



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メダカ単数体由来の生殖細胞の配偶子形成に関する研究
Author(s)	竹内, 萌
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第16712号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16712
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99557
Type	doctoral thesis
File Information	Moe_TAKEUCHI_summary.pdf, 全文の要約



主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：竹内 萌

学 位 論 文 題 目

メダカ単数体由来の生殖細胞の配偶子形成に関する研究

(Studies on gametogenesis of germ cells from haploids in medaka)

多くの有性生殖を行う動物は、母親由来と父親由来の2セットのゲノムを持つ二倍性細胞から成り、主な生活環は二倍体で構成される。一方で、ゲノムを1セットしかもたない個体は単数体（半数体、一倍体）と称される。脊椎動物では単数体は個体として生存できないが、その理由や、脊椎動物がゲノムを2セット持つ意義について詳細には明らかとなっていない。

脊椎動物において単数体は致死性だが、単数性細胞は遺伝子機能解析における有用なツールとなるため、哺乳類では単数性胚性幹 (ES) 細胞が作出されている。単数性 ES 細胞は生殖細胞を含む様々な細胞に分化可能だが、有糸分裂の失敗により DNA 量が倍になった二倍性細胞が出現する。こうしてできた二倍性細胞は安定状態で、増殖能が高く、アポトーシスも起こりにくいため、培養や分化の過程で単数性細胞は減少し、二倍体化した細胞に置き換わると考えられている。ゼブラフィッシュの単数体の体細胞でも有糸分裂の失敗が起こり、アポトーシスが生じやすいことが報告されており、単数性細胞の有糸分裂の異常は、脊椎動物に共通する事象だと考えられている。これに対し、魚類の単数体由来の生殖細胞についても研究が行われた。他個体由来の生殖細胞を持つ個体は生殖系列キメラと呼ばれ、ゼブラフィッシュ単数体由来の始原生殖細胞を、不妊化処理を施した生存性の二倍体に移植した生殖系列キメラを作製すると、単数体由来の生殖細胞でゲノム倍加が生じ、遺伝的に同一な精子を産生した。しかし魚類の単数性生殖細胞が卵形成能を持つのか、またゲノム倍加が生じる生殖細胞の分化段階やメカニズムなど、単数体由来の生殖細胞の配偶子形成過程に関して多くは明らかとなっていない。

近年、ゲノム編集技術が発展し、水産業においても肉厚で成長が早いといった有用形質を付与したゲノム編集魚が作出され、販売されている。しかし、現在の技術では同じ変異をホモ接合でもつゲノム編集魚を作出するのに2世代以上の継代が必要であり、水産有用種に複数の有用形質を付与するには、10年以上の時間と飼育コストがかかるという問題点がある。この課題の解決に向け、単数体のゲノム倍加現象を利用できないかと着想を得た。

本研究では、ゼブラフィッシュと系統学的に離れた種であるメダカを用いて、①脊椎動物が二倍性状態を維持するメカニズムの解明に向けた、単数体由来の生殖細胞の配偶子形成機構の解明、②単数体とゲノム編集技術を組み合わせた有用系統の早期作出技術の開発を目的とした。本研究の成果となる主論文は下記の四章より構成される。

魚類の単数体は胚性致死であるため、魚類の単数体由来の生殖細胞の配偶子形成について調査するには、生存性の二倍体個体に生殖細胞を移植した $1n-2n$ 生殖系列キメラを作出して解析を行う必要がある。しかし、従来の方法では $1n-2n$ 生殖系列キメラの作出効率が低いという問題点があった。そこで、第一章では、まず、*dnd1* と *nanos3* を過剰発現させて

PGC 様細胞化させた単数体ドナーを用いることで、効率的に 1n-2n 生殖系列キメラが作出できるか調査した。その結果、*dnd1* と *nanos3* を過剰発現させたドナーを用いることで通常の 3 倍程度の効率で 1n-2n 生殖系列キメラが作出できることが明らかとなった。そこで、この手法を用いて作出した 1n-2n 生殖系列キメラを利用し、単数体由来の生殖細胞の配偶子形成について調査した。妊性を持つ雌雄の 1n-2n 生殖系列キメラが得られたので、生殖腺の組織学的解析を行ったところ、減数分裂過程の生殖細胞が観察された。さらに、精巢に含まれる単数体由来の生殖細胞の倍数性を測定したところ、1C (DNA content in a cell, 二倍体の 1 細胞あたりの DNA 量を 2C とする) だけでなく、2C、4C の細胞が検出され、単数性生殖細胞でゲノムの倍加が生じていることが明らかとなった。また、雌性発生単数体を作成し、AFLP 解析を行ったところ、キメラが産する卵が遺伝的に同一であることが明らかとなった。以上から、単数体由来の生殖細胞は減数分裂過程を経て遺伝的に同一な配偶子を形成することが明らかとなった。

第一章で、単数体由来の生殖細胞でゲノムの倍加が生じていることが示唆されたが、生殖細胞の分化段階のどの時期に倍加が生じているのかは不明である。単数体由来の生殖細胞で、4C の細胞が見られたことから、これは単数性生殖細胞で有糸分裂期に 1C から 2C へとゲノムの倍加が生じ、DNA 複製後の G2 期にある状態、あるいは減数分裂の開始時に相同染色体が複製し 4C のゲノム量になっている状態を反映しているのではないかと考えられた。すなわち、単数性生殖細胞のゲノム倍加は減数分裂以前に生じているのではないかと仮説を立てた。そこで、第二章では、この仮説を実証するために、単数性細胞でゲノムの倍加が生じる生殖細胞の分化段階を調査した。まず、生殖腺形成時期の単数体と二倍体の生殖細胞の核サイズを調査したところ、単数体は、二倍体に比べて生殖細胞の核サイズは小さく、生殖細胞数も少なかったため、この時期に単数性生殖細胞でゲノム倍加は生じていないと考えた。メダカ単数体は孵化前に死亡することから、それ以降の生殖細胞の発生を調査するため、1n-2n 生殖系列キメラを作成し、免疫組織化学染色を行って生殖細胞を観察した。6–10 dph (day-post-hatch) の XX、XY の 1n-2n 生殖系列キメラの生殖腺で核サイズの大きい生殖細胞が観察された。従って、単数性生殖細胞のゲノムの倍加は遺伝的性によらず 6 dph までに I 型分裂を行う生殖細胞で生じる可能性が示唆された。そこで、I 型分裂から II 型分裂への移行が行われない *meioC* 変異体をドナーに用いた 1n-2n 生殖系列キメラを作成し、成魚の生殖腺の倍数性を調査した。その結果、キメラの生殖腺は 2C の細胞で構成されていたことから、単数性生殖細胞のゲノムの倍加は I 型分裂で生じていると考えられた。従って、単数体由来の生殖細胞は 6 dph までに I 型分裂でゲノムの倍加を生じ、減数分裂過程を経て単数性の配偶子を産生すると考えられた。

第一章、第二章の結果から、単数体の生殖細胞に含まれる 1 セットのゲノムに複数の変異が導入できれば、その生殖細胞のゲノムが倍加し、複数の変異アレルをホモでもつ生殖細胞がつくられると予想した。第三章では、第一章で検討した *dnd1* と *nanos3* を過剰発現させたドナーを用いた 1n-2n 生殖系列キメラを利用し、肉厚で生殖巣も大きいという水産業における有用形質を付与できるような 3 つの遺伝子に変異を持つ配偶子を効率的に得る方法を検討した。濃度の異なる *Cas9* mRNA と標的遺伝子に対してそれぞれ 1 つずつ (合計 3 つ) または 2 つずつ (合計 6 つ) の gRNA をインジェクションした単数体をドナーに用いて 1n-2n 生殖系列キメラを作成し、性成熟後に野生型と交配して得られた次世代に含まれる変異を調査した。二倍体に比べ、1n-2n 生殖系列キメラの方が濃度の低い *Cas9* mRNA で 3 つの遺伝子変異を持つ配偶子が得られることが明らかとなった。さらに、1n-2n 生殖系列キメラでは同個体が産する配偶子に複数の変異が含まれている確率が二倍体よりも高い傾向にあった。

第四章では、二倍体と比較して単数体で発生遅延が生じる時期に、単数体と二倍体のトランスクリプトーム解析を行い、単数体の発生が遅延し、生存できなくなる原因を探索した。単数体でも初期胞胚の時期に新規転写が開始されるが、やがて後期胞胚にあたる時期に発生遅延が生じ始めた。トランスクリプトーム解析の結果、単数体は二倍体に比べてヒストンの遺伝子発現や細胞分裂に関する遺伝子などの相対的な発現低下が見られ、クロマチン形成が二倍体に比べて遅れていると推測された。さらに、単数体では密着結合に関する遺伝子発現が相対的に低下しており、シグナル伝達を介した細胞の分化に影響を与えていると考えられた。加えて、単数体ではアポトーシス関連遺伝子が発現上昇していた。これらの結果より、単数体では細胞分裂や形態形成が正常に行われず、アポトーシスも生じ、形態異常や胚性致死につながると考えられた。

本研究の結果から、単数性細胞でアポトーシスが生じやすく、ゲノム倍加した単数性生殖細胞はその後の配偶子形成が正常に行われることが示され、単数性状態よりも二倍性状態の方が安定的であるため、脊椎動物は二倍体で維持されると考えられた。さらに、単数体の生殖細胞を利用した応用研究として、3つの遺伝子に対する変異を導入した単数体をドナーに用いた $1n-2n$ 生殖系列キメラを利用することで、3つの遺伝子への変異を含む配偶子が得られることが明らかとなった。これらの卵は、変異を含む単数性生殖細胞のゲノムが倍加し、複製した染色体間で組換えを生じて産生されたため、遺伝的に同一である。この卵と UV 照射で遺伝的に不活性化した精子をかけ合わせ、温度処理により第二極体放出を阻止すれば、同じ変異アレルをホモでもつ雌性発生二倍体が1継代で作出できると予想され、今後このシステムの実現が目指される。