

第一部 テツイロナマコ卵母細胞の微小管構造と
卵核胞の予定動物極への移動の機構

序論

動物の第一次卵母細胞は、第一減数分裂(成熟分裂)の前期で停止している。この時期の卵母細胞は巨大な核をもち、この核は卵核胞(germinal vesicle; GV)と呼ばれている。ホルモンなどの刺激により成熟分裂が再開すると、GVの核膜は崩壊し、その内容物は細胞質中に拡散する。

先の序論でも述べたが、成熟分裂を再開できる準備の整った第一次卵母細胞内でのGVの位置は、それぞれ動物の種類によって決まっており、卵母細胞の中央にある場合(Holland and Gould-Somero, 1981; Habibi and Lessman, 1985; Kuriyama *et al.*)と、卵表の特定の領域に近接している場合(Schroeder, 1985; Gard, 1991)とがある。前者では、成熟分裂が再開するとGVが卵表へと移動し、卵表直下に到達した後に崩壊するが、その移動の機構についてはまだ判っていない。

アフリカツメガエルの卵母細胞では、卵形成の初期にはGVは卵母細胞の中央にあるが、卵形成が進行するにつれて卵黄が植物半球へ蓄積されていき、GVは相対的に動物極側へと押しやられ、卵表に接するようになる(Danilchik and Gerhart, 1987)。このような端黄卵ではGVが卵表に移動するための特別な仕組みは必ずしも必要ではない可能性も考えられる。しかし、卵成熟誘起後短時間のうちにGVが動物極へと急速に移動する卵母細胞では、GVを卵表へと移動させるために何らかの機構が必要であると考えられる。

本研究では、GVの予定動物極への移動の機構を調べるために、理学部附属館山臨海実験所近くの湾に多数生息しているテツイロナマコの卵母細胞を用いて実験・観察を行った。テツイロナマコは、GVが卵母細胞の中央にあり、卵成熟の誘起後に動物極へと移動する種である。①卵母細胞は比較的透明で大きく、GVの位置が通常の光学顕微鏡で観察できる、②将来動物極となる部分の卵表には、細胞質の突起(動物極突起)があるため、卵成熟再開後GVが移動していく方向をあらかじめ知ることができる、③*in vitro*で卵成熟分裂を任意に引き起こすことができる、などの特長を持ち、GV移動の機構を研究する材料に適している。

材料と方法

材料

東京湾で採取した生殖期のテツイロナマコ (*Holothuria moebi*) は、理学部附属館山実験所の循環水槽にて飼育した。卵母細胞は、親の背中を切り開いて卵巣を取り出し、それをCa²⁺欠如人工海水中に移してピンセットでしごき出すことで得た。Ca²⁺欠如人工海水で数回洗い、卵母細胞の周囲にある濾胞細胞が外れたことを顕微鏡で確認してから、正常海水中に移してさらに数回洗ってから使用した。

ゼリー層の除去

卵母細胞の周囲には厚いゼリー層がある。一部の実験ではゼリー層を除去した卵母細胞を使用した。ゼリー層はHClでpH 4.5 に調整した酸性海水に約30分間卵母細胞を浸すことで除去した。

卵成熟誘起物質の調整

ナマコの卵成熟を誘起する物質はまだ同定されていないが、dithiothreitol (Maruyama, 1980) やヒトデ類の放射神経抽出物 (Strathmann and Sato, 1968; Maruyama, 1986) などが有効であることが知られている。今回の実験では、ヒトデ (*Asterias amurensis*) の放射神経から次の方法により抽出物を得た。まず、ヒトデ5匹分の放射神経を6 mlの蒸留水でホモジェナイズした後、約5000×gで10分間遠心した。上清を80℃で10分間湯煎し、再度遠心して沈澱物を取り除いた上清を凍結保存した。使用する際には、同量の2倍濃縮海水と混合し、さらに海水で10倍に希釈した。

細胞骨格毒による処理

微小管を脱重合させる nocodazole (Sigma Chemical Co.) と、微小繊維の重合を阻害する cytochalasin B (Aldrich Chemical Co.) はそれぞれ、200µg/ml, 2mg/mlの濃度になるようにdimethylsulfoxideに溶解した。使用の際には、正常海水でそれぞれ0.5µg/ml, 5µg/mlに希釈した。処理時間は30分とした。

遠心顕微鏡による観察

GVは卵母細胞の中央にあるときからすでに移動に関わる構造によって特定の部域と結ばれているのか、あるいは、卵成熟の誘起後に何らかの構造が形成されるのか、を知る手掛かりとして、GVに対する遠心力の作用を調べた。GVの比重は周囲の細胞質の比重よりも小さいので (Nemoto *et al.*, 1980; Nemoto *et al.*, 1992), 遠心力をかけるとGVには求

心方向へ向かう力が働くからである。

卵母細胞は遠心中に向きが変わらないようにするため、厚み60 μ mの両面テープで貼り合わせた大小2枚のカバーガラスのすき間に入れてその向きを固定した。この卵母細胞を入れたチャンバーを、厚さ1mmの亚克力板で作った20 \times 20 \times 3mmのキュベットに入れ、卵母細胞と比重が近い1M sucroseとSWを5.5:4.5の割合で混合した溶液 (Nemoto *et al.*, 1980) で満たした。遠心には遠心顕微鏡を用いた。本実験で使用したストロボスコープ型遠心顕微鏡 (Kamitsubo *et al.*, 1989; Hiramoto and Kamitsubo, 1995; 図1)は、顕微鏡のステージの部分が回転し、サンプルがレンズの下を通ると同期してストロボが発光する仕組みになっているので、遠心中のサンプルが静止像として観察できる。また、遠心しながらでも試料の照準とX-Y方向の走査が自由に行えるという特長をもっている。この遠心顕微鏡のステージにキュベットをセットした。

遠心中の卵母細胞の光学像はビデオカメラC2847 (浜松ホトニクス) によって撮像し、映像信号リアルタイム微分処理回路、リアルタイム画像処理装置イメージΣ-II (日本アビオニクス) によるコントラスト増強、アベレーシング、ガンマ補正などの処理を行った。記録はビデオカセットレコーダ S-VHS RB -S3600 (ビクター) で録画した。

間接蛍光抗体法による微小管構造の観察

卵母細胞の微小管による構造を調べるために、抗 α -tubulin抗体を用いた間接蛍光抗体法で微小管を染色した。染色は東北大学・浅虫臨海実験所の経塚啓一郎氏らの方法 (参照: Sawada and Schatten, 1989) を改良して使用した。一次抗体はmonoclonal anti-mouse α -tubulin (Amersham Corp.) を0.1%牛血清アルブミンを含むphosphate-buffered saline (PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄, 8.0mM Na₂HPO₄, pH 7.3) に1000倍に希釈したものをを用いた。二次抗体はFITCでラベルされたgoat anti-mouse IgG (Tago, Inc., Burlingame, CA) を0.1%牛血清アルブミンを含むPBSで500倍に希釈したものをを用いた。手順は、まずHClでpH4.5に調整した海水に卵母細胞を浸し、ゼリー層と卵膜とを除去した。正常な海水で数回洗った卵母細胞をCaFSWで2回洗った後、extraction medium (EM: 10 mM EGTA, 10 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1%(w/v) Triton X-100, 20% glycerine, 0.04% NaN₃, 0.2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 25 mM imidazole (pH 6.9)) で15分間処理した。poly-L-lysine (Sigma) でコートしたスライドガラスにEM処理した卵母細胞を貼り付け、-20 $^{\circ}$ Cのmethanolで1時間固定した。次に固定した卵母細胞をPBSに30分以上浸けて水和させてから一次抗体で1時間処理し、その後PBSで3回洗った。二次抗体は40分間処理し、PBSで3回洗った。また、DNAを4,6-diamidino-2-phenyl-indole dihydrochloride (DAPI, Sigma) 0.5 μ g/mlで15分間染色した。その後、卵母細胞を10% 10mM Tris-HCl (pH8.0) と2.3% 1,4-diazabicyclo-[2.2.2.] octane (退色防止剤) を含むglycerolで封入し、蛍光顕微鏡 (Nikon, OPTIPHOTO)

で観察した。励起光フィルターは、FITCにはB2(主波長 495nm)を、DAPIにはUV (365nm)を用いた。

CELLscan Systemによる微小管構造の観察

通常の蛍光顕微鏡による観察では、焦点面以外の蛍光も同時に観察されてしまうため、構造の細部や詳細な位置関係などは観察しにくい。そこで微小管の分布や構造についての三次元的な情報を、CELLscan System (エムエス機器株式会社)により得た。CELLscan Systemは、通常の蛍光顕微鏡で得られるある焦点面での画像について、焦点面以外からの光を計算によって発生面へ戻し、焦点面以外のところから出ている光を除去するシステムを備えている。この手段により実際に試料の切片を作らなくても光学的な断層像が観察でき、さらに、焦点面を変えることによって、試料内の異なる平面での光学的断層像を連続して得ることができる。蛍光抗体染色は、上に記した方法と同じである。動植物軸が光軸に対して直角に向いている卵母細胞について、蛍光を捕えることができる範囲で、0.25～0.5 μm の間隔の断層像を撮像した。

電子顕微鏡による観察

卵母細胞を3% glutaldehyde・海水 (pH 7.0) で前固定し、その後、1% OsO₄ (0.05M sodium-phosphate buffer, pH6.4) で後固定した。エタノールで脱水後、uranyl nitrate とlead acetateでブロック染色した。サンプルは、Falconのフラットシャーレを用いてPoly/Bed 812 樹脂 (Polyscience Co.) に包埋した。動物極突起を目印にしてトリミングし、超薄ミクロトーム (Sorvall MT-2) で厚さ0.1 μm の連続切片を作成した。切片をコロジオンと炭素で被膜したスロットグリッドに10～20枚ずつのせ、透過型電子顕微鏡 (日立H-3000) で観察した。なお、切片の作製と観察とは、名古屋市立大学の加藤宏一先生にお願いした。

結果

正常な卵母細胞の卵成熟

移動の過程で起こるGVの形態の変化を微分干渉顕微鏡を用いて観察した。卵成熟誘起前のテツイロナマコの卵母細胞は、中央にGVがあり、卵表の一部に細胞質の突起(動物極突起)が観察される(図2)。ヒトデ放射神経の抽出物を用いて卵成熟を誘起すると、約15分後に動物極突起の方向へのGVの移動が開始した。移動が進むに連れてGVの動物極側は平らになり、徐々に平らな部分が広がった。また、GVの移動中は卵の動物極突起の付近が少し平らになった。約25分後にはGVは卵表へと到達し、卵表に押し付けられたように扁平になり、約30分後に崩壊した。第一極体、第二極体はそれぞれ約80分後、約110分後に突起のところに放出された。

GVが移動している時期に、動物極突起とGVとの間を詳しく観察したところ(図3)、GVの移動が始まるころに動物極突起のつけねの部分に屈折率の違う部分が現われ、突起とGVとの間に繊維状の構造が観察された(図3-10',15')。このときGVの動物極側の膜の一部分は動物極側へ少し突き出したようになった(図3-15')。GVの移動が進むに連れて、動物極突起に面したGVの膜は平らになり、その部分の膜には凹凸が観察された(図3-18')。さらに移動が進むと、突起とGVとの間の屈折率の違う構造は大きく発達し(図3-20')、GVは扁平になって、動物極突起まで移動した(図3-25')。

細胞骨格毒の影響

細胞骨格を破壊する処理を行った卵母細胞でGVの移動が起るかどうかを調べた。微小管を破壊するnocodazoleで卵母細胞を処理した後に卵成熟を誘起した場合、GVの移動は起きなかった(図4-b)。また、正常な卵母細胞にみられた繊維状の構造(図3)は観察されなかった。GVの崩壊は卵の中央でcontrolと同じタイミングで起った。微小繊維を破壊するcytochalasin Bで卵母細胞を処理した場合は、GVの移動は正常に起こった(図4-c)。

ゼリー層除去卵の卵成熟

ゼリー層を除去した卵母細胞では動物極突起は認められなかった。このような卵母細胞は卵成熟を誘起すると、GVの移動が始まるころから卵表の一部がくぼみ(図5-a, 15')、GVの移動が進み動物極突起側が平らになるころくぼみは最大になった(図5-a, 20')。くぼみはGVが動物極へと到達するする前から徐々に戻り始め(図5-a, 25')、GVの移動が完了すると完全に元に戻った(図5-a, 30')。nocodazole処理によってGVの移動が阻害された卵では卵表のくぼみはできなかった(図5-b)。

遠心顕微鏡による観察

GVは卵母細胞の中央にあるときからすでに移動に関わる構造によって特定の卵表部域と結ばれているのか、卵成熟の誘起後にGVの移動に関わる構造が現れるのか、この点を検討した。まず、GVが中央にある卵母細胞に、GVを移動させるような力をかけ、その方向の違いによってGVの移動率が変わるかどうかを調べた。GVを移動させるような力には遠心力を利用した。GVは膜の遠心端、求心端の位置を、遠心の前と後とで比較し、両端とも位置が変わった場合に、移動したとみなした。

同一のバッチの未処理卵について遠心したところ、約100×gではGVが移動する卵母細胞はなかったが、約160×gでは約5%の卵母細胞のGVが求心方向へと移動するようになった(表1)。遠心力を強くするとGVの移動率も高くなった。一方、nocodazole処理卵では約100×gで20%、約180×gで88%の卵母細胞でGVが移動した。

次に、いくつかのバッチの卵母細胞を140～180×gで遠心し、GVが引き寄せられる方向が①動物極方向、②植物極方向の卵母細胞を選んでGVの移動率を調べた(表2)。未処理卵、cytochalasin B処理卵とも140～160×gのときはGVは移動しにくかったが、nocodazole処理卵では約80%の卵母細胞でGVが移動した。また、160～180×gの場合、未処理卵では動物極方向には55.9%、植物極方向には37.5%が、cytochalasin B処理卵では動物極方向には35.1%、植物極方向には23.3%の卵母細胞でGVが移動したが、各処理での2方向の結果について二項検定を行ったところ、動物極方向と植物極方向へのGVの移動率に有為の差はなく、未成熟卵では、GVを卵表の特定の部域につなぐ構造はないことがわかった。

卵成熟の開始後にGVと動物極とを結ぶ構造ができる可能性を探るため、何も処理をしていない卵母細胞を約350×gで遠心しGVを植物極側へと移動させた後、卵成熟を誘起した。これらの卵母細胞では、GVはcontrol卵での移動開始より10～15分遅れて動物極突起の方向への移動を開始した(図6)。崩壊はcontrol卵より5～15分以上遅れて起こった。GVは動物極突起の付近まで移動する場合(図6-a)と、卵の中央で崩壊する場合(図6-b)とがあった。また、ほとんど移動せずに崩壊する例も少数例あった。

間接蛍光抗体法による微小管の観察

抗 α -tubulin抗体を用いた蛍光抗体染色により卵成熟過程での微小管の構造を観察した(図7)。卵成熟誘起前の卵母細胞では(図7-a)、大まかに分けると、動物極突起を中心として放射状に広がる構造、GVを取り囲む構造と、細胞質全体に広がる細かい網目状の構造の3種類が観察された。

卵成熟を誘起すると、GVの移動が開始するころの卵母細胞では、動物極突起とGVとの間に新たな構造が観察された(図7-b)。また、GVの周囲を取り囲む微小管は動物極突起に面した部分により多く観察された。卵成熟誘起後時間が経つにつれて細胞質全体に見

られる網目のような構造は植物極側から徐々に減少していたが、逆に放射状の構造は密度が高くなっていった(図7-c)。GVが動物極突起の直下まで移動した卵では(図7-d)、GVを取り囲むように動物極突起から微小管が伸びていた。以上のように、GVが移動するときには動物極突起とGVとを結ぶような微小管の構造があり、移動が進んだ状態では動物極側に微小管が多く集まっていることがわかった。

卵成熟中のDNAの様子も観察した。未成熟の卵母細胞のDNAはほとんど凝縮はしておらず、GVの膜に沿って広がっていた(図7-a')。卵成熟を誘起すると、DNAは凝縮し、粒状になって染色体を形成していた(図7-b')。GVが移動している時期では、さらに凝縮が進み(図7-c')、GVの移動が完了するころにはDNAは一ヶ所に集まっていた(図7-d')。

nocodazole処理卵では、未処理卵のようなGVを取り囲む構造や細胞質の網目状構造はなくなっていたが、突起の部分には微小管が残っていた(図8-a)。また、放射状の微小管も多少認められた(図8-a')。cytochalasin B処理卵では未処理卵と比べて微小管構造に変化は見られなかった(図8-b)。

CELLscan Systemによる観察

未成熟卵については、動植物軸が光軸に対して直角に向いている卵母細胞について、蛍光が初めに観察される場所から厚さ9 μm の範囲で0.25 μm ごとに切片を作製した(図9)。動物極突起の部分が特に明るく染色されており(図9, 03-27)、卵表に沿って微小管が発達していた(図9, 09-24)。また、動物極突起とGVとの間に細い微小管が多数認められた(図9, 10-31)。GVの周囲にも微小管構造が観察された(図9, 12-26; 17の白矢じり)。

卵成熟誘起から10分後の、GVが移動を開始する直前の卵母細胞の観察では、動植物軸が光軸に対して直角に向いている卵母細胞について、蛍光が観察される場所から厚さ24 μm の範囲で0.5 μm ごとに切片を作製した(図10)。突起の部分では強く染色される領域が未成熟卵に比べて広く(図10, 25-40)、また、卵表に沿って伸びる微小管も発達し、太さを増していた(図10, 12-22)。未成熟卵の場合と違って、動物極突起とGVとをつなぐ新たな微小管構造が形成され、その末端はGV表面に達していた(図10, 19-38)。

電子顕微鏡による観察

一般に、微小管形成の中心には中心体があるといわれている。未成熟卵では動物極突起を中心とする放射状の微小管構造が観察され、卵成熟を誘起すると突起とGVとをつなぐ構造が新たに形成されることから、突起の部分に中心体が存在することが予想されたので、電子顕微鏡で動物極突起の付近に中心粒があるか否かについて調べた。

未成熟卵の動物極突起の付近には、大きな顆粒が比較的少ない領域があり、その中に小さな袋状の構造が集まっている部分があった。そしてその内部に2つの中心粒が離れて観察された(図11-1, 黒い枠の中)。前後の切片を観察すると、直交する一対の中心粒が、き

わめて近い距離に2組観察された(図11-2~8). 動物極突起付近に中心体が2つ存在することが確認された.

考察

ナマコの卵母細胞の微小管構造については、これまでに、卵成熟を誘起する以前からすでにGVが動物極に付着している種類のナマコ (*Stichopus californicus*) の卵母細胞のGV付近を電子顕微鏡で観察した報告 (Smiley and Cloney, 1985) はあるが、GVが中央にある卵母細胞全域の微小管については本研究が初めての報告である。

間接蛍光抗体法による観察から、ナマコの未成熟の卵母細胞に特徴的な微小管構造として、動物極突起を中心として放射状に広がる微小管が観察された。電子顕微鏡による観察から、動物極突起には中心体が存在することが明らかになったので、この放射状の構造は、中心体から形成された微小管で構成されていると考えられる。第二部でも示すように、ヒトデ卵母細胞ではGVが最も近接する卵表部分に星状体様の構造があり (Wilson and Mathew, 1895), その要となる部分には中心体が存在する (Kato *et al.*, 1990)。ナマコ卵の動物極突起を中心とする放射状の構造は、ヒトデ卵にみられる、いわゆる pre-meiotic aster に相当するものと思われる。この放射状の構造以外には、細胞質全体に広がる網目状の構造と、GVの周囲を取り囲む微小管とが観察された。

卵成熟誘起前にはGVは卵母細胞の中央にある。観察された放射状微小管の先端がGVに到達しているか否かは確認できなかったが、遠心の結果から、この時期には動物極突起とGVとを結ぶしっかりとした構造はまだ無いものと思われる。ただし、nocodazole処理によって、遠心でGVが移動しやすくなることから、GVの卵中央への保持に微小管が関わっていることが示唆される。細胞質の網目状構造である可能性が高いと思われる。

卵成熟誘起後、GVが移動を開始すると、GVの膜の動物極側のきわめて狭い範囲が突起状になる。移動が進むとその付近の膜は平らになり、その範囲は広がっていく。この時期、動物極突起とGVとを結ぶ構造が発達し、GVが移動するにつれて太く、短くなっていく。動物極に達すると、GVは広い範囲で卵表に接し、扁平になる。卵表と微小管、および、微小管とGVとの結合様式はわからないが、cytochalasin BはGVの移動や崩壊を阻害しないことから、微小繊維(アクチン)はその結合に関与しないと推測される。これらの結果から、GVの移動に関して以下の微小管構造の変化が推測される(図12)。①卵成熟を誘起する前の卵母細胞では、動物極突起を中心とする放射状の微小管構造が存在するが、GVと動物極突起とを結ぶような太い微小管構造は見当たらない(卵成熟誘起前)。②卵成熟の再開により突起付近とGVとを結ぶ微小管構造が現われて、GVの狭い範囲に結合する(10分)。③GVの移動が始まり、GVと動物極とを結ぶ微小管が発達し、GVの広い範囲に結合するようになる(15分)。細胞質の微小管構造は徐々に減少する。④動物極とGVとを結ぶ構造は短くなって、GVは動物極に到達し、崩壊までその位置に保持される(30分)。

少なくとも、細胞分裂周期にある細胞では、中心体は核膜の近くに位置することが知られている。卵母細胞を形成するための分裂期にある卵原細胞でも、中心体は核膜の近くに位置すると推測される。しかし、今回の観察では、第一減数分裂前期で停止している卵母細胞では、中心体が核から遠く離れていた。卵母細胞の成長段階で中心体と核膜とがいったん遠く離れ、その後再び近接するのは興味深い現象である。中心体と核とがいったん離れる理由は明らかではないが、第一減数分裂の前期で停止している間に核内に大量の物質を蓄積するためには、GVが卵母細胞の中央にあるほうが都合がいいのかもしれない。また、卵母細胞の細胞質の準備が整うまでは、減数分裂の開始を阻止するための工夫とも考えられる。中心体が核から離れて予定動物極に存在することは、卵の極性の成り立ちを知る上で興味深い。

ナマコの卵母細胞では予定動物極に顕著な細胞質の突起がある。図5に示したように、動物極突起はゼリー層を除去すると消失するので、その形態は固いゼリー層によって保たれているものと思われる。ゼリー層を除去したとき、いくつかの卵母細胞では濾胞細胞の塊が突起の先端に付いていた。また、微分干渉顕微鏡で注意深く観察すると、突起の部分にゼリー層の切れ目が見えることもあった。このように、突起の部分はゼリー層に覆われていないと判断される。動物極突起の存在理由はわかっていないが、卵形成過程で栄養の供給源である濾胞細胞に接していた箇所である可能性が示唆されている (Smiley and Cloney, 1985)。そうであれば、予定動物極は卵形成のごく初期に決定されることになる。ナマコ卵母細胞は、胚発生の基本軸となる動植物軸の決定の研究に適した材料であると思われる。

参考文献

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. and Watson, J. D. (1983).
Molecular biology of the cell, Garland Publishing, Inc., N. Y.
- Gard, D. L. (1991). Organization, nucleation, and acetylation of microtubules in
Xenopus laevis oocytes: A study by confocal immunofluorescence microscopy.
Dev. Biol. **143**, 346-362
- Gard, D. L. (1993). Ectopic spindle assembly during maturation of *Xenopus* oocytes:
Evidence for functional polarization of the oocyte cortex. *Dev. Biol.* **159**, 298-310
- Habibi, H. R. and Lessman, C. A. (1985). Effects of cytochalasin B on steroid-induced
oocyte meiosis and centrifugally induced nuclear movement in the goldfish
Carassius auratus. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 743-751
- Hiramoto, Y. and Kamitsubo, E. (1995). Centrifuge microscope as a tool in the study
of cell motility. *International review of cytology.* **157**, 99 - 128
- Holland, J. and Gould-Somero, M. (1981). Electrophysiological response to
insemination on oocyte of *Urechis caupo*. *Dev. Biol.* **83**, 90-100
- Kamitsubo, E., Ohashi, Y., and Kikuyama, M. (1989). Cytoplasmic streaming in
internodal cells of *Nitella* under centrifugal acceleration: a study done with a
newly constructed centrifuge microscope. *Protoplasma* **152**, 148-155
- Kato, K. H., Washitani-Nemoto, S., Hino, A. and Nemoto, S. (1990). Ultrastructural
studies on the behavior of centrioles during meiosis of starfish oocytes. *Develop.
Growth Differ.* **32** (1), 41-49
- Kishimoto, T., Hirai, S. and Kanatani, H. (1981). Role of germinal vesicle material
in production maturation-promoting factor in starfish oocytes. *Dev. Biol.* **81**, 177-
181

- Kuriyama, R., G. G. Borisy and Masui, Y. (1986). Microtubule cycles in oocytes of the Surf Clam, *Spisula solidissima*: An immunofluorescence study. *Dev. Biol.* **114**, 151-160
- Maruyama, Y.K. (1980). Artificial induction of oocyte maturation and development in the sea cucumbers *Holothuria leucospilota* and *Holothuria pardalis*. *Biol. Bull.* **158**, 339-348
- Maruyama, Y.K. (1986). Induction of sea cucumber oocyte by starfish radial nerve extracts. *J. Exp. Zool.* **238**, 241-248
- Nemoto, S., Yoneda, M., and Uemura, I. (1980). Marked decrease in the rigidity of starfish oocytes induced by 1-methyladenine. *Develop. Growth Differ.* **22**, 315-324
- Nemoto, S., Yamamoto, K., and Hashimoto, N. (1992). A nuclear extract, prepared from mass-isolated germinal vesicles, retains a factor able to sustain a cytoplasmic cycle of starfish oocytes. *Dev. Biol.* **151**, 485-490
- Smiley, S. and Cloney, R. A. (1985). Ovulation and the fine structure of the *Stichopus Californicus* (Echinodermata: Holothuroidea) fecund ovarian tubules. *Biol. Bull.* **169**, 342-364
- Sawada, T. and G. Schatten (1989). Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilization and early development in the ascidian *Molgula occidentalis*. *Dev. Biol.* **132**, 331-342
- Schroeder, T. E. (1985). Cortical expressions of polarity in the starfish oocyte. *Develop. Growth Differ.* **27**, 311-321
- Strathmann, R. R. and Sato, H. (1968). Increased germinal vesicle breakdown in oocytes of the sea cucumber *Parastichopus californicus* induced by starfish radial nerve extract. *Exp. Cell Res.* **54**, 127-129

Wilson, E. B. and Mathews, A. P. (1895). Maturation, fertilization and polarity in the echinoderm egg. *J. Morphol.* **10**, 319-342.

Wilson, E. B. (1925). *The cell in Development and Heredity*. Macmillan Co., N.Y.

Yamada, H. and Hirai, S. (1984). Role of contents of the germinal vesicle in male pronuclear development and cleavage of starfish oocytes. *Develop. Growth Differ.* **26**, 479-487

Yamamoto, K. (1985). Germinal vesicle contents are required for the cytoplasmic cycle during meiotic division of starfish oocytes. *Dev. Biol.* **107**, 213-219

表1 各遠心加速度においてGVが移動した卵母細胞の割合

遠心加速度 ×g	GVが移動した卵母細胞の割合	
	未処理卵	nocodazole処理卵
103	0/21* (0%)	3/15 (20%)
140	0/8 (0%)	—
161	1/19 (5%)	—
183	4/24 (17%)	14/16 (88%)
232	6/14 (43%)	8/8 (100%)
286	7/11 (64%)	—
346	7/9 (78%)	—

テツイロナマコの卵母細胞を各遠心力で25分間遠心したとき、GVが求心方向へと移動した卵母細胞の割合。

*GVが移動した卵母細胞の数／遠心をした卵母細胞の総数。

表2 GVが移動する方向とGVが移動した卵母細胞の割合

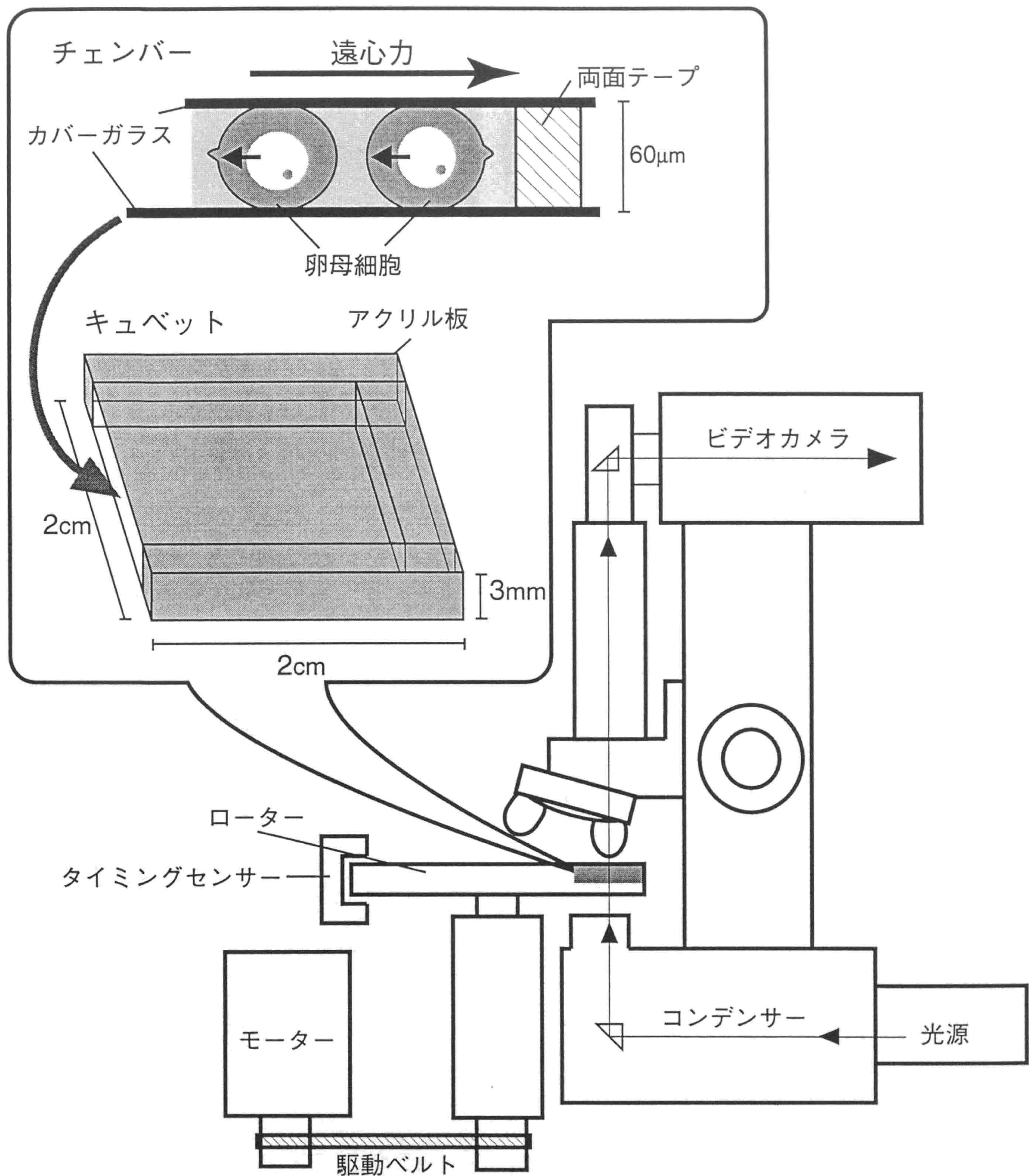
遠心加速度	処理	GVが移動した卵母細胞の割合	
		動物極方向	植物極方向
140~161 ×g	untreated	7/80* (8.8%)	5/88 (5.7%)
	nocodazole	59/70 (84.3%)	54/69 (78.3%)
	cytochalasin B	0/39 (0%)	0/49 (0%)
161~183 ×g	untreated	19/34 (55.9%)	18/48 (37.5%)
	nocodazole	42/48 (87.5%)	44/48 (91.7%)
	cytochalasin B	13/37 (35.1%)	10/43 (23.3%)

nocodazole, あるいはcytochalasin Bで処理したテツイロナマコ卵母細胞を遠心した場合の, GVが移動した卵母細胞の割合.

GVが移動する方向を動物極側と植物極側とに分けている.

*GVが移動した卵母細胞の数/遠心をした卵母細胞の総数.

図1 遠心顕微鏡模式図



チェンバー

カバーガラス2枚を厚み60µmの両面テープで貼り合わせ卵母細胞をはさむ。

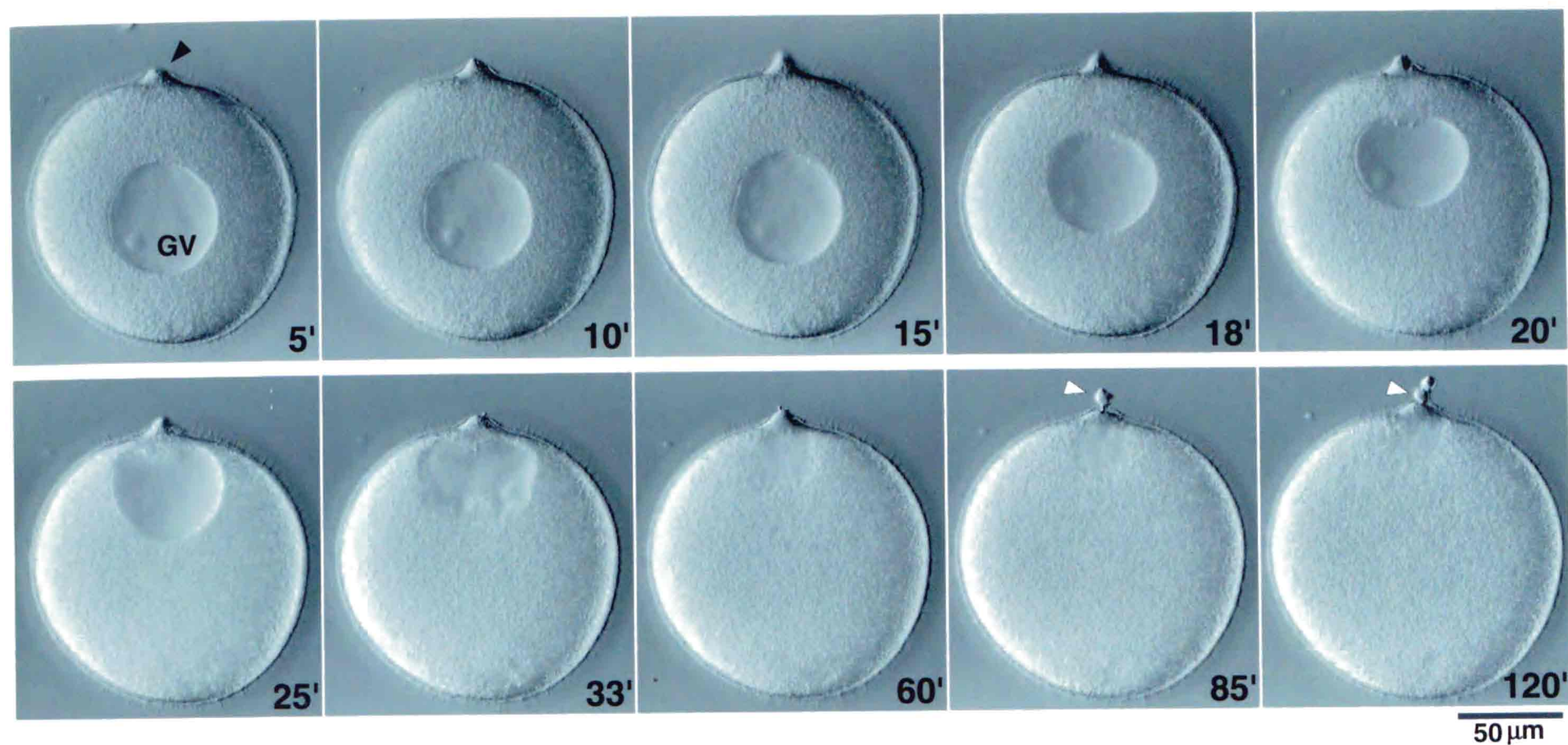
キュベット

厚み1mmのアクリル板2枚を、同じアクリル板の短冊をはさみこんで、貼り合わせる。1Msucrose：海水=4.5：5.5（体積混合比）の混合溶液で満たし、チェンバーを装填した後、遠心顕微鏡のローターにセットする。

遠心顕微鏡

ローターにセットした試料が顕微鏡の対物レンズの下を通る度に光源が瞬間的に発光し、試料が静止像として観察できる。顕微鏡自体やtiming sensorをそれぞれ動かすことによって、チェンバー内を前後、左右に走査することができる。

図2 テツイロナマコ卵母細胞の卵成熟



テツイロナマコ卵母細胞の卵成熟をヒトデの放射神経の抽出物を用いて誘起した。

微分干渉顕微鏡を用いて観察した。

数字は卵成熟誘起からの時間(分)。

卵母細胞の中央に観察される卵核胞(GV)は、卵成熟誘起後15分ごろから動物極突起(黒矢じり)の方向へと移動し、卵表直下に近接する。白矢じりは突起のところに放出された極体を示す：

第一極体(85'), 第二極体(120')。

図3 テツイロナマコ卵母細胞の卵成熟（部分）

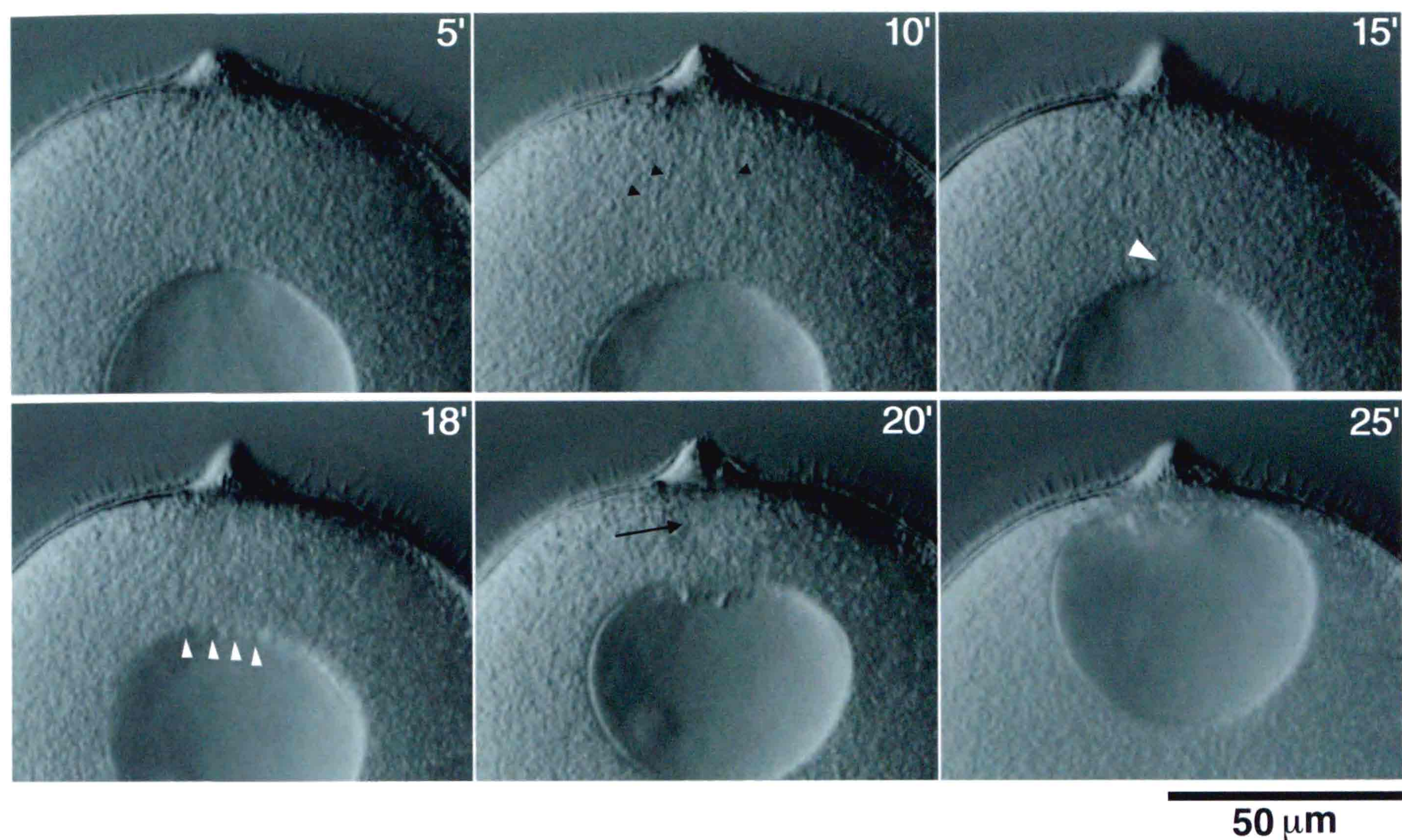
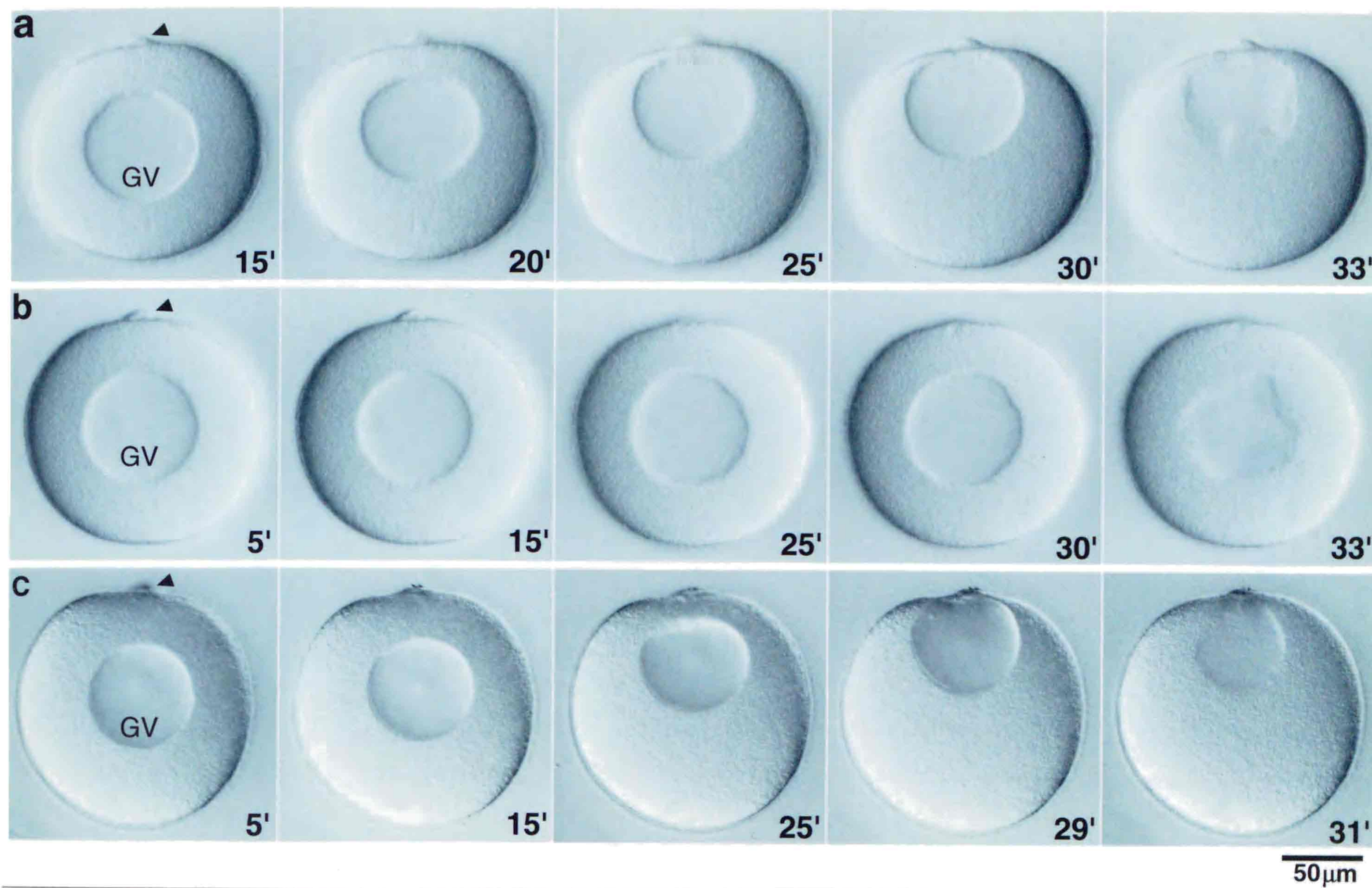


図2の動物極突起とGVとの間の拡大図。数字は卵成熟誘起からの時間(分)。
GVの移動が開始する直前(10')に、動物極突起とGVとを結ぶ繊維状の構造(黒矢じり)が現われる。GVの移動が開始するころ(15'), GV膜は動物極突起に面した部分の一部が飛び出し(白矢じり), 移動中はその部分を含むより広い範囲で凹凸になる(18'の白矢尻)。また、動物極突起とGVとを結ぶ構造が発達する(20'の黒矢印)。

図4 nocodazole処理卵とcytochalasin B処理卵の卵成熟



nocodazole処理あるいはcytochalasin B処理をしたテツイロナマコ卵母細胞の卵成熟を誘起した。黒矢尻は動物極突起を示す。数字は卵成熟誘起からの時間(分)。

a: 未処理卵

GVは卵成熟誘起後約15分から移動を開始し、約15分後に動物極突起の直下へと到達する。

b: nocodazole処理卵

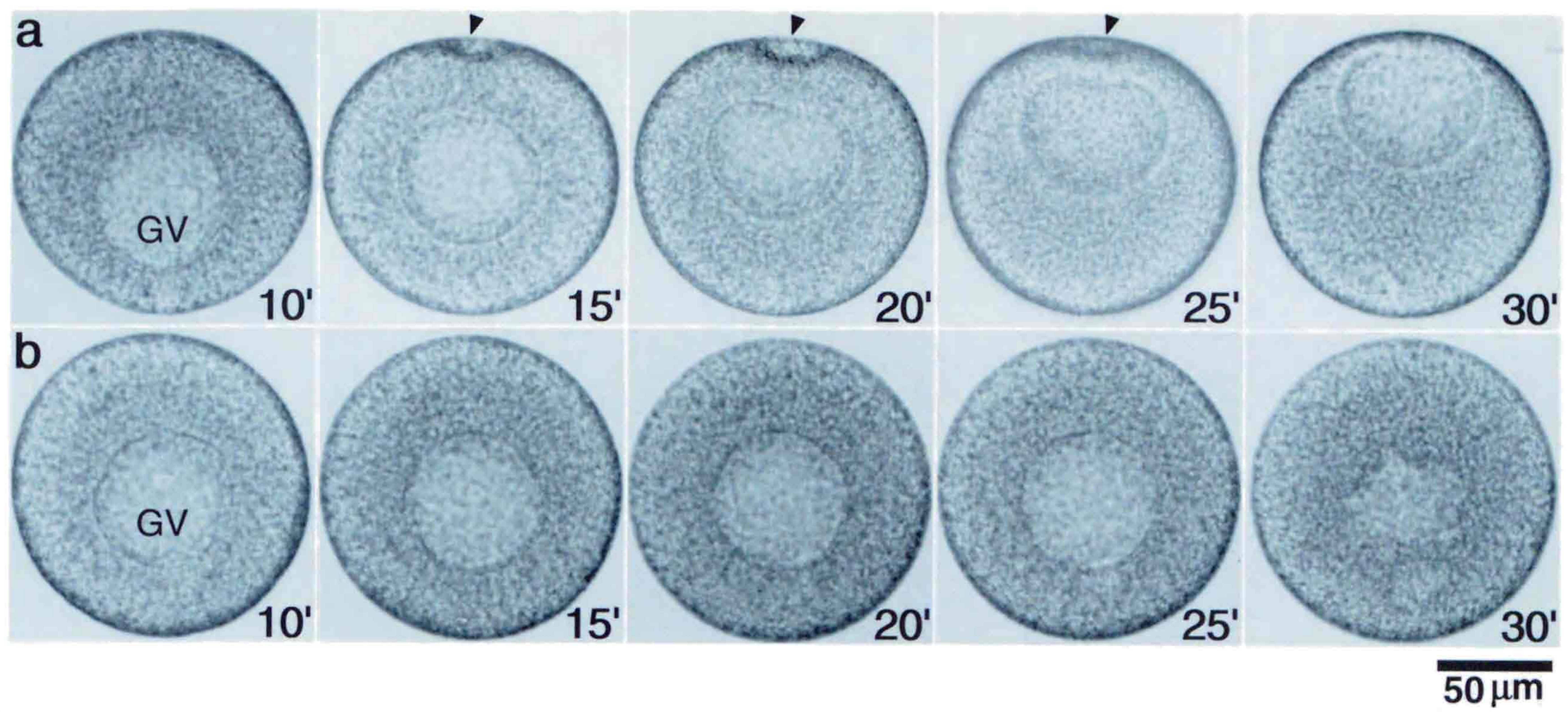
卵成熟を誘起してもGVの移動は起こらない。

c: cytochalasin B処理卵

未処理卵と同様にGVの移動が起こる。

nocodazole処理卵もcytochalasin B処理卵もGV崩壊のタイミングは未処理卵とかわらない。

図5 ゼリー層除去卵の卵成熟



数字は卵成熟誘起からの時間(分)。

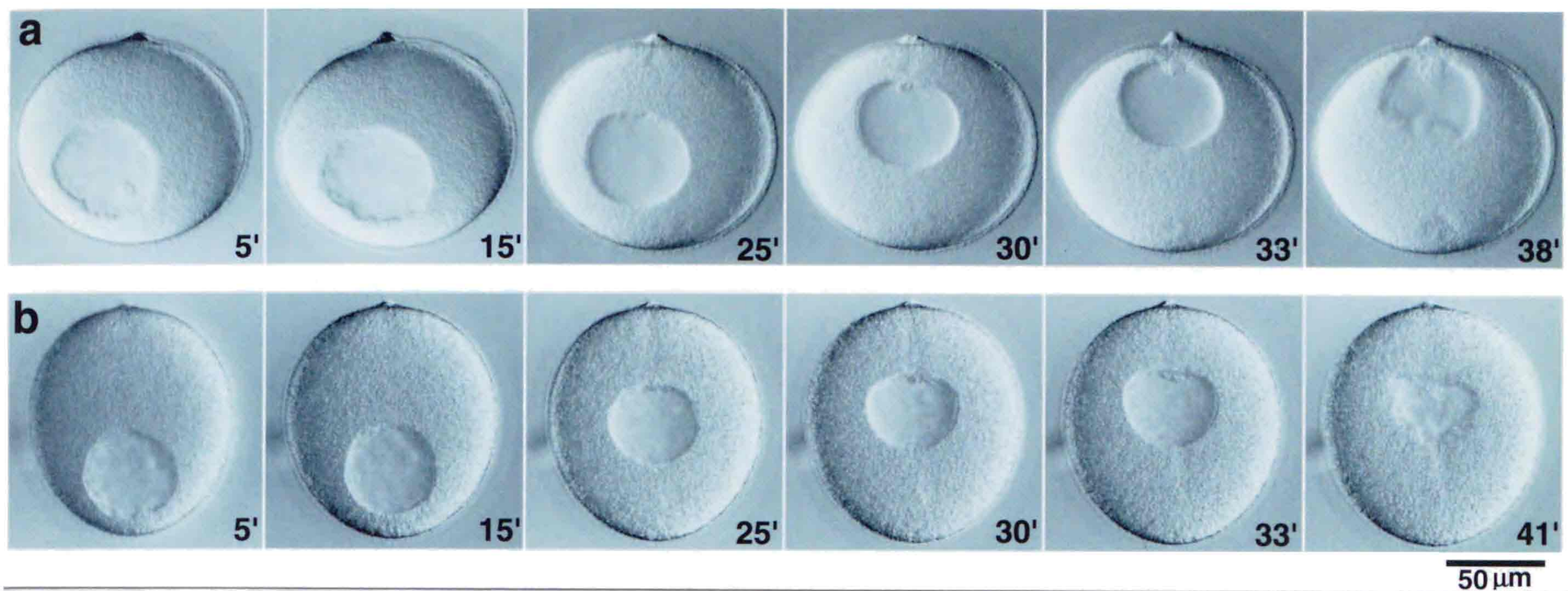
a: ゼリー層を除去したテツイロナマコ卵母細胞

GVが移動するにつれて卵表の一部(本来動物極突起があったところ; 黒矢じり)がくぼむ。

b: ゼリー層を除去し, さらにnocodazole処理をした卵母細胞

nocodazole処理をすると, GVの移動は阻害され, 卵表のくぼみは観察されない。

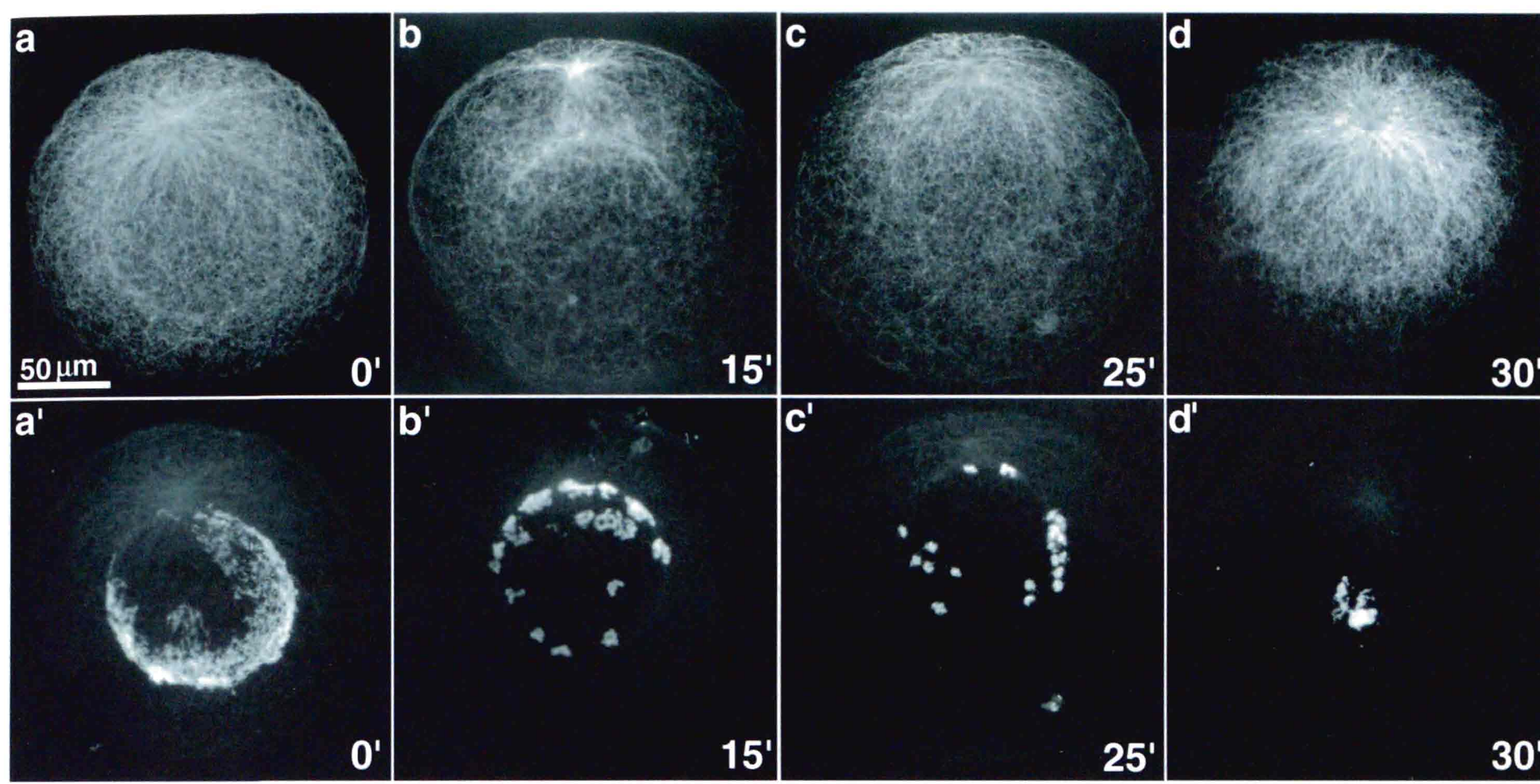
図6 遠心をしてGVを植物極側へと移動させた卵母細胞



GVを植物極側へ移動させたテツイロナマコの卵母細胞について卵成熟を誘起した。数字は成熟誘起からの時間(分)。

GVが動物極まで移動する場合(a)と、卵の中央で崩壊する場合(b)があった。移動の開始は正常な卵母細胞より5~10分遅れた。また、ほとんど移動せずにGVの崩壊が起こる場合も少数例あった。

図7 テツイロナマコ卵母細胞の微小管構造と染色体



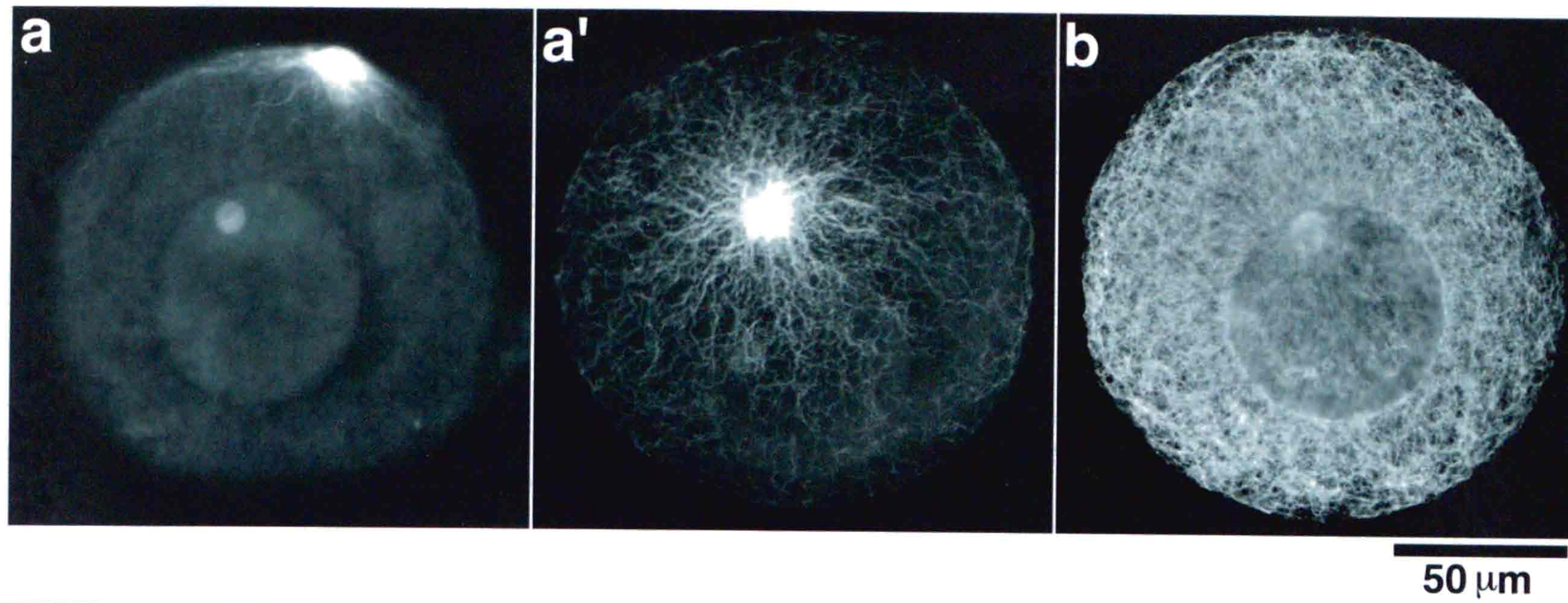
卵成熟誘起後のテツイロナマコ卵母細胞の微小管構造(a~d)と、染色体(a'~d')の変化。微小管は抗 α -tubulin抗体を、染色体はDAPIを用いて染色した。

右下の数字は卵成熟誘起からの時間(分)。

- a: 未処理卵母細胞
- b: 卵成熟誘起15分後
- c: 卵成熟誘起25分後
- d: 卵成熟誘起30分後 (GV崩壊後)

卵成熟誘起以前(a)には動物極突起を中心とした放射状の微小管が観察される。GVの移動が始まるころの卵母細胞(b)では新たに動物極突起とGVとを結ぶ微小管が観察される。

図 8 nocodazole処理卵とcytochalasin B処理卵の微小管構造



nocodazole処理あるいはcytochalasin B処理をしたテツイロナマコ卵母細胞の微小管構造を抗 α -tubulin抗体を用いて染色した。

a : nocodazole処理卵

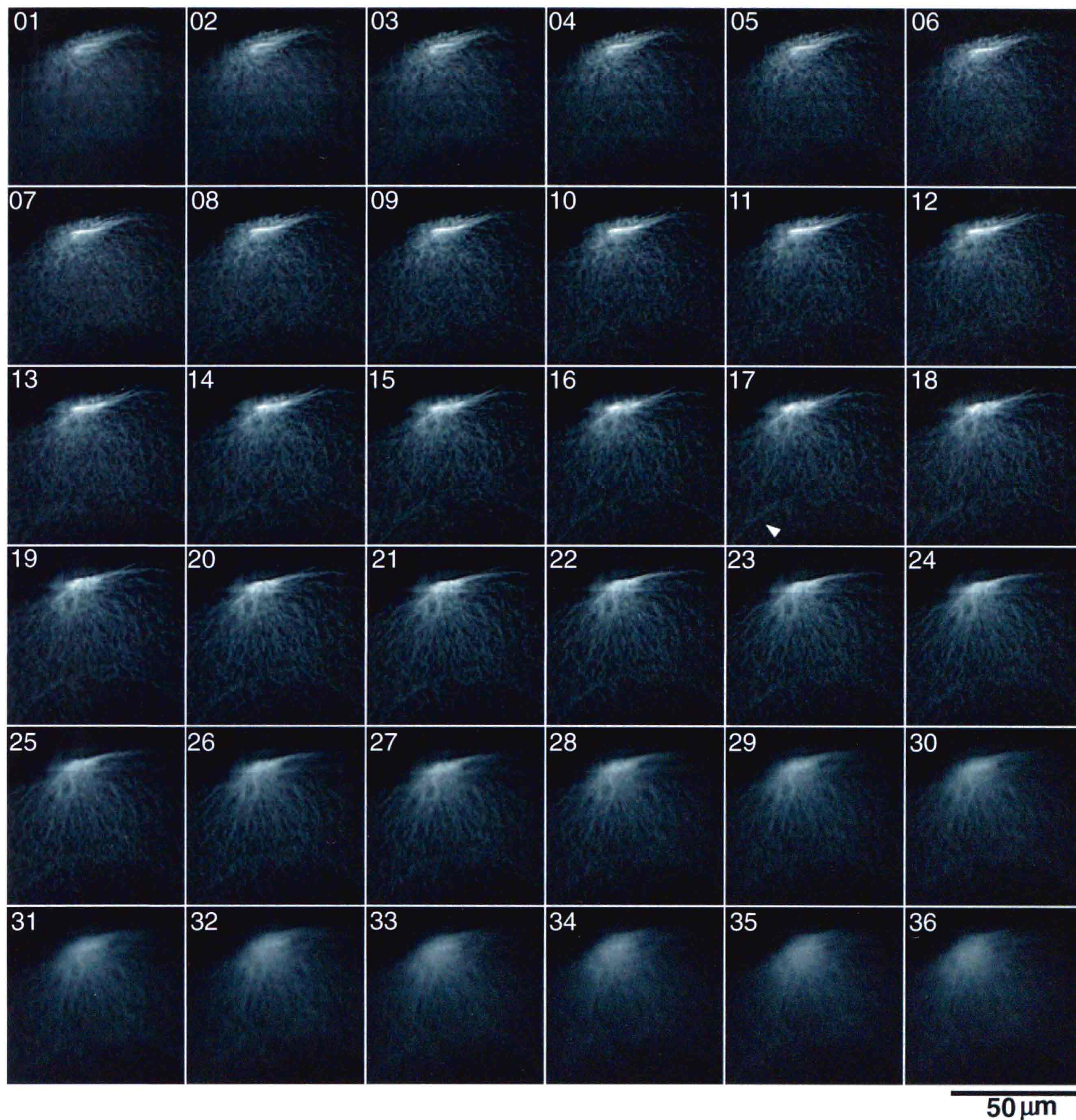
a' : nocodazole処理卵を動物極側から見たところ

nocodazole処理卵では未処理卵 (参照：図7-a)で観察されるGVの周囲や細胞質全体の網目状の構造は観察されない。突起の部分と放射状の一部に微小管が観察された。

b : cytochalasin B処理卵

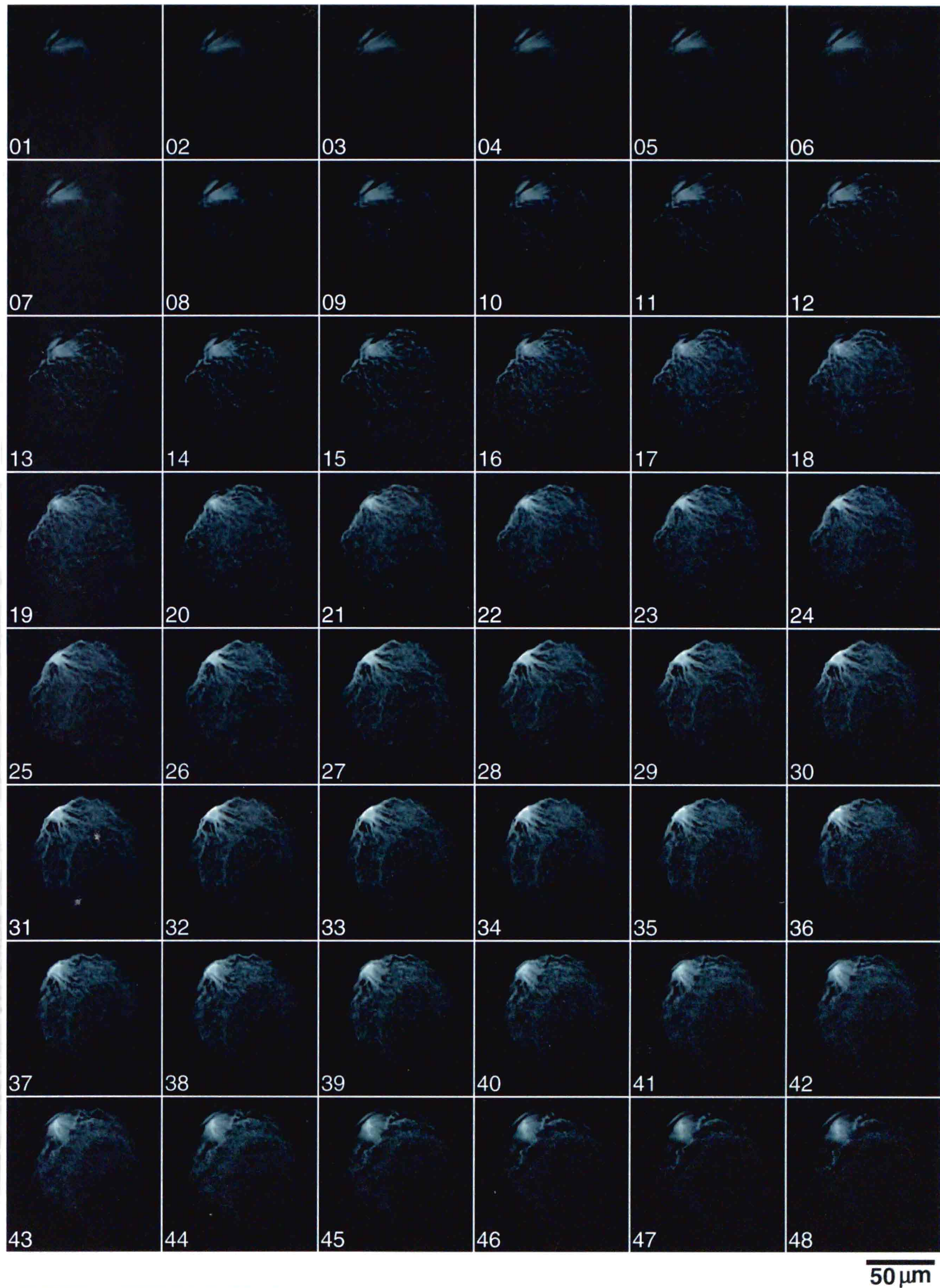
未処理卵 (参照：図7-a)の微小管構造と変わらない。

図9 CELLScanSystemによる未成熟卵の微小管構造の観察



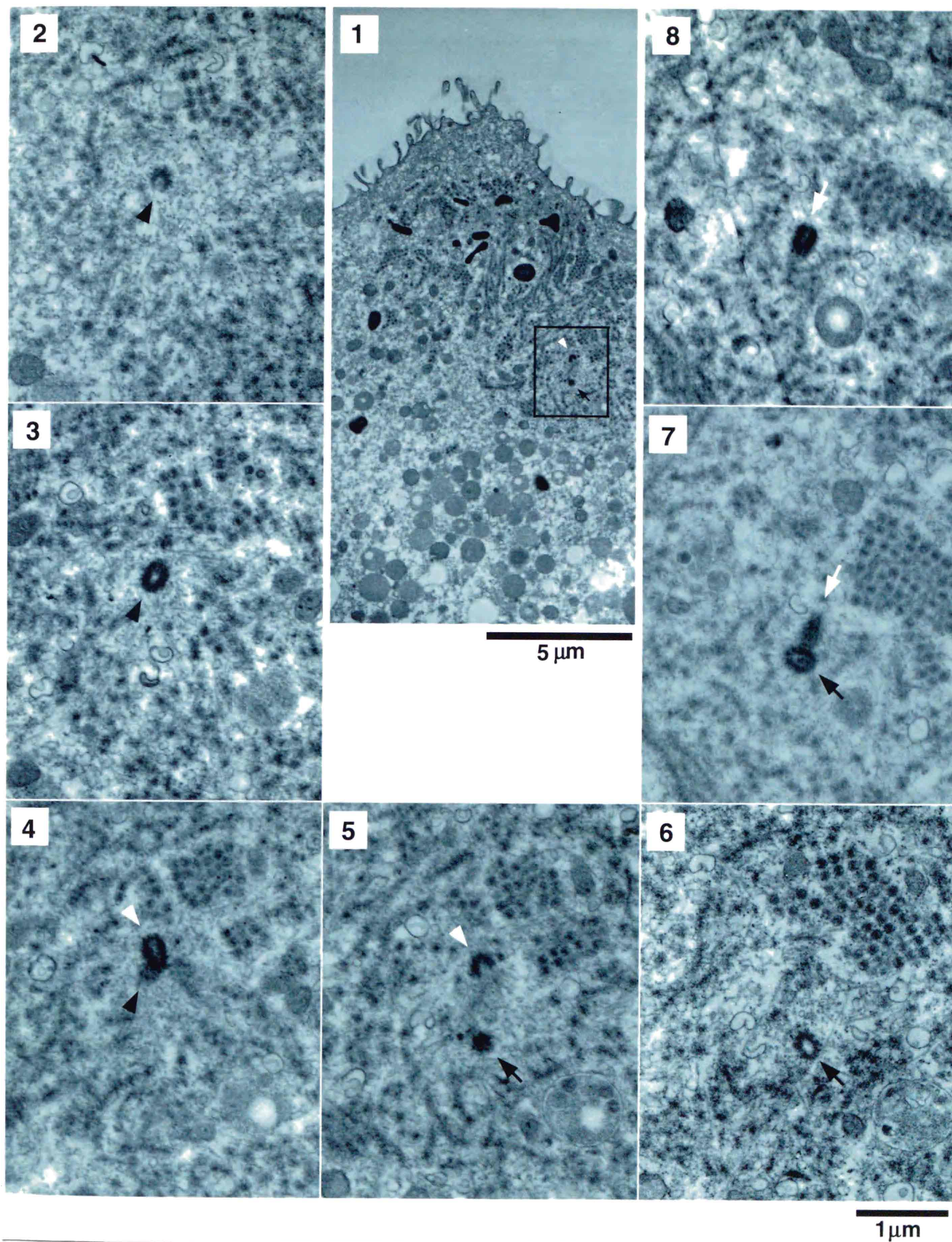
テツイロナマコ未成熟卵の微小管構造をCELLScanSystemを使って観察した。動植物軸が光軸に対して直角に向いている卵母細胞について、蛍光が観察されることから厚さ9 μm の範囲で切片を作製した。左上の数字は切り始めてからの切片の番号。切片と切片との間隔は0.25 μm 。卵表に沿って微小管が伸びている(8-27)。内部細胞質には、GVの周囲を取り巻く微小管構造が観察される(13-30；参照:17の白矢じり)。

図10 CELLScanSystemによる卵成熟中の微小管構造の観察



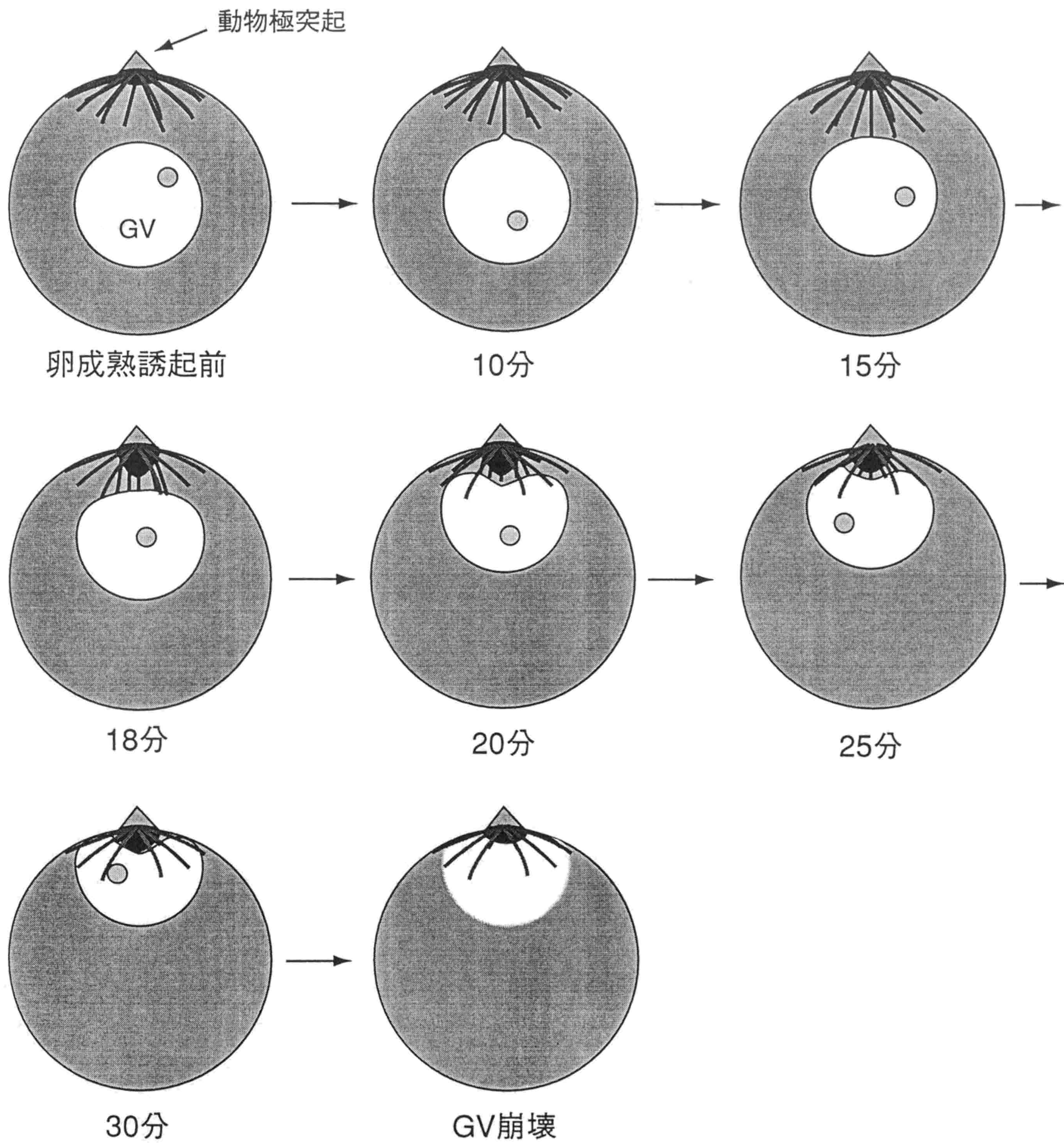
卵成熟誘起15分後(GVの移動開始直前)のテツイロナマコ卵の微小管構造をCELLScanSystemを使って観察した。動植物軸が光軸に対して直角に向いている卵母細胞について、蛍光が観察されるところから厚さ24μmの範囲で切片を作製した。左下の数字は切り始めてからの切片の番号。切片と切片との間隔は0.5μm。動物極突起とGVとを結ぶ微小管構造が新たに観察された(24-30)

図11 電子顕微鏡による動物極突起付近の観察



テツイロナマコの未成熟卵の動物極突起付近の電子顕微鏡像。1は動物極突起と中心粒との位置関係を示す。突起の直下に2つの中心粒が観察される(白矢じりと黒矢印)。黒い枠の中を拡大したものが5。2～8は連続切片。2～5に一对の中心粒(白矢じりと黒矢じり)、5～8に別の一对の中心粒(白矢印と黒矢印)が観察される。

図12 微小管構造模式図



卵成熟過程で観察されるGVの移動に関わると思われる微小管構造の変化を示した模式図。時間は卵成熟誘起からのおよその時間(分)。

① 卵成熟を誘起する以前の卵母細胞では、動物極突起を中心とする放射状の微小管構造が存在するが、GVと動物極突起とを結ぶような太い微小管構造はない。② 卵成熟が再開すると突起付近とGVとを結ぶ微小管構造が形成され、GVの狭い範囲に結合する(10分)。③ GVの移動が始まるころ、GVと動物極とを結ぶ微小管が発達し、GVの広い範囲に結合するようになる(15分)。④ 動物極とGVとを結ぶ構造が徐々に短くなるにつれて、GVと突起との距離は短くなる。やがて、GVは動物極に到達し、崩壊までその位置に保持される(30分)。