

学 位 論 文 題 名

ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の
始生殖細胞（PGCs）の起源および分化に関する研究

学位論文内容の要旨

多細胞生物の体は、体細胞系列と生殖系列の細胞により構成されている。個体の死と共に消滅する体細胞系列の細胞に対し、生殖系列の細胞は世代を越えて受け継がれてゆく性質を持つため、その遺伝的変異のみが、次世代へ伝達される。従って、生物の遺伝的改良を目的とする育種においては、生殖系列の細胞、特に将来生殖細胞になるが、まだ未分化である始生殖細胞（Primordial Germ Cells; PGCs）の性質を知ることが重要である。

魚類における PGCs に関する研究は、組織学的観察を主として、いくつかの種で行われ、囊胚期以降においてその存在が確認されている。近年、ショウジョウバエの生殖細胞形成因子の 1 つである *vasa* と相同な遺伝子である *vas* が、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* において単離され、その転写産物が初期卵割期の卵割面に局在し、後に生殖系列の細胞へ受け継がれることが明らかにされた。また、卵割面には、生殖系列に特異的な組織学的構造が局在していた。これらの結果から、本種の生殖細胞は生殖細胞形成因子により非常に早い時期に決定されている可能性が示されている。しかしながら、組織学的に観察されている PGCs の出現時期と *vas* 転写産物の分布状態との間には、時期的あるいは空間的なずれがある。また、卵割面の細胞質の生殖細胞形成への関与や PGCs の分化の可塑性の有無などは直接確かめられていない。

そこで本研究では、ゼブラフィッシュの PGCs の分化、および決定機構の一端を明らかにする目的で、主に組織学的および実験生物学的手法を用いた解析を行った。

1. PGCs の組織学的追跡

(1-1) 正常胚発生過程における PGCs の起源を、将来の生殖隆起における PGCs の特徴に基づいて遡及した。エオシン好性を呈する細胞質および核内の顆粒物質と、明瞭な核膜、および大型の核を有する球形の大型細胞である PGCs は、bud 期以降の胚で観察された。

(1-2) bud 期以前の胚においては、エオシン好性の顆粒のみを持つ PGCs-like cells (PL-cells) が、後期胞胚期 (sphere 期) まで遡って観察された。PL-cells および PGCs は、囊胚形成期に均等分裂により増殖していた。このような動態は、*vas* の転写産物を有する細胞の動態と酷似していた。以上の結果から、PL-cells は PGCs もしくは PGCs を生み出す細胞に一致すると結論された。

(1-3) PL-cells および PGCs に存在するエオシン好性の顆粒の存在様式は 1) 主に細胞質に大小の顆粒で存在する時期、2) 核近傍にキャップもしくはリングを形成するように位置する時期、3) 小さな顆粒となり核内外に位置する時期、の 3 期に分けられた。以上のエオシン好性顆粒の動態は、無尾両生類における生殖質の動態と酷似していたことから、魚類における生殖質として、PGCs への分化に重要な役割を果たしていると考えられた。また、PL-cells の分裂期である囊胚形成期に PGCs への分化が起こっていることが示唆された。

2. 胚盤操作による PGCs 分化の解析

胞胚期の、胚盤の全体、下半分、あるいは上半分をドナーとしてレシピエントである他胚の動物極へ移植する胚盤移植実験を行った。

(2-1) 胚盤下部を含む移植胚では中胚葉関連遺伝子の異所的発現が認められ、胞胚期の胚盤下部の細胞は、一部の胚で既に特殊化が進行していると考えられた。

(2-2) それぞれの移植胚における PGCs の起源を明らかにする解析の結果、主に胚盤の下部に PGCs を生み出す割球が存在し、これらは卵黄細胞からの影響を軽減しても、生殖隆起に到達する PGCs に分化することが明らかになった。

(2-3) *golden* 系統をドナー、*wild* 系統をレシピエントとし、中期胞胚期に胚盤全体を移植する重複胚を作製した。これらの胚に由来する *golden-wild* キメラ魚と、劣性であるドナー系統との交配の結果、高頻度 (80%) のキメラ魚からドナー系

列の子孫が得られた。この結果から、ドナーに由来する PGCs は、配偶子まで分化できることが明らかとなった。

3. 異所性および異時性 PGCs の分化

(3-1) 胚盤重複胚からのキメラ胚個体において、対照群で主に PGCs が分布しない、咽頭部もしくは耳胞付近での異所的な PGCs の存在が明らかになった。これらの異所的な PGCs は、正常の位置に分布する PGCs と同様の組織学的変化を呈した。これらの結果は、PGCs が位置情報なしに自律的に分化を遂げるか、異所的な PGCs が確認された咽頭部や耳胞付近が PGCs の分化にとって好的環境であったかのどちらかを示すと考えられた。

(3-2) PGCs がクラスターを形成する 12 体節期胚より PGCs を周囲の細胞と共に分離し、胞胚への異時的移植を行った。その結果、ドナー PGCs は、同時に移植された周囲の細胞とは独立して移動し、レシピエント胚中の通常の経路を通過して生殖隆起へ到達した。一方、受精後 4 日目の生殖隆起から分離した PGCs を胞胚へ移植しても、正常な移動を示さなかった。これらの結果、PGCs の移動はレシピエントの体細胞から出されるシグナルによって支配されており、12 体節期の PGCs はそれを認識するが、生殖隆起に到達後は失なうと考えられた。

(3-3) 胞胚に移植された 12 体節期の PGCs は、レシピエント胚の PGCs とは同調的に分裂を行わず、増殖が静止したままであった。このことから、移植された PGCs の分裂が自律的に制御されていることが示唆された。

(3-4) 受精後 4 日目の PGCs は、レシピエント胚の中で明瞭な PGCs の組織学的特徴を維持せず、すべて体細胞に組み込まれていた。この結果は、受精後 4 日目の PGCs が、レシピエント内で、体細胞系列へ再分化した可能性を示唆するものと考えられた。

(3-5) エオシン好性顆粒を有する中期胞胚期から 12 体節期の PGCs は、異所あるいは異時的に移動されても、その細胞運命を維持することができた。一方、同顆粒を失った受精後 4 日目の PGCs は、異時的に移植された際に他の細胞系列に組み込まれたことから、生殖系列の細胞運命の維持と、エオシン好性顆粒の状態が関与している可能性があると考えられた。

4. 卵割面に局在する細胞質の役割

細胞質の除去によって、胚盾期あるいは生殖隆起に観察される PGCs 数が減少した。一方、この細胞質を、生殖系列のマーカー遺伝子の転写産物が局在しない割球に移植した結果、この細胞質を受け継いだ PGCs 様の細胞を有する個体が得られた。これらの結果から、この細胞質が生殖質と同等の役割を果たすと考えられた。

以上から、ゼブラフィッシュの生殖細胞形成は、生殖質の存在により前成的に決定されていることが示された。また、エオシン好性顆粒は PGCs の生殖系列としての運命を保護する、つまり、生殖質と同等の機能を有すると考えられた。さらに、PGCs の移動は PGCs と体細胞の相互作用により制御されている可能性が示された。今回行った胚盤、あるいは PGCs の移植実験は、ともに生殖系列キメラの作出に有効であり、それを用いた育種技術開発が可能なことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 都 木 靖 彰

副 査 助 教 授 山 羽 悦 郎

学 位 論 文 題 名

ゼブラフィッシュ *Danio rerio* の

始原生殖細胞 (PGCs) の起源および分化に関する研究

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。魚類のPGCsは、初期卵断面に局在する細胞質を受け継いだ細胞から生じるとされている。現在、モデル魚種であるゼブラフィッシュにおいて、突然変異を利用したPGCsの分化や移動に関する研究が進められているが、PGCsあるいは胚に対する直接的な操作による解析を行なっている例はほとんどない。申請者は、同種のPGCsの分化および発生学的決定機構を明らかにする目的で、組織学的および実験発生学的な手法を用いた解析を行ない、以下の評価すべき成果を得た。

- 1) 正常発生過程におけるPGCsの起源を、組織学的に明らかにした。このうち、
(1)エオシン好性顆粒を指標とするとPGCsが後期胞胚期から見い出されること、
(2)囊胚形成期においてエオシン好性顆粒が娘細胞に均等に配分されるようになること、
(3)エオシン好性顆粒の細胞内分布様式によってPGCsの分化が三段階に分けられること、3点において新規知見を得た。
- 2) 胞胚期の胚盤におけるPGCsの分布を明らかにするために胚盤の部分的移植を行なった結果、主に胚盤の下部にPGCsを生み出す割球が存在することが明らかになった。また、中胚葉誘導の影響が無くなっても、生殖隆起に到達するPGCs

に分化することが明らかとなった。

- 3) ゼブラフィッシュの二系統より胚盤移植により誘導されたキメラ個体と劣勢系統との交配実験を行なった。この結果、高頻度の(80%)のキメラ個体よりドナー系統に由来する子孫が得られ、ドナーPGCsが機能的な配偶子へ分化することが明らかにされた。
- 3) 胚盤操作により誘導されたキメラ胚の中で、一部のPGCsが咽頭部あるいは耳胞周辺に異所的に分布し、ここで正常位置に分布するPGCsと同様の組織学的分化を遂げることが明らかとなった。この結果は、母系細胞質を受け継いだPGCsは自律的な分化を遂げるか、これらの部域がその分化によって好適環境であったかのどちらかを示すと考えられた。
- 4) 12体節期のクラスターを形成するPGCsを分離し、胞胚への異時的移植を行なった。その結果、ドナーPGCsは、レシピエントの胚のPGCsとは同調的に分裂を行なわなかったが、胚中の通常の経路を通して生殖隆起へ到達した。この結果より、この時期のPGCsの分裂が自律的に制御されているものの、宿主胚内の移動経路を認識する能力を有していると考えられた。
- 5) 受精後四日目の生殖隆起よりPGCsを分離し胞胚への異時的な移植をすると、レシピエント胚の中で通常の移動を示さず、PGCsの組織学的特徴を失って体細胞に組み込まれた。この結果は、この時期のPGCsがレシピエント内で体細胞系列へ再分化した可能性を示唆するものと考えられた。
- 6) 初期卵断面に局在し、PGCsへと受け継がれる細胞質の除去実験、移植実験を行ない、前者によりPGCsの数が少なくなること、後者により本来PGCsを生じない細胞からPGCs様の細胞が生じることを明らかにした。
- 7) これらの結果より、ゼブラフィッシュの生殖細胞形成は母系細胞質により前成的に決定されていると結論付けられた。

申請者による以上の成果は、魚類PGCsの形成および分化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。