

## ホヤ卵形成過程における付属細胞と卵母細胞との関わり

著者	島井 光太郎, 石井 宏和, 西方 敬人
雑誌名	甲南大学紀要. 理工学編
巻	56
号	1
ページ	31-41
発行年	2009-12-25
URL	<a href="http://doi.org/10.14990/00000162">http://doi.org/10.14990/00000162</a>

# ホヤ卵形成過程における付属細胞と卵母細胞との関わり

島井光太郎<sup>1</sup>, 石井 宏和<sup>2</sup>, 西方 敬人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>甲南大学大学院 自然科学研究科

<sup>2</sup>甲南大学大学院 フロンティアサイエンス研究科

(受理日 2009年10月15日)

## 1. 緒言

典型的なモザイク卵として知られるホヤの卵では、未受精卵で母性因子が局在し、その局在が初期発生において極めて重要な役割を担っていることが知られている。それらの母性因子がいつ、どのように準備されていくのかを明確にすることは、ホヤ卵形成過程を知る上でも、初期発生過程のメカニズムを理解する上でも重要である。

### 1.1 卵形成

卵形成とは、生殖巣に入った卵原細胞から成熟卵が形成される過程である。卵原細胞は卵巣内で有糸分裂を重ねて増殖するが、やがて減数分裂を開始し、卵母細胞と呼ばれるようになる。多くの脊椎動物において、この卵母細胞のステージは比較的長期間となる。その間、卵母細胞は減数分裂前期で停止し、その核は大きく膨潤し、特徴的な卵核胞 (Germinal vesicle, GV) を形成する。卵核胞内では、キアズマが形成されて遺伝子の組み換えが起こり、ランプブラシ染色体が形成されてRNAが盛んに合成され、卵という特殊な細胞を作り上げる過程が進行している。その一方で、卵母細胞の周囲に存在するいくつかの体細胞 (付属細胞) でも mRNA やタンパク質の合成が盛んに行われており、卵母細胞の成長に寄与していると考えられている。初期の卵母細胞は生殖上皮内に存在するが、卵胞細胞に囲まれた卵胞として卵巣のストロマ内に膨出してくる。その卵胞内で、卵母細胞は著しく体積を増加させて成長し、十分に成長した卵母細胞 (full grown oocyte) と呼ばれるようになる。卵母細胞はその後、ホルモンによって減数分裂が再開され、2個あるいは3個の極体を生じ、成熟卵となる。この過程を卵成熟という。成熟卵は、排卵により卵巣から放出され、未受精卵として受精を待つこととなる。

### 1.2 ホヤにおける卵形成過程

ホヤの卵形成も、基本的に上述の脊椎動物と同様の過程を経る。ただしホヤ卵は、卵殻の内側にテスト細胞 (Test cell; TC) を含む「複合卵」と呼ばれる特徴的な構成をしている。つまり、未受精卵は、卵殻 (Chorion) の内側に TC、卵殻の外側に卵胞細胞 (inner follicular cell; IFC) が並び、2種類の付属細胞を持つ卵である。

これら2種の細胞は、ともに体細胞由来であり、初期卵胞内に存在する未分化な付属細胞である primary follicular cell (PFC) から分化してくると考えられている。PFC から TC と IFC への分化の方向付けがなされた細胞の間に卵殻が形成され、TC がその内側

に、IFC がその外側に並ぶようになる。IFC は、細胞内に大きな液胞を持ち、透明で大きな細胞であり、卵巣内では明確に区別できる。また卵巣内においては、IFC のさらに外側に outer follicular cell (OFC) が存在する。OFC は比較的初期から分化する付属細胞で、卵母細胞と TC、IFC 全体を囲むように扁平に広がり、卵胞を形成している。

### 1.3 これまでのステージング

これまでのホヤ卵形成過程に関わる報告のなかで、卵母細胞のステージングの方法は大きく2つある。1つめは、大きさや卵黄の蓄積、細胞質の色合いなどを主な指標として行う方法で、透明で小さな前卵黄形成期 (pre-vitellogenic oocyte/Stage I)、不透明で中間的サイズの卵黄形成期 (vitellogenic oocyte/Stage II)、細胞質の着色が見られ十分な大きさに成長した後卵黄形成期 (post-vitellogenic oocyte/Stage III) の3つに分類される (Cowden, 1961; Kessel, 1983; Swalla *et al.*, 1991; Prodon *et al.*, 2006)。

もう一つの方法は、電子顕微鏡による超微細構造の観察によるものである。Sugino ら (1987) は、ユウレイボヤ *Ciona savignyi* の卵形成過程における付属細胞の形態変化をもとに、卵母細胞を5つのステージに分類した。また Manni ら (1994) は、イタボヤ *Botryllus schlosseri* の卵形成過程を細胞小器官やエンドサイトーシスの有無などをもとに5つのステージに分類した。

前者の指標では、変化が連続的であり、色合いの変化は個体差も大きい。また、後者の手法では、抗体染色や *in situ* ハイブリダイゼーションなどの今後の解析との整合性を取りにくい。そこで今回我々は、Sugino らによる *Ciona savignyi* での報告を参考に、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* 卵巣における卵母細胞のステージングを光学顕微鏡レベルで簡便かつ明確に行うことを目的に、付属細胞の形態変化を詳細に記載し、新しいステージングの基準を提案する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 動物

カタユウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の成体は、神戸大学海事科学部で採取されたものおよび京都大学附属舞鶴水産実験所において養殖されたものを使用した。採集したカタユウレイボヤは18 恒明条件下で飼育された。

### 2.2 DAPI 染色

卵巣を摘出後、4%ホルマリン海水を用いて固定した。100%エタノールで脱水を行った後、50%キシレン1回、100%キシレン2回、50%キシレン・パラフィン、100%パラフィン2回の操作を経てパラフィンに置換し、包埋した。切片の厚みは8 $\mu$ m。卵白アルブミンを用いてスライドガラスに接着した。脱パラフィンの後、PBSTに置き換え、2.0 $\mu$ g/ml DAPI を用いて核染色を行った。

### 2.3 抗体染色

卵巣を摘出後、約5mm角の小片にはさみで切断、100%メタノールを用いて固定した。100%エタノールに置換後、ポリエステルワックス (BDH, England; Steedman, 1957)

に包埋し、 $8\mu\text{m}$ の厚さで切片を作製した。一次抗体はBlocking One (Nakarai tesque, Kyoto, Japan) で1/100に希釈したanti- $\alpha$ -Tubulin clone-DM1A (CLT9002: CederLane, Ontario) を用いた。二次抗体は同じくBlocking One で1/100に希釈したFITC-Goat anti-mouse IgG+M (H+L) (A-108FS: American Qualex, San Clemente) を用いて、上記と同様の手順でDAPIによって、二重染色を行った。

## 2.4 写真撮影

DAPI 染色および抗体染色の観察には BIOREVO BZ-9000 (Keyence, Osaka) を用いた。細胞数、面積は BIOREVO 付属の解析ソフト (BZ-H1M, Keyence, Osaka) によって測定した。

## 3. 結果

### 3.1 付属細胞の形態による卵形成過程のステージング

今回我々は、卵胞における付属細胞の形態を主な指標として、光学顕微鏡下で観察可能な範囲内で卵巣内の卵形成過程を以下の5つのステージに分類した (Fig. 1)。

#### ステージ1：付属細胞が卵母細胞表面に散在する

卵母細胞の直径では、 $10\sim 60\mu\text{m}$ 。このステージの卵母細胞の周囲には、PFC と OFC の2種類の付属細胞が見分けられる。PFC は卵母細胞の周りに点在し、卵表層に埋まり込んでいるものもあれば、表面に付着しているようにみられるものもある。OFC は、既に扁平になり、卵母細胞と PFC の周囲を取り囲んでいる様子が観察できる。卵巣上皮から連続的に連なっている柱状の小さな卵母細胞 (直径 $10\sim 30\mu\text{m}$ ) の周囲にも同様の付属細胞が観察されることから、明確な卵胞が形成されるかどうかにかかわらず、ステージ1と分類した。この時の卵母細胞はすでに明確なGVを持ち、小さな卵母細胞内でGVの占める割合が高く、光学顕微鏡下でも他の小さな細胞から容易に区別できる。

一方、このステージの卵母細胞の比較的大きなもの (直径 $30\sim 60\mu\text{m}$ ) では、卵巣ストロマ内で OFC に囲まれた明確な卵胞を形成している。PFC は卵母細胞の成長に伴い、その数を増しているようで、卵母細胞の全周にわたってほぼ一層に並んでいるものも観察される。さらに、2つのほぼ同様の形態をした PFC が隣接して観察される場合も多く、PFC の分裂直後の様子とも考えられる。また、このステージの卵母細胞は、丸みをおびた不規則な多角形をしており、周囲の卵胞に圧迫されているように見える。

#### ステージ2：多数の付属細胞が卵母細胞表層に積み重なる

卵母細胞の直径では、 $60\sim 75\mu\text{m}$ 。このステージの卵母細胞の周りでは、多くの PFC が積み重なって卵母細胞の表層を取り囲んでいる。DAPI 染色によって多くの核が見られるものの、位相差観察では PFC の細胞質が薄茶色に着色し、密に重なり合い、卵母細胞表面にも埋まり込んでおり、PFC の細胞境界や卵母細胞の細胞膜を明確に確認することはできない。しかし、その外側を取り囲む OFC は、ステージ1と形態的に変化は見られず、卵胞として確認できる。

### ステージ3：IFCが明確に分化する

卵母細胞の直径では、75~90 $\mu\text{m}$ 。卵胞内で明確な卵殻が観察され、その内側にTCが、外側にIFCが一層に並んでいるのが観察される。TCでは、ステージ2で見られたPFCと明確な形態的变化はみられない。しかし、ステージ2で積み重なっていたTCは、卵母細胞表面に再びほぼ一層にきれいに並ぶ傾向にある。その際、TCは卵母細胞表面に埋まり込むように位置している。また、位相差観察において、TCの細胞質が徐々に薄茶色から黒っぽい色調に変化してくる。一方、卵母細胞膜外において、IFCの細胞質内に大きな液胞が作られ、細胞の体積が著しく増大する。またそのため細胞質が透明になり、細胞境界等は透過光で観察しにくくなるものの、細胞1つにつき1つ、細胞内にくっきりとした輪郭を持つ直径3 $\mu\text{m}$ 程度の小さな球形の小胞を持つようになり、体積の増大と合わせて、他の付属細胞と明確に識別できる (Fig. 2B)。この小胞は、UV励起光 (360/40nm) によってDAPIより弱い淡青色の蛍光を発することから、DAPI染色での観察には注意を要するが、位相差観察では、核よりも明確な輪郭を示すことから容易に区別できる。

### ステージ4：ポケット構造を持つ

卵母細胞の直径では、90~100 $\mu\text{m}$ 。このステージの卵母細胞の細胞膜には、内側に落ちくぼんだ特徴的な構造が存在する (Fig. 2D)。今回、我々はこの構造を「ポケット構造」と呼ぶ。このポケット構造は、このステージの卵母細胞のどの切片においても全周にわたって見られるため、卵母細胞の細胞膜全体を覆い包むように存在すると考えられる。また、いくつかの連続切片からそのポケット構造を再構成してみたところ、それぞれは不定形であり、湿地に様々な形の湖沼が広がっているような外観であろうと考えている。ポケット構造の深さは約10 $\mu\text{m}$ で、その形態にもよるが、一枚の切片では数個から十数個程度TCが一つのポケットに入り込んでいる。これらのTCの核の付近には、位相差観察で顆粒状の構造がみとめられ、TCの細胞質はより暗い色調に見える。IFCやOFCの構造には、おおきな変化は見られない。

### ステージ5：卵成熟

卵母細胞の直径では、100~130 $\mu\text{m}$ 。卵母細胞では、GVが観察されなくなり卵成熟が進行したものと考えられる。また卵細胞質の質感もなめらかなものとなり、卵成熟後の細胞質の変化 (Prodon *et al.*, 2006) を示していると考えられる。その際、卵母細胞表層の構造も大きく変化し、明確な輪郭を示すようになる。それに伴い、ポケット構造も含めて卵母細胞の表層に埋まり込むように存在したTCは、卵表面に接するように存在し、所により卵表面から離れ、卵殻の内側に貼り付いて見える場合もある。卵殻と卵母細胞表面との間の空間は明確には確認できないが、囲卵腔の形成と位置づけられる。

また、このステージのIFCは切片作製の際に剥がれ落ちるものが多いせいか、なかなか観察できない。コリオンの外側にIFCの一部と思われる細胞が一層に並んでいることも多く、さらに体積を増したIFCがコリオンの外側に大きく広がっているものと考えられる。

卵成熟に伴い、卵は卵胞より輸卵管に向けて放出され、それに伴い、卵母細胞の周囲にOFCは観察されない。

このステージの卵は、卵巣切片での観察ではあまり見られない。今回の計測では、約6% (14/239) であった。卵成熟後、順次輸卵管へと移動しているためと考えられる。

### 3.2 付属細胞形態と細胞サイズの関係

付属細胞の形態からステージ分けした卵胞について、その卵母細胞の最大の面積を与えられた切片上での面積を求め、その値をもとに卵を球形と仮定した際の直径を算出した ( $n = 239$ )。それぞれのステージについてその直径をプロットし、その散らばりを見るとともに (Fig. 3), それぞれのステージでの卵母細胞の直径の平均を求めた。それぞれのステージでの直径の平均は; ステージ 1 =  $42.8\mu\text{m}$ , ステージ 2 =  $69.5\mu\text{m}$ , ステージ 3 =  $89.0\mu\text{m}$ , ステージ 4 =  $95.9\mu\text{m}$ , ステージ 5 =  $102.3\mu\text{m}$  であった。これら直径の平均がステージを追うに従って大きくなることから、ステージングの時間的な並びに齟齬の無いことが確認できた。また、Fig. 3の散らばりの様子も参考にしながら、それぞれのステージにおける卵母細胞の直径の範囲を大まかな数字で区切り、解析の際のステージングとした。ステージ 1 からステージ 3 にかけて卵母細胞のサイズ増加が比較的顕著に起きているのに対し、ステージ 4, 5 では比較的緩やかに増加する傾向にあることが分かる。

### 3.3 付属細胞数の計測

それぞれのステージの卵胞にある OFC 以外の付属細胞、つまり PFC あるいは TC や IFC の核の数を数え、その卵胞での卵母細胞の直径を横軸に取りプロットした (Fig. 4)。ステージ 1 では十数個から100個程度の PFC に囲まれている。この時期は、PFC の卵表層での配置からも分かるとおり、卵母細胞の表面積の増加にともない、PFC の数も次第に増加している。それに対し、ステージ 2 では、PFC の細胞数の急速な増加が見られ、それが卵母細胞の表面積の増加をしのぐため、卵表層に積み重なった PFC が観察されるものと考えられる。ステージ 3 では TC と IFC が分化してくるが、その際、TC の約1/10の細胞が IFC として分化してくることが分かった。これまで、PFC が分裂する際に TC と IFC が分化し、その後 TC と IFC で分裂回数が異なるとの考えもあったが、今回の結果はそれを否定し、TC と IFC の分化が卵胞内部の何らかの細胞間のシグナルにより PFC の段階で調節されていることを示しており、そのメカニズムは興味深い。また、ステージ 3 から 4 にかけて TC も IFC もさらにもう一度細胞分裂を行っていると考えられた。

### 3.4 卵形成過程における付属細胞内での $\alpha$ -Tubulin の局在

付属細胞の分化や増殖にしたがって細胞骨格のさまざまな形態変化が見られるものと期待して、抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体による卵巣切片の染色を行った。卵母細胞では細胞質全体が弱く染色されるものの、目立った局在性は見られなかった。PFC や TC では、特徴的な染色は見られなかった。一方、ステージ 3 で液胞が大きく広がった IFC では、液胞の外側を取り囲むように明るい染色が見られた。さらに、ステージ 2 で積み重なった PFC の中で、最外層に位置するいくつかの細胞において細胞が長円形になり、内部に液胞が形成され始め、その液胞を取り囲むように分裂装置にも似た形態を示す特徴的な染色が観察された (Fig. 5)。

## 4. 考察

### 4.1 Sugino らのステージングとの比較

Sugino ら (1987) は、今回観察した *Ciona intestinalis* と同じ属の *Ciona savignyi* において、卵母細胞を以下のステージに分類している。ステージ 0：卵母細胞の直径が 40 ~ 60 $\mu\text{m}$  であり、生殖上皮内に存在する。このステージの卵母細胞の近くには dark cell および clear cell と呼ばれる付属細胞が存在する。ステージ 1：卵母細胞の直径が 60 ~ 80 $\mu\text{m}$  で、生殖上皮から卵巣ストロマに膨出され、その周囲に PFC と OFC が存在する。ステージ 2：卵母細胞の直径が 80 ~ 90 $\mu\text{m}$  であり、PFC の形状が丸くなり、細胞数が増加する。ステージ 3：卵母細胞の直径が約 100 $\mu\text{m}$  で、卵殻原基が 2 つの PFC を分けるように入り込み、その内側の PFC は TC へ、外側は IFC に分化する。ステージ 4：卵母細胞の直径 110 ~ 140 $\mu\text{m}$  で、卵母細胞表面は TC で占められる。TC の中にある電子密度の高い顆粒はサイズが増し、IFC は泡状の液胞ならびに特徴的な小胞が明瞭となる。

我々のステージングと Sugino らによるステージングの大きな違いは、Sugino らが付属細胞と卵母細胞の細胞内超微細構造を主な指標としているのに対し、われわれが付属細胞の形態や数、さらにそれらの配置に注目し、卵巣全体の形態を総合的に指標としている点である。

Sugino らによるステージ 0 とステージ 1 の大きな違いは、卵母細胞の卵巣内での場所と付属細胞の分化段階だが、われわれのステージングでは核の染色を指標としているため、少数の PFC をもつ卵母細胞として 1 つにまとめている。Sugino らによるステージ 2 の細胞数の増加は、我々のステージ 2 に相当する。双方のステージ 3 において、TC と IFC の分化を指標とできる点は一致しているようであるが、超微細構造上の変化と光学顕微鏡レベルでの変化との一致には疑問が残る。その意味で、Sugino らによるステージ 4 が、我々のステージ 3 に相当すると考えられる。

### 4.2 新しいステージングの意義

ゲノム情報も整い、ヒトを理解するためのモデル生物として確立された *Ciona intestinalis* において、卵形成過程に関しては、未解決な問題が多い。さらに、その解析のための基本となる卵形成過程の明確なステージングもいまだ確立されているとは言い難い。このような状況の中、卵形成過程全般にわたり、光学顕微鏡下での観察により、簡便かつ明確にステージングできた今回の結果は、今後の解析を行うためにも意義深いと考える。

また今回の付属細胞の記載により、その細胞数の増加や細胞分化の様子が明確に記述できた。特に、ステージ 2 および 3 での細胞増加、ステージ 2 から 3 にかけての IFC の分化は、その調節メカニズムを考える上で重要な情報となった。さらに、それら付属細胞の挙動と卵母細胞の体積増加との関わり、ポケット構造という特徴的な形態で卵母細胞と相互作用する TC の役割など、卵母細胞と付属細胞との関わりを考える上で貴重な知見が得られた。

## 5. 結語

今回我々は、カタユレイボヤ卵巣内での卵形成過程を明らかにする第一歩として、卵

母細胞のステージングをおこなった。これまでの電子顕微鏡での観察結果をもとにしたステージングなども参考にしながら、光学顕微鏡下での観察から簡便かつ容易にステージの区別ができるよう、付属細胞に着目した。そこで、一つの卵胞を形成する卵母細胞とその付属細胞に関して、付属細胞の形態的特徴や細胞数などを詳細に記載するとともに、その卵母細胞の直径を計測し、卵母細胞の成長の指標とした。その結果、卵形成過程を明確な5つのステージに分けることができた。また、ステージ2および3における、PFCの急速な分裂・増殖、ステージ2から3にかけてのTCおよびIFCの分化を明確に示すことができた。これらのステージでは、卵母細胞の体積の急激な増加も見られ、卵母細胞の成長とこれら付属細胞との関係が示唆された。

## 6. 謝辞

本研究に用いたホヤ成体は、文部科学省ナショナル・バイオリソース・プロジェクト(NBRP)により京都大学より提供を受けました。京都大学の佐藤ゆたか准教授ならびに平山和子氏に感謝いたします。またホヤの採取にあたっては、神戸大学海事科学部の古荘雅生教授にもご協力いただきました。本原稿を作成するにあたり、甲南大学理工学部の日下部岳広教授にご助言を頂きました。また本研究の一部は、文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業(2009-2014)のご支援を頂きました。以上、ここに感謝の意を表します。

## 参考文献

- Cowden RR (1961) A comparative cytochemical study of oocyte growth and development in two species of ascidians. *Acta Embryol Morphol Exp* 4: 123-141
- Kessel RG (1983) Intranuclear membranes (vesicles, lamellae, annulate lamellae) in oocytes of the ascidian, *Styela partita*. *J Submicrosc Cytol* 15: 773-785
- Manni L, Zaniolo G, Burighel P (1994) Ultrastructural study of oogenesis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri* (Tunicata). *Acta Zoologica* 75: 101-113
- Prodon F, Chenevert J, Sardet C (2006) Establishment of animal-vegetal polarity during maturation in ascidian oocytes. *Dev Biol* 290: 297-311
- Sugino YM, Tominaga A, Takashima Y (1987) Differentiation of the accessory cells and structural regionalization of the oocyte in the ascidian *Ciona savignyi* during early oogenesis. *J Exp Zool* 242: 205-214
- Swalla BJ, Badgett MR, Jeffery WR (1991) Identification of a cytoskeletal protein localized in the myoplasm of ascidian eggs: localization is modified during anural development. *Development* 111: 425-436

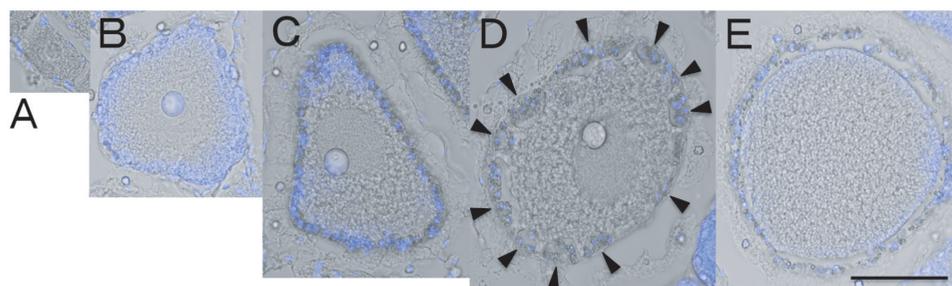


Fig. 1. 付属細胞の形態による卵形成過程のステージング。卵巣切片の観察で見られる卵母細胞を付属細胞の形態により5つのステージに分類した。(A) 付属細胞が卵母細胞表層に散在しているステージ1。(B) 多数の付属細胞が細胞表層に積み重なるステージ2。(C) IFCが明瞭に分化するステージ3。(D) 特徴的なポケット構造(矢じり)が見られるステージ4。(E) 卵成熟の進行したステージ5。Bar, 50 $\mu$ m。

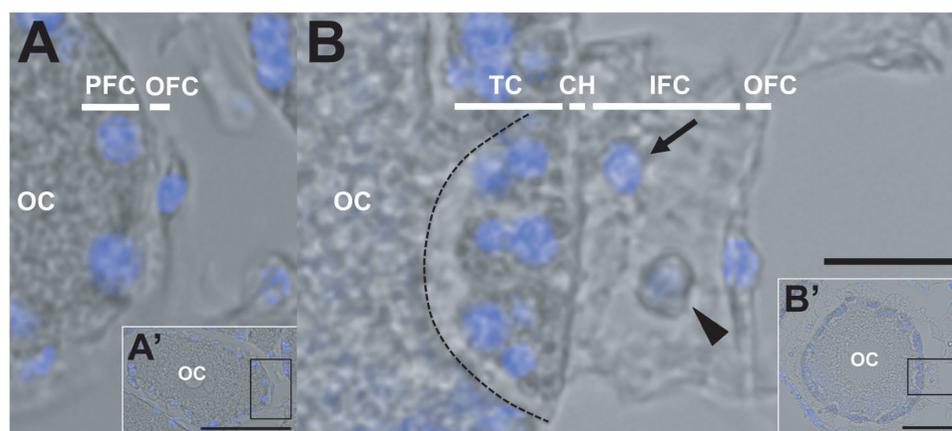


Fig. 2. カタウレイボヤ卵巣内の付属細胞。(A) ステージ1の付属細胞。A'の枠内を拡大した。ステージ1からステージ2の卵母細胞周辺には、未分化なPFCと、その外側を取り囲むように存在する扁平なOFCとが区別できる。(B) ステージ4の付属細胞。B'の枠内を拡大した。ステージ3以降では、卵表層に埋まり込むように存在するTCと細胞質の肥大化したIFCとが区別できるようになる。特にステージ4では、ポケット構造(B, 点線)が見られ、TCがその中で集塊を形成する。OC, 卵母細胞。CH, 卵殻。矢印, IFCの細胞核。矢じり, IFCに存在する特徴的な小胞。Bar, 10 $\mu$ m (AおよびB), 50 $\mu$ m (A'およびB')。

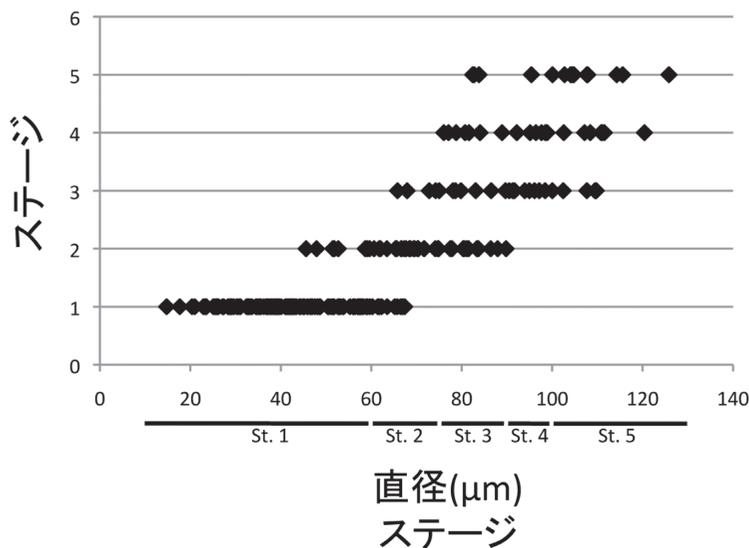


Fig. 3. 各ステージにおける卵母細胞の直径。付属細胞の形態により分類した各ステージにおける卵母細胞の直径を計測した。卵母細胞の直径は単調増加するものと考えられることから、これらのステージングの時間的な並びに齟齬はないものと考えられる。また、直径の散らばりも考慮に入れながら、各ステージにおける卵母細胞の標準的な直径の範囲を横軸の下に太線で示した。

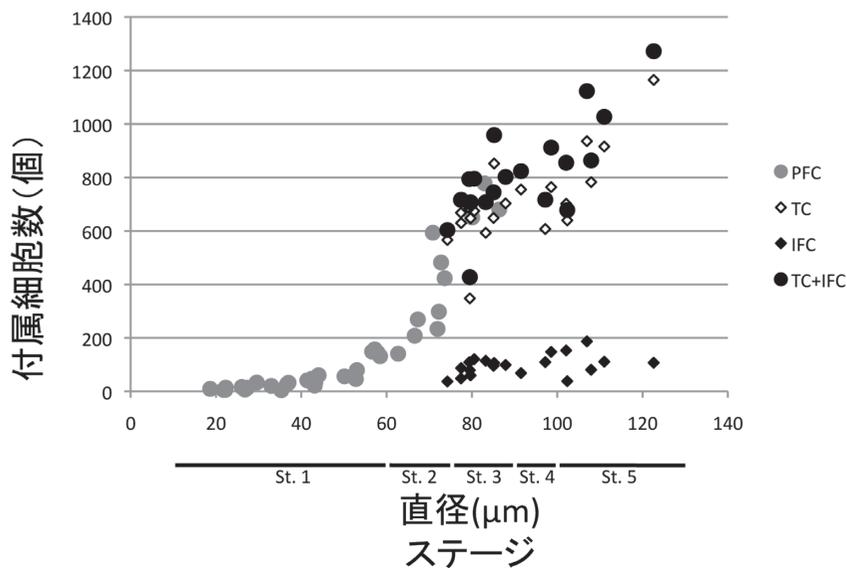


Fig. 4. 付属細胞数の計測。さまざまな大きさの卵胞に見られる PFC (●) と TC (◇), IFC (◆) を数え、それを卵母細胞の直径を横軸にとり、グラフ化した。ステージ 3 以降では、TC と IFC をたした細胞数 (●) もプロットした。

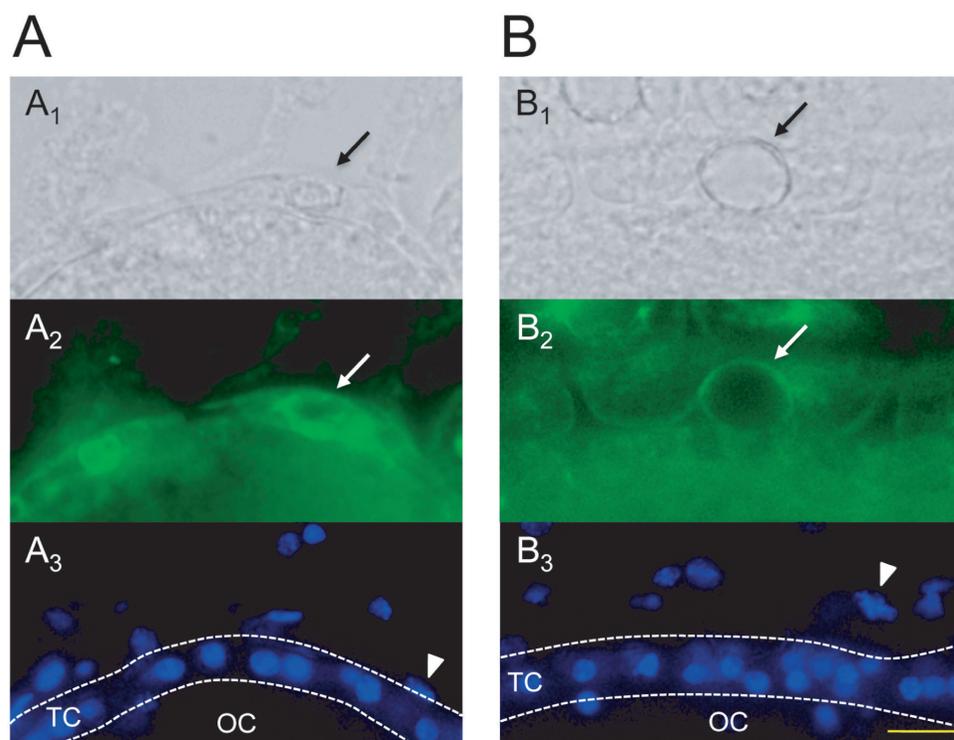


Fig. 5. IFC 内での  $\alpha$ -Tubulin の局在。(A) ステージ 2 における IFC の分化。積み重なった PFC のうちで、最外層に位置するいくつかの細胞において (A<sub>3</sub>) 細胞が長円形になり、内部に液胞が形成され始めている (A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>; 矢印)。その液胞を取り囲むように分裂装置にも似た形態を示す特徴的な染色が観察された。(B) ステージ 3 における IFC。液胞が大きく広がり、TC の外側に並ぶ IFC では (B<sub>3</sub>) その外側を取り囲むように明るい染色が見られた (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>; 矢印)。A<sub>1</sub>および B<sub>1</sub>, 位相差観察像。A<sub>2</sub>および B<sub>2</sub>,  $\alpha$ -Tubulin 抗体染色。A<sub>3</sub>および B<sub>3</sub>, DAPI 染色。OC, 卵母細胞。TC, テスト細胞。矢じりは、それぞれ注目する IFC の核を示す。Bar, 10 $\mu$ m。

## Interaction between Oocyte and Accessory Cells during Ascidian Oogenesis

Kotaro Shimai<sup>1</sup>, Hirokazu Ishii<sup>2</sup>, and Takahito Nishikata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Natural Science, Konan University, 8-9-1, Okamoto, Higashi-nada-ku, Kobe 658-8501, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University, 7-1-20, Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan

(Received October 15, 2009)

### Abstract

The ascidian egg is a typical example of a mosaic egg, and has been proved to have some localized maternal factors including the muscle determinant, *macho-1* mRNA. The analyses of how these maternal factors could be prepared within the egg are important not only for revealing the mechanisms of the oogenesis but also for understanding the mechanism of the early development. In this study, we described the morphology and the proliferation profiles of the accessory cells surrounding the oocytes in the ovary. Moreover, using the accessory cells as the morphological indices, we made a new criterion that we could easily and clearly discriminate the oogenic stages under light microscopy.