

第二部 イトマキヒトデ卵母細胞における
卵核胞の予定動物極への付着の機構

序論

第一部では，テツイロナマコの卵母細胞を用いて，卵成熟再開後にGVが卵表に寄っていく過程に微小管が関わっていることを確かめた．しかし，テツイロナマコの場合，GVは動物極まで移動すると，短時間のうちに崩壊してしまうため，予定動物極へと寄った後のGVの位置固定に関わる細胞骨格を調べるのには不向きである．テツイロナマコと同じ棘皮動物門に属するイトマキヒトデの卵母細胞は，成長途中ではテツイロナマコと同様に，GVが卵母細胞の中央にある（参照：図7）．しかし，十分に成長した卵母細胞では，GVは卵表に近接した状態にある．イトマキヒトデの卵母細胞は両生類などの端黄卵とは異なり，テツイロナマコと同様の等黄卵であることから判断して，植物極側への卵黄粒の蓄積によって受動的に動物極側に移動させられるとは考えにくい．おそらく成長過程の最後の時期にテツイロナマコと同様の機構によりGVは卵表へと移動するものと思われる．イトマキヒトデの卵母細胞は，成長が完了してから生み出されるまでの比較的長期間（1～2ヶ月間），GVが卵表直下に保たれているので，その位置に保持しておく何らかの機構があると考えた．WilsonとMathew（1895）は，GVが近接している部分の卵表には放射状に広がる繊維状の構造があり，あたかもGVを包み込んで，卵表へと固定しているかのようにみえる像をヒトデ（*Asterias forbeci*）卵母細胞の切片で観察している．抗tubulin抗体を用いた近年の研究では，彼等が観察したものと同様の構造（いわゆるpre-meiotic aster）が観察されている（Schroeder, 1985）．そこで，その構造がGVの位置の保持に関与しているか否かに重点を置き，イトマキヒトデの卵母細胞を用いてGVの卵表への付着機構を解析した．

方法

卵母細胞の採取

材料のイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) は生殖期に採集し、理学部附属館山臨海実験所の水槽で飼育しておいたものを使用した。卵母細胞は親から取り出した卵巣を切り裂いて取り出し、 Ca^{2+} 欠如海水で洗って濾胞細胞を除去した。その後正常海水で数回洗い使用するまで海水中に置いた。実験は 23°C で行った。

成熟分裂は、卵成熟誘起2次ホルモン、 $2\ \mu\text{M}$ 1-methyladenine (1-MeAde ; Sigma) を用いて誘起した (Kanatani *et al.*, 1969)。

細胞骨格毒の処理

nocodazoleとcytochalasin Bは、第一部で調整した原液を、正常海水でそれぞれ $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ と $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した。taxol (Sigma) は、 $2\ \text{mM}$ の濃度にdimethylsulfoxideに溶解したものを保存原液とし、これを正常海水で $4\ \mu\text{M}$ に希釈して用いた。処理時間は30~40分間とした。

顕微操作によるGVの除去

直径 $1\ \text{mm}$ のガラスキャピラリー (Drummond; $50\ \mu\text{m}$) をneedle puller (Narishige; PN-4) で引き切り、先端を適度に折って、口径約 $10\ \mu\text{m}$ のガラス管を作製した。マイクロマニピレータ (Narishige; MMO-202) とマイクロインジェクタ (Narishige; IM-4A) を用い、Hiramoto (1974) の開発した方法にしたがって顕微操作を行った。卵母細胞は、両面テープ2枚を重ねてはりあわせた2枚のカバーガラスのすきま ($120\ \mu\text{m}$) に入れて、動かないように固定した。この卵母細胞の植物極側からGVの膜を押すところまでガラス管を刺しこみ、GVを吸い込み始めたことを確認してから、ガラス管の先端を卵母細胞の中央付近まで戻した。そして、その位置を固定したまま、GVをゆっくりと吸い込んだ。

遠心顕微鏡

基本的な操作は、第一部に記した通りである。ただし、イトマキヒトデ卵母細胞は直径が $160\sim 180\ \mu\text{m}$ 程度あり、テツイロナマコの卵母細胞よりも大きいので、遠心中の卵母細胞の向きが変わらないようにするためのチェンバーは、卵母細胞を入れるすきまを $120\ \mu\text{m}$ にした。チェンバーに入れた卵母細胞のうち、GVが遠心端にあるものにはGVを卵表から引き離す方向に力がかかるので、そのような向きの卵母細胞を観察した。GVの遠心端側の膜が卵表から離れた場合にGVが移動したとみなした。

微小管の染色方法

卵母細胞内の微小管の構造を調べるために間接蛍光抗体法による微小管の染色を行った。ゼリー層と卵膜は、0.01% アクチナーゼ (科研製薬)・海水で取り除いた。Ca²⁺欠如人工海水で数回洗った後、蛍光抗体染色を行った。

(1) 通常型蛍光顕微鏡による観察

染色方法及び観察は、第一部，“材料と方法”に記した手順に従って行った。extraction medium による処理は、ナマコの場合よりも長く、1時間行った。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡による観察

上記の通常型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相互の位置関係などを把握することは難しい。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得るためには、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行った。この実験では、InSIGHTplus-IQリアルタイムレーザー共焦点顕微鏡(メリディアンインスツルメンツファーマーイースト株式会社)を使用した。試料となる卵母細胞は、一次抗体には、500倍に希釈した抗 α -tubulin抗体を、2次抗体には、20倍に希釈したBODIPY FL goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate (Molecular Probes, Inc.) を用いて染色した。励起光フィルターはB(488nm)を用いた。観察する試料のZ軸に対して直角な面の1 μ mごとの光学断層画像を作り、コンピュータ (Power Macintosh 8100/80AV, Apple computer, Inc.) に取り込み、立体再構築ソフト, Voxel View/Mac. (Vital Image, Inc.) を用いて立体像の再構成を行った。

結果

顕微操作によるGVの吸引

イトマキヒトデの卵母細胞の植物極側から細いガラス管を刺し込み、GVをゆっくりと吸い込むと、GVが最も近接している部分の卵表が窪んだ(図1)。GVが完全に吸い込まれる前から、くぼみは元に戻り始めて、GVが吸い込まれた後、約1分で元の状態に戻った。

遠心顕微鏡による観察

(1) 未処理卵

何も処理をしていない卵母細胞(未処理卵)を100×g, 200×g, 300×g, 500×gでそれぞれ遠心した(表1)。遠心時間は15分から40分の間では、結果に大きな変化がなかったので約20分間と定めた。GVは遠心端側の膜が卵表から離れた場合に移動したとみなした。使用した3つのバッチでは結果に若干の差はあったものの、300×g以下の遠心力ではGVはほとんどの卵母細胞で移動せず、500×gや700×gでもGVが移動する卵母細胞は約半数だった。以上の結果はGVが動かされにくいことを示している。その原因としては、GVは何らかの構造によって卵表に付着していること、あるいは、細胞質の抵抗が大きいことが考えられる。上記のガラス管でGVを吸い取る実験の結果と合わせると、GVが卵表へと付着している可能性が示唆される。そこで、細胞骨格毒である、nocodazole, taxol, cytochalasin Bの影響を調べた。

(2) nocodazole処理

前述の未処理卵の実験で用いた3つのバッチの卵母細胞をnocodazoleで30分間処理した後、100×g, 200×g, 300×gと、500×gで遠心した(表1)。100×gで遠心した場合には、多少移動するものがあった。正常卵母細胞ではGVが移動しない200×g以上の遠心力をかけると、ほぼ全ての卵母細胞でGVが移動するようになった。また、nocodazoleと同様に微小管を脱重合させる効果を持つコルヒチン(5mM)で卵母細胞を処理した場合にも、同様の結果が得られた。

(3) taxol処理

tubulinの重合を促進するtaxolで卵母細胞を30分間処理し、その影響を調べた。この実験では、未処理の場合でも200×gで約40%の卵母細胞でGVが移動するような、比較的GVの移動しやすいバッチを選んで用いた。まず、taxol処理卵9個を200×gで20分間遠心したところ、GVが移動した卵母細胞はひとつもなかった。ステップワイズに回転数を上げて300×gと、500×gとで20分ずつ遠心し、それぞれ8個と7個の卵母細胞について観察したが、やはり、GVが移動した卵母細胞はひとつもなかった。700×gにした場合には、

観察した4個の卵母細胞全てでGVが移動した。taxol処理卵ではGVが移動しにくくなることがわかった。なお、遠心力が強くなるにしたがい観察した卵母細胞の数が減っているのは、遠心中に卵母細胞の向きが変わってしまい、観察の対象からはずしたためである。

(4) cytochalasin B処理

別の種類の細胞骨格である微小繊維の形成(actinの重合)を阻害するcytochalasin Bで処理した7つのバッチの卵母細胞について、未処理卵とnocodazole処理卵での結果の違いが大きい200×gで20分間遠心したとき(表2)、GVが移動したものはなかった。同じ遠心条件下では、未処理の場合でもGVが移動した卵母細胞はなかったが、nocodazole処理をした場合には、91%の卵母細胞でGVが移動した。

(5) 1-MeAde処理卵

1-MeAde処理によって卵成熟を誘起した卵母細胞では、卵成熟を誘起してから10分後に、200×gで遠心すると、遠心を始めてから数分間はGVは移動しなかったが、あるときから急に求心方向へと移動し始めた(図2-d)。その後、GVは卵の中央付近で崩壊した。1-MeAde処理からGVが移動し始めるまでの時間は個々の卵によって異なったが、GVの崩壊から逆算するとその3-5分前に当たることがわかった。GVは全ての卵母細胞で移動した(表2)。

(6) 遠心中の卵の形状

200×gと700×gとで遠心中のGVの形状を観察した。

未処理卵を200×gで遠心をすると、GVは卵表直下に接したまま、やや求心方向へと伸びたが、移動は起こらなかった(図2-a)。700×gでは、200×gのときより早くGVが求心方向へと伸び始めた(図3-a, 06')。伸び始めてから約10分経つとGVの移動が観察された。GVが移動した4個の卵母細胞から得られた700×gにおけるGVの平均移動速度は5.39 μm/minであった。求心端まで移動したGVは、遠心終了後一時間ほどで元の位置の方向へ戻っていくことがあった。中には、ほぼ元の位置まで戻ったものもあった。GVが移動したこれらの卵母細胞では、1-MeAde処理するとGVの崩壊は起こったが、極体放出は観察されなかった。

nocodazole処理卵では、200×gでも遠心直後からGVが求心方向へと伸びて、約10分で遠心端側が細い涙滴形になった(図2-b, 10')。その後、遠心端の細くなった部分が急に丸くなるとGVは求心方向へと移動し始め(図2-b, 14')、さらに、約10分で卵母細胞の求心端まで移動した。GVは移動しきった後、さらに遠心続けると卵母細胞の遠心端に押し付けられて扁平になった(図2-b, 18')。700×gでは200×gの場合よりも早くからGVが求心方向へと移動を始め(図3-b, 04')、求心端までGVが移動した(図3-b, 16')。4個の卵母細胞

胞から得られた700×gにおけるGVの平均移動速度は6.62 μm/minであった。

cytochalasin B処理卵では、200×gの場合、未処理卵と同様にGVがやや求心方向へと伸びるものの、GVの移動は起こらなかった(図2-c, 02')。700×gでは卵母細胞が遠心方向にある両面テープの縁に押し付けられて扁平になった(図3-c, 02')。細胞の変形につれて、GVも扁平になった。遠心を止めると、卵母細胞もGVも徐々に元の球形へと戻った。

1-MeAde処理卵では、200×gのときは細胞の変形は起こらなかったが(図2-d)、700×gではcytochalasin B処理卵と同様に変形が観察された。GVも扁平になり、そのままの形状を保ったまま求心方向へ移動し、崩壊した(図3-d)。

GV中に1つ含まれている核小体(仁)は、未処理卵でも、nocodazole処理卵などでも、30×g程度の遠心で、GVの中を遠心方向へと移動した。GVの中央付近にあったものは、一定の速度でまっすぐに遠心端まで移動した(図4-a)。速度は約3.07 μm/minであった。核膜近くにあったものは、遠心方向に移動して核膜に達した後、核膜に沿って遠心端まで移動した(図4-b)。これらの核小体の挙動は、核内には核小体の移動を妨げるような特別な構造はないことを示している。

微小管の構造

間接蛍光抗体法を用いて卵母細胞内の微小管の形状を観察した。

何も処理をしていない卵母細胞では、動物極付近にtubulinを高密度に含んで明るく染色される点がひとつ(図5, a-3)、またはふたつあり(図5, a-1, a-2)、そこから繊維状の微小管が、卵表の約1/8を覆う程度に放射状に広がっていた。明るく染色される点は、breeding seasonの初期に得られた卵母細胞ではひとつであったが、中期から後期の卵母細胞では点はふたつあることが多かった。他に、GVの核膜を取り巻く部分も染色された。また、GV以外の部分では、繊維状の微小管が入り組んで、網目状の構造になっていた。

一方、nocodazole処理した卵母細胞では、放射状の微小管も、その中心にあるtubulinを高密度に含む明るく染色される点も観られなかった(図5-b)。また、表面付近にある網目状の微小管も網目状構造が崩れ、繊維が消えていたりした。

cytochalasin B処理した卵母細胞では、未処理の卵母細胞と同じように明るく染色される点があり、そこから放射状の微小管が広がっていた(図5-c)。GVを取り囲む微小管や、その他の細胞質部分にある網目状の微小管にも変化はなかった。

taxolで処理をした卵母細胞では、放射状の微小管の密度が増加していた(図5-d)。しかし、未処理卵の場合には明るい点があった放射状の中央部分は、微小管が直径16~20 μmの円形状になくなっていった。その穴の奥には弱く染色される数本の細い繊維状構造や、数個の点状構造が認められたので、放射状の微小管の中央がくぼんでいるようにみえた。GVの周囲を取り囲む微小管やGV以外の部分にある網目状の微小管については、未処理

卵との違いは認められなかった。

1-MeAde処理をした卵母細胞については、卵成熟の完了まで微小管の形状を時間を追って観察した(図6)。処理5分後の卵では、微小管が未処理卵と同様に放射状に広がり、中央に明るい点があった。しかし、処理10分後では放射状の微小管の広がる範囲が小さくなり(図6-b)、処理15分後になるとほとんど観られなくなった(図6-c)。逆に中央の明るい点は処理から時間が経つにつれてだんだんと大きく密になっていった(図6-c)。GVの崩壊が起こると、中央の点はさらに発達し、核膜を取り巻いていた微小管は観察されなくなった(図6-d)。GV以外の部分にある網目状の微小管は、未処理卵に比べると網目が粗になった。その後、中央の明るい点はふたつに分かれ(図6-e)、卵表と平行に第一極体の分裂装置を形成した(図6-f)。分裂装置は回転して卵表に垂直になり(図6-g)、第一極体が放出された(図6-h)。卵に残った分裂装置の極はさらにふたつに分かれて、卵表と垂直に分裂装置を形成し(図6-j)、第二極体が放出された(図6-k)。卵に残った染色体が前核を形成したとき(図6-l')、微小管構造は観察されなかった(図6-l)。

1-MeAde処理後、染色体の凝縮は進行し、GVの崩壊の頃には、球形に近くなった(図6, a'-d')。そして、GVの崩壊後に、発達を開始した星状体に接近し(図6-e')、やがて分裂装置を形成した(図6-f)。

ナマコの卵母細胞の微小管構造と比較するため、成長途中でまだGVが中央にある卵母細胞の微小管を染色した。直径は成長しきった卵母細胞の7～8割に当たる110～140 μ mで、17個の卵母細胞について行った。GVは卵母細胞の中央にあったが、強く染色される点と、そこから放射状に広がる微小管が卵表に観察された(図7)。これは、テツイロナマコ未成熟卵の動物極突起に観察された構造に相当するものと思われる。また、卵表に広がる網目状の微小管とGVの周囲の微小管も確認された。

遠心してGVが移動した卵母細胞についても微小管の染色を行った。染色を行うためには、遠心後の卵母細胞をチェンバーから取り出す必要があるが、チェンバーは卵母細胞が移動しないように固定するための装置であるため、目的とする卵母細胞を壊さずに取り出すのは非常に困難であった。しかし、遠心中の撮像によってGVの移動が確認されている未処理卵の内、2バッチ8個の卵母細胞が取り出せたので、微小管を染色した。その結果、放射状の微小管の中央部分が卵母細胞の中央へと向かって落ちくぼみ、中央付近がなくなっていた(図8-a)。放射状の微小管の配列も乱れていた。同様にチェンバーから取り出した2個のnocodazole処理卵では、明確な微小管構造は認められなかった。

蛍光で強く染色された放射状構造の中心には、中心体があると考えられるが(Kato *et al.*, 1990)、上に記したように遠心卵ではこの部分が欠落していた。植物極方向へ移動し

たGVの表面を探しても見当たらなかった。中心の点を含む放射状の微小管とGV及び卵表との結合について調べるために、植物極側から細いガラス管を刺してGVを吸い取った卵母細胞の微小管を染色した。これらの卵母細胞では、明るく染色される点と放射状微小管のどちらもが残っていた。この実験は30個以上の卵母細胞について行ったが、全ての例で同様の結果が得られた。この結果から、遠心卵ではGVが動かされるとき微小管の配列が乱され、その結果として放射状構造の中心部分が破壊されてしまったものと推察される。

次に、微小管の分布や構造についての三次元的な情報を得るために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。断面像は1 μ mごとに作成した。網目状の微小管は卵母細胞の表面付近にあり、細胞質の内部のほうにはないこと(図9-7)、またGVの周囲を取り囲む微小管はGV全体を覆っていることがわかった(図9-10)。得られた断層画像をコンピュータを用いて三次元的に積み重ねて立体像を再構築すると、放射状の微小管が末端でいくつかに枝分かれして網目状の微小管に入り込んでいることがわかった(図9-13)。

考察

卵母細胞を遠心したとき、微小管構造が発達している未処理卵やcytochalasin B処理卵では、GVは移動しなかった。一方、微小管構造が壊されたnocodazole処理卵では、GVの移動が観察された。また、微小管が未処理卵に比べて著しく発達しているtaxol処理卵では、GVの移動が、一層起こりにくくなった。これらの結果は、微小管がGVの予定動物極への付着に参与していることを示唆している。

イトマキヒトデの未成熟卵の微小管を、抗 α -tubulin抗体で染色したところ、予定動物極付近には点状の構造と、その点を中心としてGVの動物極側外縁に沿って広がる放射状の構造、細胞表面に広がる網目状の構造、および、GVの周囲を取り囲む構造が認められた。これらの微小管構造のうち、点状と放射状の微小管構造については、Otto and Schroeder (1984)、およびShiraiら (1990)が、それぞれ*Pisaster ochraceus*と*Asterina pectinifera*の卵母細胞においてその存在を報告している。卵成熟を誘起した卵母細胞の微小管構造を観察すると、強く染色される点は、消えることなく2つに分かれて小さな星状体を作り、その後、紡錘体を形成して分裂装置の極となった。イトマキヒトデの卵母細胞の電子顕微鏡観察により、予定動物極付近に中心粒が検出されている (Kato *et al.*, 1990)。また、同じ研究室の植竹によると (未発表)、放射状の微小管の中心部は抗 γ -tubulin抗体で染色される。したがってこの明るい点は、第一減数分裂のための中心体を含む構造と推察される。

共焦点レーザー顕微鏡による観察結果から、放射状微小管は中心部に近いところでは、GVの膜に沿って存在し、途中からGVの膜を離れて表層に沿って伸び、先端はいくつかに分岐して、細胞表面に存在している網目状構造に入り込んでいることがわかった。卵成熟再開前からGVが予定動物極へと移動しているナマコ (*Stichopus californicus*)では、予定動物極から広がる微小管がGVの植物極側まで伸びていて、GVの全体を覆っているという報告 (Smiley and Cloney, 1985)があるが、本実験で使用したイトマキヒトデでは、それと違って、予定動物極から広がる放射状微小管はGVの動物極側のみと接していることが明らかになった。この放射状の微小管とGVとの結合を調べるために、植物極側から細いガラス管でGVを吸い取った卵母細胞の、微小管を染色したところ、放射状の微小管の中央の明るく染色される点と、その周囲の放射状微小管が残っていた。これと同様の結果は他の種類のヒトデ (*Astropecten aranciacus*)の卵母細胞を使用した実験でも報告されている (Picard *et al.*, 1988)。一方、遠心でGVを移動させた卵母細胞では、放射状の微小管の中央にあった明るく染色される点が観察されないことが多かった。この構造は、GVの膜にも細胞質内部にも観られなかった。これらの結果は一見矛盾しているようにもみえるが、GVの卵表からの引き離し方によって放射状微小管の中央部への力のかかり具合が異なることが考えられる。GVを吸いとる場合は放射状の微小管とGVとの結合が、

端のほうから徐々に剥がされるので、放射状構造の中央付近には比較的力が加からず、放射状の構造は壊れずに中心の明るい点も含めて残る。しかし、遠心でGVを移動させる場合は、GVの結合部が微小管構造から一度に引き剥がされるので、放射状構造がゆがみ、微小管が収束している中央部分が破壊されてしまうため、明るい点状の部分は分散し、その結果、観察されなくなることが考えられる。さらに、中央の明るい点の付近が観察されなくなることから、明るい点とGVとの結合は、卵表と明るい点との結合よりも強いことが示唆される。放射状の微小管は卵表に沿って伸びており、その放射状の中央付近でGVと結合することによって、GVを卵表に付着させているのではないかと考えられる。1-MeAde処理後のGV崩壊直前の卵母細胞では、放射状の微小管構造は減少し、GVが遠心によって容易に移動するようになることも、この推測を支持しているものと思われる。

nocodazole処理卵を遠心すると、GVが一旦涙滴形になった。GVの狭い範囲を動物極方向に引きつけるような力がGVに作用していることが推測される。GVに作用する力としては、まずGV内部の核質よりも比重の大きい核小体が遠心方向へ移動しようとするために、核膜を内側から遠心方向に押している可能性がまず考えられる。しかし、GVが卵表から離れて求心端まで移動していく様子を観察すると、核小体はGVの遠心端にあるにもかかわらず、球形に近い状態で移動しているので、この実験の遠心条件下では、核小体が核膜を押す力はGVを涙滴形にするほど強くはないと思われる。他に考えられる可能性は、涙滴形の細く伸びた部分の核膜が、nocodazole処理では壊れない何らかの構造を介して卵表に付着していることである。微小管以外の細胞骨格としては、微小繊維や中間径フィラメントがある。そのうち中間径フィラメントの一種のサイトケラチンによる構造として、動物極を中心とする直径約20 μ mの円形の穴のあるヘアーネット形(snood)の網目状構造がヒトデ卵の表層にあり、その中心に抗サイトケラチン抗体で染色される点が2つ存在するという報告(Schroeder and Otto, 1991)がある。このサイトケラチン構造は、1-MeAde処理後の微小管が消える頃にやはり消失するとされている。また、ウニの第一次卵母細胞にも、ヒトデ卵と同様のサイトケラチン構造があり、成熟分裂完了後の卵では消滅していることが報告されている(Boyle and Ernst, 1989)。このように、動物極付近では、明るく染色される微小管の点状構造と同じ場所に存在すると思われる微小管以外の構造も、GVの卵表への付着に関与している可能性が考えられる。また、GVが涙滴形に変形するためには、GV自体が変形しやすくなることも必要であると考えられる。GVの周囲を取り巻く微小管が存在する未処理卵では、GVは比較的球形のまま卵表を離れ、その形状を保ったまま移動した。GVの周囲の微小管がGVの形状の保持に深く関与しており、GVの周囲の微小管が壊されたnocodazole処理卵では、GVが変形しやすくなったのではないかと考えられる。

細胞骨格は互いに無関係というわけではなく、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞では、cytochalasin B処理によりサイトケラチンと微小管の構造が乱されることが報告さ

れている (Gard, 1997). しかし, 本実験では, cytochalasin B処理をした卵母細胞を遠心したときにGVは移動しなかった. これは, 卵表と微小管, あるいはGVと微小管との結合には, actinは関与していないことを示している.

遠心によりnocodazole処理卵ではGVの移動が観察された. 蛍光抗体染色による結果が示すように, nocodazole処理により微小管が壊されることによるものと判断されるが, この処理による微小管の脱重合が細胞質内のtubulin量を増加させ, これによる細胞質の比重の増大がGVとの比重差をより大きくした結果, GVが移動しやすくなった可能性も考えられる. しかし, イトマキヒトデの卵母細胞のtubulin量に関するデータが無いため, この点の検証はできなかった. 同様のことが考えられるcytochalasin B処理ではGVは移動しなかったことを考慮すると, 上記の可能性は低いと判断される. ヒトデの卵母細胞では, 成熟分裂が再開するとGVの崩壊に先行して, 卵母細胞の表層の張力 (tension at the surface) と, 細胞質のconsistencyの両方が急激に大きく低下する (Nakamura and Hiramoto, 1978; Shoji *et al.*, 1978; Nemoto *et al.*, 1980). これらの変化は, cytochalasin B処理によっても引き起こされる (Nemoto *et al.*, 1980) が, コルヒチン処理では起こらない (Schroeder and Otto, 1984). これらの結果からも, 細胞骨格毒による細胞質の物理的な性質の変化が, 遠心によるGVの移動の有無の主要な原因ではないと考えられる.

700×gで遠心したcytochalasin B処理卵と1-MeAde処理卵では, 卵母細胞がチェンバーの遠心端側にある両面テープに押し付けられると, 卵母細胞は遠心方向に押しつぶされた. この形の変化は, cytochalasin B処理や1-MeAde処理により引き起こされる卵母細胞の物理的性質の変化を反映したものである.

参考文献

- Boyle, J. A. and Ernst, S. G. (1989). Sea urchin oocytes possess elaborate cortical arrays of microfilaments, microtubules, and intermediate filaments. *Dev. Biol.* **134**, 72-84
- Hiramoto, Y. (1967). Observations and measurements of sea urchin eggs with a centrifuge microscope. *J. Cell. Physiol.* **69**(2) 219-230
- Kanatani, H., Shirai, H., Nakanishi, K. and Kurokawa, T. (1969). Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish *Asterias amurensis*. *Nature*, **221**, 273-274
- 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
- Nakamura, S. and Hiramoto, Y. (1978). Mechanical properties of the cell surface in starfish eggs. *Develop. Growth Differ.* **20** (4), 317-327
- 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
- Otto, J. J. and Schroeder, T. E. (1984). Microtubule arrays in the cortex and near the germinal vesicle of immature starfish oocytes. *Dev. Biol.*, **101**, 274-281
- Picard, A., Harricane, M.-C., Labbe, J.-C. and Doree, M. (1988). Germinal vesicle components are not required for the cell-cycle oscillator of the early starfish embryo. *Dev. Biol.* **128**, 121-128

- 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
- Schroeder, T. E. and Otto, J. J. (1984). Cyclic assembly-disassembly of cortical microtubules during maturation and early development of starfish oocytes. *Dev. Biol.*, **103**, 493-503
- Schroeder, T. E. and Otto, J. J. (1991). Snoods: A periodic network containing cyokeratin in the cortex of starfish oocytes. *Dev. Biol.* **144**, 240-247
- Shirai, H., Hosoya, N., Sawada, T., Nagahama, Y. and Mohri, H. (1990). Dynamics of mitotic apparatus formation and tubulin content during oocyte maturation in starfish. *Develop. Growth Differ.* **32** (5), 521-529
- Shoji, Y., Hamaguchi, M. S. and Hiramoto, Y. (1978). Mechanical properties of the endoplasm in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.* **117**, 79-87
- 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

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

force batch	untreated				nocodezole		
	100×g	200×g	300×g	500×g	100×g	200×g	300×g
A	0/11*(0%)	0/5(0%)	0/13(0%)	0/5(0%)	3/23(13%)	8/8(100%)	11/13(85%)
B	0/9(0%)	2/41(5%)	0/4(0%)	1/8(13%)	0/8(0%)	7/24(29%)	8/8(100%)
C	0/11(0%)	0/5(0%)	2/5(40%)	2/5(40%)	0/7(0%)	6/7(86%)	3/3(100%)
合計	0/31(0%)	2/51(4%)	2/22(9%)	3/18(17%)	3/38(8%)	21/39(54%)	22/24(92%)

3つのバッチから得られたイトマキヒトデ卵母細胞を各遠心加速度で遠心したときのGVが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 各処理をした場合のGVが移動した卵母細胞の割合

treatment force	untreated	nocodazole	cytochalasin B	1-MeAde
200×g	0/41* (0%)	32/35 (91%)	0/18 (0%)	7/7 (100%)
700×g	5/12 (42%)	7/7 (100%)	0/3 (0%)	9/12 (75%)

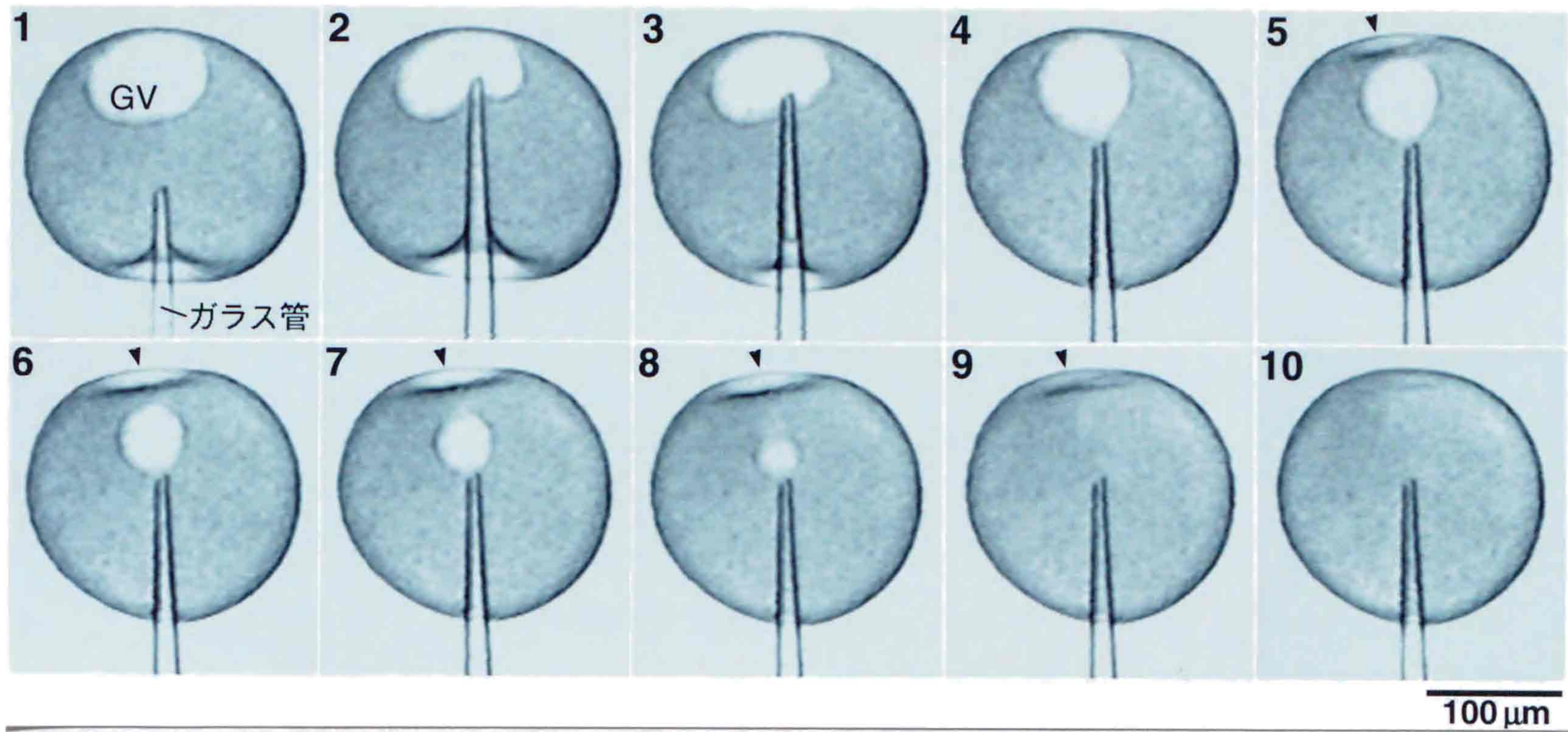
nocodazole, cytochalasin B, あるいは1-MeAdeで処理をしたイトマキヒトデ卵母細胞を遠心したときにGVが移動した卵母細胞の割合.

*GVが移動した卵母細胞の数/遠心をした卵母細胞の総数.

未処理とnocodazole処理は7バッチ, cytochalasin B処理と1-MeAde処理はそのうちの5バッチから得られた卵母細胞を用いた.

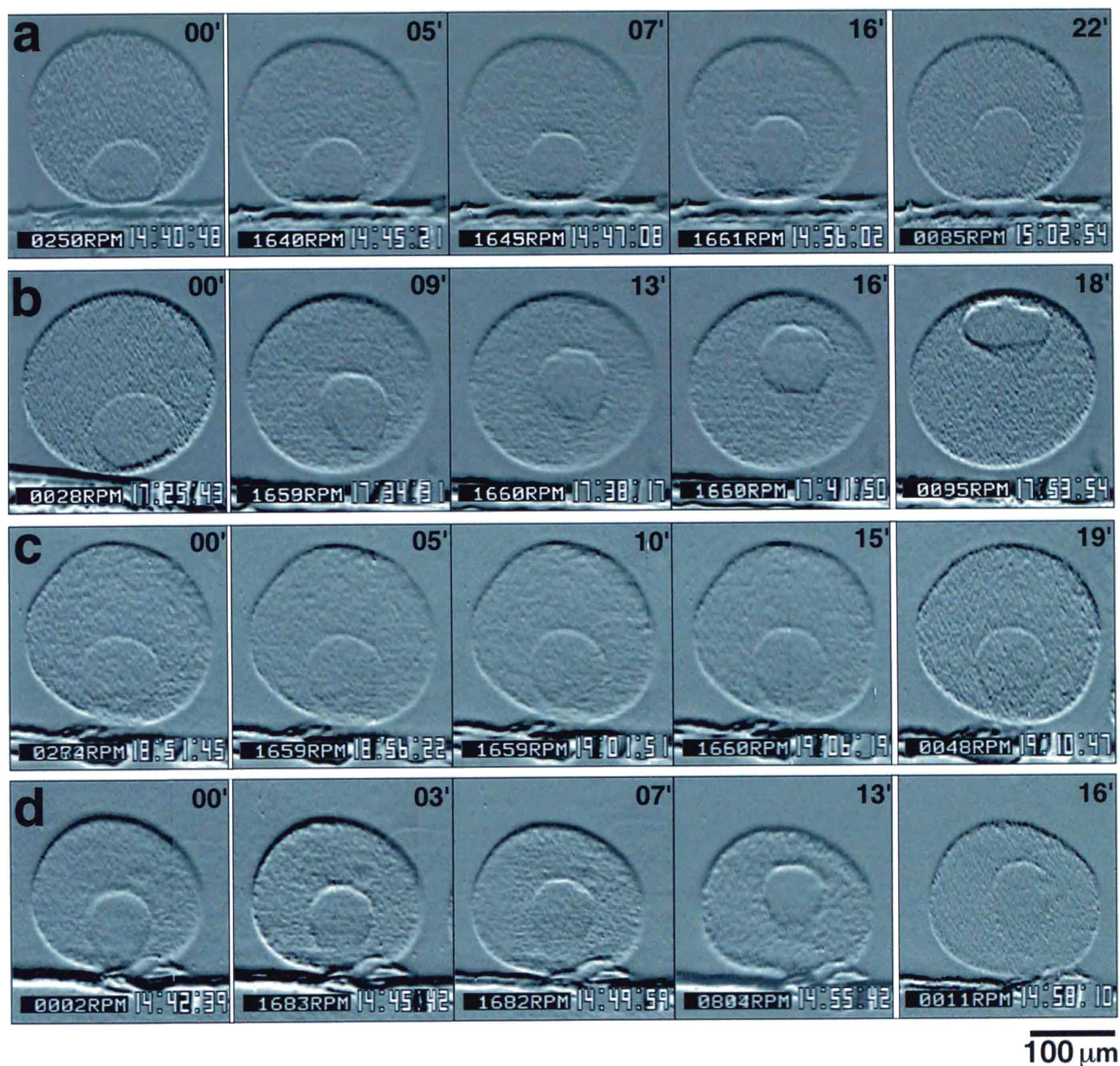
表1に示したバッチとは異なるバッチの卵母細胞を使用した.

図1 卵核胞の吸引



イトマキヒトデ卵母細胞の卵核胞 (GV) をガラス管を用いて吸引した。
卵母細胞の植物極側からガラス管をさし込み (1), 先端をGV膜に付けて (2), 吸い込む (3~9).
ガラス管の位置を固定したまま, ゆっくりと吸い込むと, GVが最も近づいている部分の卵表がくぼむ (矢じり). GVが完全に吸い込まれる前から, くぼみは元に戻り始め (8), 1~2分で元の状態に戻った (10).

図2 200×gでの遠心



各フレームの上側が求心方向，下側が遠心方向．数字は遠心加速度が200×gになってからの時間(分)．ただし，00'は遠心開始直後の像．遠心開始から約1分以内で遠心加速度は所定の大きさに達する．右端フレームは遠心を止めた後の像．

各フレーム左下はローターの回転数．右下はビデオの時刻．

各フレームの下端に見える線はチェンバーの底である両面テープの縁．

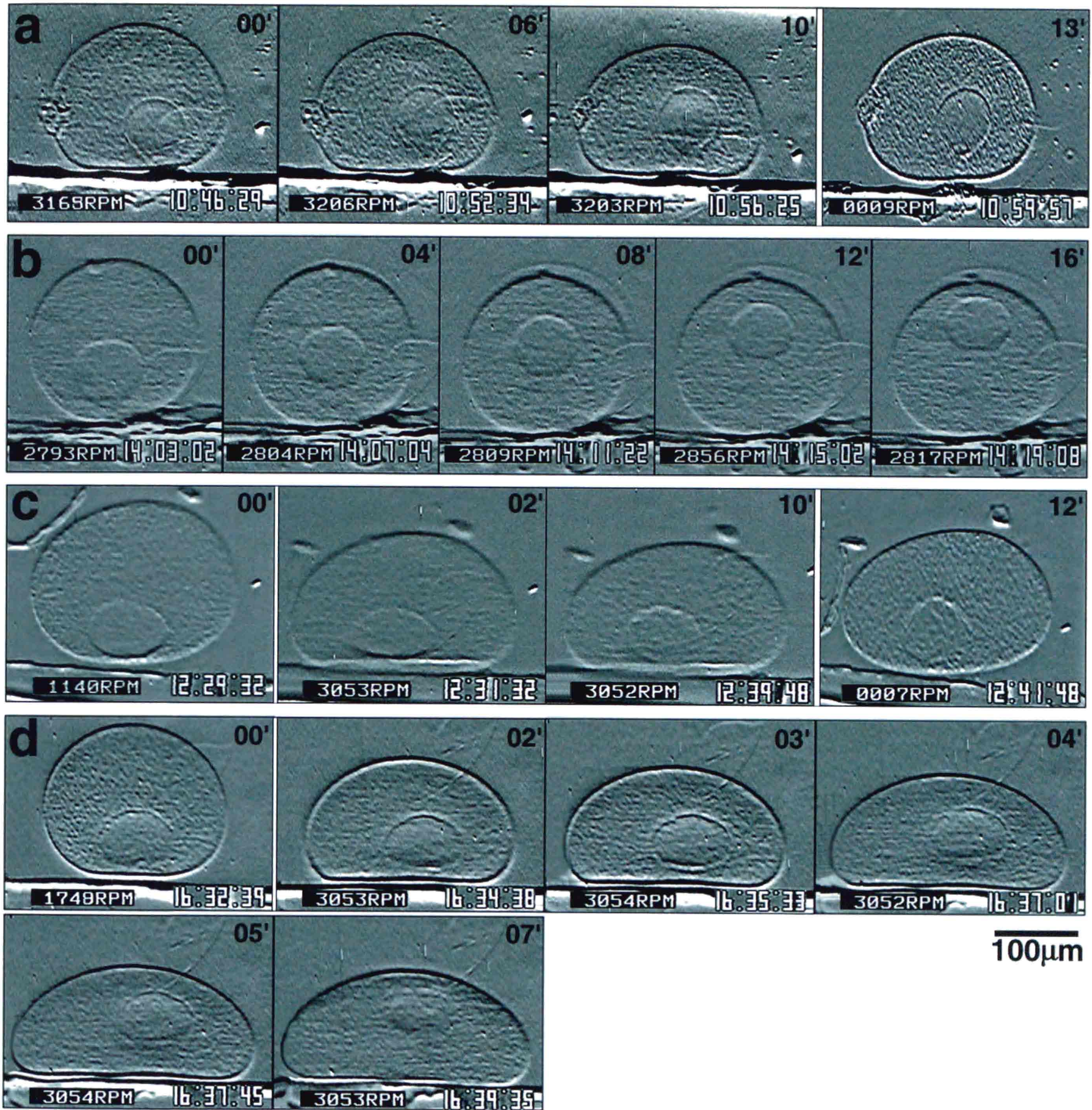
a：未処理卵

b：nocodazole処理卵

c：cytochalasin B処理卵

d：1-MeAde処理卵

図3 700×gでの遠心



各フレームの上側が求心方向，下側が遠心方向．数字は遠心加速度が700×gになってからの時間(分)．ただし，c，dの左端フレーム(00')は，700×gに達する以前の像．a，cの右端フレームは遠心を止めた後の像．

各フレーム左下はローターの回転数．右下はビデオの時刻．

各フレームの下端に見える線はチェンバーの底である両面テープの縁．

a：未処理卵

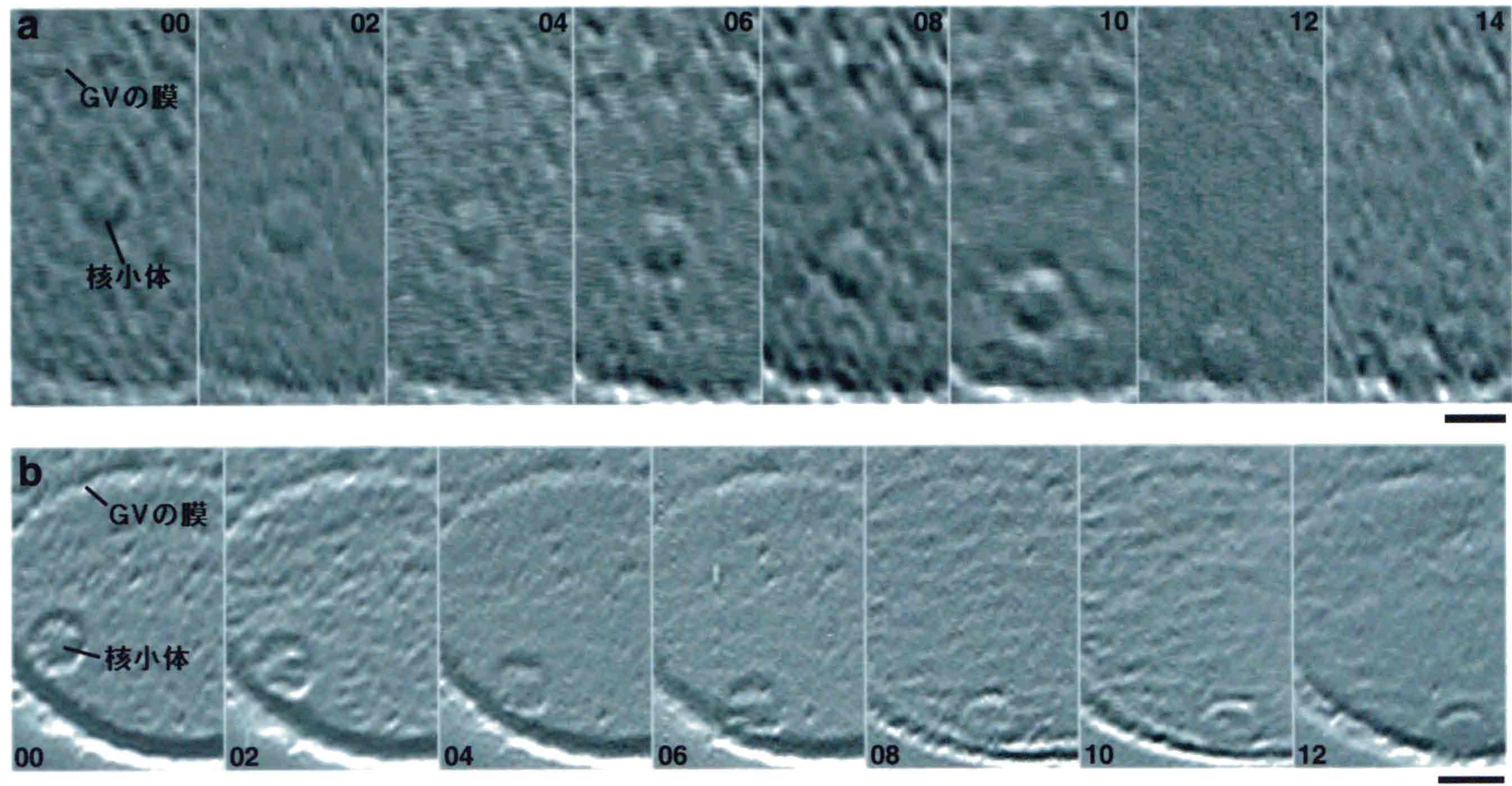
b：nocodazole処理卵

c：cytochalasin B処理卵

d：1-MeAde処理卵

cytochalasin B処理卵と1-MeAde処理卵では，卵母細胞自体がチェンバーの底に押し付けられて偏平になっている．

図4 核小体の移動



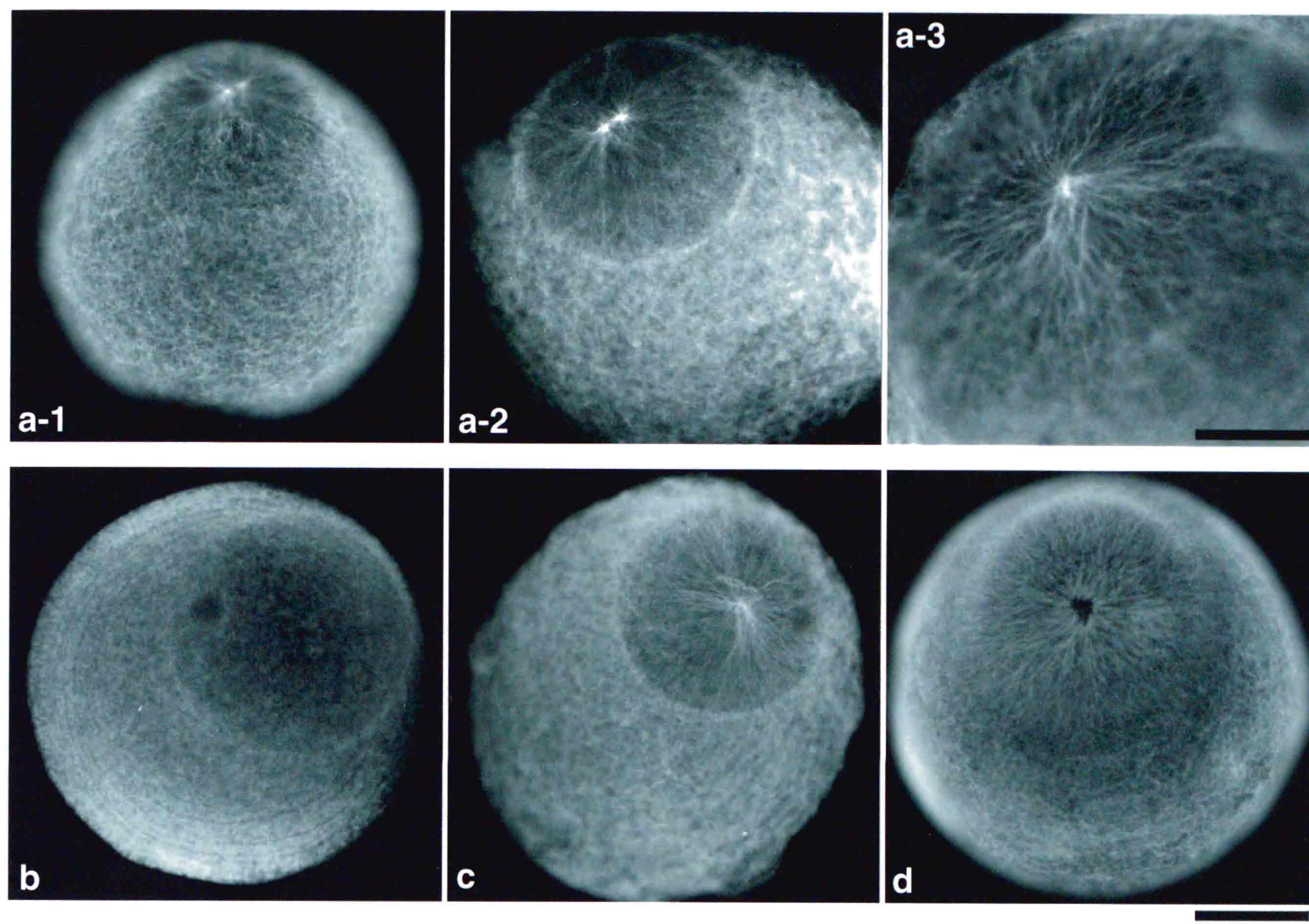
遠心による核小体の移動. 遠心加速度は約 $30 \times g$.

図の上が求心方向, 下が遠心方向. 数字は一番左のフレームの時点をもとにしたときの時間(秒). バーは $20 \mu\text{m}$.

a: GVの中央付近にあったものは, 一定の速度でまっすぐに遠心端まで移動した.

b: 核膜近くにあったものは, 遠心方向へと移動して核膜にぶつかった後, 核膜に沿って遠心端まで移動した.

図5 イトマキヒトデ卵母細胞の微小管構造



抗 α -tubulin抗体を用いた間接蛍光抗体法によりイトマキヒトデ未成熟卵の微小管構造を染色した。

バーは50 μ m. a-3のみ25 μ m.

a: 未処理卵

動物極付近にtubulinを高密度に含み, 明るく染色される点が1つ (a-3), または2つあり (a-1, a-2), そこから放射状に微小管が広がる. GVの核膜を取り巻く部分, GV以外の部分の網目状の構造も観察される.

b: nocodazole処理卵

放射状の構造も細胞質の網目状の構造も観察されない.

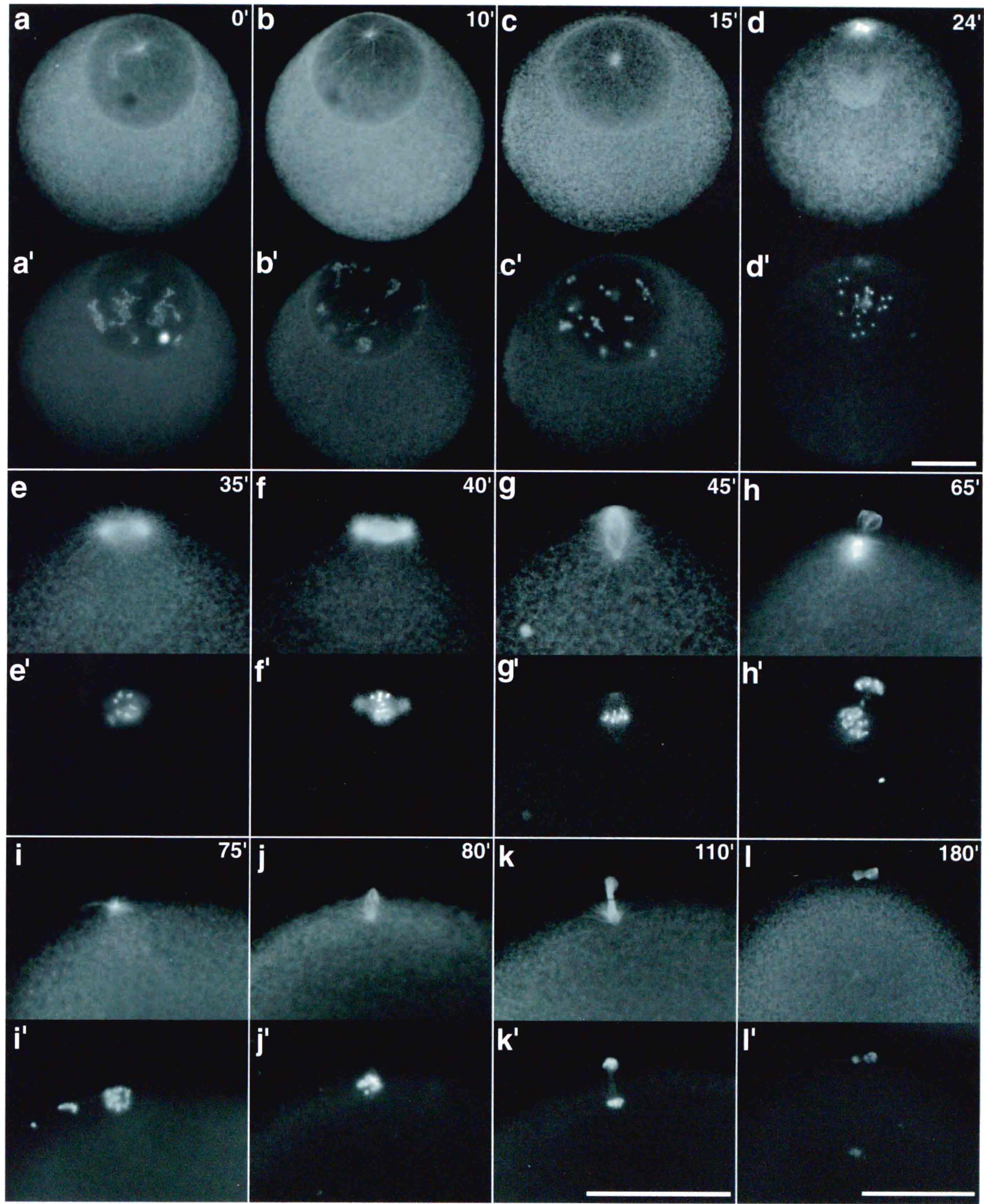
c: cytochalasin B処理卵

未処理の卵母細胞と同様の微小管構造が観察される.

d: taxol処理卵

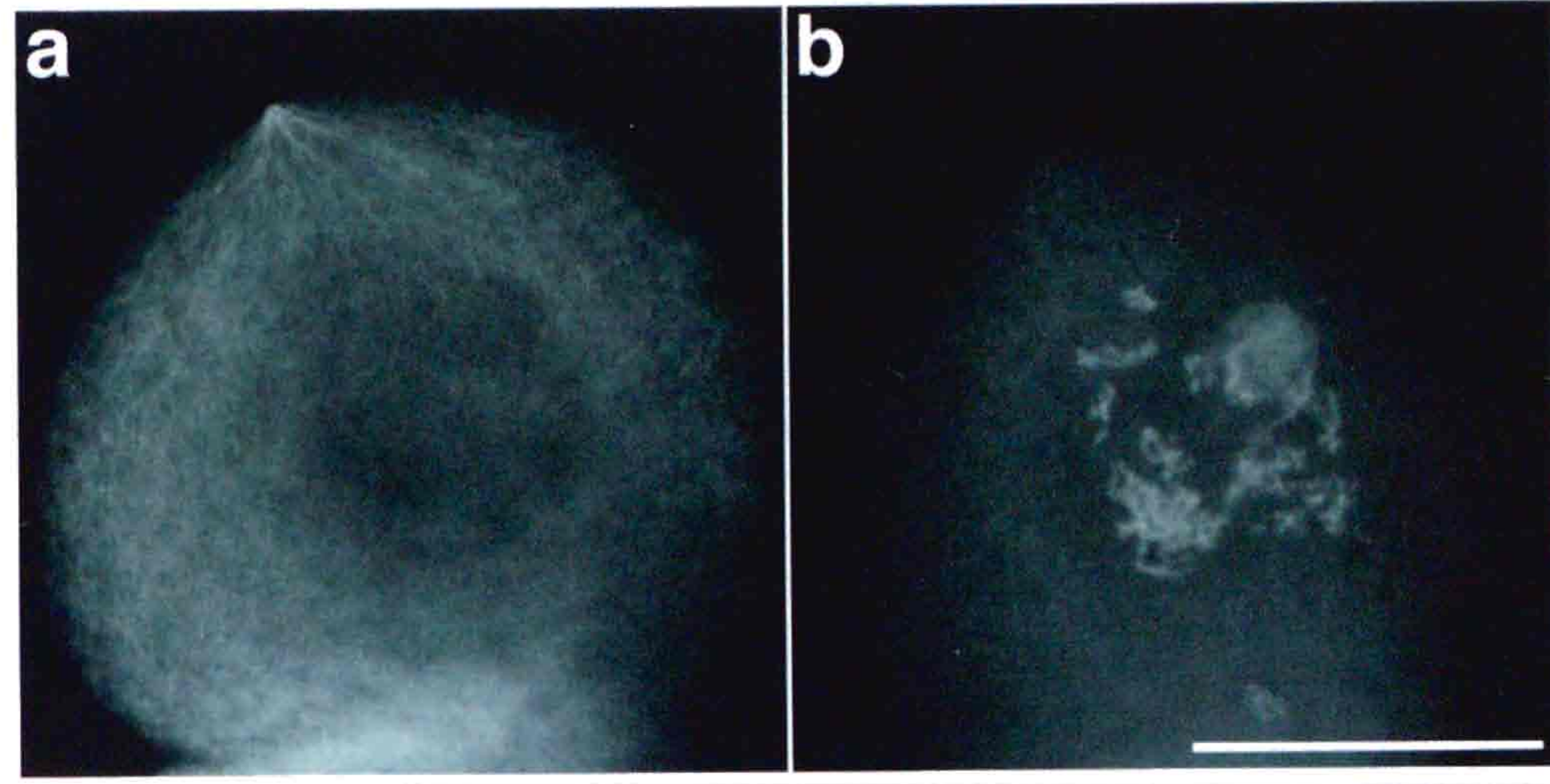
放射状の微小管の密度が増加している. 放射状の中央には, 染色されない直径16~20 μ mの円形の部分がある.

図6 卵成熟中のイトマキヒトデ卵母細胞の微小管と染色体



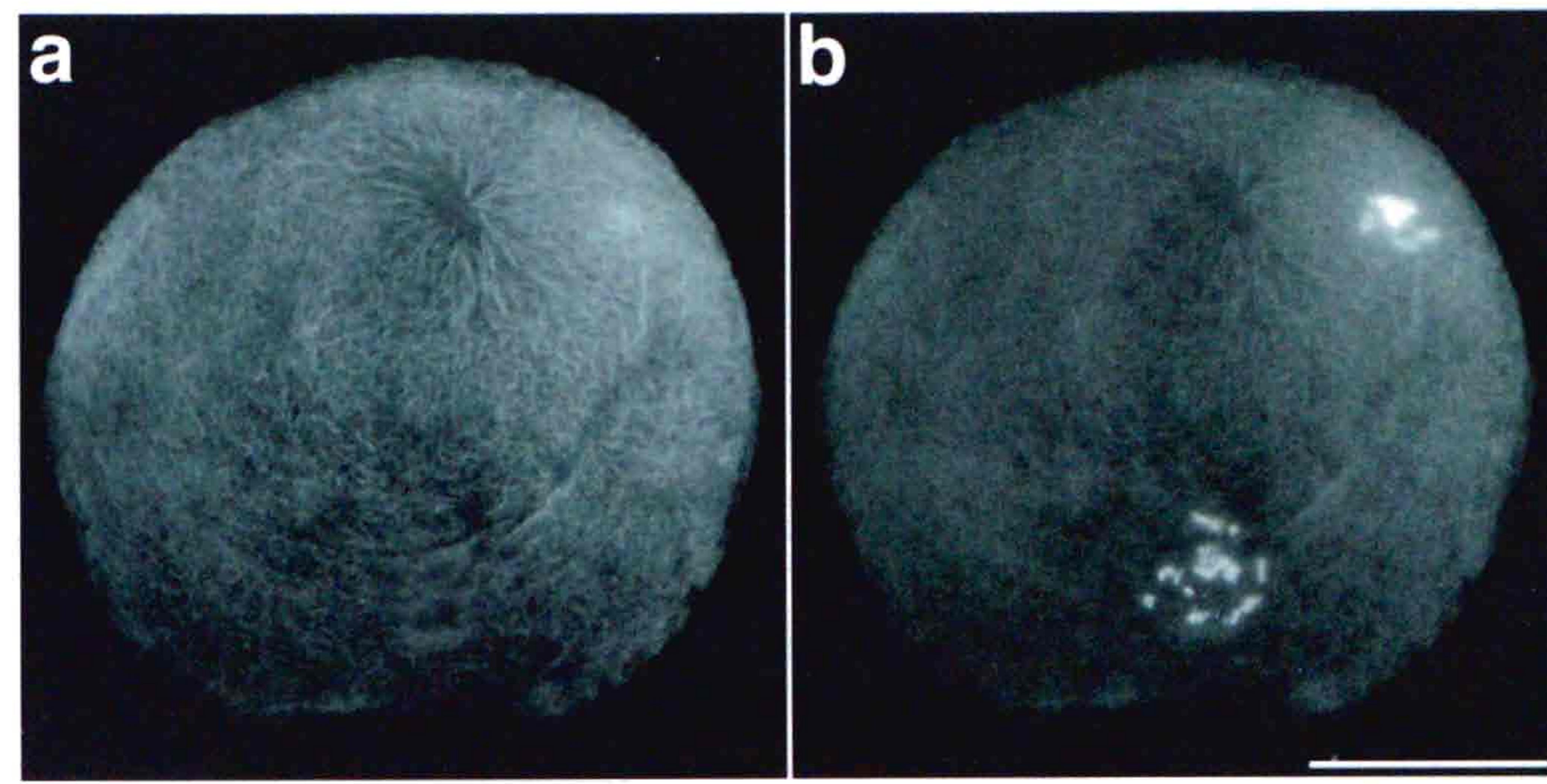
卵成熟誘起後から第二極体放出後までのイトマキヒトデ卵母細胞の微小管(a~l)と染色体(a'~l'). 微小管は抗 α -tubulin抗体を, 染色体はDAPIを用いて染色した. 数字は1-MeAde処理からの時間(分). バーは50 μ m.
 予定動物極の明るく染色される点は, 消えることなく減数分裂(極体形成)の分裂装置の極となる.

図7 成長途中の小さな卵母細胞の微小管構造



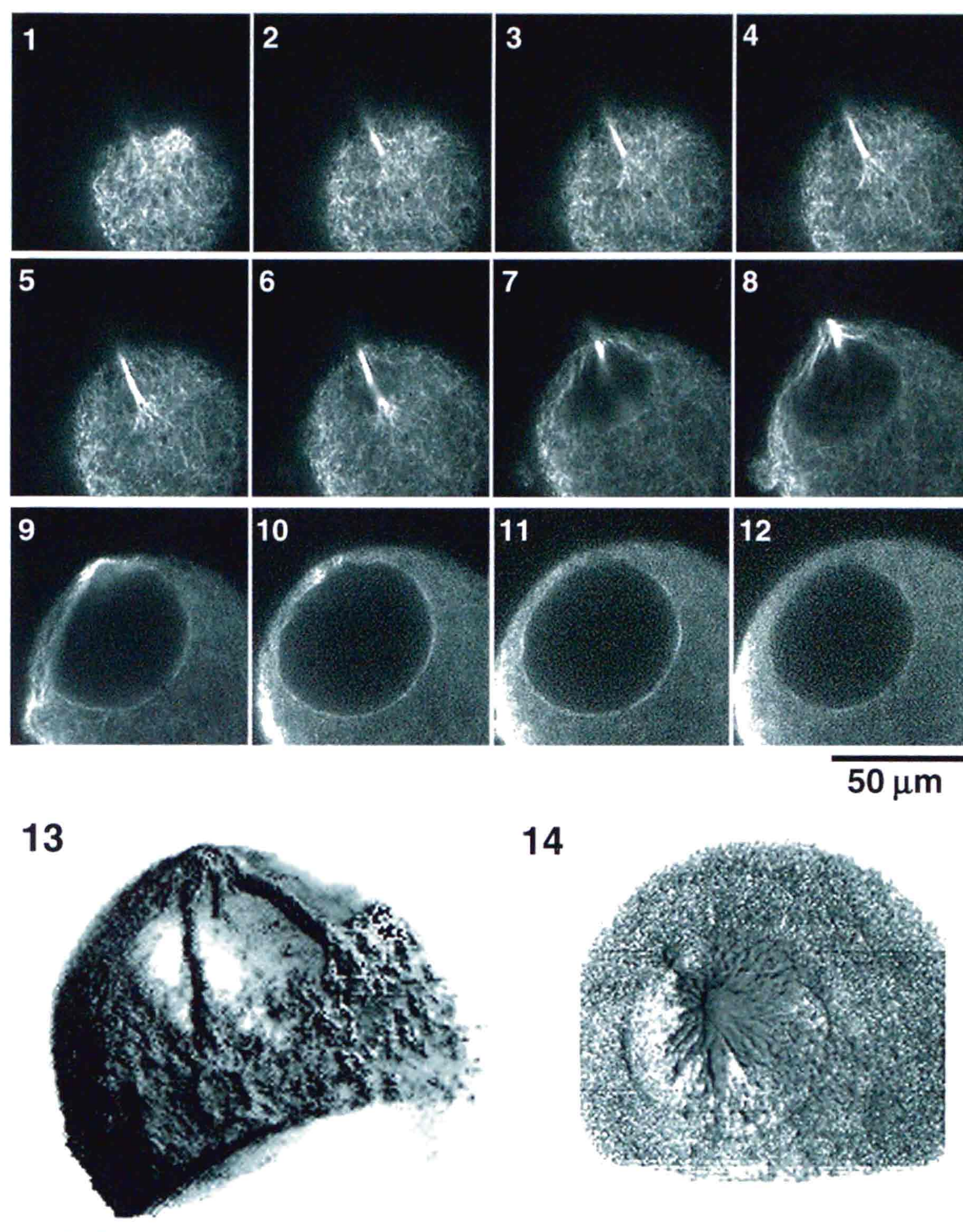
成長途中である直径約 $100\mu\text{m}$ のイトマキヒトデ卵母細胞の微小管構造(a)と染色体(b). 微小管は抗 α -tubulin抗体を, 染色体はDAPIを用いて染色した. バーは $50\mu\text{m}$. 卵表に明るく光る点とそこから放射状に伸びる微小管とが観察される. 放射状の微小管は十分に成長した卵母細胞(図5-a)に比べると少ない. 染色体はまだ凝縮していない.

図 8 遠心した卵母細胞の微小管構造



遠心でGVを植物極側へと移動させたイトマキヒトデ卵の微小管構造(a)と染色体(b).
微小管は抗 α -tubulin抗体を, 染色体はDAPIを用いて染色した. バーは50 μ m.
染色体の位置から, GVは植物極側にあることがわかる. 放射状の微小管は正常な卵母細胞と同様に観察されるが, その中心部分はなくなっている.

図9 共焦点レーザー顕微鏡による観察



共焦点レーザー顕微鏡によって得られた未処理のイトマキヒトデ未成熟卵母細胞の連続断層画像(1~8は1μmごと, 9~12は5μmごと)と, それらの断層画像をコンピュータにより三次元再構築した立体像(13). GVの周囲の微小管がはっきりと観察される(10, 11). また, 放射状の微小管の末端が枝分かれして, 細胞質の網目状の構造に入り込んでいることがわかる(13). 14は別の卵母細胞から得られた断面画像(図には示していない)を三次元再構築した例で, 動物極側から見たところ. この卵母細胞では細い放射状微小管が多数観察される.