

## ウニの生物石灰化に対する重力環境の影響

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 biomineralization 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.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 effect of hypergravity on the spicule formation of the sea urchin embryo. The embryos cultured under hypergravity showed some abnormal skeletogenesis. The elongation of two arm rods (post oral rod) was suppressed in 80% of embryos under 100xg condition. Under 5xg condition most of them developed into normal larvae, but additional branching, abnormal partial thickening and excess spicule formation were observed. It is considered that spicule formation in embryo is accepting not only direct hypergravity effect but also indirect effect via surrounding tissues. The excess spicule formation observed in the embryo is correspond to the increase of spicule in the culture experiment and supposed to be one direct effect of hyper gravity.

Key words; skeletogenic cells, sea urchin, micromere, 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、無脊椎動物の生物石灰化（バイオミネラリゼーション）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  $\text{Ca}^{2+}$  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、発生し体内で骨片形成の過程が進んでいる胚に過重力を与えた時の影響を調べ、そこで得られる骨格の形態異常と、これまでの培養系

で得られた結果を比較検討した。

#### 【材料と方法】

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus* 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。胚は、16 穴プラスチック底チャンバースライド (469922 F16 POLYSORP UNFRA NUNC-IMMUNO MODULE) を使い、well (海水 300  $\mu$  l/well) あたり 50 匹入れて発生させた。過重力実験は、20°C 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.*, 2004) を用いて行った。受精後 16 時間まで 1xg 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。対照群 (1xg) の容器は、温度条件を合わせるため遠心機の底においた。

#### 【結果と考察】

ウニ胚を過重力下で飼育すると、一部異常な幼生骨格が観察された。100xg では、口後桿だけが短く

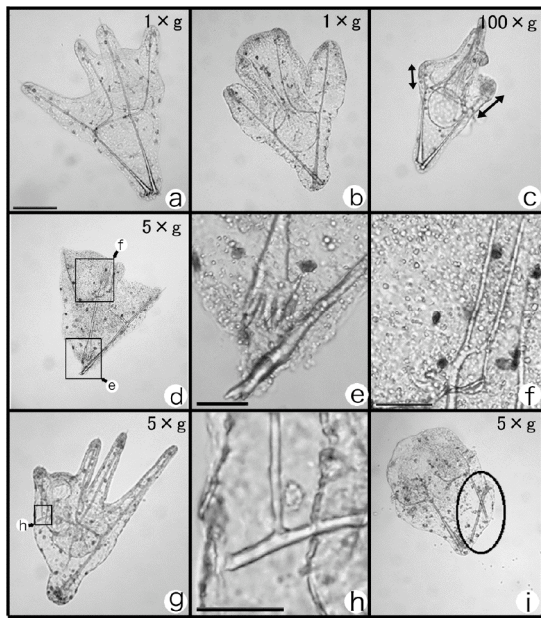


Fig.1 Larval skeletons after the culture under the hypergravity. In normal larvae the arm rods were well extending 72 hours after fertilization (a, b). The extension of post oral rods was suppressed in the larvae cultured in 100xg (C). The abnormal partial thickening (d, e), additional branching (d, f, g, h) and excess spicule formation (i) were observed in the larvae cultured in 5xg. The enlargement of e and f correspond to the squares in d and f corresponds to that in g. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  for a, b, c, d, g, i and 25  $\mu\text{m}$  for e, f, h.

なった幼生が80%の高い割合でみられた (Fig.1)。このとき他の骨格には特に異常は認められなかった。100xgでは、胚は培養器の底に押し付けられた状態で発生すると考えられるが、このように、特定の骨格だけに異常が生じ、他の部分の骨格は正常になるのは興味深い現象である。一方、5xgでは、ほとんどの幼生は正常な骨格を作ったが、一部の胚に異常が観察された。体桿の後端が通常より太くなったもの (5.7%)、通常見られない骨片の分枝があるもの (4.7%)、通常見られない新たな骨片を形成したもの (2.8%) の3種類の異常が確認された (Fig.1)。胚の内部の骨片細胞は、周囲の細胞からの作用を受けながら骨片を形成する。このため、胚全体に過重力を加える実験では、骨片細胞への直接の影響と、過重力を受けた周囲の細胞からの間接的な影響の両方が骨片細胞にあらわれることになる。これまでに得られた骨片細胞の培養系の結果では、過重力により形成される骨片の数が増えているので、過

重力が骨片細胞に直接影響して胚の中でも新たな骨片の形成を引き起こす可能性が考えられる。しかし、胚のなかでの新たな骨片の形成は5xgの場合であったのに対し、培養系での骨片の増加は今のところ、100xgの場合に観察されているので、さらに検討する必要がある。

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) 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) Okazaki, K., Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo, *Amer. Zool.*, 15, pp.567-581 (1975).
- 8) Wilt, F., Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos, *Zool. Sci.*, 19, 253-261 (2002).