

過重力環境がウニ単離小割球培養細胞やウニの骨片形成に与える影響

お茶大 今井真理子 宇宙研 黒谷明美 東大 江口星雄 お茶大 山口守 清本正人

The effect of hypergravity on the spicule formation in the culture of sea urchin micromeres and embryos

Mariko Imai¹, Akemi Izumi-Kurotan², Hoshio Eguchi³, Mamoru Yamaguchi¹ and Masato Kiyomoto¹,
¹ Tateyama Marine Laboratory, Marine and Coastal Research Center, Ochanomizu University, Kou-yatsu, Tateyama Chiba 294-0301
² Institute of Space and Astronautical Science Yoshinodai, Sagami-hara, Kanagawa 229-8510
³ Research Center for Nuclear Science and Technology, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032
 E-Mail: kiyomoto@cc.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. This skeletogenic cells are called primary mesenchymen cells and are derived from micromeres at 16-cell stage. Spicule formation by the cultured micromere of sea urchin was used as a model for the morphogenesis in biomineralization to be adapted as an experimental system in space. We have detected an effect for spicule formation by cultured micromere in the different gravity environment. In this study we examined the effect of hypergravity in the culture medium with different serum concentration. Though the culture medium containing 4 % horse serum is suitable for the spicule formation, it was difficult to detect significant difference in hypergravity condition. In the low concentration of serum the number of spicule decreased and it recovered significantly in hypergravity. It was observed that extra spicules were formed later under hypergravity condition. Next, Ca²⁺ transport was examined. The inhibitor of Ca²⁺-channel (diltiazem) was added to the micromere culture. The number of spicules was decreased in the culture with diltiazem. But the decrease of spicule number was recovered under hypergravity condition. These results show the possibility that the Ca²⁺ uptake is one of a candidate process that is affected by hypergravity condition.

Key words; skeletogenic cell, sea urchin, micromere, centrifuge, calcium, diltiazem

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る（Fig. 1）。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。これまで、遠心機、クリノスタット、航空機を使った各種実験を行い、重力環境により骨片形成が影響をうけることが確認されている。今回、小割球を培養する際の血清濃度と骨片形成の評価方法について検討し、実験の再現性を改良した。さらに、骨片の材料の一つ、カルシウムイオンの輸送に対する過重力の影響についても調べた。

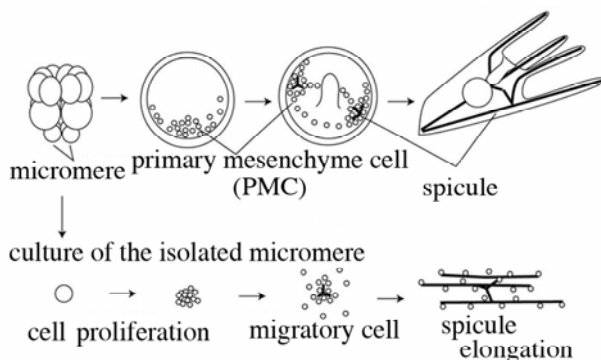


Fig. 1. Spicule formation in sea urchin embryo and in the culture of micromere.

【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×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、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×g の対照群と比較を行った。

【結果と考察】

小割球の培養では、通常 4% の濃度の馬血清が使われる。この血清濃度は骨片形成に適しており、濃度を下げると形成される骨片の数は減り、骨片の長さも減少する。血清の濃度を 0.1% まで下げると全く骨片は形成されない。

各血清濃度での培養細胞を過重力環境に置くと、血清濃度が高い時は、骨片の数、長さに影響が見られる場合があるが、抑制的に働く場合と Fig. 2 のように促進的に働く場合が観察されることがあり、どちらも有意な差になることは少なかった。しかし、

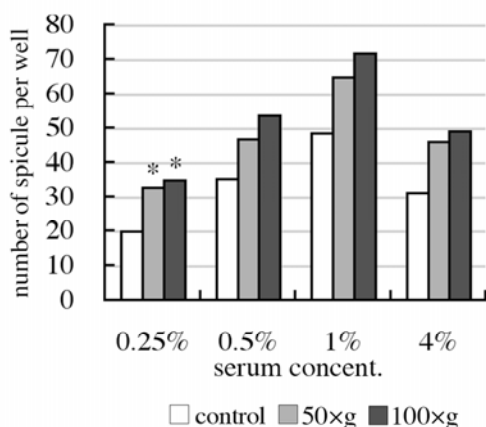


Fig. 2. The gravity effect for spicule formation at various serum concentrations. The effect under hypergravity was shown clearly in low serum concentration.

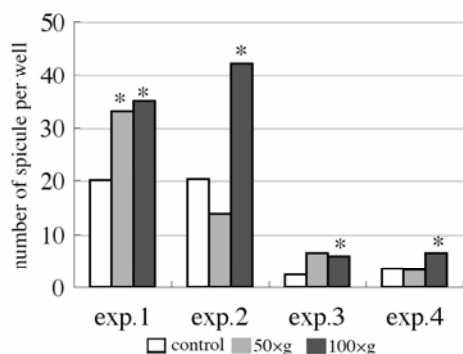


Fig. 3. The gravity effect for spicule formation at 0.25 % serum concentration. The spicule numbers increased under 100g. *,P<0.05

血清濃度を下げていくと、0.25%では骨片の数が有意に増加するようになった (Fig. 2)。この血清濃度での実験を繰り返すと、バッチによって形成される骨片数は異なるが、100 x g の過重力により 4 回とも骨片数が有意に増加している (Fig.3)。

次に、このような低濃度血清条件で観察される過重力による骨片数の増加がどのように生じているのかについて調べた。まず、過重力環境下でいつ骨片形成が始まるのかを、途中で遠心機を止めて観察した (Fig.4)。受精後 30 時間以降に骨片形成が始まり、骨片数が増加するが、その増加の様子は 1 x g の対照群と違いはなかった。対照群では 40 時間以

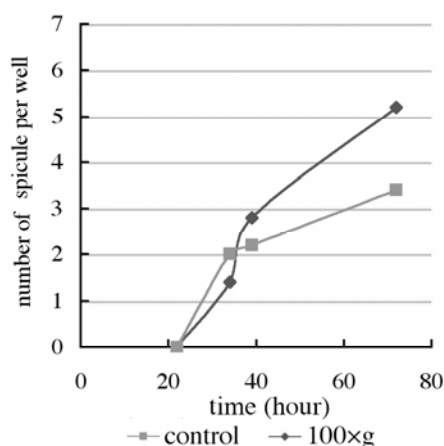


Fig.4 Appearance of spicules in the centrifuge experiment. Isolated micromeres were cultured in sea water containing 0.25 % horse serum. The number of spicules was checked at each time.

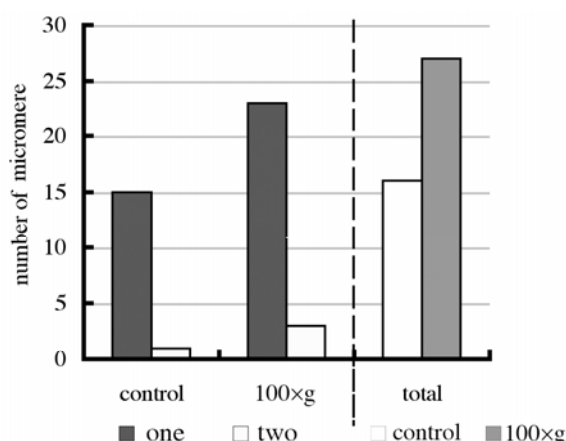


Fig. 5 The count of the micromeres whose descendant cells formed spicule. Only one spicule was formed in the descendant cells of most micromere under control and hypergravity condition.

降)に形成される骨片が少ないのに対し、100 x g 実験群では遅れて形成される骨片が多く、この差が骨片数の増加をもたらしていることが分かった。

単離小割球は十数個の細胞に分裂し、ある程度の範囲の中に遊走しているため、それぞれの小割球に由来する細胞群の間には十分な距離があり、識別可能である。1個の小割球に由来する細胞群が複数の骨片を形成することもある。そこで、過重力により骨片の数が増えるのは、1個の小割球由来の細胞群の中に形成される骨片の数が増えるためか、それとも、骨片を形成できなかった細胞群が形成するようになったのかを調べた (Fig. 5)。対照群に比べ、100 x g 実験群でも、1個の小割球に由来する細胞群で2個以上の骨片を形成するものは特に増えているわけではなく、1個の骨片を形成するものが増えていた。以上の結果から、過重力環境下では、低濃度血清のために骨片を形成できなかった細胞が、通常よりも遅れて骨片形成を開始することにより、骨片数が増えているということが分かった。

骨片の主要な成分となるカルシウムイオンは海水中から細胞膜表面のカルシウムチャンネルを介して取り込まれている。このため、カルシウムチャンネルの阻害剤により骨片形成は抑制される。この状態では、阻害剤により減少したカルシウムイオンの取り込みが骨片形成の程度を限定する要因になっていると考えられる。骨片形成へと至るサブプロセスの中で過重力環境によりカルシウムイオンの取り込みの部分が影響をうけていないかを調べた。通常血清濃度である4%の馬血清を含む海水で培養した小割球に、カルシウムチャンネルの阻害剤 (ジルチアゼム) を、骨片形成がある程度阻害されるように加え、遠心実験を行った。ジルチアゼム

により形成される骨片数が減少するが、100 x g の過重力により骨片数が増加した (Fig.6)。その程度は、0.25%馬血清により減少した骨片数が過重力により増加するのと同じであった。

ウニ胚の骨片はシンシチウムの状態にある一次間充細胞の中の骨格胞に、カルシウムイオンや基質蛋白質が蓄積して形成される。過重力の影響は、このような骨片の材料の取り込みや合成、輸送、蓄積の各過程のどこかに作用しているはずである。今回、カルシウムイオンチャンネル阻害剤による抑制 (骨片数の減少) が、過重力により回復した結果は、カルシウム輸送のプロセスに重力環境が影響する可能性を示している。

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) Iwata, M. and Nakano, E., Enhancement of spicule formation and calcium uptake by monoclonal antibodies to fibronectin-binding acid polysaccharide in cultured sea urchin embryonic cells, *Cell Differentiation* 17, pp. 57-62 (1985)
- 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) Kitajima, T. and Matsuda, R., Specific protein synthesis of sea urchin micromeres during differentiation, *Zool. Mag.*, 91, pp. 200-205 (1982).
- 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, pp.567-581 (1975).
- 7) Wilt, F., Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos, *Zool. Sci.*, 19, 253-261 (2002).

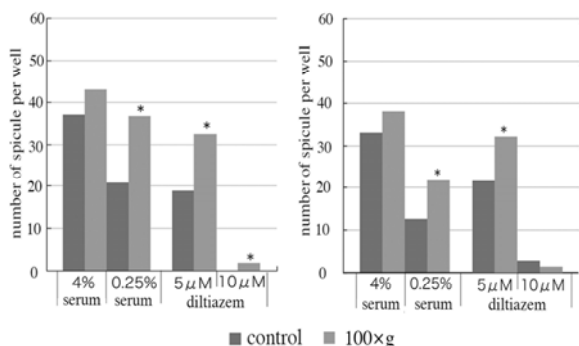


Fig. 6 The number of spicule decreased by calcium channel antagonist, diltiazem. Under the hypergravity this suppression recovered and the number of spicule increased.