HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	高橋, 英佑
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/65476
Type	doctoral thesis
File Information	Eisuke_Takahashi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文の要約

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、最終的に配偶子に分化する生殖系列細胞の起源となる細胞である。PGCs は、胚発生の初期に母系の生殖細胞質を受け継いだ細胞、もしくは他の細胞からの誘導により分化する。そして、分化した場所から生殖腺形成部位まで自ら移動し、体細胞との相互作用により生殖腺を形成する。この生殖腺へ移動するという興味深い特徴から、PGCs の動態に関する研究が様々な種でおこなわれてきた。しかし魚類において、体細胞、特に内胚葉由来の消化器官とどのように相互作用し、腹腔内の複雑な構造が形成されるかを研究した例はない。これは、今まで PGCs の研究が行われてきたゼブラフィッシュやメダカでは、胃が形成されないため消化管の分化が不明瞭な点が影響している。キュウリウオ科魚類は体が透明でかつ色素細胞の分化が遅く、消化器官の形成過程が非常に観察しやすい。また、明瞭な胃の形成が認められる。これらの理由から、PGCs の動態と消化器官の相互作用を解析するのに適している。さらに、生殖腺が左右非対称に発達するという興味深い特徴を有している。そこで、本研究では、キュウリウオ科魚類を用いて発生学の研究を行うための技術基盤と基礎的知見を整備し、その上で PGCs の分化と生殖腺の形成過程を解析した。まず第 1 章では、キュウリウオ科魚類で卵膜を除去する方法を開発した。続いて第 2 章では、キュウリウオとワカサギ両種の正常発生ステージ表を作成し、第 3 章では両種の PGCs の起源および移動経路を明らかとした。そして、第 4 章では、組織学的観察によりワカサギの生殖腺の形成過程と消化器官の位置関係を明らかとした。これらの知見を総合し、第 5 章ではキュウリウオ科魚類の発生学の研究材料としての有用性、および生殖腺の分化と消化器官の相互作用を考察した。

第 1 章：受精卵の卵膜除去法の開発

(1) キュウリウオの受精卵を材料とし、いくつかの魚種で報告されている卵膜除去法を試みた。その結果、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ゲル液（Smelt's Ringer's Solution：SRS）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。すべての受精卵の卵膜が除去されたときの発生段階は２細胞期であった。

(2) 上述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 ± 13.9 %と最も高かった。

(3) これらの結果から、キュウリウオにおいて卵膜を除去するための最適な条件は、上述の溶液での受精直後から処理と考えられた。また、卵膜を持たない 1 細胞期胚を得るためには、多くの処理胚より卵膜を除去できた胚を適宜回収するのが良いと考えられた。

第 2 章：キュウリウオ科魚類の胚発生過程

（1） 第 1 章で開発した方法をワカサギとキュウリウオに適用し、卵膜を除去した胚を得て、両種を 10℃で培養し、正常胚発生過程を観察した。第 1 卵割、胞胚期、後期胞胚期、嚢胚期、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非常に長い時間をかけて胚発生を行っていた。

（2） 外部形態の観察と、Whole mount *in situ* hybridization（WM-ISH）による *goosecoid* および *no tail* の発現解析の結果、ワカサギでは 50 %エピボリー期に胚盾の形成が、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。

（3） ワカサギで内胚葉系の消化器官の形成を明らかにした。intestinal bulb は、ゼブラフィッシュと同様に第 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。後方への移動は、第 1 から第 4 体節部にとどまり続けるゼブラフィッシュとは異なっていた。また、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 27 体節分であり、発生に伴う伸張は認められなかった。肝臓の腹腔内での占有部位は後方へ伸長することから、ワカサギでは intestinal bulb と肝臓が発達し、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

（1） 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 細胞期の緯割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 のシグナルも同様な位置に認められた。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、これらの取り込みから PGCs が起源すると考えられた。

（2） GFP-*nos3* 3'UTR mRNA により可視化された PGCs の動態を解析した。その結果、50 %エピボリー期には PGCs の数は増加していたが、その分布は 1000 細胞期の分布域を引き継いでいた。このことから、この時期には PGCs は能動的な移動はしていないと考えられた。Conversion 運動による胚体形成時に、胚体への PGCs の急激な移動が認められたが、これは、体細胞の移動と同調した受動的な動きであると考えられた。体節形成期以降の体節番号を指標とした観察から、PGCs は後方へと移動したことから、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

（1） ワカサギにおいて生殖腺周辺の PGCs の分布を解析した。孵化 3 日後の PGCs は第 16 から第 24 体節に明瞭な左右性を持たずに分布した。このときの PGCs はすでに移動能を失っている形態をしていた。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。この時期、左側の生殖腺に多くの PGCs が含まれていた。

（2） 孵化後 1 ヶ月の稚魚の第 20 体節部の前方では、腹腔内の右側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。一方、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内の左右のスペースに生殖腺が形成されていた。このことから、生殖腺の左右性は、消化器官とともに腹腔内の空間を効率よく使用するために生じたものと考えられた。

第 5 章：総合考察

体節番号を指標として PGCs の最終的な集合位置を比較すると、ワカサギの PGCs はゼブラフィッシュより体の後方に集合していた。しかし、それぞれの集合位置は両種ともに intestinal bulb の直ぐ後方であった。intestinal bulb は、両種ともに第 1 から第 4 体節付近で最初に分化し、その後ワカサギでは後方へと移動・伸長していた。時系列的な順番は、①体節形成期の初期に intestinal bulb が第 1 から第 4 体節付近で分化、② intestinal bulb の後方への移動、③ intestinal bulb の後端の腹膜内への PGCs の集合、となっていた。このことから、PGCs が集合する中胚葉の位置は、両種ともに intestinal bulb によって 2 次的に決定される可能性が示唆された。また、肝臓が発達する位置も、両種ともに intestinal bulb の腹側であった。このことから、PGCs と同様に、intestinal bulb によって、消化管から肝臓が形成される位置が決定されている可能性が示唆された。

本研究を通して、キュウリウオ科魚類の腹腔内の器官の分化に関して、時間的な経過、前後軸に沿った位置関係が明らかにされた。また、腹腔内での消化器官の分布に伴って生殖腺が左右非対称に配置されると考えられた。これらの腹腔内での器官の分布は、モデル魚類として使われてきたゼブラフィッシュやメダカでは解析ができない内胚葉性の器官の前後・左右軸が形成される過程を解析するのに適している。今後、クッペル氏胞の破壊実験やゲノム編集などをキュウリウオ科魚類に適用し、生物の体づくりの仕組みがより詳しく解明されることが期待される。