

## アフリカツメガエル卵成熟過程に対する過重力の影響

広島大・院理・両生研 古野伸明、田澤一郎、柏木啓子、川上智美、鳥取大・医 吉留賢、徳島大・総合科学 渡部稔、ISAS/JAXA 山下雅道、広島大・院理・両生研 柏木昭彦

### Effects of the hypergravity on oocyte maturation of *Xenopus laevis*

Nobuaki Furuno<sup>a</sup>, Ichiro Tazawa<sup>a</sup>, Keiko Kashiwaga<sup>a</sup>, Tomomi Kawakami<sup>a</sup>, Satoshi Yoshitome<sup>b</sup>, Minoru Watanabe<sup>c</sup>, Masamichi Yamashita<sup>d</sup>, Akihiko Kashiwaga<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Institute for Amphibian Biology, Graduate School Science, Hiroshima University, Higashihiroshima 739-8526, <sup>b</sup>Department of Biomedical Sciences, School of Life Science, Tottori University, Yonago 683-8503, <sup>c</sup>Faculty of Integrated Arts and Sciences, Tokushima University, 1-1 Minami-jousanjima, Tokushima 770-8502, <sup>d</sup>Institute of Space and Astronautical Science (ISAS), Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Yoshinodai, Sagami-hara, Kanagawa 229-8510

E-mail: nfuruno@hiroshima-u.ac.jp

**Abstract:** Developing oocytes arrest at the prophase of meiosis I, while the hormone progesterone restarts the process, leading to full maturation into a fertile egg. In this study we investigated the effects of hypergravity on this phase of maturation using oocytes of *Xenopus*. No differences were found between 2G, 5G and untreated controls regarding time to resumption of maturation, as judged by the appearance of a white spot in the animal hemisphere, whereas the white spot itself was larger and brighter in treated oocytes at time of appearance, and became even more pronounced as maturation proceeded. These findings suggest that although hypergravity does not affect the resumption of maturation, it might adversely affect the subsequent process and final results.

**Key words:** *Xenopus*, hypergravity, oocyte maturation, white spot

宇宙旅行や、将来、他の惑星・衛星に植民するうえで、宇宙環境の生物に対する影響を研究する事は大変重要である。各種のモデル生物の中でも、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ために大変適した生物であると考えられる。その理由は、多くの卵が一度に得られる事や受精が体外で行なわれる事、そしてその発生過程が容易に観察できるからである。我々は最近、アフリカツメガエル胚を用い、過重力がその胚発生にどのような影響を与えるか調べた。その結果、過重力下では発生の遅れが観察され、小頭症や小眼症などを含む様々な奇形が誘起される事を報告した。そして、そのような異常が、ある種の遺伝子の機能が抑制され、その結果異常な細胞死が脳や眼で誘導されて起こる事を示唆した<sup>1)</sup>。

十分に成長したアフリカツメガエルの卵母細胞は、

第一減数分裂の前期で停止している。この時、卵母細胞には卵核胞とよばれる巨大な核が存在する。卵母細胞がホルモン刺激によって減数分裂を再開すると、この卵核胞が崩壊し動物極に白斑が生じる。その後、卵母細胞は第二減数分裂の中期で再度分裂を停止して受精を待つ。卵成熟とは、第一減数分裂の前期で減数分裂を停止していた卵母細胞が、ホルモンなどの刺激によって減数分裂を再開し、脊椎動物の場合、第二減数分裂の中期で停止するまでの過程をいう<sup>2)</sup>。よって、動物極にあらわれる白斑は、卵成熟が開始したかどうかのよい指標となる。この卵成熟の結果、卵母細胞が受精可能な未受精卵へ変化する。このように卵成熟は、受精可能な未受精卵へなる為に重要な過程である。しかしながら、宇宙環境が卵成熟にどのような影響を与えるかは、クリノスタートを用いてマウスの卵成熟がどうなるかを調

べた以外に報告が無い<sup>3)</sup>。本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、卵成熟過程を2G、5Gの過重力に暴露しその影響を調べた。

### 1. 卵成熟の開始に対する影響

卵成熟の開始は、動物極に出現する白斑で判定出来る。過重力の卵成熟の開始に対する影響を調べる為、十分に成長した卵母細胞をそれぞれ150個集めて卵成熟誘起ホルモンであるプロゲステロン (PG) 処理を行ない、その直後から2G、5Gの過重力をかけた。その後、適当な時間間隔で動物極の白斑の出現を観察し、その数をカウントした。図1は、その代表的な実験結果を示す。この時には、無処理では、約4時間で半数の卵母細胞に白斑が出現し、6時間でほぼすべての卵母細胞に白斑が出現していた。これに対して、2G、5Gでも4時間でほぼ半数の卵母細胞に白斑が出現し、6時間でほぼすべての卵母細胞に白斑が出現していた。この結果、2G、5Gの過重力は卵成熟の開始には影響を与えない事が示された。しかしながら、図2の0h（この時間は白斑出現直後を示す）からわかるように、過重力に暴露すると、白斑が無処理のものと比較してより白かった。この傾向は、5Gではより強く見られた。

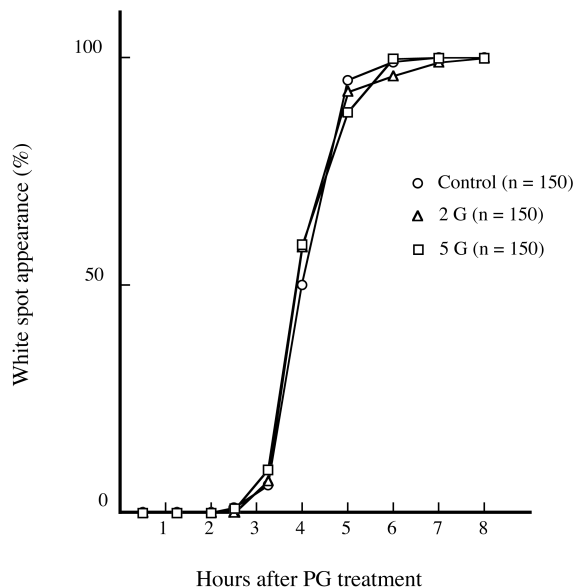


Figure 1. Time to appearance of white spot. 2G, 5G and control groups contained 150 oocytes each. ○= control, △= 2G, □= 5G

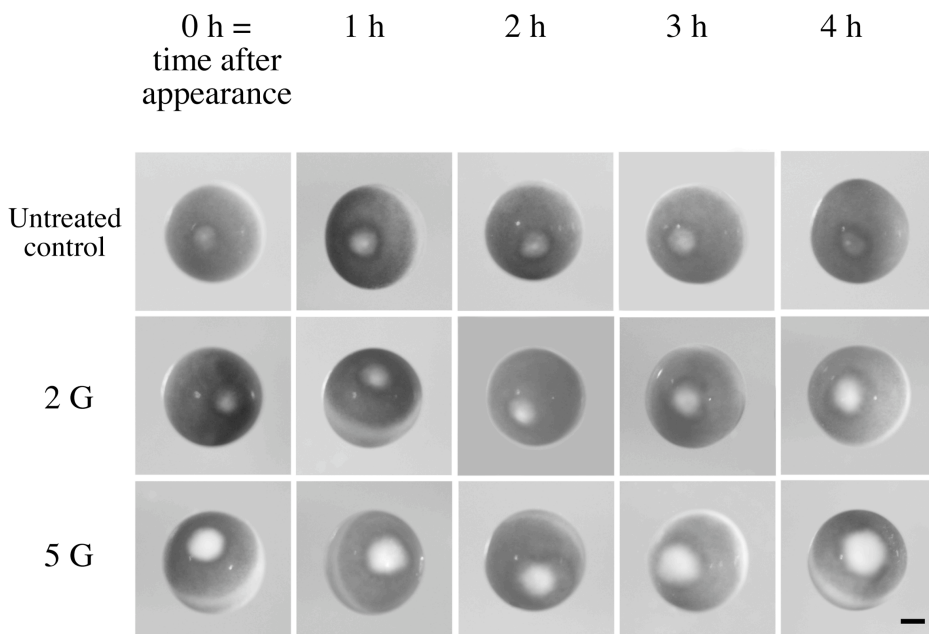


Figure 2. Relative brightness of white spot. Ten sample oocytes were collected from each group at 0, 1, 2, 3 and 4 hours after white spot appearance and were fixed and photographed. Note that the white spot in 2G and 5G becomes gradually larger and brighter as opposed to controls. 0h = appearance of white spot. 1h = one hour later. 2h = two hours later. 3h = three hours later. 4h = four hours later. Bar, 200 $\mu$ m.

また、過重力に暴露すると白斑が重力依存的に大きくなる傾向が観察された。それを確かめる為、それぞれのサンプルを10個ずつとって白斑の面積を測定し、統計処理したのが図3の0hである。図から分かるように、2Gでは白斑の大きさが無処理の1.4倍、5Gでは2.5倍の大きさになり、過重力下では、白斑が重力依存的に大きくなっていった。さ

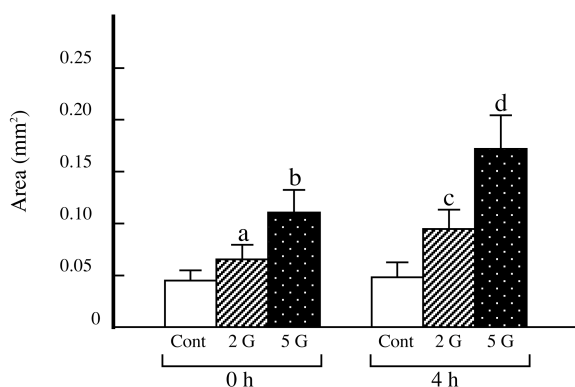


Figure 3. Relative area of white spot. Ten sample oocytes were collected from each group at 4 hours after white spot appearance. These were photographed and white size was measured. <sup>a</sup>Significantly less ( $P < 0.01$ ) than 5G value. <sup>b</sup>Significantly greater ( $P < 0.01$ ) than control value. <sup>c</sup>Significantly greater ( $P < 0.01$ ) than control value. <sup>d</sup>Significantly greater ( $P < 0.01$ ) than 2G value.

らに、過重力下では、白斑が動物極の頂点からから少しずれて出現しているのもあった (data not shown)。これらの結果から、過重力はアフリカツメガエルの卵成熟の開始にはほとんど影響を与えない事が示唆されたが、白斑の色や大きさ、出現位置に何らかの影響を与える事が示唆された。

## 2. 卵成熟の進行に対する過重力の影響

通常、白斑出現後約4時間で第二減数分裂の中期に到達し、卵成熟は完了する<sup>4)</sup>。そこで、次に卵成熟の進行に対する過重力の影響を調べた。そのため、白斑出現後 (図2の0h)、1時間おきに4時間まで卵母細胞を固定しその白斑の様子を観察した。図2は、その結果を示す。無処理では、時間経過にかかわらず白斑の様子はほとんど変化が無かった。しかしながら、2G、5Gでは、時間経過とともに、無処理のものと比較して、白斑がより白くなっていった。また、図2から分かるように無処理と比較して白斑が時間経過とともに大きくなっていく傾向が見られた。それを確かめる為、白斑の面積を測定し、

統計処理を行なったのが図3である。図3から分かるように、白斑出現後4時間では、無処理では白斑の面積にほとんど差はなかったが、2Gでは無処理の1.9倍、5Gでは3.5倍になっていた。これらの結果は、過重力は卵成熟の進行に何らかの影響を与える事を示唆した。

## 3. 終わりに

今まで、卵成熟に対する重力の影響を調べた報告はほとんど無く、唯一、マウスの卵母細胞を用いたクリノスタートの実験で、重力は卵成熟に影響をほとんど与えないと報告されている。本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて卵成熟に対する過重力の影響調べ、過重力は卵成熟の開始には影響を与えないものの、白斑の色や大きさ、その出現位置に影響を与える事、さらに、白斑出現後、時間経過とともにその影響が強くなる事が示され、卵成熟に何らかの影響を与える事が示唆された。実際、予備的な実験において、第一減数分裂完了までは2G、5Gでは正常に進行しているが、第二減数分裂に入って、一部の卵母細胞において紡錘体が正常に形成されずアスター構造を形成しているのが観察された。以上の結果から、過重力は、卵成熟に影響をおよぼす事が強く示唆された。

## 参考文献

- 1) Kashiwagi, A., Hanada, H., Kawakami, S., Kubo, H., Shinkai, T., Fujii, H., Kashiwagi, K. Effects of high gravity on amphibian development. *Biol. Sci. Space* **17**, 215-216, (2003).
- 2) Masui, Y. and Clarke, H. J. Oocyte maturation. *International Review of Cytology* **57**, 186-282, (1979). ed by Bourne, G. H. and Danielli, J. F. Academic Press Inc.
- 3) Wolgemuth, D. J. and Grills, G. S. Effects of clinostat rotation on mouse meiotic maturation in vitro. *Physiologist* **27** (6 suppl), S99-100, (1984).
- 4) Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y. and Sagata, N. Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **13**: 2399-2410, (1994).