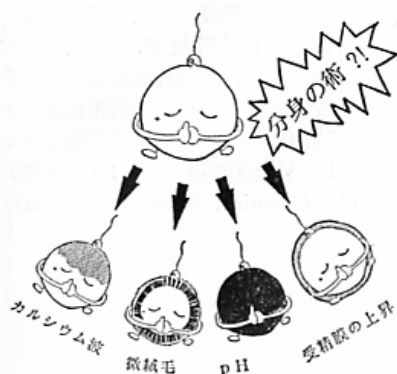


受精の細胞内過程を 多画像顕微鏡で覗く

Looking into Cells at Fertilization through
a Multi-View Microscope



カット：どろんぱっと、分身の術でふえたのは、ご存じ卵子と精子です。この術で受精時のいろいろな様子を同時に見ることができます。さて、この術のたねあかしは、“多画像顕微鏡”というのですが…。

精子と卵子が会ってから二つの細胞に何がおきるか。すでに多くが知られているが、細胞内の様々な出来事を同時にリアルタイム観察した例はまだ少ない。複雑な受精反応の連鎖をときほぐすため、多画像顕微鏡という道具を使って、いろいろな細胞内過程の時間的空間的關係を画像として捉えてみた。

多画像顕微鏡

高感度ビデオカメラ、画像処理技術、さらに千種を越える蛍光プローブの開発などのおかげで、細胞内 pH, イオン濃度、膜電位、特定の分子の位置や向きなど、ほんらい目に見えないはずのものが次々と画像として見えるようになってきた。これらが刺激に応じてどう変化するか、1個の生きた細胞の中で同時に観察することができれば、反応の道筋を明らかにすることができる。

そこで、図1(カラー頁参照)に示すような多画像顕微鏡を作ってみた。顕微鏡とビデオカメラの間で、波長ないし偏光方向に応じて光の方向を少しだけずらす。するとそれぞれの像が、カメラ上に隣合って、別々に映るという仕掛けである。例えば、緑に光る Ca^{2+} 感受性蛍光色素と赤く光る pH 感受性色素で細胞を染め、形態観察に青の透過光を用いれば、これら三つの変化を独立かつ

Keisuke SUZUKI

鈴木慶介

Yuriko TANAKA

田中百合子

Ichiro SASE

佐瀬一郎

Kazuhiko KINOSITA, Jr.

木下一彦

同時・連続的に記録できることになる。3画像を一つのカメラにまとめて映し込むところがミソで、微弱蛍光用の超高感度ビデオカメラも1台あればすむ。

卵子の受精初期過程

丸いウニの卵に精子が泳ぎ着くと、細胞内 Ca^{2+} 濃度、続いて細胞内 pH が上昇することがわかっている。細胞表面では、それまで比較的平だったところに微絨毛 (microvilli) と呼ばれる突起が無数に伸びだし、一方では卵の周りに堅い受精膜が作られて後からくる精子を妨害する。これらの現象の間の関係を、多画像顕微鏡を使って探ってみた。

図2は受精前と受精後のウニ卵で、白黒3画像の組が多画像顕微鏡に同時に映る。cとgは透過光像で、gのほうをよく見ると卵の外側を受精膜が取り囲んでいるのがわかる。a b と e f は、微絨毛の伸長を捉えるための偏光蛍光像である。

微絨毛は細くて、光学顕微鏡で直接見るのは難しい。そこで、卵の細胞膜を RH 292 という蛍光色素で染めた。この色素は細長い分子で、その蛍光は分子の長軸方向に偏光する。RH 292 は、その構造から細胞膜にほぼ垂直に入り込むと予想されるが、実際、未受精卵では図2 a b のように蛍

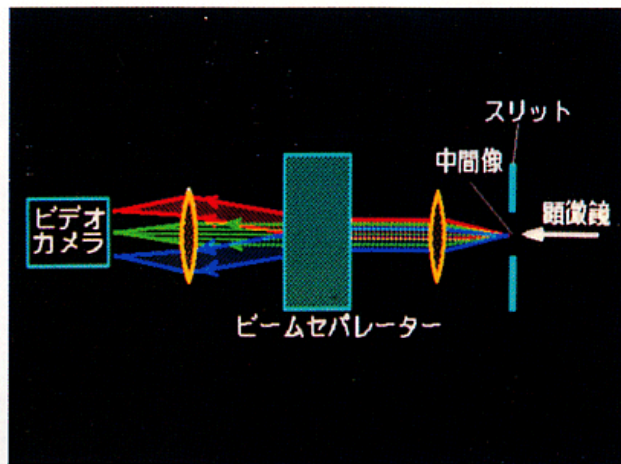


図 1 多画像顕微鏡の原理。

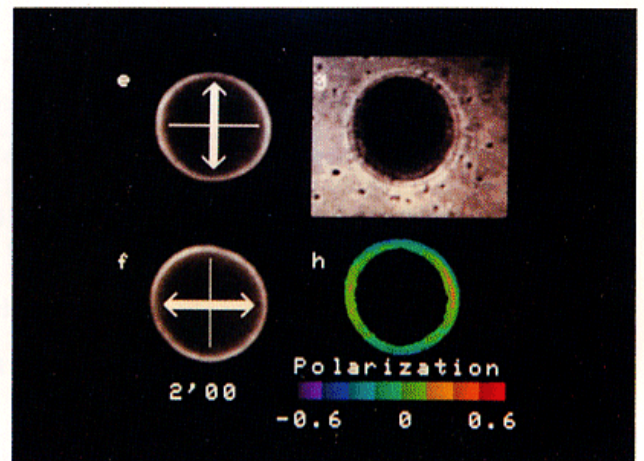
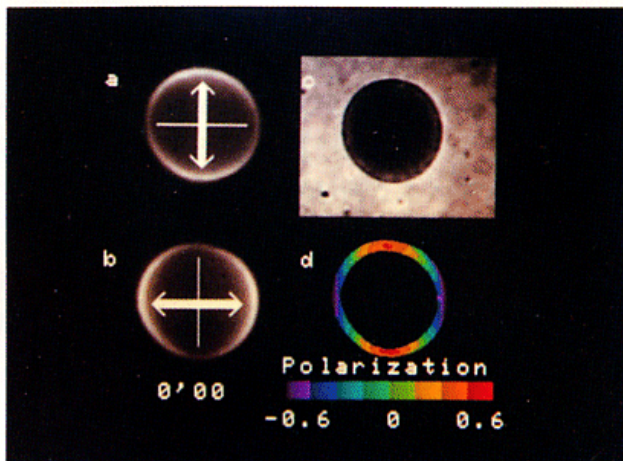


図 2 多画像顕微鏡に映った未受精 (a~d) および受精後 2 分 (e~h) のウニ卵。白黒が原画像で、a b e f は RH 292 の蛍光の矢印方向の偏光成分。色表示は偏光度の計算値で、 $d = (a - b) / (a + b)$ 、h も同様。

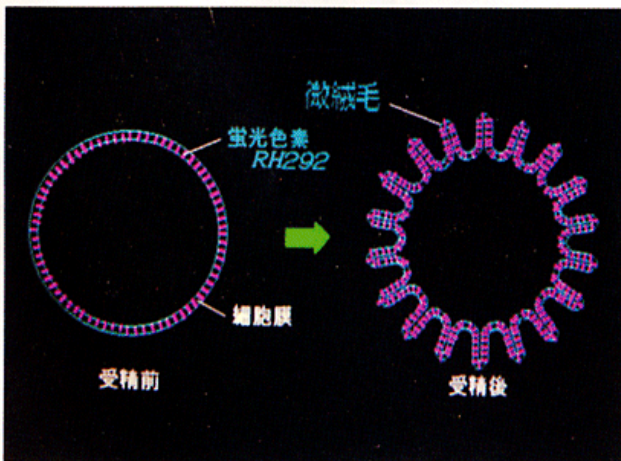


図 3 微絨毛伸長を蛍光色素の向きの変化として捉える。

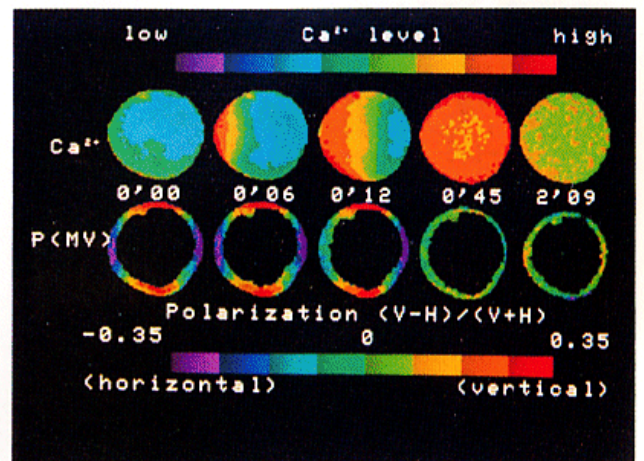


図 4 ウニ卵受精にともなうカルシウム波 (上段, 蛍光色素 Calcium Green 使用) および微絨毛伸長 (下段, 偏光度を色表示) の時間経過。

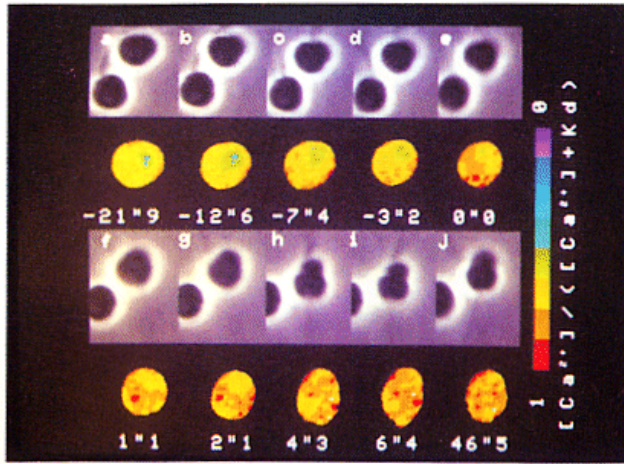


図 5 ヒトデ精子の先体反応と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化 (蛍光色素 indo-1 により測定)。

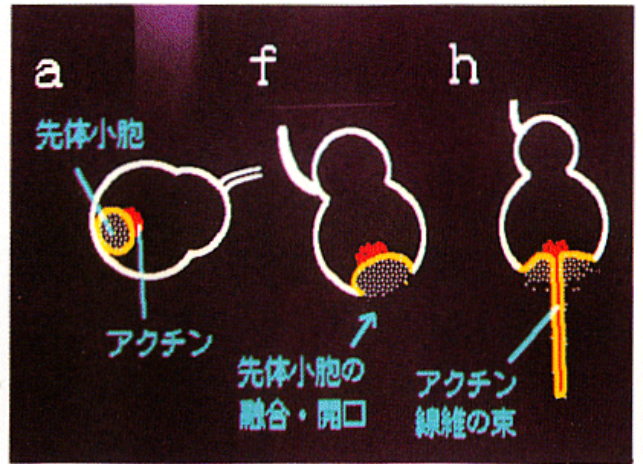


図 6 先体反応の模式図。記号は図 5 と対応。

光が卵表面に垂直に偏光した。微絨毛が伸びると細胞膜の向きが90度変わることになるのだが(図3), 確かに受精2分後の図2efでは偏光方向が90度変わっており, 微絨毛が伸びたことが示された。

図2dhは偏光度の計算値で, RH292の向きを色で表わしたと思えばよい。上下方向に向きが揃うほど暖かい色, 左右なら寒い色というわけである。

微絨毛伸長の時間経過の1例を, 色表示で図4の下段に示す。上段は, Ca^{2+} 感受性蛍光色素を使って同時に見た細胞内 Ca^{2+} 濃度である。卵の左側に精子が付着すると, そこから Ca^{2+} 濃度が上昇をはじめ, 卵全体に波のように伝わっていった。この「カルシウム波」から7秒ほど遅れて, 微絨毛伸長の波がやはり同じ速度で伝わっていった。

図2だけではわからないが, 受精膜も精子付着点から順々に形成されていく。この波も速度は図4と同じで, カルシウム波からは22秒ほど遅れる。微絨毛伸長も受精膜形成も Ca^{2+} が引き金となり, それぞれ反応時間が異なることがわかる。

pH 感受性色素の蛍光像は, 受精膜形成とほぼ同時, すでに Ca^{2+} 濃度が減少しはじめたときに, 細胞内 pH がゆっくりと上昇することを示した。こちらは, 波というより細胞全体が一様に変化するようには見えた。微絨毛伸長はよく見ると2段階におき, 第2段階がちょうど pH 変化と重なるが, 両者に関係があるかどうか, 現在検討中である。

精子の先体反応

精子の側で目立つ変化は, 図5の白黒の透過光像に見られるような先体突起の形成である。図6に示すように, まず先体小胞が細胞膜と融合して口を開き(図5の時刻0'0), 中の酵素を放出して卵を覆うゼリー層を溶かす。ついでアクチンが重合して小胞膜を押し上げ, 先端部分がゼリー層を突き抜けて卵の細胞膜と結合する。

先体反応も, Ca^{2+} が引き金となる。図5は人為的に細胞内 Ca^{2+} を増加させた実験だが, 色表示の Ca^{2+} 濃度がゆっくりと上昇するのに対し, 先体小胞の融合・開口が突然起きることがわかる。 Ca^{2+} 増加速度をいろいろ変えた結果, Ca^{2+} 濃度がある値に達したとたん先体反応が起きること

がわかった。そしてこの瞬間に, 細胞内 pH がすばやく上昇する。pH 上昇がアクチン重合の引き金となるという説に, 見かけ上符合する結果となった。

おわりに

卵の微絨毛の中にもアクチン線維束がある。また, 微絨毛伸長に先立って細胞内の小胞が細胞膜と融合し, 中身を外へ放出する。精子先体反応とよく似たシナリオである。

シナリオの大筋は見えていても, 因果関係の連鎖はまだ途切れ途切れで, 分子機作も不明な点が多い。連鎖のあちこちを人為的につついで, 結果を多画像顕微鏡で解析することにより, 受精反応の仕組みにせまりたい。

協同研究者の, 浜松ホトニクス(株)伊藤博康, 平野憲一, 慶應義塾大学中島陽子, 東京工業大学星元紀, 沖永龍之の皆様に, 深く感謝いたします。

Keisuke SUZUKI 慶應義塾大学大学院生(理工学部物理学科) 理学士

筆者紹介 [経歴] 平成3年慶應義塾大学物理学科卒, 同大学院修士課程在学中。[専門] 生物物理学。[趣味] トライアスロン, スキー。

Ichiro SASE 慶應義塾大学大学院生(理工学部物理学科) 理学士

筆者紹介 [経歴] 平成3年慶應義塾大学物理学科卒, 同大学院修士課程在学中。[専門] 生物物理学。[趣味] バレーボール, 野球(打者専門)。

Yuriko TANAKA 慶應義塾大学大学院生(理工学部物理学科) 理学士

筆者紹介 [経歴] 平成4年慶應義塾大学物理学科卒, 同大学院修士課程在学中。[専門] 生物物理学。[趣味] 犬と遊ぶ, 人形劇。

Kazuhiko KINOSITA 慶應義塾大学 教授(理工学部物理学科) 理学博士

筆者紹介 [経歴] 昭和44年東京大学理学部物理学科卒, 同大学院, 米国ジョンスホプキンス大留学を経て53年理化学研究所研究員, 平成元年より現職。[専門] 生物物理学。[おもな著書] 「蛍光測定」, 「限界を越える生物顕微鏡」(学会出版センター)。[趣味] スキー, マンガを読む, 皮肉。



鈴木

佐瀬 木下

田中

(© 1993 The Chemical Society of Japan)