

ウニの成体骨格に対する重力環境の影響の検討

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 effect of gravity on the adult skeleton of the sea urchin

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 0.25% horse serum culture of the skeletogenic cells. In this condition, cultured skeletogenic cells are so sensitive that they show a clear difference of skeletogenesis under the hypergravity though it is difficult to detect significant difference in the culture medium containing 4% horse serum. In 0.25% serum, the number of spicule is less than that in 4% serum under 1xg condition. It recovers to the similar level significantly even in 0.25% under hypergravity(100xg). In this study, we examined the method for detecting the effect of hypergravity on the skeleton formation of the sea urchin juvenile. The skeletons of 8 armed-larvae with full-grown echinus rudiment were stained by calcein. Then, they were cultured under hypergravity with coralline red algae for inducing metamorphosis. The growth of skeleton during under hypergravity was measured at the tip of spines, where no calcein staining is observed. The growth of spine is from 40 to 100 micrometers depending on the size of test of each juvenile.

Key words; skeletogenic cells, sea urchin, juvenile, spine, centrifuge, 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）のモデルとしてこのウニ小割球の培養系を使い、各種重力環境の及ぼす影響を調べている。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、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+} の取り込みで過重力が影響している可能性や、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を報告した（Imai *et al*, 2006; Kiyomoto *et al*, 2007）。

今回の報告では、変態直後の稚ウニの骨格形成への重力環境の影響を調べるために、カルセインによる骨格染色を利用した方法を検討した。

【材料と方法】

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus* とアカウニ *Pseudocentrotus depressus* を使用した。10mM 塩化アセチルコリンを割腔内に注射し配偶子を集めた。卵は、海水で数回洗浄後、精子けん濁液で受精した。シャーレ中で発生させたプルテウス幼生は、その後、4リットルビーカー中で、モーターに取り付けた羽根で攪拌しながら、八腕幼生まで飼育した（Kiyomoto *et al*, 2008）。ウニ原基が十分発達して変態可能な幼生をカルセイン海水（50 μ g/ml）に移し、2日間かけて骨格を染色した。その後、正常海水に戻し、変態を誘導するために石灰藻を加え、過重力を24時間加えた。過重力実験は、20℃に設定された遠心機（多本架恒温遠心機 LIX-130, EIX-135, EIX-136, TOMY, Izumi-Kurotani *et al*, 2003, 2006）を用いて行った。実験群と対照群の稚ウニの、実験期間中の骨格の伸長量は、棘の先端のカルセインの染色の無い部分の長さを顕微鏡下で計測して求めた。

【結果と考察】

偏光照明であきらかなように、変態直後の稚ウニには、棘、生殖板や終板などの殻を作る板、管足の

先端の吸盤骨、歯や口器を構成する骨などがある (Fig. 1A)。いずれも、2日間、カルセイン海水中で飼育する事で、カルセインが入り、その蛍光でラベルされた。この幼生を、変態を誘導するための石灰藻と一緒にいれ、24時間、100xgの過重力を加えると、その間に変態した。カルセインの染色を調べると、棘の先端に染まっていない部分があり、カルセイン染色後、過重力を加えていた時間に伸長した棘の成長量として測定できた。この成長量は、40~100 μm の範囲で、殻の直径が大きいほど、棘の成長量も大きかった。過重力の影響を棘の成長量として調べる時は、大きさをそろえた稚ウニを使う必要があるかもしれない。

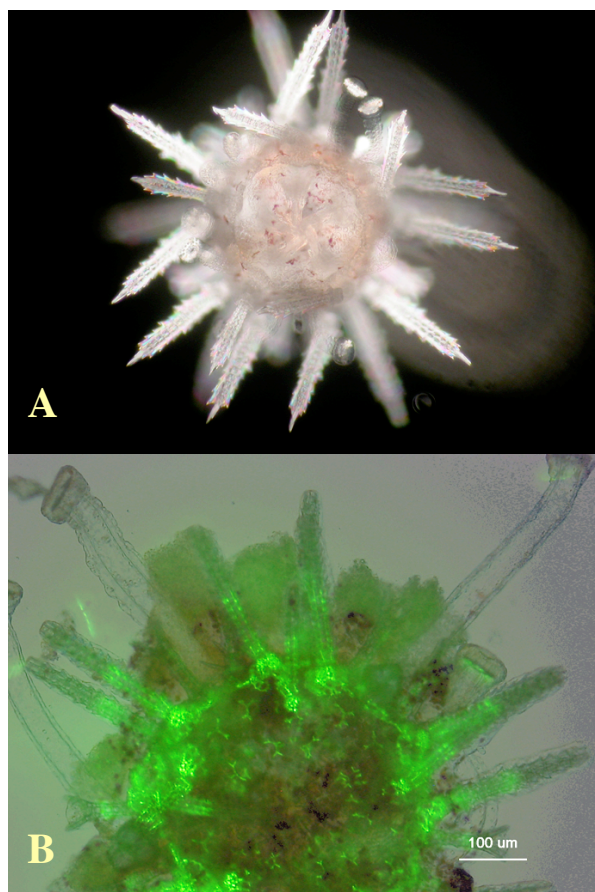


Fig.1 The skeleton elements appears under the polarized illumination (A). A juvenile cultured in 100xg after calcein staining. Each stained skeleton was formed before the hypergravity. The growth of skeleton during the hypergravity is measured at the part of spine tip without calcein staining.

参照文献

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) 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)
- 6) Kiyomoto, M. and Tsukahara, J., Spicule formation-inducing substance in sea urchin embryo, *Develop. Growth Differ.*, 33, pp. 443-450 (1991).
- 7) Kiyomoto M, Kikuchi A, Morinaga S, Unuma T, Yokota Y. Exogastrulation and interference with the expression of major yolk protein by estrogens administered to sea urchins. *Cell Biol Toxicol.* 24, 611-20 (2008).
- 8) Okazaki, K., Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo, *Amer. Zool.*, 15, pp567-581 (1975).
- 9) Wilt, F., Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos, *Zool. Sci.*, 19, 253-261 (2002).