

重力実験のためのウニの幼生骨格の培養系の検討

お茶大 清本正人 宇宙研 黒谷明美 東大 江口星雄 お茶大 山口守

The culture condition of larval skeletogenic cell for the gravity experiment

Masato Kiyomoto, Akemi Izum-Kurotani, Hoshio Eguchi, Mamoru Yamaguchi

Marine and Coastal Research Center, Ochanomizu University Kouyatsu, Tateyama, Chiba 294-0034

E-Mail: kiyomoto.masato@ocha.ac.jp

Abstract: Sea urchin and other echinoderm animals have calcitic endoskeleton. In sea urchin embryo, skeletogenesis starts at late gastrula stage and then the spicules grow up to larval skeletons. The skeletogenic cells are called primary mesenchyme cells derived from micromeres at 16-cell stage. We already reported a promotive effect of hypergravity on skeletogenesis in the culture of the skeletogenic cells with low concentration of horse serum. In this study, we examined the culture condition, the component necessary for spicule formation. The low activity of gel filtration fraction was recovered by the addition of affinity heparin column flow through fraction. VEGF, one candidate of the factor for spicule formation, was not effective for micromere culture, even with low concentration of horse serum. These results show the possibility that two or more factors are necessary for spicule formation in the culture of micromeres.

Key words; skeletogenic cells, sea urchin, horse serum, VEGF, calcium, hypergravity

ウニを含む棘皮動物は炭酸カルシウムからなる内骨格を持つ。中でもウニの幼生の骨片（幼生骨格）はそれを形成する細胞の系譜が明らかで、16細胞期の小割球に由来する一次間充織細胞によって骨片が形成される。小割球を単離培養することにより、骨片細胞だけを培養することも可能であり（Okazaki, 1975; Kiyomoto & Tsukahara, 1991）、無脊椎動物の生物石灰化（バイオミネラル化）のモデルとして、各種重力環境の及ぼす影響がこのウニ小割球の培養系を使って調べられている。培養系では、石灰化を担う細胞を純粋に培養することができる。このため、他の組織の影響を考慮する必要がない。これまでに、過重力環境により形成される骨片の数が增加すること、骨片形成に関わる過程の中で Ca^{2+} の取り込みに過重力が影響している可能性、骨片基質タンパク質の発現に過重力は影響していない事が報告された（Imai *et al.*, 2006; Kiyomoto *et al.*, 2007）。

このように、ウニ幼生の骨片細胞の培養系は重力実験に有用であるが、培養条件については、4%程度の馬血清が経験的に使われており、その中のどんな成分が有効なのか、培養された細胞がどんな成分を必要としているのかはまだわかっていない。今回の研究では、ウニの胚から得られる、血清と同様な培養された細胞に有効な成分の部分精製分画の活性について報告する。さらに、最近、骨片形成への関与が発現阻害実験により示された血管内皮増殖因子（VEGF）の培養系での効果について調べた。

【材料と方法】

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus*、アカウニ *Pseudocentrotus depressus*、ムラサキウニ *Anthocidaris crassispina*、キタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus*、ラップウニ *Toxopneustes pileolus* を使用した。10mM 塩化アセチルコリンもしくは0.5M KClを割腔内に注射し配偶子を採取した。培養系での骨片形成に必要な因子は、ラップウニの間充織胞胚を材料にした。この時期の胚を集め、カルシウム-マグネシウム欠如海水で洗ったのち、1M グリシン中で細胞を完全に解離し、遠心後の上清を集めた。8M 尿素中で透析後、陰イオン交換樹脂（DEAE）、アフィニティー（ヘパリン）、ゲル濾過の各クロマトグラフィーにより精製を進めた。こうして得られた分画の活性は、ムラサキウニ、キタムラサキウニ、アカウニの小割球の培養系に加えて調べた。VEGFはRecombinant Human VEGF 165（R & D systems）を使用した。

【結果と考察】

ラップウニ胞胚の細胞を解離したときの遠心上清をイオン交換（DEAE）とアフィニティー（ヘパリン）のクロマトグラフィーで精製した。ヘパリンカラムでは、活性はヘパリンに吸着し、素通りの分画には活性はなかった。バッファーの塩濃度をあげて活性を回収したのち、ゲル濾過のカラムにかけた。すると活性分画の活性は低かった。しかし、ヘパリ

ンカラムの活性のなかった素通り分画を加えたところ、ゲル濾過の活性分画の活性が上昇した。従って、ゲル濾過の分画の成分と、単独では活性を示さないへパリンカラムの素通り分画の成分の両方が、単離小割球の培養系には必要であると考えられる。

近年、血管内皮増殖因子（VEGF）の発現を阻害すると骨片形成がおこらないこと、VEGFは骨片の形成される位置に近い外胚葉から発現していることが報告された、骨片形成に必要な因子の候補分子の一つである。このことを、市販のヒトのリコンビナント VEGF を培養系に加えることで直接調べた。

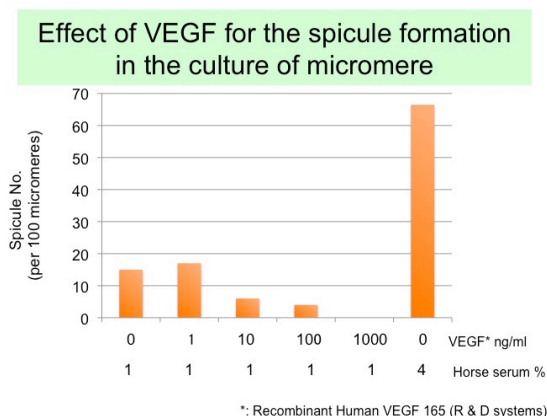


Fig.1 The effect of VEGF on the culture of isolated micromeres. The effect of VEGF did not detected, even in the culture with low concentration of horse serum.

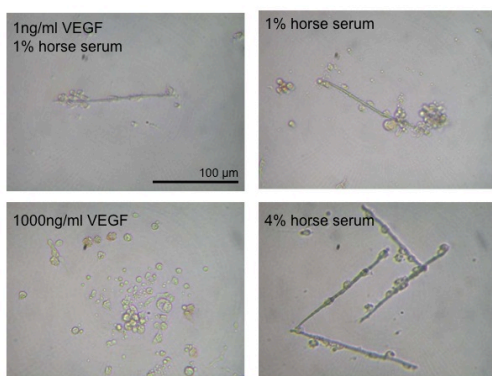


Fig.2 The spicules in the culture of isolated micromeres. The culture in 4% horse serum was suitable condition for the isolated micromerea. VEGF was not effective in the range from 1000 ng/ml to 1ng/ml. When low concentration (1%) of horse serum was added, small numbers of spicules were formed. But the number of spicules did not increased by addition of VEGF. Bar: 100 μm.

VEGF のみを培養のはじめから加えても骨片は形成されなかった。複数の成分が必要とされることが予想されるので、低濃度の血清と VEGF の両方を加えた。低濃度の血清（1%）では、形成される骨片数は、小割球 100 個あたり十数個だったが、これに VEGF を最大 1000 ng/ml まで加えても形成される骨片の数は増加しなかった。（Fig. 1、2）。

このように、VEGF に効果が認められなかったのは、他にも必要な成分があり、それを加えないと VEGF の効果も認められないのかも知れない。VEGF に続いて、ウニの FGF ホモログ、FGFA でも、その発現を阻害すると骨片形成もうまくいかないことが報告された。これらの成分はウニ胚の中にもあるはずで、精製が進んだ分画の成分を明らかにする必要がある。また、今回使った VEGF はヒトのものなので、相同性の問題により棘皮動物には効果がないのかもしれない。

参考文献

- 1) Duloquin L., Lhomond G., and Gache C. Localized VEGF signaling from ectoderm to mesenchyme cells controls morphogenesis of the sea urchin embryo skeleton. *Development* 134, pp. 2293-2302 (2007) .
- 2) Imai M, Izumi-Kurotani A, Eguchi H, Yamaguchi M and Kiyomoto M., The effect of hypergravity on the spicule formation in the culture of sea urchin micromeres and embryos. *Space Utilization Research* 22, pp. 238-240 (2006)
- 3) Imai M, Izumi-Kurotani A, Eguchi H, Yamaguchi M and Kiyomoto M., The effect of hypergravity on the spicule formation in the culture of sea urchin micromeres and embryos. *Space Utilization Research* 22, pp. 238-240 (2006)
- 4) Kiyomoto M., Izumi-Kurotani A, Eguchi H, Yamaguchi M., The effect of hypergravity on the spicule formation in the sea urchin development. *Space Utilization Research* 23, pp. 332-334 (2007)
- 5) Kiyomoto, M. and Tsukahara, J., Spicule formation-inducing substance in sea urchin embryo. *Develop. Growth Differ.*, 33, pp. 443-450 (1991).
- 6) Okazaki, K., Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. *Amer. Zool.*, 15, pp567-581 (1975).
- 7) Röttinger E., Saudemont A., Véronique Duboc1V, Besnardeau L., McClay D. Lepage T. FGF signals guide migration of mesenchymal cells, control skeletal morphogenesis of the skeleton and regulate gastrulation during sea urchin development. *Development* 135, pp. 2293-2302 (2007)