

魚類の生殖系列キメラ作出に関する実験発生学的研究

学位論文内容の要旨

生殖巣に遺伝的起源が異なる生殖細胞を含むキメラ個体を、「生殖系列キメラ」と呼ぶ。もし、異魚種間で生殖系列キメラを作出することができれば、1) 小型魚種を用いた大型魚種配偶子の生産による育種の効率化、2) 短期間で成熟する魚種を用いた、成熟に長期間を要する魚種の配偶子生産による再生産の時間の短縮、3) 胚細胞の凍結保存技術と組み合わせた優良品種や絶滅危惧魚種の保存に応用できる。

始原生殖細胞 (PGCs) は、生殖細胞の祖となる細胞であり、胚発生の初期に体細胞系列から分離することが知られている。この特性を利用し、PGCs 移植により生殖系列キメラを作成するアイデアが提案されている (山羽, 2002)。魚類ではコイ目魚種やメダカを中心に PGCs の動態が解析されているが (reviewed by Braat *et al.*, 1999)、魚類は多様性に富んでいるため、水産育種・増殖への応用を考慮したとき、様々な種で PGCs の動態を明らかにする必要がある。そこで本研究では、(1) 水産上の有用魚種を多数含むスズキ目の魚、シロウオとウキゴリの胚発生過程と PGCs の動態を明らかにし、魚類の胚発生過程と PGCs の動態を整理した。そして、それらの知見を踏まえ、(2) PGCs を含む胚領域の移植により同種間および異種間生殖系列キメラの作出を試み、さらに (3) 様々な魚種で PGCs を可視化する手法の開発を行い、PGCs の選択的移植による同種間、異種間生殖系列キメラの作出法を検討した。

シロウオとウキゴリの PGCs の起源と動態、および胞胚期における胚盤の分化多能性

1) Whole mount *in situ* hybridization (WISH) 法による *vasa* mRNA の局在の追跡と組織学的観察により、シロウオとウキゴリの PGCs の起源と動態を明らかにした。その結果、①両魚種の PGCs の起源は第 1 から第 3 卵割期の卵割面にまで遡ることができた。②後期胞胚期以降に PGCs は増殖した。③胚盾期まで、大部分の PGCs は胚盤周縁部に位置していたが、90% エピボリー期になると、背側の動物極側の領域にも観察された。④初期体節期には胚体両側部に前後軸方向に分散して整列した。⑤10 体節期以降、PGCs は背腹軸方向に胚体下部へ移動した。⑥その後、PGCs は胚体下部に位置したまま尾部基部方向へ向かって、後方へ移動した。⑦尾部基部領域に到達した PGCs は、腸管側部の側板中胚葉の内部、および腸間膜を経由して、生殖隆起へと移動した。これらの結果より、シロウオとウキゴリの PGCs は生殖細胞質により形成されると考えられた。また、移動様式のほとんどにおいて他魚種の知見との共通性が認められたものの、10 体節期以降に背腹方向に胚体内へ PGCs が移動する様式は他魚種では観察されておらず、両魚種に特徴的だった。

2) シロウオ胚盤の分化能を明らかにするため、8細胞期の割球を動植物軸に対して垂直に断片化し、断片胚のその後の形態形成過程を観察した。卵黄細胞を有する割球は胚体形成を行ったが、卵黄細胞から切り離れた割球は胚体形成を行わなかった。また、8細胞期の上下1割球の細胞系譜を追跡したところ、上下どちらの割球の子孫も初期囊胚期まで胚盤内で大規模な混合を起こし、すべての組織に分化した。これらの結果より、少なくとも体細胞系列の細胞は初期囊胚期まで分化多能性を有しており、卵黄からの誘導が胚体形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。

3) ウキゴリの16~32細胞期の1割球を標識し、その細胞系譜を追跡すると、標識割球の子孫は初期囊胚期まで胚盤内で大規模な混合を起こした。ウキゴリ胚でも、初期囊胚期まで胚盤に分化多能性があるものと考えられた。

PGCsを含む胚領域の移植

1) シロウオ、ウキゴリ、キンギョとコイの交雑魚、ドジョウ、ゼブラフィッシュ胚を用いて、同種間、あるいは異種間で、胞胚期胚盤の植物極側領域の移植を行った。今回用いた魚種では、胞胚期の胚盤の植物極側にPGCsが位置していることから、体細胞と共にPGCsも移植されることが予想された。同種間での移植では、胞胚期から囊胚期にかけて供与体細胞は宿主胚と大規模な混合を起こした。その後移植胚の生殖隆起に供与体由来のPGCsが確認された。一方、異種間での移植実験の大部分では、供与体細胞は宿主胚中で凝集塊を形成し、移植胚の生殖隆起には供与体由来のPGCsが認められなかった。この結果は、種の違いによる細胞凝集がPGCsの移動を阻害したものと考えられた。

PGCsの単離移植

1) ゼブラフィッシュ *nos1* の3'末端非翻訳領域(3'UTR)と緑色蛍光蛋白(GFP)遺伝子を接続したキメラ遺伝子のmRNAを、様々な魚種の受精卵へ顕微注射した。その結果、キンギョ、ドジョウ、シロウオ、ニシン、メダカのPGCsをGFP蛍光により可視化することができた。このことは、ゼブラフィッシュ *nos1* 3'UTRは他魚種のPGCs内でも安定化され、効率的に翻訳されることを示しており、この3'UTRの機能は魚種間で広く保存されているものと考えられた。

2) ドジョウとキンギョの可視化したPGCsを10~20体節期胚に単離し、それぞれ同種の胞胚期胚盤への移植を行ったところ、移植PGCsは宿主の生殖隆起に達した。このことは、胞胚期から体節形成期までPGCsの性質、とくに空間認識機構が維持されていることを示し、胚発生の長期にわたる一貫したPGCsの移動機構の存在を示唆した。

3) 可視化したPGCsを異種間で移植した。コイ目魚種間でPGCsを移植した場合は、供与体PGCsは宿主胚の移動様式に従って生殖隆起に到達した。一方、ドジョウとキンギョのPGCsをウキゴリ胚へ移植した場合、供与体PGCsは初期体節形成期までは宿主のPGCsの移動様式に従ったが、それ以降の発生段階では生殖隆起形成域への移動が認められなかった。また、シロウオPGCsをキンギョに移植した場合、供与体PGCsは宿主の移動様式に従わなかった。これらの結果は、PGCsの移動機構は少なくともコイ目の魚種間では保存されていることを示

している。しかし、系統的に遠い関係にある場合は、移動様式あるいは発生速度の違いにより、供与体 PGCs の移動が宿主の制御から逸脱するものと考えられた。

これらの結果より、生殖系列キメラの誘導には、発生速度が等しく、発生機構の類似した種間では PGCs を含む胚断片を移植することで対応できるが、遠縁種では PGCs のみの移植が適当であることが示された。また PGCs の生殖隆起への移動には種を超えて共通な機構が保存され、これを利用することで宿主の生殖腺へ PGCs を取り込ませることができる可能性が示された。しかしながら、生殖隆起に到達した PGCs が機能的な配偶子を分化させることができるかどうかは不明である。今後、異種配偶子の形成過程を解析し、PGCs の単離・移植技術を洗練させることで、異種間生殖系列キメラ作出が実現するものと思われる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 荒井 克俊
副査 教授 阿部 周一
副査 教授 都木 靖彰
副査 教授 山羽 悦郎

学位論文題名

魚類の生殖系列キメラ作出に関する実験発生学的研究

生殖巣に遺伝的起源が異なる生殖細胞を含むキメラ個体を「生殖系列キメラ」と呼ぶ。もし、異魚種間で生殖系列キメラを作出することができれば、1)小型魚類を用いた大形魚種の配偶子生産による飼育空間の効率化、2)短時間で成熟する魚種を用いた、成熟に長期間要する魚種の配偶子生産による再生産時間の短縮、3)胚細胞の凍結保存技術と組み合わせた優良品種や絶滅危惧魚種の保存と再生等に応用できる。本研究は、異魚種間での生殖系列キメラ個体の作出を目的とし、初期発生機構解析、始原生殖細胞(PGCs)の起源と移動経路の解析、および異魚種へ移植された胚細胞とPGCsの動態を明らかにし、以下の評価すべき成果を得た。

1) シロウオの胞胚期における胚盤の分化多能性を明らかにするため、8細胞期の割球を動植物軸に対して垂直に断片化し、断片胚のその後の形態形成過程を観察した。また、8細胞期割球の細胞系譜を追求した。その結果から、少なくとも体細胞系列の細胞は初期囊胚期まで分化多能性を有しており、卵黄からの誘導が胚胎形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。

2) ウキゴリの16~32細胞期の1割球を標識し、その細胞系譜を追跡すると、標識割球の子孫は初期囊胚期までに胚盤内で大規模な混合を起こした。また、外中内胚様に起源する組織全てに分化した。このことから、ウキゴリ胚でも、初期囊胚期まで胚盤に分化多能性があるものと考えられた。

3) Whole mount *in situ* hybridization (WISH)法による *vasa* mRNAの局在の追

跡と組織学的観察により、シロウオとウキゴリのPGCsの起源と動態を明らかにした。その結果、シロウオとウキゴリのPGCsは、初期卵割面に局在する生殖細胞質により形成されると考えられた。また、PGCsの移動様式のほとんどにおいて、他魚種の知見との共通性が認められたものの、10体節期以降に背腹方向に胚体内に移動する様式は両魚種に特異的だった。

4) 生殖系列キメラを誘導するために、同種間あるいは異種間でPGCsを含む胞胚期の胚盤領域の移植を行なった。その結果、同種間では供与体の胚細胞がホスト内で分散し、供与体のPGCsはキメラ個体の生殖隆起へ到達した。異種間での移植では、ドナー胚細胞がホスト内で分散した場合には供与体PGCsはキメラ個体の生殖隆起へ到達した。供与体胚細胞がホスト内で細胞塊を形成した場合には、供与体PGCsはキメラ個体の生殖隆起へ到達しなかった。PGCsが移動できなかったのは、種の違いによる細胞凝集がPGCsの移動を阻害したものと考えられた。

5) 体細胞系列の細胞からPGCsを単離するために、ゼブラフィッシュ*nos1*の3'末端非翻訳領域(3'UTR)と緑色蛍光蛋白遺伝子(GFP)を接続したキメラ遺伝子のmRNAを様々な魚種の受精卵へ顕微注入した。その結果、用いた6魚種全てでPGCsがGFP蛍光で可視化された。このことより、ゼブラフィッシュ*nos1*の3'UTRの機能は、魚種間で広く保存されているものと考えられた。

6) 可視化したPGCsを10~20体節期に単離し、それぞれ同種の胞胚期胚盤への移植を行なった結果、移植PGCsは宿主の生殖隆起に達した。このことより、胚発生の長期にわたる一貫したPGCsの移動機構の存在が示唆された。

7) 可視化したPGCsを異種間で移植した結果、PGCsの移動機構は少なくともコイ目の魚種間では保存されているものの、系統的に遠い関係に有る場合は、移動様式あるいは発生速度の違いにより、供与体PGCsの移動が宿主の制御から逸脱するものと考えられた。

8) これらの結果より、生殖系列キメラの誘導には、発生速度が等しく、発生機構の類似した種間ではPGCsを含む胚断片を移植することで対応できるが、遠縁種ではPGCsのみの移植が適当であることが示された。

申請者による以上の成果は、魚類における生殖系列キメラを介した「借腹生

産」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。