



ヒトデの卵成熟と初期発生(受精・卵割) の観察

■実験のねらいと特徴

ヒトデの卵成熟、受精、卵割を観察することで、『生物の初期発生過程のダイナミクス』を体験させる。

■実験の流れ

- ・準備
 - 1) 使用する材料、器具、試薬の準備。
 - 2) 限られた実験時間内に卵割過程を観察できるように、一部の卵を受精させておく。
詳細は『イトマキヒトデ受精法』
- ・前説明
 - 1) 棘皮動物ヒトデについて
 - 2) 減数分裂、受精、細胞分裂について
 - 3) スケッチの意義と描き方について
 - 4) 明視野顕微鏡の使い方について
- ・実験中
 - 1) ヒトデの卵成熟・受精・卵割過程の観察（レンズに海水が付かないように留意させる）。
- ・実験後
 - 1) レポートの作成と提出
 - 2) 顕微鏡のレンズとステージの掃除

■はじめに

多くの生物は、卵と精子を介した有性生殖^{用語1}により新たな個体を作り出す。卵と精子は、遺伝子のセット(ゲノム^{用語2})を一揃いのみ持つ生殖細胞^{用語3}である(図1)。精子が卵と融合し受精が成立した卵は

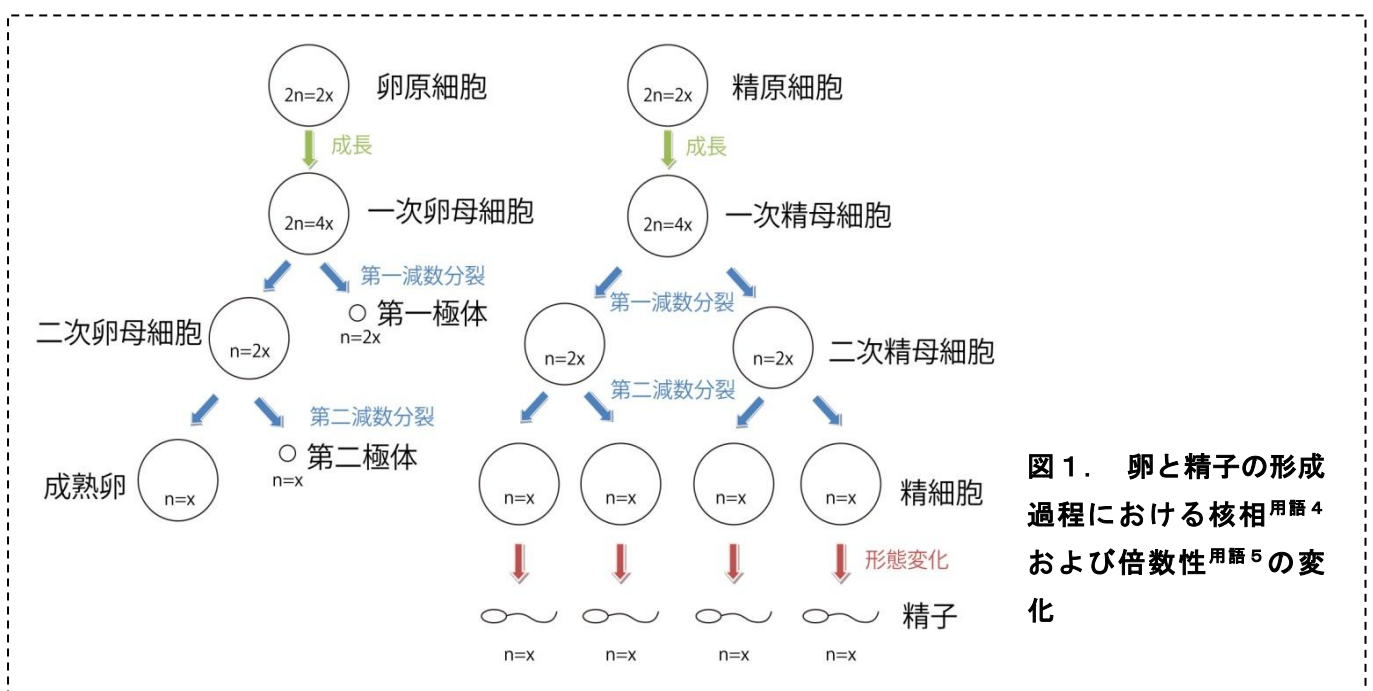


図1. 卵と精子の形成過程における核相^{用語4}および倍数性^{用語5}の変化

受精卵と呼ばれる。受精卵は分裂を繰り返すことで、細胞数を増やし、個体へと発生していく。私たちヒトにおいては、一個の受精卵から 60 兆個まで細胞が増殖する。各細胞は、ゲノム情報に基づき、形と機能の特異的に変化させ始め（細胞分化）、相互に作用し合うことで（細胞間相互作用）、それぞれの細胞が 3 次元的に構築された組織、器官を形成し（形態形成）、最終的に種に固有の形を作り出す。発生過程は、単相（n）の生殖細胞から複相（2n）の体細胞、さらに、組織、器官、個体へと階層が上る過程と特徴づけることができる。階層が上るに従って生物は複雑な構造を形成し、より高次の機能を獲得する。

発生プログラムは、受精卵のゲノムに書き込まれており、世代を超えて正確に引き継がれる。すなわち、カエルの受精卵はカエルに、ヒトデの受精卵はヒトデになる。発生の各過程では、受精卵と同じ遺伝情報を持つ細胞たちが、位置と時を間違えずに多様な遺伝子を発現する。中でも、発生の初期過程は、受精に向けて卵が成熟し、受精が成立した後、胚を構築する細胞の数が急速に増える時期である。これらの変化を顕微鏡下でじかに観察することをとおして、刻一刻と変化する発生の初期過程のダイナミクスを体験する。

■ 目的と課題

（目的 1）ヒトデ卵成熟の観察

課題 1：卵核胞（germinal vesicle; GV）を有する未成熟卵を観察・スケッチする。

課題 2：未成熟卵を 1-メチルアデニン（1-methyladenine:1-MA）で処理し、GV が崩壊して成熟卵となる過程を観察し、成熟卵をスケッチする。

（目的 2）受精の観察

課題 3：受精膜の形成、および第 1、第 2 極体の放出を観察し、受精卵をスケッチする。

（目的 3）卵割の観察

課題 4：2 細胞期、4 細胞期の胚、ならびに細胞質分裂を進行している状態の胚をスケッチする。媒精からの経過時間も記録する。

（目的 4）精子の観察

課題 5：ヒトデに特徴的な精子の頭部と尾部をスケッチする。

■ 材料

・イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*) の卵:

未成熟卵（1 シャーレ/8 人）、サンプル 1（1 シャーレ/1 人）、サンプル 2（1 シャーレ/1 人）

・イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*) の精子懸濁液:受精用と観察用（試験管 2 本/8 人）

■ 試薬

・1mM 1-メチルアデニン（1-MA; $C_6H_7N_5$, MW=149.2）:10 μ l/10 ml の海水中に入れた卵巣

・海水、または人工海水（マリンアート）:200 ml/8 人

■ 器具

・光学顕微鏡（1 台/1 人）

・直径 6 cm シャーレ（ヒトデ卵観察用）（2 枚/1 人）（サンプル 1、サンプル 2 を入れて配布）

・パストゥールピペット（3 本/8 人）

- ・ ビニールテープ付きスライドガラス（1枚/1人）
- ・ スライドガラス（1枚/1人）
- ・ カバーガラス（2枚/1人）
- ・ 濾紙片（適宜）

■実験手順

（1）卵成熟（図4参照）

①1-メチルアデニン（1-MA）処理していない卵巣片から、卵をスペーサー付き観察用スライドガラス（図2）上にとり、カバーガラスをかけて、濾紙で余分な海水を吸い取り、100倍で顕鏡・スケッチする^{注1}。

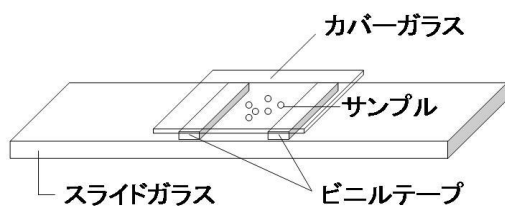


図2. スペーサー付き観察用スライドガラス

②15分前に1-メチルアデニン（1-MA）処理された卵巣片から得た卵（サンプル1）（図3）を、10倍の対物レンズを使ってシャーレ中で顕鏡し、GVが崩壊していく様子を観察する^{注2}。顕微鏡のステージが、メカニカルステージの場合には、クレンメルで挟んだスライドガラスの上にシャーレを乗せて顕鏡することで、シャーレ中の観察位置をスムーズに変えることができる^{注3}。

（2）極体形成・受精（図4参照）

①GVが崩壊したサンプル1のシャーレ中の卵細胞に、精子液を1滴加える。加えた時間をすぐに記録する。

②シャーレを静かに揺すって精子を攪拌し、その後に生じる受精膜、第一極体、第二極体の形成を10倍の対物レンズを使ってシャーレ中で速やかに観察する^{注4}。

③各スケッチには、媒精からの経過時間を必ず記録する^{注5}。

（3）卵割（図4参照）

①30分前に媒精した卵巣片から得た卵（サンプル2）（図3）を、スペーサー付き観察用スライドガラス上にとり、カバーガラスをかけ、濾紙で余分な海水を吸い取り、100倍で顕鏡する。

②2細胞期、4細胞期の胚を観察する。また、細胞質がくびれて、2細胞または4細胞になる過程（細胞質分裂中の様子）も観察する。各スケッチには、媒精からの経過時間を必ず記録する。

（4）精子（図5参照）

①通常のスライドガラス上に精子液を1滴落とす。

②カバーガラスをかけ、余分な海水を濾紙で吸い取り、600倍（対物レンズ40倍×接眼レン

ズ 15 倍) で顕鏡する^{注6}。コンデンサーのフィルター上に遮光板を入れることで、簡易的な暗視野照明が可能になり、精子の頭部や尾部の形態が明瞭に観察できる^{注7}。

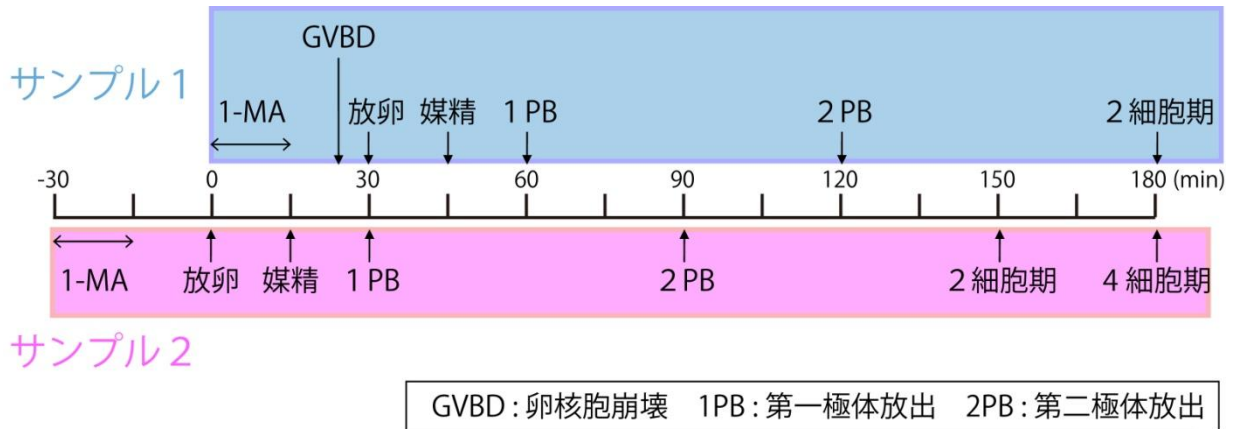


図3. ヒトデ卵成熟と初期発生のタイムスケジュール (19°C) ^{注8}

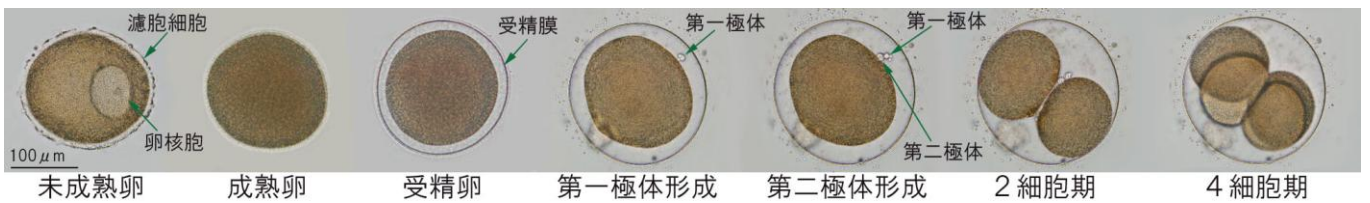


図4. イトマキヒトデの卵成熟と初期発生

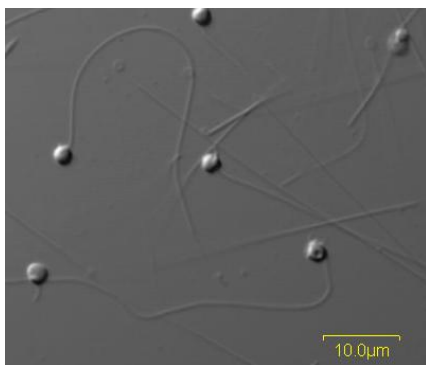


図5. イトマキヒトデの精子 (微分干渉像)

■ポイントとトラブルシューティング

- 注¹: 卵がつぶれないように、ビニールテープで隙間を作ったスペーサー付きスライドガラスで観察する。
- 注²: シャーレのままの顕鏡では、対物レンズは10倍までにすること。レンズに海水がつかないようにくれぐれも注意する。海水がついた場合は、速やかにスタッフに伝え、レンズが腐食しないように丁寧にクリーニングする。(海水のついた部分を蒸留水で洗い、レンズペーパーを用いて、水分を完全に拭き取る)
- 注³: クレンメルがスムーズに作動するように、スライドガラス裏面に水がつかないように注意する。
- 注⁴: 媒精約1分後に受精膜の上昇、続いて約15分後に第一、第二極体形成が生じる。比較的速い現象であるので、見落とさないように注意する。
- 注⁵: 経過時間は時刻ではなく、媒精からの正味の時間を記述する。
- 注⁶: 精子の観察は、通常のスライドガラスでおこなう。ビニールテープで隙間を作ったスライドガラスでは、精子が泳ぎ回って、観察しづらい。
- 注⁷: 開口数が比較的小さな0.05~0.6ぐらいの対物レンズを使用している場合は、適切な大きさの遮光板(例えば10円玉やレンズの大きさに合わせた黒っぽい紙)をコンデンサーレンズ上に乗せることにより、簡易暗視野照明が得られる。
- 注⁸: 1℃の温度上昇でも、発生は速く進行するのでタイムスケールはあくまでも目安とし、注意して観察する。
- ・「顕微鏡の使い方」をよく読む。
 - ・生きている細胞を観察しているので、光源の熱による水分の蒸発や温度上昇は、最小限になるようにくれぐれも注意する。

■実験を成功させるための留意点

実験前

- ・必要量のイトマキヒトデを用意し、タイムスケジュール(図3)に従って、1-MA処理や媒精を行う。余裕があれば、媒精の時間を15分程度ずらしたサンプルをいくつか用意するとよい。
- ・未受精卵を扱うピペットは、精子を扱うピペットとしっかり区別し、誤って、未受精卵に精子が混ざらないようにする。

実験中

- ・海水をレンズに付着させないように注意を促す。

実験後

- ・顕微鏡本体とレンズに海水がついていないか確認させる。

■本実験の発展

『ヒトデの受精・形態形成におけるカルシウムイオンの役割』や『ヒトデの発生過程の観察』と組み合わせることができる。

■用語解説

用語¹ (有性生殖) : 精子と卵などの生殖細胞により新たな個体を作り出す方法

用語² (ゲノム) : gene (遺伝子) と chromosome (染色体) の複合語であるゲノム genome は、個々の生物がもつ1組の遺伝情報を指す。

用語³ (生殖細胞) : 新しい個体を形成し、次世代に遺伝情報を伝えうる生殖のために特別に分化した細胞。精子や卵子など。

用語⁴ (核相) : 細胞1個にふくまれる染色体の状況を核相として表す。体細胞に見られるように相同染色体が存在する複相 ($2n$) と、生殖細胞に見られるような染色体が単独で存在する単相 (n) がある。

用語⁵ (倍数性) : 1個の細胞に含まれるゲノムのセット数を倍数性として表す。