

学 位 論 文 題 名

精子からの個体再生に向けた魚類の核  
—細胞質雑種に関する発生工学的研究

学位論文内容の要旨

近年の人間活動の活発化によって水産生物の生息する環境は急変し、多くの魚類が多様性を失い、絶滅の危機に瀕している。このような状況において、多種多様な遺伝資源の保存は必要不可欠である。遺伝資源を保存する方法として、精子や細胞の凍結保存がある。また、凍結した遺伝資源から個体を再生する技術として、精子を用いた雄性発生法、細胞を用いた核移植法、始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGCs）を用いた生殖系列キメラ法がある。雄性発生法と核移植法では卵細胞質を土台として胚発生を行うことによって、精子や細胞から一代で個体の再生を行うことができる。一方、生殖系列キメラ法は、PGCs を宿主生殖巣内で配偶子に分化させることによって、次世代において個体の再生を行うことができる。

絶滅危惧種や卵を得難い魚種から胚細胞や PGCs を確保するのは困難であるが、精子は、そのような魚種からも採取が容易で少量でも多様性が確保できるという点で有効な遺伝資源である。また精子は、同種の卵が無くとも異種間雄性発生法によって核 - 細胞質雑種として胚発生させることができる。その胚から機能的な PGCs が分化すれば、多様な魚種の精子から異種間雄性発生法を介して PGCs を作出することが可能となる。すなわち、精子から PGCs への変換が可能となれば、その PGCs を組み込んだ生殖系列キメラを介して配偶子を形成し次世代で個体を得るといふ、異種間雄性発生法と異種間生殖系列キメラ法を融合した新たな個体再生の方法が構築できる。しかしながら、そのためには核 - 細胞質雑種の胚発生能力や、PGCs の形成能力などを検証する必要がある。そこで本研究では、核 - 細胞質雑種の生物学的特性を明らかにすることを目的とし、キンギョの核とドジョウの細胞質から構成される核 - 細胞質雑種を用い

て解析を行った。

### 1. ドジョウの胚発生過程

核 - 細胞質雑種胚と比較するために、20°Cの培養温度下でのドジョウの胚発生過程を明らかにした。その結果、第1卵割は受精後1時間に認められ、受精後5.5時間に中期胞胚遷移を迎えた。受精後6時間には *gooseoid (gsc)* や *no tail (ntl)* の核からの遺伝子発現が観察された。受精後8時間にエピボリーが開始し、受精後10時間には囊胚形成が確認された。エピボリー終了後の受精後16~17時間から体節形成が開始し最終的には約50対の体節が形成された。受精後約48時間に孵化した。

### 2. ドジョウのPGCsの動態

PGCsの起源と動態を、生殖細胞特異的に発現する *vas* mRNAの局在を指標に調べた。mRNAは第1、第2、第3卵割溝に局在し、最大8個のシグナルが認められた。64細胞期以降には、細胞内にシグナルが観察された。これ以降、これらの *vas* 陽性細胞をPGCsとした。後期胞胚期以降にPGCsの増殖が観察された。エピボリー終了時には背側赤道領域から腹側植物極領域にかけて分布し、体節形成期には前方に位置する体節の両側部にクラスターを形成した。卵黄伸長以降、クラスターは卵黄伸長基部を越えて後方へ移動し、孵化期には卵黄伸長部の後半部に分布した。組織学的な解析から、受精後2日の孵化時にPGCsは上皮と胚体との間隙に、卵黄多核層に接して存在しており、受精後6日以降に予定生殖腺原基に到達した。

### 3. 紫外線照射による雄性発生誘起

ドジョウ卵核の遺伝的不活性化には0、25、50、75、100、125、150、175、200 mJ/cm<sup>2</sup>の紫外線照射区を設定した。半数体症候群を示す奇形は、75 mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射区において観察された。DNA量の測定では、75 mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射区で半数体が検出された。しかし、75 mJ/cm<sup>2</sup>照射区の主なDNA量を示すピークの変動係数は高い値を示しており、125 mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射区において通常受精胚と同等の値を示した。無核化処理胚における核の存否を組織学的に解析した結果、無核胚は150 mJ/cm<sup>2</sup>以上の照射区で主に観察された。

これらの結果より、ドジョウにおける卵核の遺伝的不活性化には 150~200 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線照射が必要であることが明らかとなった。

#### 4. キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種の生物学的特性

卵核が不活性化されたドジョウ卵とキンギョの精子の受精によって、キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種を作出し、その発生能力、胚細胞特性、PGCs 形成能力の解析を行った。

核 - 細胞質雑種胚は、胞胚期までは正常に発生が進行したが、囊胚形成が起らず、胚盤の崩壊が起こって死亡した。胞胚期での *gsc* と *ntl* の発現パターンは、細胞質提供種であるドジョウと同様の時空間的な発現をし、キンギョの核における mRNA の発現がドジョウの細胞質によって制御されていることが示唆された。キンギョでのこれらの遺伝子発現はドジョウより 2 時間遅いことが知られており、このような種間における発生速度の差が遺伝子発現のカスケードに異常を引き起こし、胚発生に異常が生じた可能性がある。

核 - 細胞質雑種の胚細胞をドナーとし細胞質由来種のドジョウ胚、あるいは核由来種のキンギョ胚を宿主としたキメラを胞胚期に作出し、細胞の生存能力、および発生能力を検討した。ドナー細胞は宿主をドジョウ胚とした時、囊胚期に宿主細胞と混合したが、体節形成期には凝集し小塊が形成された。宿主がキンギョ胚の場合、囊胚期には凝集塊を形成するものの、体節形成期では凝集塊からの少数のドナー細胞の分散が観察された。これらの孵化期のキメラ胚では、ドナー細胞が僅かしか認められず、発生過程で死亡している可能性が考えられた。これらの結果から、キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種は胚としては体節形成期の前に死亡するにもかかわらず、正常胚とキメラ化することによって、この核 - 細胞質雑種胚に由来する細胞は孵化期においても生存できることが示唆された。

*vas* シグナルは、通常受精胚が dome 期と胚環期に相当する時期に、この核 - 細胞質雑種胚でも検出できた。また、GFP-*nos1* 3'UTR mRNA を顕微注入したキンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種胚細胞を宿主のドジョウ胚に移植した時、仔魚期のキメラ胚に GFP 蛍光細胞が観察され、さらに予定生殖腺原基にドナー細胞由来の PGCs が見出された。これらの結果は、個体としては致死性であるこの核 - 細胞質雑種胚の PGCs が、正常な胚発生をする環境におかれると、

その生存性や PGCs としての機能を維持し、半数性であっても宿主の PGCs をガイドするシグナルに沿って予定生殖腺原基まで到達できることを示唆している。

以上の結果から、異種間雄性発生法を用いた核 - 細胞質雑種胚を介することにより、精子ゲノムを有する PGCs を誘起できる可能性が示された。しかし、誘起した核 - 細胞質雑種 PGCs は実際に宿主内で配偶子に分化できる能力を有するか否かは不明であり、今後、解析する必要がある。さらに、現時点では作出できる核 - 細胞質雑種の PGCs は半数性であり、半数体 PGCs から派生する生殖細胞の形成過程や機能を解明するとともに、半数体から二倍体への染色体の倍加技術を開発する必要がある。

# 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

## 精子からの個体再生に向けた魚類の核 －細胞質雑種に関する発生工学的研究

近年の遺伝子多様性の喪失に対処するため、配偶子や細胞等の凍結保存が行なわれている。生物生産の分野では、保存された細胞から個体を再生する技術の確立が必要である。水産学の分野では、個体を再生する手段として、精子では雄性発生法、細胞では核移植法、さらには始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: PGCs) を用いた生殖系列キメラ法がある。本研究では、胚細胞や PGCs の確保が困難な種の精子から、異種の卵細胞質を介して個体を再生する技術の確立を目指し、その過程で生じる核 - 細胞質雑種の生物学的特性を明らかにすることを目的とし、比較対象となるドジョウの正常発生の記載、技術的障壁である卵核の遺伝的不活性化の条件の検討を行なった後、これらの知見をもとにキンギョの核とドジョウの細胞質から構成される核 - 細胞質雑種を誘起して解析を行った。

- 1) キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種の生物学的特性の比較対象として、これまで細胞学的、分子生物学的に未記載のドジョウの正常発生過程を詳細に記載した。その結果、20℃の培養条件下で、受精後1時間に第1卵割、5.5時間後に中期胞胚遷移、6時間に核からの遺伝子発現が観察された。また受精後8時間にエピボリーを開始し、10時間に囊胚形成が起こった。さらに16-17時間から形成された体節は、最終的には50対生じ、受精後約48時間に孵化した。
- 2) ドジョウの PGCs の起源と動態は生殖細胞特異的に発現する *vas* mRNA の局在を指標に調べた。*vas* mRNA は、第1、第2、第3卵割溝の両端に局在し、最大8個のシグナルが認められた。PGCs の増殖は後期胞胚期以降に認められ、体節形成期には前方に位置する体節の両側部にクラスターを形成した。クラスターは後方へ移動し、孵化期には卵黄

伸長部の後半部に分布し、受精後 6 日以降に予定生殖腺原基に到達した。これらの PGCs の起源は、シグナル数および予定生殖腺原基の位置以外はゼブラフィッシュのそれと類似した。

3) 核細胞質雑種のドジョウ卵への紫外線照射による卵核の遺伝的不活性化の最適条件を、半数体症候群の形態を示す奇形の出現、雄性発生区での DNA 量および主な DNA 量を示すピークの変動係数、さらに無核化处理胚における核の存否から設定した。その結果、本種における卵核の遺伝的不活性化に最適な紫外線照射量は  $150\text{--}200\text{ mJ/cm}^2$  であった。

1-3) の結果を元に、キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種を作出するとともに、その発生能力、胚細胞特性、PGCs 形成能力の解析を行った。

4) 核 - 細胞質雑種胚は、胞胚期まで正常に発生したが、囊胚形成が起らず、胚盤の崩壊が起こって死亡した。*gsc* と *ntl* の発現パターンは、細胞質提供種であるドジョウと同様の時空間的な発現をし、キンギョの核がドジョウの細胞質によって制御されていることが示唆された。

5) 発生が停止するキンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種の胚細胞をドジョウ胚またはキンギョ胚へ移植し、細胞の生存能力および発生能力を検討した。核 - 細胞質雑種胚細胞は、宿主によりその分布形態が異なった。また、胚としては死亡する体節形成期を過ぎても宿主胚内で生き残ることが明らかにされた。

6) *vas* シグナルは、キンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種胚においても、通常受精胚が dome 期と胚環期に相当する時期において検出された。また、GFP-*nos1* 3'UTR mRNA を顕微注入した核 - 細胞質雑種の胚細胞をドジョウ胚に移植した時、仔魚期のキメラ胚に GFP 蛍光細胞が観察され、さらに予定生殖腺原基にドナー細胞由来の PGCs が見出された。これらの結果は、個体としては致死性であるキンギョ核 - ドジョウ細胞質雑種胚の PGCs が、正常な胚発生をする環境におかれると、その生存性や PGCs としての機能を維持し、宿主の PGCs をガイドするシグナルに沿って予定生殖腺原基まで到達することが可能であることが示された。

以上の結果から、異種間雄性発生法を用いて核 - 細胞質雑種胚を介することにより、精子から PGCs を誘起できる可能性が示された。

申請者による以上の成果は、魚類における異種間核細胞質雑種を介した個体再生技術の確立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、審査員一同は本論文が博士（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。