

# 動物生理学実験 D

この実験実習では、ウニを使った初期発生の観察・精子運動の観察を行います。ウニは、周囲を海に囲まれた日本では入手しやすい実験材料であった点、卵と精子を多量に入手できる点、体外受精を行う動物のために人工的な受精が可能な点、卵割などの初期発生が観察しやすい点の利点があり、生物学の分野では永く使われて来ました。ここでは、配偶子となる卵と精子を使った基礎的な観察を行います。観察には、光学顕微鏡を使います。卵は直径 100-200  $\mu\text{m}$  の大きな細胞であるのに対して、精子は長さが 50  $\mu\text{m}$ 、頭部が約 3  $\mu\text{m}$ 、鞭毛の太さはわずか 0.2  $\mu\text{m}$  と細長い細胞です。観察の対象のサイズや観察目的に応じて、対物レンズの倍率や照明方法（暗視野照明・位相差顕微鏡）など、適切な方法を選ぶことが重要です。一般的な顕微鏡観察時の目安となる倍率は以下の通りです。小型シャーレの中に入れて直接観察する、あるいは、下図に示されたようなプレパラートを作成する場合によっても観察倍率は異なります。

卵の受精や発生過程を観察するとき： $\times 4 \sim \times 20$  倍の対物レンズ（明視野・暗視野・位相差）

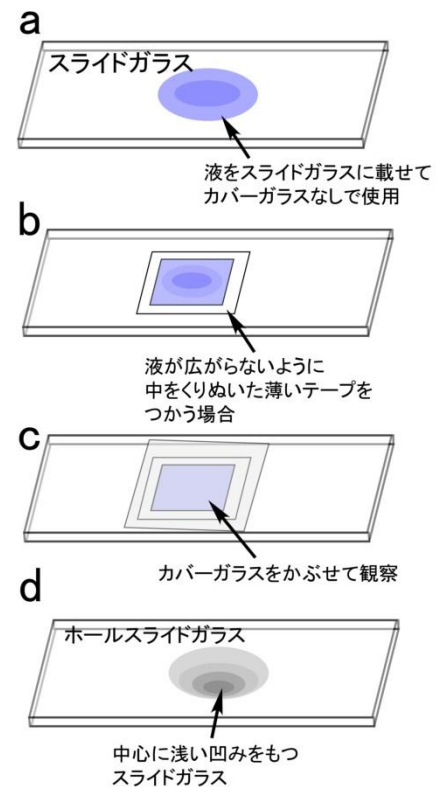
精子の形態を観察するとき： $\times 40$  倍の対物レンズ（暗視野・位相差、カバーガラス使用）

精子の運動を観察するとき： $\times 10 \sim \times 20$  倍の対物レンズ（暗視野・位相差）

## D - 1 ) ウニの初期発生の観察

### 観察の進め方

- はじめに、卵と精子をウニから取り出す方法をデモンストレーションします。次に各グループ（グループ分けは実験室入口ドアの掲示参照）でも同じように、採卵・採精の作業を行います。回収した卵と精子は 10~20°C で保存します。1 日目の実験の最後に残った精子は、0.25 mL または 1.0 mL エピペンドルフチューブ（マイクロチューブとも呼びます。MT と以下略します）に入れて、冷蔵庫内で保存して、2 日目の観察にも使用します（注：このテキストでは mL や  $\mu\text{L}$  を、ml や  $\mu\text{l}$  の代わりの表記方法として使用します）。
- 卵は海水中に放卵させて回収します。その時の海水を卵海水と呼びます。卵海水には受精を阻害する物質が含まれるために、集めた未受精卵は、海水で 2~3 回洗ったあと、10~20°C（バフンウニは、10~15°C、ムラサキウニは 15~20°C）で保管します。
- 精子は、海水中へは放精させません。海水に希釈すると、運動が活性化して、受精できる状態になりますが、数分間で著しく運動能・受精能が低下することがわかっています。精子は、♂個体を上向きに静置して（生殖孔を上側）、放精された濃度の濃い精子液を直接ピペット（200



卵や精子の観察方法

～1,000  $\mu\text{L}$  ピペットマン使用) で吸い取って、0.25 mL または 1.0 mL MT に集めます。または、シャーレに生殖孔を下にして静置し 10～20 分かけて放精させ後に、MT に回収する方法もあります (この場合、体腔液が混入する傾向あり)。このような海水に希釈する前の精子液を **dry sperm** と呼びます。一般に、**dry sperm** は、冷蔵庫内に保存することによって 1 週間ほど、運動能や受精能を維持します。

- d. 未受精卵をまず観察します。観察には、2つの方法があります。1つは、小型のシャーレに卵を懸濁した海水を取り、蓋をせずに、そのまま $\times 5 \sim \times 10$  倍の対物レンズを使用して観察します。この方法は海水の中に対物レンズを浸してしまう危険性が非常に高いので、常に顕微鏡を横から眺めて、海水の面と対物レンズの先端にある程度の隙間があるように注意しながら観察します。海水量を減らすと観察しやすくなりますが、水分の蒸発による塩濃度の上昇を引き起こすので、長時間の観察には適しません。
- e. もう一つの観察方法は、スライドガラスの上に卵を含む海水を 1～2 滴 (40～100  $\mu\text{L}$ 、方法によって異なります) を取って、前図のような方法で観察します。このような方法は、あとで卵を回収したり、培養を続けたりするには適していません。しかし、細かな構造を観察するには優れた方法です。 $\times 40$  の対物レンズを使う場合には、カバーガラスを使用するのは必須となります。スライドガラスの中心に、浅い凹みのあるホールスライドガラスは卵のような大きな細胞を観察するのに適しています。しかし、ガラスの凹面がレンズのはたらきをして、暗視野照明法や位相差顕微鏡の観察には適さないこともあります。
- f. 未受精卵の構造の特徴 (特に大きな特徴はないかも知れません) を観察した後、次に、以下の注意点を参考にして、受精の瞬間を観察します。この観察には、スライドガラス上に取ったばかりの新鮮な卵を使います (位相差顕微鏡か、暗視野照明が観察に適している)。未受精卵を確認できたら、希釈した精子液 (下記参照) をごく少量、ピペットや細いガラス棒を使って、スライドガラス上に置いた卵試料液の端に添加します。しばらくすると精子が卵へ向かって泳いで来て受精しますので、受精膜 (ウニの種によってはわかりにくい場合もあります) があがるまでの一連の変化を観察してスケッチとして残します。

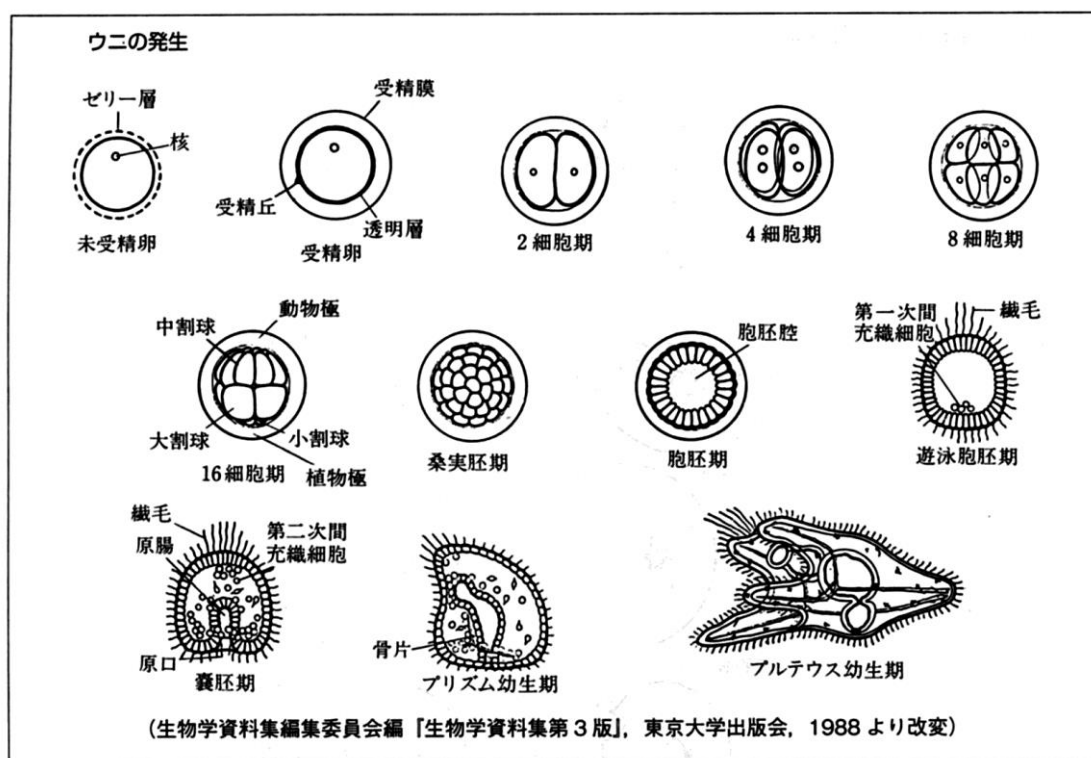
<注意点 I > 精子の希釈は可能な限り少量をとり (数  $\mu\text{L}$  以内)、それを  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  倍に希釈したものを、卵を含む海水に最終的に  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  倍量程度加えるのを、それぞれの細胞数の混ぜる比率の目安とします。卵の受精率 (受精膜の形成の見られる%) は、卵の鮮度や精子の活性 (受精能) に依存して大きく変わります。必要に応じて、精子濃度は、高めに、あるいは、低めに調節します。

<注意点 II > 希釈した精子は、数分でその受精能が著しく低下します。そのため、希釈後 1-2 分以内に使用するにします。また、容器や使用するピペット・ガラス棒などにわずかに残った精子があっても、卵が受精することもあります。一旦精子を扱った可能性のある容器類は、蒸留水や水道水で洗うことで、予期しない受精を防ぐことができます。

- g. スライドガラス上で受精を確認できたら、次に受精率や発生の過程を観察するために、シャーレ内で受精させます。まず、適量の未受精卵 (目安は、シャーレの底で塊にならないように一様に分散する程度) をとり、精子を上比率で混ぜ受精させます。この受精の時間を記録します。ほぼ 100%受精しているのを確認したら、一旦、海水を新鮮なものに交換して残った精子をできるだけ取り除くようにします。また、乾燥を防ぐために、海水の量は多めに入れて室温で保存します (直接、シャーレ内

の卵を観察するときは、海水は減らします)。受精率が悪い場合 (例えば<80%)、何らかの操作ミス  
の可能性があるので、fの操作を繰り返して、100%近い受精率となる条件を探します。

- h. 実験の期間 (2日間) に、その後の経時変化 (卵割から胞胚期・プリズム幼生まで可能な範囲で) を  
顕微鏡で観察し、スケッチします。室温 (約 20℃) に放置した場合に比べて、培養器内 (15℃) に置  
くと発生の速度を遅らせることができます。胞胚期 (通常、12~15 時間後) の胚を観察する場合、初  
日の実験が終了する 17:30 頃に受精させ、15℃培養器内に保管し、2日目の早めに使用します。
- i. このテキスト内の「実習に役立つ統計学入門」や、ダウンロードした例題を参考に、各グループでウ  
ニの平均卵割時間 (第1から第3か第4卵割くらいまで) を求めてみましょう。テキストをあらかじめ  
読んでおき、どのような手順でデータを収集するのが良いか各グループで話し合ってから実験を開  
始してください。1日目に卵割の様子をスケッチしながら大体の時間経過をつかんでおき、定量的な  
測定は2日目に行うのが良いでしょう。グループごとに全員分のデータをまとめてから数値処理を行  
います。



参照動画サイト (<http://www.bio.chuo-u.ac.jp/nano/index.htm>)



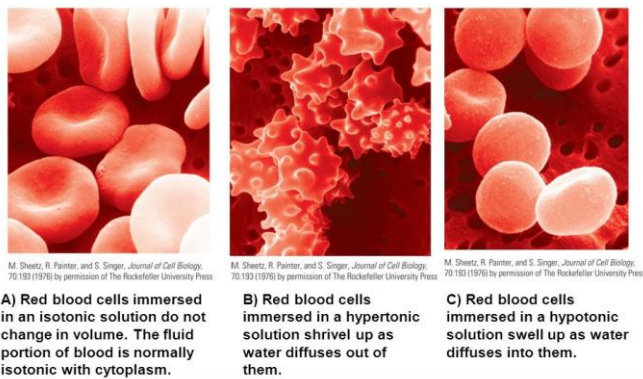
## 課題 D2 浸透圧がウニ未受精卵に与える影響

### A. 問題の提起 (Alleva et al., FEBS Letter 586:2991-2999, 2012)

浸透圧は、細胞内のホメオスタシスを左右する重要な因子であり、細胞の生存率にも大きく影響することがある。これまで、完全には、浸透圧（浸透性）の分子レベルでの理解は進んでいないが、近年、水を輸送するトランスポーター（アクアポリン）の実体が明らかになって来たことから、浸透圧差による水の移動機構は、研究上、注目されるようになった。今、解明すべき点は、浸透圧による水の移動の機構、その移動にアクアポリンがどの程度寄与しているかという点である。この review では、この問いに答えるべき手法について議論したい。浸透圧という 19 世紀以来研究されて来た知見とは、それに、*in vivo*、*in vitro*、*in silico* の研究から得られる新知見をどのように組み合わせるかが、重要な点であろう。Alleva et al., FEBS Letter 586:2991-2999 (2012)

### B. よく知られた例から（教科書的な知見）

#### Effects of tonicity in human red blood cells



What would happen to an RBC placed in a hypertonic solution? What about a hypotonic solution?

<https://www.quora.com/What-would-happen-to-an-RBC-placed-in-a-hypertonic-solution-What-about-a-hypotonic-solution>

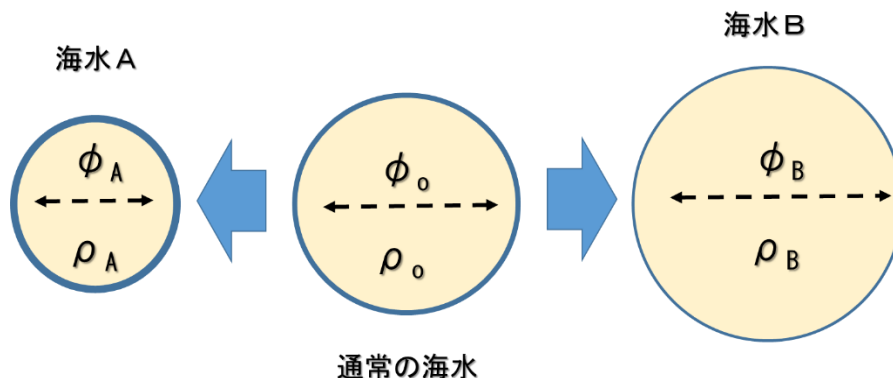
### C. この古典的な知見を確認した研究例



Osmolarity	150 mOsm	300 mOsm	600 mOsm	900 mOsm	1200 mOsm
Shape Distribution	S	D P1	D P1	D P1 P2	P1 P2 P3

浸透圧の異なる溶液内での赤血球の観察像。外液の浸透圧を上げると変形して、やがて崩壊する。S: 球状になったもの、D: 平盤型; P1: 変形が始まった細胞; P2: 中程度の変形; P3: 大きく変形した細胞。この大きく変形した細胞は、どの浸透圧でも見られた。突起の多い有棘赤血球（ウニ型突起細胞、echinocytes）は、いずれの溶液条件でも観察された、その分布 (%) を下の棒グラフで示している。Bambardekar, et al., 2014

C. ウニ卵を使った実験は可能だろうか



細胞は、外部の浸透圧 (osmosis, osmolarity, tonicity) が変えた時、どのような時間経過で、どのような体積変化を引き起こすのであろうか？ウニ卵は、球形の細胞で、直径の変化から、容易に体積変化を求めることのできる実験材料である。この利点を生かして、ここでは、浸透圧を変えたときの変化を予測し、計測する。

課題Ⅰ ウニ未受精卵は、回りの溶液の浸透圧の違いで、どのように (how, when) 反応すると考えられるか。

課題Ⅱ そのウニ卵の反応は、どのような手法で観察 (確認) するのが効率的か。

課題Ⅲ 上の実験で得られた結果は、どのように解釈できるか。そこで起こっている現象をどのように説明できるだろうか。

課題Ⅳ 上の考察の是非を確かめるには、次のどのような実験を計画すべきか？

これまでの実験で用いたものに加えて、以下のものを実験室に準備します。

・通常人工海水 (～1154 mOsm)  
成分：470 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM Tris-HCl, pH 8

・高張人工海水 (～2308 mOsm)  
成分：1047 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM Tris-HCl, pH 8

・低張人工海水 (～230 mOsm)  
成分：8 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM Tris-HCl, pH 8

他に実験室に準備して置いてほしいものがある場合は、[skam@bio.chuo-u.ac.jp](mailto:skam@bio.chuo-u.ac.jp) へメールでリクエストしてください (12/20 午前中まで)。