

過重力環境がウニの骨片形成に与える影響

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 effect of hypergravity on the spicule formation in the sea urchin development

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

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

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

Abstract: In sea urchin embryo, the skeletogenic cells are called primary mesenchymal cells derived from micromeres at 16-cell stage. We reported a promotive effect of hypergravity in the low serum concentration culture of the skeletogenic cells. In this condition, cultured skeletogenic cells were so sensitive that they showed a clear difference of skeletogenesis also for the different substrate of culture plate. The decrease of spicule number by the inhibitor of Ca^{2+} -channel is recovered under hypergravity condition. The culture in low Ca^{2+} concentration also decreased the number of formed spicule and the number was recovered under hypergravity, too. These results show the possibility that the Ca^{2+} uptake is one of a candidate process that is affected by hypergravity condition. The spicule also contains spicule matrix proteins. The expression of their mRNA under hypergravity was examined and the level was not different from control condition.

Key words; skeletogenic cells, sea urchin, micromere, centrifuge, calcium, hypergravity

ウニ胚の単離小割球による骨片形成の培養系では、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、生物石灰化における形態形成のモデル系として重力環境の影響を評価する際に、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増加することや、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を報告した (Imai *et al*, 2006)。今回は、細胞の培養条件によって影響される骨片形勢の比較から過重力の影響を考察した。さらに、骨片基質タンパク質の発現に対す過重力の影響についても調べた。

【材料と方法】

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus* を使用した。受精直後に 10 倍量のカルシウム-マグネシウム欠如海水を加え、ピペッティングにより受精膜を除いた。除膜受精卵は、16 細胞期までカルシウム欠如海水中で発生させた。三種類の割球が形成される 16 細胞期に割球を解離し、ショ糖の密度勾配を使って、小割球を他の割球から分けて単離した。小割球 50 個が 96 穴培養プレートの一つのウェルに入るように分注し、培養を開始した。培養液には、抗生物質と馬血清を含む海水を使用した。培養プレートには、細胞が接着しやすくなるようにあらかじめフィブロネクチンをコートしておいた。

受精後 16 時間まで $1\times g$ で培養した後、遠心機により過重力を加えた状態で培養を続けた。受精後 72 時間に観察した。デジタルカメラで各ウェルの

中に形成された骨片を撮影し、その映像から形成された骨片の数と長さを求めた。1 つの条件について 9 つのウェルで測定を行い、 $1\times g$ の対照群と比較を行った。

TRIZOL reagent を用いて RNA を抽出した。抽出した total RNA を TaKaRa RNA PCR kit (タカラバイオ) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA をテンプレートとして、iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, USA) を用いてリアルタイム PCR を行った。その際、内部標準遺伝子としてアクチンを利用した。リアルタイム PCR の結果の解析には、MYiQ リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD, USA) を用いた。

【結果と考察】

単離培養した骨片細胞では、骨片形成に適した馬血清の濃度 4 % では、過重力の影響の検出が難しいが、血清濃度を下げて骨片形成しにくい条件で実験をすると、過重力の影響が再現性よく検出できる。血清濃度が 0.5-0.25 % では過重力により形成される骨片の数が有意に増加する (Imai *et al*, 2006)。この低血清条件は、培養条件の違いを敏感に示すようである。培養容器を変えた場合、4 % の血清濃度では骨片の長さや数に違いは無いが、低濃度の血清では、大きな違いが観察される場合があった (Fig. 1)。低血清濃度を使って重力環境の影響を検出する場合、培養容器の選択も重要な要素になると考えられる。

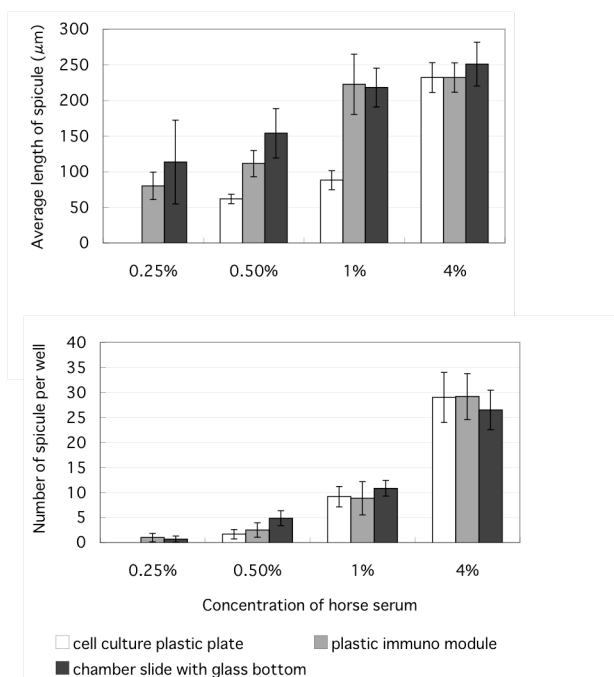


Fig. 1 The comparison of spicule formation on different substrate of culture plate.

骨片細胞は卵割腔内の基底層の細胞外基質 (ECM) を足場に配置して骨片を形成する。実験では細胞接着に機能する ECM の成分であるフィブロネクチンを培養器にコートして使用した。これにより細胞は培養器の基質に接着しやすくなる。フィブロネクチンをコートしたものでは、遊走を始めた細胞は広く散らばり、この細胞集団の何か所かで骨片を形成するのに対し、コートしないものでは、細胞は塊を維持し、その中に 1 個の骨片を形成することが多かった (Fig. 2)。

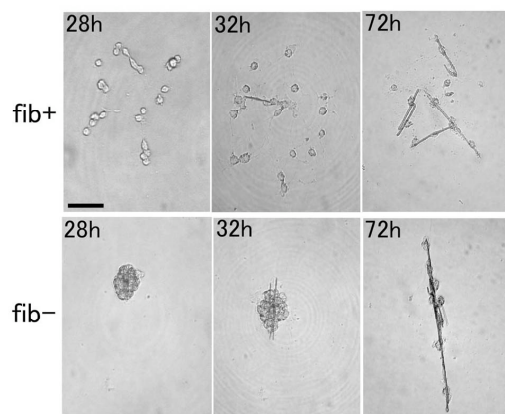


Fig. 2 The comparison of cell migration and spicule formation on the substrate with or without fibronectin coating. Time indicate after fertilization. Bar: 50 μm.

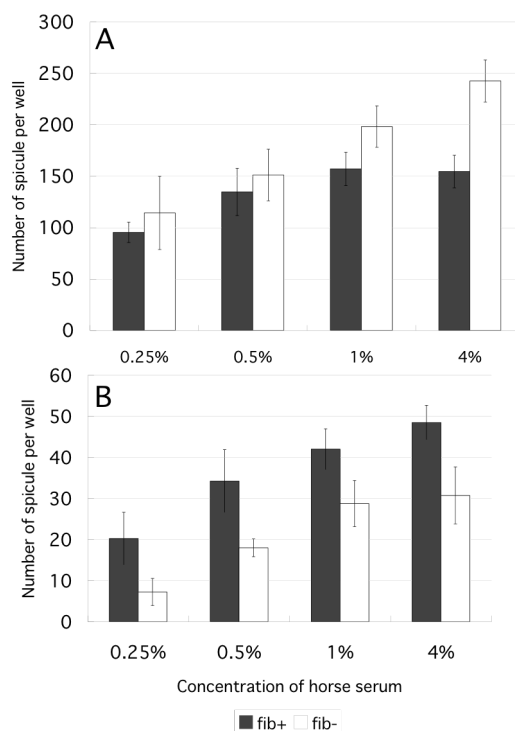


Fig. 3 The comparison of spicule formation on the substrate with or without fibronectin in each horse serum concentration.

その結果、フィブロネクチンをコートしないものの方が骨片の長さは長くなるが、形成される骨片の数はコートしたものの方が多くなった。この傾向は血清濃度を低くしても同じであった (Fig. 3)。一個の小割球に由来するある細胞集団が、互いに密着して塊を維持すると、その中に 1 個の結晶が成長して長い骨片が形成され、一方、広い範囲に分散すると何か所かで結晶の成長が始まり複数の骨片が形成されると考えられる。

過重力環境下では、形成される骨片の数が増加したが、時間をおって調べてみると、骨片形成の始まる受精後 30 時間頃は対照群と同程度の骨片数だが、40 時間以降に新たな骨片の形成が加わり、骨片数が増加する (Imai *et al.*, 2006)。過重力により、骨片細胞のシンシチウムの中の骨格胞の中が、骨片形成のもとになる結晶核の形成が起こりやすい条件になっているのかもしれない。

骨片形成に関わるプロセスの中で、膜を介した Ca^{2+} の輸送に重力環境が影響する可能性がある。カルシウムイオンチャンネルの阻害剤を、骨片形成がある程度阻害されるように加えると、低濃度血清により減少した骨片数が過重力で増加するのと同じ

程度に、骨片数が回復することを報告した (Imai *et al.*, 2006)。同じように、細胞を培養している海水中の Ca^{2+} の濃度を低くすることでも、 Ca^{2+} の輸送を押さえて骨片形成を阻害する事ができる。この場合でも阻害剤の場合と同じように、過重力により形成される骨片数は回復した (Fig. 4)。このように、骨片の材料となるイオンの輸送のプロセスが重力環境に影響されている可能性が支持された。

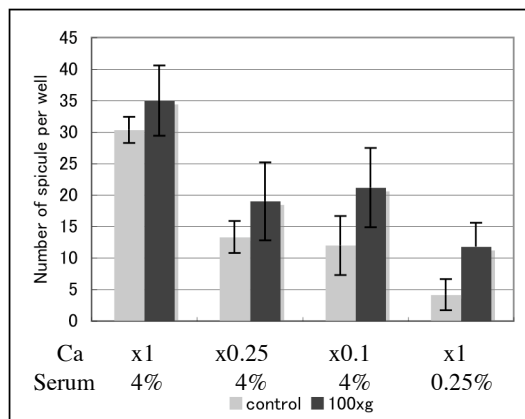


Fig. 4 Suppression of spicule formation by low Ca^{2+} concentration and the recovery under hypergravity condition.

骨片は無機的なイオンの他に、骨片基質タンパク質を含んでいる。基質タンパク質は骨片細胞で特異的に発現し、骨片が形成され成長している骨格胞へと輸送されると考えられている。従って、その合成や輸送が影響を受ける可能性も考えられる。今回、定量的な RT-PCR を使って、主要な基質タンパク質である SM50 と SM30 の mRNA の発現量を過重力

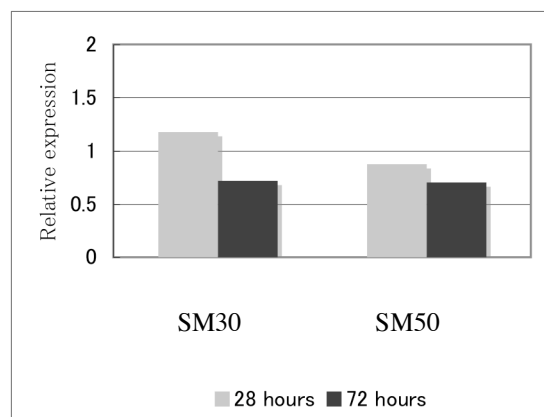


Fig. 5 Quantitative analysis of spicule matrix protein mRNA expression under hypergravity condition (100xg).

を加えた細胞と対照群の細胞とで比較した (Fig. 5)。どちらも間充細胞となって遊走する受経後 16 時間には発現が始まる。骨片形成の始まる直前の 28 時間と、骨片が十分成長する 72 時間で比較したが、どちらのタンパク質もその発現量に顕著な増減は検出されなかった。

以上のことから、ウニ胚の培養骨片細胞に与える過重力の影響は、骨片形成に関わるプロセスの中では、少なくとも基質タンパク質の発現の部分には影響していないようである。今後は、基質タンパク質の輸送系や細胞骨格の他、その影響の示唆されているイオン輸送や結晶核形成への影響について検討していく必要がある。

なお、本研究は (財) 日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境に関する地上公募研究」プロジェクトの一環として行った。

参考文献

- 1) Beniash, E., Addadi, L. and Weiner S., Cellular control over spicule formation in sea urchin embryos: a structural approach, *Journal of Structural Biology* 125, pp. 50-62 (1999)
- 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) Izumi-Kurotani, A. and Kiyomoto, M., Morphogenesis and gravity in a whole amphibian embryo and in isolated blastomeres of sea urchins. In *Developmental Biology Research in Space* (Ed. Marthy H), *Advances in Space Biology and Medicine*, Vol. 9, pp. 83-99. Elsevier Science, Amsterdam. (2003)
- 4) Izumi-Kurotani A, Kiyomoto M, Imai M, and Eguchi H., Effects of gravity on spicule formation in cultured micromeres of sea urchin embryo. *Advances in Space Research* 38, pp. 1112-1116 (2006)
- 5) Kitajima, T. and Matsuda, R., Specific protein synthesis of sea urchin micromeres during differentiation, *Zool. Mag.*, 91, pp. 200-205 (1982).
- 6) Kiyomoto, M. and Tsukahara, J., Spicule formation-inducing substance in sea urchin embryo, *Develop. Growth Differ.*, 33, pp. 443-450 (1991).
- 7) Okazaki, K., Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo, *Amer. Zool.*, 15, pp567-581 (1975).
- 8) Wilt, F., Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos, *Zool. Sci.*, 19, 253-261 (2002).