

重力実験のためのウニの産卵期の調節と配偶子の保存

清本 正人（お茶大），黒谷 明美（JAXA），江口 星雄（東大），山口 守（お茶大）

Gametogenesis control and gamete preservation of sea urchin 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: Marine invertebrate species, especially sea urchin, are convenient materials for developmental biology. They spawn a large amount of gametes that are ready to be fertilized without any special treatments. But the breeding season restricts the research period in a year because the animals are dependent on natural populations. The animals in breeding season are so sensitive for environmental changes that they sometimes spawn spontaneously without enough culture system. These problems on the restricted breeding season and the transportation make it difficult to adapt to plan the gravity experiment using these animals. The breeding season of sea urchin was possible to control the culture condition. Under the reversed temperature condition, *Hemicentrotus purcherrimus* matured even in summer or autumn though the natural breeding season is winter. Unfertilized eggs could be preserved for more than one week by adding antibiotics. The sea urchin will become the adaptive material for gravity experiments with these devised methods.

Key words; gravity experiment, skeletogenic cells, sea urchin, gametogenesis, gamete preservation

1. はじめに

海産無脊椎動物は、容易に大量の配偶子を採用でき、体外受精が容易などの特徴があり、発生の各種実験に古くから使われている。炭酸カルシウムからなる内骨格を持つウニでは、幼生の骨片（幼生骨格）は、16細胞期の小割球に由来する一次間充細胞によって形成される。この小割球を単離培養することで、他の組織を除いた骨片細胞だけを培養することが可能である(Okazaki, 1975; Kiyomoto & Tsukahara, 1991)。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、各種重力環境の造骨組織に直接及ぼす影響を調べることが可能である。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、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)。

このような実験材料としての利点のある海産無脊椎動物ではあるが、一方で、天然の動物を利用しているために、産卵期しか実験できないという大きな問題がある。また、産卵期の動物は飼育条件のわずかな変化にも反応して、自発的に放卵放精をしてしまうため、安定した飼育環境を維持するために、水槽設備は大がかりなものになってしまう。重力実験等の材料として、航空機などを利用した研究を立案する上で、時期や輸送維持の制約は大きな問題となる。

自然の動物の多くは、1年の周期の中の特定の時期に生殖時期がある。この周年の周期を引き起こす環境要因として、主に明暗の周期と温度の変化が考えられる。ウニの場合、アメリカ西海岸のウニでは明暗の長さの変化が、日本の温帯域のウニでは温度の変化が引き金となっている (Pearse *et al*, 1986; Sakairi *et al*, 1989)。このような環境要因をコントロールすることで、成熟する時期を変更できる可能性が示されている (Sakairi *et al*, 1989)。

ひとつの個体から大量の配偶子が得られることが、ウニのような動物の実験材料としての利点のひとつである。たいていの実験では、量的にはそのごく一部で十分であるが、放卵された未受精卵は時間経過とともに、受精能が落ちてやがて崩壊してしまうため、大量の材料がどうしても無駄になってしまう。このため、実験材料としては、常に新鮮な採卵したてのより良いものを使えるように、通常の発生関連の研究では努力がなされている。しかし、実験材料として必要な質を保った程度に未受精卵を保存することができるなら、遠方での実験でも成体を輸送・維持する必要がなくなるため、実験計画の立案が飛躍的に容易になる。すでに、抗生物質を加えることで未受精卵をある程度の期間保存できることがアメリカの複数の種類を使って報告されている (Epel, 1997)。

2. 材料と方法

実験にはバフンウニ *Hemicentrotus purcherrimus* を使用した。ウニの飼育は、天然海水をかけ流している屋外水槽と、冷却と保温の可能な恒温循環水槽を使用した。成熟度の確認は、10mM 塩化アセチルコリンを割腔内に注射し配偶子を放出するかで雌雄を判別し行った。また、一部は、殻を割って生殖巣を取り出し、ブアン液で固定後、通常のパラフィン切片を作成し、配偶子形成の程度を組織学的に観察した。未受精卵は抗生物質を加えたミリポア濾過海水（孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ ）中に 4°C で保存した。50ml のねじ口試験管に、体積で 0.5ml の未受精卵を入れた。抗生物質はペニシリン（100 U/ml）とストレプトマイシン（100 $\mu\text{g/ml}$ ）を使用した。

3. 結果と考察

バフンウニの産卵期は冬期で、海水温は $1\text{--}3^\circ\text{C}$ 程度まで下がっている時期になる。海水温は、夏期は 26°C 程度まで上昇し、年間では 10°C 以上の温度差がある。まず、産卵期に採集したウニを、産卵期と同じ低温で1年間飼育した。すると、6月でも10個中8個が配偶子を持っていて、産卵期を長くすることができた。しかし、8月になると成熟しているものも減るので（3/7）、一定の温度環境では産卵期以外の時期に成熟させることはできないことが分かった。そこで、秋期に採集したウニを、冬期は夏の高温で飼育し、翌年の春と夏に温度を下げて飼育した。すると温度を下げてから2ヶ月ほどで、多くの個体が成熟した。温度を下げる時期を調節することで、6月下旬から11月にかけての時期に、卵と精子を得ることができた。

冬期に高温で飼育したウニでも、その一部は成熟していた。生殖巣の組織切片でも、卵や精子の形成が起こっていることが確かめられ、それまで自然の中にいた動物は、数ヶ月温度を変えても、本来の年周期どおりに成熟してしまうことがわかった。しかし、冬期に高温で飼育したウニは、5月にはその生

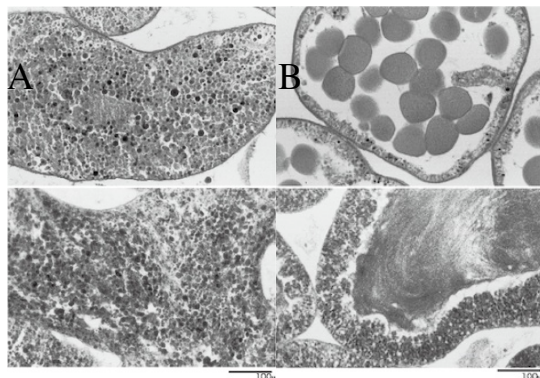


Fig.1 Sea urchin gonad in May cultured in high temperature condition in winter (A) and in natural condition (B).

殖巣から配偶子はまったく無くなり、早く配偶子形成が終ることが確認された(Fig. 1)。そのため、次のサイクルに早く入ることが可能になったのかもしれない。

本来冬の産卵期を、夏から温度を下げることで早めることができることが報告されている（伊藤他, 1989）。この方法だと、前年の秋から高温で飼育するのに比べ、飼育期間が短くて済む。このような方法を組み合わせ、三つの高温水槽を使って、6月下旬から8月上旬、9月から10月、11月から12月の本来産卵期ではない時期に成熟したバフンウニを提供することが可能になった。

このようにして夏期に得られた卵と精子が実験材料として使用に耐えられるのかを、受精後の正常発生と、単離小割球を培養した骨片細胞の培養によって調べた。受精卵の発生は、正常に進行し、健全なプルテウス幼生へと発生した(Fig. 2A)。単離小割球の培養でも、1日後には一次間充細胞に分化し、本来の冬の産卵期の卵と同様に $100\ \mu\text{m}$ を超える骨片が培養条件下で形成された(Fig. 2B)。

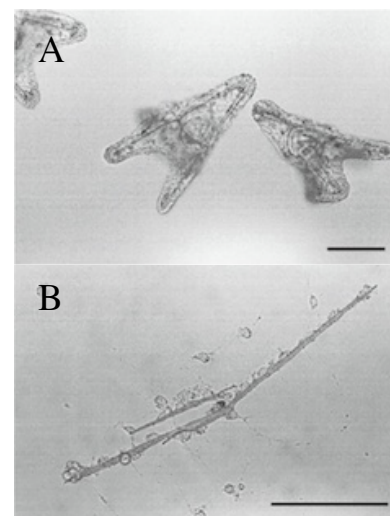


Fig.2 Larvae (A) and skeletogenic cell culture (B) from the material obtained in summer.

室温に置いた未受精卵は、翌日には媒精しても受精膜がほとんど形成されなくなる。バフンウニの未受精卵は 4°C で保存すると、翌日はまだ十分受精するが、数日のうちに受精膜は形成されなくなり、その後、卵は崩壊してしまう。このような未受精卵の保存については、抗生物質を加えた海水を使うことで、大きく改善されることが報告されている（Epel, 1997）。バフンウニの未受精卵をペニシリンとストレプトマイシンを含む海水中で保存した所、1週間から10日の間、受精可能な状態で維持できた。しかし、バッチによっては、一晩から数日で、崩壊す

る卵の多い場合もあった。特に産卵期の後半になると、そのようなバッチが目立つようになった。そのような場合、最初の1～2日程で崩壊するものが出て来るので、そうならないものを選ぶことで選別することが可能である。この方法で、10日間保存した卵を発生させたところ、正常な幼生へと発生し、さらに3ヶ月飼育を続けると、変態して殻径が数ミリの稚ウニまで発生した。

天然の産卵期に制約されるウニでも、飼育条件をコントロールすることで産卵期を任意の時期に変えられることと、採卵した未受精卵を1週間から10日ほど保存できることが実証された。これらの方法を使うことで、時期や輸送の制約を解消できるので、航空機実験等で研究室を離れて実験する場合に柔軟に計画を立てることができる。

参考文献

- 1) Epel D, Immortilized eggs: standard procedures for long term storage of urchin eggs, and innovative teaching tools. *Developmental Biology of the Sea Urchin XI* (1997)
<http://www.stanford.edu/group/Urchin/contents.html>
- 2) 伊藤 史郎, 他; 水温制御によるバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* の成熟, 産卵促進, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, pp. 757-763 (1989)
- 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, pp. 567-581 (1975)
- 7) Pearse JS, Pearse VB, Davis KK, Photoperiodic regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Exp. Zool.* 237, pp. 107-118 (1986)
- 8) Sakairi K, Yamamoto M, Ohtsu K, Yoshida M, Environmental control of gonadal maturation in laboratory-reared sea urchins, *Anthocidaris crassispina* and *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zool. Sci.* 6, pp. 721-730 (1989)