

ニワトリ胚網膜の核酸合成に関するラジオオート グラフィ的研究 II 電顕ラジオオートグラフィ

Wisnu Gunarso

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任: 永田哲士教授)

Radioautographic Studies on Nucleic Acid Synthesis in the Retina of Chick Embryo II Electron Microscopic Radioautography

Wisnu GUNARSO

First Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

In order to demonstrate the intracellular localization of nucleic acid synthesis in the retinas of chick embryos, the incorporations of both ^3H -thymidine and ^3H -uridine into the retina anlagen of incubated chick embryos from day 1 to day 7 were studied by means of electron microscopic radioautography.

The matrix cells which had incorporated ^3H -thymidine synthesizing DNA into nuclei appeared more frequently in early embryonic stages, possessing large spherical nuclei with abundant euchromatin and large nucleoli but poor cell organelles in cytoplasm except free ribosomes and microfilaments (Figs. 1-4). Differentiating cells which did not incorporate ^3H -thymidine accumulated in either innermost or outermost portions of the inner lamella of optic cup, possessing indented nuclei and well developed cell organelles such as mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi complex in cytoplasm and extending either growth cones or cilia (Figs. 5-6), developing to ganglion cells or photoreceptor cells.

^3H -uridine was incorporated into all cells and the grain counts increased from day 1 to 7 (Figs. 7-10). More grains were found in well differentiated cells containing more cell organelles than the matrix cells (Figs. 11-12). *Shinshu Med. J.*, 32: 241-248, 1984

(Received for publication January 12, 1984)

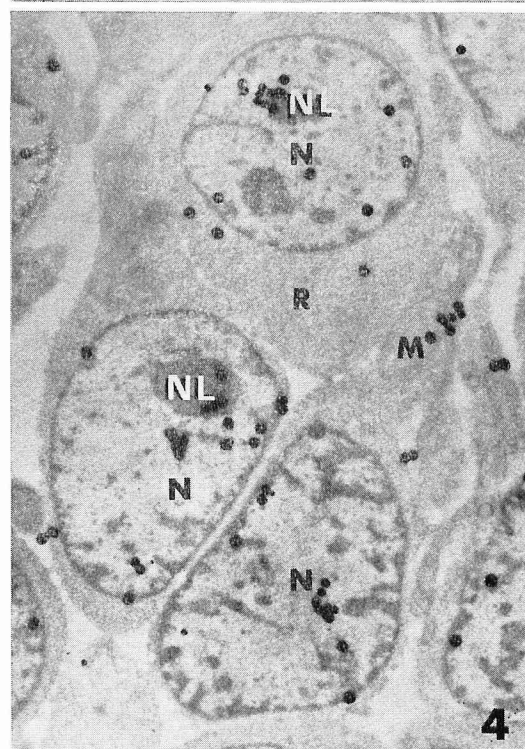
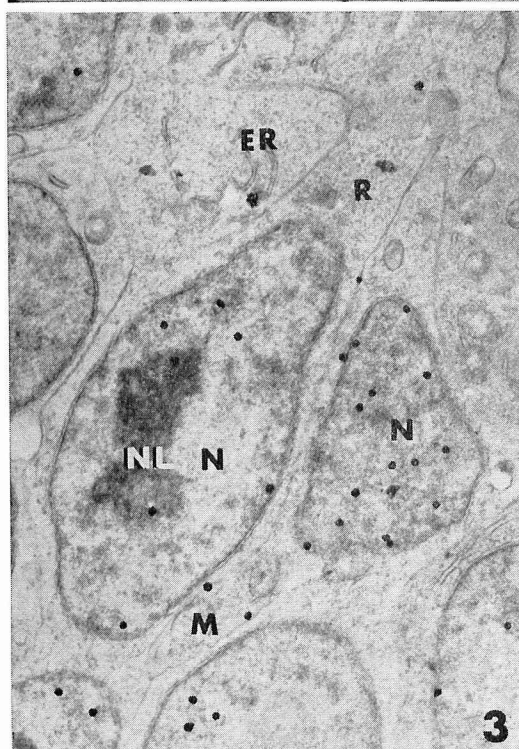
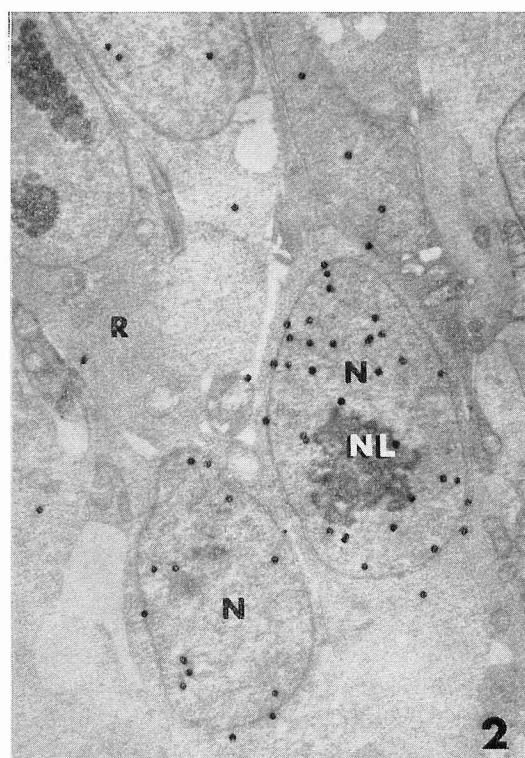
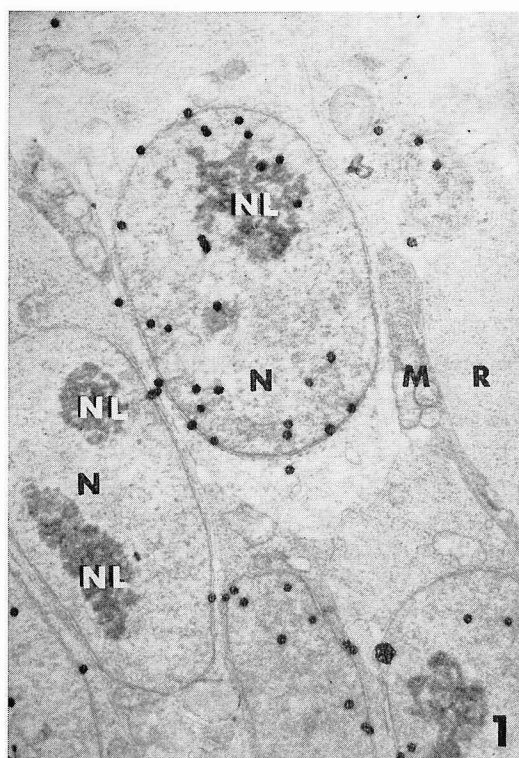
Key words: chick embryo, retina, electron microscopic radioautography, DNA synthesis, RNA synthesis

ニワトリ胚, 網膜, 電顕ラジオオートグラフィ, DNA合成, RNA合成

I 緒言

ニワトリ胚網膜の発生に際して, 核酸合成を行う細胞をラジオオートグラフィにより同定した研究は少ない。著者は前回, ふ卵1日から7日の発生初期のニ

ワトリ胚を ^3H -thymidine および ^3H -uridine で標識し, 光顕ラジオオートグラフィを行い, DNA合成およびRNA合成を行う細胞の局在を明らかにしたり。今回は同一材料を用いて電顕ラジオオートグラフィを行い, 標識細胞の超微構造を明らかにしたので報告



する。

II 材料および方法

前報¹⁾で用いた白色レグホンの胚を材料とした。すなわち受精卵を購入し、38.5°Cでふ卵して1, 2, 3, 4, 7日の胚それぞれ30個ずつ150個を2群に分け、Hanks液中で眼胞または眼杯を細切しEagle MEM (10%子牛血清)に溶解した³H-thymidine (5.0Ci/mM) または³H-uridine (30Ci/mM) (20 μ Ci/ml)で1, 2, 4時間炭酸ガス培養器(テーパー)により培養して*in vitro*で標識し、燐酸緩衝2.5% glutaraldehydeと1%四酸化オスミウムで重固定、ethanol脱水、Luveak 812(半井化学)で包埋し、超ミクロトーム(LKB ultratome 4,800)で厚さ50 nmに超薄切、コロジオン被覆銅メッシュに載せ、さくらNR-H2乳剤で、wire-loop²⁾法によりラジオオートグラフィーを行った。8週間露出後、GL-phenidon³⁾現像、定着、クエン酸鉛⁴⁾による電子染色と脱ゼラチンを行い電顕(日立HU-11A)を観察し、ランダムに写真撮影した。

III 結果

A ³H-thymidine ラジオオートグラフィー

³H-thymidineにより標識されたDNA合成を示す細胞は1日から7日までの胚で観察され、1日胚は脳胞の母基細胞が多数標識され、2日胚の眼胞の母基細胞に移行する。2日の胚は光顕で観察すると、前報²⁾に報告した通り、眼胞を形成し、標識細胞は外層に多

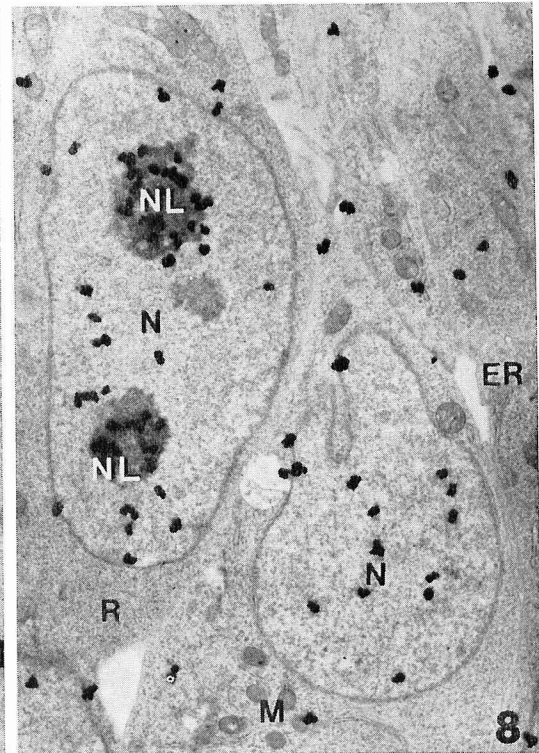
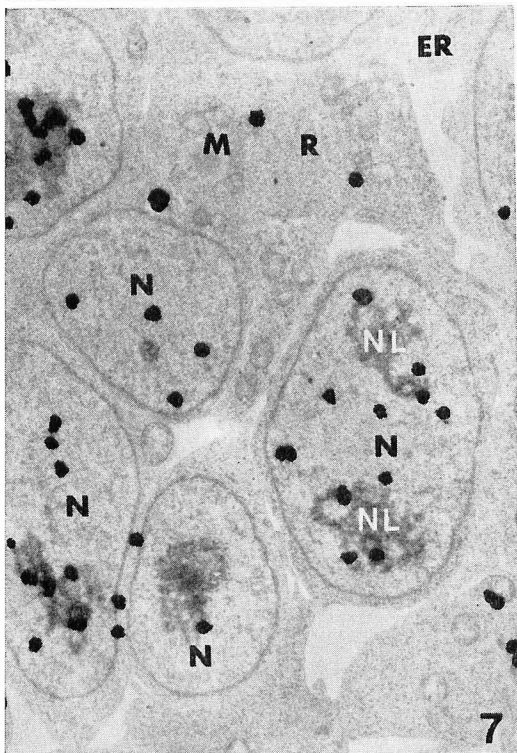
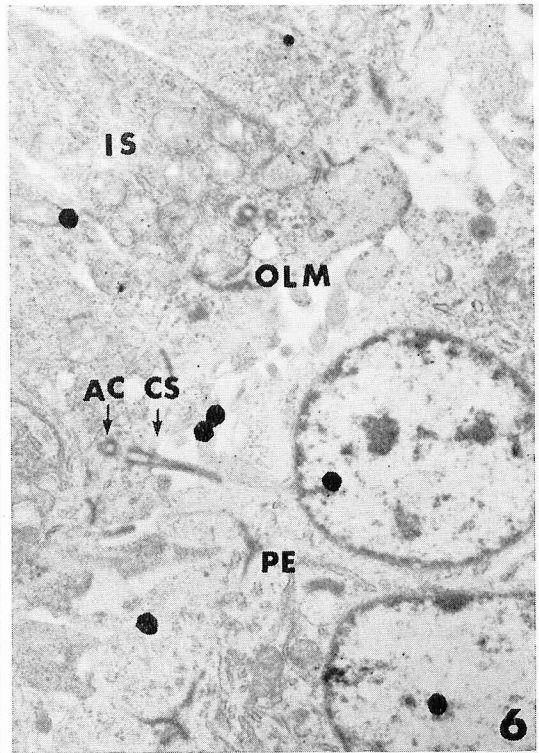
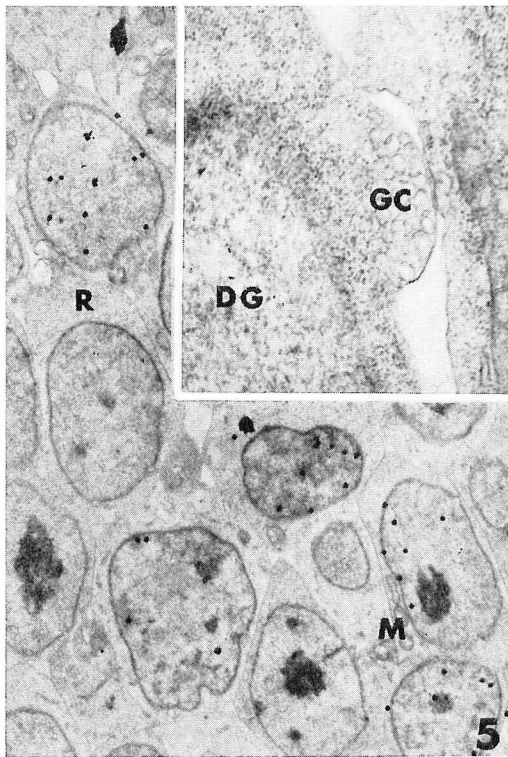
く内層に少ないが、電顕で観察すると銀粒子は核に集中していて、細胞質には認められない(Fig.1)。この時期の核は大型で楕円形を呈し、核小体も大型で1~2個認められ、核質は主として正染色質から成り、細胞質の細胞小器官は乏しいが自由リボソームは多い。銀粒子は大部分が正染色質上にある。3日の胚では眼杯が形成され、標識細胞数が2日より少なくなり、眼杯内層(網膜神経部)の内層に位置するもの多く、核も小型で長楕円形となり、核質には銀粒子が少ない細胞が多くなる。銀粒子を有する標識細胞では、銀粒子は核質の正染色質上に認められ、その細胞質には少数の糸粒体、粗面小胞体、自由リボ小体、細線維が認められるが(Fig.2)、銀粒子を有しない非標識細胞は眼杯内層に多く、標識細胞に比し細胞小器官が豊富であり、核が陥凹するものが多い。特に網膜神経部(眼杯内層)の最内層と最外層には、それぞれ内顆粒層の視神経細胞と外顆粒層の視細胞に分化する非標識細胞が認められ、前者では神経突起が、後者では外節を形成する纖毛構造が観察された。いずれも細胞質内に粗面小胞体、糸粒体、ゴルジ装置が発達する(Figs. 5-6)。4日胚では標識細胞はさらに減少し、標識細胞の細胞小器官は3日より数を増し糸粒体にはまれに銀粒子が認められる(Fig.3)。網膜の最内層と最外層には視神経細胞と視細胞は標識されず、さらに数を増す。これらの非標識細胞では、より多くの糸粒体、粗面小胞体、リボ小体、ゴルジ装置が観察される。7日胚では標識細胞は網膜の中間層に局限し、数も少なくなるが細胞小器官はさらに増加する(Fig.4)。非標識細胞は最内層で

Fig. 1 An electron microscopic radioautogram showing a few labeled matrix cells in the outer portion of day 2 chick embryo optic vesicle after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-thymidine. Abbreviations: M, mitochondria, N, nucleus, NL, nucleolus, R, ribosomes. $\times 4,700$.

Fig. 2 An electron microscopic radioautogram showing some labeled matrix cells in the outer portion of day 3 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-thymidine. Note that one of mitochondria in the middle of the figure is labeled. Abbreviations: M, mitochondria, N, nucleus, NL, nucleolus, R, ribosomes. $\times 3,800$.

Fig. 3 An electron microscopic radioautogram of day 4 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-thymidine. Note that the number of silver grains decreased while endoplasmic reticulum and mitochondria increased as compared with Figs. 1-2. Abbreviations; ER, endoplasmic reticulum, M, mitochondria, N, nucleus, NL, nucleolus, R, ribosomes. $\times 6,900$.

Fig. 4 An electron microscopic radioautogram showing some labeled cells in the inner portion of the posterior region of day 7 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-thymidine. Note that two mitochondria are labeled. Abbreviations: M, mitochondria, N, nucleus, NL, nucleolus, R, ribosomes. $\times 5,250$.



は視神経細胞が神経突起を出すものが多く、最外層では視細胞が発達し、内節の尖端側には糸粒体、小胞体が集まり、外節に層板構造が認められる。

B ^3H -uridine ラジオオートグラフィ

すでに前報の光顕ラジオオートグラフィでも認められたように、電顕で観察しても銀粒子はすべての細胞の核質、核小体、細胞質に観察される (Figs. 7-10)。銀粒子数は2日胚で最も少なく (Fig. 7)、3日 (Fig. 8)、4日 (Fig. 9)、7日 (Fig. 10) と発生が進むに従い、銀粒子数が増す。同一時期については銀粒子は核質に最も多く、核小体または細胞質では少ない。7日胚では5日までに比し特に多数の銀粒子が核質と細胞質中に現れ、RNA合成の急激な増加を示し、細胞質中には糸粒体、粗面小胞体、リボ小体が増加し、これらの細胞小器官に銀粒子の局在が認められる (Fig. 10)。特に糸粒体の銀粒子は7日胚で最高に達する。網膜最内層には視神経細胞が神経突起を3日から7日にかけて発達させ (Fig. 11)、最外層には視細胞が外節を形成することは、 ^3H -thymidine の項で記載した通りであるが、 ^3H -uridine はこれらの分化しつつある細胞においてはより多く取り込まれる (Fig. 12)。

IV 考 察

今回の実験結果により、電顕ラジオオートグラムに

おいても、光顕と同様に ^3H -thymidine の取り込みを示す標識細胞は2日で多く、以後3日から7日まで減少し、非標識細胞が網膜最内層では視神経細胞に、最外層では視細胞に分化することが明らかにされた。文献上はニワトリ胚網膜の ^3H -thymidine の取り込みについては三嶋⁵⁾ がふ卵4日から6日までの、Mi-shima と Fujita⁶⁾ は4日から10日までの眼杯を電顕ラジオオートグラフィにより観察し、ふ卵4日の眼杯内板はすべて標識された母基細胞 (matrix cell) から成るが、ふ卵5日からDNA合成能力を失った神経芽細胞が最内層に現れ、視神経細胞に分化し、7日から最外層に同じくDNA合成を行わない視細胞が現れ、10日以降に杆状体と錐状体に分化することを報告しているが、4日以前の早期胚は観察していない。本研究結果の4日以降の所見は彼等の研究に一致するが、1日から3日の母基細胞については今回初めて明らかになったものである。

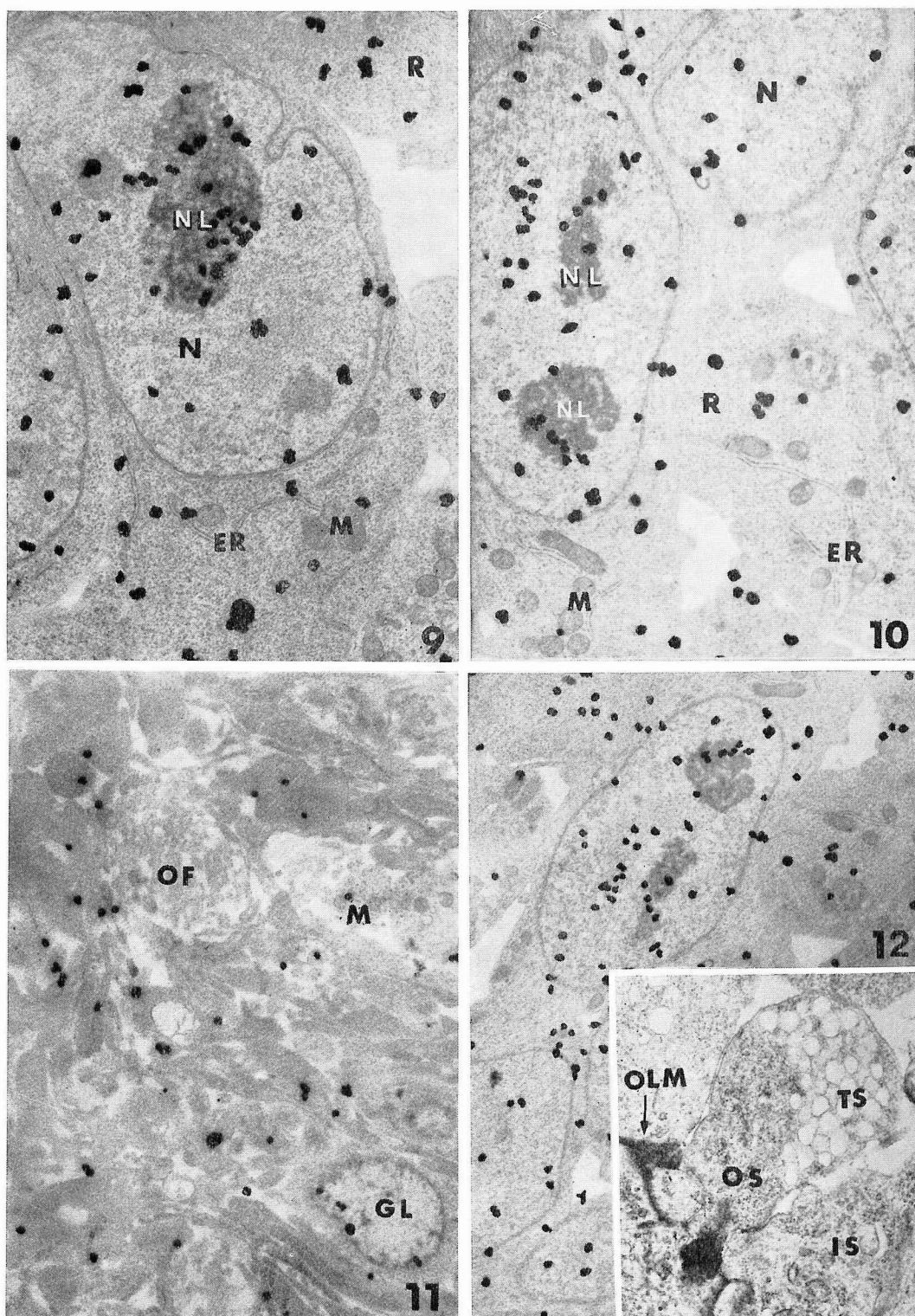
一方、 ^3H -uridine の取り込みについては、すべての網膜細胞に銀粒子が認められ、2日から7日まで銀粒子数が増加することが明らかにされ、これは前報の光顕所見¹⁾ を裏づけるものである。特に興味ある現象は、標識細胞の細胞小器官の超微形態所見であり、DNA合成の場合と反対に、同一時期の細胞においては糸粒体、小胞体、リボ小体の多い細胞において多数の

Fig. 5 An electron microscopic radioautogram showing some presumptive ganglion cells of day 3 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ^3H -thymidine. Note that the differentiating ganglion cells possessing growth cone as shown in the inset are not labeled any more. Abbreviations: GC, growth cone. DG, differentiating ganglion cell. M, mitochondria, N, nucleolus. R, ribosomes. $\times 4,000$ (inset $\times 10,500$).

Fig. 6 An electron microscopic radioautogram showing a cilium of a differentiating photoreceptor cell outer segment of day 3 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ^3H -thymidine. A few silver grains due to background fog are noticed. Abbreviations: AC, accessory centriole. CS, ciliary stalk. IS, inner segment. OLM, outer limiting membrane. PE, pigment epithelium. $\times 10,000$.

Fig. 7 An electron microscopic radioautogram of some matrix cells of day 2 chick embryo optic vesicle after 1 hr incubation with ^3H -uridine. Note that grains are found to locate over the chromatin, nucleoli, nuclear membranes, ribosomes and mitochondria. Abbreviations; ER, endoplasmic reticulum. M, mitochondria. N, nucleus. NL, nucleolus. $\times 6,000$.

Fig. 8 An electron microscopic radioautogram of some matrix cells of day 3 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ^3H -uridine. Note that grains are found to locate over the chromatin, nucleoli and also over the ribosomes, endoplasmic reticulum and mitochondria of the cytoplasm. Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum. M, mitochondria. N, nucleus. NL, nucleolus. R, ribosomes. $\times 6,000$.



銀粒子が認められた点である。この所見は神経芽細胞から視神経細胞あるいは視細胞に分化するに従って、RNA合成が盛んになることを示すものである。また同一時期の細胞において核質、核小体、細胞質の銀粒子を観察すると、核質に多く、核小体と細胞質に少ないことが観察されたが、この所見は光顕的¹⁾にも観察され、その結果を裏づけるものである。文献的には網膜の発生に関するRNA合成の電顕ラジオオートグラフの研究は、まったくなく、光顕ラジオオートグラフによる研究もラット新生仔に関する報告⁷⁾が見出されるのみである。従ってニワトリ眼胞から眼杯の発生に伴って、眼杯内板の母基細胞が³H-uridineを取り込んでRNA合成を行いつつ、内層の視神経細胞と外層の視細胞に分化し、細胞小器官が複雑に分化して発生が進行する様子が初めて明らかにされた。これらの細胞小器官の中で、糸粒体の核酸合成は他の細胞小器官とは独立していると考えられており⁸⁾⁻¹⁰⁾、今回のニワトリ網膜についても別に発表する¹¹⁾。

V 結 語

ふ卵1, 2, 3, 4, 7日のニワトリ胚網膜の原基を、³H-thymidine および ³H-uridine により標識し、電顕ラジオオートグラフを行って、標識細胞の超微構造を観察し、次のことが明らかにされた。

1 ³H-thymidine を取り込みDNA合成を行う母基

細胞は、2日胚の眼胞の大部分を占め、3日から7日にかけて減少し、核は大型楕円形で正染色質に富み、核小体が大きく、細胞質には自由リボ小体と細胞線維が多いほかは細胞小器官に乏しい。

2 ³H-thymidine を取り込まない細胞は3日から7日に多くなり、眼杯内層(網膜神経部)の最内層と最外層に集積し、前者は神経突起を、後者は外節を形成してそれぞれ視神経細胞と視細胞に分化し、糸粒体、粗面小胞体、ゴルジ装置が発達し、核は陥凹を示す。

3 ³H-uridine を取り込むRNA合成は1日から7日までの全細胞の細胞質、核質、核小体に認められる。

4 ³H-uridine の取り込みを示す銀粒子数はふ卵1日から7日まで増加するが、同一時期の細胞で比較すると、細胞小器官の乏しい母基細胞で少なく、細胞小器官が発達した分化した細胞で多い。

5 以上の結果から、網膜の発生に伴って核酸合成を行う細胞の細胞小器官の変化が明らかにされた。

本稿を終わるにあたり、本研究の御指導と原稿の御校閲を頂いた恩師永田哲士教授に感謝いたします。また実験について御協力頂いた信州大学医学部第1解剖学教室の関係者各位に謝意を表します。なお本研究は著者が文部省国費外国人留学生として昭和55年4月より59年3月まで信州大学大学院医学研究科に在学した期間に行われたものである。本論文の要旨は第88回日

Fig. 9 An electron microscopic radioautogram of matrix cells of day 4 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-uridine. The grains are found to locate over the chromatin, nucleoli, nuclear membrane, ribosomes, endoplasmic reticulum, and mitochondria. Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum. M, mitochondria. N, nucleus. NL, nucleolus. R, ribosomes. $\times 8,050$.

Fig. 10 An electron microscopic radioautogram of matrix cells of day 7 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-uridine. The grains can be noticed to locate over the chromatin, nucleoli, nuclear membranes, ribosomes, endoplasmic reticulum, and mitochondria. Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum. M, mitochondria. N, nucleus. NL, nucleolus. R, ribosomes. $\times 8,000$.

Fig. 11 An electron microscopic radioautogram showing differentiating ganglion cells possessing axonal processes of day 7 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-uridine. Note that grains are found not only in the cell bodies, but also in the optic fibres of the axonal processes. Abbreviations: GL, ganglion cell. M, mitochondria. OF, optic fibre. $\times 5,000$.

Fig. 12 An electron microscopic radioautogram showing some photoreceptor cells of an area close to the outer limiting membrane of day 7 chick embryo retina after 1 hr incubation *in vitro* with ³H-uridine. Note that the differentiating photoreceptor cells possessing the developing outer segments as shown in the inset are not labeled. Abbreviations: IS, inner segment. OLM, outer limiting membrane. OS, outer segment. TS, tubular structures. $\times 5,000$ (Inset $\times 10,000$).

本解剖学会総会（昭和58年4月4～6日，大阪）において発表された。

文 献

- 1) Gunarso, W. : ニワトリ胚網膜の核酸合成に関するラジオオートグラフ的研究. I 光顕ラジオオートグラフィー. 信州医誌, 32 : 231-240, 1984
- 2) Yoshida, K., Murata, F., Ohno, S. and Nagata, T. : A modified wire-loop method for quantitative electron microscopic radioautography. Histochemistry, 57 : 93-96, 1978
- 3) Murata, F., Yoshida, K., Ohno, S. and Nagata, T. : Electron microscopic radioautography using a combination of phenidon developer and domestic emulsion. Acta Histochem Cytochem, 12 : 443-450, 1979
- 4) Reynolds, S. : The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol, 17 : 209-212, 1963
- 5) 三嶋 弘 : ニワトリ網膜の発生に関する電子顕微鏡的研究. I 母基細胞より神経芽細胞への分化. 日眼会誌, 78 : 1410-1417, 1974
- 6) Mishima, H. and Fujita, H. : Studies on the cytodifferentiation of the neuroblasts and visual cells in the chick embryo retina, using the electron microscopic autoradiography of ^3H -thymidine. Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol, 206 : 1-10, 1978
- 7) Yew, D.W. : Autoradiographic study of neonatal rat retina after labeled uridine uptake. Acta Histochem (Jena), 64 : 1-4, 1979
- 8) Nagata, T., Shibata, O. and Nawa, T. : Incorporation of tritiated thymidine into mitochondrial DNA of the liver and kidney cells of chickens and mice in tissue culture. Histochemie, 10 : 305-308, 1967
- 9) Nagata, T. : Electron microscopic radioautography of intramitochondrial RNA synthesis in HeLa cells in culture. Histochemie, 32 : 163-170, 1972
- 10) Nagata, T. : Electron microscopic radioautography of intramitochondrial nucleic acid synthesis in mammalian cells *in vitro*. Proc 8th Internat Cong Elect Microsc II : 346-347, 1974
- 11) Gunarso, W. and Nagata, T. : Electron microscopic radioautography of mitochondrial RNA synthesis in the retina of chick embryo. Histochem J : Submitted for publication 1984.

(59. 1. 12 受稿)