

学 位 論 文 題 名

キンギョにおける始原生殖細胞の移動に関する
実験発生学的研究：特に囊胚形成運動との関係について

学位論文内容の要旨

多くの種において、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞 (PGCs) は将来生殖腺の形成される領域とは離れた場所で形成され、その後生殖腺へと移動してくることが知られている。また PGCs の生殖腺部位への移動の第一段階が原腸陥入の時期に起こっているという点で共通している。PGCs の移動に関する研究を行うためには、移動前の PGCs を識別し、その移動過程を追跡できることが必要条件となる。

分子生物学の発達により生殖顆粒の構成分子の一つ *vasa* が様々な種で単離され、生殖細胞特異的な遺伝子として注目されてきた。魚類でもゼブラフィッシュ、メダカ、ニジマス、ティラピアなどで *vasa* 相同遺伝子が単離されている。*vasa* 相同遺伝子 (*vas*) をマーカーとして魚類の PGCs が識別できるようになって、以前よりも早い発生ステージでの PGCs の動態を追跡できるようになった。これまでゼブラフィッシュ以外にも、ニジマス、メダカ、シロウオなどで観察が行われている。しかし発生初期における *vas* の局在が観察されない、初期胚の *vas* の局在にばらつきがあるなどの相違点が報告されている。また、メダカでは後期囊胚期における PGCs の分布がゼブラフィッシュとは異なる点がある。

魚類の初期発生胚は卵黄や胚盤の形状も様々で、発生過程の形状は非常に多様性に富んでいる。そのため PGCs の起源や分布に関する違いが何に起因するのかを判定するのは難しい。そこで本研究ではゼブラフィッシュの近縁種で発生形態の類似するキンギョを用いて、まず (1) PGCs の動態を追跡し、ゼブラフィッシュとの比較を行った。次に (2) キンギョとゼブラフィッシュの相違点の生じる理由を実験的な手法により明らかにし、(3) それらの結果を総合してキンギョにおける PGCs の移動モデルを

作成した。

PGCsの動態はWhole mount *in situ* hybridization (WM-ISH) 法を用いて *vas* mRNAの局在位置を追跡することで明らかにした。その結果、2細胞期には第1卵割溝の両端に強い局在が見られた。4, 8細胞期においても、新たに生じた卵割溝のそれぞれの両端に強い局在が見られた。しかし第4卵割溝には局在が認められず、それ以後も局在部位は8箇所のみであった。256細胞期以降、*vas*の局在点は1つの割球の中に取り込まれている形で観察されるようになった。これ以後、*vas*の局在する細胞を始原生殖細胞(PGCs)とする。後期胞胚期になるとPGCsの増加が認められ、各々の部位に複数個認められるようになった。

後期胞胚期以降、多くのPGCsは予定内-中胚葉領域内に存在していたが、その領域から外れた位置に観察される頻度が後期胞胚期からdome期までの間に増加した。エピボリー運動が始まるとPGCsは胚盤周縁部に位置したまま植物極方向へと移動していき、shield期になると背側へと移動し始めた。70-90%エピボリー期になると、背側に位置したPGCsは胚軸に沿うように動物極側へと移動するようになるが、背側以外のPGCsは依然、胚環領域に位置していた。100%エピボリー期では、PGCsは植物極付近から胚軸に沿って体幹部に広範囲な分布を示した。PGCsがクラスターを形成している部位はなく、分布域は幅広く拡散していた。胚体の動物極側、頭部付近に位置しているPGCsも確認できた。

キンギョにおける*vas*の局在部位およびPGCsの動態は、ゼブラフィッシュと比較すると幾つかの相違点が見られた。特に、1) 後期胞胚期から50%エピボリー期において、キンギョ胚ではPGCsが胚盤周縁下部よりも上方に位置しているのが多く見つかること、2) 囊胚形成期のPGCsの分布が大きく異なること、3) キンギョでは体節期においてPGCsが頭部付近に高い頻度で観察されること、の3点はゼブラフィッシュの結果より構築された移動モデルでは説明できない。そこでキンギョで確立している様々な胚操作の手法を用いて中胚葉形成、背腹軸形成に変化を与えることでPGCsの動態にどのような変化が生じるかを調べた。その結果、以下のことが明らかになった。

- ①胚操作によって誘導した中胚葉欠損胚においても*vas*の発現は維持され、正常胚に移植すると生殖腺へと移動した。このことからPGCsの初期配置はPGCsの

細胞運命と直接の関係はないと考えられた。

②細胞追跡の結果、胚盤周縁部の細胞が胚盤上部にまで移動することが明らかになった。このことから、後期胞胚期以降に胚盤上部で観察される PGCs は割球のこの大規模な混合によって移動していると考えられた。

③胚操作により作出した背腹軸形成の奇形胚を用いた解析の結果、convergence 運動の全く起こらない胚では PGCs の背側への移動は見られなかった。そのため PGCs の背側への移動には convergence 運動が必要であることが示唆された。

④一方、convergence 運動の起こっていない胚においても、PGCs が動物極付近へ移動する例があった。胚環部で起こる involution 運動と、それに伴う胚盤葉下層の形成運動が関与していると考えられた。

⑤人為的に誘導した二次軸胚を用いた解析の結果、PGCs は形態形成が不完全な軸の方へも移動していた反面、正常胚に見られるような「胚軸に沿って整列するような分布」は示さなかった。これらのことから形態形成期の PGCs の移動は細胞自律的なものではなく形態形成運動に依存したものであると考えられた。

⑥胚盤の移植位置を変化させた胚を用いた解析の結果、胞胚期の胚盤上部に移植された PGCs は胚体の頭部域に到達し、本来の PGCs 存在位置である胚盤周縁部に近いほど、正常な移動をすることが示された。このことより PGCs は胞胚期における初期分布位置により、別の移動経路を示すと考えられた。

これらの結果より、囊胚形成期における PGCs の移動を①背側方向への convergence 運動と、②動物極方向への involution 運動と extention 運動の総和として動くとして仮定し、魚類における同時期の PGCs 移動モデルを作成した。ゼブラフィッシュの *spadetail* 変異体における PGCs の動態から、involution 運動によって動物極方向へと移動した PGCs は動物-植物極の境界を越えず、境界線上にトラップされと考えられた。それをモデルに反映させるとゼブラフィッシュの正常胚に見られる PGCs の特徴的な分布が示された。このモデルにより、キンギョとゼブラフィッシュにおいて大きな違いが認められた後期囊胚期の PGCs の分布も、胚環から PGCs が離脱し動物極方向へと移動し始める時期の差という小さな差異で説明しうると考えられた。最後にキンギョにおける PGCs の移動と胚発生との時間的・空間的關係をまとめ、模式的に図示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 嵯 峨 直 恆
副 査 助 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

キンギョにおける始原生殖細胞の移動に関する 実験発生学的研究：特に囊胚形成運動との関係について

始原生殖細胞（PGCs）は生殖細胞の前駆細胞である。このPGCsに遺伝子工学的・細胞工学的操作を加えた後、生殖系列キメラを介することで、この操作PGCs由来の個体を再生できる。この様にPGCsは、発生工学、生殖工学の分野でその材料として注目される細胞である。多くの種においてPGCsは、将来生殖腺の形成される領域とは離れた場所で形成され、その後生殖腺へと移動してくることが知られている。しかしながら、魚類においてはモデル動物であるゼブラフィッシュとメダカ以外の種で、PGCsの分化や生殖腺への移動に関する基礎的な研究はほとんど進んでいない。本研究は、キンギョのPGCsの分化および移動機構を明らかにすることを目的として行なわれ、正常発生胚と実験発生学的操作を加えた胚に対して、生殖細胞特異的な*vas*遺伝子産物をマーカーとした分子生物学的解析を行ない、以下の評価すべき成果を得た。

1) 受精直後からPGCsが生殖隆起に至るまでの正常発生過程における*vas*遺伝子産物の分布を、whole mount *in situ* hybridization法により明らかにした。このうち、(1)*vas*遺伝子産物は第一から第三卵断面の両端に蓄積されること、(2)胞胚期において一部のPGCsが内中胚葉領域から逸脱すること、(3)囊胚形成期においてPGCsの多くが胚環領域に分布し帯域には分布しないこと、(4)体節期においてPGCsが頭部付近に高い頻度で観察されることの4点においてゼブラフィッシュで

の報告とは異なる知見を見い出した。

2) 胞胚期から囊胚期にかけてPGCsの分布する領域は中胚葉誘導を受ける場であることから、PGCsの分化と中胚葉形成の関係が示唆されていた。胚操作により中胚葉を欠損する胚を誘導し、*vas*の発現と維持を明らかにすると共に、キメラ胚を作成し生殖隆起への移動能力を検討した。その結果、中胚葉の欠損胚でも*vas*の発現が維持されること、さらにこの胚を正常胚に移植した時、欠損胚由来の機能的なPGCsが形成されることを明らかにし、中胚葉誘導とPGCsの分化は関係がないことを示した。このことより、正常発生で観察された内中胚葉領域から逸脱したPGCsも機能的なPGCsに成り得ることが明らかになった。

3) 胞胚期において観察された、内中胚葉領域から一部PGCsの逸脱の機構を明らかにする目的で、64細胞期の胚細胞を標識と追跡観察を行なった。この結果、標識細胞は胚盤の周縁から広範囲の拡散することを明らかにした。従って、胞胚期におけるPGCsの内中胚葉領域からの逸脱は、キンギョで特異的な同時期の胚細胞のランダムかつ自律的なmixing運動に原因が求められることが示唆された。

4) 胚盤の周囲に分布したPGCsが背側への移動する機構を明らかにする目的で、背腹軸形成の欠損胚を実験的に誘導し、これらの胚でのPGCsの移動を明らかにした。その結果、形態形成運動であるconvergence運動の起こらない背側構造の欠損胚では背側へのPGCsの移動が起こらないこと、人為的に誘導した2次胚を持つ2軸胚でPGCsが不完全な2次軸へ移動することが明らかとなった。これらのことから、PGCsの背側への移動は細胞自律的なものではなく形態形成運動に依存したものであることを示した。

5) キンギョにおいて胚体の頭部にPGCsが高い頻度で観察される原因を明らかにする目的で、胞胚期の胚盤を他胚の動物極側へ移植する操作を行なった。この結果、より動物極側への移植を行ないPGCsの分布を動物極側に変更した胚で、頭部にPGCsが観察される胚の頻度が増え、観察されるPGCsの数も増加した。このことより、PGCsは胞胚期における初期分布位置により移動経路が異なり、より動物極側に位置することで頭部へ移動することが明らかにされた。

6) これらの結果を元に、キンギョにおけるPGCsの形成とその移動の経路のモデルを構築した。

申請者による以上の成果は、魚類PGCsの形成および生殖隆起への移動機構の解明に大きく寄与するものであり、さらには今後の魚類の発生工学技術の発展に資するものとして、審査員一同は本研究が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。