

## シマウキゴリの胚発生過程

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	斎藤, 大樹 荒井, 克俊 山羽, 悦郎
巻/号	52巻2号
掲載ページ	p. 177-184
発行年月	2004年6月

## シマウキゴリの胚発生過程

斎藤大樹<sup>1</sup>・荒井克俊<sup>1</sup>・山羽悦郎<sup>2</sup>

### The Embryonic Development of Shima-ukigori, *Gymnogobius opperiens*

Taiju SAITO<sup>1</sup>, Katsutoshi ARAI<sup>1</sup> and Etsuro YAMAHA<sup>2</sup>

**Abstract:** The embryonic development of shima-ukigori, *Gymnogobius opperiens* (Family; gobiidae) at 20°C was staged by morphological and histological criteria, and analyzed by cell-lineage tracing, with special reference to the embryonic patterning mechanism during pre-gastrula stage. Egg cytoplasm was separately distributed from yolk even in unfertilized egg, but included many yolk granules within it. The yolk granules were maintained until mid-somitogenesis stage, and disappeared thereafter. The third cleavage sometimes occurred horizontally. Yolk cell kept the spherical shape without yolk extension throughout the embryonic development. These properties are similar to those in gobiidae fish, but different from those in cyprinidae fish, such as zebrafish and goldfish. Cell-labeling at the 16- to 32-cell stage showed that the blastomeres mingled with each other during blastula to early gastrula stages, suggesting developmental fates are not destined in these stages. These results suggest that the fundamental mechanisms of embryonic patterning are conserved in varied fish species, although shapes of embryo and yolk cell are different.

**Key words:** *Gymnogobius opperiens*; Embryonic development; Morphogenesis; Differentiation

近年、地球環境の変化に伴い水産資源の減少や遺伝的多様性の喪失が指摘されている。遺伝的多様性は育種の素材として欠かせない。将来、これらを遺伝子資源として利用するには、保存し再生する技術を確立することが必要である。現在魚類においても、細胞の凍結保存 (Kusuda et al. 2004)、核移植 (Wakamatu et al. 2001)、借腹生産 (Yamaha et al. 2001, 2003) などの発生工学的技術の開発が進められてきている。発生工学の技術の多くは、初期胚発生時の配偶子や胚を材料としている。これらの技術を確立し新しい育種法を展開するためには、硬骨魚類の初期胚発生過程を理解することが肝要である。

魚類の胚発生過程は、ゼブラフィッシュを主たる材料として実験発生学的手法および突然変異体により解析されてきている。一連の研究から、胞胚期の割球には分化多能性が存在すること (Ho and Kimmel 1993; Kimmel and Law 1985)、囊胚期における背腹軸

の確立および中胚葉の形成には、卵黄細胞からの誘導が重要な役割を果たすこと (Mizuno et al. 1996)、背腹軸の誘導には卵黄細胞に存在する母系の細胞質因子が関与していることが明らかにされている (Mizuno et al. 1997, 1999)。さらに、始原生殖細胞 (primordial germ cells; PGCs) の決定にも同様に母系の細胞質が関与している (Reviewed by Raz 2003)。以上の様に、硬骨魚類の胚発生における細胞分化には、卵内に不均一に蓄積された細胞質の働きと、組織間・胚領域間で生じる胚誘導が段階的に組み合わせられていることが明らかとなってきた。

ゼブラフィッシュにおける一連の研究は、脊椎動物の形態形成を明らかにするためのモデル実験系として重要であるだけでなく、胚発生を制御する、いわゆる発生工学的技術を魚類に適用する上で多くの可能性を提示している。例えば、ゼブラフィッシュとほぼ同様の胚発生機構をもつキンギョでは、胞胚期の胚盤下部

2004年4月8日受付：2004年5月31日受理。

<sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究科育種生物学講座 (Laboratory of Breeding Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan).

<sup>2</sup>北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏ステーション七飯淡水実験所 (Nanae Fresh Water Laboratory, Field Science Center of North Biosphere, Hokkaido University, Nanae 041-1105, Japan).

領域を他胚へ移植することで生殖系列キメラの作出が可能となっている (Kazama-Wakabayashi et al. 1999; Yamaha et al. 2001, 2003)。この技術は、胞胚期の胚盤は分化多能性を有し、胚盤の下部領域で PGCs が形成されるという知見を統合してはじめて可能となった。しかし、硬骨魚は多様性に富んでおり、卵や胚の形状、大きさ、発生速度が魚種間で大きく異なっている。これらの違いが、胚発生（形態形成）へどのような影響を与えているかは不明である。特に、水産における重要種を多数含むスズキ目魚類では、胚発生過程に関する報告は形態的な記載が中心で (Arakawa et al. 1999; Ballard 1969)、胚操作の主たる時期である初期胚発生の知見に乏しく、発生工学的技術を導入して育種への展開を図るうえで障碍となっている。

シマウキゴリ *Gymnogobius opperiens* は、スズキ目ハゼ科に属する魚種である。本種では、比較的容易に受精卵を採取でき、胚を人工的に培養することが可能である。スズキ目魚類において生殖細胞を用いた発生工学的技術を検討するためのモデル実験系を確立するために、著者らは本種の始原生殖細胞の動態に関して詳細に観察している。しかしながら、本種の胚発生過程については外部形態の記載はあるものの、一定温度条件下での発生速度は示されていない (Hamada 1968)。本研究では、育種における発生工学的研究に資するために、シマウキゴリにおける初期胚発生の形態形成を最近の知見をもとに捉え直すとともに一定温度下での発生段階を決定した。さらに細胞標識により細胞運命を明らかにすることで初期胚における形態形成機構を明らかにし、他魚種の知見と比較した。

## 材料および方法

### 受精卵の採取

4月下旬～7月上旬の期間に、河川中の石の下に生みつけられたシマウキゴリ受精卵を材料として用いた。卵の採取は、北海道函館市近郊の戸切地川および茂辺地川で行った。発生段階の早い卵を含む卵塊を石ごと採取し、ピンセットで石より卵を分離して水道水中で培養した。

近年、ウキゴリ属の分類が再検討され、従来のウキゴリ *Chaenogobius urotaenia* は、シマウキゴリ *Gymnogobius opperiens*、スミウキゴリ *Gymnogobius petschiliensis*、ウキゴリ *Gymnogobius urotaenia* の3種に分類された (Stevenson 2002)。これら3魚種は同所的な生息域があることが知られている (石野 1987)。そこで本研究では、用いた卵群を孵化させ、その斑紋から稚魚がシマウキゴリであることを確認した。

### 卵膜の除去および培養

シマウキゴリ受精卵の卵膜は、実体顕微鏡下でピンセットを用いて外科的に除去した。卵膜除去卵は、囊胚形成が終了するまでは淡水産硬骨魚用リンゲル液 (128 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) に0.01%のペニシリンとストレプトマイシン、および1.6%鶏卵白を加えた培養液（一次培養液）で培養した。囊胚形成終了後は、1.8 mM CaCl<sub>2</sub>と1.8 mM MgCl<sub>2</sub>を含む蒸留水に0.01%のペニシリンとストレプトマイシンを加えた液中（2次培養液）で培養した。死卵等による培養液の悪化の発生への影響を排除するため、それぞれの卵膜除去胚は全胚発生過程を通じて96穴プレート (Grainer) で個別に培養した。胚の培養は、20℃のインキュベーター内で行った。卵膜未除去胚は、水道水（約40 ml）を満たした90 mm シャーレ中で培養した。

### 発生段階の決定

受精直後（1細胞期）の受精卵を選別し、卵膜を除去後、20℃のインキュベーター内で培養した。第1卵割の開始を起点とし、胚発生過程における外部形態の時間的変化を観察した。割球の数を計測できる発生段階では割球数を基準に発生段階を決定したが、ウキゴリ胚の胚盤は不透明であるため、64細胞期以降は外部形態から割球の数を計測することができなかった。そこで、64細胞期以降は30分毎に胚盤を分離し、1%クエン酸三ナトリウムを含む淡水魚用リンゲル液を満たしたガラスシャーレに入れ、各割球を解離させ割球数を計測した。割球の分離手術には、パスツールピペットを引き伸ばし、先端にガラスウールを接着した微細ガラス針を用いた。0.8%寒天をコーティングしたガラスシャーレに一次培養液を満たし、その中に胚を入れ、微細ガラス針を切断面となる胚盤と卵黄の境界面に押し当て、胚盤を分離した。

胞胚中期から後期における胚盤の形態的変化は、ゼブラフィッシュの胚発生過程を詳細に記載した既報 (Kimmel et al. 1995) の表記法を用いた。胚環形成以降エピボリー終了までは、胚盤が卵黄細胞に覆い被さっている割合を基準に発生段階を決定した。体節形成期には胚発生過程を体節数により示し、それ以降の発生段階では受精後（採取後）の日数 (dpf) で示した。

### 割球の標識

単一割球由来の細胞の挙動、特に胞胚期における細胞の運動を観察するために、0.2M KClで調整した5% FITC-dextran (Sigma) 溶液を、シマウキゴリ胚の16細胞期から32細胞期の単一の割球へ顕微注入することにより標識した。顕微注入のためのガラス針は、微小ガラス毛細管を微小針作製機 (Narishige) により延

伸し、実体顕微鏡下で先端部をピンセットでわずかに壊し開口させて作製した。顕微注入は、細胞標識色素をガラス針に充填し、実体顕微鏡下でマイクロマニピュレーター (Narishige) とマイクロインジェクター (Eppendorf) を操作して行った。顕微注入直後に蛍光顕微鏡により FITC-dextran を含む割球を確認し、他の割球へ標識色素が移行していた場合、その胚は廃棄した。その後、標識された割球に由来する細胞の挙動を、実体蛍光顕微鏡 (OLYMPUS SZ12 FLM) で経時的に観察した。

#### 組織切片の作成

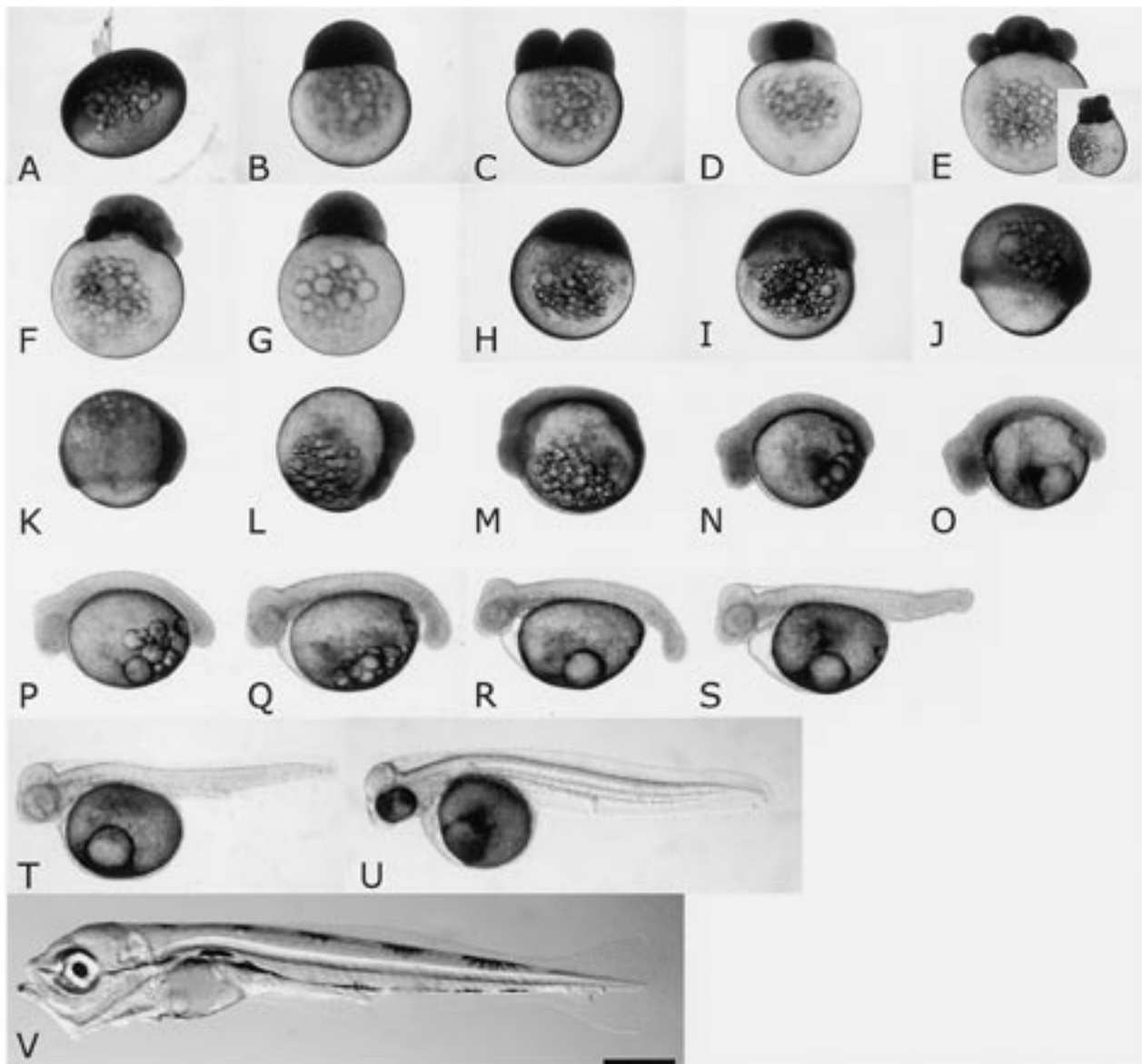
シマウキゴリ胚を経時的に固定し、組織切片を作成

した。卵膜を除去した胚をブアン氏液により2時間固定した後、80%エタノールに置換し使用するまで保存した。定法に従って、厚さ  $8\mu\text{m}$  の連続切片を作成しスライドガラスに貼り付けた後、ヘマトキシリン・エオシン二重染色 (HE 染色) を施し観察に用いた。

## 結 果

#### 胚発生過程

河川から採取された卵塊中には、未受精卵も含まれていた。その卵膜は球形で膨潤しておらず、卵と密着していた (Fig. 1A)。受精卵は卵膜が膨潤し、長水滴型を呈した。シマウキゴリ胚の細胞質は、未受精卵に



**Fig. 1.** Embryonic development of ukigori. A: unfertilized egg, B: 1-cell stage, C: 2-cell stage, D: 4-cell stage, E: 8-cell stage and inset column showing the embryo in which third cleavage occurred horizontally, F: 16-cell stage, G: 32-cell stage, H: sphere stage, I: shield stage, J: 60% epiboly, K: 80% epiboly stage, L: 90%-epiboly stage, M: bud stage, N: 10-somite stage, O: 12-somite stage, P: 14-somite stage, Q: 18-somite stage, R: 20-somite stage, S: 24-somite stage, T: 36-somite stage, U: 4-day post-fertilization, and V: hatching embryo. Scale bar indicates 1 mm.

においても卵黄細胞から明瞭に区別することができ、卵黄細胞を包み込むように分布していた。受精直後の胚へ蛍光色素を顕微注入しても、卵黄細胞には色素が拡散することは無く胚盤内だけで拡散した。受精直後の胚の卵黄細胞には多数の油球が散在していたが、発生の進行に伴って融合し、体節形成期が終了する発生段階では単一の油球を形成した (Fig. 1R)。

第1卵割、第2卵割は経割を行ったが、第3卵割は胚により異なり、一部の胚で緯割した (Fig. 1C-E)。緯割した胚では結果として、胚盤の8割球の構成が上下2層の構造を呈した (Fig. 1E, inset)。しかし、この第3卵割の卵割様式は比較的不均一で、1~3個の割球のみが緯割を起こした胚も観察された。また、採取直後の卵でも、不均一な卵割様式は認められた。16細胞期以降の胚では、割球が整然と配列しているものから不規則に位置しているものまで様々だった。しかし、どのような卵割様式であっても、その後の胚発生への影響は認められなかった。胚盤はその後6.5時間で、2細胞期から512細胞期に達した。このとき、胚盤深部に位置する割球と組織学的に比較すると、胚盤の表層に位置する割球のほうが大きい傾向があった (Fig. 2)。また、胚盤の表層付近には多量のエオシン好性の顆粒が観察された (Fig. 2)。第1卵割面が形成されてから12時間後には、胚盤と卵黄の境界が平らになり胚全体が球形を呈する sphere 期に達し (Fig. 1H; Table 1)、14時間後には卵黄細胞が胚盤を押し上げる、いわゆるバルジング (bulging) が観察された (Dome 期)。

16時間後には胚環が確認できたことから、これ以降の発生段階では胚盤葉下層の細胞がもぐり込みを開始する、囊胚期であると考えられた。またこのとき、背側の胚環部には肥厚が認められ、背側と腹側の違いを明瞭に区別することができた (胚盾期; Fig. 1I)。これ以降、エピボリーの進行に伴い、胚盤の背側ではさらに細胞が収斂して肥厚し、胚盤葉下層の細胞層がより動物極側へ拡大しているのが認められた。また、卵黄細胞の覆い被せも背側の方が早く進行した (Fig. 1J, K)。80%エピボリー期までは、明瞭な胚体構造を認めることはできなかったが、90%エピボリー期 (24時間) をすぎると、背側動物極側が急激に肥厚し、明確な頭部領域を形成した (Fig. 1L)。この時期には、胚体部腹側の卵黄栓付近にクッパー胞の形成が認められた。

26時間後には胚盤が完全に卵黄を包み込む尾芽胚期に達した。この時期にはすでに1~2体節が形成されており、眼胞の構造も確認された (Fig. 1M)。ウキゴリの胚盤は不透明で、その特徴はエピボリーの終了まで継続していたが、その後、14体節期 (41時間) までに胚体が透明化した (Fig. 1M-P)。HE染色を施し

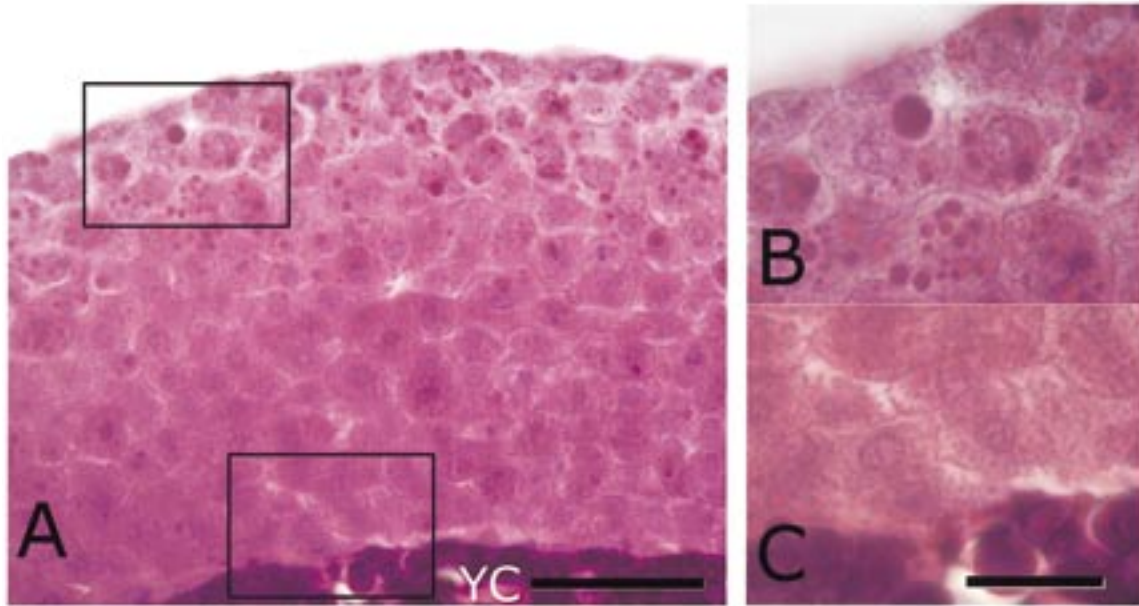
たこの発生段階の胚の組織切片を観察すると、エオシン好性の顆粒が体細胞から消失していた。体節の分節は、その卵群あるいは個々の卵により差が認められたが、20℃ではおよそ1時間に1体節ずつ分節した。14体節期 (41時間) には眼胞内にレンズが形成され (Fig. 1P)、16体節期 (43時間) には耳胞が認められた。18体節期 (45時間) には囲心腔と心臓を確認することができた (Fig. 1Q)。コイ目魚類では、体節数の増加にともない卵黄細胞が変形し後方へ伸長 (卵黄伸長) することが知られているが (Kimmel et al. 1995)、シマウキゴリ胚の卵黄細胞は球形を維持していた (Fig. 1R, S)。30体節期までに、外部形態から腸管の形状が明瞭になった。最終的な体節数は36~37 (63時間) であったが、外部形態からは正確な数の計測は困難だった (Fig. 1T)。この発生段階以降、眼色素の網膜への沈着および体表でのメラノフォアの沈着が認められ、発生6日目には組織学的に鰾の形成も認められた (Table 1)。卵膜の除去を行わなかった胚は孵化し遊泳を開始した (Fig. 1V)。

卵割期のシマウキゴリ胚を4℃で培養したところ、胚発生がほぼ停止したが、20℃で培養を再開するとふたたび胚発生を開始した。また、12時間程度の4℃処理ではその後の形態形成に異常は認められなかった。

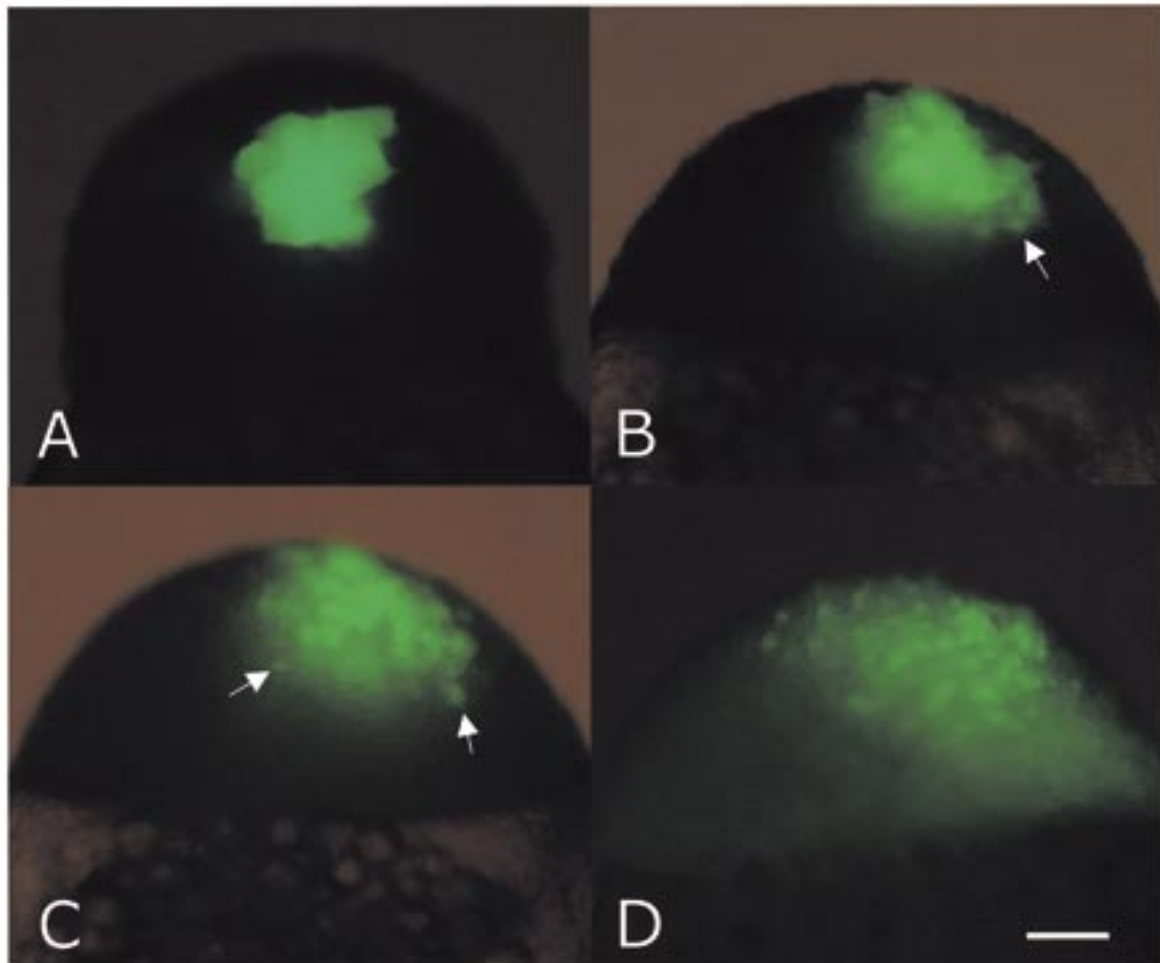
シマウキゴリ胚は、1シャーレ中 (約40 ml) に約100個体の、高密度で培養すると発生に遅滞が見られ、体

**Table 1.** Stages of embryonic development of shima-ukigori

Stage	h	Morphogenesis
1-cell		
2-cell	0	
4-cell	3/4	
8-cell	12/3	
512-cell	6.5	
1K-cell	8	∴
	10	mixing
Sphere	12	↓
Dome	14	
Shield	16	germ ring, dorsal side thicker
50%-epiboly	17.5	
95%-epiboly	24	Kupffer's vesicle
Bud	26	eye vesicle, 1,2-somite
5-somite	32	
10-somite	37	
12-somite	39	
14-somite	41	transparent embryonic body, lens formation
16-somite	43	otic placode
18-somite	45	heart prominent
20-somite	47	
24-somite	51	heart beat
36-somite	63	melanophore
6-dpf		gas bladder
12-dpf		hatch out



**Fig. 2.** HE-stained histological section of the blastula stage embryo. A: Image of central part of blastodisc. B: Higher magnification image of upper column in A. C: Higher magnification image of lower column in A. YC, yolk cell. Scale bar in A indicates  $50\mu\text{m}$ . Scale bar in C indicates  $20\mu\text{m}$ .



**Fig. 3.** Cell mixing of ukigori embryo at the blastula stage. A: 128-cell stage, B: 10-hpf stage, C: sphere stage, and D: dome stage. Green fluorescent cells were originated from a single blastomere of 16-cell stage. Blastomeres were mingled with non-labeled cells after blastula stage. Note the single labeled cells separated from main cluster after the 10-hpf stage (B,C: arrows). Finally, labeled cells scattered to wide region of blastodisc (D), than these of (A). Scale bar indicates  $100\mu\text{m}$ .

節形成期以降には頭部の矮小化など奇形化した胚が観察された。標準的な90 mmのプラスチックシャーレに卵膜未除去の卵を入れた場合、1シャーレにつき20個体程度の密度では正常に発生した。

#### 標識した割球の動態

16~32細胞期に標識した割球を、蛍光顕微鏡により経時的に観察した。標識した割球も、未標識の割球と同様のタイミングで卵割を行い、胞胚期には胚盤表層から深層まで位置する細胞集団を構成した。第1卵割面の形成から8時間後(約1000細胞期)までは標識割球はそれぞれ隣接していたが(Fig. 3A)、10時間後になると標識された細胞の一部が標識細胞の集団から分離し、未標識の細胞中への移動が認められた(Fig. 3B)。その後12時間後(sphere期)までに、標識された細胞と未標識の細胞は大規模に混合し、標識細胞は胚盤のより広い領域へと拡散した(Fig. 3C)。この拡散は、初期囊胚期まで続いた(Fig. 3D)。

#### 考 察

本稿では、20℃におけるシマウキゴリの胚発生過程と発生速度を明らかにするとともに、発生段階の指標となる形態的特徴および器官形成を記述し、表にまとめた(Table 1)。現在まで、ハゼ科魚種では、シロウオ、*Leucopsarion petersii*、および海産のハゼ科魚種、*negro goby*の胚発生過程における形態的変化が観察されている(Arakawa et al. 1999; Ballard 1969)。それらハゼ科魚種とシマウキゴリの胚発生過程を比較すると、胚のサイズに違いがあるものの、後期囊胚形成期に急激に頭部が増大し、体節形成期に卵黄伸長が起こらないなど、胚発生過程での共通の形態的特徴が認められた。また、細胞質と卵黄は、未受精卵の段階から明瞭に部域化され区別できた。この特徴は、ハゼ科魚種 *negro goby* 胚と共通である。しかしながら、受精直後に卵黄と胚盤の細胞質が混在し、胚盤形成過程で細胞質が卵黄細胞の内部を流動して動物極側に集合するゼブラフィッシュなどのコイ目魚類(Leung et al. 2000)とは異なっていた。また、コイ目魚類では、胚発生過程で卵黄細胞の形態は柔軟に変形し、いわゆる卵黄伸長と呼ばれる構造を形成するが、ハゼ科魚類では一貫して球形を維持する。卵黄を構成する成分あるいは卵黄細胞を支持する細胞骨格の違いが、このような胚発生過程における形態の違いの原因ではないかと考えられた。実際、卵形成過程において、卵黄を構成する複合タンパク質であるビテロジェニンの分子構造や卵黄球の存在様式が、魚種によって異なっていることが知られている(高野 1989)。

8細胞期以降は、胚によりいくつかの異なった卵割様式が認められ、その中に割球が上下2層の構造を呈する胚があった。しかし、どの様な卵割様式をとってもその後の形態形成に違いが認められなかった。このことは、初期卵割期の割球の位置や配列パターンの違いは形態形成に重要な役割をもっていないことを示している。さらに、16~32細胞期にFITCで標識した割球の子孫は、初期囊胚期まで胚盤の中で大規模な混合を起こした。この結果は、初期囊胚期まではそれぞれの割球が胚盤の中で位置を変化させても形態形成に影響を与えないことを示している。すなわち本種の発生機構が、少なくとも初期囊胚期まで胚盤の割球に分化多能性が維持されており、卵黄細胞からの誘導により中胚葉および背腹軸が決定されるという、ゼブラフィッシュで提示されている初期細胞分化機構(Ho and Kimmel 1993; Kimmel and Law 1985)と同等であることを強く示唆している。このことから、基本的な胚発生メカニズムは魚類の中で広く保存されているものと考えられる。ハゼ科魚類では、未受精卵の段階から胚盤と卵黄細胞が明確に部域化されていた。このことは、コイ科魚類では不明瞭な胚盤と卵黄細胞の誘導作用も、本種を用いることで実験発生的に明らかにできる可能性がある。今後、この点での詳細な研究も必要である。

シマウキゴリ胞胚期胚盤の各割球のサイズは、胚盤深層部に位置する割球よりも胚盤表層に位置する割球のほうが大きかった。両生類胚では、卵黄顆粒が多量に含まれる植物極では卵割溝の形成速度に遅滞が起こることが報告されている(Hara 1977)。また、最初に生じる緯割は卵黄顆粒の少ない動物極側で起こり、結果として動物極側の割球が細くなることが知られている。HE染色を施した組織切片上では、シマウキゴリ胚の組織切片でも胚盤の表層付近に多量のエオシン好性の顆粒が観察されたことから、胚盤表層における分裂が顆粒により抑制されている可能性が考えられる。一方、囊胚形成から初期体節形成期にかけて胚体が透明化し、それと同時にHE染色を施した組織切片上ではエオシン好性顆粒の消失が認められた。このことから、胚の不透明性はこの顆粒に起因するものであったことを示している。この顆粒がいかなる機構で胚盤の表層に位置しているのか、どの様な機能を有しているか明らかではないものの、胞胚期の胚細胞は分化多能性を持っていることが明らかであることから、分化の方向性を決定する因子としての機能は無いものと考えられる。

サンプリングを行った函館の近郊では、河川の水温の平均が11.8℃から19.5℃の範囲の期間にシマウキゴリの産卵が行われているが、実際には、胚発生期間の

水温は大きく変動する (6.5~23.0°C)。本研究では、胚発生過程の温度条件を均一化するため、水温を一定の20°Cに設定した。自然界と比較して、本研究の条件ではやや高い水温が継続したことになる。しかし、適切な培養条件では多数の個体が正常に発生・孵化し、胚発生の攪乱など悪影響は認められなかった。一方、4°Cの培養条件では胚発生はほぼ停止し、水温を上げると発生を再開した。また半日程度の4°C処理では、その後の胚発生過程に形態的な障害は認められなかった。このように広い温度への耐性を有することと、発生の停止や再開などの調節が可能であることは、初期胚を操作する研究に用いる上で重要な特徴である。

本研究の結果から、卵や卵膜の性質に違いがあっても、基本的な胚発生機構は硬骨魚類中で広く保存されていることが明らかとなった。このことは、胚盤移植による始原生殖細胞の移植 (Yamaha et al. 2001, 2003) など、現在まで一部の魚種に限定されていた発生工学的手法をより多様な魚種へ展開できる可能性を示している。今後は、シマウキゴリでそれらの技術の適用を図り知見を集積すると共に、より多様な魚種での展開が期待される。

## 要 約

20°Cにおけるシマウキゴリの胚発生過程を詳細に観察した。さらに、卵割期における単一割球の標識実験により、胚盤における分化の方向性が決定される時期を明らかにした。その結果、未受精卵の段階から細胞質が卵黄から分離していること、体節形成期に至るまで胚細胞中には卵黄顆粒が分布しているが体節形成期以降消失し胚体が透明化すること、第3卵割以降、卵割の様式が不規則になることが明らかとなった。また、16細胞期から32細胞期に標識された細胞追跡の結果、胞胚期から初期囊胚期まで、標識細胞は未標識の細胞と胚盤内で大規模な混合を起こすことが明らかとなった。この結果は、初期囊胚期まで胚盤の細胞は分化多能性を有していることを示唆している。

## 謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、北海道大学大学院水産科学研究科育種生物学講座の後藤晃助教授、李大雄助手、藤本貴史氏、相田貴紀氏および水産学部の学生諸氏には採卵に関して御協力いただいた。また、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター水圏センター七飯淡水実験所技官の木村志津雄氏。および事務の都木美佐江氏には良好な研究環境を提供していただいた。ここに篤くお礼申し上げる。

なお、本研究は平成14~15年度日本学術振興会科学研究費補助金 (特別研究員奨励費 DC2, No. 0446, 斎藤大樹) および平成14~15年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (1), No. 14360105, 代表研究者 山羽悦郎) により実施された。

## 文 献

- Arakawa, T., Y. Kanno, N. Akiyama, T. Kitano, N. Nakatsuji and T. Nakatsuji (1999) Stages of embryonic development of the ice goby (shiro-uo), *Leucopsarion petersii*. *Zool. Sci.*, **16**, 761-773.
- Ballard, W. W. (1969) Normal embryonic stages of *Gobius niger* jazo. *Publ. Staz. Zool.*, **37**, 1-17.
- Hamada, K. (1968) Development of a goby, *Chaenogobius urotaenia*, with special reference to the gill and the chloride cell. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **3**, 185-197.
- Hara, K. (1977) The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting. *Wilhelm. Roux. Arch. Entwicklunsmech Org.*, **181**, 73-87.
- Ho, R. K. and C. B. Kimmel (1993) Commitment of cell fate in the early zebrafish embryo. *Science*, **261**, 109-111.
- 石野健吾 (1987) ウキゴリ類 - すみ場所への適応と分化。日本の淡水魚類 - その変異・分布・種分化をめぐる (水野・後藤編), 東海大学出版会, 東京, pp. 189-197.
- Kazama-Wakabayashi, M., E. Yamaha and F. Yamazaki (1999) The elimination and duplication of lower part of blastoderm effect on the number of primordial germ cells in goldfish. *Fish. Sci.*, **65**, 577-582.
- Kimmel, C. B. and R. D. Law (1985) Cell lineage of zebrafish blastomeres. I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells. *Dev. Biol.*, **108**, 78-85.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, **203**, 253-310.
- Kusuda, S., T. Teranishi, N. Koide, T. Nagai, K. Arai and E. Yamaha (2004) Pluripotency of cryopreserved blastomeres of the goldfish. *J. Exp. Zool.*, **301**, 131-138.
- Leung, C. F., S. E. Webb and A. L. Miller (2000) On the mechanism of ooplasmic segregation in single-cell zebrafish embryos. *Dev. Growth. Differ.*, **42**, 29-40.
- Mizuno, T., E. Yamaha, M. Wakahara, A. Kuroiwa and H. Takeda (1996) Mesoderm induction in zebrafish. *Nature.*, **383**, 131-132.
- Mizuno, T., E. Yamaha and F. Yamazaki (1997) Localized axis determinant in the early cleavage embryo of the goldfish, *Carassius auratus*. *Dev. Genes. Evol.*, **206**, 389-396.
- Mizuno, T., E. Yamaha, A. Kuroiwa and H. Takeda (1999) Removal of vegetal yolk causes dorsal deficiencies and impairs dorsal-inducing ability of the yolk cell in zebrafish. *Mech. Dev.*, **81**, 51-63.
- Raz, E. (2003) Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 690-700.
- Stevenson, D. E. (2002) Systematics and distribution of fishes



- of the Asian goby genera *Chaenogobius* and *Gymnogobius* (Osteichthys: Perciformes: Gobiidae), with the description of a new species. *Species Diversity*, **7**, 251-312.
- 高野和則 (1989) 卵巣の構造と配偶子形成. 水族繁殖学 (隆島・羽生編), 緑書房, 東京, pp. 3-23.
- Wakamatsu, Y., B. Ju, I. Pristyazhnyuk, K. Niwa, T. Ladygina, M. Kinoshita, K. Araki and K. Ozato (2001) Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 1071-1076.
- Yamaha, E., M. Kazama-Wakabayashi, S. Otani, T. Fujimoto and K. Arai (2001) Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica*, **111**, 227-236.
- Yamaha, E., M. Murakami, K. Hada, S. Otani, T. Fujimoto, M. Tanaka, S. Sakao, S. Kimura, S. Sato and K. Arai (2003) Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica*, **119**, 121-131.