

アフリカツメガエル卵成熟過程に対する過重力の影響 II

広大・院理・両生研 古野伸明、田澤一郎、柏木啓子、東京都・老人研 新海正、鳥取大・医・生命科学 吉留賢、徳島大・総合科学部・自然システム学 渡部稔、ISAS/JAXA 山下雅道、広大・院理・両生研 柏木昭彦

Effects of hypergravity on oocyte maturation in *Xenopus laevis*, Part II

Nobuaki Furuno^a, Ichiro Tazawa^a, Keiko Kashiwagi^a, Tadashi Shinkai^b, Satoshi Yoshitome^c, Minoru Watanabe^d, Masamichi Yamashita^e, Akihiko Kashiwagi^a

^aInstitute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima 739-8526, Japan, ²Redox Regulation Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015, Japan, ^cDepartment of Biomedical Sciences, School of Life Science, Tottori University, Yonago 683-8503, Japan, ^dFaculty of Integrated Arts and Sciences, Tokushima University, 1-1 Minami-jousanjima, Tokushima 770-8502, Japan, ^eInstitute of Space and Astronautical Science (ISAS), Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Yoshinodai, Sagami-hara, Kanagawa 229-8510, Japan

E-Mail: nfuluno@hiroshima-u.ac.jp

Abstract: Full-grown *Xenopus* oocytes arrest at the prophase of meiosis I. The hormone progesterone induces resumption of the meiotic cell cycle, leading to maturation of the oocyte into a fertilizable egg. We investigated the effect of hypergravity on *Xenopus* oocyte maturation. At the last meeting, we reported that hypergravity did not affect the initiation of maturation, whereas the progression of maturation was affected regarding the external appearance of the white spot. The present study examines changes in spindle morphology during *Xenopus* oocyte maturation. Cytological examination showed that spindle formation of meiosis II was largely inhibited, although meiosis I was successfully completed. These findings suggest that hypergravity inhibits the bipolar spindle formation of meiosis II, and hence adversely affects the process of oocyte maturation in *Xenopus laevis*.

Key words: *Xenopus*, hypergravity, oocyte maturation, meiotic apparatus, spindle formation

現在、地球規模で化学物質による環境汚染が進行している。さらに、炭酸ガスなど温室効果ガスの排出による地球温暖化も進んでおり、その結果、地表に貯えられた氷が溶けて将来海面が上昇し、ヒトが住んでいる地域のかなりの部分の水没が予想されている。また、人口の増加も著しい。これらの事象は、地球上での人類の生存を脅かす要因となる。これらの困難を回避するため、他の惑星や衛星への移住は1つの手段である。そのためには宇宙環境下において、ヒトが健康な生活をおくれるのかどうか、また、食料の自給などのため生物の生活環が正常に回るかどうかを調べる必要がある。各種のモデル生物の中で、アフリカツメガエルは宇宙環境の生物への影響を調べるのに大変に適した生物であると考えられている。その理由は、季節に関係なくホルモン注射によって多数の卵が得られること、体外受精のためごく初期からの発生過程が容易に観察できることなどである。我々はその利点を生かして、過重力がアフリカツメガエル初期発生にどのような影響を与えるかを調べてきた。その結果、過重力に対して

敏感な時期は受精直後から卵割開始までであり、その時期に過重力をかけると、発生の遅れや、小頭症や小眼症などの様々な奇形が誘起されることがわかった。またその後の研究により、このような異常はある特定の遺伝子機能が抑制された結果、異常な細胞死が脳や眼で誘起されたために起こることが示唆された^{1,2)}。

卵成熟とは、卵減数分裂の一部の過程であり受精可能な未受精卵になるための重要なステップである。卵は、始原生殖細胞が卵巣に移動して生じた卵原細胞からできる。これを卵母細胞といい、この細胞は減数分裂に入って発生に必要な養分などを貯えて十分に成長して、第一減数分裂の前期で停止する。成長した卵母細胞は、ホルモンなどの刺激を受けて減数分裂を再開し、脊椎動物の場合、再び第二減数分裂の中期で停止する。この状態になった卵母細胞が未受精卵である。卵成熟とは、第一減数分裂の前期から第二減数分裂の中期までを呼ぶ³⁾。

第一減数分裂の前期で停止している十分に成長したアフリカツメガエルの卵母細胞には、卵核胞と

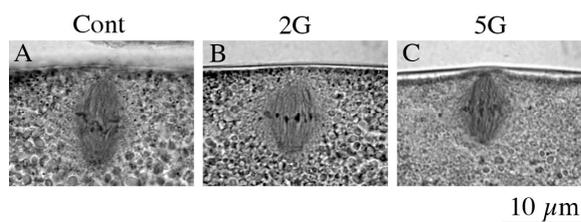


Fig. 1 Morphology of meiotic apparatus in meiosis I oocytes treated with hypergravity. A: Untreated control. B: 2G. C: 5G. Bar represents 10 μ m.

呼ばれる巨大な核が存在する。ホルモン刺激によって減数分裂が再開すると、この卵核胞が崩壊し動物極に白斑が生じる。その後、染色体凝縮が起こり、紡錘体の形成が始まる。最初に紡錘体は、動物極の表面近くで細胞膜に対して平行に形成されつつ、細胞膜直下に移動してゆく。その後、徐々に紡錘体は回転して、細胞膜に垂直になる。卵核胞崩壊の約2時間後に第一極体が放出され、卵核胞崩壊後約4時間経過すると垂直の紡錘体が再度形成され第二減数分裂の中期に至る⁴⁾。宇宙環境が卵成熟過程に与える影響については、筆者らの知るかぎり、クリノスタートを用いたマウスの卵成熟に対する影響以外に報告がない⁵⁾。我々は最近、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて、この卵成熟過程を2G、5Gの過重力に暴露して、その影響を調べている。その結果、白斑の出現時期から判断して卵成熟の開始には過重力は影響を与えないが、その形状が変化すること、そして、卵成熟の進行とともに白斑がより大きくなることを報告した⁶⁾。本研究では、過重力下での卵成熟過程の紡錘体の形状変化を調べた。

1. 第一減数分裂における紡錘体形成に対する過重力の影響

田沢らは昨年、過重力は、卵成熟の開始には影響を与えないが、出現した白斑の外観に影響を及ぼすことを報告した⁶⁾。このことは、過重力が卵の内部構造にも影響を与える事を強く示唆する。そこで、卵の主な内部構造体である分裂装置に注目し、過重

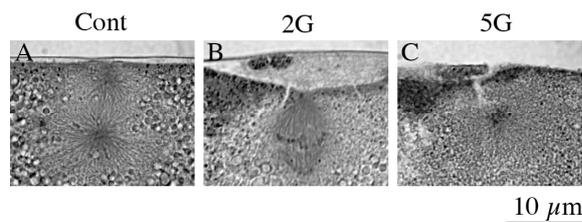


Fig. 2 Appearance of meiotic apparatus in meiosis I/II transition. A: Untreated control. B: 2G. C: 5G. Bar represents 10 μ m.

力に対する影響を調べた。そのため、ステージ VI の卵母細胞⁷⁾を無処理群と2G、5Gの実験のためそれぞれ150個集め、1×MBS⁸⁾⁹⁾中で卵成熟誘起ホルモンであるプロゲステロンで処理を行い、その直後から2G、5Gの過重力をかけた。その後、白斑出現の開始期を0時間として、1時間ごとに4時間まで卵母細胞を集め、スミスの液¹⁰⁾で固定したのち、包埋して切片を作製し、シッフ試薬で染色した。対比染色にはファーストグリーンを使用した⁴⁾¹¹⁾。白斑出現後1時間では、無処理群では、細胞膜に対して垂直の紡錘体が形成されていた(図1A)。同様の結果は2G、5G処理群でも得られた(図1BとC)。この結果は、過重力は白斑の形状には影響を与えるものの、第一減数分裂の紡錘体形成には影響をしないことを示す。白斑出現後2時間では、無処理群、2G、5G処理群でも、正常に第一極体が放出される像が得られた(図2A、BとC)。図1と図2に示す結果から、分裂装置の形態で見ると正常に第一減数分裂は終了しており、過重力は第一減数分裂には影響しないことが明らかになった。

2. 第二減数分裂における紡錘体形成に対する過重力の影響

上記の結果から、第一減数分裂の紡錘体形成には、過重力は影響を及ぼさないことが示された。次に、我々は過重力が第二減数分裂の紡錘体形成に影響するかどうか調べた。そのため、白斑出現後、3時間および4時間に卵を集め分裂装置の形態を観察した。その結果、無処理卵では、極体を伴った縦のスピンデルが観察された(図3A)。それに対して、2G処理卵のうち、約70%は正常な縦のスピンデルが見られ、残りの30%はロゼッタ様の星状

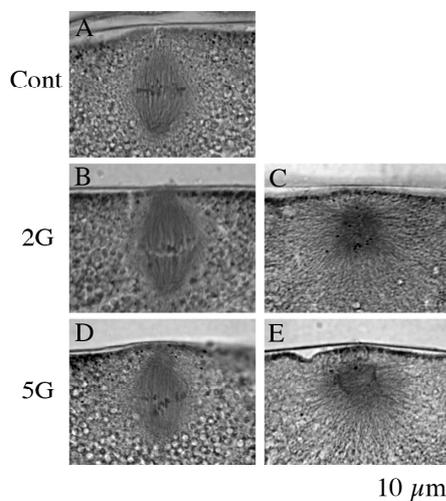


Fig. 3 Configuration of meiotic apparatus in meiosis II. A: Untreated control. B and C: 2G. D and E: 5G. Bar represents 10 μ m.

体（または単極）の分裂装置が観察された（図3BとC）。この傾向は5Gでは更に強まり、調べた卵のうち約30%が正常で、残りの70%に同様の異常な分裂装置が認められた（図3DとE）。これら異常な紡錘体では、受精後に第二極体を正常に放出できないと考えられるので、これらの卵は正常に発生しないことが予想される。以上の結果から、過重力は、第二減数分裂の分裂装置の形成に影響を与えることが示唆された。

3. 終わりに

卵成熟過程は減数分裂の一過程であるが、生物環が宇宙環境下で正常に回るかどうかを検証する上で調べなければならない重要な過程である。しかし、宇宙環境下での研究はほとんどない。これまでに唯一報告されたマウスの卵母細胞を用いたクリノスタートの実験では、卵成熟には影響しないとされている⁵⁾。我々のアフリカツメガエルを用いた一連の研究から、過重力は卵成熟の開始には影響しないものの、白斑の色や大きさに影響を与えること、更に、本研究において、第二減数分裂でも紡錘体が正常に形成されず、アスター構造になることが観察された。特に、紡錘体形成不全は、正常な未受精卵ができないことを意味し、過重力は、卵減数分裂に重篤な影響を与えることが初めて示された。こうしたアスター構造は、サイクリン B2 の細胞質保持シグナルを卵母細胞で過剰発現させた時に見られると報告されているので¹²⁾、過重力は、サイクリン B2 の細胞内局在に何らかの影響を与えた結果、正常な紡錘体が形成されないものと考えられる。

参考文献

- 1) Kashiwagi, A., Hanada, H., Kawakami, S., Kubo, H., Shinkai, T., Fujii, H., Kashiwagi, K. (2003) Effects of high gravity on amphibian development. *Biol. Sci. Space* **17**, 215-216
- 2) Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2006) Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. *Com. Biochem. Physiol. Part A*, **145**, 65-72
- 3) Masui, Y. and Clarke, H. J. (1979) Oocyte maturation. *International Review of Cytology* **57**, 186-282. ed by Bourne, G. H. and Danielli, J. F. Academic Press Inc.
- 4) Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N. (1994) Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **13**: 2399-2410
- 5) Wolgemuth, D. J. and Grills, G. S. (1984) Effects of clinostat rotation on mouse meiotic maturation *in vitro*. *Physiologist* **27** (6 suppl), S99-100
- 6) Tazawa, I., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K. and Furuno, N. (2005) Effects of hypergravity on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Bio. Sci. Space* **19**, 242-244
- 7) Dumont, J. N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, **136**, 153-180
- 8) Gurdon, J. B. (1968) Changes on somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **20**, 401-414
- 9) Sive, H. L., Grainger, R. M. and Harland, R. M. (2000) Early development of *Xenopus laevis* – A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 283-284
- 10) Smith, B. G. (1912) The embryology of *Cryptobranchus alleganiensis* including comparisons with some other vertebrates. *J. Morphology* **23**, 61-153
- 11) Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N. and Sagata, N. (1992) The ‘second-codon rule’ and autophosphorylation govern the stability of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **11**, 2433-2446
- 12) Yoshitome, S., Furuno, N. and Sagata, N. (1998) Overexpression of the cytoplasmic retention signal region of cyclin B2, but not of cyclin B1, inhibits bipolar spindle formation in *Xenopus* oocytes. *Biol. Cell*, **90**, 509-518