

学 位 論 文 題 名

Analyses of mitosis and meiosis in the medaka fish
(*Oryzias latipes*) using interspecific hybrids and
a newly developed *in vitro* male germ cell culture system

(種間雑種と新規雄性生殖細胞培養系を用いたメダカ体細胞分裂および
減数分裂の解析)

学位論文内容の要旨

メダカ (*Oryzias*) 属には多くの近縁種が存在し、それらを異種間で交配して得た雑種胚は、親種の組み合わせによって胚発生異常や生殖細胞形成異常による不妊等の様々な異常を生じる。これらの雑種を胚発生や生殖細胞形成の突然変異体とみなしてその異常の原因を解析することは、正常個体における制御機構を探ることのできる有用な実験系である。私は体細胞分裂および減数分裂の制御機構を調べるため、体細胞分裂に異常を起こすニホンメダカ (*Oryzias latipes*) とハブスメダカ (*O. hubbsi*) の雑種と減数分裂に異常を起こすニホンメダカとハイナメダカ (*O. curvinotus*) の雑種に着目し、研究を行った。

ニホンメダカとハブスメダカの雑種では初期発生の体細胞分裂が異常となり胚致死となる。この雑種の胚発生で起きる異常な体細胞分裂の原因を調べるため、まず染色体の挙動を調べた。雑種胚では胚発生の進行とともに約半数にまで染色体数が減少していることが明らかとなった。染色体分離像を観察すると雑種胚では第一分裂から染色体の一部が分裂後期に紡錘体の中央に残され、両極に移動しない染色体 (ラギング染色体) が認められた。染色体の脱落は胚発生を通して、中期胚変移の後も続いた。FISH 法によりニホンメダカの染色体とハブスメダカの染色体を染め分けて観察をしたところ、親種の組み合わせを問わずラギングを起こす染色体はハブスメダカ由来のものであることが分かった。次に染色体動態への関与が予想されるタンパク質の解析を行った。候補としてコヒーシン (SMC1 α , SMC3, Rad21), p53, Cdc20, Mad2, リン酸化ヒストン H3, α -チューブリン, γ -チューブリンを選び、免疫組織化学染色によりこれらタンパク質の発現パターンを雑種と野生種と比較した。リン酸化ヒストン H3 以外のタンパク質は雑種でも野生種と同様の発現パターンを示した。リン酸化ヒストン H3 は染色体凝縮のマーカーであり、野生種においては中期染色体においてシグナルが観察され、後期にはそのシグナルは消失していたが、雑種においては後期にラギング染色体上にシグナルが観察された。以上の結果から染色体のラギングはニホンメダカ染色体よりも遅れて染色体凝縮を起こしたハブスメダカ染色体が細胞終期の進行に取り残されるために起きることが示唆された。

ニホンメダカとハイナメダカの雑種雄では第一減数分裂における染色体の配置が異常

で、さらに細胞質分裂を欠いた減数分裂を経て4Cの精子様細胞が作られ不妊となる。この異常な減数分裂の原因分子を探るため、分裂時の染色体動態制御への関与が予想されるタンパク質の解析を行った。ニホンメダカとハブスメダカの雑種で解析を行ったタンパク質に加え、Aurora B、減数分裂に特異的なコヒーシンであるRec8を候補とし、免疫組織化学染色により、これらタンパク質の発現パターンを雑種と野生種で比較した。また、染色体と微小管の両極性結合や細胞質分裂の完了等に関わるとされる chromosomal passenger protein complex の構成要素であり、Aurora Bと協調して働く Inner centromere protein (INCENP)のメダカホモログを新たにクローニングし、その特異的抗体を作製し、これについても同様の解析を行った。その結果、雑種では野生種で見られる中期に整列した染色体上へのAurora BとINCENPの局在が見られないこと、明確な分裂後期像が観察されないこと、後期から終期にかけての細胞質の分裂予定面へのAurora BとINCENPの局在も観察されないことが明らかとなり、これらのことが雑種減数分裂の細胞質分裂異常に関わることが示唆された。

次に野生種の減数分裂でこれら分子の機能を解析することを考えたが、現在の技術では生殖細胞での遺伝子操作は不可能なため、減数分裂における遺伝子やタンパク質の機能解析は極めて困難である。そこで私は、メダカで減数分裂における遺伝子やタンパク質の機能解析を可能とするために、新規の実験系の確立を目指すこととした。メダカでは試験管内で精母細胞から機能的精子を形成させる培養系が確立している。この系を応用し、遺伝子操作を行った生殖細胞に減数分裂を起こさせることで、減数分裂における制御機構の解析が可能になることが期待される。私はまず、精母細胞に遺伝子導入を行うため、エレクトロポレーション法やリポソーム法などを種々の条件で検討した。その結果、精母細胞にはほとんど遺伝子を導入することができないが、減数分裂に入る前の精原細胞には遺伝子導入が可能であることが分かった。しかし精巣中の精原細胞の割合は低く、また現在の培養系では精原細胞の増殖および精子への分化を誘起できない。そこで次に培養系の改良を試みた。精巣中で精原細胞はセルトリ細胞とよばれる支持細胞に囲まれて存在しており、精原細胞の増殖と分化はホルモンや成長因子により活性化したセルトリ細胞によって制御されている。そこで、精原細胞とセルトリ細胞の共培養を行った。精原細胞をセルトリ細胞上で培養し、さらにコイ血清および生殖腺刺激ホルモンを添加することにより精原細胞の増殖、精子への分化が観察された。また、精原細胞の精子への分化は魚類特有の性ステロイドホルモンである 17α , 20β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オンと11-ケトテストステロンを添加することでより促進されることが分かった。培養で作られた精子を用いて人工媒精を行うと受精個体を得られ、培養系で正常な精子形成が起こり機能的精子が作られていることが確認された。すなわち、試験管内で精原細胞から精子までの精子形成過程の全てを再現することが可能な新規培養系の開発に成功した。遺伝子導入を行った精原細胞からも正常な精子形成が観察されたことから、この新規培養系により減数分裂での機能解析が可能であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 正 兼
副 査 教 授 清 水 隆
副 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 助 教 小 谷 友 也

学位論文題名

Analyses of mitosis and meiosis in the medaka fish
(*Oryzias latipes*) using interspecific hybrids and
a newly developed *in vitro* male germ cell culture system

(種間雑種と新規雄性生殖細胞培養系を用いたメダカ体細胞分裂および
減数分裂の解析)

細胞分裂（体細胞分裂と減数分裂）の制御機構は生命科学における基本命題の一つで、研究が盛んに行われているが、分子細胞レベルでの理解は未だ不十分である。特に脊椎動物における理解が遅れている。その原因の一つは適切な実験系の欠如にある。メダカ (*Oryzias*) 属には多くの近縁種が存在し、それらを異種間で交配して得た雑種は、親種の組み合わせによって胚発生異常や生殖細胞形成異常を起こし、次世代を残せない。これらの雑種を胚発生や生殖細胞形成の変異体とみなし、その異常原因を解析することで、正常個体における制御機構を理解できると期待される。本論文は、ニホンメダカ (*Oryzias latipes*) とハブスメダカ (*O. hubbsi*) の雑種及びニホンメダカとハイナンメダカ (*O. curvinotus*) の雑種を用い、体細胞分裂および減数分裂の制御機構を調べたものである。

ニホンメダカとハブスメダカの雑種では初期発生の体細胞分裂が異常となり、胚致死となる。著者はまず、雑種胚では発生の進行とともに約半分にまで染色体数が減少すること、また、この原因が、染色体が分裂後期に紡錘体の中央に取り残され両極に移動しないため（染色体ラギング）であることを明らかにした。染色体の脱落は胚発生を通して中期胞胚変移の後も続き、親の組み合わせに関わらず、ハブスメダカ由来の染色体が脱落することも明らかにした。次に著者は、染色体動態への関与が予想されるタンパク質としてコヒーシン (SMC1 α , SMC3, Rad21), p53, Cdc20, Mad2, リン酸化ヒストン H3, α -チューブリン, γ -チューブリンの発現パターンを雑種と野生種で比較し、染色体凝縮マーカーであるリン酸化ヒストン H3 のみが雑種と野生種で異なる発現パターンを示すことを見いだ

した。すなわち、野生種においては中期染色体においてリン酸化ヒストン H3 のシグナルが観察され、後期には消失したが、雑種においては後期にラギング染色体上にシグナルが観察された。以上の結果から、ニホンメダカ染色体よりも遅れて染色体凝縮を起こしたハブスメダカ染色体が、細胞周期の進行に取り残されるためにラギングを起こすことが示唆された。

ニホンメダカとハイナンメダカの雑種雄では第一減数分裂における染色体の配置が異常で、細胞質分裂を欠いた減数分裂を経て4Cの精子様細胞が作られ不妊となる。この異常な減数分裂の原因分子を探るため、分裂時の染色体動態制御への関与が予想されるタンパク質の解析を行った。その結果、雑種では野生種で見られる中期に整列した染色体上への Aurora B と Inner centromere protein (INCENP) の局在が見られないこと、明確な分裂後期像が観察されないこと、後期から終期にかけての細胞質の分裂予定面への Aurora B と INCENP の局在も観察されないことが判明し、これらが雑種減数分裂の細胞質分裂異常に関わることが示唆された。

著者は、メダカの減数分裂において遺伝子やタンパク質の機能解析を可能とするため、新規の実験系の確立を目指した。著者はまず、種々の条件下でエレクトロポレーション法やリポソーム法などを検討し、精母細胞には遺伝子を導入することができないが、減数分裂に入る前の精原細胞には遺伝子導入が可能であることを発見した。そこで次に、精原細胞から精子を作る培養系の確立を試みた。精巣中で精原細胞はセルトリ細胞とよばれる支持細胞に囲まれて存在し、精原細胞の増殖と分化はホルモンや成長因子により活性化したセルトリ細胞によって制御されているため、精原細胞とセルトリ細胞の共培養を行った。精原細胞をセルトリ細胞上で培養し、さらにコイ血清および生殖腺刺激ホルモンを添加することにより、精原細胞の増殖と精子への分化が観察された。また、精原細胞の精子への分化は、魚類特有の性ステロイドホルモンを添加することで、より促進されることが分かった。培養系で作られた精子は受精能を持つことが確認された。すなわち、試験管内で精原細胞から機能的精子までの精子形成過程の全てを再現することが可能な新規培養系の開発に成功した。遺伝子導入を行った精原細胞からも正常な精子形成が観察されたことから、この培養系により、減数分裂での遺伝子やタンパク質の機能解析が可能であると考えられる。

これを要するに、著者はメダカ雑種の特性を活用し、体細胞分裂と減数分裂の制御機構について新知見を得た。さらに減数分裂における遺伝子やタンパク質の機能解析を可能にする新規の実験系を確立した。これらの成果は生命科学分野における基本原理の理解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（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。