

実習開発 3

イトマキヒトデ卵成熟過程に伴う卵内カルシウム遊離機構の発達と受精時のカルシウム波の測定

経塚 啓一郎

Key words: イトマキヒトデ、卵成熟、受精、卵内カルシウム変化、顕微蛍光測光法、カルシウムイメージング

1. はじめに

受精は、有性生殖をおこなう動物にとって、新たな「個体発生」の出発点として、生物学的に極めて重要な現象である。

受精発生の実習教材に海産動物を用いることは、以下のような利点を持つ。それらは①配偶子（卵や精子）の採取が容易である（基本的には切り出せば良い）、②海水を入れた容器中に配偶子を入れ、受精発生過程を容易に観察できる（体外受精）。③発生が早く（およそ1~1.5時間に1回の卵割が進行）海水を入れた容器中で、受精発生過程を容易に観察できる。などである。特に溶液が海水で、特別な温度管理をせずに、発生過程を顕微鏡下で観察できることは、海産動物を用いる大きな利点である。

一般に、成熟した雌の卵巣内の卵母細胞は、まだ受精発生する能力が備わっていない。自然状態では、卵巣卵の体外への放出に先行して、卵成熟が進行し、受精可能な成熟卵となって放出される。この過程には、卵成熟誘起ホルモンが関与する。成熟卵への受精時に、精子が卵内に侵入すると、卵の活性化が起こり、発生を開始する。この時、精子侵入に伴って卵内カルシウムイオン(Ca^{2+})の上昇が起こることは、種を越えた一般的な現象として知られている。また

Ca^{2+} ionophore などを用いて人為的に卵内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより、精子無しで卵の単為付活を誘起できる。そこで、精子により卵内 Ca^{2+} 上昇が起こることは、卵の活性化が起こるために必要十分な条件である。

本年度、教育拠点設備として、顕微測光装置（Nikon IX+画像取得処理プログラム NIS Elements、後半の実習使用中の測光システム写真）を新規に導入した。これにより、蛍光プローブを用いた顕微測光法により卵内 Ca^{2+} 変化を解析することが可能となり、発展実習プログラム「イトマキヒトデ卵成熟過程に伴う卵内カルシウム遊離機構の発達と受精時のカルシウム波の測定」を開発した。

近年、 Ca^{2+} 以外にも、マグネシウムイオンやナトリウムイオンなどの細胞内イオン、あるいは膜電位変化や pH 変化を経時的に測定出来る蛍光プローブが数多く開発、市販されておりこれらとこれらの蛍光波長に対応したフィルターを設置することにより、各種刺激に応答する卵（細胞）内における変化を、経時的に測定、解析することが可能となり、これらを用いた様々なプログラムを開発できるポテンシャルを持つ。そこで、今回は、今後予想される多方面の実習メニューへの応用を前提に、システムの基本的な取扱方法を中心にして述べる。

目的：

イトマキヒトデは卵巣中の卵母細胞を切り出すことで第一減数分裂前期の卵核胞を持った、まだ受精発生能をもたない未成熟卵を得ることが出来る。これらの卵母細胞は海水中においても卵成熟は進行しないが、