

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	不等分裂、均等分裂における 細胞骨格構造の定量的解析と力の推定
Title(English)	
著者(和文)	佐藤節子
Author(English)	Setsuko K. Satoh
出典(和文)	学位:博士(学術), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4067号, 授与年月日:2012年3月31日, 学位の種別:論文博士, 審査員:濱口幸久
Citation(English)	Degree:Doctor(Philosophy), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4067号, Conferred date:2012/3/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

不等分裂、均等分裂における
細胞骨格構造の定量的解析と力の推定

佐藤 節子

目 次

第 1 章 序論と概略

1-1 序論	1
1-1-1 細胞分裂の分子機構	1
1-1-2 張力	3
1-1-3 目的	4
1-2 概略	4

第 1 章の図

図1-1 細胞分裂	8
図1-2 細胞骨格	9
図1-3 収縮機構	10
図1-4 様々な分裂様式	11
図1-5 張力の測定方法	12
図1-6 収縮モデル	13
図1-7 張力の定義	14

第 2 章 材料と方法

2-1 材料	15
2-1-1 イトマキヒトデ卵母細胞	15
2-1-2 ウニ卵	15
2-2 方法	16
2-2-1 染色体の蛍光染色	16
2-2-2 微小管の蛍光染色	16
2-2-3 アクチンの蛍光染色	16
2-3 顕微鏡観察	17

2-3-1	生きている卵母細胞の染色体と分裂装置の観察	17
2-3-2	蛍光染色した卵の顕微鏡観察	17
2-3-3	張力測定用画像	18
2-4	画像解析	18
2-4-1	生きている卵の微小管の定量化	18
2-4-2	蛍光像からの微小管の定量化	18
2-4-3	蛍光像からのアクチン繊維の定量化	19
2-4-4	張力測定のための画像の取り込み方法と測定法	19
2-4-4-1	卵母細胞全体の張力測定	19
2-4-4-2	動物極の張力測定	19
2-4-4-3	疑似カラー化	19

第2章の図

図2-1	実験動物	20
------	------	----

第3章 イトマキヒトデ卵母細胞の微小管分布

3-1	はじめに	21
3-2	結果	21
3-2-1	分裂装置の微小管分布-免疫蛍光法	21
3-2-1-1	細胞質抽出卵の微小管	21
3-2-1-2	単離した分裂装置	22
3-2-2	分裂装置の微小管分布-偏光顕微鏡法	23
3-2-3	細胞表層への接着を阻害したときの分裂装置の微小管分布	23
3-2-4	染色体と細胞表層	23
3-3	考察	23

第3章の図

図3-1	減数第一分裂	25
------	--------	----

図3-2 減数第二分裂	26
図3-3 単離した分裂装置と微小管分布	27
図3-4 動物極表層と分裂装置	28
図3-5 遠心処理卵の分裂装置と微小管分布	29
図3-6 動物極表層と染色体	30

第4章 イトマキヒトデ卵母細胞における極体形成時の微小管

4-1 はじめに	31
4-2 結果	31
4-2-1 非対称の増強	31
4-2-2 微小管分布	32
4-3 考察	33

第4章の図表

図4-1 極体形成時の分裂装置	34
図4-2 分裂装置の蛍光強度	35
表4-1 蛍光強度比	36

第5章 ウニ卵の第一分裂における表層アクチン繊維

5-1 はじめに	37
5-2 結果	37
5-2-1 Method I による表層アクチン分布	38
5-2-2 Method II による表層アクチン分布	38
5-2-3 Method III による表層アクチン分布	38
5-2-4 サイトカラシンB処理卵のアクチン分布	39
5-3 考察	39

第5章の図

図5-1	アクチン定量方法	42
図5-2a	Method I を適用した場合の 分裂過程における赤道直径と極-極間の距離	43
図5-2b	Method I を適用した場合の分裂過程におけるアクチン分布	44
図5-3a	Method II を適用した場合の分裂過程におけるアクチン分布	45
図5-3b	Method II を適用した場合の分裂過程の収縮環幅	46
図5-4a	Method III を適用した場合の分裂過程のアクチン分布	47
図5-4b	Method III を適用した場合の分裂過程の収縮環幅	48
図5-5	従来型と共焦点型の蛍光顕微鏡像の比較	49
図5-6	サイトカラシンB処理卵の蛍光像	50

第6章 イトマキヒトデにおける極体形成時の表層アクチン

6-1	はじめに	51
6-1-1	不等分裂の指標	51
6-2	方法	52
6-2-1	アクチン定量 Method I	52
6-2-2	アクチン定量 Method II	53
6-3	結果	53
6-3-1	極体形成時の動物極の形態変化	53
6-3-2	極体形成時の表層アクチン分布	54
6-3-3	極体形成を阻害したときのアクチン分布	54
6-4	考察	55
6-4-1	膨らみと分裂溝形成	55
6-4-2	表層のアクチン分布	55
6-4-3	極体形成機構	56

第6章の図

図6-1	Method I を適用したアクチン定量法	58
図6-2	Method II を適用した蛍光強度と分裂溝直径測定法	59
図6-3	高倍率での極体形成時の動物極付近の形態変化と染色体の動態	60
図6-4	極体形成時の形態変化	61
図6-5	低倍率での極体形成時の蛍光像	62
図6-6	1-MeAde処理後の赤道表層と 動物極(AP)、植物極(VP)表層の蛍光強度比	63
図6-7	分裂溝の蛍光強度比と分裂溝直径	64
図6-8	動物極表層の蛍光強度比と動物極の高さとの関係	65
図6-9	分裂溝の蛍光強度比と膨らみ、または分裂溝直径の関係	66
図6-10	動物極を圧迫した時の極体形成阻害	67
図6-11	動植物軸を圧迫した時の極体形成阻害	68
図6-12	極体形成時の卵母細胞における 形態変化と表層のアクチン分布の模式図	69

第7章 イトマキヒトデ卵母細胞における極体形成時の張力の変化

7-1	はじめに	70
7-2	結果	70
7-2-1	卵母細胞全体の張力の変化	70
7-2-2	動物極の張力の変化	71
7-3	考察	72

第7章の図

図7-1	低解像のデジタル画像からの張力の測定法	73
図7-2	高解像のデジタル画像からの張力の測定法	74
図7-3	低解像度で撮影したときの極体形成	75

図7-4 動植物極と赤道の張力	76
図7-5 動物極の張力	77

第8章 不等分裂のまとめと均等分裂との比較、および今後の展望

8-1 はじめに	78
8-2 不等分裂時の分裂装置とアクチン繊維	78
8-3 不等分裂時の張力の変化	78
8-4 張力とアクチン分布	79
8-5 星状体微小管の役割	80
8-6 考察	80
8-7 まとめ	81

第8章の図

図8-1 動物極の張力の時間変化	83
図8-2 動物極のアクチンの時間変化	84
図8-3 考察	85

引用文献.....	86
-----------	----

謝辞.....	92
---------	----

第1章 序論と概略

1-1 序論

卵細胞は受精することにより分裂を繰り返し、組織、器官、個体を形成する。この過程の均等分裂についての研究が古くからなされてきた。はじめは分裂過程を光学顕微鏡で観察する形態学的な手法から始まった。その後の技術の進歩により、電子顕微鏡、偏光顕微鏡、微分干渉顕微鏡などの新しい顕微鏡を利用した詳細な細胞内観察が可能になり、細胞分裂を行っている細胞の中に染色体、中心体、紡錘体、星状体から構成される分裂装置(56)、また、細胞表層の収縮環(43 69)の存在などが次々に明らかにされてきた。

Kanataniによってイトマキヒトデの卵成熟誘起ホルモンが同定されたことから卵成熟過程を観察できるようになった(32)。この過程は卵母細胞が成熟し、受精可能な成熟卵になる過程で極端な不等分裂によって形成される、極体に半分の染色体を入れて、卵外に放出する。この重要な機構はいまだに解明されていない。

これまでに細胞内の微細構造を構成する様々なタンパク質が単離され、以前は顕微鏡下で直接見ることが困難であったこれらのタンパク質が蛍光試薬の発見、開発に伴い、最近では蛍光顕微鏡で可視化することが可能になってきた(12 13 43 66)。形態観察の画像解析技術においても、コンピュータ、デジタルカメラの著しい発達に伴いデジタル化された高画質画像を得ることが容易になり、高度な画像演算処理を行うことができる画像解析ソフトウェアも開発され、デジタル画像解析装置を使用することにより、デジタル画像解析が適用できるようになってきた(62 73 74)。

1-1-1 細胞分裂の分子機構

細胞分裂は染色体を分離する核分裂と、これらを2個の娘細胞に分ける細胞質分裂に大きく分けられ、核分裂には細胞骨格タンパク質のうち微小管(チューブリン、tubulin)系が関与(14)し、細胞質分裂にはアクチン(actin)-ミオシン(myosin)系が関与していることが知られている(43 69)。また、細胞質分裂時における細胞の分裂面は、分裂装置の位置、方向、および細胞分裂後期の始めの分裂装置の大きさによって形成される分裂溝によって決定される(21 24 29 55)。このときの分裂には同じ大きさの2個の娘細胞に分裂する均等分裂と、分裂装置が紡錘体軸に沿って移動し、分裂溝が2個の中心体から異なっ

た距離に分裂面を形成する不等分裂に分類できる(図1-1, 1-2)。一般的に均等分裂は多くの細胞で見ることができるが、極端な不等分裂は、様々な動物の減数分裂時の卵母細胞の極体形成で見られることが報告されている(8 35 36 40 41 55 75)。

多くの細胞の均等分裂では、細胞質分裂に先だって核の中で染色体の複製が行われた後に、前期、中期、後期、終期を経て2個の娘核に分離し、それぞれの娘細胞に均等に分配される。不等分裂時の核分裂は均等分裂と同様に前期、中期、後期、終期を経るが、染色体は複製することなく数が半減する。

細胞質分裂は核分裂によって形成された娘核を娘細胞に分配する役割を持ち、分裂装置、収縮環が大きな役割を果たす。分裂装置は染色体、中心体、紡錘体、星状体から構成される。細胞質分裂に先だって核分裂が開始し、紡錘体微小管によって2個の娘核がそれぞれの娘細胞に分配される。また、2個の中心体から伸長している星状体微小管を通してシグナルを表層に運び分裂面を決定する役割も担っている。

収縮環を構成するG-アクチン(アクチン分子)は細胞質内に分布し、受精後、重合したF-アクチン(アクチン繊維)は全表層の細胞膜直下に網目構造を作って存在するが、星状体微小管から表層に送られたシグナルによって分裂面が決定し、分裂面付近に集積する。はじめ、アクチンは赤道面にランダムに分布しているが、やがて方向性を持ち、表層の裏打ち構造を形成するタンパク質(スペクトリン、アンキリン等)を足場に平行化(94)、束化して収縮環を形成する。その後、アクチン繊維を架橋していたミオシンが活性化して滑りあうことで、収縮力が発生し、収縮環直径が減少し細胞をくびり切る(図1-3)。収縮の際に力を発生するのはモータータンパク質のミオシンである。収縮環でミオシン繊維がどのように存在しているかは確認されていないが、蛍光抗体法で分裂溝に多いことがわかり、ミオシン抗体を卵内に注入すると細胞質分裂が阻害されることが分かっている(42)。

多細胞の植物細胞、単細胞の出芽酵母、原核細胞(細菌)の分裂は卵細胞とは異なった機構で分裂が行われる(図1-4)。植物細胞のサイズはウニ卵と同様の直径100 μm で、細胞膜の外側を細胞壁が囲み、形を維持しているため、動物細胞のように大きな形態変形を起こさず、染色体分配後、細胞板を形成して分裂する。アクチンは細胞内にランダムに存在し、細胞板の形成にはかかわっているが細胞板を形成する役割は持たない。また、長いアクチンフィラメントが束を形成してランダムに存在している。ミオシンは二つの頭部を

持つ細長い分子で存在し、尾の部分で細胞小器官と結合し、頭の部分でアクチンフィラメントと滑り運動をする(5)。

出芽酵母（真核細胞）はサイズが 5 μm と小さく、植物細胞と同様に細胞膜の外側に細胞壁が存在する。母細胞から出芽し娘細胞は母細胞から分離して、2細胞になる。核は核膜が消失することなく微小管に引っ張られて芽の方向に移動して分裂する。細胞骨格としては、紡錘糸を形成する微小管、細胞極性を形成するアクチンケーブル、細胞膜上に存在するアクチンパッチ、細胞質分裂に関与するセプチンなどの存在が知られており、各々の制御因子が遺伝学的解析により詳細に報告されてきている(37)。

以前は細胞骨格はないと考えられていた原核細胞はさらにサイズが1 μm と小さいが、最近の細胞内微細構造の可視化技術や構造決定法の進歩によって細胞骨格の存在が明らかになってきた。さらに真核細胞に存在する主要な細胞骨格タンパク質のすべてについて、それらに対応するものが原核細胞でも発見されている。卵細胞のアクチンに近い機能を持つFtsZが存在し分裂リングを形成するが、構造は微小管に類似している。また、アクチンと似た構造を持つMreBも存在し、機能面では微小管に似て、細胞長軸に沿って細胞骨格繊維状構造を形成する(15 87 89)。

1-1-2 張力

以前から張力の測定はマニピュレータを使用し、表層に微小ピペットで陰圧をかけるHiramotoらの方法(47 50)やYonedaらのカバーガラスで圧迫する方法(26 93)などの細胞の変形から求められてきた(図1-5)。近年ではウニ卵を使った均等分裂過程の張力をガラス針の先端に積層圧電アクチュエーターで電圧をかけることにより卵を押し、卵の変形から内圧を測定したMiyoshi(46)らによって細胞全表層と収縮環の張力が解析された。その結果、ウニ卵の均等分裂では細胞をくびりきる働きは、収縮環より広い領域の収縮環機能によって発生していることがわかった。さらに、張力発生は、全細胞表層において発生していることもわかった。これらのことから、細胞質分裂には、収縮環だけでなく、全表層の張力発生が重要であることが示唆された。しかし、不等分裂の極体形成については、局所的な事象であることから、現在まで動物極周辺についての詳細な定量ができていない。

1-1-3 目的

上述で収縮についてはアクチンとミオシンが滑り合って直径を縮ませるSchroederの「巾着モデル」(69 図1-6Aa)を説明したが、他に任意のアクチンミオシンネットワークが滑り、赤道付近を縮ませる等方性収縮モデル、アクチンフィラメントの引く力によって膜が内部へ入り込む牽引モデルがあり、未だ明らかになっていない(12 71 図-6A))。

そこで本研究では実際の分裂時にアクチン分布がどのように変化をしているのかを調べた。これまでの収縮環説ではウニ卵の様に均等分裂をする場合は可能であるが、ヒトデ卵母細胞のような極端な不等分裂では収縮環が収縮するだけでは極体を形成することができない(収縮環直径の減少があるだけ)と考えられる(図1-6B)。不等分裂の分裂機構が理解できれば、均等分裂、不等分裂全般の細胞質分裂の仕組みが理解できると考える。

F-アクチン(アクチン繊維)に特異的に結合するキノコ毒の一種、ファロトキシン(phallotoxin)に蛍光標識した試薬を用いて染色した。細胞の蛍光像から細胞表層を切り出してアクチン量を測った。内部にあるアクチンは力を発生するのに影響がないと思われるので除外した。また、表層と細胞質が区別できることはHiramotoらによって既に報告され(25)、細胞質は粘性をもち、収縮力がないことも証明されている(80)。

張力の推定については近年の形態学的な画像解析法により、デジタル化された高画質画像を得ることが容易になり、これらの画像を使用して、高度な画像演算処理を行うことにより、細胞の細部に渡る画像解析が適用できるようになってきた。これらのことから、形から張力を画像演算処理によって推定することを試みた。

1-2 概略

第2章では、実験で用いた材料と方法について示す。不等分裂の解析にはイトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)卵母細胞の極体形成、均等分裂の解析にはバフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、タコノマクラ(*Clypeaster japonicus*)卵の第一分裂を使用して実験を行った。棘皮動物の産卵時期は限定されるため、イトマキヒトデは、三浦半島、房総半島、浅虫沿岸から産卵期に採集し、実験に使用するまで研究室で飼育した。ウニについては異なる種を産卵期に応じて採集し、飼育して使用した。これらの動物から得られる卵は球状であることから定量的解析に適している。実験方法はそれぞれの卵を発生させ、目的に応じて蛍光染色し、細胞分裂過程の顕微鏡像をコンピュータに取り込み、デジタル化して画像

解析を行った。デジタル画像解析のためのソフトウェアは市販のものと独自に開発したものを適時併用した。

第3章では、イトマキヒトデの卵母細胞の不等分裂の分裂装置が非対称を引き起こしたことを示し、その要因を考察する。卵成熟過程の不等分裂は2個の極体を形成し、その中に染色体を入れて、卵外に放出するという重要な役割を果たしている。ここでの不等分裂は分裂装置が紡錘体軸に沿って移動することによって引き起こされる。イトマキヒトデの極体形成時の分裂装置は細胞表層の動物極に紡錘体極が接着し、表層に接着した星状体は内側の星状体より小さく、サイズは細胞質に依存することが報告されているが、紡錘体の形態変化に関しては今まであまり調べられていない。中心体から形成される微小管が分裂装置を構築するので、分裂装置の形態変化は微小管の分布変化によって引き起こされると考えられる。微小管分布は卵成熟の間、免疫蛍光染色で線虫、貝、イトミミズ、マウスなどで広く研究されている(1 14 18 35 44 64 65 66 68 70 72 75 76 78 79)。極体形成の間に生じる分裂装置の動的な挙動を観察するために、イトマキヒトデ卵母細胞の極体形成時における分裂装置の微小管分布を免疫蛍光染色法と偏光顕微鏡観察法を用いて調べた。本章の実験で用いた偏光顕微鏡法は、生きている細胞の分裂装置において微小管分布を観察するのに優れている(30 61)。その結果、不等分裂過程の紡錘体の微小管分布は表層側の半紡錘体で内側とくらべ微小管量が多く、半紡錘体の大きさも大きいことがわかった。

多くの動物卵母細胞の極体形成において、分裂装置は動物極の細胞表層付近で形成され、動物極表層に垂直に接着して非対称を示した(39)。第3章で免疫蛍光染色によって、極体形成時に動物極表層に接着した表層側の半紡錘体は内側（卵の中心に近い側）の半紡錘体より明るく、非対称を示し、極端な不等分裂を誘導して極体を形成することが観察された(63)。このことから、第4章では、前章での非対称な微小管量を定量化した。第3章の実験で使用したイトマキヒトデ卵母細胞の微小管の蛍光像のデジタル画像をNIH-Image画像解析ソフトウェア(NIH-Image)を使い画像をデジタル化し(62)、始めに、NIH-Imageを用いて免疫蛍光染色した分裂装置のデジタル画像を数値化し、疑似カラー化し(59 64 74 82)比較した。次にコンピュータを用いて画像解析し、半紡錘体の微小管量、大きさを測定した。

第5章では、細胞骨格のうちで細胞の形態変化と細胞質分裂に関与し、細胞表層に収縮環を形成するアクチン繊維についてのデジタル画像の解析実験を示す。

不等分裂に先駆け、ウニ卵の第一分裂時でアクチン繊維の構築機構の解析を行った。直径100 μm 前後のウニ卵の均等分裂では赤道に幅10 μm 、厚さ0.2 μm にアクチン繊維が並び(69 70 71)、収縮環はちょうどこのときに形成が始まると報告されている(45)。しかし、収縮環の形成が潜在のアクチン繊維の再配列によるものなのか、新たな重合によるものかは明らかになっていない。そこで、キノコ毒であるファロトキシンはアクチン繊維に結合することがすでに知られており、蛍光ラベルしたファロトキシン(蛍光ファロトキシン)は、アクチン繊維の分布を調べるのに有効である(4 6 17 36 51 52 83 94)。このことから、本章では蛍光ファロトキシンで卵を染色し、細胞全体の画像から染色部分(表層部分)を切り出し、表層のアクチン繊維量の測定を行った。さらに、サイトカラシンB(cytochalasin B)処理によってアクチン重合を阻害したときの表層アクチン量の変化を調べた。この染色法は、F-アクチンだけが可視化でき、アクチン分子を排除できるので、抗アクチン抗体や蛍光ラベルされたアクチン(3 18)より有効である。

解析の結果、均等分裂時のミッドステージ(分裂 50%)で、収縮環のアクチン量は極表層の2.5倍になり、分裂溝陥入がさらに進むにつれて徐々に減少した。収縮環の幅もミッドステージまで増加し、40 μm にまでなった。

第6章では、イトマキヒトデの卵母細胞を使用して不等分裂機構を明らかにすることを目的にし、極体形成時の表層アクチンの定量実験を示す。卵母細胞は、細胞形態の変化に応じて、以下のⅠからⅤのステージに分けられる(16)。

ステージⅠ 極体形成の準備段階。

ステージⅡ 細胞質の植物極から動物極への動きに伴い、細胞表層は植物極の周りで収縮し、動物極付近で伸長する。

ステージⅢ 極体の膨らみに伴って膨らみの周りで収縮し、植物極で伸長する。

ステージⅣ 極体の膨らみ後、動物極の細胞表層は伸長する。

ステージⅤ 極体形成完了。

これらの観察から動物極表層は柔らかくなった後、リング状の収縮による細胞の内圧変化によって動物極付近に細胞質の流れが起こり、その結果、動物極が膨らむと考えられた。しかしながら、動物極の収縮環が動物極頂点表層を柔らかくするかどうかは、現時点では明らかになっていない。一方で、Rappaportら(55)は、極体形成における膨らみが局所的な表層の柔らかさからではなく、局所的な細胞骨格の動きから起こることを示唆してい

る。そこで、ウニ卵の表層アクチン量を測定する方法(65)を応用して、イトマキヒトデの卵母細胞の動物極のアクチン量の変化と形態変化を調べた。

定量方法は、表層のアクチン繊維の詳細な分布を蛍光ファロトキシンで卵成熟過程を染色し、画像解析によってそれらを定量化した。さらに、第一極体形成阻害時の卵母細胞表層のアクチン繊維の分布も調べた。

その結果、動物極でアクチン減少が起こり、動物極表層の膨らみの元のアクチン量が増加し、その結果、収縮環が形成されて細胞質分裂が起きることがわかった。

第7章では、極体形成時の表層の張力の変化を推定した実験を示す。これまでのことから細胞分裂は微小管およびアクチンの集積分布の変化により、細胞表層に張力の変化が生まれ、その結果、極体が形成されると考えられてきた。以前から、形態と張力の関係についてイトマキヒトデ卵母細胞、ウニ卵を使って、不等分裂、均等分裂における研究がされてきた(図1-5, 7 16 27 46 92)。本章においては、不等分裂の機構を明らかにするためにイトマキヒトデ卵母細胞を使って関数計算式によって分裂時に細胞表層にはたらく張力を求めた(図1-7)。卵母細胞表層の輪郭をスプライン関数(31)に当てはめ、張力算出の数値演算処理を実行できる、独自に開発したプログラムを使用することで、分裂過程の卵母細胞の画像解析を行い、細胞表層の張力の変化を詳細に観察した。

ウニ卵の均等分裂過程張力を先端を積層圧電アクチュエーターを使ってガラス針の先端に電圧をかけることによって内圧を測定し、細胞質分裂には、収縮環だけでなく、全表層の力発生が重要であることを示唆した(46)。しかし、不等分裂の極体形成については、動物極周辺の詳細な定量ができていない。

スプライン関数を使用した張力算出の数値演算処理によって不等分裂の時の張力は 動物極頂点で極体の膨らみが始まる前から減少し、膨らみの元の分裂溝の位置では増加し、収縮環となって極体をくびり切ることがわかった。

第8章ではここまでの結果をふまえて、不等分裂の分裂機構における分裂装置、アクチン繊維、張力について考察する。また、細胞分裂時のアクチン分布と張力について均等分裂と不等分裂の比較考察し、今後、さらに進めるべき研究の方向性などを本論文の総括とともに述べる。

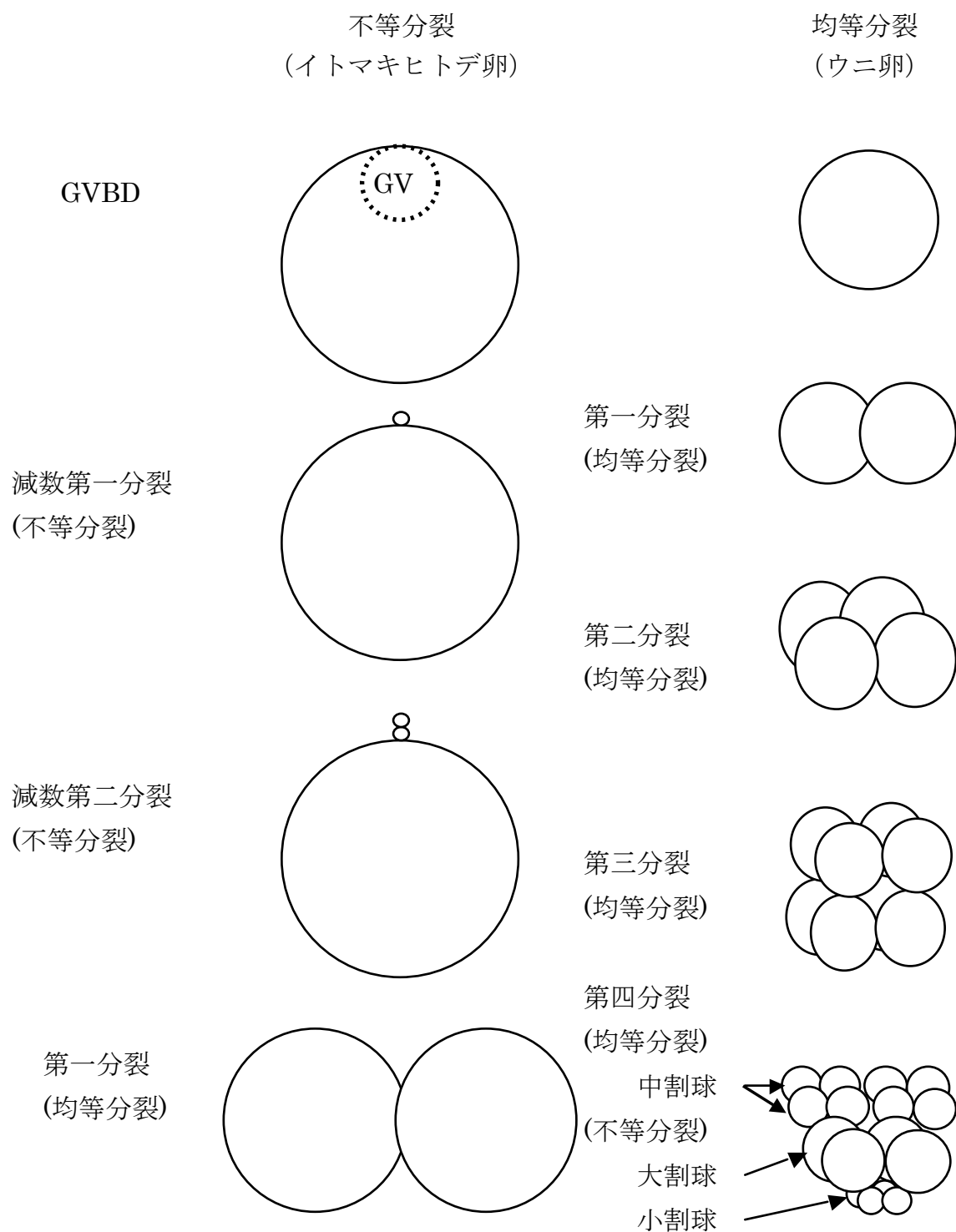
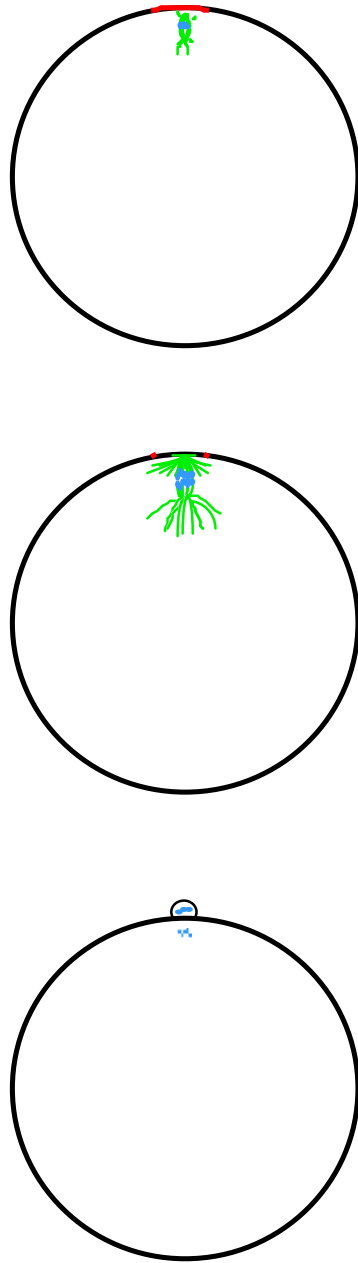


図1-1 細胞分裂

左列にイトマキヒトデの初期発生の様式図を示す。卵核胞を持ったイトマキヒトデの卵母細胞は卵成熟ホルモン処理後、卵核胞崩壊をする。媒精後、動物極で2回の減数分裂（不等分裂）を行い、成熟卵になり均等分裂へと進む。

右列はウニ卵の第一から第三分裂の均等分裂と第四分裂の均等分裂と不等分裂の様式図を示す。

不等分裂
(イトマキヒトデ卵)



均等分裂
(ウニ卵)

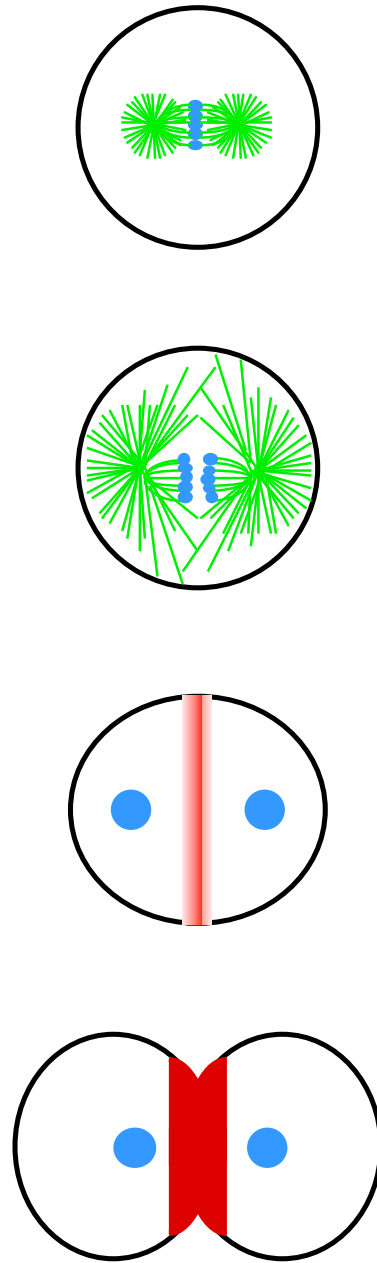


図1-2 細胞骨格

分裂過程で見られる細胞骨格のうち微小管系の、紡錘体、星状体を緑で、染色体を青で、アクチン系収縮環を赤で表した。

左列がイトマキヒトデ卵母細胞で、動物極に接着して分裂装置が形成され、不等分裂（減数第一分裂）をする。

右列がウニ卵の均等分裂（第一分裂）で、細胞の中央に分裂装置が形成されることを示す。

均等分裂（ウニ卵）

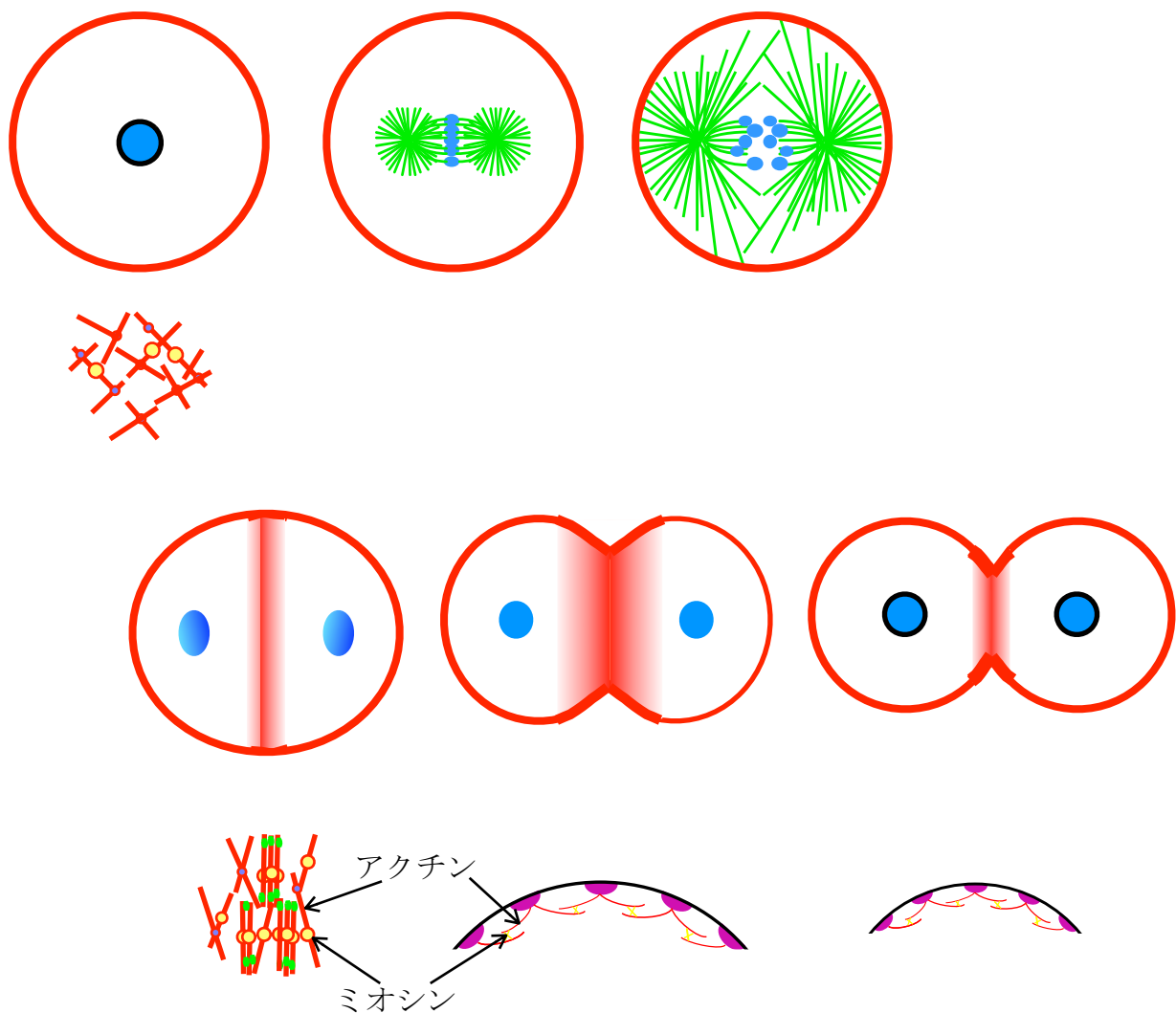
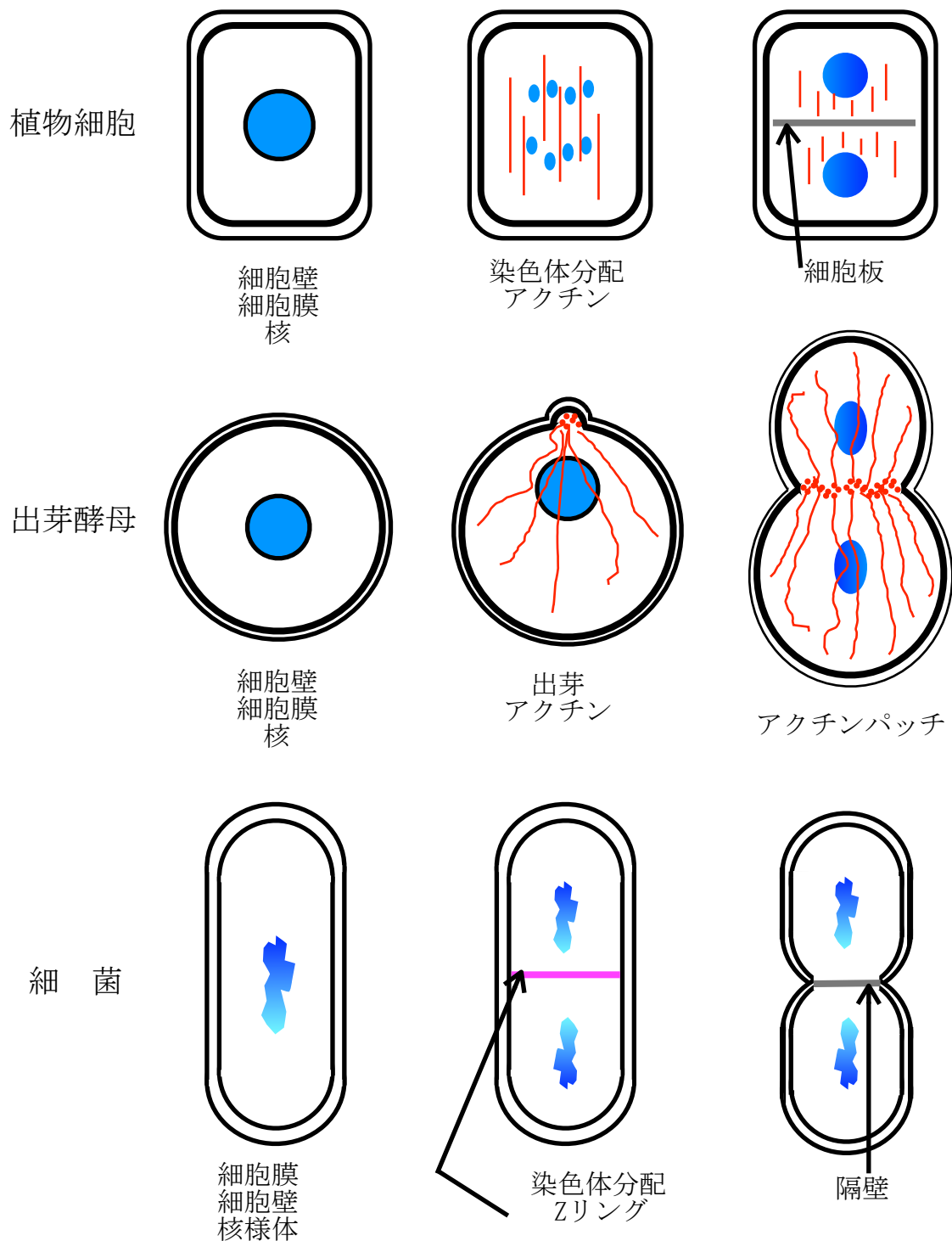


図1-3 収縮機構

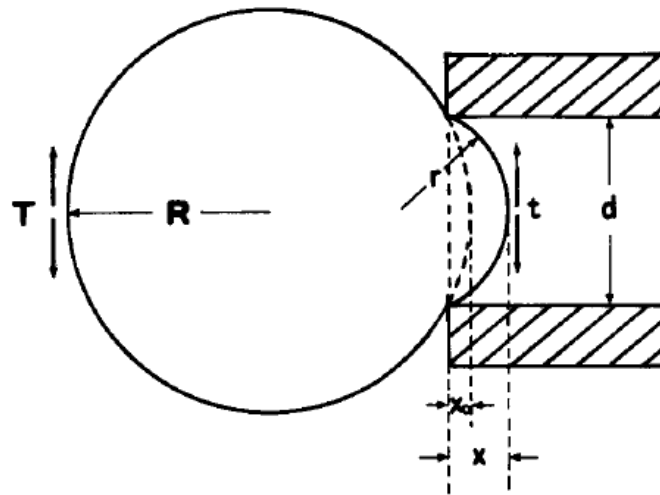
細胞質全体に平行に存在していたG-アクチンとF-アクチンが媒精後、アクチン繊維を形成し、細胞全表層に網目構造を作り、星状体微小管から表層に送られたシグナルによって分裂面に集積する。アクチンはランダムに分布しているが、方向性を持ち、表層の裏打ち構造を形成する（スペクトリン、アンキリン等の）タンパク質を足場に平行化、束化して収縮環を形成する。赤はアクチン系、緑は微小管系、青は染色体を示している。集積前、アクチン繊維はメッシュ状にランダムに並ぶ。その後、分裂面付近で平行に並び、収縮環を形成し、アクチンとミオシンの相互作用によって収縮し、くびりきる。



5図1-4 多様な分裂様式

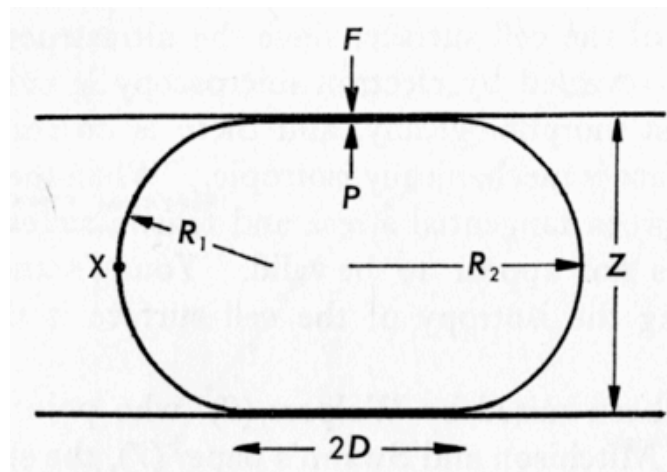
上段は多細胞の植物細胞、中段は真核細胞の出芽酵母、下段は原核細胞の細菌の分裂機構を示した。これらの細胞はそれぞれ細胞骨格を持ち、細胞壁もある。植物細胞の直径は100 μm 、出芽酵母は5 μm 、細菌は1 μm と大きさが異なり、分裂様式も異なる。染色体を青で、アクチンを赤で表した。

陰圧法



(47) Nakamura, S. and Hiramoto, Y. 1978
 Develop. Growth and Differ. 20: 317-327

圧迫法



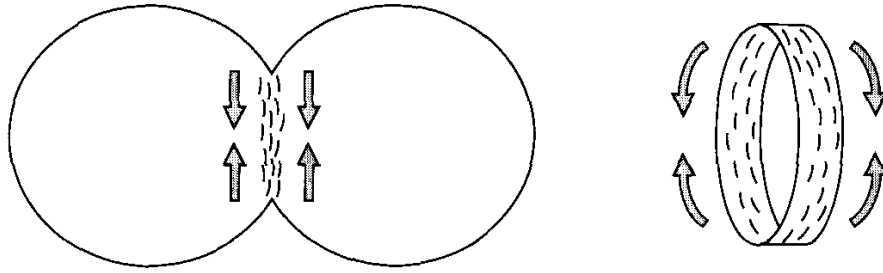
(92) Yoneda, M. 1973
 Advan. Biophys. 4: 153-190

図1-5 張力の測定方法

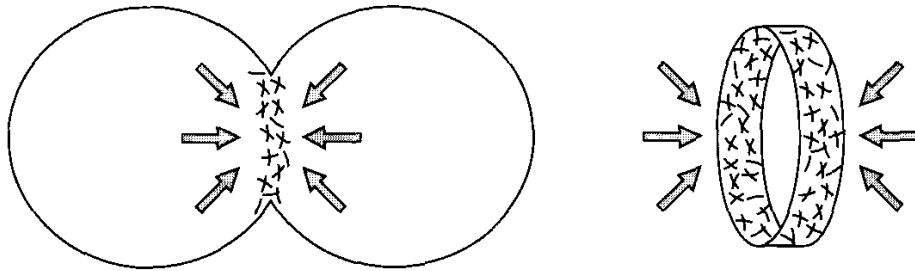
上段は微小ピペットで表層に陰圧をかける方法、下段はカバーガラスで圧迫する方法で、両方とも細胞の形の変形から計算によって張力を求める。

A 均等分裂時の張力モデル

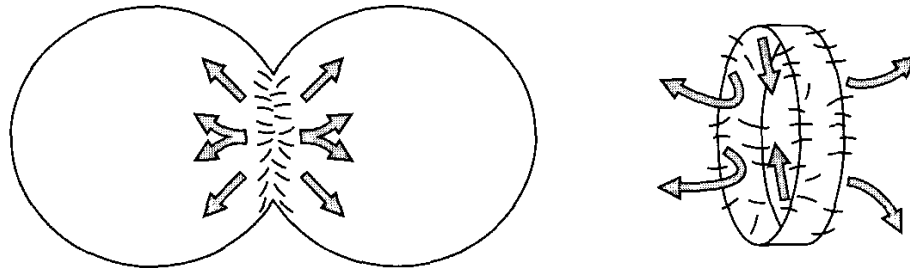
(a) Purse string



(b) Isotropic contraction



(c) Traction



(13) Fishkind, D. J. and Wang, Y.-L. 1995 New horizons for cytokinesis. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 23-31.

B 不等分裂時にあてはめると

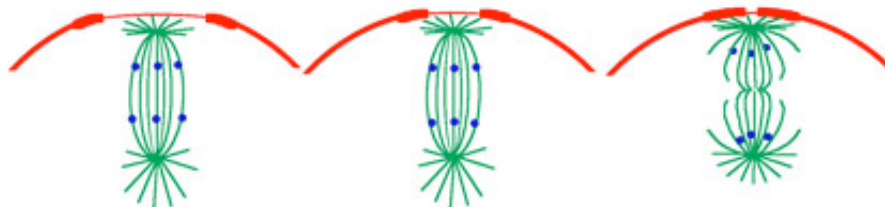


図1-6 収縮モデル

(A)は今までに提唱されてきた均等分裂時の張力のモデルを示した。これまでのモデルでは極端な不等分裂の時の収縮環は直径の減少をするだけで極体を形成することはできない (B)。

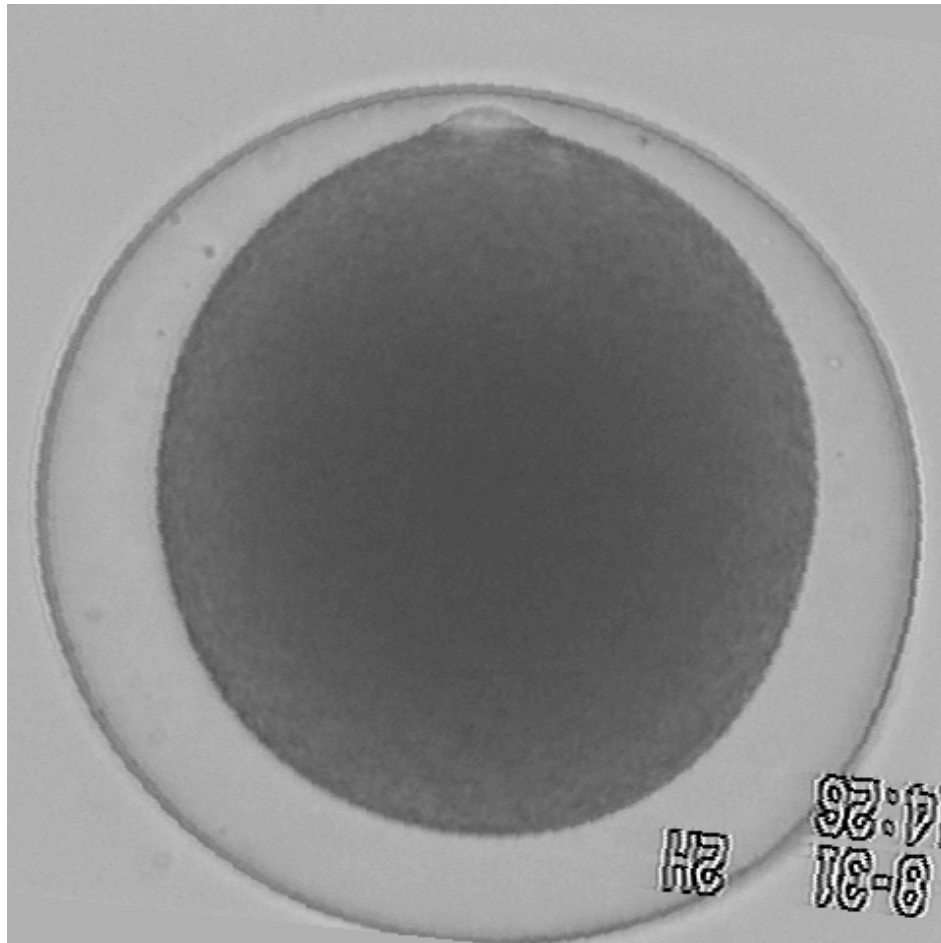


図1-7 張力の定義

T1=卵の経度方向の張力、
 T2=卵の緯度方向の張力、
 P（内圧）=1、
 R1, R2=主曲率半径、

$T1 = P \cdot R2 / 2$ 、
 $T2 = [P \cdot R2 (2 - R2 / R1)] / 2$ 、

第2章 材料と方法

2-1 材料

2-1-1 イトマキヒトデ卵母細胞

イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*, 図2-1) は5月に三浦半島、7月に房総半島、9月に浅虫沿岸で採集し、天然海水中で飼育し、実験に使用した。イトマキヒトデの卵と精子の採集、使用法についてはKanatani (32)、Saikiら (59) の方法にしたがった。卵母細胞は卵巣から取り出した後、周りの廬胞細胞を除去するために、Ca欠如人工海水 (CaFSW, Jamarin U, Jamarin Lab., Osaka, Japan) で洗浄した (63)。停止している減数分裂を再開させるために2 μ M 1-methyladenine (1-MeAde, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) を人工海水 (ASW, Jamarin, Jamarin Lab., Osaka, Japan) に溶解し、Kanataniら (32) の方法で20分間、20°Cで処理後、ASWで洗浄した。卵核胞崩壊後、10分後に媒精して受精膜を形成させ、極体形成の観察を行った。いくつかの実験では、媒精直後、1 Mグリシン液を1分間処理することによって受精卵の受精膜とゼリーコートの両方を除去した後、CaFSW中で20°Cで発生させた。減数分裂を阻害するため、1-MeAde処理後に遠心分離機 (M-50-IV, Sakuma, Tokyo, Japan) を用いて50% Percoll (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) ASWを緩衝剤に、卵母細胞の懸濁液を上部にのせ、10分間、10,000rpmで遠心処理を行った。

2-1-2 ウニ卵

1月の館山 (千葉) と5月の銚子 (千葉) のバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) を、5月の高知 (高知) と8月の油壺 (神奈川) のタコノマクラ (*Clypeaster japonicus*) を使用した (図2-1)。卵は10 mMアセチルコリン海水をウニの体腔に注入し、海水中に産卵させて、15°Cで保ったASWで3回洗浄後、材料とした (65)。精液は「ドライスパーム」として、4°Cで冷蔵庫に保存し、使用直前に希釈した。バフンウニの卵は20-22°Cで受精膜と透明層の両方を媒精直後、1-1.5分後に1 Mの尿素溶液を処理し、CaFSWで洗浄することによって除去し、発生させた (65)。タコノマクラ卵は同様に処理をして25-27°Cで発生させた。タコノマクラの受精卵の分裂時に10 μ MサイトカラシンBを処理して、分裂阻害の実験も行った。

2-2 方法

2-2-1 染色体の蛍光染色

媒精後の発生の様々なステージを観察するために、3.6% formaldehydeを含む90%のCaFSWで固定し、染色体を5 µg/ml DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)で15分間、室温で染色した。

2-2-2 微小管の蛍光染色

微小管の観察は様々なステージの卵を抽出液(10 mM EGTA, 5 mM KCl, 25 mM imidazole, 1% Triton X-100, 20% glycerol)で処理した(66)。その後、15-30分間、-20℃の冷メタノールで固定を行った。分裂装置の単離は未成熟卵を0.1 mg/ml actinase E (Kaken Kagaku Co. Ltd., Tokyo, Japan)で20分間、20℃で処理した後、発生させ、単離用緩衝液(5 mM EGTA, 1 M glycerol, 1% Triton X-100, pH 6.2)を入れたチューブの中で強く振盪後、一晚デカンテーションを行った。単離した分裂装置を含む沈殿物を冷メタノールで固定し、0.1% ポリリジンでコーティングしたカバーガラスにはり付け、以下の方法で染色した。

1次抗体、monoclonal anti- α -tubulin antibody(DM1A, Amersham, Buckinghamshire, England またはYL1/2, Sera Lab., Sussex, England)を30分間、37℃で処理した。リン酸緩衝生理食塩水[phosphate buffer saline(PBS), Nissui, Pharmacial Co. Ltd., Tokyo, Japan]で洗浄後、2次抗体、FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody(Kirkegaard & Perry Lab. Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A.)または、anti-rat IgG antibody(Kirkegaard & Perry Lab. Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A.)を60分間、37℃で染色をした。1次抗体は使用時に1,000倍に希釈し、2次抗体は抗マウスIgG抗体は300倍に、抗ラットIgG抗体は100倍に希釈して使用した。抗体処理後PBSで3回洗浄した後、染色体はDAPIで10分間染色して蛍光顕微鏡で観察した。

2-2-3 アクチンの蛍光染色

ウニ卵を発生の様々な時期に、3.6% formaldehydeを含むGlucose-F-buffer溶液 [Mabuchi (45)の変法] で30分間固定した。Glucose-F-buffer溶液は 0.1 M KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM MOPS(3-morpholinopropanesulfonic acid, pH 7.4)、と0.5 M

glucoseを含む。アクチン染色はrhodamine-phalloidinまたは、BODIPY FL-phalloidin (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, U.S.A.)を一昼夜処理を室温で行い、染色体はDAPIで10分間染色して観察した。Rhodamine-phalloidinとBODIPY FL-phalloidinはメタノールにそれぞれ溶解し、1% β -mercaptoethanolを含むGlucose-F-buffer溶液で150倍に希釈した。イトマキヒトデ卵の染色にはGlycerol-F-buffer溶液を使用した。Glycerol-F-buffer溶液はGlucose-F-buffer溶液と成分は同じであるが0.5 M glucoseに変えて0.5 M glycerolを使用した。

2-3 顕微鏡観察

2-3-1 生きている卵母細胞の染色体と分裂装置の観察

主に微分干渉顕微鏡(DIC)と偏光顕微鏡(Brace-Köhler compensator, Optiphot, Nikon Co., Tokyo, Japan)を使用して、生きたままの卵母細胞を観察した。卵母細胞は、光学顕微鏡で観察するために直径200 μ mの卵母細胞を厚さ60 μ mに押しつぶした。染色体運動は、屈折率が卵母細胞に近いFructooligosaccharides(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan)溶液中で微分干渉顕微鏡を用いて、分裂装置は偏光顕微鏡を使用して観察した。

2-3-2 蛍光染色した卵の顕微鏡観察

染色体運動と細胞表層変化を観察するため、様々なステージの卵を3.6% formaldehydeを含むCaFSW中で固定し、カバーガラスとスライドの間に厚さ300 μ mの空間を作り、変形を防ぐためにその中に卵を入れた。分裂装置の観察には消光防止剤を使用した。蛍光染色した卵を、落射蛍光装置を備えた蛍光顕微鏡と位相差光学顕微鏡を用いて観察した。観察した顕微鏡像は35mmフィルム(T-Max 400, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, U.S.A.)、または、画像処理装置(Image Sigma-II, Nippon Avionics Co. Ltd., Tokyo, Japan)を使用してビデオカメラ(WV1550, Panasonic, Tokyo, Japan)で増感撮影した。フィルムで撮影した画像はフィルムスキャナ(Coolscan: Nikon Co., Tokyo, Japan)を使ってデジタル化した。得た画像は、最も暗い蛍光強度を0、最も明るい蛍光強度が255に対応するように白黒画像256階調(8-bit)で補正した。画像解析NIH-Imageソフトウェア[National Institute of Health(NIH, U.S.A.)のW. Rasband氏によって作成されたパブリック・ドメイン・ソフトウェア(PDS)]を使用し、コンピュータ(Macintosh Centris 660AV, Apple Inc.,

Cupertino, CA, U.S.A)を用いて観察した顕微鏡像の蛍光強度と疑似カラー解析を行った。CCDカメラ(C2400-75I, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)、画像処理プロセッサ(Argus 20, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を通して、蛍光顕微鏡で観察した卵の蛍光像を直接コンピュータに取り込んだ。また、共焦点蛍光顕微鏡(InSIGHTplus, Meridian Instruments Inc., Okemo, Michigan, U.S.A.)とCCDカメラ(MicroImager, Xillix Technologies Corp., Richmond, BC, Canada)からも画像をコンピュータに取り込んだ。

2-3-3 張力測定用画像

イトマキヒトデの卵母細胞全体の低解像度の画像は、NIH-Imageを使用し、光学顕微鏡(DIAPHOT-TMD, Nikon Co.)、ビデオカメラ(Panasonic)を介して、 640×480 pixel、 1.98 pixel/ μm の条件でコンピュータ(Macintosh iMac)に取り込んだ。

動物極を中心にした高解像度の画像は、画像解析ソフトウェアIP Lab(Scanalytics, Inc., Rockville, MD, U.S.A.)を使用し、光学顕微鏡(OPTIPHOT-2, Nikon Co.)、カメラ(xillix MicroImager)を介して、 1024×1020 pixel、 4.49 pixel/ μm でコンピュータに取り込んだ。

2-4 画像解析

2-4-1 生きている卵の微小管の定量化

光強度は光ダイオード(S1226 5BQ, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を用いて測定した。画像解析は紡錘体軸に垂直な 0.5×1.0 μm の長方形の範囲でNIH-Imageを使用し、微小管の定量は紡錘体軸に沿って行った(19 73)。

2-4-2 蛍光像からの微小管の定量化

分裂装置の蛍光写真は蛍光顕微鏡(Optiphot, Nikon Co.)を使い、35mmフィルム(T-Max 400)で撮影し、スキャナ(Coolscan, Nikon Co., Tokyo, Japan)を使ってデジタル化した。得られたデジタル画像は、自動的に256階調に補正して示した。NIH-Imageソフトウェアを使用し、コンピュータ(Macintosh Centris 660AV, Apple Inc.)を用いて、8個のサンプル画像の蛍光強度と疑似カラー解析を行った。また、結果についての統計処理は、Wilcoxon-Mann-Whitney検定法を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2-4-3 蛍光像からのアクチン繊維の定量化

落射蛍光装置を備えた蛍光顕微鏡で染色した卵を観察し、CCDカメラ(C2400-75I)を使い、画像処理プロセッサ(Argus 20)を通してコンピュータに画像を取り込んだ。解析には共焦点蛍光顕微鏡(InSIGHTplus)とCCDカメラ(MicroImager)で取り込んだ画像も使用した。

2-4-4 張力測定のための画像の取り込み方法と測定法

2-4-4-1 卵母細胞全体の張力測定

コンピュータ(Macintosh, iMac)に低解像度の画像を取り込み、これらの画像から、卵母細胞の表層の輪郭を抽出し、重心からの角度と半径を測定して数値化した。そして、この数値を用いて卵全体の表層の張力を図1-7に示した関数変換式より算出した。

2-4-4-2 動物極の張力測定

高解像度の卵母細胞の画像をコンピュータに取り込み、低解像度で取り込んだ卵母細胞の画像解析と同様に、角度と半径に数値化し、張力を求め、極体形成が見られる動物半球の詳細な張力を得た。

2-4-4-3 疑似カラー化

高解像度の画像から得られた張力を、動-植物軸に直角に100 μm の弦を張り、その位置の張力に対する張力比を求めた。この比を用いて動物極卵母細胞の高さ20 μm （膨らみを除く）の範囲をAdobe Illustrator(Adobe Systems Inc., Berkeley, CA, U.S.A.)を用いて3次元疑似カラー化した。また、アクチン分布も同様に動-植物軸に直角に100 μm の弦を張り、その位置の蛍光強度に対する蛍光強度比を求めた。張力と同様に動物極卵母細胞の高さ20 μm （膨らみを除く）の範囲をAdobe Illustratorを用いてこの比を3次元疑似カラーで表した（未発表）。

第6章については別途、詳細に方法を示す。



イトマキヒトデ
Asterina pectinifera



バフンウニ
Hemicentrotus pulcherrimus



タコノマクラ
Clypeaster japonicus

図2-1 実験動物

イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) は5月から9月にかけて、三浦半島、房総半島、浅虫沿岸で採集した。バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) は1月から4月に房総半島で、タコノマクラ (*Clypeaster japonicus*) は5月に高知、7月に油壺で採集した。

第3章 イトマキヒトデ卵母細胞の微小管分布

3-1 はじめに

これまで様々な実験動物を使用することで、減数分裂中の分裂装置のはたらきは研究されてきた(10 11 19 21 33 35 38 39 41 57 74 75 76)。しかしながら、減数分裂時における分裂装置のはたらきは、まだ明らかにされていない。イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)卵母細胞は成熟する過程において、減数分裂で極体形成を行い、極端な不等分裂をすることから実験動物として使った。本章では偏光顕微鏡(30 61)を使用して、極体形成過程の分裂装置を生きたまま観察した。さらに分裂装置の微小管を蛍光染色し、蛍光強度を定量化することによって分裂装置の微小管量を測定した。また、細胞表層と染色体の位置関係も固定した卵で観察した。

3-2 結果

3-2-1 分裂装置の微小管分布-免疫蛍光法

3-2-1-1 細胞質抽出卵の微小管

イトマキヒトデ卵母細胞の卵成熟を再開し卵核胞崩壊後に、微小管安定剤と表面活性剤を用いて、卵母細胞の細胞質を抽出した。減数分裂時の分裂装置の紡錘体と星状体を2種類の異なった抗チューブリン抗体で染色し、顕微鏡観察を行った。染色体が赤道面に集合する以前の紡錘体と星状体は小さく、前中期の分裂装置では形態学的に両半紡錘体は類似していた(図3-1a, 1b, 1c)(59 60)。発生が進み、中期になって分裂装置が動物極の細胞表層に紡錘体軸が垂直に接着したとき、表層に接着した側の星状体と内側(卵の中心に近い方)の星状体を比較すると明らかに非対称の形状を示した(図3-1d)(59 60 79)。図3-1g, jに示すように不等分裂では細胞表層側の星状体は、先端を切ったように平らになった。さらに、表層側の半紡錘体は内側の半紡錘体よりも強い蛍光を示した。

図3-1に示す画像からは星状体はわずかししか見えていないのは、両半紡錘体の蛍光強度分布の違いを示すために、露出を低く設定したためである。表層側の半紡錘体は内側の半紡錘体よりも大きかった(図3-1d, g, j)。後期の間、両半紡錘体の蛍光強度差は増加したが、紡錘体は伸長することなく、むしろ短くなった(図3-1g, j)。測定した後期の紡錘体329個のうち、303個(92%)において、表層側の半紡錘体が内側の半紡錘体よりも強い蛍光

を示した。これらの結果から、紡錘体を構成する微小管数の偏りは表層側の半紡錘体と動物極表層との間に何らかの相互作用が存在することが予想された。

減数第二分裂においても分裂装置の微小管分布を調べた。減数第二分裂の分裂装置は図3-2に示すように、減数第一分裂の分裂装置よりわずかに小さかった。微小管分布は減数第一分裂と同様に、分裂装置が表層に接着した後、表層側の星状体は表層に沿い、内側の星状体は球状に拡がり、全く異なる形態を示した(図3-2c)。そして、表層側の半紡錘体は内側の半紡錘体よりも強い蛍光を示した(図3-2e)。

3-2-1-2 単離した分裂装置

中期の後期で単離した分裂装置の微小管分布を観察するために抗チューブリン抗体で染色した。分裂装置の方向は星状体の形態の違いから判断した。微小管量を定量するために、分裂装置の紡錘体軸に沿って蛍光強度を測定した。図3-3a, bに示すように両星状体の形態は全く異なっていた。すなわち、表層側の星状体の蛍光強度は内側よりも強いことから、表層側の星状体は微小管密度が内側より高いことが推測された。また、表層側の半紡錘体も内側の半紡錘体より強い蛍光を示し(図3-3a)、表層側の半紡錘体の蛍光強度は内側の半紡錘体よりも強かった(図3-3e)。

3-2-2 分裂装置の微小管分布-偏光顕微鏡法

前項(3-2-1-2)の観察結果を確認するために、生きている細胞の紡錘体の複屈折変化を偏光顕微鏡で観察した。減数分裂紡錘体の複屈折は微小管の偏光によって引き起こされることから、紡錘体断面の微小管数を反映することが報告されている(30-61)。卵母細胞の紡錘体の複屈折を図3-4に示した。中期に分裂装置は細胞表層に接着し、複屈折は高くなった(図3-4a, b)。その後、動物極の細胞表層が弧を描く後期には、表層側の半紡錘体の複屈折は内側より大きくなった(図3-4c, d)。表層が徐々に膨らむにしたがって、その両半紡錘体の複屈折の差異は増大した(図3-4e, f)。しかし、後期後半に紡錘体の複屈折の差は急激に減少し、その後、2個の半紡錘体の複屈折の差はなくなった。

3-2-3 細胞表層への接着を阻害したときの分裂装置の微小管分布

これまでの結果から、分裂装置と細胞表層との間の相互作用の存在を考え、分裂装置が細胞表層に接着するのを阻害するために、卵成熟再開直後の卵母細胞を遠心処理した。遠心後、極体形成の分裂装置は細胞表層近くに存在したが、その分裂装置は細胞表層に接着せず、極体を形成できなかった。このことは、星状体微小管が動物極の細胞表層に到達しないため、分裂装置が細胞内へ移動したと考えられる。遠心処理した細胞の紡錘体は未処理細胞の紡錘体と比較して大きさに変化はなかった。そして、2個の半紡錘体と星状体の微小管分布は中期から後期の間等しく、対称性を示した(図3-5)。分裂装置の紡錘体軸に添って、蛍光強度を測定し、微小管量を定量した結果、図3-5jに示すように両半紡錘体の蛍光強度のパターン(2個の矢印の間)は等しかった。

3-2-4 染色体と細胞表層

染色体は生きている卵母細胞では観察が困難なため、極体形成の染色体運動と細胞表層の関係をformaldehydeで固定、染色体をDAPI染色して観察した。表層と染色体の両方を同時に位相差と蛍光顕微鏡で観察した。卵核胞崩壊直後、動物極は卵表層に近づく分裂装置によって細胞顆粒が除かれ、透明域として検出された。卵核胞崩壊から前中期には、卵母細胞表層の形はほとんど変化しなかった。中期の動物極表層は、図3-6a, bに示すように平坦か、または窪んでいた。そして、後期の間に徐々に円弧に戻り(図3-6c)、続いて膨らんだ(図3-6d)。分裂溝は分離した染色体の間に後期後半に出現し(図3-6f)、収縮環を形成してその後収縮し、極体が形成された。

3-3 考察

本章の実験において、抗チューブリン抗体免疫蛍光染色法と偏光顕微鏡を用いて、イトマキヒトデ卵母細胞の極体形成時の分裂装置の微小管分布を調べた。その結果、分裂装置が細胞表層へ接着することにより星状体が形態変化を引き起こし、非対称になったことを確認した。この現象はOgawaら(49)、Shiraiら(79)によっても報告されている。不等分裂をするウバガイ(*Spisula solidissima*)卵の減数第一分裂とウニ卵の第四分裂においては、細胞表層に分裂装置が接着する以前から分裂装置の2個の星状体のうちの一方は小さく、もう一方は大きかった(7 10 56 57)。しかし、バッタ(*Chortophaga uiridifasciata*)の精母細胞の

不等分裂では両星状体の対称性は終期(91)まで続いた。

さらに、分裂装置の細胞表層への接着が星状体だけではなく、紡錘体の非対称も引き起こすことがわかった。非対称性はそれぞれの半紡錘体に含まれる染色体、キネトコアの量の違いからくる微小管量の差による(48)と考えられている。イトマキヒトデ卵母細胞の第一、第二極体形成時の不等分裂は、染色体数が多い(88)ことからこのことは該当しないと考える。また、紡錘体の非対称性は星状体微小管による可能性は、以下の理由によって排除した。

1. 図3-1の蛍光像に示したように紡錘体の両極の星状体は紡錘体よりはるかに小さく、蛍光強度も弱いことから、紡錘体の非対称性は星状体の影響は受けない。特に免疫蛍光法においては、紡錘体の非対称は共焦点レーザ蛍光顕微鏡を使用しても観察できた。それは、共焦点レーザ蛍光顕微鏡は焦点深度が従来の顕微鏡より浅いことから、星状体による可能性を除去できる（未発表）。
2. 一般的な細胞表層の複屈折は紡錘体と同じ複屈折を持っているので、表層に近い半紡錘体と細胞表層の複屈折が重なる。しかし、ウニ卵の表層の複屈折は紡錘体より小さく、表層から数 μm 中へ入ったところではゼロ近くまで減少すると報告されている(81)。本実験ではヒトデ卵の半紡錘体付近の複屈折を細胞表層から数 μm 離れたところで定量したのでその影響はないと考える。

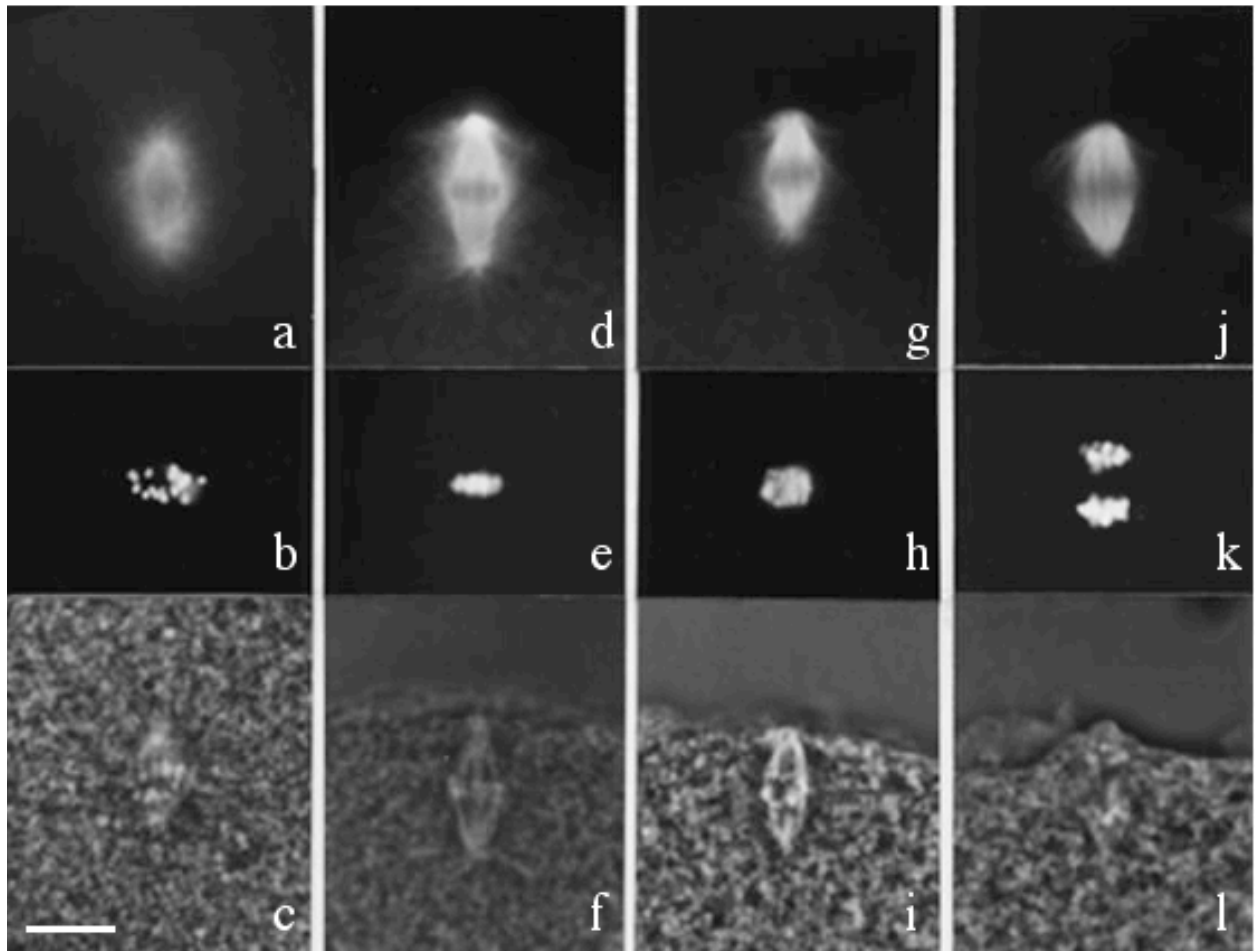


図3-1 減数第一分裂

イトマキヒトデ卵母細胞の不等分裂（極体形成）過程における細胞質を抽出した後の分裂装置の顕微鏡像を示す。上段(a, d, g, j)は抗チューブリン抗体DM1AとFITC-conjugated anti mouse IgGで染色した微小管の蛍光像、中段(b, e, h, k)はDAPIで染色した染色体像、下段(c, f, i, l)は上中段と同一部位の卵母細胞の分裂装置の位置と動物極表層を表す位相差顕微鏡像を示す。分裂装置は2個の半紡錘体で構成され（露光の調整で、この図では星状体がわずかししか見えない）、後期に入るとその両半紡錘体の蛍光強度に差異が観察された。すべての画像は動物極が上方方向になるように配置した。細胞分裂のステージ：(a, b, c)は前中期、(d, e, f)は中期、(g, h, i)は後期の前期、(j, k, l)は後期の中期にそれぞれ相当する。スケールバー：10 μm （文献63から引用）

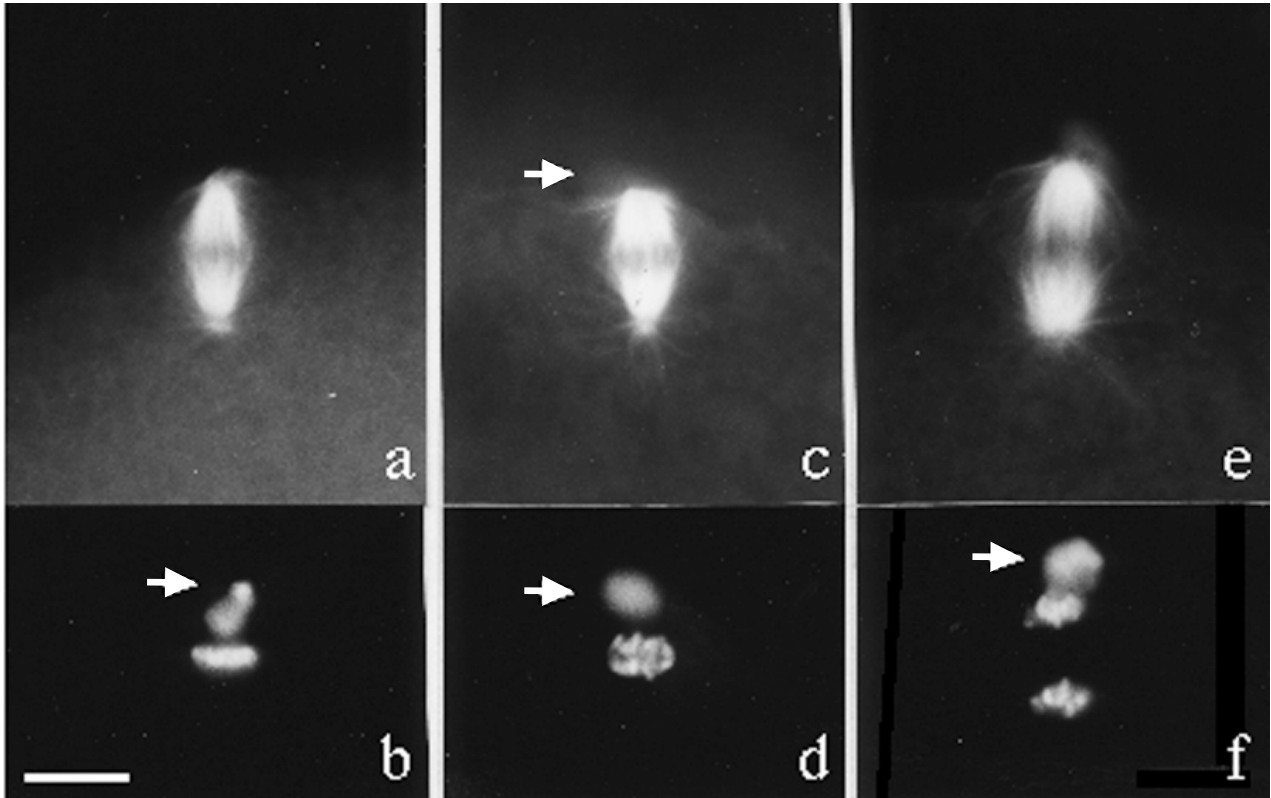


図3-2 減数第二分裂

細胞質を抽出したイトマキヒトデ卵母細胞の減数第二分裂（第二極体形成）時の分裂装置の顕微鏡像を示す。上段(a, c, e)は抗チューブリン抗体で染色した微小管の蛍光像、下段(b, d, f)はDAPIで染色した染色体像を示す。減数第一分裂時（図3-1）と同様に2個の半紡錘体の蛍光強度に差異が観察された。矢印は第一極体の染色体を示し、すべての画像は動物極が上方向になるように配置した。細胞分裂のステージ：(a, b)は中期、(c, d)は後期の前期、(e, f)は後期の後期に相当する。スケールバー：10 μm （文献63から引用）

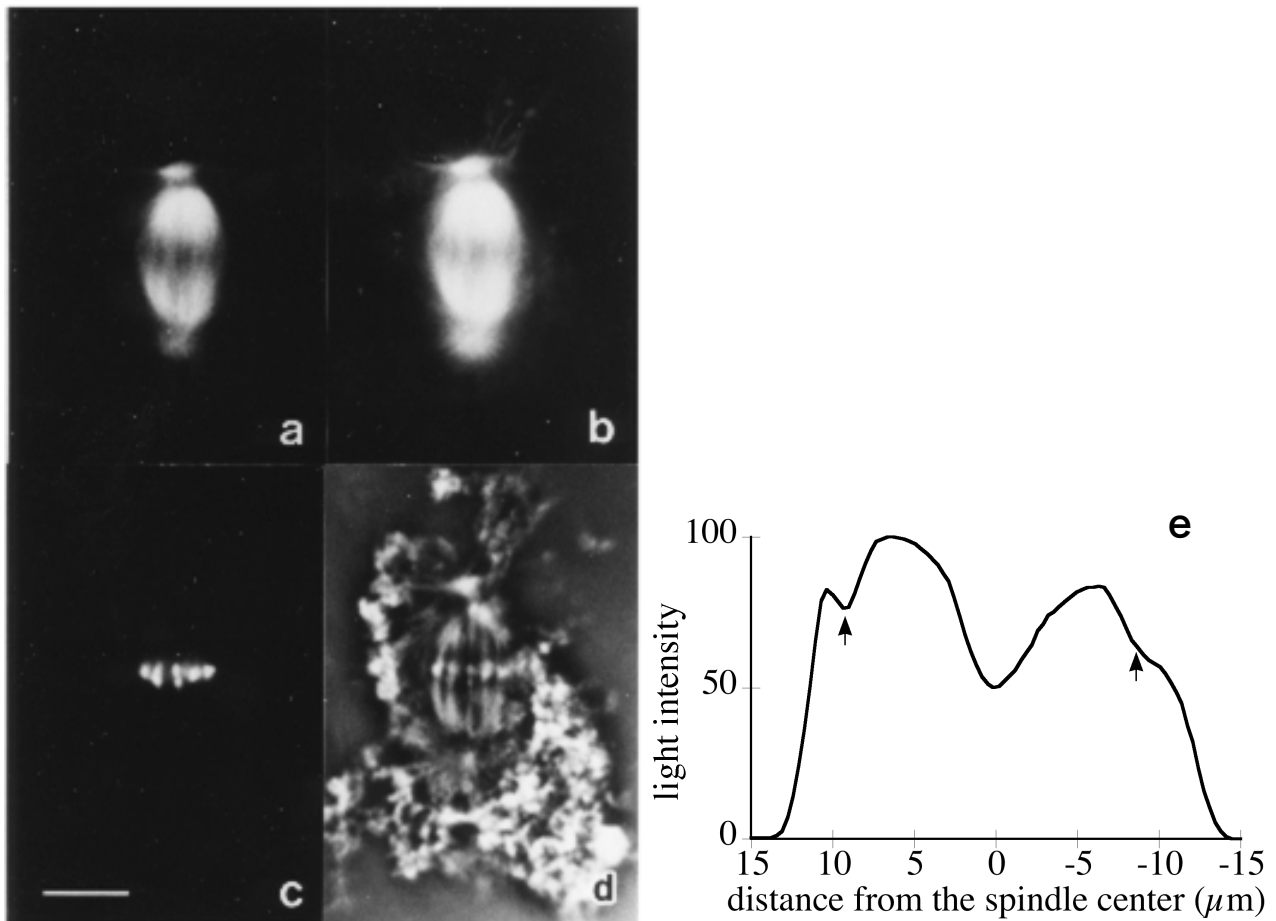


図3-3 単離した分裂装置と微小管分布

左図(a, b, c, d)は単離した分裂装置の顕微鏡像を示す。(a, b)は抗チューブリン抗体で微小管を染色した分裂装置の蛍光像(画像(a)は半紡錘体の違いが分かるように、画像(b)は星状体の違いが分かるようにそれぞれ露光を調節した)、(c)はDAPIで染色した染色体像、(d)は卵母細胞の位相差顕微鏡像を示す。スケールバー: 10 μm

右図(e)は画像(a)における分裂装置の紡錘体軸に沿った微小管の蛍光強度の変化を示す。縦軸は蛍光強度(相対比: %表示)、横軸は紡錘体軸に沿った紡錘体中心からの距離(μm : マイナス方向は卵の中心に近い側を示す)を表している。矢印は紡錘体の極の位置を示す。細胞表層に近い左のピークが内側(卵の中心に近い側)よりも蛍光強度が強い。(文献63から引用)

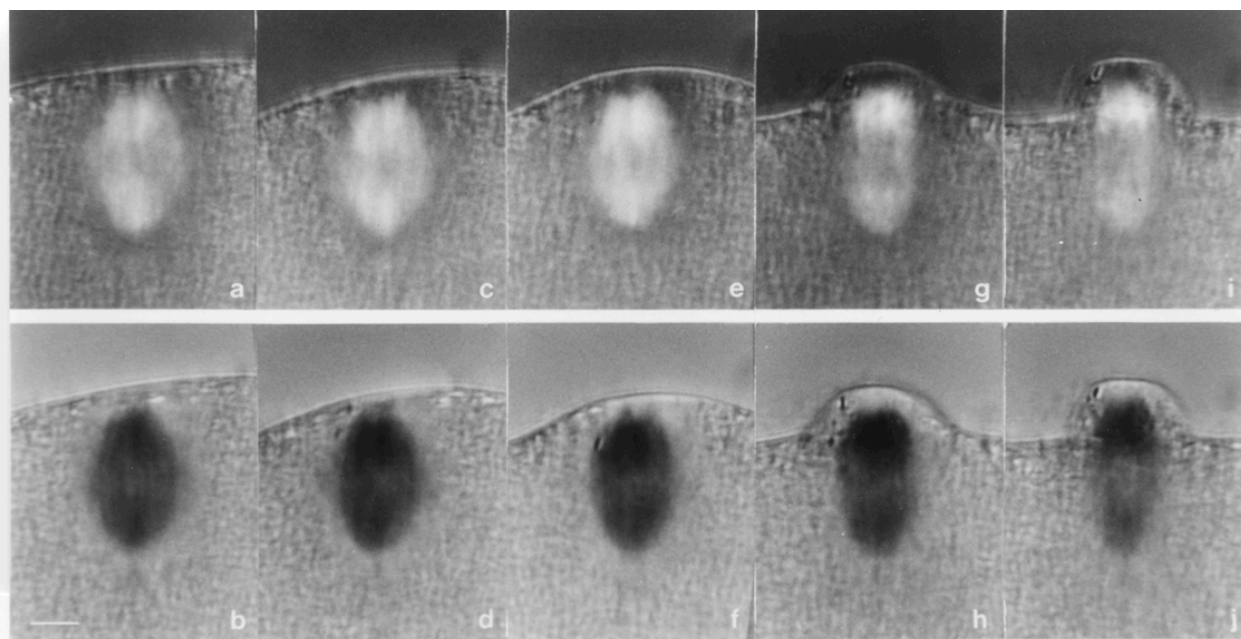


図3-4 動物極表層と分裂装置

上段は生きている細胞における紡錘体の偏光顕微鏡像を示す。下段は上段の白黒反転像を示した。分裂装置は中期(a)は細胞表層に接着し、後期(c)に表層側(図においては上方向)の半紡錘体の複屈折が内側(卵の中心に近い側)の複屈折より大きい(図においては、半紡錘体部分が濃くなる(f, h, j))のが観察された。スケールバー: 10 μm (文献63から引用)

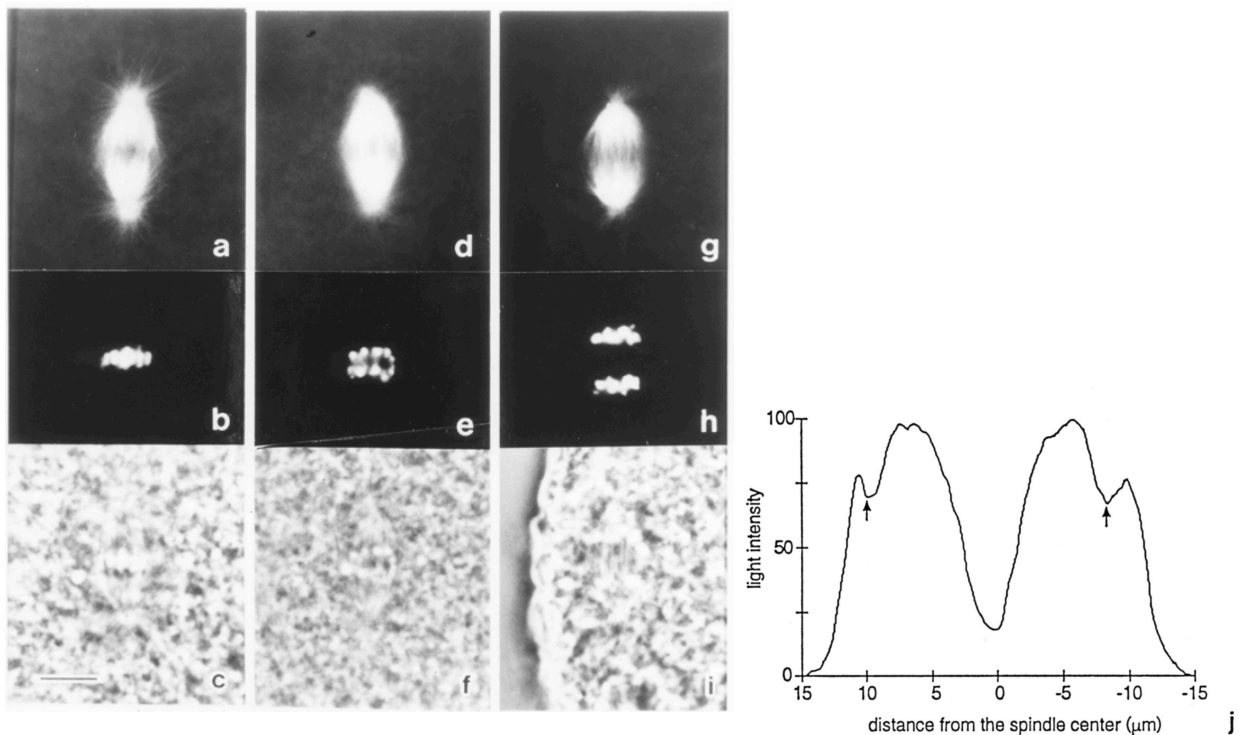


図3-5 遠心処理卵の分裂装置と微小管分布

左図は遠心処理卵の分裂装置の顕微鏡像を示す。上段(a, d, g)は抗チューブリン抗体で微小管を染色した分裂装置の蛍光像、中段(b, e, h)はDAPIで染色した染色体像、下段(c, f, i)は分裂装置の位置と動物極表層を表す位相差像を示す。細胞分裂のステージ：(a, b, c)は中期、(d, e, f)は後期の前期、(g, h, i)は後期の中期にそれぞれ相当する。スケールバー：10 μm

右図(j)は画像(a)における分裂装置の紡錘体軸に沿った微小管の蛍光強度の変化を示す。縦軸は蛍光強度（相対比：%表示）、横軸は紡錘体軸に沿った紡錘体中心からの距離（ μm ：マイナス方向は卵の中心に近い側を示す）を表している。矢印は紡錘体の極の位置を示す。両ピークの蛍光強度はほぼ等しい。（文献63から引用）

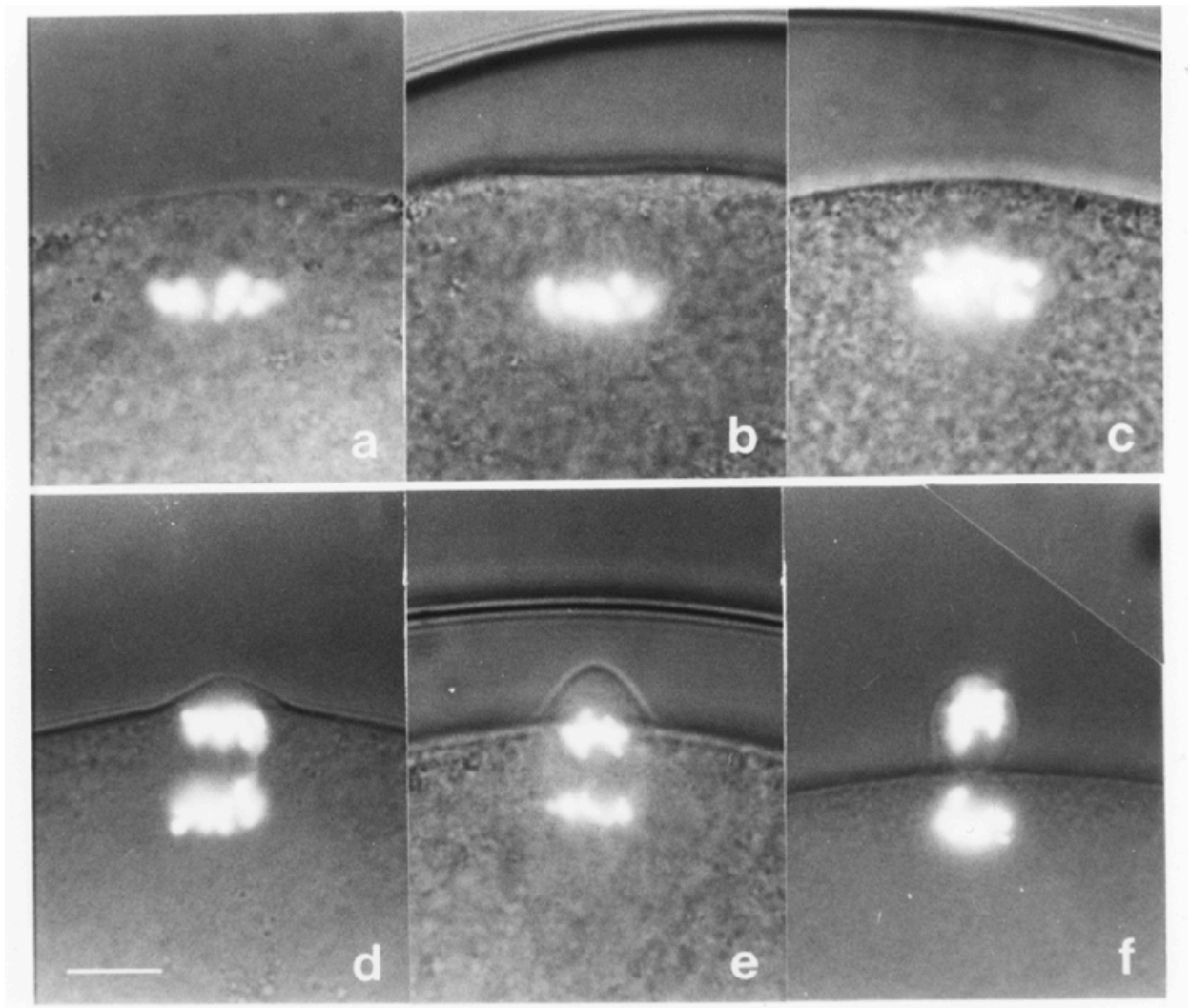


図3-6 動物極表層と染色体

染色体の位置と動物極表層の関係を調べるために、二重露出撮影法を適用し、細胞の動物極表層付近の位相差像と染色体像（DAPI染色）の両画像を一枚のフィルムに撮影した。すべての画像は動物極が上方向になるように配置した。細胞分裂のステージ：(a)は前中期、(b)は中期、(c)は後期の前期、(d, e, f)は後期の後期にそれぞれ相当する。スケールバー：10 μm （文献63から引用）

第4章 イトマキヒトデ卵母細胞における極体形成時の微小管

4-1 はじめに

前章において、イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) 卵母細胞の極体形成時の分裂装置の非対称性が明らかになった。本章の実験においては前章で用いた、微小管を蛍光染色した蛍光像についてNIH-Imageを使用してデジタル画像演算処理と微小管の画像を解析することにより微小管の定量を行った結果を示す(63-64)。本章の実験で用いた画像処理ソフトウェアNIH-Imageの利点は、市販の汎用画像処理ソフトウェアと異なり、画像の数値化が可能であり、他のグラフ作成ソフトウェアと画像数値データを共有することができる。さらに、NIH-Imageを使用してデジタル画像を疑似カラー化することで、視認性定量が向上し、局所別の蛍光強度の差が容易に判断できる(73-74-82)。

イトマキヒトデ卵母細胞の極体形成時、分裂装置は動物極の細胞表層近くで形成され、紡錘体は表層に紡錘体軸を垂直にして極で接着し、その動物極に極体を形成する(39)。極体形成を2回連続して行った後、卵母細胞は成熟卵になる(39)。本章の実験では、分裂装置の免疫蛍光染色像を画像解析した結果、表層に接着した側の半紡錘体が内側(卵の中心に近い側)の半紡錘体より強い蛍光を持つことから、2個の半紡錘体における微小管の量的な差異を示す(63)。

4-2 結果

ヒトデ卵母細胞の成熟再開後に、減数第一分裂時の分裂装置の微小管分布を調べるために、抽出液を用いて細胞質の抽出を行い、抗-チューブリン抗体で免疫蛍光染色した。蛍光像をフィルムに撮影し、フィルムスキャナでデジタル化してコンピュータに取り込み、分裂装置の蛍光強度を測定することによって微小管の定量を行った。

4-2-1 非対称の増強

遠心未処理卵における分裂装置の蛍光像(図4-1A)と遠心処理卵における分裂装置の蛍光像(図4-1D)をそれぞれ示した。2個の半紡錘体の蛍光強度の差を増強するために、これらの画像を紡錘体の赤道を軸に180°回転し、回転した像をそれぞれのオリジナルの画像(図4-1B、図4-1E)から、減算処理を行った。さらに、分裂装置は極と極を結ぶ軸に沿って対

称(28)だと考えられることから、軸に沿って画像を回転し、平均化することによって、画像上の雑音を除去した。そして、これらの像の視認性を高めるために疑似カラー化した(図4-1C, F)。その結果、遠心未処理の分裂装置の表層側の半紡錘体は、内側の紡錘体と異なった色相を示した(図4-1C)。特にこの色相の違いは紡錘体極近くで顕著であり、蛍光強度の非対称性を示した(図4-1C)。星状体においても表層側と内側では異なった色相を示し、非対称性を示した。一方、遠心処理をして表層に接着していない分裂装置の両半紡錘体、両星状体は同じ色相を示した(図4-1F)。このことから、遠心処理した分裂装置において、両半紡錘体と両星状体の蛍光強度はほとんど差異がなく蛍光強度の対称性を示した。

4-2-2 微小管分布

紡錘体を構成する微小管量を測定するために、極と極を結ぶ軸に平行に蛍光強度のパターンを得た(図4-2)。これらのパターンを解析すると、2 μm 間隔の蛍光強度は、ほとんど一定だった。次に、極と極を結ぶ軸に沿って、赤道から4-6 μm 離れたところの2 $\times$ 2 μm の正方形の領域の蛍光強度を平均化して、表層側の半紡錘体と内側の半紡錘体の蛍光強度を求めて比を示した(表 4-1)。遠心未処理の分裂装置の蛍光強度比の平均値 $\pm$ 標準誤差は1.18 $\pm$ 0.04だった。しかし、遠心処理をした紡錘体の大きい方と小さい方の半紡錘体の蛍光強度比は、細胞分裂を通してほぼ1.00 $\pm$ 0.01だった($p < 0.01$)。分裂装置の半紡錘体域を概算するために、紡錘体面積を分裂装置の像から蛍光強度が赤道より大きい領域として、選択的に切り出し、それぞれの半紡錘体面積の蛍光領域を測定した。結果として、遠心未処理の分裂装置の表層側の半紡錘体と内側の半紡錘体面積比の平均値 $\pm$ 標準誤差は1.20 $\pm$ 0.03であり、遠心処理した紡錘体では1.03 $\pm$ 0.02となった($p < 0.01$)。次に、それぞれの半紡錘体の総蛍光強度を求め、表層側の半紡錘体と内側の半紡錘体との比を求めた。遠心未処理の紡錘体の比の平均値 $\pm$ 標準誤差は1.37 $\pm$ 0.06で、遠心処理した紡錘体では1.02 $\pm$ 0.02だった($p < 0.01$)。これらの値から、蛍光強度と蛍光領域が未処理の紡錘体で非対称を示し、遠心処理した紡錘体では対称を示すことがわかった。さらに、遠心未処理卵の星状体も非対称を示した。表層側の星状体は、平らで先端が切られ、一方、内側の星状体は卵母細胞内に中心体から放射状に広がっていた(8-10)。半紡錘体と同様に半分裂装置の領域の総蛍光強度を得た。そして、表層側の半分裂装置と内側の比を解析した結果、遠心未処理の分裂装置の平均値 $\pm$ 標準誤差は1.38 $\pm$ 0.11で、遠心処理し

た分裂装置では 1.00 ± 0.04 となった($p < 0.01$)。これらは遠心未処理と遠心処理した卵母細胞の分裂装置における紡錘体の違いと同様の結果を示した。

4-3 考察

本研究によって、遠心未処理のヒトデ卵母細胞の極体形成時の半紡錘体の蛍光強度の違い、すなわち2個の半紡錘体の微小管量の差が明確になった。このような差は遠心処理をし、極体形成を阻害した卵母細胞では見られなかった。極体が形成される間、蛍光強度と面積の両方とも表層側の半紡錘体は内側の半紡錘体より約20%大きかった。この非対称性は2種類の抗チューブリン抗体によって染色した分裂装置でも同じ領域で違いを示したことから、表層側の半紡錘体は内側より多い数の微小管によって作られていることが示唆された。一方、極体形成を遠心処理によって阻害したとき、2個の半紡錘体の微小管量の差は3%未満だった。これらのことから減数分裂によって極体に一組の染色体を入れ、卵母細胞外に放出するには表層側の半紡錘体の微小管量が多いことが必要であると考えられる。

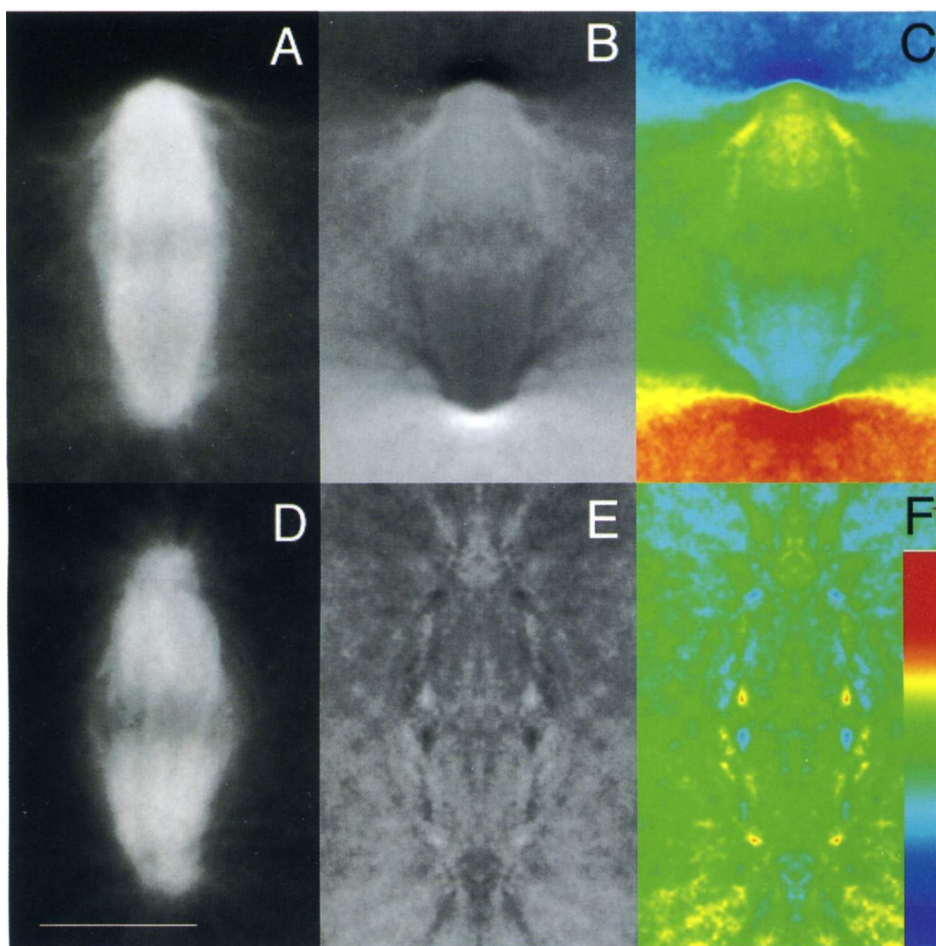


図4-1 極体形成時の分裂装置

遠心未処理卵 (A, B, C) と遠心処理卵 (D, E, F)。(A, D)は抗チューブリン抗体で染色した、減数第一分裂中期の微小管の蛍光像。(B, E)はそれぞれ画像(A, D)を赤道を軸に180°回転し、(A, D)から減算処理をした後、極-極軸を中心に回転した画像を示す。(C, F)はNIH-Imageを使用して、蛍光強度を疑似カラー化（低：青色→高：赤色）した。遠心未処理卵 (A, B, C) では分裂装置の方向によって疑似カラーの色相に差異が認められるが、遠心処理卵 (D, E, F) では認められない。スケールバー：10 μm (文献64から引用)

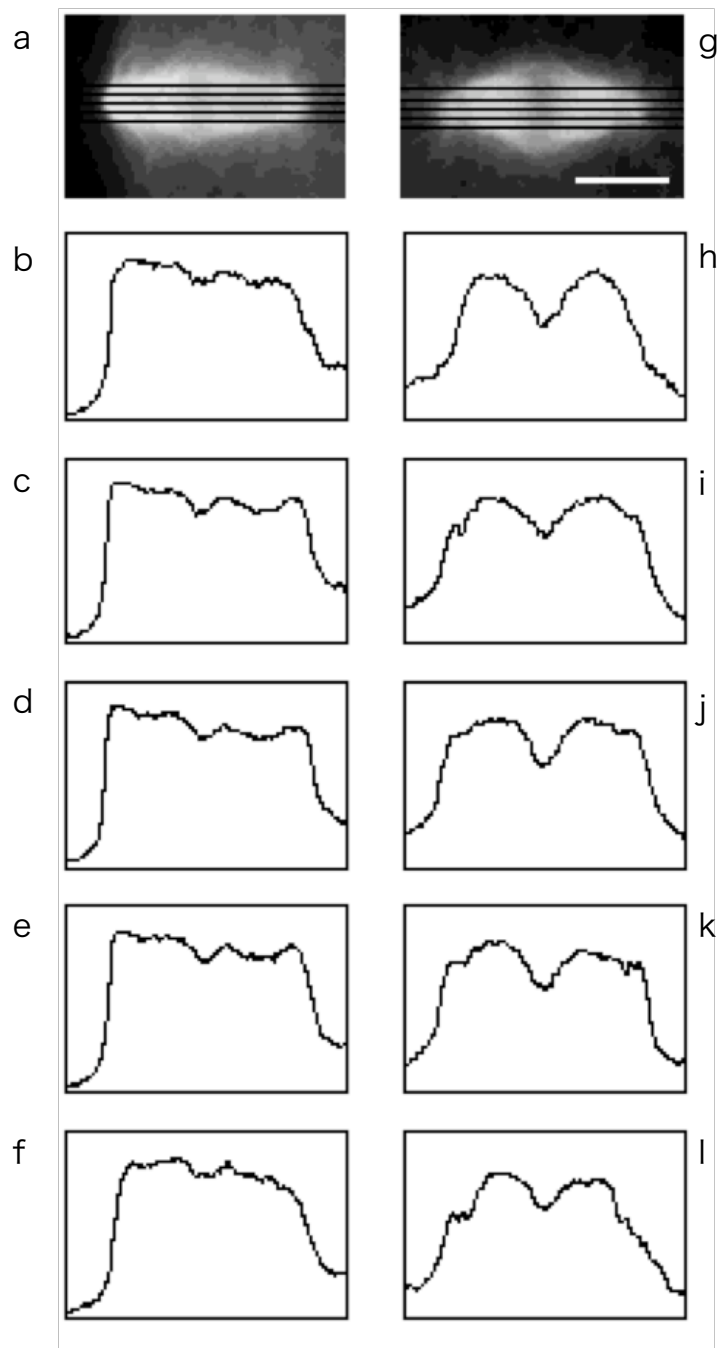


図4-2 分裂装置の蛍光強度

(a, g)は抗チューブリン抗体で染色した減数第一分裂中期の分裂装置の蛍光像を示す。遠心未処理卵（左列(a-f)は不等分裂）と遠心処理卵（右列(g-l)は均等分裂）を示す。(a, g)の分裂装置上を2 μm 間隔でスキャンした蛍光強度を表した。スケールバー：10 μm （文献64から引用）

	遠心未処理卵の 分裂装置	遠心処理卵の 分裂装置	Wilcoxon-Mann- Whitney test
ピークの蛍光強度比	1.18 ± 0.04	1.00 ± 0.01	$p < 0.01$
半紡錘体の面積比	1.20 ± 0.03	1.03 ± 0.02	$p < 0.01$
半紡錘体の蛍光強度比	1.37 ± 0.06	1.02 ± 0.02	$p < 0.01$
分裂装置の蛍光強度比	1.38 ± 0.11	1.00 ± 0.04	$p < 0.01$
サンプル数	8	8	

表4-1 蛍光強度比

遠心処理と未処理の卵母細胞におけるそれぞれの半紡錘体の蛍光量、面積の比を求めたところ、未処理卵では非対称を示したが、遠心処理卵では対称を示した。（文献64から引用）

第5章 ウニ卵の第一分裂における表層アクチン繊維

5-1 はじめに

ウニ卵の第一分裂時、細胞表層下には幅10 μm 、厚さ0.2 μm にアクチン繊維が並び、収縮環を形成することが知られている(69 70 71)。アクチン繊維が赤道の細胞表層下に並び始めたときに収縮環形成が始まることも報告されている(45)。しかし、この収縮環形成が元から細胞表層下に存在するアクチン繊維の再配列によるものなのか、あるいは、アクチン繊維の新たな重合によるものなのか、また、分子の一部だけが重合し、表層のアクチンのほとんどは変化をしない(43)という報告もあり、いまだ明らかになっていない。本研究で用いたファロトキシンはアクチンと結合することが知られ、蛍光ファロトキシンはアクチンの局在の研究によく使われる(17 94)。蛍光ラベルしたアクチンと抗アクチン抗体もアクチン染色に使われるが、ファロトキシンを使用した方法はアクチン繊維だけを可視化できることからアクチン繊維定量に適している。

本章では、ウニ卵のアクチン繊維を蛍光ファロトキシンで染色し、得られたデジタル蛍光像をNIH-Imageを用いて画像解析を行うことによって、細胞表層のアクチン量を詳細に測定した。さらに、ウニ卵をサイトカラシンBで処理し、アクチン繊維重合を阻害したときの分裂過程の表層アクチンの変化についても調べ、卵の分裂過程における表層アクチン繊維の分布について考察した。

5-2 結果

最初に赤道面の直径と極-極間の距離を図5-1 Method Iの方法で測定し、図5-2aに示した。球状の卵から分裂完了まで、赤道の直径と両極間の距離の比が分裂過程の指標となることがすでにHiramoto(26)の報告から分かっているので、この分裂過程表記を使用した。ウニ個体の状態、卵の固定状態、蛍光顕微鏡の光源の強度、顕微鏡のレンズ絞り、蛍光試薬の消光などの要素によって卵から得られた蛍光強度は変化するが、自家蛍光は無視できるので、蛍光強度は1個の卵のアクチン量の分布を反映すると考えた。したがって、アクチン量を赤道表層と極表層の蛍光強度比をとることによって定量化した。媒精後の球体(分裂過程は0%)のとき、蛍光はほぼ全体で均一で、赤道表層と極表層の蛍光強度比はほ

ば一定の1だった(図5-2b)。第一分裂の分裂溝の表層の蛍光量を以下に示す3通りの方法で求めた(図5-1)。

5-2-1 Method Iによる表層アクチン分布

コンピュータに取り込んだ分裂過程の蛍光像から図5-1 Method Iに示すように細胞表層の赤道部分(E)、極部分(P)、バックグラウンド(B)を5×20 pixelの範囲で切り出し、表層の平均蛍光強度を測定し、赤道部分と極の蛍光強度比(R)を求めた。

$$R = (E-B) / (P-B) \quad (1)$$

中期または後期の球状のステージはDNA蛍光像から極-極軸に垂直に染色体が整列することから赤道と極の位置を判断した。赤道の分裂溝の表層アクチン量は分裂のミッドステージでは極表層と比べて2.5倍に増加し、その後減少した(図5-2b)。

5-2-2 Method IIによる表層アクチン分布

図5-1 Method IIに示すように上半分の細胞表層上に一方の極からもう一方の極まで赤道を通してプロットし、このプロットを結ぶラインに沿って、幅10 pixelで表層を切り出し、蛍光強度を得た。赤道におけるアクチン量はMethod Iの結果と同様に中間期まで増加した(図5-3a)。蛍光強度は図5-1に示すように、極近くの表層の2/3の範囲ではほぼ一定だった。しかし、赤道近くの表層の1/3の範囲では徐々に増加し、最大蛍光強度を示した。また、赤道面の平均蛍光強度と両極の平均蛍光強度の差の1/2の蛍光強度を示す位置の距離を測定し、収縮環の幅とした。この幅は球状に近いステージでは明らかにできなかった(約10%の分裂ステージ)。しかし、分裂が20%進んだ段階でアクチン集積の収縮環幅は10 μmと明らかになった。収縮環の幅は、分裂の中間期まで徐々に40 μmまで増加し、一定の幅で維持された(図5-3a, b)。

5-2-3 Method IIIによる表層アクチン分布

卵全体から表層の蛍光強度分布を定量化した。図5-1 Method IIIに示すように取り込んだ蛍光像から細胞表層の輪郭を抽出し、抽出した輪郭を基準に表層を幅6 pixelで切り出し、表層蛍光を定量した。Method I、IIの方法と同様にこの分布図から赤道の極に対する蛍光強度比(R)を求めた。分裂溝の幅もMethod IIと同じ方法で求めた。Method IIIの方法

で、我々は図5-4a, bに示すように赤道表層へのアクチン集積量を測定した。赤道表層でのアクチンの集積量と幅はMethod I、IIと同じようにミッドステージまで増加した。Method IIIの方法で得られた幅は極-極軸に沿っていて、表層には沿っていないので収縮環幅は30 μm と増加が小さかった。

また、蛍光共焦点顕微鏡から得た蛍光像からアクチン集積を定量し、比較したところ、従来の蛍光顕微鏡で得た蛍光像(図5-5a)は、蛍光共焦点顕微鏡で得た画像(図5-5c)よりはるかに明るかった。しかし、この実験ではイメージプロセッシングによって、卵全体の画像から表層領域だけを切り出して解析したので、この違いは表層での蛍光強度の測定に影響を及ぼさないと考えた。

赤道表層と極表層のアクチン量の比は2種類の顕微鏡から得られた画像の間に差は無かった。共焦点顕微鏡で得られた赤道表層の収縮環幅は従来の顕微鏡から得られた値より少し広がった。この結果は、分裂時の形態変化に伴った光路の変化が表層の蛍光強度にほとんど影響しないことを示す。さらに、表層の蛍光強度のランダムさは従来の顕微鏡法による内因的な不均一性よりむしろ、蛍光共焦点顕微鏡法の欠点として強調された。

5-2-4 サイトカラシンB処理卵のアクチン分布

細胞分裂が阻害された時の赤道の表層アクチンの変化を観察する為に、サイトカラシンB処理を行い、アクチンの重合を阻害して細胞分裂を抑制した。サイトカラシンBを処理し、様々な時期に固定した分裂卵の表層のアクチン量を測定した。サイトカラシンB処理後、直ぐに分裂溝陥入が停止した。処理後1分の分裂溝における蛍光像から、アクチンがパッチ状になり、収縮環が崩壊したことがわかった(図5-6d)。処理3分後、赤道域表層のアクチン量は極より減少した(図5-6g)。処理後10分、卵母細胞の表層の蛍光パッチは明るかったが、表層に沿った蛍光強度には大きな減少があった。

5-3 考察

蛍光ファロトキシンでウニ卵の表層アクチンを染色し、デジタル化したアクチンの染色像を解析して表層のアクチン量を測定した。画像解析は前章にも述べたように分子の分布を定量することに有効な手法である(64)。特に卵などの大型の細胞では、多量の細胞質アクチンが表層のアクチン繊維量の測定を妨げることから、細胞全体から表層を切り出すこと

による解析法は表層アクチンのダイナミックな変化を明確に出来る。解析結果から、分裂溝ではアクチン繊維が極表層の2.5倍集積することがわかった。アクチン量の絶対値は測定できなかったが、第一分裂の間、極表層のアクチン量はほぼ一定であると予想する。従来から存在するアクチン繊維が収縮環に対して垂直方向に10%以下の範囲で再配列する結果、収縮環は直線的に減少した(24)。したがって、極表層に対して赤道表層の過剰なアクチンは新たに構築され、表層のアクチンの総量は元の1.5倍にまで増加した。もし、従来から存在したアクチン繊維がランダムに配置し、新たに重合したアクチン繊維が平行に整列して収縮環を形成すると、張力はアクチン繊維の量と繊維方向のコサインの両方に比例することになる。赤道の直径に沿った張力は球状の段階で3.4倍にまで増加するが、赤道に対して垂直方向の張力は一定だった。Hiramoto(28)の、赤道から5 μm 離れた位置で、赤道に対して平行な張力は垂直の張力の2倍という報告と近い値を示した。しかし、赤道における報告はなかった。一方、Schroeder(69, 70, 71)は、分裂の間収縮環の厚さは一定で、アクチン繊維量を測定しなかったが、収縮環領域のアクチン量は一定で変化のないことを示唆した。

本研究で分裂溝のアクチン集積幅は分裂20%で10 μm 、50%のミッドステージで最大40 μm とわかった。他に*Arbacia*卵で約8 μm (2.5-17 μm)(71)、*Hemicentrotus*卵で15-18 μm (85)という報告もある。分裂のミッドステージにおけるこの違いは、総表層の約30%を占める分裂溝とその周辺の表層のアクチン繊維の集積のランダムな方向によると考えられる(24)。さらに本研究で、サイトカラシンB処理1分後のウニ卵の分裂溝領域で集積したアクチン繊維が崩壊してパッチ状になった。Tanakaら(84)によってもサイトカラシンD処理後すぐに収縮環が崩壊してパッチ状になったことが報告されている。アクチン繊維の崩壊はサイトカラシンが将来、分裂溝が入るところ以外で滑り運動と繊維の崩壊を引き起こしたためだと考えられる。収縮環でのアクチン繊維はミオシンに依存して張力を発生させるが、これらのアクチン繊維は分裂が進むと減少した。つまり、Schroeder(71)の予想では収縮環のアクチン量は単純な滑り運動では増加しない。一方、赤道以外の表層の領域のアクチンは赤道表層ほどサイトカラシンBに感受性は高くなかった。この実験で報告されたウニ卵の表層の蛍光の明るいパッチは、それらの報告で束になっている微絨毛中の切れ切れになったアクチン繊維と同じものであるかもしれない(86)。分裂溝以外の領域のアクチンはアクチン繊維を架橋する役割を果たす赤血球膜タンパク質(34)や α アクチニン(44)などのアク

チン結合タンパク質によって調整され、赤道における活性力に対して作用する張力を発生する。これは、サイトカラシンBに感受性を持つアクチン量を測定することによって、アクチン繊維が発生する力を定量することができることを意味する。

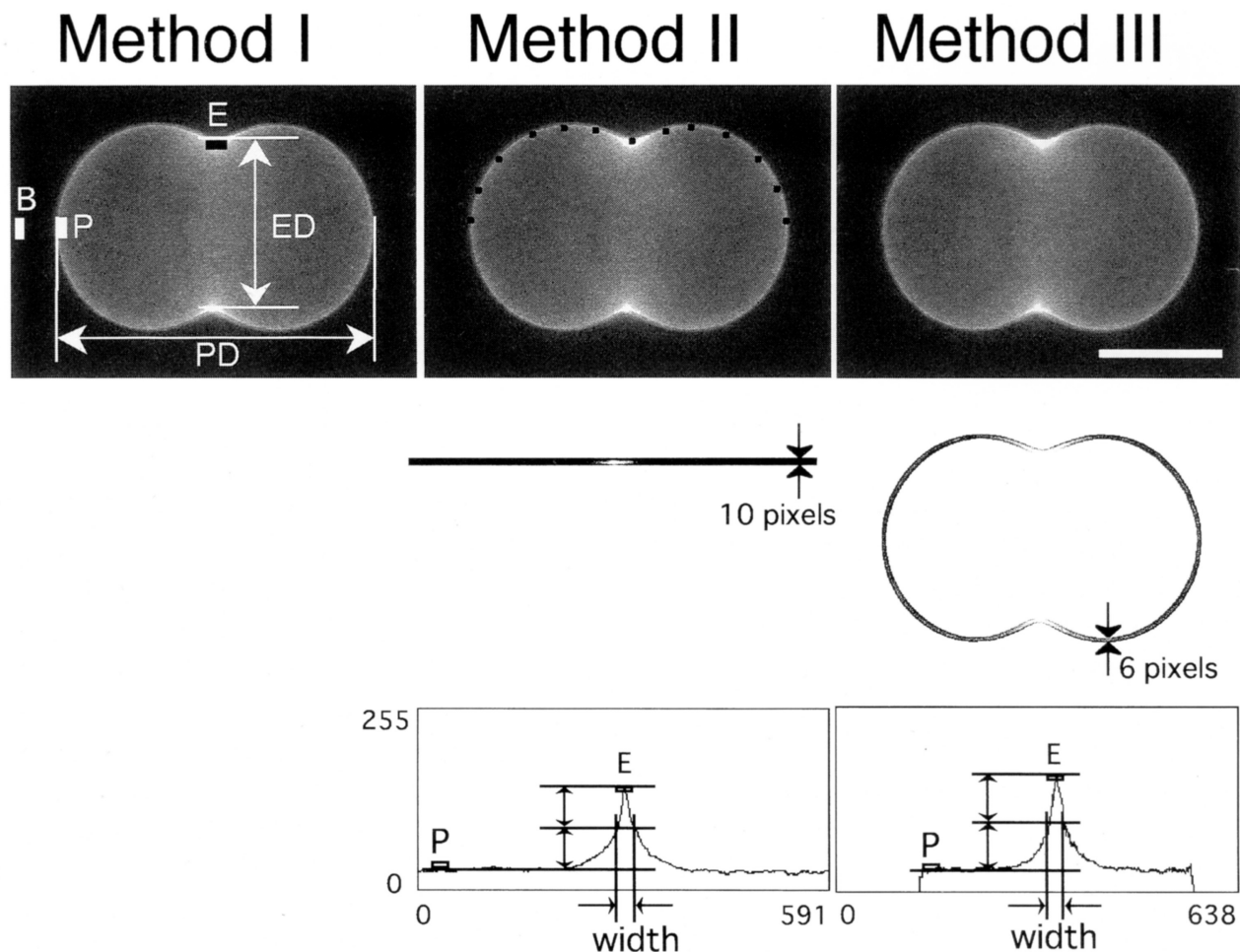


図5-1 アクチン定量方法

Method I : 分裂中の卵のアクチン蛍光像から、細胞表層の赤道部分(E)、極部分(P)、バックグラウンド(B)を 5×20 pixelの範囲で切り出し、表層の平均蛍光強度を測定し、以下の式(1)より赤道部分と極のアクチン蛍光強度比(R)を求めた。ED : 赤道直径、PD : 極-極間の距離、 $R = (E-B)/(P-B)$ (1)

Method II : 上半分の細胞表層上の一方の極からもう一方の極まで赤道を通してプロットし、このプロットを結ぶラインに沿って、幅10 pixelで表層部分を切り出し、直線的に再配置した部分的蛍光像(中段左図)からアクチン平均蛍光強度分布を得た。

Method III : 取り込んだ蛍光画像から細胞表層の輪郭を抽出し、抽出した像を基準に表層を幅6 pixelで切り出し(中段右図)、平均蛍光強度分布を得た。

Method II、IIIで得られた蛍光分布から赤道面の平均蛍光強度と両極のアクチン平均蛍光強度の差の1/2の蛍光強度を示す位置の距離を収縮環の幅(width)として測定した(下段図)。スケールバー : 50 μm (文献65から引用)

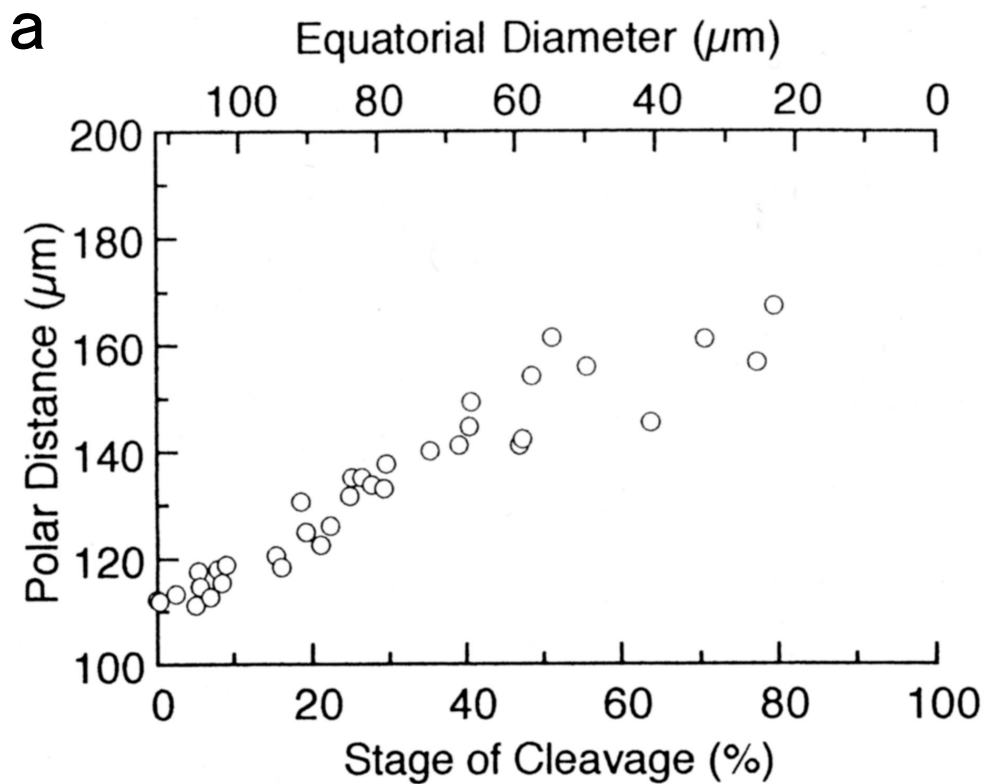


図 5-2a Method I を適用した場合の分裂過程における赤道直径と極-極間の距離

ウニ卵第一分裂過程における赤道直径 [Equatorial Diameter (μm):ED 図5-1参照、横軸]と極-極間の距離[Polar Distance (μm):PD 図5-1参照、縦軸]、および、分裂時期 (卵割段階を%で表示。横軸) の関係を示す。PDとED、分裂時期の関係は、ほぼ比例関係を示す。(文献65から引用)

b

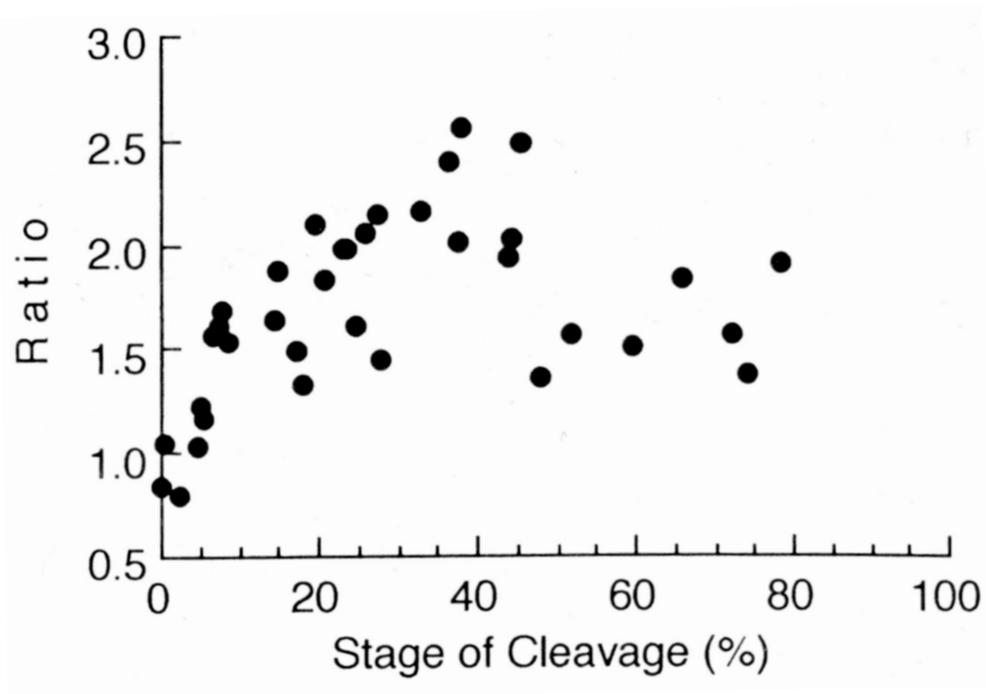


図 5-2b Method I を適用した場合の分裂過程におけるアクチン分布

ウニ卵第一分裂過程における赤道付近のアクチン量の変化を示す。横軸は分裂時期（卵割段階を%で表示）を表し、縦軸は蛍光比[Ratio: R、本文の式(1)参照]を示す。赤道における分裂溝の表層アクチン量は、分裂の中間期(50%)では極表層と比べて約2.5倍に増加し、その後減少した。（文献65から引用）

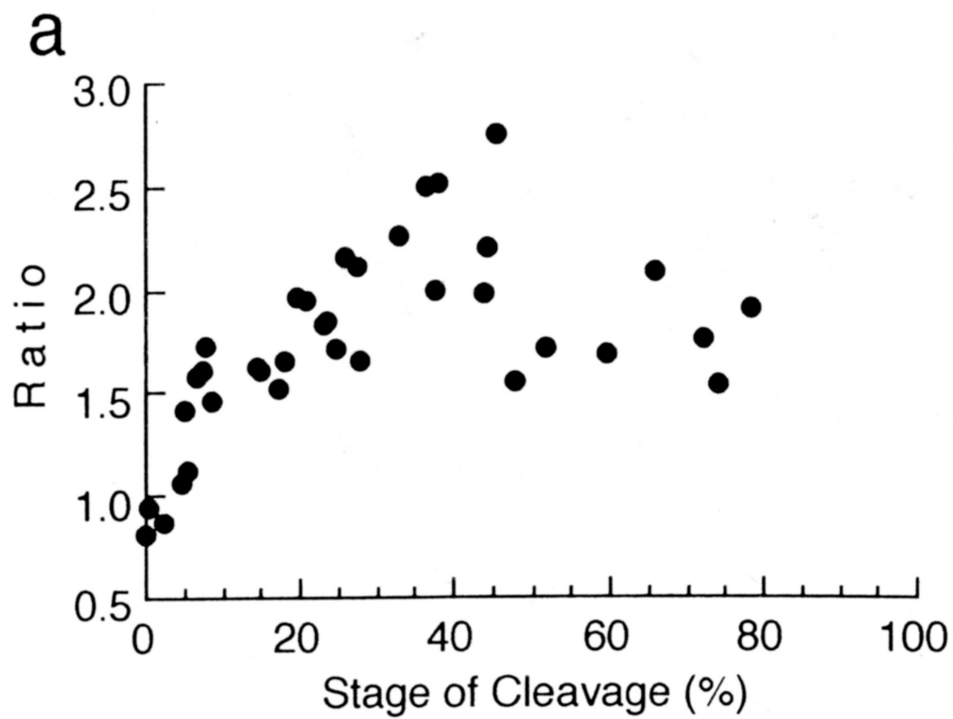


図5-3a Method IIを適用した場合の分裂過程におけるアクチン分布

ウニ卵第一分裂過程における赤道付近のアクチン量の変化を示す。Method Iを適用した場合と同様な結果を得た。（文献65から引用）

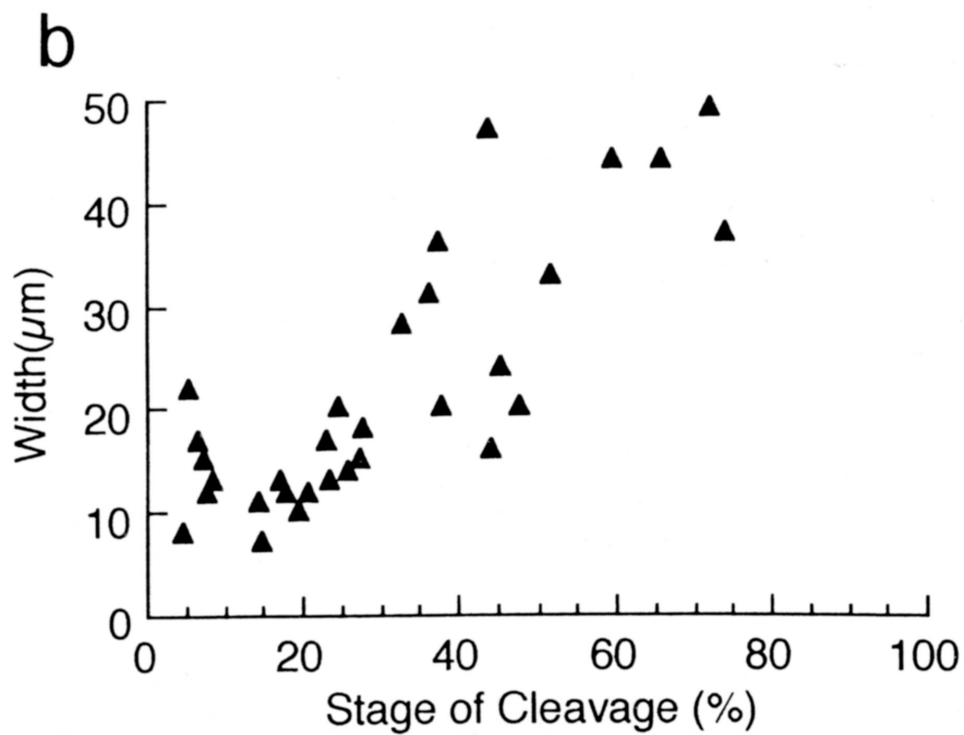


図5-3b Method IIを適用した場合の分裂過程の収縮環幅

ウニ卵第一分裂過程における収縮環の幅[width(μm)]の変化を示す。収縮環の幅は、分裂の中間期まで徐々に40 μmまで増加し、一定のままで残った。(文献65から引用)

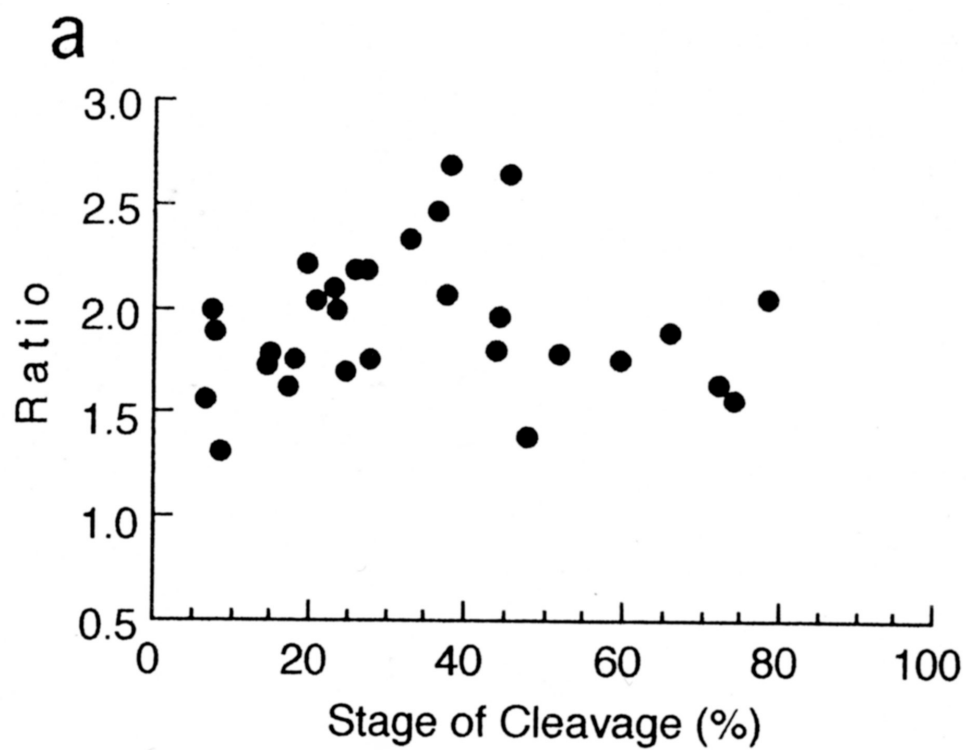


図5-4a Method IIIを適用した場合の分裂過程のアクチン分布

ウニ卵第一分裂過程における赤道付近のアクチン量の変化を示す。Method I、IIを適用した場合と同様な結果を得た。（文献65から引用）

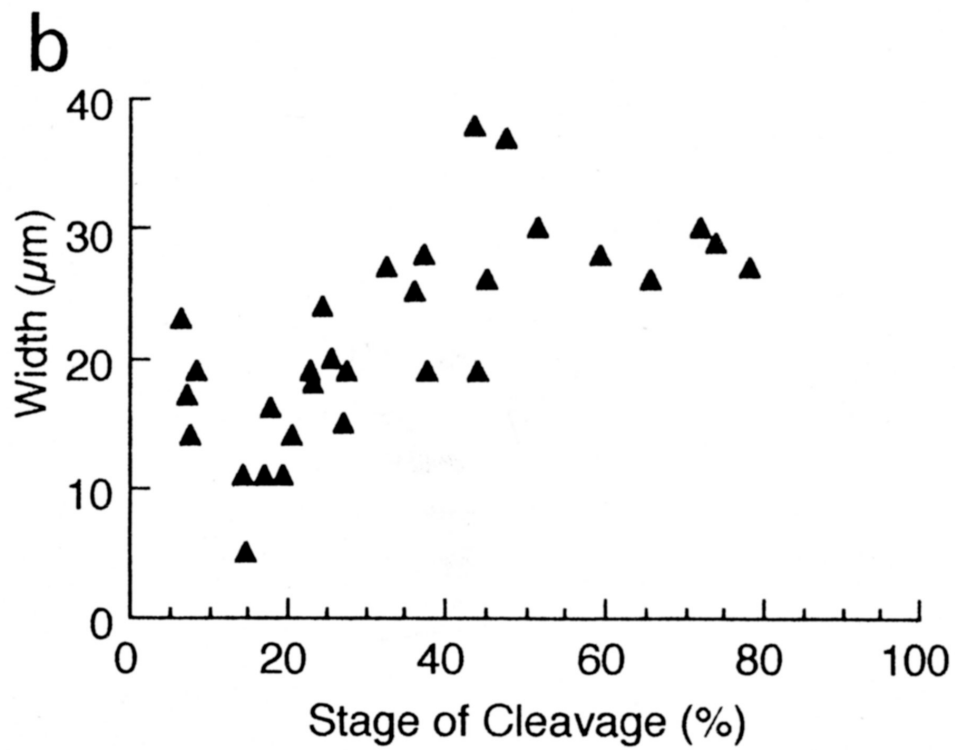


図5-4b Method IIIを適用した場合の分裂過程の収縮環幅

ウニ卵第一分裂過程における収縮環の幅[width(μm)]の変化を示す。表層に沿っていないので収縮環幅は30 μmと増加が小さいが、一定のままで残った。(文献65から引用)

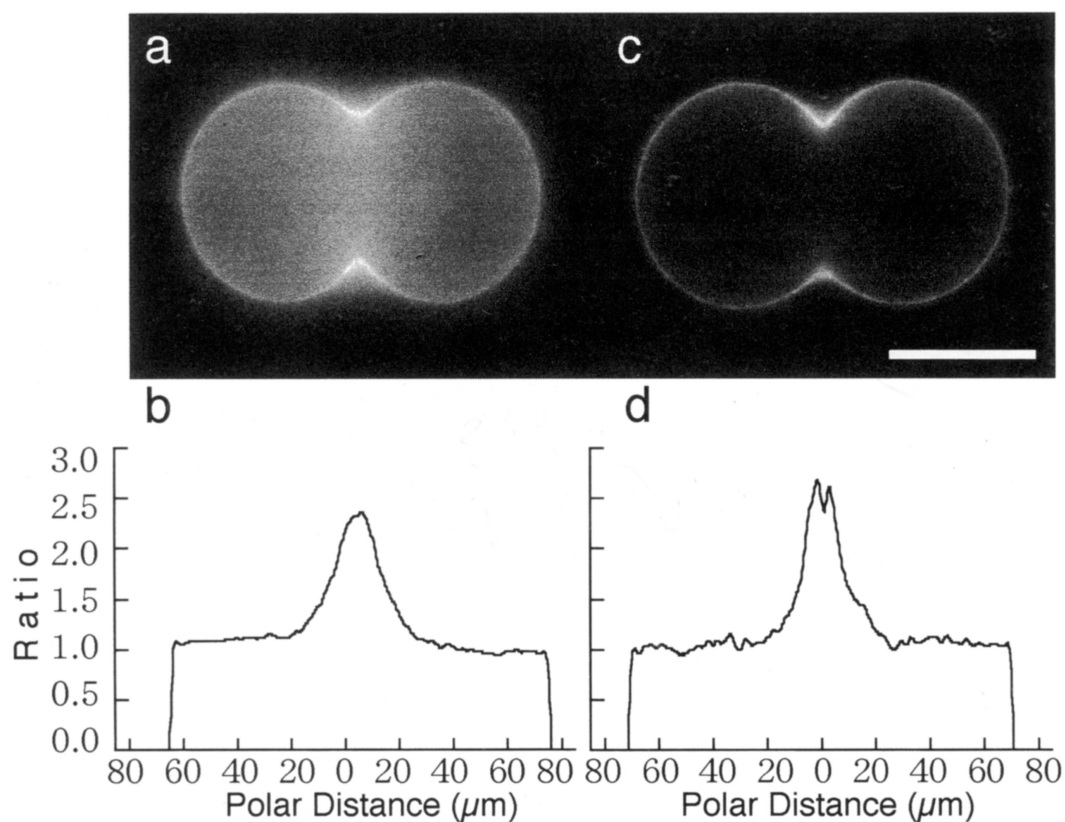


図5-5 従来型と共焦点型の蛍光顕微鏡像の比較

Method IIIの方法で細胞表層のアクチンの集積を定量化した。従来の蛍光顕微鏡像(a)と共焦点顕微鏡像(c)を使用して、それぞれの蛍光分布を得た(b, d)。の横軸は極-極間の距離[Polar Distance(μm):PD]を示し、縦軸は蛍光比(R)を示す。共焦点型の蛍光顕微鏡像の方が、コントラストがついた比較的明るい画像を得たが、表層のアクチン分布の大きな違いは認められなかった。(文献65から引用)

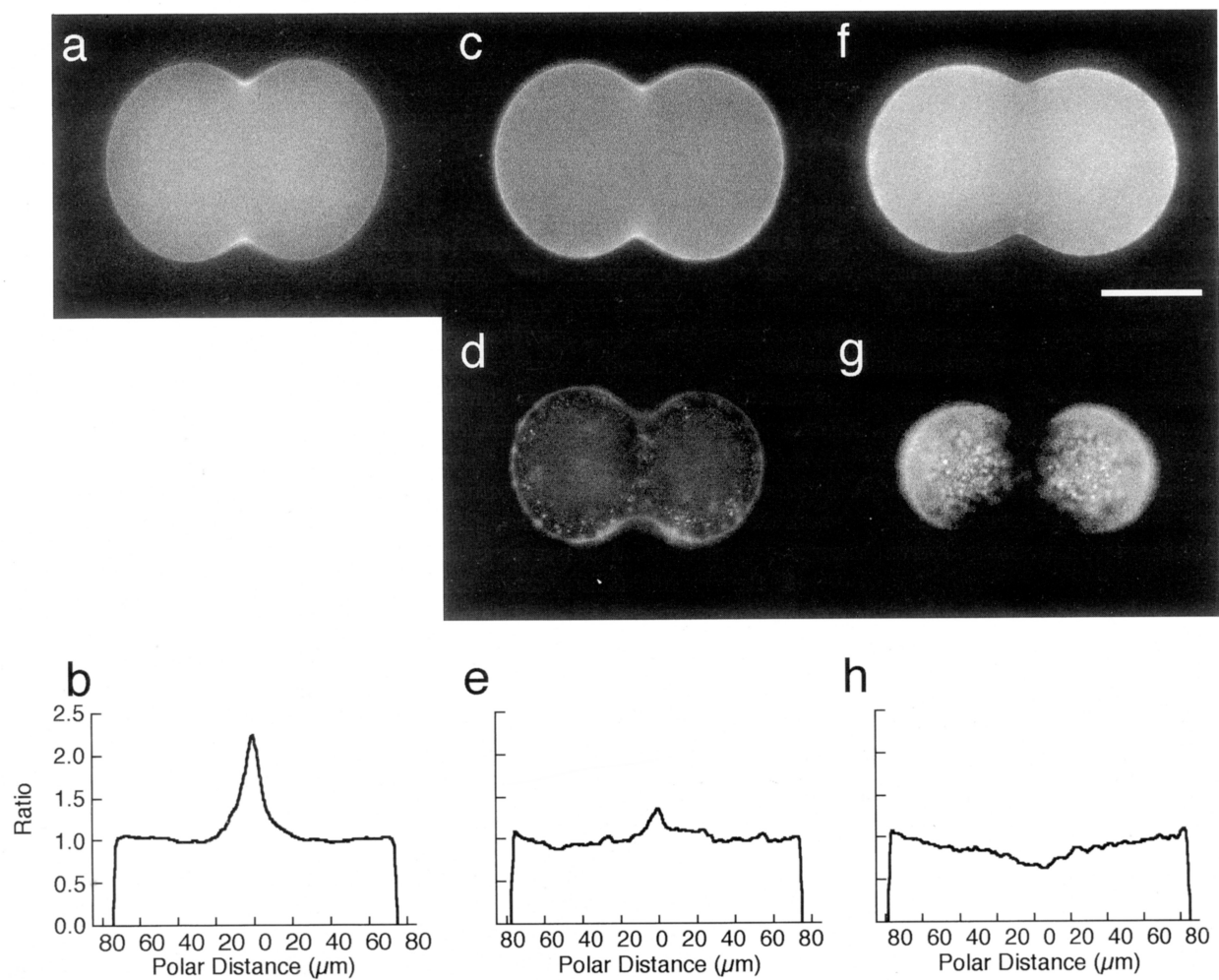


図5-6 サイトカラシンB処理卵の蛍光像

(a)はサイトカラシンB未処理卵のアクチン染色の蛍光像を示す。(c, f)はサイトカラシンB処理後1分と3分後のそれぞれの細胞表層のアクチン蛍光像を示す。(d, g)は分裂溝位置のアクチン蛍光像を示す。(b)は画像(a)のアクチン分布図を示し。(e, h)はそれぞれ(c, f)のアクチン分布図を示す。スケールバー：50 μm (文献65から引用)

第6章 イトマキヒトデにおける極体形成時の表層アクチン

6-1 はじめに

ウニ卵の均等分裂において、Rappaport (53)は、2個の中心体の間に分裂溝が形成されることを明らかにした。ウニ卵の第一分裂で形成される分裂溝のアクチン繊維量は極表層の2.5倍集積し、極表層のアクチンは第一分裂の間では、ほとんど一定であることを第5章で明らかにした。

卵成熟過程の極体形成時に見られる不等分裂で分裂装置の微小管量が表層側の半紡錘体、星状体で内側より多いことを第3、4章で明らかにした。すでに不等分裂の分裂溝は2個の中心体から異なった距離の表層に形成されることもわかっている。本章では不等分裂における収縮環形成機構を解明することを目的に、前章と同様に蛍光ファロトキシンで卵母細胞を染色し、蛍光像から表層を切り出し、アクチン量のダイナミックな変化を明らかにするためにSatoh, S. K.らの方法(65)で解析を行った。まず、動物極表層の形態変化を微分干渉顕微鏡を使って生きている卵母細胞で観察し、画像を撮影した。

6-1-1 不等分裂の指標

卵母細胞の発生で極体形成はすべて同時には起こらなかった。そこで、固定卵母細胞を観察し、生きている卵母細胞の分裂過程と細胞骨格を比較するために、不等分裂の発生指標を決定した(16)。不等分裂の膨らみの高さや膨らみの直径は個々の卵母細胞のステージを比較する指標には適さなかった。そこで、本章の実験では動植物軸に垂直に膨らみの直径より大きい50 μm の長さの弦を図6-4aに示すように設定し、弦から動物極までの高さ、弦から表層側と内側の染色体までの距離、膨らみの直径または分裂溝の直径を測定して指標とした。(図6-4a, b, c)。染色体運動は後期の分裂溝が陥入するまでにほとんど完了し、卵母細胞と極体にそれぞれ一個の核が存在した。卵母細胞の動物極が膨らみ始めてから、わずか5-7分間で極体形成は完了した。本章において、時間の指標は膨らみの直径が12 μm (極体の直径に相当し、不等分裂における分裂溝形成開始に相当する)まで減少した時間を0分とした。この時間は膨らみの形成開始から3-4分後だった。動物極の高さの平均値は、極体形成の初期に直線的に増加し、図6-4bに示すように後期で一定になった。したがって、動物極の高さは極体形成の初期には極体形成の指標になったが、後期では指標に

適さなかった。一方、膨らみの直径の平均値は極体形成の初期には直線的に減少したが、図6-4bに示すように標準偏差が著しく大きくなることから、膨らみの直径は初期の指標には不適切だった。しかし、分裂溝形成後、分裂溝の直径の平均値は直線的に減少し、標準偏差も小さかったことから極体形成の後期の指標に適した。これらを組み合わせて初期には動物極の高さを、分裂溝形成後には分裂溝の直径を発生指標にしてアクチン量の測定を行った。

6-2 方法

卵母細胞の表層の蛍光強度の定量を第5章と同様の方法で行った(65)。蛍光強度の解析は、Method I (図6-1)とMethod II (図6-2)の方法でNIH-Imageを使用し、Power Macintosh 7500コンピュータで行った。卵母細胞の蛍光像は、2次元で0から255までの256階調あり、低倍率画像は、Fluor 10 (NA = 0.5) 対物レンズ装着蛍光顕微鏡、CCDカメラ (C2400-75I, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)、画像処理プロセッサ (Argus 20, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を通してコンピュータに取り込んだ。画像の1 pixelは0.23 μm に相当する(図6-1a)。高倍率画像はUV-F40油浸対物レンズ (NA = 1.30)を装着した顕微鏡で撮影し、1 pixelは0.38 μm に相当する(図6-1b)。

他にも共焦点蛍光顕微鏡 (InSIGHTplus, Meridian Instruments Inc., Okemo, MI, U.S.A)からCCDカメラ (MicroImager, Xillix Technologies Corp., Richmond, BC, Canada)で画像をコンピュータに取り込んだ(図6-1b)。

6-2-1 アクチン定量 Method I

図6-1aに示すように、極 (AP, VP) と赤道 (E コントロール) の表層の 5×20 pixel ($1.9 \times 7.7 \mu\text{m}$) の長方形の領域とバックグラウンド (B) としての卵母細胞外の同じ面積の領域の蛍光強度/pixelの平均値を低倍率の蛍光像で測定した。以下の式(1)から、極表層/赤道表層の蛍光強度比 (R) を求めた。

$$\left. \begin{aligned} R_A &= (AP-B) / (E-B) \\ R_V &= (VP-B) / (E-B) \end{aligned} \right) \quad (1)$$

高倍率では、動物極を詳細に測定するために、図6-1bに示すように、動物極表層(AP)で直径6 pixel(1.4 μm)の円領域の蛍光強度平均と低倍率画像の赤道表層の代わりに動物極から50 μm 離れたところのコントロール表層(E)の直径6 pixel(1.4 μm)の円領域とバックグラウンドとしての卵母細胞外の同じ面積の領域(B)の蛍光強度/pixelの平均値を高倍率で測定した。式(1)で、動物極表層/コントロール表層の蛍光強度比(R)を求めた。

6-2-2 アクチン定量 Method II

蛍光ファロトキシンで染色した卵母細胞(図6-2a)の高倍率の蛍光像から、卵母細胞の輪郭を作成したNIH-Imageのマクロプログラムを使用して抽出した(図6-2b)。この輪郭から幅6 pixel(1.4 μm)における卵母細胞の動物極表層を切り出して解析した。アクチン分布は動植物軸に沿った方向(図6-2c)と垂直の方向(図6-2d)で定量した。

6-3 結果

6-3-1 極体形成時の動物極の形態変化

卵母細胞は極体形成直前に、動物極の細胞表層が拡張し、植物極は収縮した(16)。次に、動物極で膨らんだ領域の周りの細胞表層は収縮し、植物極の表層が拡張した。既に、Shiraiら(78)によって細胞の直径も急速に変化することも分かっている。

卵母細胞の動物極付近の形態変化と染色体の動態の両方を微分干渉顕微鏡で観察し、図6-3に示した。中期では卵母細胞の動物極表層から10 μm 離れて染色体は位置した(図6-3a)。染色体は後期に入り分離を始め、同時に、動物極の直径30-40 μm の表層領域(図6-3b, c)を膨らませた。膨らみが際立つようになったとき、染色体が膨らみの方向に動いたのが確認された(図6-3d-g)。分裂溝が膨らみの元に形成され、極体形成のための分裂装置の赤道面で陥入し(図6-3h)、表層側の染色体は膨らみの中に取り込まれ(図6-3i)、染色体を含む極体を形成し(図6-3j)、分裂溝は収縮した。

6-3-2 極体形成時の表層アクチン分布

卵母細胞表層でのアクチン分布は、rhodamine-phalloidinで蛍光染色することによって定量した。蛍光は卵母細胞内部では見られなかった。絶対蛍光強度が測定できないので、動物極、植物極、赤道の表層蛍光強度を測定し、赤道表層とそれぞれの表層の蛍光強度比を計算した。極体形成の膨らみ開始前の、動物極、植物極、赤道の表層の蛍光強度は等しかった(図6-5a)。その後、動物極表層の蛍光強度は植物極より増加した(図6-5b, c)。蛍光強度比は膨らみ開始後、動物極では急激に減少し、その後、0.4まで下がったのに対して植物極は変化しなかった(図6-6)。極体形成時、動物極表層の領域でのアクチン分布を正確に測定するために共焦点顕微鏡で観察した(図6-2)。表層領域を画像から切り出した後、表層の蛍光強度比は図6-7に示すように動植物軸に沿った方向と垂直の方向で定量した。動物極表層の蛍光強度は動物極の高さの増加と反比例して減少し、一方、極体表層(動物極頂点)では、蛍光強度比がコントロール表層と比べて0.5になった(図6-8)。膨らみの元では、アクチンの集積が観察された。膨らみ開始の直後に、蛍光強度はコントロール表層と比較すると約1.2になり、徐々に1.8にまで増加した(図6-9)。生きている卵母細胞を使って図6-8の動物極の高さ12 μm と図6-9の膨らみ、または分裂溝の直径の12 μm が等しいステージとして解析した。

6-3-3 極体形成を阻害したときのアクチン分布

極体形成を阻害するために、くさびの中に卵母細胞を入れ、カバーガラスの縁で動物極の膨らんだ部分を15分間押し続けた(図6-10e)。そのときのアクチン分布と染色体の像を図6-10a, bに示した。アクチンの集積が動物極表層で観察でき、この集積した領域の中心に小さく暗い領域があった。この蛍光分布は未処理の卵母細胞の蛍光像(図6-10c, d)の極体形成の収縮環と似ていた。リング状の蛍光の直径は $5.4 \pm 1.9 \mu\text{m}$ (サンプル数 $N = 5$)であった。動植物軸を圧迫することによって極体形成を阻害し(図6-11h)、表層の蛍光分布を詳細に観察した。卵母細胞を100 μm の厚さのくさびの中に入れた後、固定、染色をした。動物極がくさびのカバーガラス面に接し、極体形成が阻害されたときの表層の蛍光分布を図6-11に示した。膨らみの形成を推測する表層上の暗い領域に染色体が観察でき、いくつかの卵母細胞ではアクチン分布がリング状に観察された(図6-11a, d)。それは極体形成時の収縮環と類似し、動物極付近のリング状の蛍光は1-MeAde処理後50分では直径13.7

± 3.7 μm (サンプル数 $N = 12$) だった。蛍光リングの直径は56分で6 μm まで小さくなり、その後、60分で固定した卵母細胞ではわずかに大きくなった(図6-11g)。このことはリングが収縮し、次に弛緩したことを示唆した。したがって、極体形成を阻害したときの、動物極表層でのアクチンの減少は未処理の卵母細胞の極体形成の膨らんだ表層と同様の方法で引き起こされたと考えられる。そして、また、リング状のアクチン集積は未処理の卵母細胞の分裂溝と同様に動物極からの離れた位置の表層で引き起こされた。

6-4 考察

6-4-1 膨らみと分裂溝形成

極体形成の間、ダイナミックな形態変化が動物極近くで起こった。この形態の変化と染色体運動は図6-3と図6-4に示すように生きている卵母細胞で観察した。動物極の表層は膨らみ始めた後期の始めに、染色体が分離するのが分かった。膨らみ始めて2、3分後に、分裂溝が膨らみの元で形成され、その後、分裂溝は収縮し、極体を形成した。このことから不等分裂時の分裂溝は均等分裂と同じ時期(図5-2, 3)、後期と終期の間に形成されることが分かった(図6-12)。

Longo (40) は薬理的にこれらの現象を解析した。サイトカラシンBをsurf clam (*Spisula*)の卵成熟過程に処理すると、膨らみは形成されたが、分裂溝は形成されなかった。Rappaportら (54) は顕微操作でこの現象を解析した。*Pisaster*と*Asterias*の成熟卵母細胞の極体が形成される動物極の表層から12-25 μm の位置に平行な1組の顕微針を挿入した。この対になった顕微針で、極体の膨らみの元に形成される収縮環が収縮するのを阻害したが、膨らみは形成された。したがって、膨らみの形成と分裂溝の形成は時間的に異なったメカニズムによって引き起こされることが予想された。

6-4-2 表層のアクチン分布

次に極体形成時の卵母細胞の蛍光像を解析することによって表層アクチン繊維の量を測定した。蛍光像の解析は現在までに多くの研究者によって報告されるように、いくつかの分子の分布を定量するのに非常に役立つ(58 64 65 96)。Heil-Chapdelaineら (23) は*Asterias amurensis*の卵母細胞をrhodamine-phalloidinを使用して成熟過程の表層アクチンについて

調べたが、領域の変化については解析していない。ここで測定した動物極表層の蛍光強度は動物極の高さの増加に反比例して減少し、動物極頂点ではコントロール表層(図6-8)の半分になった。極体形成時の膨らみ領域の表層アクチン減少と同様のことが、電子顕微鏡と蛍光顕微鏡で*Tubifex*と*surf clam*でも報告された(51 52 75 76)。

極体と卵母細胞の直径比によると、張力が単にアクチンとミオシンの相互作用によって生まれるなら蛍光強度は0.07にならなければならない(16)。表層の厚さは表層アクチン量を過剰にしているかもしれない(ここでは、表層の厚さは卵母細胞の蛍光像から1.4 μm と予想した)。さらに、分裂装置近くの領域の蛍光強度は周囲の細胞質より高かった(図6-1, 2, 7)。周囲の細胞質と比較するとこれが分裂装置のアクチン繊維の存在によるものか分裂装置の透明によるのかは明確にできなかった(図6-3)。また、分裂装置近くの領域の蛍光強度は表層アクチン量を過剰にしているかもしれない。0.5と0.07の値の矛盾は表層の画像解析に代わり、卵母細胞像全体から単離した表層アクチンの定量などの今後の解析により減少させることができると考える。アクチン繊維は膨らみ開始直後に膨らみの元で増加し、膨らみの元が分裂溝になった。分裂溝では、アクチン繊維がコントロール表層の1.8倍まで集積した。Schroeder(69 70)によって分裂溝の収縮環が報告されて以降、蛍光ファロトキシンを使った極体形成の分裂溝でのアクチン集積が頻繁に報告された(4 6 36 45 51 52 65 77 83 92)。したがって、卵母細胞の動物極から赤道域までのアクチン分布は、極において最小で、膨らみの元で最大に増加し、その後徐々に一定値まで減少した。つまり、膨らみの形成と分裂溝の形成は空間的に異なったメカニズムによって引き起こされることが分かった。

6-4-3 極体形成機構

極体形成時の卵母細胞での動物極表層の形態変化とアクチン分布の模式図を図6-12に示す。この章で2つのことが分かった。動物極で最初にアクチン減少が起こり、動物極表層の膨らみの元のアクチン量が増加する。その結果、収縮環が形成されて細胞質分裂が起きる。Dan(9)によって提唱された不等分裂の機構が弛緩理論か収縮理論によるのかを決定することは難しい。弛緩については極体形成時の極が柔らかくなることによることが示唆された(16 50 90)。動物極領域のアクチン減少は極の弛緩の分子的基础かもしれない。したがって、極体形成の間、アクチン繊維と分裂装置の表層側の中心体付近で結果として産生

する張力の減少は動物極に膨らみを誘導し、動物極の周りに収縮を誘導する(16 50)。2つの中心体から異なった距離にあった膨らみの元は分裂装置が動物極表層に接着した後(20)、中心体から等距離になった。Wolpert(90)、Hamaguchi, M. S. and Hiramoto(16)とOhtsubo and Hiramoto(50)は、極の弛緩は膨らみの前に形成された収縮環の収縮によって引き起こされ、最初または収縮環形成に先行して起こることを示唆した。一方、膨らみの元で増加するアクチン繊維と張力の産生の結果、収縮環が誘導され収縮すると示唆した。

圧迫することにより極体形成を阻害したとき、極体形成の膨らみも形成されなかったが、収縮環様の構造が分裂装置の2つの中心体から異なった距離に誘導された。このことは分裂装置が動物極表層に接着することで、動物極でアクチンの減少が引き起こされ、後期の間に動物極からわずかに離れた表層でアクチンの集積が誘導された事を示唆した。Rappaportらは、ヒトデの卵母細胞を使用し、様々な実験において極体形成を調べた(54)。その結果、極体形成における膨らみが局所的な表層の弛緩から起きるのではなく、局所の細胞骨格活性から起こるかもしれないことを提唱した。本章で、細胞骨格の中のアクチン分布を調べたことで、極体が形成される領域の膨らみの表層でアクチンが減少することが分かった。

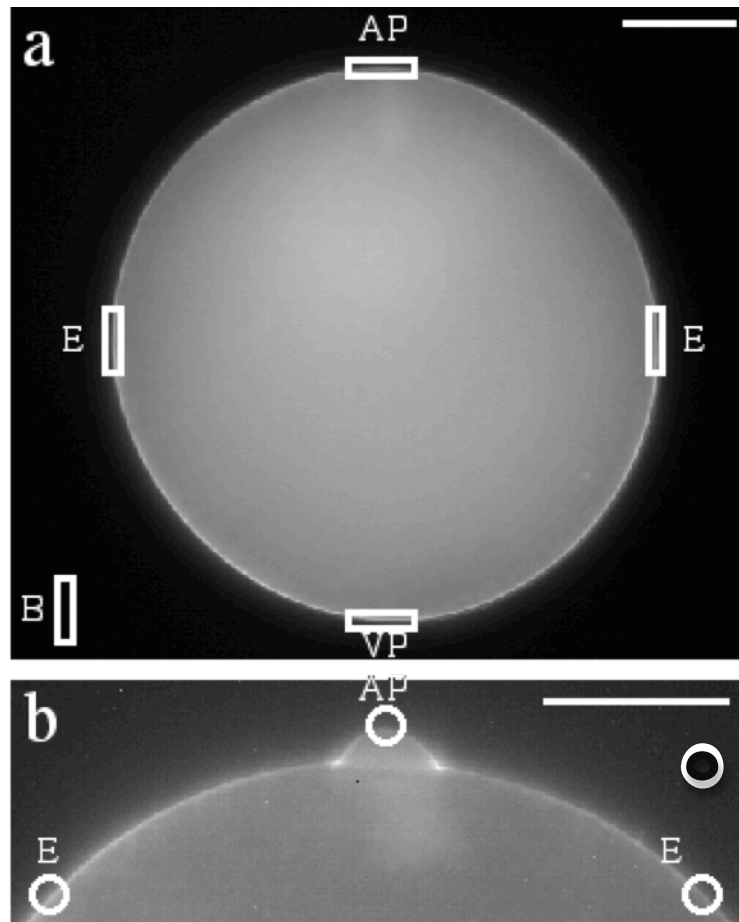


図6-1 Method Iを適用したアクチン定量法

a : Method Iの方法を適用し、低倍率でコンピュータに取り込んだ蛍光像での定量方を示した。動物極(AP)と植物極(VP)、赤道(E)の表層の 5×20 pixel ($1.9 \times 7.7 \mu\text{m}$)の長方形の領域とバックグラウンド(B)としての卵母細胞外の同じ面積の領域の蛍光強度/pixelの平均値から、極表層/赤道表層の蛍光比($R = (P-B)/(E-B)$)を求めた。b : 高倍率の動物極蛍光像での定量法を示した。動物極表層(AP)において、直径6 pixel ($1.4 \mu\text{m}$)の円領域の蛍光強度平均と赤道表層の代わりに動物極から $50 \mu\text{m}$ 離れたところのコントロール表層(E)とバックグラウンド(B)の卵母細胞外の同じ面積の領域の蛍光強度/pixelの平均値から動物極表層/コントロール表層の蛍光比(R)を求めた。スケールバー : $50 \mu\text{m}$ (文献22から引用)

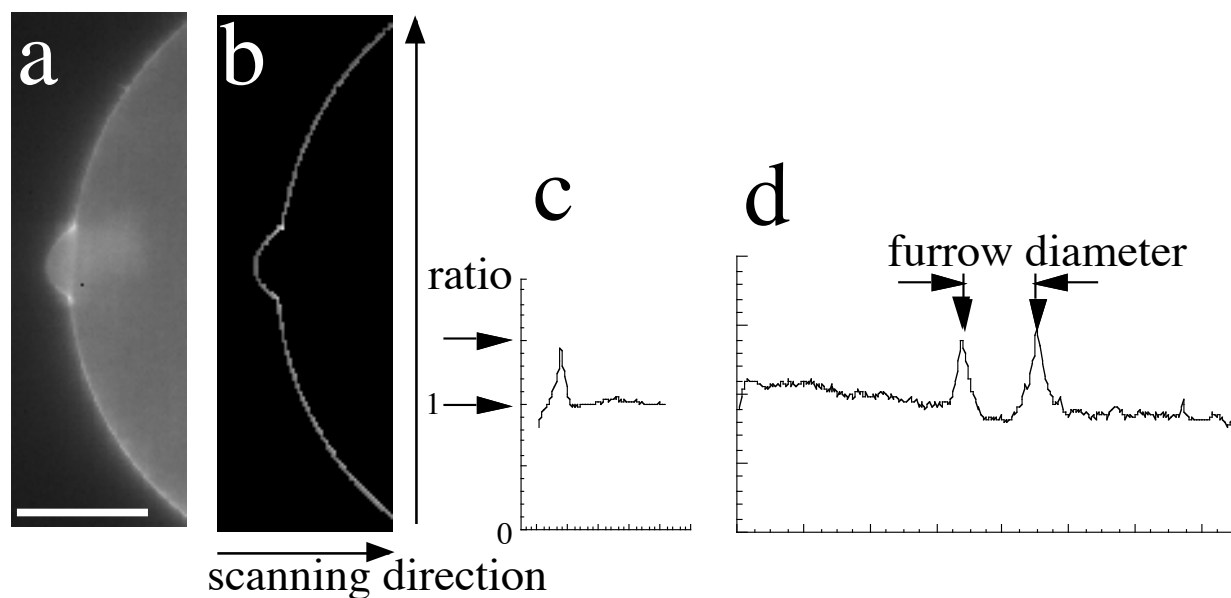


図6-2 Method IIを適用した蛍光強度と分裂溝直径測定法

(a)は高倍率で取り込んだ動物極の蛍光像を示す。(b)は画像(a)から卵母細胞の輪郭を幅1.4 μm で抽出した像を示す。(c)は画像(b)の動植物極軸に沿った方向(画像の左から右方向)にスキャンした蛍光比分布(ratio)を示す。(d)は画像(b)の垂直方向(下から上方向)にスキャンした蛍光比分布を示す。ピーク(矢印)間の距離を分裂溝直径(furrow diameter)として測定した。スケールバー: 20 μm (文献22から引用)

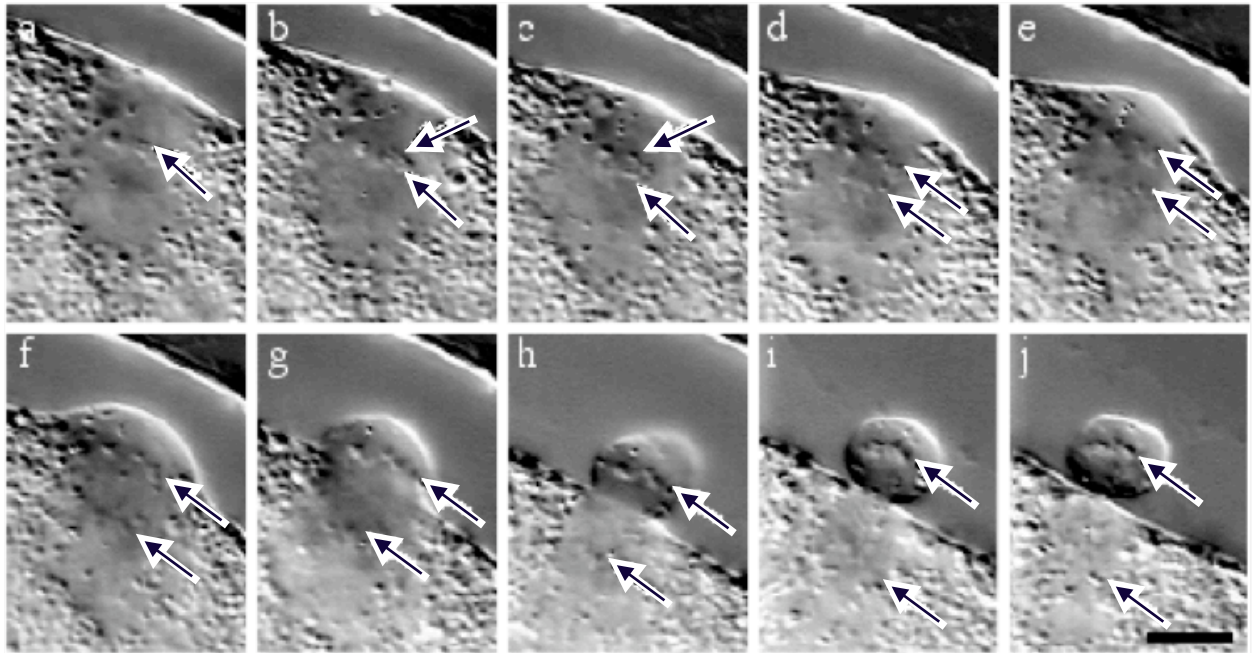


図6-3 高倍率の極体成時の動物極付近の形態変化と染色体の動態

高倍率で観察したヒトデ卵母細胞の極体形成時の動物極表層の形態変化と染色体の動態を示した。(a-j)は1-MeAde処理後46分から40秒間隔で撮影した顕微鏡像を示す。上方が動物極、矢印は染色体を示す。スケールバー：10 μm (文献22から引用)

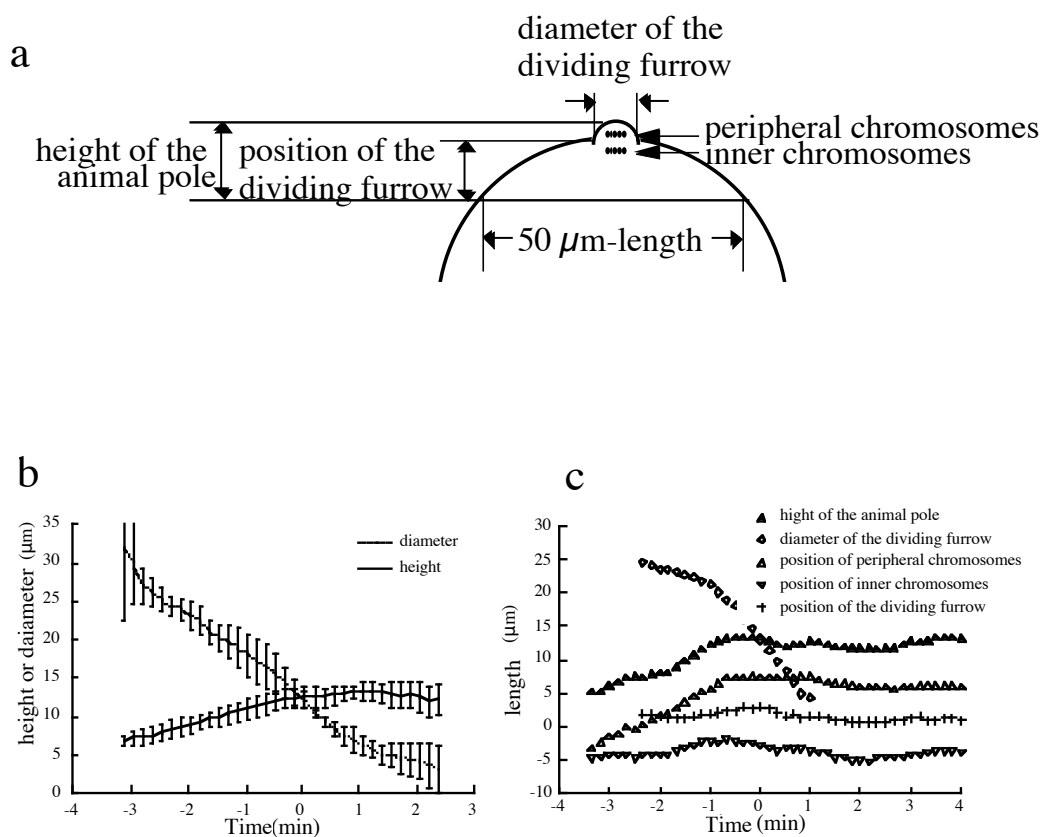


図6-4 極体形成時の形態変化

(a)は形態変化から極体形成ステージの指標を検討した。動植物軸に垂直に50 μm に弦をとる。動物極の高さは弦から動物極頂点までの距離、分裂溝の直径、弦から分裂溝までの距離、それぞれの染色体から表層までの距離をそれぞれ示す。(b)は動物極の高さと分裂溝の直径の8個のサンプルの平均値を表した。横軸は分裂溝の直径が12 μm になった時間を0分として表示した。

(c)は動物極の高さ、分裂溝の直径、分裂溝の位置、それぞれの染色体から表層までの距離の時間変化を示した。(文献22から引用)

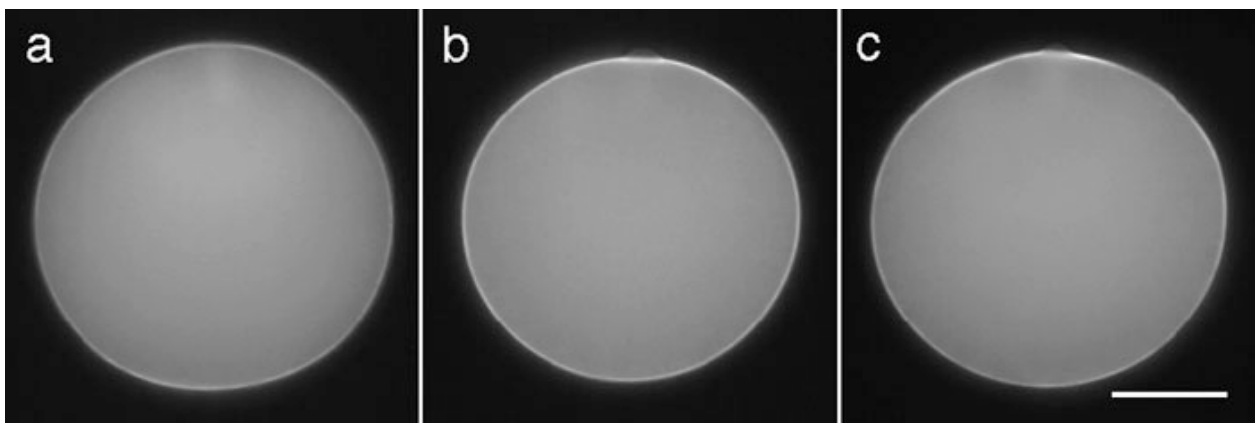


図6-5 低倍率での極体形成時の蛍光像

1-MeAde処理から(a)54分、(b)60分、および(c)63分後のヒトデ卵母細胞の低倍率の蛍光像を示した。各像は上方が動物極を示す。動物極表層が明るい。スケールバー：50 μm (文献22から引用)

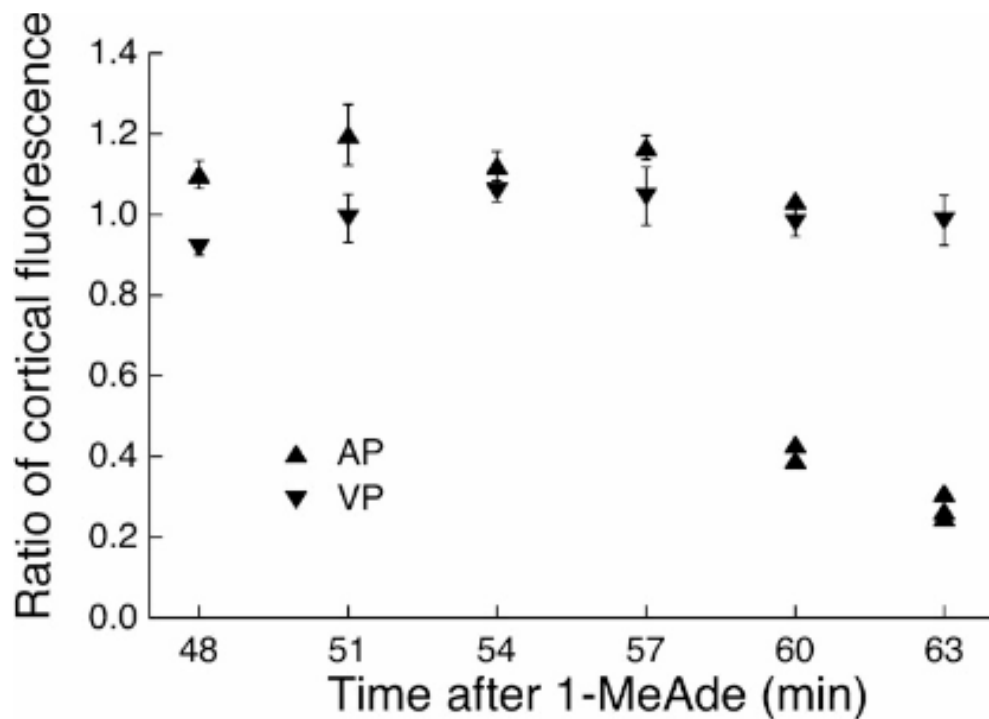


図6-6 1-MeAde処理後の赤道表層と動物極(AP)、植物極(VP)表層の蛍光強度比

植物極の蛍光強度は1-MeAde処理後48分から63分の間で1を示した。動物極の蛍光強度は1-MeAde処理後60分からすべての卵母細胞でそれぞれ減少した。それらの卵母細胞では、動物極で膨らみが見られた。横軸は1-MeAde処理後の時間(分)、縦軸は蛍光強度比を表した。(文献22から引用)

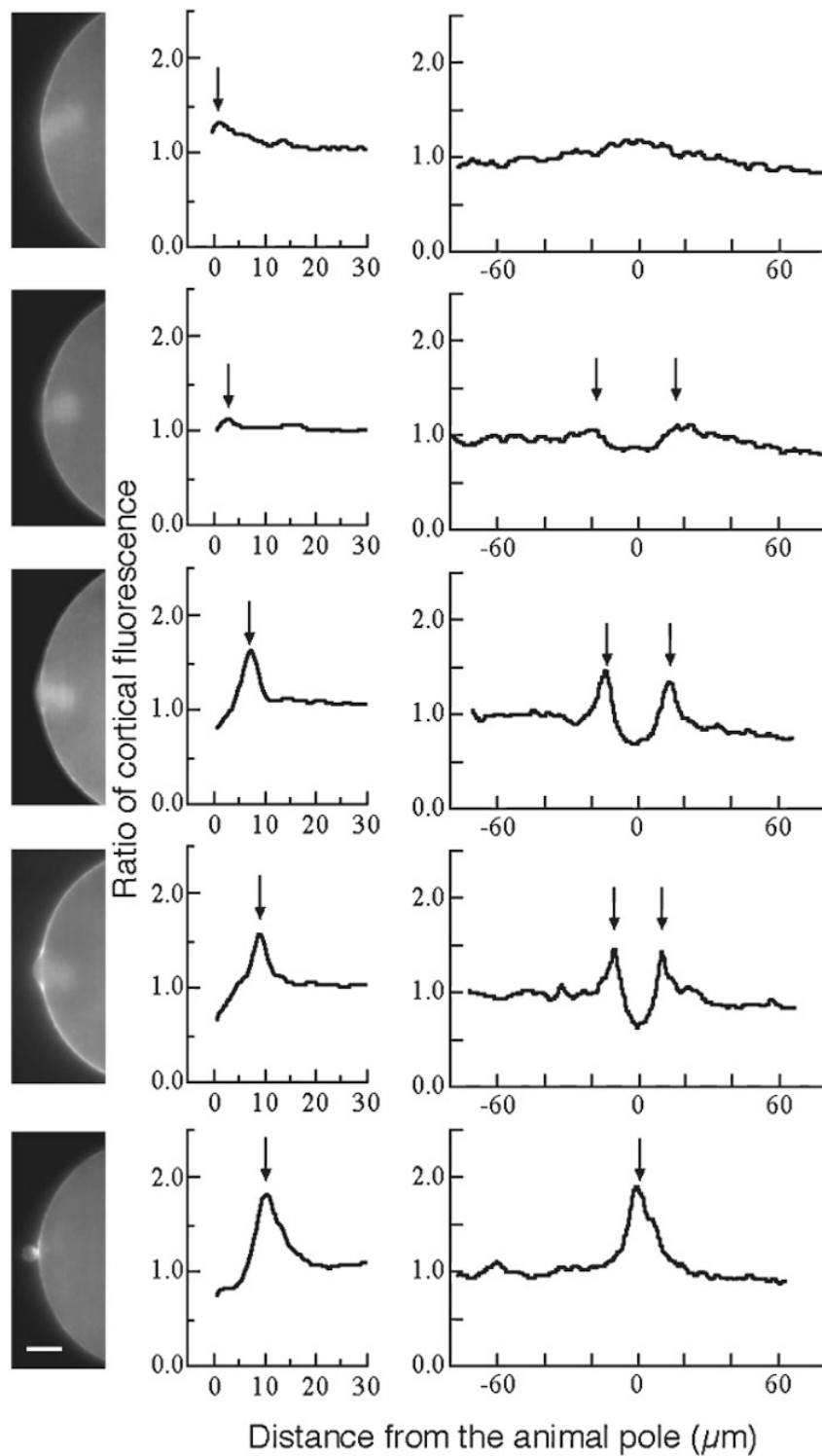


図6-7 分裂溝の蛍光強度比と分裂溝直径

左列は極体形成順に並べた蛍光像を示す。中央列は動植物軸に沿って測定した蛍光強度を示した。右列は動植物軸に垂直測定した蛍光強度を示した。図中矢印は蛍光強度のピークを示す。スケールバー：20 μm （文献22から引用）

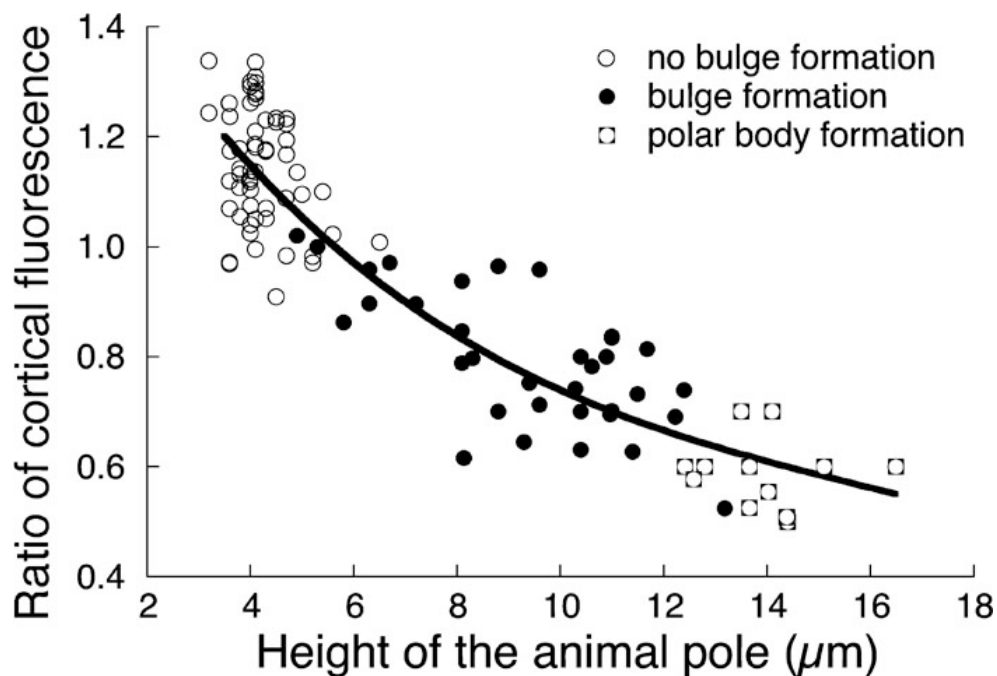


図6-8 動物極表層の蛍光強度比と動物極の高さとの関係

図中の白丸は動物極の膨らみが観察されなかった卵母細胞を示す。図中の黒丸は動物極の膨らみが観察された卵母細胞を示す。図中の角丸は膨らみの元が収縮を始めた卵母細胞を示す。横軸は動物極の高さ、縦軸は蛍光強度比を示す。動物極の高さの増加が図4-bに示すように極体形成過程を示す。（文献22から引用）

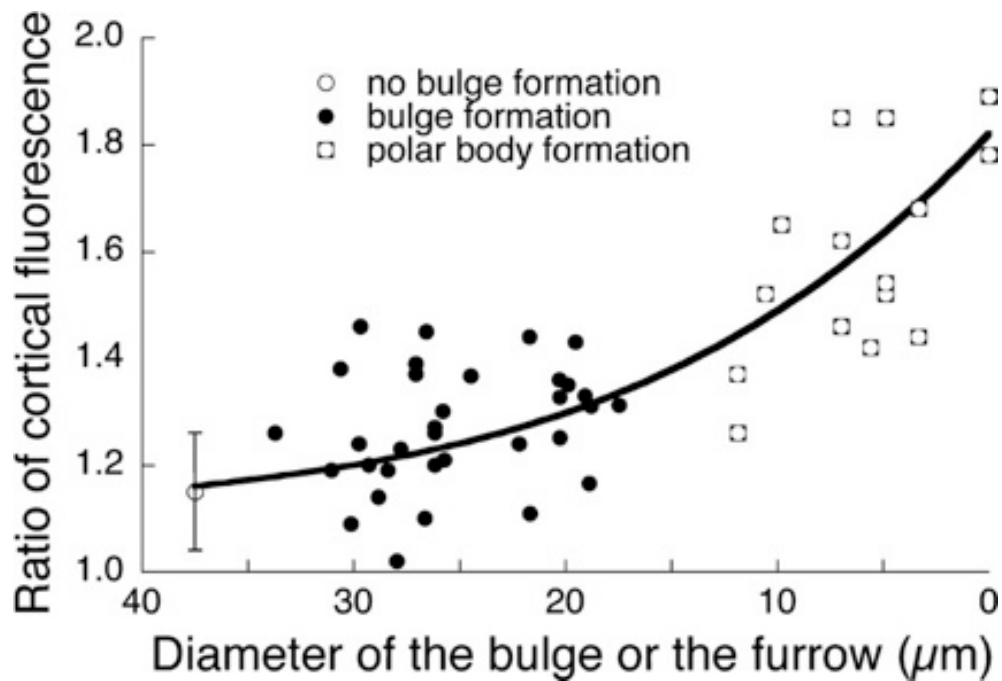


図6-9 分裂溝の蛍光強度比と膨らみ、または分裂溝直径の関係

図中の白丸は動物極の膨らみが観察されなかった卵母細胞を示すが、この場合、直径の測定は不可能だった。図中の黒丸は動物極の膨らみが観察された卵母細胞を示す。図中の角丸は膨らみの元が収縮を始めた卵母細胞を示す。横軸は分裂溝の直径、縦軸は蛍光強度比を表した。分裂溝の減少が図4-bに示すように極体形成過程を示す。（文献22から引用）

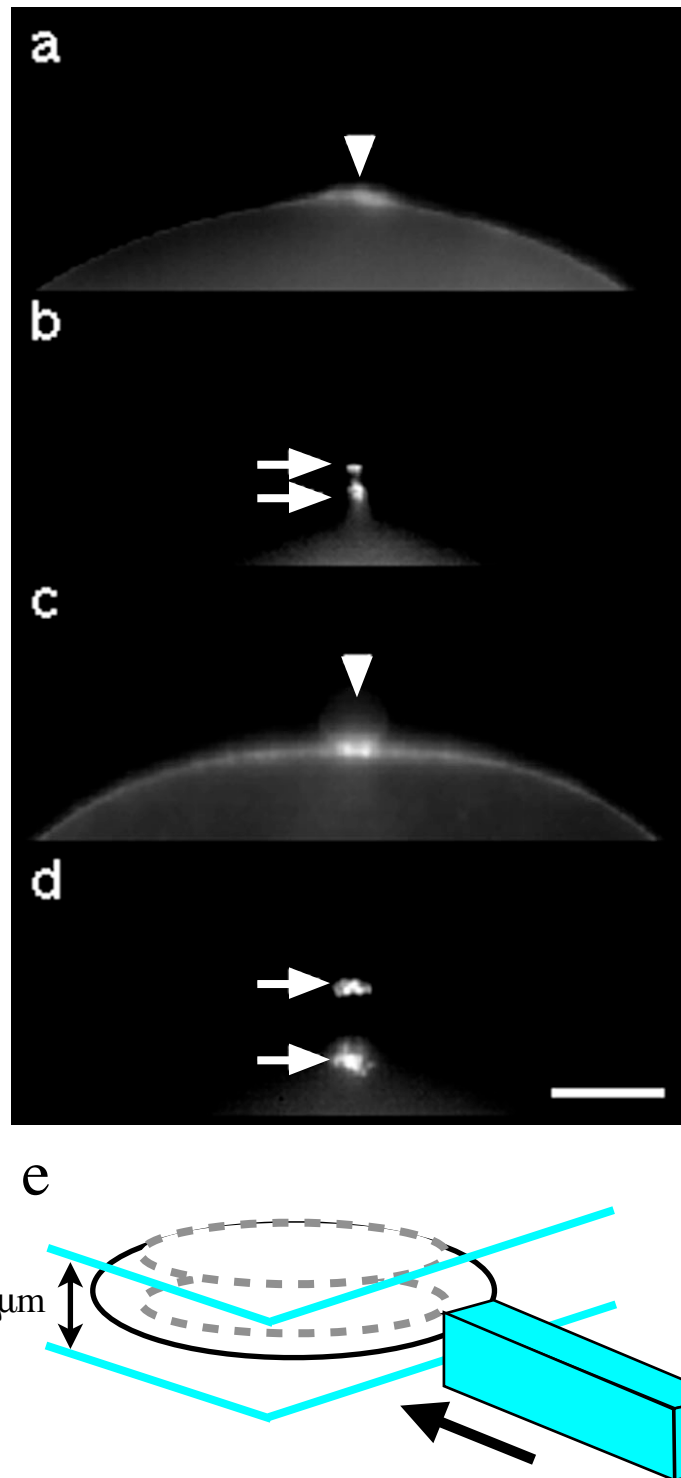


図6-10 動物極を圧迫した時の極体形成阻害

(a, b)は動物極表層をカバーガラス片で押えることによって極体形成を阻害したときの蛍光像を示す。(c, d)は未処理で第一極体形成時の蛍光像を示す。(a, c)は蛍光アクチン像、(b, d)は染色体像を示す。(e)は阻害方法を示す。図中の矢尻は動物極を、矢印は染色体を示す。スケールバー：20 μm (文献22から引用)

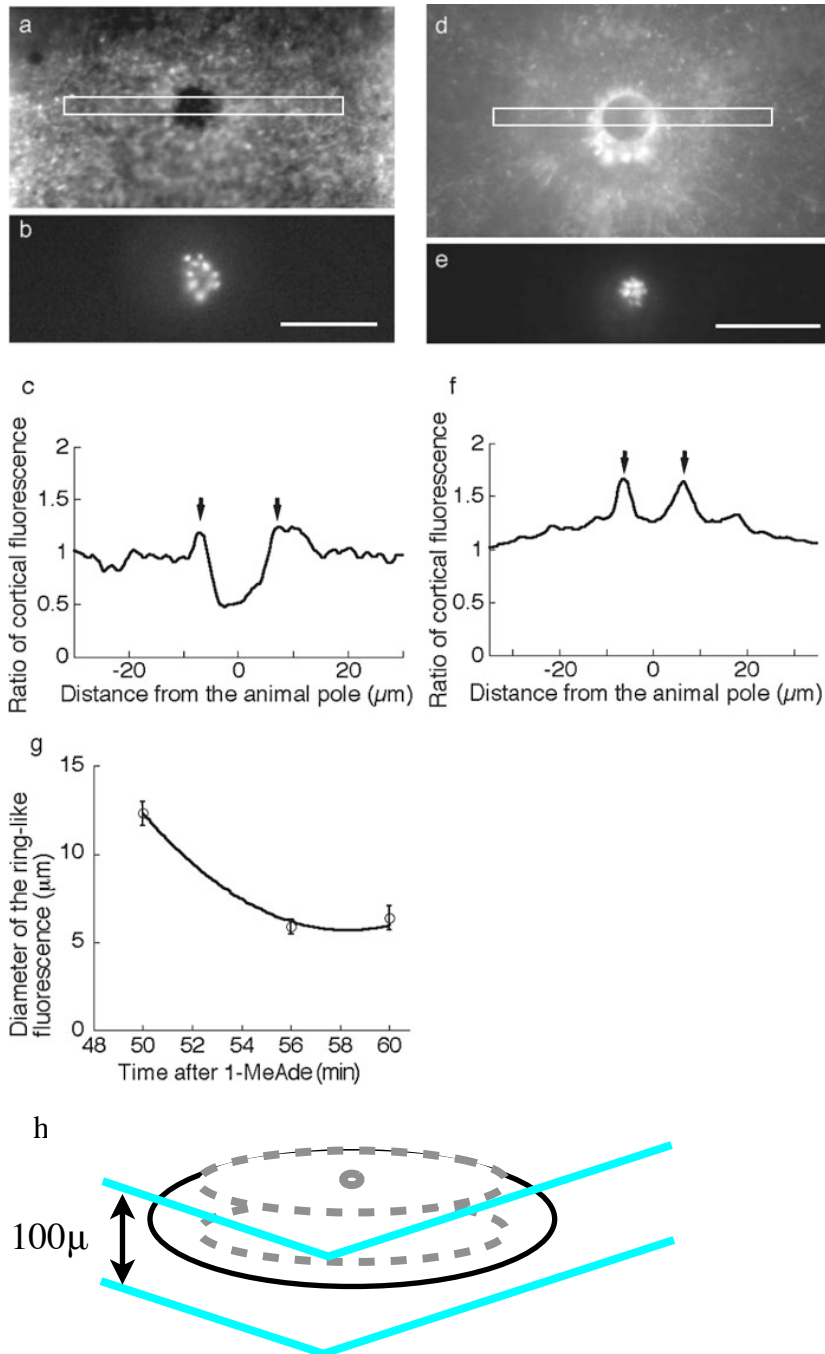


図6-11 動植物軸を圧迫した時の極体形成阻害

(a, b, d, e)は100 μm の厚さのくさびに卵母細胞を入れ、カバーガラス面に動物極が接し、動植物軸に対して圧迫し極体形成を阻害したときの画像（細胞は顕微鏡の光軸と動植物軸が平行）を示した。(a, d)は蛍光アクチン像、(b, e)は染色体像を示す。(c, f)は(a, d)における長方形領域の平均の蛍光強度を示した。これらの2つの最大蛍光強度間の距離（2個の矢印間の距離）の時間変化を(g)に示した。この距離は(a, d)で見られる収縮環様構造の直径に相当する。(h)は阻害方法を示す。スケールバー：20 μm （文献22から引用）

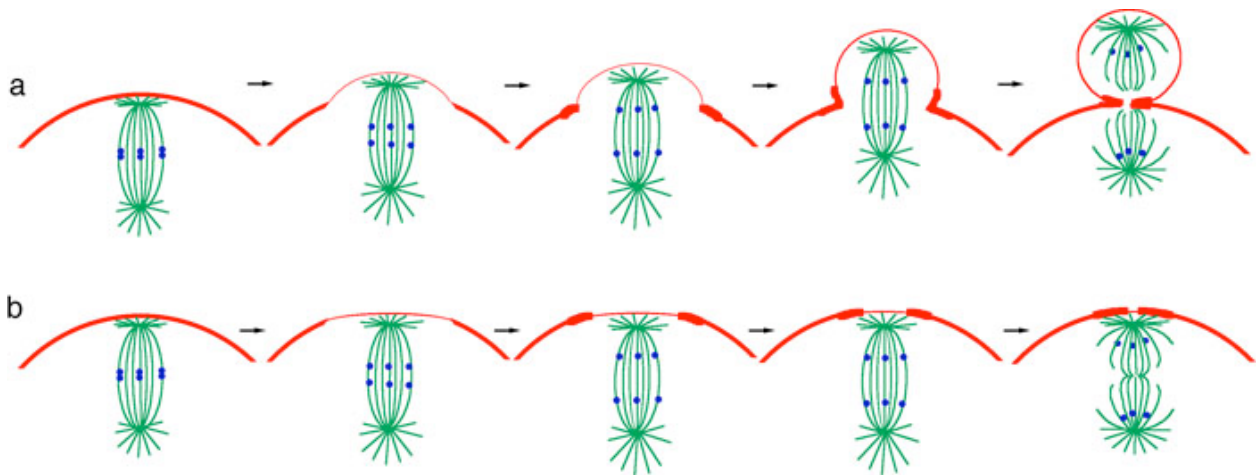


図6-12 極体形成時の卵母細胞における形態変化と表層のアクチン分布の模式図

表層のアクチン量を赤い線の太さの違いによって表した。また、表層の変化が後期染色体移動と同時に起こるので、分裂装置を一緒に示した。染色体を青丸、微小管は緑の線で示した。(a)は通常 of 極体形成を示す。後期の開始直後に、アクチンは動物極で減少すると同時に膨らみの元に現れる。そして、表層のアクチンは膨らみの元だけで増加し、膨らみの高さが増加するにつれて膨らみの元は収縮して、最終的に極体をくびり切る。収縮の間、膨らみまたは動物極頂点のアクチンは減少し、膨らみの元のアクチンは増加する。(b)は極体形成の阻害を示す。後期が開始して、動物極頂点からアクチンが減少しても膨らみは見られない。表層に円状に集積したアクチン直径は減少した。(文献22から引用)

第7章 イトマキヒトデ卵母細胞における極体形成時の張力の変化

7-1 はじめに

前章までに、細胞分裂時に役割を担う分裂装置を構成する、微小管、表層におけるアクチン繊維の定量を行ってきたことを示した(22)。細胞分裂は表層、細胞質、紡錘体、染色体等の様々な構造のダイナミックな変化と分子の移動を伴って進み、この様々な構造変化と分子の移動が細胞の形態変化を引き起こすと考えられている(20)。

イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)の卵母細胞は減数分裂のときに、染色体数を半分に減らす。この減数分裂過程を経て、卵母細胞は1個の卵を形成する。前章までのことから、極体形成は微小管(63 64)およびアクチン繊維の集積分布が変わることにより細胞表層の張力の変化が生まれ、その結果、極体が形成されるのではないかと考えた。そこで本章に示す実験では、極体形成の機構を明確にするためにスプライン関数(31)を用いたプログラムを作成し、分裂過程の卵母細胞の形態から細胞表層の張力変化を測定した。そして、これらの結果から細胞表層の張力とアクチン繊維量との関係を考察した。

7-2 結果

7-2-1 卵母細胞全体の張力の変化

イトマキヒトデ卵母細胞の全体像を低解像度、640×480 pixel、1.98 pixel/μmで取り込んだ(図7-1A, 図7-3)。これらの画像から、極体の部分を除き、独自に作成したNIH-Imageのマクロプログラムで細胞の輪郭を抽出し(図7-1B)、重心からの角度と半径に数値化した(図7-1C)。その後、動-植物軸対称(平均化/回転対称体)(30)にした。得られた輪郭をスプライン関数に当てはめ、計算式を使って卵全体表層の張力を得た(図7-1D)。スプライン関数は、独自に作成した4次元B-スプライン関数プログラムをMathematica上で以下の計算式を使って計算し、細胞全体の表層の張力を得た。

$$T1 = P \cdot R2 / 2、$$

$$T2 = [P \cdot R2 (2 - R2/R1)] / 2、$$

T1 = 卵の経度方向の張力、T2 = 卵の緯度方向の張力、

P(内圧) = 1、R1, R2 = 主曲率半径

卵巣から取り出した卵母細胞は、1-MeAde処理をした直後は球状をしている。動物極が膨らむ1分前を0分とすると、極体形成過程において、動物極の細胞表層で極体形成のための膨らみが始まる8分前は動植物軸方向につぶれていた。動物極で膨らみが始まる0分には球状に戻り、分裂溝の陥入が始まった4分後には再び動植物軸方向につぶれ、膨らみを極体としてくぶり切り、6分後には球状に戻った(図7-3)。

低解像度の画像からは動物極の膨らみを除いて、極体形成過程の卵母細胞の形態変化をB-スプライン関数に当てはめ、張力を求めた(図7-1D)。それぞれの画像から動物極、植物極付近の経度方向(T1)、動物極と植物極の中間位置(赤道)の経度方向(T1)と緯度方向(T2)(図1-7)の張力の和の時間変化をグラフに示した(図7-4)。膨らみが始まる8分前には動物極付近の張力が植物極付近より大きく、その後、6分から1分後までは動物極付近の張力は植物極付近より小さくなった。動物極の張力は極体形成のための膨らみが始まってから4分後には膨らみが始まる前の2倍にまで増加した。植物極での張力は動物極の増加に前後してわずかではあるが増加した。赤道では極体形成過程において、張力はほとんど変化しなかった。

7-2-2 動物極の張力の変化

光学顕微鏡(OPTIHOT-2, Nikon Co. Tokyo, Japan)を介して、 1024×1020 pixel、 4.49 pixel/ μm の画像(高解像度)をカメラ(xillix MicroImager)、画像解析ソフトIP Lab (Scanalytics)を使ってコンピュータに取り込んだ(図7-2A)。低解像度の画像解析と同様に、細胞の輪郭を抽出し、角度と半径に数値化し(図7-2B)、動-植物軸対称にした後、張力を求め、不等分裂が見られる動物半球の張力を得た(図7-2C)。動物極付近の詳細な張力から、動-植物軸に直角に $100 \mu\text{m}$ の弦を張り、その位置の張力に対する張力比を求めた(図7-5)。

動物極頂点で経度方向と緯度方向の両方向の張力が膨らみが始まる前から減少し、膨らみが始まった1分後には0に近くになった。一方、極体形成の膨らみの元で両方向の張力が増加した。膨らみの元での張力の最大値は、膨らみが始まった頃から増加した。この両端の張力の最大値間の距離は膨らみが始まる1.5分前まで減少し、その後、膨らみが始まってから0.5分まで増加した。その0.5分後には分裂溝の位置が決定し、分裂溝での張力が増加した。

7-3 考察

スプライン関数を用いると、複雑な形（卵母細胞外形）を滑らかな曲線に近似することができる。本実験では、数あるスプライン関数の中でも、張力を求めるため、2次微分係数が滑らかな4次元B-スプライン関数を用いた(31)。しかしながら、卵全体の変形と極体形成時の局所的な変形が同時に解析できないため、2種類の精度で解析した。卵母細胞全体の解析では、極体形成による動物極の変形を無視した。動物極付近の解析には高解像の像を使用し、極体形成による変形の解析を行った。しかしながら、精度を上げると、動植物極の垂直方向（緯度方向）の張力(T_2)に、周期的な誤差が混入した。ヒトデ卵の極体形成には卵母細胞形の大きな形態変化と張力の変化を伴うことがすでに報告されている(16)。この実験では極体形成の膨らみが形成される前に植物極での張力が動物極より高く、次に動物極で高くなった。膨らみが形成されると動物極頂点での張力は減少し、膨らみの元での張力が増加し、局所的な不等分裂も卵母細胞全体の張力の変化があることが分かった。

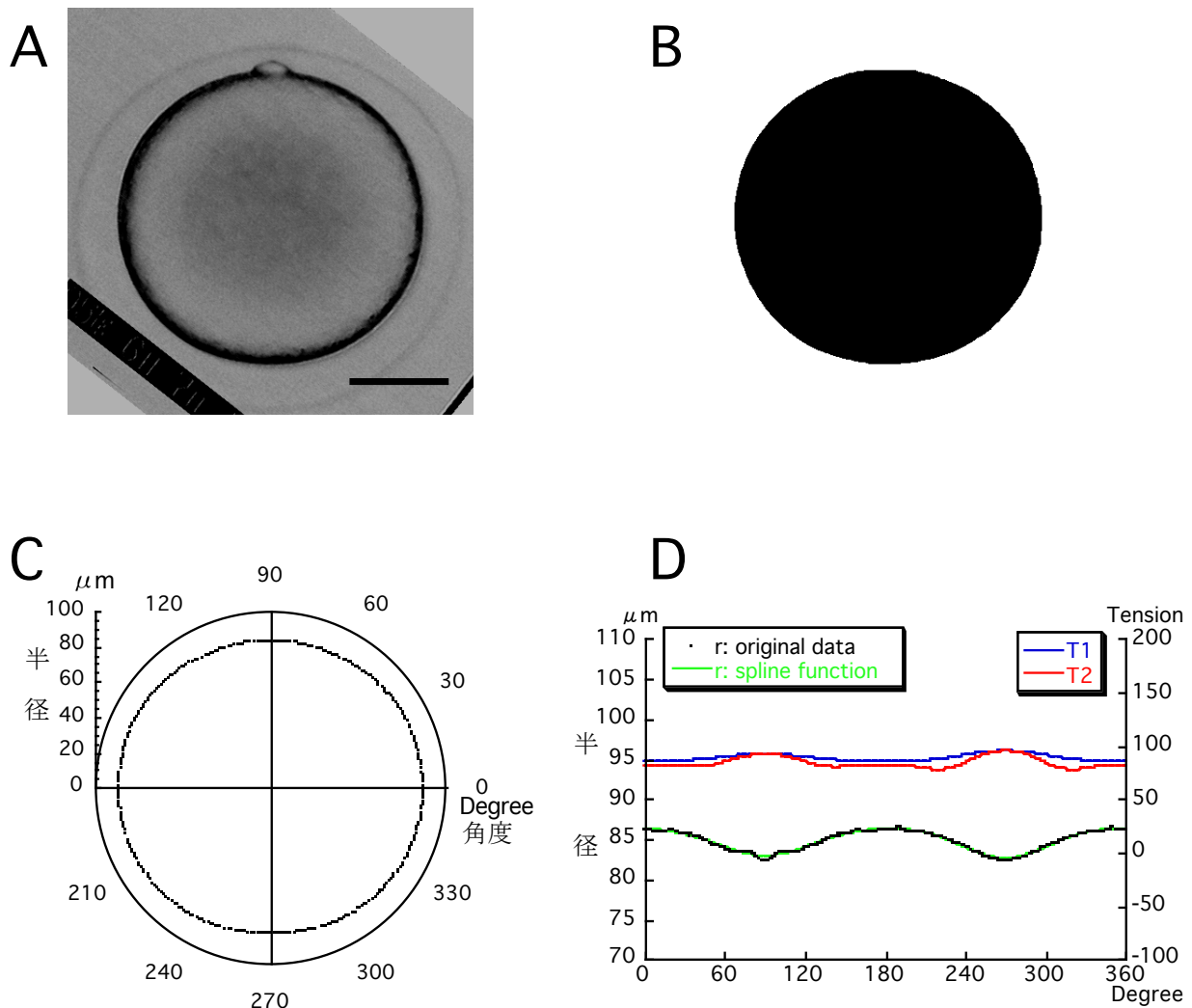


図7-1 低解像のデジタル画像からの張力の測定法

(A)はコンピュータに低解像度で取り込んだ極体形成のときの卵母細胞の全体デジタル画像を示した。(B)は画像Aの輪郭だけを抽出し、画像重心を求めるために、その内部を黒塗りにした画像を示す。(C)は画像Bを重心からの角度と半径に数値化し、その後、動-植物軸対象にして極グラフで表した。(D)は(C)の極グラフの数値から、計算式を使って得た卵全体の表層の張力 (T1, T2) を表した。スケールバー : 50 μm

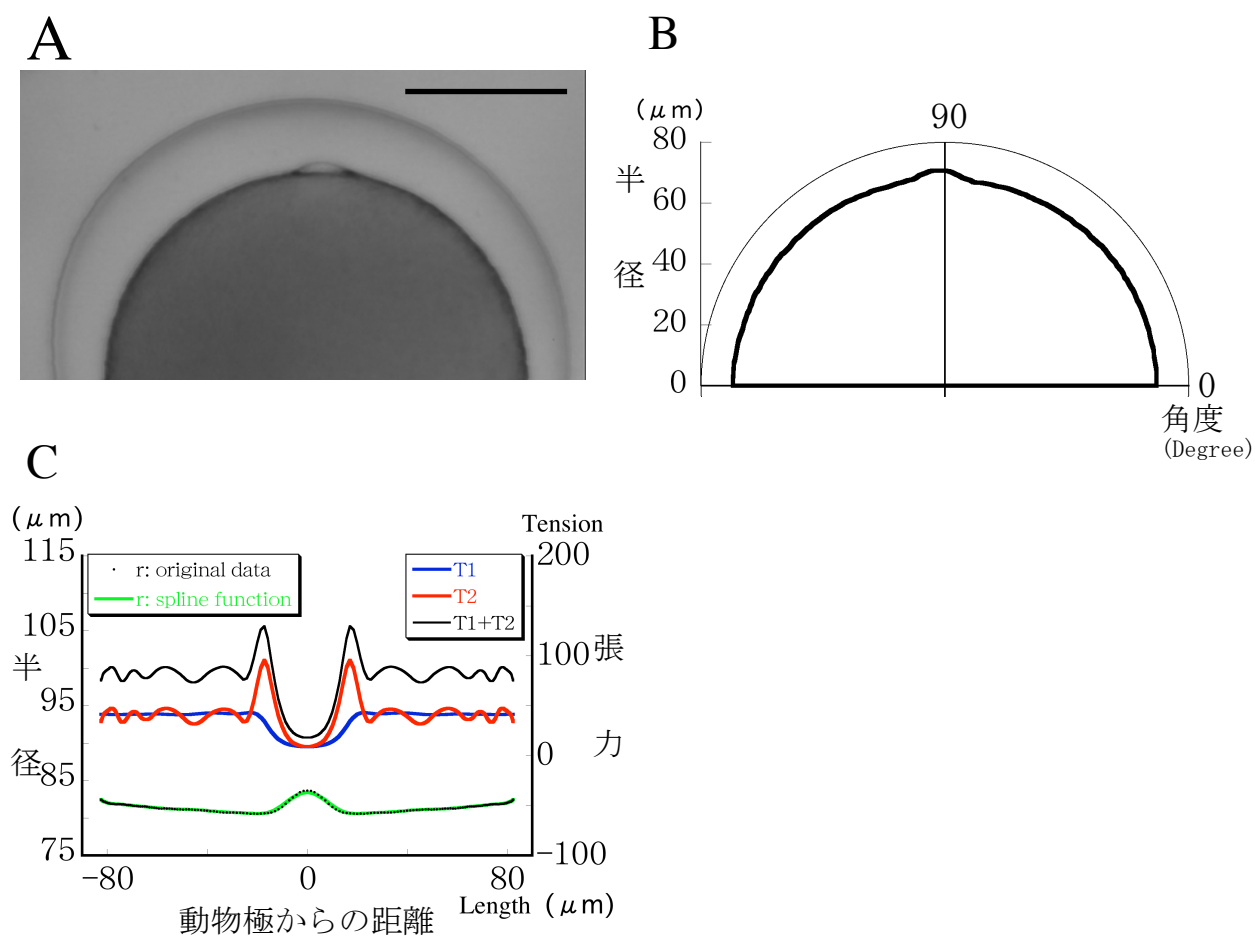


図7-2 高解像のデジタル画像からの張力の測定法

(A)はコンピュータに高解像度で取り込んだ極体形成のときの卵母細胞の動物半球のデジタル画像を示す。(B)は画像Aの輪郭だけを抽出し、画像重心からの角度と半径に数値化し、その後、動-植物軸対象にして極グラフで表した。(C)は(B)の極グラフの数値から、計算式を使って得た卵母細胞の動物半球の表層の張力 (T_1 , T_2 , $T_1 + T_2$) を表した。スケールバー : $50 \mu\text{m}$

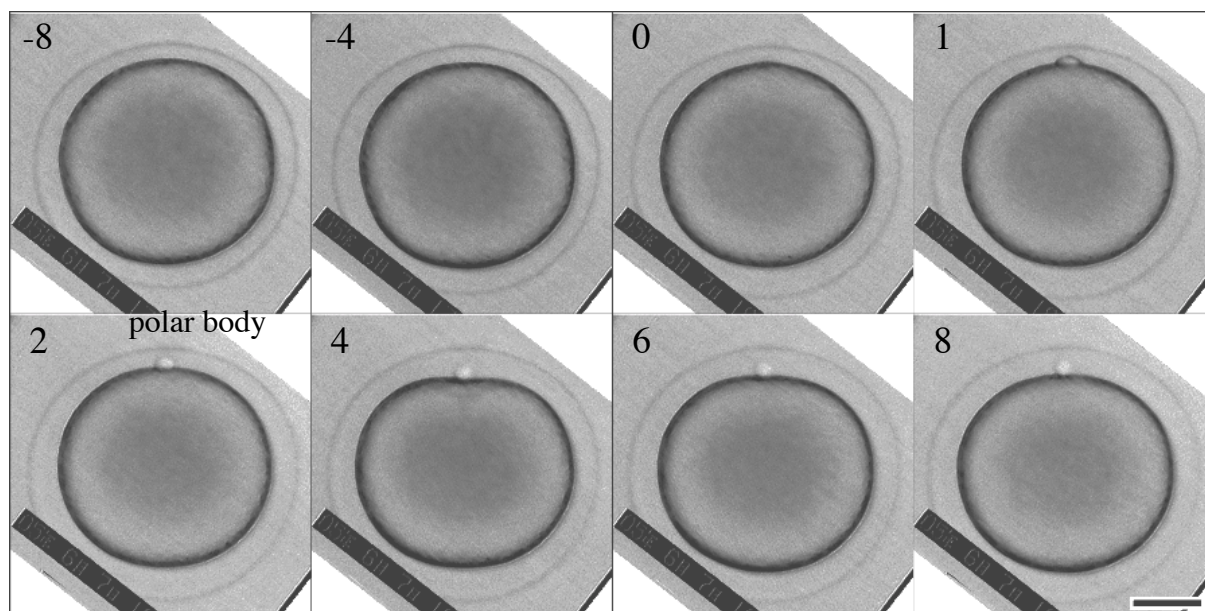


図7-3 低解像度で撮影したときの極体形成

低解像度でコンピュータに取り込んだ極体形成の時の卵母細胞全体のデジタル画像を示した。各図の左上の数字は、動物極が膨らむ前を0とした経過時間（分）を表している。スケールバー：50 μm

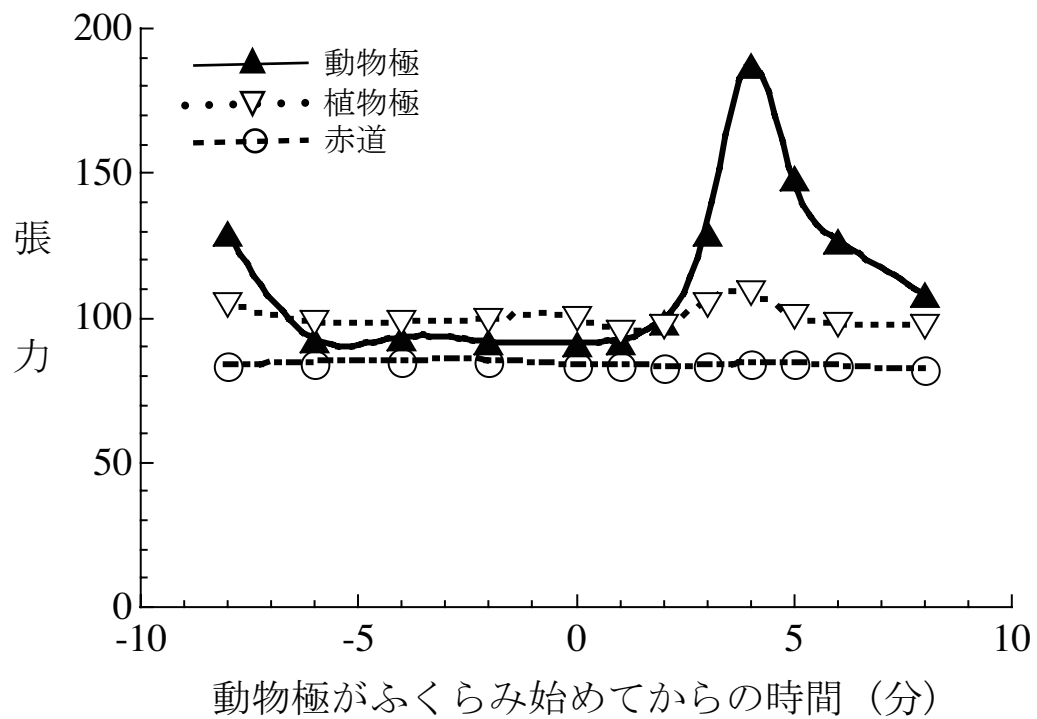


図7-4 動植物極と赤道の張力

低解像度のデジタル画像（図7-3）から求めた、極体形成時の動物極(animal pole)、植物極(vegetal pole)の経度方向、動物極と植物極の中間位置（赤道、equator）での経度方向と緯度方向の張力の和の変化を示す。横軸は極体形成が始まってからの時間（分）を、縦軸は張力を表示した。

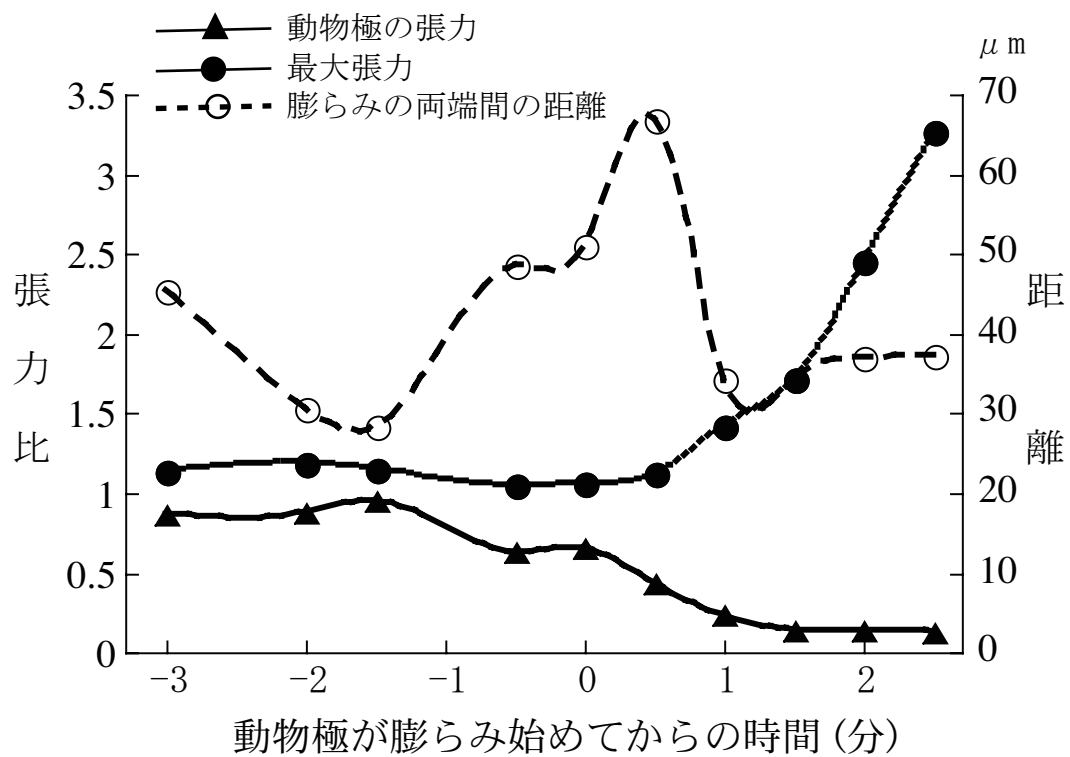


図7-5 動物極の張力

高解像度のデジタル画像から求めた、動物極付近の張力の変化を示す。左縦軸は動物極頂点での経度方向と緯度方向の張力の和と極体形成の膨らみの元での張力の和を赤道における張力の和に対する比で示し、右縦軸は膨らみの両端の間の距離を示す。横軸は膨らみが始まってからの時間（分）を示す。

第8章 不等分裂のまとめと均等分裂との比較、および今後の展望

8-1 はじめに

これまでにウニ卵を使った均等分裂機構の解析と、イトマキヒトデ卵母細胞を使って極端な不等分裂機構について解析してきた。この章では、不等分裂にかかわる分裂装置、アクチン繊維、張力についてまとめる。その後均等分裂との比較を行う。さらに、今後の展望について述べる。

8-2 不等分裂時の分裂装置とアクチン繊維

ヒトデ (*Asterina pectinifera*) 卵母細胞の極体形成時に卵核胞崩壊完了後に染色体が表層近くに集合し、それを挟むように紡錘体が動物極表層に垂直に構築された。染色体が中期に進んだとき、分裂装置は表層に接着し、表層側の半紡錘体の微小管量は内側より多くなった。表層側の星状体は先端が切られた様に平らな状態で表層に接着し、広がらなかった。内側の星状体は卵母細胞内に扇状に広がり、星状体も非対称を示した。卵を遠心することにより分裂装置の表層への接着を阻害すると分裂装置は非対称を示すことなく極体形成が阻害された。このことから、極体形成には分裂装置の表層への接着が必要で、接着することにより分裂装置の非対称性が生じ、不等分裂をして極体が形成されることがわかった。

表層アクチンは中期前に植物極に一端集積し、極体形成の膨らみの前に動物極に集積した。染色体が分離し、極体の膨らみが形成されると、動物極頂点からアクチンは消失した。分裂装置は動物極頂点の直下に存在し、アクチンが消失した表層の膨らみの中へ進入した。一方、分裂溝の位置にアクチンは集積し、その後分離した染色体群の間に収縮環を形成して極体をくぶり切った(22)。

極端な不等分裂には微小管とアクチン分布の変化が巧みにかかわっていることが示唆される。

8-3 不等分裂時の張力の変化

卵母細胞は1-MeAde処理直後は球状をしていて卵全体の張力は一定だった。その後、卵核胞崩壊が起こり、動物極で膨らみが始まる前、動物極の張力が一旦大きくなり、その後、植物極で大きくなった。動物極で極体形成の膨らみが始まってから動物極の張力は増加し

た。植物極での張力もわずかではあるが増加した。不等分裂は動物極の局所で生じる現象ではあるが、対極の植物極での張力の変化も伴うことが分かった。動物極と植物極の中間位置の赤道での張力はほとんど変化しなかった。動物極での変化を詳細に見ると、動物極頂点で経度と緯度の両方向の張力は極体の膨らみが始まる前から減少を始めた。膨らみの元、分裂溝の位置での張力は増加し、収縮環となって収縮しながら更に増加を続けた。

8-4 張力とアクチン分布

細胞の均等分裂において、分裂溝の局所的な張力の変化だけではなく、細胞全体の張力の変化を伴うことが分かってきている。局所的な不等分裂によって極体を形成するイトマキヒトデで卵母細胞の形態は大きく変化し、このときの張力の変化も動物極にとどまらず対極の植物極での変化を捕らえることができた。張力を発生すると考えられる表層アクチン分布の変化と比較した。

不等分裂の高解像度の画像から得られた張力を、極体形成過程の動物極付近での張力の和 ($T1+T2$) の変化を卵母細胞の動物極の高さ 20 μm (膨らみを除く) の範囲を Adobe Illustrator で 3次元疑似カラーを付けて 3D で示した (図8-1)。これらの像から、動物極での膨らみが始まる 3 分前には動物極領域の張力比は 1 以上を示す黄色だったが、1 分前には極体になるわずかな表層で 1 以下の緑色になった。動物極の膨らみが始まる直前の 0 分では動物極付近の張力は広範囲でさらに減少し、青になった。膨らみが始まって、1 分後には動物極の分裂溝位置で張力の増加が始まった。さらに動物極で、膨らみが大きくなると、頂点部分の張力はさらに減少し、分裂溝位置での張力比が 3 を示す赤にまで増加した。また、第 6 章で得られた極体形成時の収縮にかかわるアクチン分布も張力と同様に Adobe Illustrator で 3次元疑似カラー表示を行い、時間変化をみた (図8-2)。アクチン分布は張力と同様に膨らみが始まる前、動物極付近で増加したが、膨らみの増加とともに極でのアクチン量は減少した。分裂溝形成の位置では膨らみがみられる前から増加が始まった。アクチンと張力の増加は極体側より卵母細胞側で見られた。図8-1と図8-2から収縮環のアクチン量より張力が高いのはアクチン繊維が平行 (95) になっているために、量と比較して張力が増加すると考えられる。また、ミオシンの蛍光抗体染色 (42) が分裂溝に集積していることからアクチン量に比例する以上のミオシンが集積し、張力を出していることも示唆される。

8-5 星状体微小管の役割

脊椎動物では中心体がないことから星状体の役割を無視できるが、ヒトデ卵母細胞では小さいながら星状体が存在することから星状体微小管の役割も考える必要がある。線虫では大小の星状体を持つ分裂装置が形成され、星状体の大きさに伴った不等分裂がおきる例もあるが、ヒトデ卵母細胞の極体形成時の内側の星状体は非常に小さいので分裂装置を極体の中に押し込む力を発生する可能性は少ないと考える。近年はむしろ、Gタンパク質 cdc42が 動物極頂点のアクチンを減らし表層を柔らかくして分裂装置が入り込む説が有力になってきている(2)。また、動物極頂点の膨らみを微小管が形作っている可能性も考えられるが、微小管の直線的特性から表層の膨らみの曲線を作る力を出すことはできない。更に、微小管安定剤のヘキシレングリコールを処理し微小管を安定化させると微小管の直線性が強くなり、極体は肥大化する(60)ことから微小管が極体の膨らみを形作っているとは考えられない(図8-3A)。むしろ、星状体微小管の役割は表層に対して突っ張り、紡錘体の赤道面に収縮溝を形成して分裂させるという役割があるように考えられる(根本、上村：動物学会、2011)(図8-3B)。ウニ卵でサイトカラシンBを作用させて表層アクチンの重合を阻害すると、細胞が極方向に伸長することが観察された(佐々木：修士論文)ことから、微小管が表層に作用していることも考えられたが、微小管の出す力はアクチンに比べて非常に小さいことも示唆される。しかしながら、微小管の働きについては今後の課題である(67)。

8-6 考察

張力の推定に使用した、スプライン関数は複雑な形(外形)を滑らかな曲線で近似することができる関数である。本論文では、数あるスプライン関数の中から、2次微分係数が滑らかな4次元B-スプライン関数を用いた。しかしながら、卵全体の変形と極体形成時の局所的な変形とを同時に解析できないため、それらをそれぞれ別の精度で解析した。卵全体の解析では、極体形成による動物極の変形を無視した。動物極付近の極体形成の解析には精度の高い関数を適用し、成功した。しかしながら、精度が高くなると、動植物極に垂直方向(緯度方向)の張力(T2)には周期的な誤差が混入することから精度を上げることに限界があった。

ヒトデ卵の減数第一分裂時には形態の大きな変化と張力の変化を伴うことが今までに報告されてきた(16)。ウニ卵の均等分裂である第一分裂においての張力の変化は極付近での張力の減少と分裂溝での張力の増加のバランスが重要であることも分かってきた(46)。微小管の観察(63-64)から動物極が膨らむときに、細胞膜の下には分裂装置が存在する。分裂装置は減数第一分裂中期で動物極に一方の極で接着し、動物極から植物極への細胞質の動きに伴って分裂装置を膨らみの中に入れる。その後、分裂装置の赤道面に分裂溝が形成され、半紡錘体と染色体を含む極体を形成した(21)。

染色体の放出を行う減数分裂における極端な不等分裂のときの形態と張力の関係は、以上の観察結果から次のような結論が導かれた。

- 1) 動物極の膨らみが始まって約4分後に張力は動物極周辺で2倍になった。一方、赤道から植物極の域では張力の変化はわずかであった。
- 2) 動物極の膨らみが始まると張力は動物極頂点で減少し、膨らみの元の分裂溝形成位置で著しく増加した。
- 3) 張力の時間変化はアクチン集積の時間変化と類似していた。

8-7 まとめ

ヒトデ卵母細胞は卵核胞崩壊後、細胞質の動きを伴い、大きな形態の変化を行いながら極体を形成する。形態変化は始めに植物極周辺にアクチン繊維が集積することにより細胞表層が収縮し細胞質を動物極へ押し上げる。このときに植物極で張力の増加がみられた。次に動物極へのアクチンの集積に伴って動物極付近の表層で張力の増加がみられ、動物極が収縮し、細胞質を植物極へ押し戻す。その後、動物極頂点からアクチンが消失し、動物極頂点の張力が減少し、細胞表層が柔らかくなることによって膨らみが形成される。さらに分裂溝が形成される位置に集積したアクチンとミオシンの相互作用によって張力が増加し、収縮環が膨らみをくぶり切る。ということがアクチンの定量的解析と張力の推定の双方の結果から推論できた。ただし、ヒトデの極体表面積は他の卵母細胞と比較すると1/2しかないことから、動物極表層の張力は1/20になる必要がある。しかし、本研究ではアクチン量が過大評価されていることが考えられる。というのは実際の動物極頂点の厚さが薄いことが示唆されるからである(全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡による観察 図8-3C)。

ウニ卵の均等分裂(第一分裂)時、染色体は赤道面に並び、分裂装置の星状体は細胞表層に達するまでに伸長する。星状体が細胞表層の赤道域に到達するころ、中心体から等距離にある赤道域でアクチンの集積が始まり、収縮環が形成され、分裂溝が陥入する。このことから星状体と表層の間のシグナルの関与が示唆されている。均等分裂時のアクチン分布は卵が球状から5%の分裂溝陥入まで表層全体で均一だったことが確認できた。その後、分裂溝が10%にまで陥入したとき、赤道域で極表層の1.5倍のアクチンが集積した。収縮環として確認できたのは分裂溝の20%陥入以降だった。このときに赤道域で、10 μm のアクチンの集積幅が観察できた。分裂のミッドステージで、収縮環のアクチン量は極表層の2.5倍になり、分裂溝陥入がさらに進むにつれて徐々に減少した。分裂溝の幅もミッドステージまで増加し、卵の直径100 μm の1/2の40 μm にまで増加し、持続した。一方、極でのアクチン量の変化は無いと考えている。分裂溝の収縮はミッドステージまで増加するが、その後はアクチン繊維の集積は必要とせず、収縮が進行すると考えられた(第5章)。すでにLongo(40)によって表層張力をは極と赤道の張力のバランスが重要との結論を得ているので、以下にイトマキヒトデの不等分裂での結果(第3, 4章、6, 7章、本章)とあわせて考えてみる。

図1-2の模式図に示したように、均等分裂では分裂装置が細胞中央にあり、赤道でアクチン繊維が集積し、張力が増加する。一方、極では星状体の刺激により張力が減少する。分裂装置が卵母細胞表層に星状体によって接着していると、接着している部分でアクチン繊維が減少し、張力も低下し、膨らみができる。次いで、分裂装置がこの膨らみに進入して、その結果、分裂装置の赤道部分にアクチン繊維が集積し、分裂溝となって膨らみ部分をきくびり切る。卵となる部分ではアクチン繊維の集積の変化はわずかで、張力もほぼ一様である。このように、不等分裂では、アクチン繊維分布の変化が極端であるので、今後、さらに不等分裂における張力発生の解析、検討を行っていきたい。その結果、分裂装置と表層の関係が明確になり、均等分裂、不等分裂をまとめて統一的に理解できるようになると期待している。

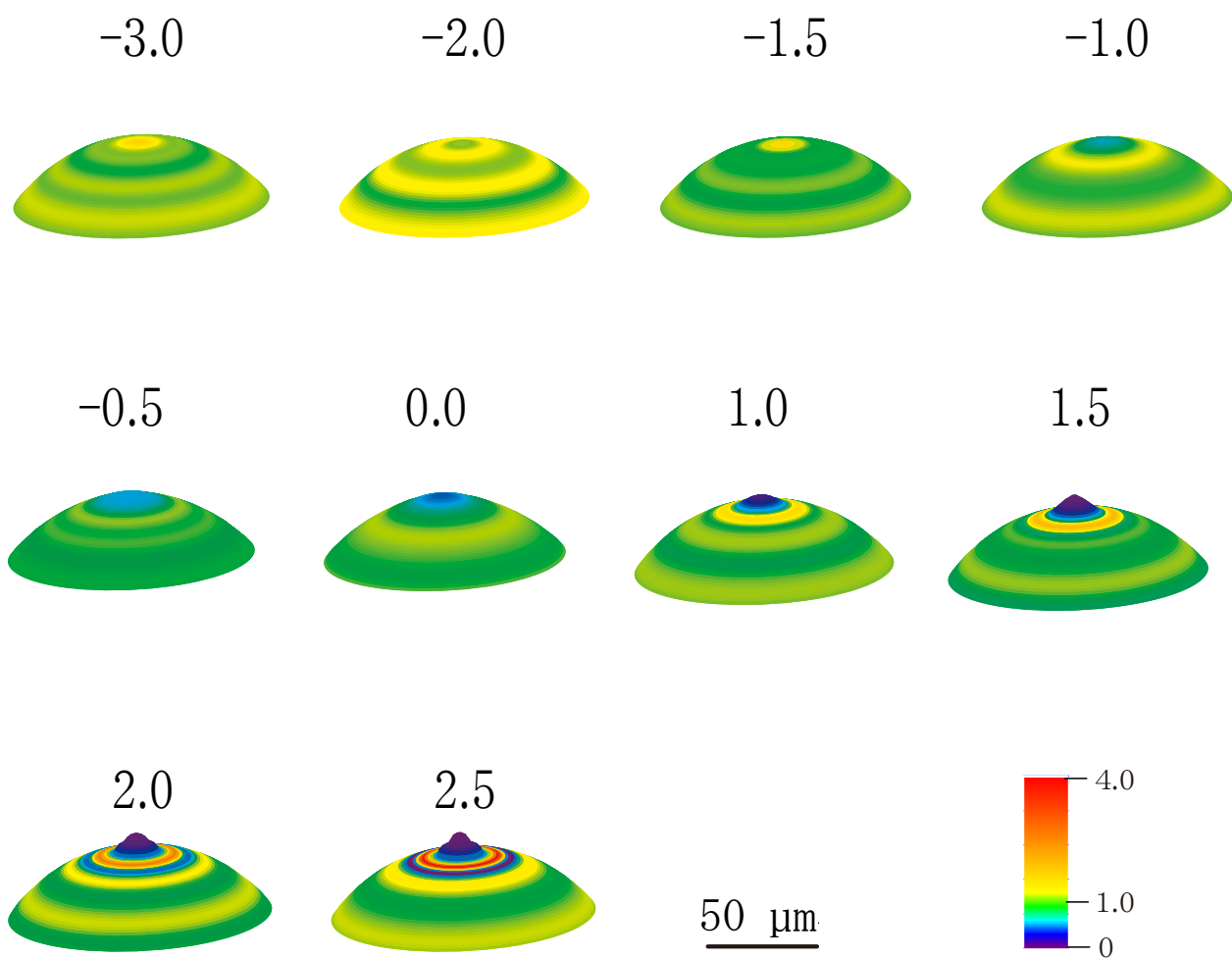


図8-1 動物極の張力の時間変化

動物極の張力比の変化を三次元疑似カラーで表した。図中の数字は膨らみが始まる1分前を0としたときの時間（分）を示す。カラーは張力比が1を黄緑で、4を赤で、0を青で表した。スケールバー：50 μm

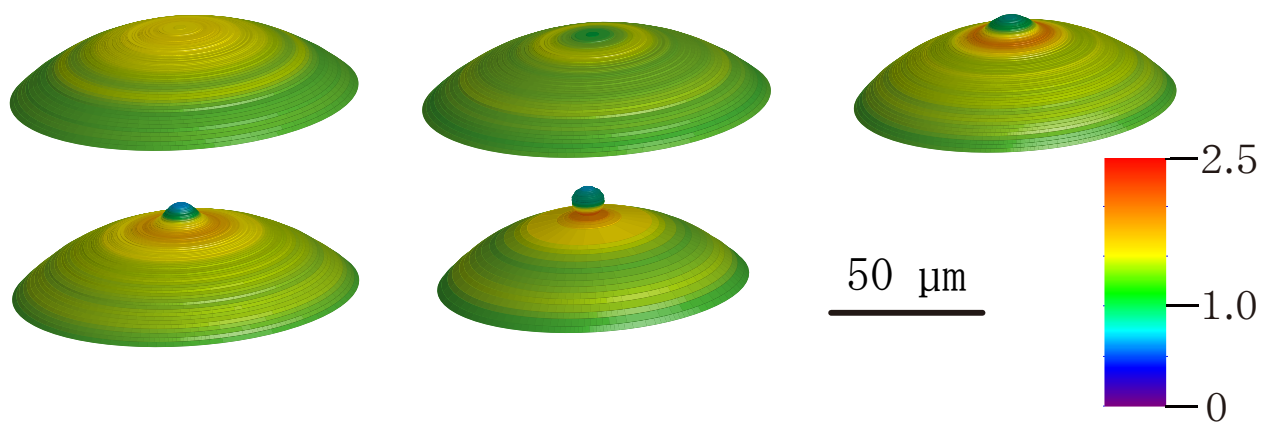


図8-2 動物極のアクチンの時間変化

動物極のアクチン比を3次元疑似カラーで表した。カラーはアクチン比が1を黄緑で、2.5を赤で、0を青で表した。スケールバー：50 μm

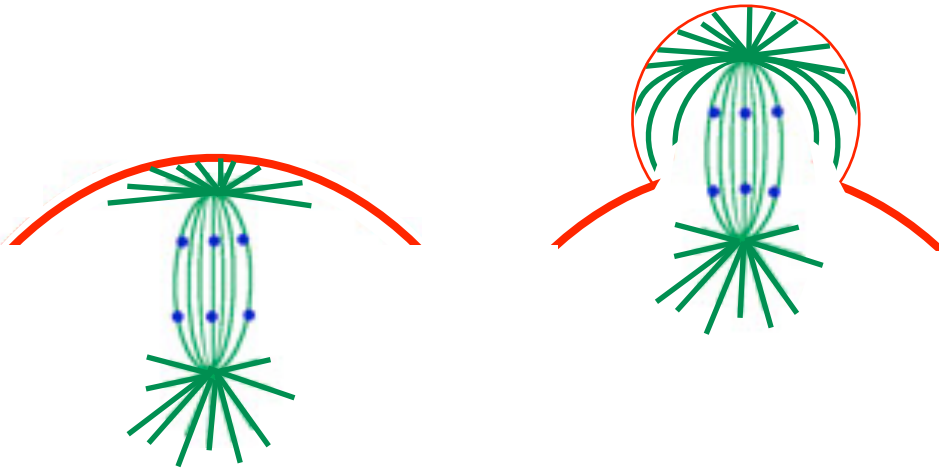


図8-3A 星状体微小管の安定化と表層の関係
微小管安定剤を処理すると極体は肥大化する。

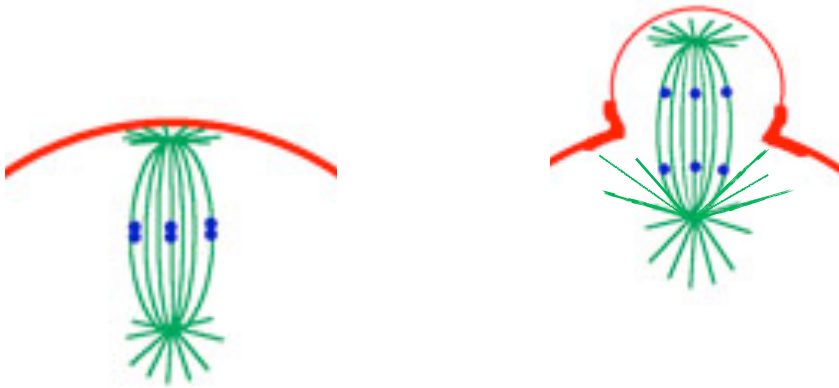


図8-3B 星状体微小管と表層の関係
星状体微小管は表層に対して突っ張り、赤道面に収縮溝を形成する。

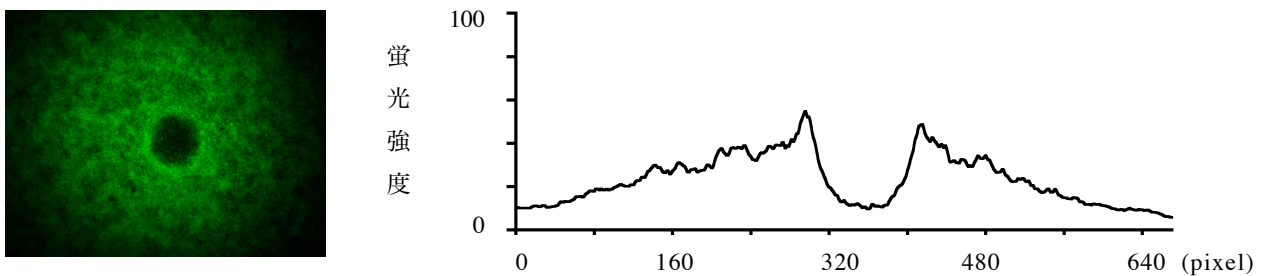


図8-3C TIRF顕微鏡観察による動物極表層とアクチン分布
左図は極体形成時の収縮環のアクチン蛍光像を示し、右のグラフは左図の蛍光像の蛍光強度を示す。極体部分の表層からアクチンは消失している。

引用文献

1. Albertson, D. G. 1984 Formation of the first cleavage spindle in nematode embryos. *Dev. Biol.* 101: 61-72.
2. Benink, H. A. and Bement, W. M. 2005 Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* 168: 429-439.
3. Byers, H. R. and Fujiwara, K. 1982 Stress fibers in cells *in situ*: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J. Cell Biol.* 93: 804-811.
4. Cao, L.G. and Wang, Y. L. 1990 Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. I. Recruitment of preexisting actin filaments into the cleavage furrow. *J. Cell Biol.* 110: 1089-1095.
5. Cleary, A. L., Gunning, B. E. S., Wasteneys, G. O. and Hepler, P. K. 1992 Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Cell Sci.* 103: 977-988.
6. Crawford, J. M., Harden, N., Leung, T., Lim, L. and Kiehart, D. P. 1998 Cellularization in *Drosophila melanogaster* is disrupted by the inhibition of rho activity and the activation of cdc42 function. *Dev. Biol.* 204: 151-164.
7. Czihak, G. 1974 The role of astral rays in early cleavage of sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* 83: 424-426.
8. Dan, K. and Nakajima, T. 1956 On the morphology of the meiotic apparatus isolated from echinoderm eggs. *Embryologia* 3: 187-200.
9. Dan, K. 1963 Force of cleavage of the dividing sea urchin egg. *Symp. Int. Soc. Cell Biol.* 2: 261-276.
10. Dan, K. and Ito, S. 1984 Studies of unequal cleavage in molluscs: I. Nuclear behavior and anchorage of a spindle pole to cortex as revealed by isolation technique. *Dev. Growth Differ.* 26: 249-262.
11. Dan, K. and Inoue, S. 1987 Studies of unequal cleavage in molluscs II. Asymmetric nature of the two asters. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 11: 335-354.
12. Eggert, U. S., Mitchison, T. J. and Field C. M. 2006 Animal cytokinesis: From Parts List to Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 543-566
13. Fishkind, D. J. and Wang, Y.-L. 1995 New horizons for cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 23-31.
14. Goday, C., Gonz  les-García, J. M., Esteban, M. R., Giovinazzo, G. and Pimpinelli, S. 1992 Kinetochores and chromatin diminution in early embryos of *Parascaris univalens*. *J. Cell Biol.* 118: 23-32.
15. Goehring, N. W. and Beckwith, J. 2005 Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* 15: 514-526.
16. Hamaguchi, M. S. and Hiramoto, Y. 1978 Protoplasmic movement during polar-body formation in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.* 112: 55-62.
17. Hamaguchi, Y. and Mabuchi, I. 1982 Effects of phalloidin microinjection and localization of fluorescein-labeled phalloidin in living sand dollar eggs. *Cell Motil. Cytoskel.* 2: 103-113.

18. Hamaguchi, Y. and Mabuchi, I. 1988 Accumulation of fluorescently labeled actin in the cortical layer in sea urchin eggs after fertilization. *Cell Motil. Cytoskel.* 9: 153-163.
19. Hamaguchi, Y., Iwasa, F., Toriyama, M. and Sakai, H. 1989 A comparative study of the distribution of fluorescently labeled calmodulin and tubulin in the meiotic apparatus of the mouse oocyte. *Cell Struct. Funct.* 14: 241-248.
20. Hamaguchi, Y. 2001 Displacement of the mitotic apparatus which induces ectopic polar body formation or parthenogenetic cleavage in starfish oocytes. *Dev. Biol.* 239: 364-375.
21. Hamaguchi, Y., Satoh, S. K., Numata, T. and Hamaguchi, M. S. 2001 Response of the cortex to the mitotic apparatus during polar body formation in the starfish oocyte of *Asterina pectinifera*. *c* 26: 627-631
22. Hamaguchi, Y., Numata, T. and Satoh, S. K. 2007 Quantitative cortical actin during polar body formation in starfish oocytes. *Cell Struct. Funct.* 32: 29-40
23. Heil-Chapdelaine, R.A. and Otto, J. J. 1996 Characterization of changes in F-actin during maturation of starfish oocytes. *Dev. Biol.* 177: 204-216.
24. Hiramoto, Y. 1956 Cell division without mitotic apparatus in sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* 11: 630-636.
25. Hiramoto, Y. 1957 The thickness of the cortex and the refractive index of the protoplasm in sea urchin eggs. *Dev. Growth Differ.* 3: 361-374.
26. Hiramoto, Y. 1958 A quantitative description of protoplasmic movement during cleavage in the seaurchin egg. *J. Exp. Biol.* 35: 407-424.
27. Hiramoto, Y. 1963 Mechanical properties of sea urchin eggs: I. Surface force and elastic modulus of the cell membrane. *Exp. Cell Res.* 32: 59-75.
28. Hiramoto, Y. 1968 The mechanics and mechanism of cleavage in the sea-urchin egg. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 311-327.
29. Hiramoto, Y. 1971 Analysis of cleavage stimulus by means of micromanipulation of sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* 68: 291-298.
30. Hiramoto, Y., Hamaguchi, Y., Shoji, Y., Schroeder, T. E., Shimoda, S. and Nakamura, S. 1981 The role of microtubules in birefringence of the spindle of the sea urchin egg. *J. Cell Biol.* 89: 121-130.
31. Ichida, K., Yoshimoto, F. and Kiyono, T. 1976 Curve fitting by a piecewise cubic polynomial. *Computing* 16: 329-338
32. Kanatani, H. 1969 Induction of spawning and oocyte maturation by 1-methyladenine in starfishes. *Exp. Cell Res.* 57: 333-337.
33. Kato, K. H., Washitani-Nemoto, S., Hino, A. and Nemoto, S. 1990 Ultrastructural studies on the behavior of centrioles during meiosis of starfish oocytes. *Dev. Growth Differ.* 32: 41-49.
34. Kuramochi, K., Mabuchi, I. and Owaribe, K. 1986 Spectrin from sea urchin eggs. *Biomed. Res.* 7: 65-68.
35. Kuriyama, R., Borisy, G. G. and Masui, Y. 1986 Microtubule cycles in oocytes of the surf clam, *Spisula solidissima*: An immunofluorescence study. *Dev. Biol.* 114: 151-160.

36. Li, F., Wang, X., Bunger, P. C. and Gerdes, A. M. 1997 Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 1541-1551.
37. Li, R., Zheng, Y. and Drubin, D. G. 1995 Regulation of cortical actin cytoskeleton assembly during polarized cell growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* 128: 599–615
38. Longo, F. J. and Anderson, E. 1969 Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, *Mytilus edulis*. I. Polar body formation and development of the female pronucleus. *J. Exp. Zool.* 172: 69-95.
39. Longo, F. J. and Anderson, E. 1970 An ultrastructural analysis of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. I. Polar body formation and development of the female pronucleus. *J. Ultrastruct. Res.* 33: 495-514.
40. Longo, F. J. 1972 The effects of cytochalasin B on the events of fertilization in the surf clam, *Spisula solidissima*. I. Polar body formation. *J. Exp. Zool.* 182: 321-344.
41. Lutz, D. A., Hamaguchi, Y. and Inoue, S. 1988 Micromanipulation studies of the asymmetric positioning of the maturation spindle in *Chaetopterus* sp. oocytes: I. Anchorage of the spindle to the cortex and migration of a displaced spindle. *Cell Motil. Cytoskel.* 11: 83-96.
42. Mabuchi, I. and Okuno, M. 1977 The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J. Cell Biol.* 74: 251–263.
43. Mabuchi, I., Hosoya, H. and Sakai, H. 1980 Actin in the cortical layer of the sea urchin egg. Changes in its content during and after fertilization. *Biomed. Res.* 1: 417-426.
44. Mabuchi, I., Hamaguchi, Y., Kobayashi, T., Hosoya, H., Tsukita, S. and Tsukita, S. 1985 Alpha-actinin from sea urchin eggs: Biochemical properties, interaction with actin, and distribution in the cell during fertilization and cleavage. *J. Cell Biol.* 100: 375-383.
45. Mabuchi, I. 1994 Cleavage furrow: timing of emergence of contractile ring actin filaments and establishment of the contractile ring by filament bundling in sea urchin eggs. *J. Cell Sci.* 107: 1853-1862.
46. Miyoshi H., Satoh, S. K., Yamada, E. and Hamaguchi, Y. 2006 Temporal change in local forces and total force all over the surface of the sea urchin egg during cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskel.* 63: 208-221
47. Nakamura, S. and Hiramoto, Y. 1978 Mechanical properties of the cell surface in starfish eggs. *Dev. Growth Differ.* 4: 317-327.
48. Nicklas, R. B. and Gordon, G. W. 1985 The total length of spindle microtubules depends on the number of chromosomes present. *J. Cell Biol.* 100: 1-7.
49. Ogawa, K., Yokota, E. and Shirai, H. 1988 Assembly of a protein sharing epitopes with sperm dynein heavy chains into meiotic spindle in the prometaphase starfish oocyte. *Biol. Cell.* 64: 57-66.
50. Ohtsubo, M. and Hiramoto, Y. 1985 Regional difference in mechanical properties of the cell surface in dividing echinoderm eggs. *Dev. Growth Differ.* 27: 371-383.
51. Pielak, R. M., Gaysinskaya, V.A. and Cohen, W. D. 2004 Formation and function of the polar body contractile ring in *Spisula*. *Dev. Biol.* 269: 421-432.

52. Pielak, R.M., Hawkins, C., Pyie, A., Bautista, J., Lee, K. G. and Cohen, W. D. 2005 Polar body formation in *Spisula* oocytes: Function of the peripheral aster. Biol. Bull. 209: 21-30.
53. Rappaport, R. 1961 Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. J. Exp. Zool. 148: 81-89.
54. Rappaport, R. and Rappaport, B.N. 1985 Experimental analysis of polar body formation in starfish eggs. J. Exp. Zool. 235: 87-103.
55. Rappaport, R. 1996 Cytokinesis in animal cells. Cambridge University Press
56. Rebhun, L. I. 1959 Studies of early cleavage in the surf clam, *Spisula solidissima*. using methylene blue and toluidine blue as vital stains. Biol. Bull. 117: 518-545.
57. Rebhun, L. I. and Sander, G. 1967 Ultrastructure and birefringence of the isolated mitotic apparatus of marine eggs. J. Cell Biol. 34: 859-883.
58. Robinson, D. N., Cavet, G., Warrick, H. M. and Spudich, J. A. 2002 Quantitation of the distribution and flux of myosin-II during cytokinesis. BMC Cell Biol. 3: 4-16.
59. Saiki, T., Kyojuka, K., Osanai, K. and Hamaguchi, Y. 1991 Chromosomal behavior in starfish (*Asterina pectinifera*) zygotes under the effect of aphidicolin, an inhibitor of DNA polymerase. Exp. Cell Res., 192: 380-388.
60. Saiki, T. and Hamaguchi, Y. 1993 Difference between maturation division and cleavage in starfish oocytes: Dependency of induced cytokinesis on the size of the aster as revealed by transplantation of the centrosome. Dev. Growth Differ. 35: 181-188.
61. Sato, H., Ellis G. W. and Inoué, S. 1975 Microtubular origin of mitotic spindle birefringence. Demonstration of the applicability of Wiener's equation. J. Cell Biol. 67: 501-517.
62. Satoh, R., Horie, K. and Yamazaki, S. 1996 Computer-imaging analysis by NIH Image. (in Japanese) Kitasato Med. 26: 9-16.
63. Satoh, S. K., Oka, M. T. and Hamaguchi, Y. 1994 Asymmetry in the mitotic spindle induced by the attachment to the cell surface during maturation in the starfish oocyte. Dev. Growth Differ. 36: 557-565.
64. Satoh, S. K., Satoh, R. and Hamaguchi, Y. 1996 Quantitative analysis of asymmetry of the mitotic apparatus during polar body formation in the starfish oocyte. Bioimages 4: 79-83.
65. Satoh, S. K. and Hamaguchi, Y. 2000 Quantitative analysis of cortical actin filaments in dividing sea urchin eggs. Bioimages 8: 105-111.
66. Sawada, T. and Schatten, G. 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.
67. Schaerer-Brodbeck, C. and Riezman, H. 2000 Interdependence of filamentous actin and microtubules for asymmetric cell division. Biol. Chem. 381: 815-825.
68. Schatten, G., Simerly, C. and Schatten, H. 1985 Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4152-4156.
69. Schroeder, T.E. 1968. Cytokinesis: Filaments in the cleavage furrow. Exp. Cell Res. 53: 272-276.

70. Schroeder, T. E. 1970 The contractile ring. I. Fine structure of dividing mammalian (HeLa) cells and the effects of cytochalasin B. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 109: 431-449.
71. Schroeder, T. E. 1972 The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in cleaving *Arbacia* eggs. *J. Cell Biol.* 53: 419-434.
72. 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.
73. Sekiya, K., R. Satoh, H. Danbara, and Y. Futaesaku, 1993 A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin 0 on the erythrocyte membrane. *J. Bacteriol.* 175: 5953-5961.
74. Shaw, S. L., Salmon, E. D. and Quatrano, R. S. 1995 Digital photography for the light microscope: Results with a gated, video-rate CCD camera and NIH-Image software. *Biotechniques* 19: 946-955.
75. Shimizu, T. 1981a. Cortical differentiation of the animal pole during maturation division in fertilized eggs of *Tubifex* (Annelida, Oligochaeta). I. Meiotic apparatus formation. *Dev. Biol.* 85: 65-76.
76. Shimizu, T. 1981b. Cortical differentiation of the animal pole during maturation division in fertilized eggs of *Tubifex* (Annelida, Oligochaeta). II. Polar body formation. *Dev. Biol.* 85: 77-88.
77. Shimizu, T. 1990 Polar body formation in *Tubifex* eggs *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 582: 260-272.
78. Shirai, H. and Kanatani, H. 1980 Effect of local application of 1-methyladenine on the site of polar body formation in starfish oocyte. *Dev. Growth Differ.* 22: 555-560.
79. 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. *Dev. Growth Differ.* 32: 521-529.
80. Shôji, Y., Hamaguchi, M. S. and Hiramoto, Y. 1978 Mechanical properties of the endoplasm in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.* 117: 79-87
81. Shoji, Y., Hamaguchi, Y. and Hiramoto, Y. 1981 Quantitative studies on polarization optical properties of living cells. III: Cortical birefringence of the dividing sea urchin egg. *Cell Motil.* 1: 387-397.
82. Small, J. V., Herzog, M. and Anderson, K. 1995 Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J. Cell Biol.* 129: 1275-1286.
83. Strome, S. 1986 Fluorescence visualization of the distribution of microfilaments in gonads and early embryos of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 103: 2241-2252.
84. Tanaka, Y. and Inoué, S. 1981 Does cytochalasin-D induce reversible disruption of the cleavage contractile ring? *Biol. Bull.* 161: 311.
85. Usui, N. and Yoneda, M. 1982 Ultrastructural basis of the tension increase in sea-urchin eggs prior to cytokinesis. *Dev. Growth Differ.* 24: 453-465.
86. Usui, N. and Yoneda, M. 1989 Regional response to cytochalasin B of the equatorial cell cortex in sea urchin eggs during the first mitosis. *Dev. Growth Differ.* 31: 257-267.
87. Wachi, M. and Iwai, N. 2007 Bacterial actin-like cytoskeletal protein as a new target of antibacterial agents. (in Japanese) *Nihon saikingaku zasshi.* 62: 397-404.

88. Washitani-N., S., C. Saitoh and S. Nemoto, 1990 Requirement of egg activation and suppression of polar body extrusion for inducing parthenogenetic development in starfish. In Biol. Echinodermata, (Ed. Yanagisawa, Yasumasu, Oguro, Suzuki, and Motokawa), 469-474, Balkema, Rotterdam.
89. Weiss. D. S. 2004 Bacterial cell division and the septul ring. Mol. Microbiol. 54: 588-597.
90. Wolpert, L. 1960 The mechanics and mechanism of cleavage. Int .Rev. Cytol. 10,163-216.
91. Yamashiki, N. 1990 Microtubule distribution in unequal cell division of the grasshopper neuroblasts. J. Rakuno Gakuen Univ. 14: 169-181.
92. Yoneda. M. and Dan, K. 1972 Tension at the surface of the dividing sea-urchin egg. J. Exp. Biol. 57: 575-587.
93. Yoneda, M. 1973 Tension at the surface of sea urchin eggs on the basis of 'liquid-drop' concept. Advan. Biophys, 4: 153–190.
94. Yonemura, S. and Kinoshita, S. 1986 Actin filament organization in the sand dollar egg cortex. Dev. Biol. 115: 171-183.
95. Yonemura, S. and Mabuchi, I. 1987 Wave of cortical actin polymerization in the sea urchin egg. Cell Motil. Cytoskel. 7: 46-53.
96. Yumura, S. and Fukui, Y. 1998 Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in *Dictyostelium*. J. Cell Sci. 111: 2097-2108.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導をいただきました濱口幸久教授に心から深く感謝いたします。濱口幸久教授には実験手技から生物学的見方、考え方、研究の進め方に至までご指導をいただきました。また、濱口研究室の石島純夫博士、濱口みやこ博士、研究室で多くの時間を共に研究を行った学生にも感謝致します。更に、本研究をすすめるにあたり、多くのご理解、ご援助をいただきました基礎生物、生物プロセスの先生方にも深く感謝いたします。

実験動物の採集を計画して下さった、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター厚岸臨海実験所佐野清博士、東京工業大学生命理工学研究科岸本研究室の先生方、また、採集にご協力いただいた東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学研究センター、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センター、東京大学大学院理学系研究科附属三崎臨海実験所、岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所、高知大学総合研究センター海洋生物教育研究施設の方々にも深く感謝いたします。

最後に友人と家族にお礼申し上げます。