



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ゼブラフィッシュの胚盤移植による生殖系列キメラの誘導
Author(s)	長井, 輝美; 大谷, 哲; 斎藤, 大樹 他
Citation	日本水産学会誌, 71(1), 1-9 https://doi.org/10.2331/suisan.71.1
Issue Date	2005
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35176
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	arai-98.pdf



ゼブラフィッシュの胚盤移植による生殖系列キメラの誘導

長井輝美,^{1,a*} 大谷 哲,¹ 斎藤大樹,¹ 前川真吾^{2,b}
井上邦夫,^{2,c} 荒井克俊,¹ 山羽悦郎³

(2004年3月5日受付, 2004年7月7日受理)

¹北海道大学大学院水産科学研究科育種生物学講座

²奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分子発生生物学講座

³北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所

Germ-line chimera produced by blastoderm transplantation in zebrafish

TERUMI NAGAI,^{1,a*} SATOSHI OTANI,¹ TAIJU SAITO,¹ SHINGO MAEGAWA,^{2,b}
KUNIO INOUE,^{2,c} KATSUTOSHI ARAI¹ AND ETSURO YAMAHA³

¹Laboratory of Breeding Science, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, ²Laboratory of Molecular and Developmental Biology, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma 630-0101, ³Nanae Fresh Water Laboratory, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, Sakura, Nanae, Kamada, Hokkaido 041-1105

To elucidate the effects of blastoderm graft for chimeric-fish production on further development, transplantations of upper, lower or entire part of blastoderm were performed onto the animal part of host embryos during the blastula stage in zebrafish. In the case of upper, all resultant chimeric embryos developed normally, while in the lower part, many acephalic embryos appeared. When the entire blastoderm was transplanted, many resultant embryos showed normal phenotype with extra cell-mass, while a few had double axis. *vas* mRNA, one of the markers of PGCs, also kept the expressions in both donor and recipient blastomeres in transplantation of the entire blastoderm. Donor PGCs were frequently detected at germinal anlagen in histological sections of 6-day larvae developed from transplantations of lower and entire blastoderm, but seldom in those of the upper part. These results might suggest that graft transplantation was effective for production of germ-line chimera, but sometimes caused un-regulatory differentiation of graft cells under the community effect.

キーワード: PGCs, 始原生殖細胞, 生殖系列キメラ, ゼブラフィッシュ, 胚盤移植

キメラ動物は、細胞間相互作用を調べる上で重要な実験系であり、実験発生学分野では、広く作出されてきた。このなかで遺伝的起源の異なる生殖細胞を生殖巣に含むキメラ個体は「生殖系列キメラ」と呼ばれる。生殖系列キメラ個体からは、遺伝的に異なる系統の個体の配偶子が作りだされることが期待できる。植物におけるキメラともいえる「接ぎ木」と呼ばれる手法は、増殖を目的とする植物体の一部である枝や芽などを切り取って他の植物体に接ぎあわせ、独立した新しい個体に養成する

繁殖法であり、効率的に有用な形質を持った個体を得ることができる。この技術の水産の分野に応用することができれば、効率のよい育種が可能になると考えられる。このため、水産の分野では、飼育しづらい種の配偶子を、飼育しやすい種を宿主とした生殖系列キメラ個体を介して得る「借り腹生産」の試みがなされている。¹⁾

生殖系列キメラは、将来生殖細胞に分化する細胞である始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGCs) を宿主となる胚へ移植し、宿主の生殖腺へ取り込ませることに

* Tel : 81-76-445-6642. Fax : 81-76-445-6549. Email : teru@sci.toyama-u.ac.jp

^a 現所属: 富山大学理学部生物学科生体制御学講座 (Laboratory of Regulatory Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Toyama University, Gofuku, Toyama, Toyama 930-8555, Japan)

^b 現所属: ペンシルバニア大学生物学科 (Department of Biology, University of Pennsylvania, PA 19104, USA)

^c 現所属: 神戸大学大学院理学研究科 (Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe, 675-8501, Japan)

よって作出される。ニジマスでは、遺伝子組み換えにより PGCs が可視化された系統よりこれを採取し、他個体へ移植する技術が確立している。²⁾ 視覚的に区別できていない魚種では、PGCs を含む胚の領域を体細胞とともに他胚へ移植して生殖系列キメラを作出する。実際には、胚細胞が分化多能性を有し、宿主への移植作業が容易である胞胚期の胚で移植が行なわれてきた。³⁻⁶⁾ しかしながら、この時期の胚の PGCs は体細胞系列の細胞とは区別されないことから、宿主へ PGCs が必ず移植されるとは限らない。したがって、作成したキメラ個体のうち、ドナー系統の配偶子を形成する個体の出現率は低かった。そこで、ドナー系統の PGCs を確実に宿主胚へ移植する技術を確認する必要がある。

キンギョにおいては、胞胚期の胚盤下部に PGCs の founder となる細胞が分布し、その後の形態形成過程で将来の生殖腺である生殖隆起へと移動することが明らかにされている。^{7,8)} また、胞胚期の胚盤全体、あるいは部分的な断片を作成し、他胚に移植しても正常な形態形成を行なうことが示されている。^{9,10)} さらに、キンギョ胞胚の胚盤に、雌性発生する 3 倍体のフナ胚の PGCs が分布する胚盤下部を移植したキメラ個体を作成し次世代を得たところ、実験に用いた 5 個体全てよりフナとキンギョの子孫が得られている。¹¹⁾ このことから、胚盤移植により確実に生殖系列キメラが作成されたことが示された。今後、この方法を生殖系列キメラの作成に応用していくためには、このような大規模な胚断片移植が他の種で可能であることを明らかにする必要がある。

魚類の胚発生の過程における細胞の分化には、胚盤の下部に位置する卵黄細胞が大きな役割を果たしていることがキンギョやゼブラフィッシュで明らかにされている。^{10,12)} 卵黄細胞は、胚盤の細胞における *no tail (ntl)* や *goosecoid (gsc)* 等の遺伝子の発現を誘導し、内中胚葉を分化させる。このような誘導を受けている細胞でも、分離し単独で他胚に移植した場合、その細胞の予定運命を変えることは可能である。¹³⁾ 一方、集団で移植した場合、その発生運命を変えないことが集団効果 (community effect) として知られている。¹⁴⁾ このため、大規模な胚断片の移植では、その結果得られた移植胚の発生に影響を与えることが懸念される。

水産育種の分野に胚盤移植法を適用し、生殖系列キメラの作出を目指してゆくためには、基礎生物学的な研究を重ねていくことが必須である。しかしながら、養殖対象となる魚種は一般に生活史が長く、このような研究には不向きである。ゼブラフィッシュは、通年産卵性で世代交代が早く多数の卵を産むこと、また胚が透明であるため形態形成の観察が容易であることから、基礎研究を行う上で優れている。また、多くの突然変異体が誘起され維持されると共に、発生に関する様々な遺伝子の同定

が行われている。加えて、生殖細胞形成に関与する因子の一部も解明されている。¹⁵⁾

そこで本研究では、ゼブラフィッシュを材料として用い、キンギョにおいて生殖系列キメラ誘導に有効であることが示されている胚盤移植を試み、胚盤移植の発生への影響を明らかにすると共に、生殖系列キメラの作出への有効性を検討した。

試料および方法

供試魚の飼育、受精卵の採取、卵膜除去と培養 ゼブラフィッシュ *wild* 系統は、北海道大学大学院水産科学研究科の水槽センター内で、水温約 29°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の環境で飼育した。自然産卵により得られた受精卵を材料として用いた。得られた受精卵より、0.1% トリプシン (DIFCO) および 0.4% の尿素を含む淡水産硬骨魚類用リンゲル液 (128 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂) に少量のアクチナーゼ E (科研製薬) を添加した溶液によって卵膜を除去した。卵膜除去卵は、受精後 1 日までは、0.01% ペニシリン、0.01% ストレプトマイシン、および 1.6% ニワトリ卵白を含む淡水産硬骨魚類用リンゲル液 (一次培養液) 中で培養した。受精後 1 日以降は、0.01% ペニシリンと 0.01% ストレプトマイシンを含む淡水産硬骨魚類用リンゲル液 (二次培養液) を満たした 96 穴プレート (Greiner) 中で、各胚を分離して飼育した。培養プレートは、29°C のインキュベーター内で保温した。胚の発生段階は、Kimmel *et al.*¹⁶⁾ に従った。

細胞の標識 胚盤の細胞質への標識は、Ho and Kane¹⁷⁾ に従い行った。自然産卵により得た 1 から 8 細胞期の胚に、5% biotin-Dextran (Sigma) と 5% FITC-Dextran (Sigma) を含む 0.2 M の KCl 溶液を顕微注入することにより行った。標識色素を注入された胚由来の細胞は、FITC を指標として蛍光顕微鏡下で区別することが可能であり、組織化学的手法により biotin を有する細胞として区別できる。標識された胚は、胞胚期になるまで培養し、胚盤移植においてドナー胚として用いられた。

胚盤移植 上記により標識された胚をドナーとして、未標識の胚をレシピエントとして、胚盤移植を行った。中期胞胚期遷移 (MBT) 前後の胞胚期に、ドナー胚盤の上半分、下半分、または全てを、動物-植物極の方向性を変えずに同時期の未標識胚の動物極へ移植した (Fig. 1)。胚細胞の切除および移植は、ガラスピペットの先端を引き延ばし、ガラスウールを接着したガラスウール針を用いて行った。ガラスウール針により切除されたドナー胚盤を、動物極側細胞を僅かに切除し、接着しやすくした未標識のレシピエントの胚盤へ移植した。手術の作業は、すべて約 1% の寒天でコートしたガラ

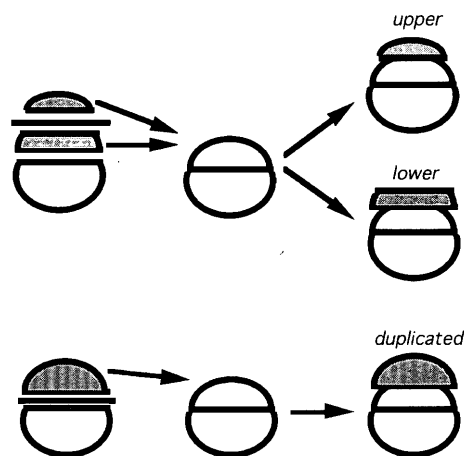


Fig. 1 Schematic representation of blastoderm transplantation from labeled embryo to unlabeled one at the blastula stage. Upper half (*upper*), lower half (*lower*), and whole labeled blastoderm (*duplicated*) were transplanted onto the unlabeled recipient embryo, respectively.

スシャーレ内の1次培養液中で行った。胚盤の上半分、下半分、または全てを移植した手術胚は、それぞれ、胚盤上部重複胚 (*upper*)、胚盤下部重複胚 (*lower*)、および重複胚 (*duplicated*) とした。手術胚の培養は、卵膜除去胚の培養に準じた。*duplicated* 胚は、MBTの前後に分けて培養した。胚盤移植後の胚細胞の混合は、30% エピボリー期 (受精後4.7時間: 4.7 hpf) から75% エピボリー期 (8 hpf) に蛍光顕微鏡下 (Olympus BH-RFL) で観察した。

手術胚における形態形成の評価 手術胚は、外部形態より、Mizuno *et al.*¹⁸⁾ に準じて、背側前方指数 (Dorso-Anterior Index: DAI) による背腹軸の形成能力の評価によって行った。すなわち、DAI-1: 明瞭な背腹軸構造を持たず、回転相称を呈する、DAI-2: 背腹軸構造を持つが、明瞭な頭部構造を持たない、DAI-3: 頭部に目を1つしか持たない、DAI-4: 左右の目が頭部先端で融合しており、間脳、端脳を持たない、DAI-5: 正常な頭部、体幹構造を有する形態である。さらに本研究では、上記の分類に属さない2軸胚を2-Axis、および不規則な奇形個体を *other* として分類した。

Whole mount *in situ* hybridization (WM-ISH) WM-ISH は、Yoon *et al.*¹⁹⁾ に準じて行った。WM-ISH に供するために、手術胚と卵膜を除去しただけの対照胚は、4% パラフォルムアルデヒドを含む phosphate-buffered saline (PBS) により、適宜固定した。RNA プロブは、*vas* ではゼブラフィッシュの cDNA より得られた 3'UTR 領域の 0.4k 断片を、*gsc* および *ntl* ではゼブラフィッシュの cDNA より得られた全長を用いた。プロブの標識は UTP-11 digoxigenin (DIG) または、

Fluorescein Isothiocyanate (FITC) で行った。RNA プロブは *in vitro* transcription による合成後、Probe-Quant G-50 Micro columns (Amasham Bioscience) により精製した。

WM-ISH の前に、Proteinase K で胚を処理した。後期胞胚期 (4 hpf) から75% エピボリー期 (8 hpf) の胚に対して、10 mg/ml の終濃度の Proteinase K を加えた PBST (PBS+0.1% Tween 20) で5分間処理した。プレハイブリダイゼーションは60°Cで1時間、ハイブリダイゼーションは60°Cで16時間以上行った。抗体反応は終濃度 1/8000 の anti-digoxigenin-AP fab fragment (Roche) と終濃度 1/250 の anti-FITC-POD fab fragment (Roche) を用いた。発色基質は、anti-digoxigenin-AP fab fragment 用として Nitroblue Tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate (NBT/BCIP) を、anti-FITC-POD fab fragment 用として、diaminobenzidine (DAB) を用いた。²⁰⁾

プロブの FITC、および FITC-Dextran の検出は、終濃度 1/500 の anti-FITC-POD fab fragment (Roche) を用いた。抗体反応は4時間以上行った。発色基質は DAB を用いた。

組織学的観察と標識細胞の検出 組織学的観察に供するため、手術胚および卵膜除去しただけの対照胚を、ブアン氏液により経時的に固定した。2時間の固定の後、80% エタノール液に置換し、保存した。固定試料は、常法によりブチルアルコールシリーズにより脱水し、パラフィンに包埋した。その後、前後軸を横断する 8 μ m の連続切片を作製した。作製した連続切片は、卵白グリセリン水溶液によりスライドガラスに貼付し、十分な乾燥の後、ヘマトキシリン-エオシンにより二重染色し、PGCsの組織学的観察および計数を行った。PGCsは、Nagai *et al.*²¹⁾ の組織学的な形態にしたがって判定した。

移植胚盤由来の細胞の分布を調べるための切片は、上記同様に作製し、0.05% poly-L-lysine 水溶液によりスライドガラスへ貼付した。Biotin-Dextran の検出にはヒストファイン SAB-PO (M) キット (ニチレイ) を用いた。

統計解析 *duplicated* 胚において胚盤同士の混合状態と奇形の出現の関連性を調べるために、 χ^2 検定により有意差があるか否かを確かめた。

結 果

胚盤移植胚における形態形成 移植直後、ドナーとレシピエント胚盤が2つ重なった形状を示した手術胚は、1時間程度で正常胚と変わらない形状を回復した (Fig. 2)。胚盤移植の結果得られた胚は、胚細胞の体積が増加し、エピボリー運動の若干の遅滞、および胚体の肥厚 (Fig. 2D) が観察された。30% エピボリー期 (4.7 hpf)

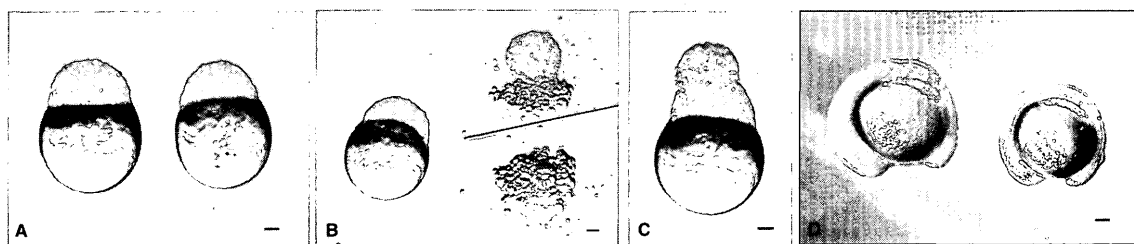


Fig. 2 Process of blastoderm transplantation in duplicated embryos. (A) Donor and recipient embryos at the mid-blastula stage. (B) Removing whole blastoderm from one embryo with glass needle. (C) Blastoderm transplanted embryo at a few minutes after operation. (D) *Duplicated* (left) and control embryos at the 12-somite stage. Scale bars indicate 100 μm .

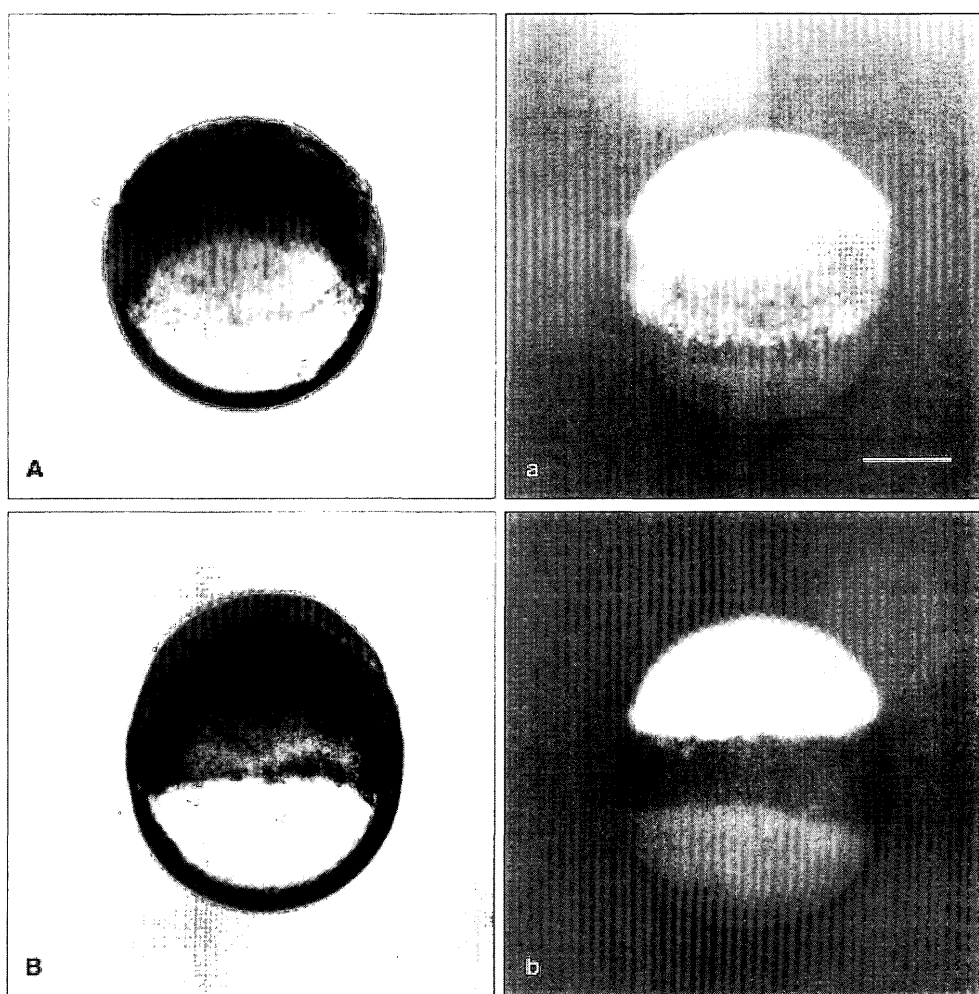


Fig. 3 Blastomere mixing between donor and recipient in duplicated embryos at the shield stage. (A), (a) Embryo shows extensive mixing of blastodermal cells between donor and recipient. (B), (b) Embryo shows less mixing of blastodermal cells between donor and recipient. (a) and (b) are fluorescence view of (A) and (B), respectively. Scale bar indicates 100 μm .

以降においては、手術胚においてドナー胚盤とレシピエント胚盤の混合が起こる個体と、ほとんど起こらない個体が観察された (Fig. 3)。これらドナー胚盤とレシピエント胚盤の混合の有無と、奇形胚の出現の間には関連性は認められなかった ($p > 0.05$)。

3種類の移植胚のそれぞれについて、胚盤移植は生残

率に大きな影響を与えなかったが、背腹軸の異常や2軸などいくつかの奇形が観察された (Fig. 4A, B)。孵化期 (48 hpf) の重複胚 (*duplicated*) で、約2/3の個体が正常な背側前方形態 (DAI-5) を示したが、体幹部に細胞塊を有する個体が約半数出現した (Fig. 4B : DAI-5 abnormal)。このような細胞塊を持つ個体や2軸

胚は、中期胞胚期 (3 hpf) 以前 (Fig. 4B, before MBT) に手術されたものより、それ以後 (Fig. 4B, after MBT) に手術されたものに高い割合で観察された。下部胚盤重複胚 (*lower*) においては、DAI-2 の外部形態を呈する個体が DAI-5 の外部形態を呈する個体よりも多く得られた (Fig. 4A)。一方、上部胚盤重複胚 (*upper*) においては、全ての個体の外部形態は正常 (DAI-5) で、こ

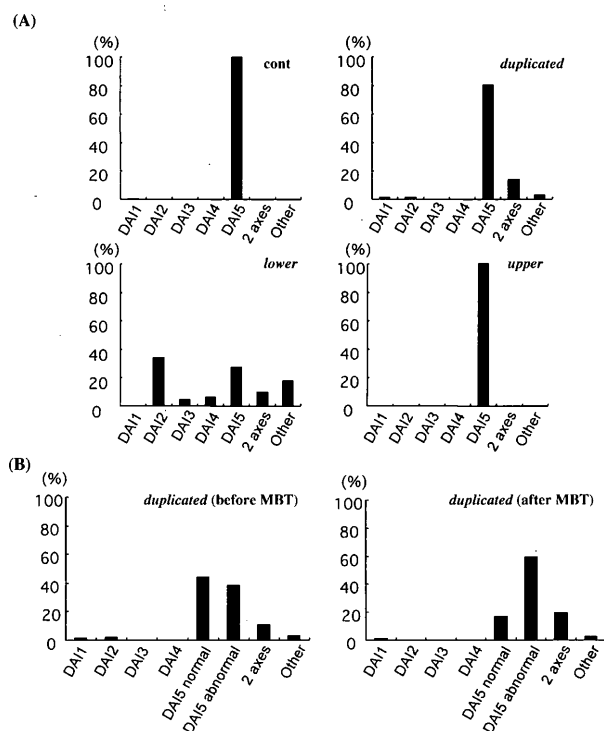


Fig. 4 The frequency of DAI (dorso-anterior index) 1-5 embryos developed from blastoderm-transplanted embryos. (A) The frequency of DAI 1-5 embryos developed from three kinds of operated embryos at the 48 hpf (hatching period). (B) The detailed frequency of the *duplicated* group in (A). The embryos in the *duplicated* group were divided into two groups by operation period before or after the mid-blastula stage. DAI-5 embryos without or with extra cell mass in each divided group were further classified into normal and abnormal, respectively. DAI 1, rotational symmetry. DAI 2, truncated head. DAI 3, Cyclops. DAI 4, joined eye. DAI 5, normal.

の割合はコントロール群と等しかった (Fig. 4A)。

初期オーガナイザーのマーカである *gsc*²²⁾ の発現を、胚盤の再形成直後の重複胚で調べた。その結果、22 個体中 8 個体 (36.4%) の移植胚盤に *gsc* の発現が認められた (Table 1)。また、75% エピボリー期 (8 hpf) に、内中胚葉マーカである *ntl*²³⁾ を用いて WM-ISH を行ったところ、23 個体中 8 個体 (34.8%) に異所的な *ntl* の発現が認められた (Table 1)。しかしながら、異所的な *ntl* の発現は環状を呈さず狭い範囲に限定されていた。また、異所的な *ntl* の出現頻度は、手術を行った時期が MBT の前でも後でも変わらなかった (Table 1)。

手術胚における移植胚盤由来の PGCs *duplicated* 胚において、胚盤の移植と同時に PGCs が移植されたかを確認するため、ビオチン標識された胚盤を未標識胚の胚盤に移植し、傷の修復後 *vas* に対する WM-ISH を行った。その結果、PGCs は移植胚盤およびレシピエント胚盤の周縁部に確認された (Fig. 5)。

DAI-5 の形態を呈した手術胚を受精後 6 日目に固定し、組織切片を作成して PGCs の由来を明らかにした。組織化学的な標識細胞の検出により、3 種類の手術胚のそれぞれにおいて、生殖隆起にビオチン標識および未標識の PGCs が確認された (Fig. 6E, F, Table 2)。*duplicated*、および *lower* 胚においては全てに、*upper* 胚においては 8 個体中 4 個体 (50%) に標識された PGCs が確認された。しかしながら、*upper* 胚で確認された標識 PGCs の数は、*lower* や *duplicated* 胚と比較して少なかった。一方、移植胚盤由来の細胞は、受精後 6 日目の手術胚において、上皮組織、神経組織、前腎管等、様々な組織および器官に分化していることが確認された (Fig. 6)。また、移植された胚盤に由来するほとんどの細胞が、上皮組織や神経組織のような外胚葉性の組織に分化している個体も観察された。このような個体においても移植胚盤由来の PGCs は生殖隆起に確認された。

考 察

胚盤移植手術の形態形成への影響 本実験では、手術個体の多くが、背方構造や頭部構造の形態形成が正常で

Table 1 Frequency of embryos with ectopic expression of *gsc* and *ntl* in *duplicated*

Operation stage	No. of embryos analyzed		Embryos with ectopic expressions (%)	
	<i>gsc</i> (restored)* ¹	<i>ntl</i> (75% epiboly)* ²	<i>gsc</i> (restored)* ¹	<i>ntl</i> (75% epiboly)* ²
before MBT	11	8	4(36.4%)	2(25.0%)
after MBT	11	15	4(36.4%)	6(40.0%)
(Total)	22	23	8(36.4%)	8(34.8%)

*¹ *gsc* expression was detected just after restoration from blastoderm transplantation.

*² *ntl* expression was detected at 75% epiboly stage in resultant embryos from blastoderm transplantation.

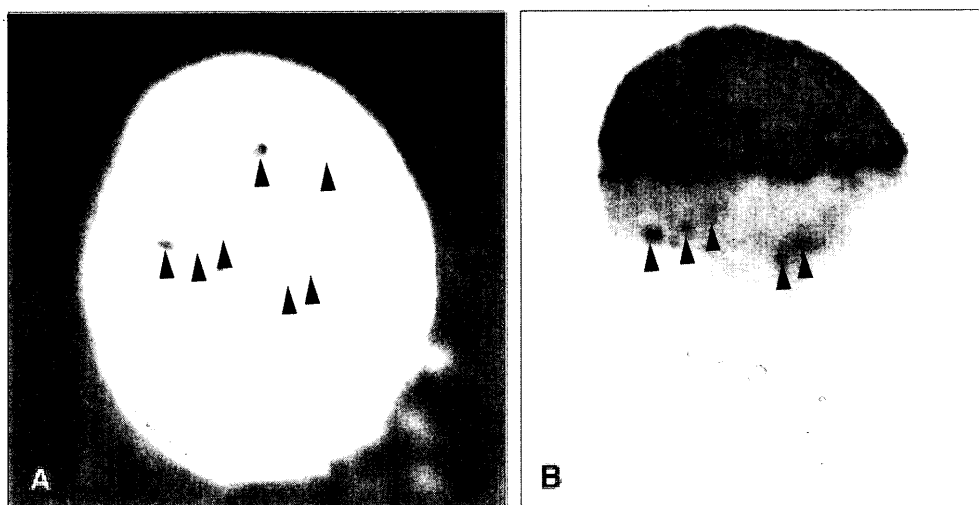


Fig. 5 The distribution of *vas* positive cells in the *duplicated* embryo. (A) (B) *vas* positive cells (dots) are located in the lower part of host and donor blastoderm. (B) is obtained by biotin specific staining of (A). Arrowheads indicate *vas* positive cells.

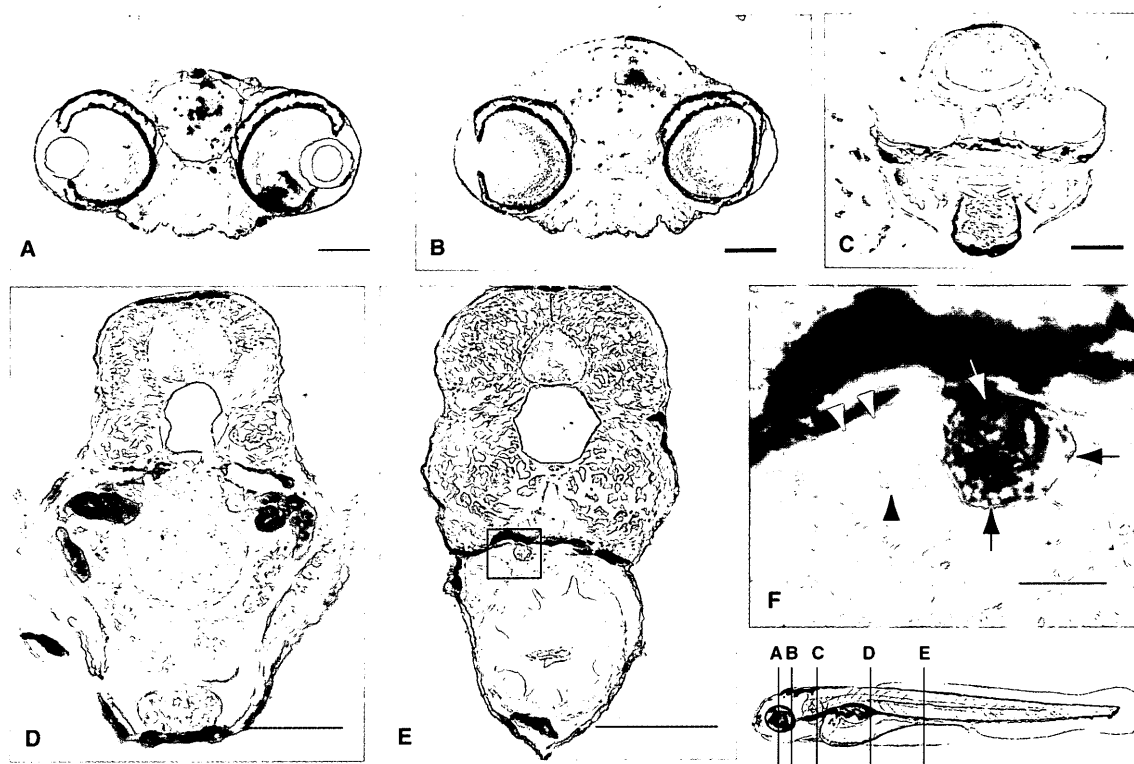


Fig. 6 The histological distribution of biotin labeled donor cells in the *duplicated* DAI-5 embryo at the 6 dpf. (A)-(E) correspond to the transverse sections at lines A-E on the illustration of the larva, respectively. (F) Higher magnification of rectangle in (E). (A-E) Most labeled cells differentiate into tissues derived from ectoderm. Pronephric duct and blood also contain labeled cells. (E) Three labeled and unlabeled PGCs are located in gonadal anlage. Dark brown areas indicate cells derived from donor blastoderm. Scale bars indicate 100 μm in (A)-(E), and 10 μm in (F). Arrows indicate labeled PGCs. Arrowheads indicate unlabeled PGCs.

あることを示す DAI-5 を呈し、それらの中で移植割球が様々な細胞系列に分化していた。特に *upper* 胚では、全てが対照胚と同様の形態を示した。ゼブラフィッシュ

では、初期囊胚期までの胚細胞は分化多能性を持つことが示されている。¹³⁾ これらの DAI-5 胚では、胞胚期に移植された胚盤細胞が、宿主の形態形成過程に組み込ま

Table 2 Number of labeled PGCs in three kinds of operated embryos at the 144 hpf

The type of experiment	Individual No.	No. total PGCs	No. of labelled PGCs
<i>upper</i>	1	15	1
	2	29	0
	3	26	2
	4	36	1
	5	20	0
	6	19	4
	7	43	0
	8	20	0
<i>lower</i>	1	31	2
	2	44	14
	3	73	36
	4	28	11
<i>duplicated</i>	1	44	0
	2	44	14
	3	50	15
	4	49	21
	5	37	8
	6	33	1
	7	36	8

れ、その分化多能性から調節されたことを意味するものと考えられる。

一方、*lower* や *duplicated* 胚では、いくつかの異常形態をもつ個体が出現した。*duplicated* 胚においては、2軸胚の出現頻度が高く（約10%）、この頻度は、MBT以前より以降の方が高かった。また、外部形態がDAI-5に分類されるものの中に、体幹に余分な細胞塊を持つ個体が出現し、その出現頻度もMBT後の手術個体の方が高かった。2軸胚の出現は、キンギョにおける胚盤の移植実験でも報告されており、既に背側の特殊化、あるいは細胞運命の拘束が起こっている細胞群が移植片に存在し、その発生運命に従って2次軸を形成したものと解釈されている。¹⁰⁾ 本研究においても、*duplicated* 胚で、軸誘導のマーカである *gsc* の異所的な発現が確認された。*gsc* mRNA の注入により2軸胚が誘導されることが知られており、²²⁾ ドナー胚盤に *gsc* の発現が維持された結果、*duplicated* 胚に2次軸が生み出されたものと考えられる。また、75% エピボリー期（8 hpf）の *duplicated* 胚には *gsc* と同頻度で、中胚葉細胞の分布を示す *ntl* の異所的な発現が観察された。*ntl* は内中胚葉域で発現を開始し、エピボリーの過程では、はじめ将来の脊索域に、その後に尾芽に発現することが知られている。²³⁾ *duplicated* 胚のドナー胚盤側で部分的に *ntl* の発現細胞が維持された結果、この部分が別の発生運命を持ち体幹部での余分な細胞塊になった可能性がある。アフリカツメガエルにおいては、筋肉や脊索などの中胚葉細

胞において、少数の分散された細胞が移植された場合には、発生運命が変化するのに対し、細胞塊として移植された場合、以前の発生運命が継続することに関して、集団効果という概念が提案されている。¹⁴⁾ 今回の胚盤の移植は後者に相当し、集団効果が働くことによって、一部の細胞が移植以前の発生運命を維持したため、2軸あるいは余分な細胞塊が形成されたと捉えることができるかもしれない。したがって、このような‘集団効果’がゼブラフィッシュにおいても働いていたとすると、今回の胚盤移植の結果と細胞移植の結果は必ずしも矛盾しないと考えられた。

本研究では、*duplicated*, *lower* 胚とも胚盤の下部が移植されている。しかしながら、結果として発生した個体の示す形態には両者で明らかな違いがあった。すなわち、*duplicated* 胚においては、体幹に細胞塊をもつ個体が約半数含まれてはいるもののDAI-5に分類される個体が多いのに対し、*lower* 胚においては、頭部構造をもたないDAI-2の個体が、そのほかの形態を示すものに比較して高頻度で出現した。Kimmel *et al.*²⁴⁾ は、50% エピボリー期（5.3 hpf）の胚細胞の位置とその後の胚細胞の分化から、予定運命図を作製している。この予定運命図に従えば、胚盤の上部は胚体の頭部などの外胚葉性の組織を形成する領域である。今回、*duplicate* 胚の50% エピボリー期（5.3 hpf）に、移植胚盤とレシピエント胚盤の混合が観察されている。しかし、移植胚盤の大部分は胚の動物極側を占めていた。それゆえ、それぞれの実験で移植された胚盤細胞は、頭部をはじめとした外胚葉組織を構成することになると予想される。一方、胚盤の周縁部の少量の細胞を動物極へ移植したとき、この移植胚では胚の頭部形成が欠損し、後脳構造が重複することが知られている。²⁵⁾ 今回の実験で胚盤下部が移植された場合、これと同等の現象が引き起こされたことが予想される。*duplicated* 胚の75% エピボリー期（8 hpf）に *ntl* の発現が維持されていたことは、胚盤下部重複胚でも *ntl* の発現が維持された胚があることを意味する。この細胞群が胚盤下部重複胚の動物極に存在することで、頭部形態が欠損したと考えられる。実際にこのような過程で頭部構造の欠損が起こったかを明らかにするためには、後脳域のマーカ遺伝子の発現等を胚盤下部重複胚で調べる必要がある。

胚盤移植による生殖系列キメラの作出 胚盤全体または胚盤下部を移植した胚から発生した多くの個体（10/11）の生殖隆起にドナー胚盤に由来するPGCsが認められ、本種での生殖系列キメラ個体の作出に、胚盤移植法が有効であることが明らかとなった。胚盤移植技術による生殖系列キメラへの寄与は、キンギョとフナにおける胞胚期の胚盤下部の移植により、高頻度であることが確かめられている。¹¹⁾ したがって、次世代への貢献率は

まだ不明であるが, 本研究における胚盤移植によって作出された生殖系列キメラの頻度は, 他の研究での胚細胞移植による作出頻度 (32% 以下)³⁻⁶⁾ に比較して, かなり高頻度 (10/11 : 91%) であることが証明された。PGCs を生み出す細胞は, 胞胚期にはその運命を拘束され, 体細胞系列から独立していることが示唆されている。¹⁹⁾ そのため, 胚細胞移植では移植される PGCs の数が少なく, 胚盤全体の移植では数多くの PGCs を含むことが, 生殖系列キメラの誘起頻度の差として表れたと考えられる。

しかしながら, 手術胚の生殖隆起に見られたドナー胚盤由来の PGCs の数は, 宿主に由来するものに比較して数が少なかった。本来, 胚盤の周囲に分布するゼブラフィッシュの PGCs は, エピボリーの過程で頭部中胚葉と体幹部中胚葉の境界を経由して胚体の両側部にクラスターを形成する。²⁶⁾ その後, 将来の生殖隆起へ向かって後方へと移動することが明らかにされている。この移動経路をはずれた PGCs は, 低頻度で頭部に観察されることが報告されている。²⁶⁾ 胚盤の動物極側は将来の予定外胚葉域であり, ここに分布した PGCs が頭部に残留した可能性も考えられる。今後, 移植した PGCs を確実に生殖隆起へ取り込ませるためには, 動物極側に移植された胚盤に由来する PGCs の移動経路を明らかにする必要が有ると考えられる。

胚盤移植による生殖系列キメラの作出に関する本研究の結果を総合すると, 本手法により高頻度で生殖系列キメラが作出されるものの, 細胞集団として移植されるので, 移植した細胞集団が特殊化したあるいは拘束されている場合, レシビエントの胚発生に異常をきたすものと考えられた。胚盤移植により作出されたキンギョとフナの子メラ個体では, ドナーと宿主に由来する配偶子の割合は個体ごとに異なり, ドナー由来の配偶子が 9 割を超える例があることが報告されている。¹¹⁾ 生殖系列キメラにおけるドナー由来の配偶子の割合については, 次世代の検定が必要である。今後, このような生殖系列キメラの生物学的基礎研究を進めていくには, 世代交代の早いゼブラフィッシュが適していると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御指導を賜った, 北海道大学名誉教授の山崎文雄博士, 北海道大学大学院水産科学研究科の後藤晃博士, 都木靖彰博士, 富山大学理学部の山崎裕治博士に慎んで感謝の意を表します。また, 研究の遂行と取りまとめに御協力いただいた。北海道大学北方生物圏フィールド科学センター七飯淡水実験所の木村志津雄技官, 都木美佐江さん, 同実験所および北海道大学水産科学研究科育種生物学講座の学生, 院生諸氏に感謝の意を表する。本研究の一部は日本学術振興会, 科学研

究費補助金基盤研究 (B) (1) (課題番号 12460081, 14360105) によった。

文 献

- 1) 山羽悦郎. 魚類における借り腹生産. 海洋と生物 2002; **139**: 126-131.
- 2) 吉崎悟朗. 魚類の遺伝子操作. 「動物発生工学」(岩倉洋一郎, 佐藤英明, 館鄰, 東條英昭編) 朝倉書店, 東京. 2002; 238-251.
- 3) Lin S, Long W, Chen J, Hopkins N. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; **89**: 4519-4523.
- 4) Wakamatsu Y, Hashimoto H, Kinoshita M, Iwamatsu T, Hyodo-Taguchi Y, Tomita H, Sakaguchi M, Ozato K. Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1993; **2**: 325-332.
- 5) Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastoderm transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; **59**: 380-389.
- 6) Nakagawa M, Kobayashi T, Ueno K. Production of germ-line chimera in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and proposal of new method for preservation of endangered fish species. *J. Exp. Zool.* 2002; **293**: 624-631.
- 7) Kazama-Wakabayashi M, Yamaha E, Yamazaki F. The elimination and duplication of lower part of blastoderm effects on the number of primordial germ cells in goldfish. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 577-582.
- 8) Otani S, Maegawa S, Inoue K, Arai K, Yamaha E. The germ cell lineage identified by *vas*-mRNA during embryogenesis in goldfish. *Zool. Sci.* 2002; **19**: 519-526.
- 9) Yamaha E, Mizuno T, Hasebe Y, Yamazaki F. Chimeric fish produced by blastoderm exchange in goldfish, *Carassius auratus*. *Fish. Sci.* 1997; **128**: 91-95.
- 10) Yamaha E, Mizuno T, Hasebe Y, Takeda H, Yamazaki F. Dorsal specification in the blastoderm at the blastula stage in goldfish, *Carassius auratus*. *Develop. Growth Differ.* 1998; **40**: 267-275.
- 11) Yamaha E, Kazama-Wakabayashi M, Otani S, Fujimoto T, Arai K. Germ-line chimera by blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* 2001; **111**: 227-236.
- 12) Mizuno T, Yamaha E, Wakahara M, Kuroiwa A, Takeda H. Mesoderm induction in zebrafish embryos. *Nature* 1996; **383**: 131-132.
- 13) Ho RK, Kimmel CB. Commitment of cell fate in the early zebrafish embryo. *Science* 1993; **261**: 109-111.
- 14) Gurdon JB, Lemaire P, Kato K. Community effects and related phenomena in development. *Cell* 1993; **75**: 831-834.
- 15) Raz E, Hopkins N. Primordial germ-cell development in zebrafish. *Results Probl. Cell Differ.* 2002; **40**: 166-179.
- 16) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stage of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynamics* 1995; **203**: 253-310.
- 17) Ho RK, Kane DA. Cell-autonomous action of zebrafish *spt-I* mutation in specific mesodermal precursors. *Nature* 1990; **348**: 728-730.
- 18) Mizuno T, Yamaha E, Yamazaki F. Localized axis determinant in the early cleavage embryo of the goldfish, *Carassius auratus*. *Dev. Genes Evol.* 1997; **206**: 389-396.
- 19) Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homo-

- logue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and expressed in the primordial germ cells. *Development* 1997; **124**: 3157-3166.
- 20) Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene. 2000.
- 21) Nagai T, Yamaha E, Arai K. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. *Zool. Sci.* 2001; **18**: 215-223.
- 22) Stachel SE, Grunwald DJ, Myers PZ. Lithium perturbation and *gooseoid* expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* 1993; **117**: 1261-1274.
- 23) Schulte-Merker S, Ho RK, Herrmann BG, Nüsslein-Volhard C. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* 1992; **116**: 1021-1032.
- 24) Kimmel CB, Warga RM, Schilling TF. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 1990; **108**: 581-594.
- 25) Woo K, Frazer SE. Specification of the zebrafish nervous system by nonaxial signals. *Science* 1997; **277**: 254-257.
- 26) Weidinger G, Wolke U, Köprunner M, Klinger M, Raz E. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development* 1999; **126**: 5295-5307.