

◇研究報告◇

# 共焦点レーザー顕微鏡法を用いた 両生類胚の細胞分裂の観察

阿部庸二\*・岩尾康宏\*

## Observation of cell division in amphibian embryos with confocal laser microscopy

Abe Y.\* and Iwao, Y.\*

In order to investigate the molecular mechanisms of cell division in early development of amphibians, the embryos were fixed and stained with anti-cyclin B1 antibody or anti- $\alpha$  and  $\gamma$  tubulin antibodies and the second antibody conjugated with FITC. Cyclin B1 was localized in the condensed chromatins, chromosomes, centrosomes, and spindles.  $\gamma$  tubulin was localized centrosomes and poles of spindles. The confocal laser microscopy enabled us to observe the localization of these molecules in a large size of cells, more than 500  $\mu$  m in diameter.

### 1. はじめに

細胞分裂は動物の受精卵から成体の体をつくる時に欠くことのできないものである。その基本的な分子機構は進化上よく保存されていて、細胞分裂周期で中心的な役割をはたしているM期促進因子(MPF)の分子は、単細胞の酵母菌から多細胞生物のヒトにおいてもほぼ共通である。とくに発生初期の細胞分裂は卵割とよばれ、同調した、早い分裂が見られる。例えば、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の受精卵(1細胞)は一晩で数千の細胞に分裂する。この初期胚の卵割は細胞分裂のしくみを調べる上で格好の材料の一つである。今回、卵割をモデルに細胞分裂の研究での共焦点レーザー顕微鏡法の適用を紹介する。

ヒトの体においても、赤血球や精子などは新たな分裂により毎日作り出されている。これらの細胞分裂(体細胞分裂)では細胞周期はM期、G<sub>1</sub>期、S期とG<sub>2</sub>期に分けられる。G<sub>1</sub>期はDNA合成準備期でS期にはDNA合成をおこなう。G<sub>2</sub>期は分裂準備期であり、G<sub>2</sub>期から核と細胞質が分裂するM期への移行は細胞質中のMPFの有無によって制御されている。また、M期はさらに前期、前

中期、中期、後期、終期に分けられる。両生類のアフリカツメガエルとアカハライモリ(*Cynops pyrrhogaster*)の卵割では、第12卵割頃までは成長に必要なG<sub>1</sub>とG<sub>2</sub>期が存在しないため、1回の分裂サイクルが非常に早い。しかし、M期とS期の活動はほとんど他の細胞と同じであり、M期には核分裂(有糸分裂)と細胞質分裂が起き、2つの娘細胞ができる。すなわち、卵割期の細胞分裂の進行はMPF活性の有無によって決定されている。MPFは活性サブユニットのcdc2キナーゼと調節サブユニットのサイクリンBの複合体であり、卵割期のMPF活性はサイクリンB量のみによって制御されている。また、この有糸分裂では微小管からなる双極の紡錘体が染色体を両極に移動させる。その後、微小繊維(マイクロフィラメント)からなる収縮環の働きで細胞が二分される。微小管は $\alpha$ と $\beta$ チューブリンが管状に重合したもので、一般に中心体から重合開始するが、それには $\gamma$ チューブリンが重要な役割をはたしている。

今回、アフリカツメガエルとアカハライモリの受精卵を用いて卵割期における $\alpha$ 、 $\beta$ チューブリンと $\gamma$ チューブリンの挙動を間接蛍光抗体法と共

\*理学部自然情報科学科生物科学講座 Department of Physics, Biology and Infomatics, Faculty of Science.

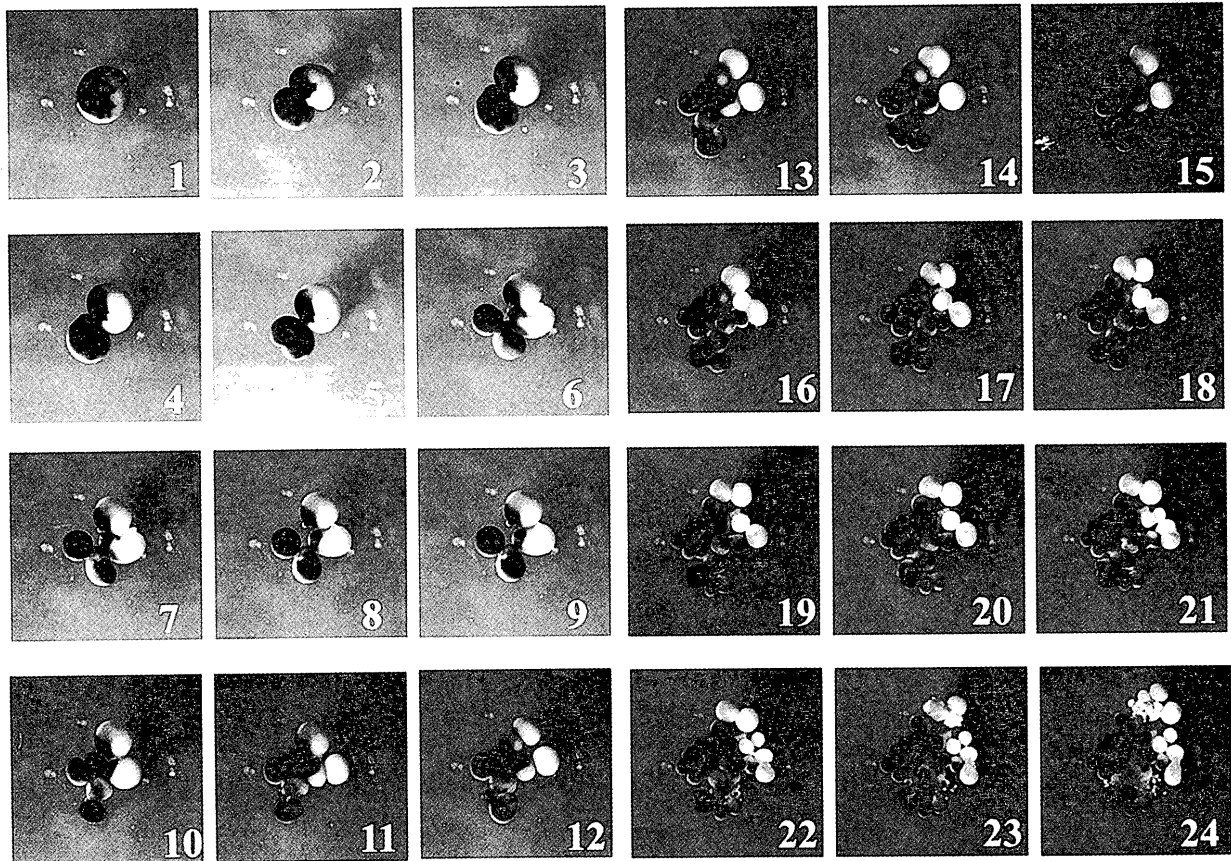


図1. イモリ胚の同調的卵割

焦点レーザー顕微鏡で詳しく観察することを試みた。

## 2. 同調的な卵割の観察

第2卵割を終えたイモリ胚から動物半球の割球を単離し、卵割する様子を30分ごとに撮影した(図1)。第9卵割までは、ほぼ2時間ごとに割球が一斉に同調して分裂することがわかる。

## 3. イモリ卵でのサイクリンBとDNAの観察

イモリ卵内のサイクリンBの分布を観察するために、第6卵割の卵割溝が見え始めた直後から10分ごとに卵を固定して、抗サイクリンB抗体を用いて蛍光抗体染色をおこなった。FITC結合2次抗体とDNA染色にpropidium iodide (PI)を用いて、分子細胞情報解析システムの共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, LSM-510)で観察した。間期(S期)の割球では、サイクリンBは細胞質と核内に存在していた(図2A)。とくに、DNAをまとめている核内の染色糸に多く見られた。M期中期

では、サイクリンBは染色体と紡錘体の両極に多く分布し、紡錘糸にも見られた(図2B)。M期後期では両極へ移動中の染色体と星状体を広げている紡錘体極に多く見られた(図2C)。M期終期では紡錘体は消失し、卵割溝が形成されるが、染色体にサイクリンBが多少残っていた(図2D)。

## 4. アフリカツメガエル卵での微小管と $\gamma$ チューブリンの観察

アフリカツメガエル卵内の微小管構造と $\gamma$ チューブリンの分布を観察するために、第6卵割期に卵を固定して、抗 $\alpha$ チューブリン抗体または抗 $\gamma$ チューブリン抗体を用いて蛍光抗体染色をおこなった。ツメガエル卵では間期(S期)の割球では核のそばに $\alpha$ チューブリンが集中した微小管重合中心(MTOC)である中心体が1ヶ存在し、そこから微小管が放射状に細胞質内に広がっていた(図3A)。M期前中期になると中心体が2つに分かれ始めていた(図3B)。核の部分は染色されずに黒く抜けて見えた。M期中期では大きな双極の紡錘

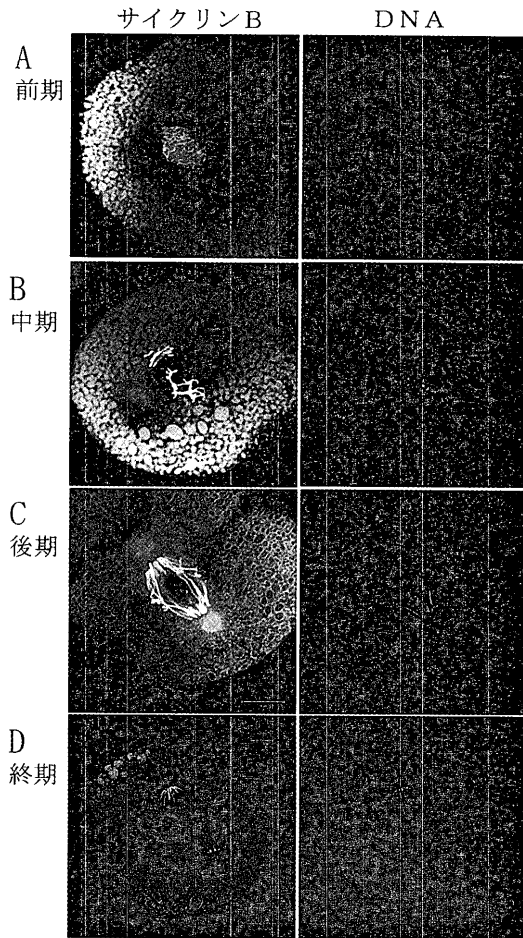


図2. イモリ胚の第7卵割期におけるサイクリンB 1とDNAの分布

体がつくられた (図3 C)。M期後期になると、紡錘体が伸張して、両極の星状体が発達した (図3 D)。M期終期には2極の星状体の間に卵割溝が形成された。

$\gamma$ チューブリンの分布を見ると、間期 (S期) では中心体のみ存在し、それから伸びた微小管には見られなかった (図3 A)。M期前中期では2つに分かれ始めた中心体のみ見られた (図3 B)。M期中期でも紡錘体極にのみ存在しており、紡錘糸や極星状体には見られなかった (図3 C)。M期後期から終期にかけても、紡錘体極に存在した (図3 D)。

今回、直径が500  $\mu$ mもの大きな細胞 (割球) において細胞内構造を蛍光抗体法と共焦点顕微鏡法により詳細に観察できることがわかった。この方法では数 $\mu$ mから数百 $\mu$ mの厚さの光学切片を自在に得ることができるので、通常の蛍光顕微鏡

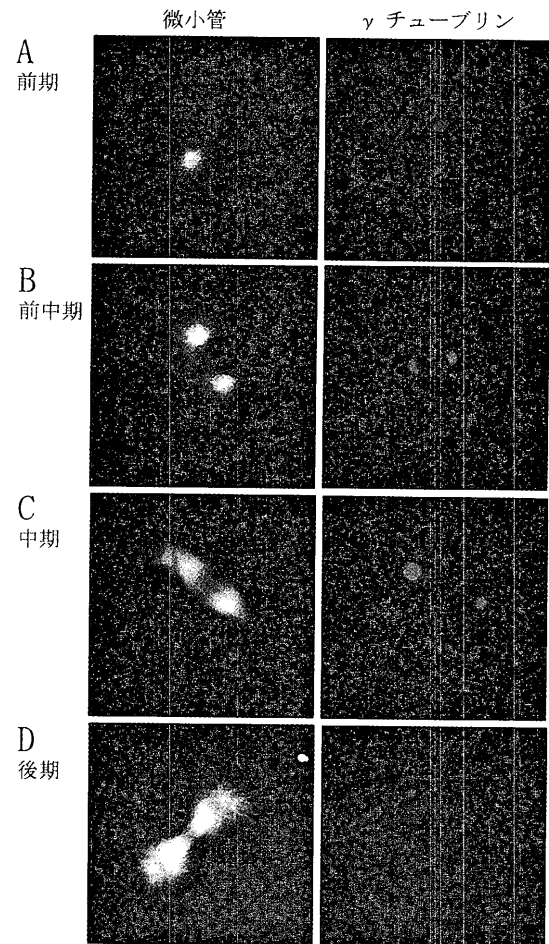


図3. アフリカツメガエル胚の第6卵割期における $\alpha$ と $\gamma$ チューブリンの分布

では見ることの出来ない高解像度の画像を容易に観察できた。今後、初期胚細胞内の分子の局在・挙動を明らかにし、細胞の機能を明らかにする研究に大いに役立つと考えられる。共焦点レーザー顕微鏡法は今後盛んになるとされるプロテオーム解析 (遺伝子から発現したタンパク機能解析) の基本的手法の一つである。以前、電子顕微鏡が細胞生物学の基本的技術となり、各研究室での使用が当然となったように、共焦点レーザー顕微鏡法も使えて当然のものとなりつつある。学生実習や院生の研究でこの技術に触れることは、最先端の生命科学を学ぶ上からも大変有意義なことである。

#### 参考文献

- (1) 「両生類の発生生物学」片桐千明編 5章 (岩尾康宏) 「多精拒否—精子1ヶのみを受け付ける

- ためにしくみ」北海道大学図書刊行会 (1998)
- (2) "Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals, Cellular and Molecular Aspects" Tarin, J.J. and Cano, A. (Eds.) (原生動物と後生動物の受精, 細胞と分子的側面) Chapter 4, pp. 147-191. Springer-Verlag Heidelberg (2000) ISBN 3-540-67093-9
- (3) Mechanisms of egg activation and polyspermy block in amphibians and comparative aspects with fertilization in other vertebrates. (両生類での卵付活と多精防止のしくみ, および他の脊椎動物との比較) :Y. Iwao *Zoological Science* 17: 1-11 (2000)
- (4) Changes in microtubule structures during the first cell cycle of physiologically polyspermic newt eggs (生理的多精受精のイモリ卵での第一細胞周期における微小管構造の変化) :Y. Iwao, K. Yasumitsu, M. Narihira, J. Jiang & Y. Nagahama *Molecular Reproduction & Development* 42, 210-221 (1997)