



Title	キュウリウオ科魚類の胚発生と生殖細胞に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高橋, 英佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12661号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65475
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Eisuke_Takahashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：高橋 英佑

学 位 論 文 題 目

キュウリウオ科魚類の胚発生と生殖細胞に関する研究

始原生殖細胞：Primordial Germ Cells (PGCs)は生殖細胞系列の大本となる細胞で、全能性を維持する配偶子へ分化するという特性から、近年発生工学の材料として注目されている。また PGCs は、分化した場所から生殖腺形成部位まで自ら移動する。魚類ではこれらの特徴を利用し、PGC を他の個体に移植することにより生殖系列キメラが作成されている。生殖系列キメラを用いることで、凍結保存した PGC から個体を再生したり、飼育が難しい種の PGC を飼育が簡単な種に移植したりすることで、配偶子を得る労力を省略することが可能である。

生殖系列キメラを効率的に作成するためには PGCs がどのようなルート、メカニズムで生殖隆起まで移動し、体細胞と相互作用し生殖腺が形成されるか知る事が重要である。これらは、モデル生物であるゼブラフィッシュやメダカを用いて詳細に研究されている。PGCs は、胚発生の初期には体細胞により受動的に移動するが、ある時期から移動先の体細胞が発現するケモカインに誘引され、能動的に移動するようになる。生殖隆起まで移動した PGCs は、中胚葉由来の生殖腺の前駆細胞に囲まれ、これらによって受動的に移動し生殖腺を形成する。

しかし、生殖腺が腹腔内の臓器、特に内胚葉由来の消化器官とどのように相互作用し、前後・左右性が形成されるかについては明らかとなっていない。これは、ゼブラフィッシュやメダカでは胃が形成されず、消化管の前後の分化が不明瞭であることと、生殖腺が左右対称に発達することが原因である。キュウリウオ科魚類には、胚発生過程を通して胚が透明で消化器官の形成が明瞭に観察でき、さらに生殖腺が左右非対称に形成されるという特徴がある。これらの特徴から本魚種は、生殖腺の前後・左右性が消化器官とどのように相互作用し形成されるのか解析するのに最適なモデルである。そこで本研究は、キュウリウオ科魚類を用いて研究を行うための基礎を整備することを目的とし、発生工学に必要な手法を確立するとともに、PGCs の分化と生殖腺の形成の詳細な解析を行った。

第 1 章：受精卵の卵膜除去法の開発

魚類の胚は、卵膜でおおわれており、胚の操作や詳細な観察を行うことは困難である。そこで、入手の容易なタンパク質分解酵素のトリプシンを用いて卵膜を除去する条件を検討した。キュウリウオを用いて実験したところ、pH 11.0 に調整した 0.1%トリプシンを含むキュウリウオ科魚類用リングル液で 5 時間処理することで、すべての胚で卵膜を除去できた。この条件で卵膜を除去し、培養した胚の孵化時の生存率の平均は $37.8 \pm 13.9 \%$ と最も高かった。この除去法は、ワカサギにも適用可能であった。

第 2 章：キュウリウオ科魚類の胚発生過程

第1章で開発した方法によりワカサギとキュウリウオの受精卵の卵膜を除去し、10℃での正常胚発生過程を観察した。第1卵割、胞胚期、後期胞胚期、囊胚期、体節形成期、咽頭胚期、孵化期への到達時間は、ワカサギではそれぞれ5時間、14時間、28時間、50時間、4日、10日、20.5日であった。一方キュウリウオでは、それぞれ4.5時間、13.5時間、24時間、48時間、3日、9日、22日と両種で大きな違いはなかった。しかし、コイ科魚類などと比べると、胚発生には長時間を要した。

PGCsの移動過程を理解するうえで、重要な段階である胚体形成過程を理解するため、外部形態の観察と *goosecoid* と *no tail* の Whole mount *in situ* hybridization (WM-ISH) による発現解析を行った。その結果、ワカサギでは50%エピボリー期に胚盾の形成が認められ、エピボリー終了時に *conversion* と *extension* 運動が起こり、明瞭な胚体が形成された。一方のキュウリウオは、70%エピボリー期に胚盾の形成が認められ、その後エピボリーの進行とともに *extension* 運動が徐々に起こった。また、エピボリー終了時の *conversion* 運動により、明瞭な胚体が形成された。

ワカサギを用いて内胚葉系の消化器官の形成過程を、胆嚢や肝臓、膵臓が分化する *intestinal bulb* (腸管膨大部) を中心として観察した。*intestinal bulb* は、体節形成期に第1から第3体節部の卵黄の背側に形成され、その後、後方へと移動し、第11から第17体節部に位置した。*intestinal bulb* と肝臓、さらにこれらの後方に形成される腸管の全体の長さは胚発生過程を通して27体節分であり、発生に伴う伸張は認められなかった。*Intestinal bulb* と肝臓の腹腔内での占有部位は後方へ位置することになることから、ワカサギではこれらの発達により腸管を後方へと押し出すものと考えられた。

第3章：PGCsの起源と移動経路

ワカサギにおいて、*vasa* を対照とした WM-ISH を行った結果、第1から第3卵割溝の両端にシグナルが認められた。これらに加え、16細胞期の緯断面にもシグナルが認められた。また、キュウリウオにおいて、生殖細胞質の局在を示す *bucky ball*-GFP mRNA のシグナルも同様の位置に認められた。これらのシグナルの位置と、GFP-*nos3* 3'UTR mRNA により可視化された PGCs の位置が一致したことから、これらの魚種でも生殖細胞質の取り込みにより PGCs が起源すると考えられた。

GFP-*nos3* 3'UTR mRNA を顕微注入した胚では、ワカサギでは50%エピボリー期、キュウリウオでは70%エピボリー期以降に PGCs を識別できた。このとき、PGCs の数は初期卵割期でのシグナルより増加していたが、その分布は1000細胞期の分布域を引き継いでいた。両種ともに、エピボリーの過程では PGCs 集団間の相対的な位置に変化はなかったが、胚体の形成にともない胚軸への PGCs の急激な移動が認められた。これは、体細胞の胚体形成運動である *conversion* 運動と *extension* 運動に同調した受動的な動きであると考えられた。体節形成期以降 PGCs は後方へと移動したが、体節番号を指標とした観察から、この移動は能動的なものと考えられた。

第4章：生殖腺の形成過程

ワカサギにおいて、生殖腺周辺の PGCs の分布を解析した。その結果、孵化3日後の PGCs は第16から第24体節の腸管膜を形成する細胞中もしくは腸間膜の上部に明瞭な左右性を持たずに分布した。このときの PGCs は自律的な移動能を失っている形態を示した。孵化1ヶ月後の稚魚では、第20体節部に生殖腺が形成された。この部域の前方右側の腹腔は肝臓や膵臓が占有し、生殖腺は左側のみが発達していた。肝臓や膵臓の分布の後端部では、他の器官の占有が無い腹腔の右側のスペースにも生殖腺が形成されていた。これらの観察

結果から、PGCs は体細胞により受動的に 20 体節付近に集められて生殖腺を形成し、生殖腺の左右性は腹腔の空間を消化器官と効率よく使用するために生じたものと考えられた。

本研究により、キュウリウオ科魚類を用いて発生学の研究、特に PGCs の移動様式と生殖腺形成の解析を行うための基礎が整備された。特にワカサギでは、腹腔内の中央に集積した PGCs が、体細胞によって 20 体節部に集められ、左右性を持ち生殖腺が形成される過程が観察された。今後、左右性形成の分子生物学的な背景を明らかにするため、クッペル氏胞の破壊個体や *dead end* 遺伝子のノックダウンによる PGCs 欠損個体において腹腔内の臓器と生殖腺の配置を解析する必要がある。