

平成19年4月11日

平成18年度「両生類の生活環に対する重力影響」活動報告書

代表者所属 氏名 広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設 柏木昭彦

1. 構成メンバー

氏名	所属
柏木昭彦	広島大学大学院理学研究科
柏木啓子	広島大学大学院理学研究科
古野伸明	広島大学大学院理学研究科
坂井雅夫	鹿児島大学理学部
渡部 稔	徳島大学総合科学部
吉留 賢	鳥取大学医学部
藤井博匡	札幌医科大学保健医療学部
久保英夫	東京都臨床医学研究所
新海 正	東京都老人総合研究所
山下雅道	宇宙航空研究開発機構

2. 本年度 WG 会合開催実績

(1) 第1回：平成19年1月16日

3. 活動目的

宇宙進出は人類が長年にわたって抱き続けてきた夢である。しかし、宇宙の環境は地球のそれとは多くの面で異なっており、その変化に人類が耐えることができるか否かを調べるのが宇宙進出に不可欠である。そのことを調べるのに両生類が良いモデル生物であることは、これまでの多くの研究から明らかである。我々は平成16年度からWGに選定され、カエルを材料としてその生活環（初期発生・変態・減数分裂）全体に対する過重力の影響を継続して研究している。今までに、初期発生に対する影響を調べ報告した。昨年度からは、

アフリカツメガエルを用い、恒常性の維持に重要な役割を果たす視床下部-脳下垂体-標的器官を軸とした内分泌系への過重力の影響について解析を進めている。その結果、過重力環境に置かれた変態開始期（St57）の幼生および変態最盛期（St66）に達した幼若ガエルの脳下垂体と甲状腺に形態学的な変化が認められた。さらに、卵母細胞から未受精卵へ変化する過程である卵減数分裂（卵成熟）に対する過重力の影響を調べたところ、卵母細胞の外見的变化から、卵成熟の進行にも影響を与えることが分った。今年度は、それらの研究を発展させ、1) 内分泌系の上位制御部域である視床下部への影響と、2) 卵成熟過程での紡錘体形成に対する影響、について研究した。

4. 活動内容

WGの会合では、上記の2つの課題に対して新海、古野がそれぞれの結果を報告し、その内容について質疑応答を行った。また、今後の研究の進め方などについても議論した。活動目的にあげた課題に対する結果を以下に記す。

1) アフリカツメガエルの視床下部-脳下垂体系に対する過重力の影響

アフリカツメガエルの幼生を、2Gおよび5Gに長期間暴露してSt57の幼生とSt66の仔ガエルの視床下部正中面の計測を行った。その結果、縦軸長は、実験群の方が無処理対照群よりもおよそ10%短くなっていた。また、横軸長も対照群と比べて、実験群の方が2G下で12%程度、5G下で10%程度短くなっていた。以上の結果から、過重力環境下では幼生や仔ガエルの視床下部は小型になることがわかった。しかし、小型の視床下部が正常に機能しているのか、あるいは視床下部の小型化が体の発達に直接関係するかどうかについては、

今のところ、よく分からない。

カエルの変態には甲状腺ホルモンが直接関与しており、このホルモンは視床下部より分泌される甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) により調節されている。TRHは視床下部の幾つかの領域の細胞より分泌されるが、視索前核もその1つである。そこで、アフリカツメガエルの視索前核に対する過重力の影響について形態学的に調べたところ、2G、5Gともに細胞の形状、細胞密度は1Gと比べ大きな変化は認められなかった。このことは過重力が視索前核のTRH分泌機能に影響を与えない可能性を示唆するものである。

変態開始初期には正中隆起は視床下部と脳下垂体主葉の中間に位置し、正中隆起の中には毛細血管網が発達、その血管壁に視床下部の神経分泌細胞の軸索が接する。この神経分泌細胞が分泌するTRHは正中隆起から脳下垂体主葉へと達し、甲状腺刺激ホルモン産生細胞から甲状腺刺激ホルモン、次いで甲状腺の濾胞上皮細胞から甲状腺ホルモンが分泌されて最終的に変態に関わるいろいろな変化が引き起こされることとなる。

実験群の正中隆起正中面の横軸長は、発生 の進行とともに減少した。しかし、正中隆起の分化は対照群と同様によく進んでおり、過重力環境下でも視床下部—脳下垂体系十分に機能しているものと思われた。

私達は今回、アフリカツメガエル幼生に過重力を暴露し、変態制御に関与する内分泌系のうち、甲状腺よりも上位に位置する視床下部と正中隆起にどのような形態学的変化が起こるかに着目した。これらの器官は実験群では一般に、形状は対照群と似ているが、小型化することが明らかになった。このことは、通常とは異なった重力環境が内分泌系諸器官のホルモンの合成・分泌機構に変化を与え、恒常性の維持に影響を与える可能性を示唆している。

2) アフリカツメガエルの卵成熟過程の紡錘体形成に対する過重力の影響

田沢らは昨年、過重力は、卵成熟の開始には影響を与えないが、出現した白斑の外観に影響を及ぼすことを報告した。このことは、過重力が卵の内部構造にも影響を与

えることを強く示唆する。そこで、卵の主な内部構造体である分裂装置に注目し、過重力に対する影響を調べた。そのため、ステージVIの卵母細胞を無処理群と2G、5Gの実験のためそれぞれ

150個集め、卵成熟誘起ホルモンであるプロゲステロンで処理を行い、その直後から2G、5Gの過重力をかけた。その後、白斑出現の開始期を0時間として、1時間ごとに4時間まで卵母細胞を集め、スミスの液で固定したのち、包埋して切片を作製し、シッフ試薬で染色した。対比染色にはファーストグリーンを使用した。白斑出現1時間後に、無処理群では、細胞膜に対して垂直の紡錘体が形成されていた。同様の結果は2G、5G処理群でも得られた。この結果は、過重力は白斑の形状には影響を与えるものの、第一減数分裂の紡錘体形成には影響をしないことを示す。白斑出現後2時間では、無処理群、2G、5G処理群でも、正常に第一極体が放出される像が得られた。これらの結果から、分裂装置の形態で見る限り正常に第一減数分裂は終了しており、過重力は第一減数分裂には影響しないことが明らかになった。

次に、我々は過重力が第二減数分裂の紡錘体形成に影響するのかどうか調べた。そのため、白斑出現後、3時間および4時間に卵を集め分裂装置の形態を観察した。その結果、無処理卵では、極体を伴った縦のスピンドルが観察された。それに対して、2G処理卵のうち、約70%は正常な縦のスピンドルが見られ、残りの30%はロゼッタ様の星状体(または単極)の分裂装置が観察された。この傾向は5Gでより一層強まり、調べた卵のうち約30%が正常で、残りの70%に同様の異常な分裂装置が認められた。これら異常な紡錘体では、受精後に第二極体を正常に放出できないと考えられるため、これらの卵は正常に発生しないことが予想される。以上の結果から、過重力は、第二減数分裂の分裂装置の形成に影響を与えることが示唆された。

卵成熟過程は減数分裂の一過程であるが、生物環が宇宙環境下で正常に回るかどうかを検証する上で調べなければならない重要な過程である。しかし、宇宙環境下での研究はほとんどない。これまでに唯一

報告されたマウスの卵母細胞を用いたクリノスタートの実験では、卵成熟には影響しないとされている。我々のアフリカツメガエルを用いた一連の研究から、過重力は卵成熟の開始には影響しないものの、白斑の色や大きさに影響を与えること、さらに、本研究において、第二減数分裂でも紡錘体が正常に形成されず、アスター構造になることが観察された。特に、紡錘体形成不全は、正常な未受精卵ができないことを意味し、過重力は、卵減数分裂に重篤な影響を与えることが初めて示された。

5. 成果

原著論文

Kawakami, S., Kashiwagi, K., Furuno, N., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2006) Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145, 65-72

Furuno, N., Tazawa, I., Kashiwagi, K., Kawakami, S., Shinkai, T., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2006) The effect of hypergravity on bipolar spindle formation of meiosis II in *Xenopus* oocytes. *Biological Sciences in Space* 20, 92-94

Shinkai, T., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Matsuda, M., Urano, S., Sato, H., Kubo, H., Furuno, N., Sakai, M., Watanabe, M., Yoshitome, S., Fujii, H. and Yamashita, M. (2006) Effects of hypergravity on pituitary-target organs in the frog, *Xenopus laevis*, *Biological Sciences in Space* 20, 40-43

Furuno, N., Tazawa, I., Kashiwagi, K., Shinkai, T., Yoshitome, S., Watanabe, M., Yamashita, M. and Kashiwagi, A. (2007) Effects of hypergravity on oocyte maturation in *Xenopus laevis* II. *Space Utiliz. Res.*, 23, in press

Shinkai, T., Matsuda, M., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Furuno, N., Urano, S., Kubo, H., Sakai, M., Fujii, H., Yamashita, M. (2007) Effects of hypergravity on the hypothalamus-pituitary axis in the frog, *Xenopus laevis*. *Space Utiliz. Res.*, 23, in press

学会発表

川上智美、柏木啓子、古野伸明、柏木昭彦、山下雅道、谷本能文。アフリカツメガエルの発生と遺伝子発現に対する過重力と強磁場の影響。電気学会マグネテイクス研究会、九州大学西新プラザ、福岡 5.17-18, 2006

古野伸明、田澤一朗、柏木啓子、川上智美、新海正、山下雅道、柏木昭彦 過重力はアフリカツメガエル卵成熟の進行に影響を与える。第20回宇宙生物科学会 大阪市大、9.28-29

新海正、柏木昭彦、柏木啓子、松田道子、浦野四郎、佐藤嘉哉、久保英夫、古野伸明、坂井雅夫、渡部稔、吉留賢、藤井博匡、山下雅道 アフリカツメガエルの脳下垂体—標的器官に対する過重力の影響。第20回宇宙生物科学会 大阪市大、9.28-29

古野伸明、田澤一朗、柏木啓子、新海正、吉留賢、渡部稔、山下雅道、柏木昭彦。アフリカツメガエル卵成熟過程に対する過重力の影響 II。第23回宇宙利用シンポジウム、日本学術会議、東京、1.15-17, 2007
新海正、柏木昭彦、柏木啓子、古野伸明、浦野四郎、松田道子、久保英夫、藤井博匡、坂井雅夫、山下雅道：アフリカツメガエルの視床下部—脳下垂体系に対する過重力の影響。第23回宇宙利用シンポジウム、日本学術会議、東京、1.15-17, 2007

学位論文

川上智美 Effects of hypergravity environments and strong static magnetic fields on amphibian development, gene expression and apoptosis (両生類の発生、遺伝子発現およびアポトーシスに対する過重力と強磁場の影響). 広島大学

注1：報告書は3ページ程度としてください。必要に応じ、資料を添付してください。

注2：研究費のサポートを受けたWGは、活動の概要を記述した英文パワーポイントの資料（2ページ程度）も作成し提出してください。