRNA が発現しないにも関わらず、精子様細胞の核が凝縮することが示され、プロタミンの生理学的意義は核の凝縮誘起にあるとする従来の説に疑問が投げかけられた。プロタミン mRNA の発現は精細胞で始まるので、第1章で確立された前母細胞の培養系に mRNA 合成阻害剤（転写阻害剤、アクチノマイシンD）を加えることでプロタミンの発現が阻害でき、プロタミンを持たない精子を作製することができる。この精子の性質を詳細に調べることで、プロタミンの生理学的意義を調べた。

単離したメダカ前母細胞を転写阻害剤存在下で培養すると、非処理細胞と同様、減数分裂を終え、核が凝縮した4つの精子に変態した。プロタミン抗体による免疫組織化学により、転写阻害下で作製された精子はプロタミン蛋白質を持たないことが確認され、プロタミンは精子核凝縮に関与しないことがはじめて実験的に示された。受精の際、メダカ精子は水中に放出され、卵に到達するまで低浸透圧下に置かれる。プロタミンを持つ精子と持たない精子を水で処理し、10分間連続的に観察したところ、前者は80%以上崩壊しなかったのに対し、後者はすべて崩壊した。以上のことから、メダカプロタミンの生理的意義は、卵に到達するまでの間、精子核を低浸透圧による破壊から保護することにあると考えられる。

第3章 メダカとハイナンメダカの種間雑種における非還元卵形成機構

メダカとハイナンメダカの種間雑種が成熟させる卵は顕微測定の結果から、通常の2Cではなく、4CのDNA量を持つ非還元卵であった。これは、卵形成の制御機構に異常が生じたためと考えられる。卵形成の制御機構に関する知見を得るため、本雑種で非還元卵がどのように形成されるかを調べた結果、以下のことが明らかになった。1) 減数分裂は正常に進行し、2度の分裂でDNA量が1/4に減少する。2) 卵黄形成期の核（卵核胞）中に両親種の2倍（48本）の二価染色体が含まれる。これらのことは、減数分裂は正常に進行するが、減数分裂前に細胞質分裂を行わない分裂（核内有糸分裂）が起こるため、非還元卵ができることを示す。

この種間雑種の卵巣にはザイゴテン期の卵母細胞の蓄積が観察された。この現象は、「相同染色体が正常に対合しているかをチェックし、異常の場合は、減数分裂を停止させる機構がある」と仮定すると、説明できる。すなわち、核内有糸分裂を行わなかった卵母細胞は相同染色体がないため対合できず、ザイゴテン期で停止するが、核内有糸分裂を経た卵母細胞は対合が可能なので、成長期へと移行できると推定される。このようなチェック機構の存在は体細胞分裂ではすでに確認されているが、減数分裂では未だ不明で、本研究によりはじめてその存在が強く示唆された。

以上、本研究はメダカ及びその種間雑種の生殖特性を活かした実験・解析により、これまで適切な実験系に乏しく、不明の点が多い脊椎動物における配偶子形成過程の制御機構に新たな知見を提供するとともに、従来信じられていたプロタミンの機能を覆し、新たな生理的意義を示したもので、生殖生物学に多大な貢献をなすものと考え

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 助 教 授 若 原 正 己

学 位 論 文 題 名

Cell Biological Analyses of Gametogenesis in the Hybrid Medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*

(メダカとハンナンメダカ種間雑種の配偶子形成に関する
細胞生物学的解析)

配偶子形成過程を構成する諸過程（生殖原細胞の増殖、減数分裂、精子変態/卵形成・卵成熟）は、正常な配偶子の形成のため、互いに強く関連していると考えられるが、その制御機構は未だ不明の点が多い。メダカとハンナンメダカの種間雑種は異常な配偶子形成を行う。この配偶子形成不全の原因を探ることで、野生種における配偶子形成機構に迫ることができると思われる。本研究はメダカ種間雑種の特徴的な配偶子形成を細胞生物学的に解析することで、未だ不明の点が多い脊椎動物における配偶子形成の制御機構に関する新知見を得る目的で行われた。

学位論文は3章から成る。第1章では異常精子を形成するメダカとハンナンメダカ種間雑種の精子形成過程を組織学的に解析した。種間雑種精巣の組織構築は両親種と変わりなく、精子様細胞が形成され、輸精管に放出された。しかし、減数分裂は第1中期に移行せず、精巣中に半数体性の細胞は観察されなかった。また、通常、減数分裂後に開始されるプロタミン mRNA の発現も認められなかったことから、減数分裂が完了していないことが予想された。本雑種における精子形成過程をより詳細に観察するため、精母細胞の培養系を確立し、顕微鏡下で連続的に精子形成過程を観察した。正常（野生）メダカの精母細胞は、試験管内で減数分裂、精子変態を行い、4つの精子へと分化した。一方、種間雑種の精母細胞は、減数分裂を行うことなく1つの精子様細胞に分化した。以上の結果から、正常な減数分裂なしでも、精子変態は予定通り進行することが示された。これは減数分裂と精子変態は密接に関連するという従来の概念を破る発見である。

強く凝縮した精子核には特有の塩基性蛋白質であるプロタミンが存在する。プロタミ

ンは核凝縮時（精細胞期）に発現し、体細胞型ヒストンと置き換わることで核凝縮を誘起すると考えられている。しかし、第1章の研究で、メダカとハイナンメダカ種間雑種の精子形成過程では、プロタミン mRNA が発現しないにも関わらず、精子様細胞の核が凝縮することが示され、プロタミンの生理学的意義は核の凝縮誘起にあるとする従来の説に疑問が投げかけられた。第2章ではプロタミンを持たない精子を作製し、その性質を詳細に調べることで、プロタミンの生理学的意義を調べた。単離したメダカ精母細胞を転写阻害剤存在下で培養すると、非処理細胞と同様、減数分裂を終え、凝縮した核を持つ4つの精子に変態した。プロタミン抗体による免疫組織化学により、転写阻害下で作製された精子はプロタミン蛋白質を持たないことが確認され、プロタミンは精子核凝縮に関与しないことがはじめて実験的に示された。受精の際、メダカ精子は水中に放出され、卵に到達するまで低浸透圧下に置かれる。プロタミンを持つ精子と持たない精子を水で処理し、10分間連続的に観察したところ、前者の核は80%以上崩壊しなかったのに対し、後者のそれはすべて崩壊した。以上のことから、メダカプロタミンの生理的意義は、排出された精子が卵に到達するまでの間、精子核を低浸透圧による破壊から保護することにあると考えられる。

メダカとハイナンメダカの種間雑種が成熟させる卵は顕微測定の結果から、通常の2Cではなく、4CのDNA量を持つ非還元卵であった。これは、卵形成の制御機構に異常が生じたためと考えられる。卵形成の制御機構に関する知見を得るため、本雑種で非還元卵がいかにか形成されるかを調べた結果、減数分裂は正常に進行するが、減数分裂前に細胞質分裂を伴わない分裂（核内有糸分裂）が起こるため、非還元卵ができることが明らかになった。この種間雑種の卵巣にはザイゴテン期の卵母細胞の蓄積が観察された。この現象は「相同染色体が正常に対合しているかをチェックし、異常の場合は、減数分裂を停止させる機構がある」と仮定すると、説明できる。すなわち、核内有糸分裂を行わなかった卵母細胞は相同染色体がないため対合できず、ザイゴテン期で停止するが、核内有糸分裂を経た卵母細胞は対合が可能なので、成長期へと移行できると推定される。このようなチェック機構の存在は体細胞分裂ではすでに確認されているが、減数分裂では不明で、本研究によりはじめてその存在が強く示唆された。

以上をまとめると、著者はメダカ及びその種間雑種の生殖特性を活かした実験・解析により、脊椎動物における配偶子形成過程の制御機構に新たな知見を提供するとともに、従来信じられていたプロタミンの機能を覆し、新たな生理的意義を示したもので、生殖生物学に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。