ウニの発生実験

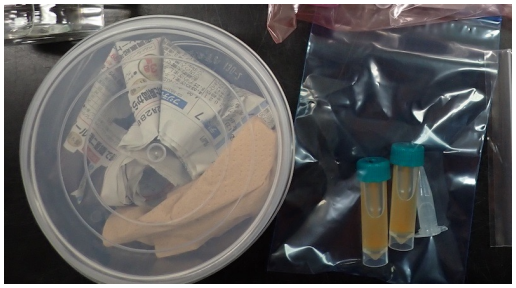
2021年 7月 県立川越女子高校
8月 東邦大学、早稲田大学
9月 東邦大学
10月 川口市立高校

実習スケジュールの例

1日目　午前　ウニと実験器具の配達
午後　採卵と受精・卵割の実験観察
2日目　午前　ふ化・胞胚の観察
午後　原腸胚の観察
3日目　プルテウス幼生の観察
（１ヶ月ほど飼育した材料を送付して）
幼生の成長と成体への変態・稚ウニの観察

＊日程のない場合は、胚や幼生を一緒に送付して、1日で観察を終わらせることも可能。

１日目　採卵

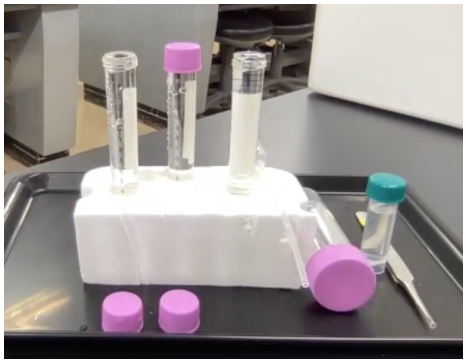


バフンウニ
雌１匹（紙タオル）
雄１匹（新聞紙）

未受精卵
精子

海水
採卵用器具

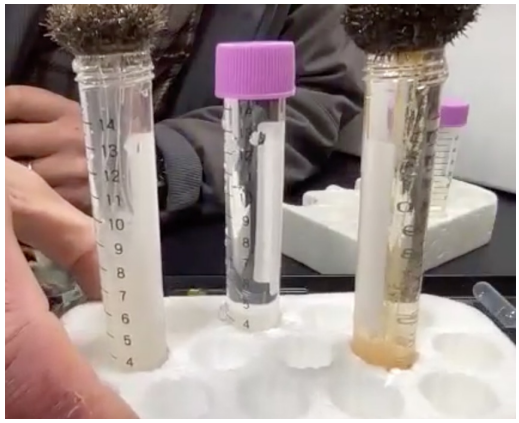
Zoomで実演される方法を見ながら、
一緒に採卵します。



海水の入った試験管を用意

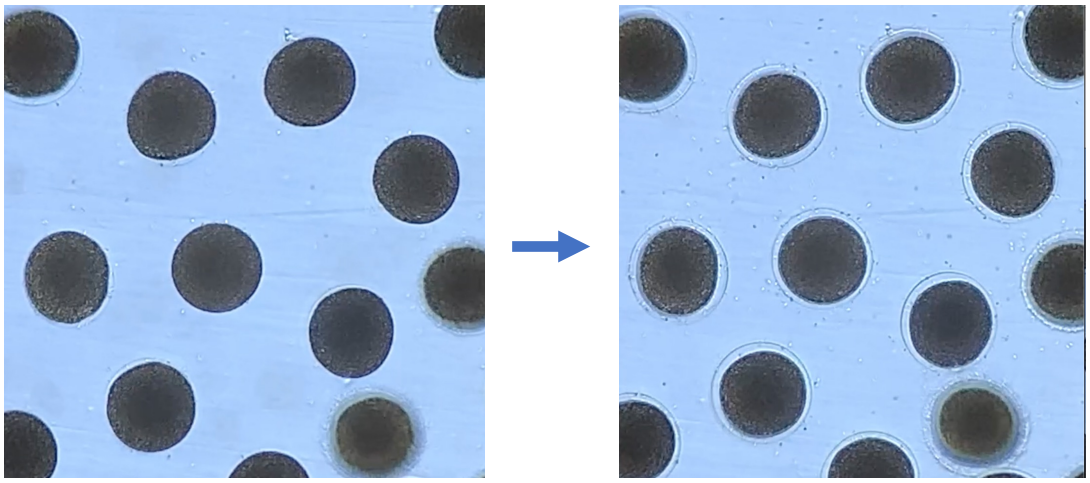
ウニの口を外す

塩化カリウムの液を入れる



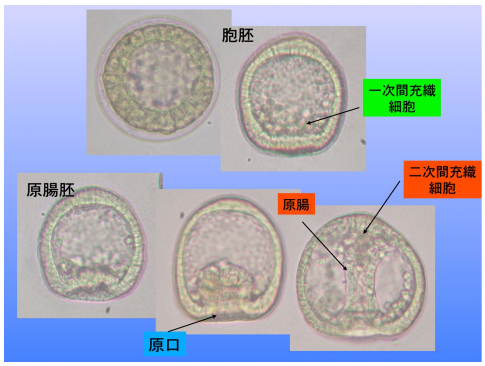
雌は卵を（右側）
雄は精子を（左側）放出

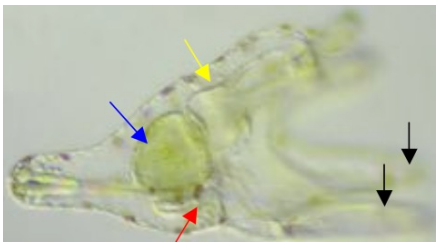
１日目　受精・卵割の観察



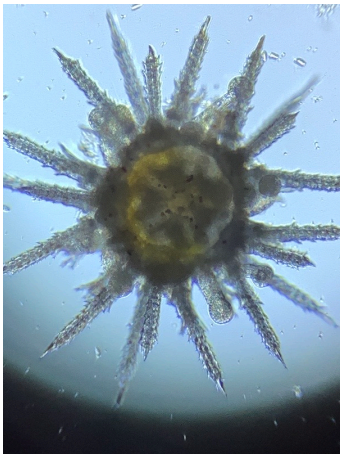
Zoomを通しての説明通りに、未受精卵に精子を加え、
受精と卵割を観察
その後の発生を観察

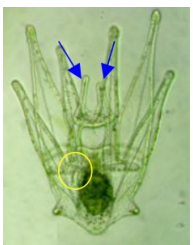
2日目　フ化した胞胚、原腸胚の観察





3日目　9:00- 10:30　プルテウス幼生の観察
送付された幼生と稚ウニの観察



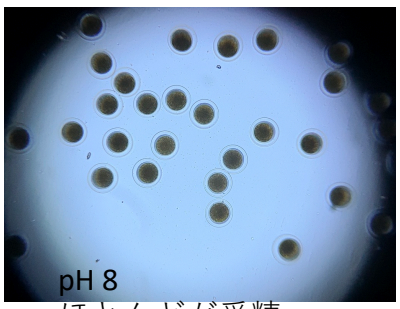


海洋酸性化のウニの発生への影響

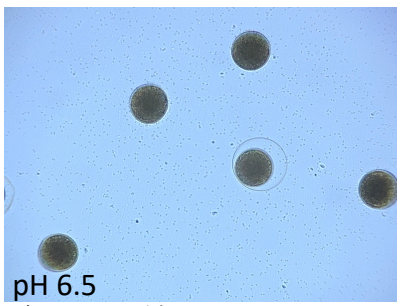
CO2により酸性化した海水を送付
pH 7, 6.5, 6 と対照の自然海水pH 8の４本を２セット

受精への影響

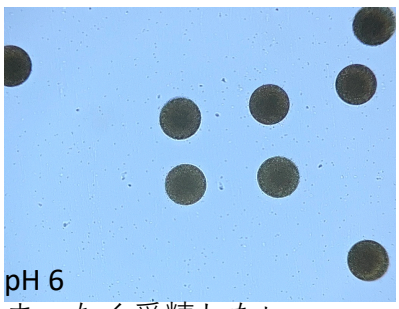
2日目　9:00- 10:00　の時間に
各pHの海水に精子を希釈し、未受精卵を加え、受精率を調べる。



ほとんどが受精



多くは受精しない

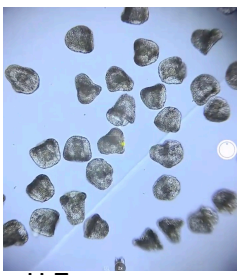


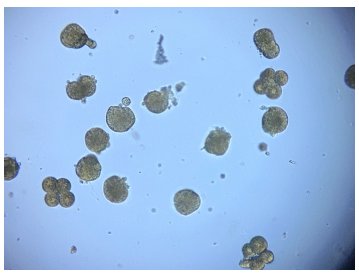
まったく受精しない

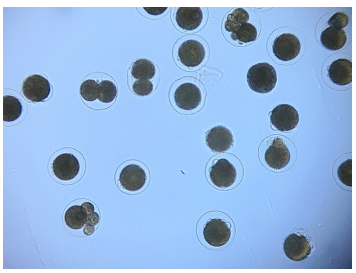
胚発生への影響

1日目　13:00- 17:00の時間に
受精卵を各pHの海水に加え発生させる。
3日目　9:00- 10:30の時間に
各pHの海水で発生させた胚の形態を調べる。

pH 8
プルテウス幼生


pH 7
発生が遅れる
骨格は？


pH 6.5
繊毛で動くものはあるが、形が異常


pH 6
卵割していない

東邦大学実習（リモート）
2021 9 10-12

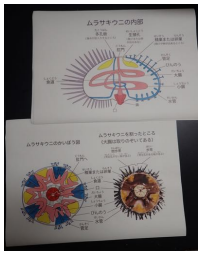
ウニの発生

お茶の水女子大学
湾岸生物教育研究センター
清本　正人

1

箱の中身

ムラサキウニ
　雌　３匹（茶色のキムタオル）
　雄　３匹（新聞紙）



ウニの形態の図

ウニ殻 ムラサキウニ
タコノマクラ

①採卵採精用器具
ハサミ、ピンセット、
KCl液、スポイト

②採卵採精用容器
100 mL 6個

②卵用　25 mL　スポイト
精子用　シャーレ、
チューブ、スポイト

キタムラサキウニ卵
箱の外に

キタムラサキウニ精子
氷のそばに

墨海水

偏光板、
ピニールテープ

精子不活
性化液

ムラサキウニ幼生
と稚ウニ

幼生飼育用の海水
(100ml 3本)

2

ムラサキウニの採卵・採精

この他に用意するもの
・ウニを載せるバット
・300 mL程度のビーカー
海水を入れる

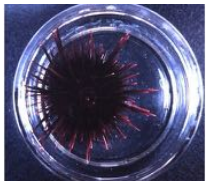
・箱から雌のウニを取り出しバットに。
・ハサミ、ピンセット、KCl液、スポイトを用意。
・100 mL程度の容器に海水を目一杯入れる。
・バットの上で、口のまわりの皮をハサミで切り、
ウニの口器を外す。ピンセットを使っても良い。
口器を奥に押し込んではいけない。
・海水で、体内と表面をさっと洗う。

・海水が目一杯入った採卵用の容器に、
ウニを裏返しにのせる。
・口を外した穴から、KCl (0.5 M)を数mLスポイトで入れる。
・放卵を観察する。
（放卵が終わったら、）
・容器の底に沈んだ卵を2-3mLピペットで吸い取り、
海水の入った配分用の容器（例えば25mL容器）に入れる。
（後述の精子は氷中が望ましいが、卵は15度以上に）

・同様の手順で雄のウニの放精を観察する。
・放精の観察はほどほどに、オスを空のシャーレに載せ、濃い精子液をためる。
・濃い精子液をピペットで吸い取り、マイクロチューブに入れる。氷中か4度に。

3

キタムラサキウニの未受精卵と精子も用意してあります。ムラサキウニと同様に受精、発生を観察してください。



ムラサキウニ（7月～8月）
Heliocidaris crassispina

キタムラサキウニ（9月～10月）
Mesocentrotus nudus

4

受精、発生の観察

・卵（25mL容器）を、卵用のスポイトで、海水を入れたシャーレに入れる。
・精子（マイクロチューブ）を、精子用のスポイトでほんの少しとり、
海水を入れたシャーで希釈し、希釈した液を卵のシャーレに数滴入れる。
・攪拌し、時刻を記録する（受精した時刻）。

・未受精卵、受精卵をそれぞれホールスライドグラスに１滴載せ、
カバーグラスをかけて観察。

受精膜、周りの精子、卵内の雌性前核、雄性前核（星状体）

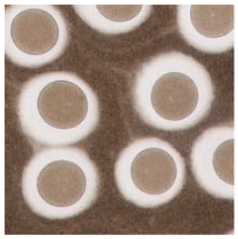
・受精の過程を観察するには、、
ホールスライドグラスに卵を１滴、カバーグラスなしでピントを合わせる。
希釈した精子液を１滴、卵の１滴のそばに載せる。
顕微鏡で観察しながら、鉛筆の先などで卵と精子の液をつなぎ、卵の周りに
精子がやってきたところを観察する。

5

ゼリー層の観察

卵の周りには透明なゼリー層がある。ウニの場合、精子はゼリー層の物質により先体反応を起こし、受精できるようになる。卵が密集してもゼリー層の厚さだけ、一定の間隔があるのが観察される。墨海水（墨汁を混ぜた海水、海水で墨をすっても良い）中の卵を観察すると写真のようにゼリー層を確認できる。

・ホールスライドグラスではなく、平なスライドグラスを使う。ホールスライドグラスの裏側でも良い。
・未受精卵を１滴、墨海水を１滴、スライドグラスにとり、カバーグラスをかけて観察する。
・墨の粒子はゼリー層に入らないので、ゼリー層が白く抜けて見える。
・海水が多いと、墨海水が全体を覆ってうまく見えない。卵がカバーグラスとスライドグラスに挟まるくらいが良い。

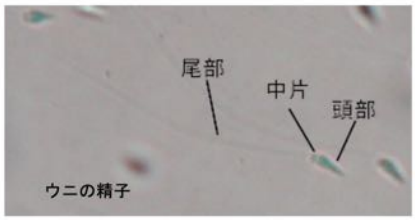


6

精子の観察

生きた精子は活発に動くので観察しにくい。ここでは、尾部の鞭毛運動を阻害する液で動きを止めて観察する。頭部と尾部の間の中片（ミトコンドリアがある）まで確認できるはずですが、、

・マイクロチューブの濃い精子液をスポイトで少量とり、精子不活性化液に入れ、攪拌する。
・その１滴をスライドグラスの平なところ（普通のスライドグラスか、ホールスライドグラスの裏側）にとり、カバーグラスをかけて観察する。
・１０倍の対物レンズで、カバーグラスの縁を目印に、ピントを合わせる。さらに、４０倍の対物レンズでピントを合わせる。絞りで見え方を調節する。



精子不活性化液
カリウムを増やし、
酸性にした人工海水

NaCl 425 mM
$MgCl_2$ 27 mM
$MgSO_4$ 29 mM
$CaCl_2$ 10 mM
$NaHCO_3$ 2.4mM
KCl 50 mM (通常10 mM)
MES 5mM
pH 6.0 (通常pH 8.0)

Bracho et al. 1997 Biochem. Biophys. Res. com. 237, 59-62を改変

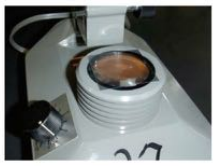
7

偏光による幼生骨格の観察

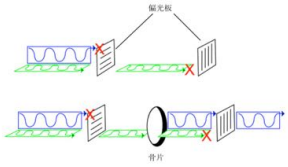
幼生骨格（骨片）は、炭酸カルシウムの結晶（方解石、カルサイト）。その性質（複屈折性）により、偏光を使うと光って見える。

・小さい偏光板（丸型）を接眼レンズの上にのせ、ビニールテープで左右をとめる。大きい偏光板（四角）はステージの下の照明の上にのせる。

・顕微鏡をのぞきながら接眼レンズを回転させ、視野がもっとも暗くなるところで回転をとめる。この状態で、幼生の骨格が暗い視野の中で光って見える。絞りを全開にすると、組織の影が薄くなり骨片がよく光って見える。



偏光照明の原理



光は波の性質があり、普通の光源は様々な方向に振動した光の集まりである。偏光板は、その中のある一定の方向に振動する光しか通さないので、偏光板を通り抜けた光はそろって一定の方向に振動している。これが偏光である。
この図のように、2枚の偏光板が直行していると、1枚目を通り抜けた光（緑）も2枚目の偏光板を通り抜けることができない。顕微鏡は今、この状態になっているので、視野全体が暗くなっている。偏光板の間に、結晶のように分子が一定の配列を取るものがあると、振動面のそろった偏光がそこを通り抜ける時に、いろいろな方向に振動するようになる。このような性質を複屈折性と言う。骨片は炭酸カルシウム（$CaCO_3$）の結晶（方解石）であり、複屈折性を持つ。こうして、骨片を通り抜けた光の中には、2枚目の偏光板を通り抜けるような方向に振動するもの（青）もあるので、骨片が光って見える。

8