

## ウニを調べる

ウニと聞くと、あの軍艦巻きの上に載った黄色いものを想像する人が多いかも知れない。しかし、ウニは食材としての他に発生生物学の代表的な実験試料としても知られている。丸い卵が分かれてゆく図は、生物の教科書ではおなじみだが、それとウニ軍艦を結びつけることのできる人は少ないだろう。また、あのイガ栗のような外形とのマッチングはさらに容易なことではないと思われる。

ここでは、先ずウニの発生に関する実験を行い、人工授精した卵が分裂し、幼生となって泳ぎだすまでを、リアルタイムで観察する。

さらに、その特徴的なイガイガの外形を観察し、その独特な内骨格や口器、体表を被う他の動物では見られない特殊な構造を観察する。

## ウニの発生生物学

生殖時期のウニから未受精卵と精子を採取し、人工授精を行い、受精卵の変化をリアルタイムで観察する。

### 採卵・採精

ウニを裏返し、口器の脇から注射針を刺し、0.55 M KCl もしくは  $10^{-5}$  M アセチルコリン溶液(海水に希釈したもの)を注入する。

背面にある生殖孔から卵が出てきたら海水を入れた腰高シャーレに生殖孔を下にして置き、放卵させる。

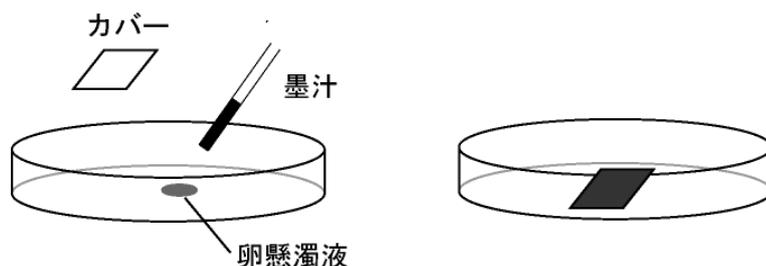
精子が出てきたら、シャーレの蓋に生殖孔を下にして置き、放精させる。放出された精液から、体腔液を含まない部分 (dry sperm) をとり、ポリチューブに入れ、使用するまで低温 (冷蔵庫もしくは氷中) で保存する。

放卵が終了したところで、シャーレの上清を捨て、卵を新しい海水に懸濁する (ゴミがあったらガーゼでこす)。しばらく静置し、卵が沈んだら上清を捨て、新しい海水に再懸濁する。これを繰り返す (2回以上)。卵を入れる容器はガラス製を用いる。

### 未受精卵の観察

ウニ卵には細胞質の不均質分布により極性(動物極と植物極)が存在する。一般に卵黄顆粒を多く含む植物極側が高密度となっている。未受精卵はかなり厚いジェリー層で覆われている。ジェリー層は透明なため、そのままでは観察しにくい。

洗浄が終わり、シャーレの底に沈んだ卵塊から1滴を取り、フラットシャーレに載せる。そこに墨汁 (海水で擦った墨) を加え、かき混ぜた後でカバーガラスを掛けて観察する。ジェリー層が存在すると、卵の周りに墨汁が入り込めず、白く抜けた空間が見られる。



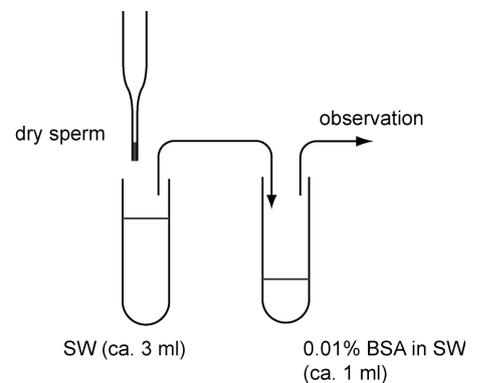
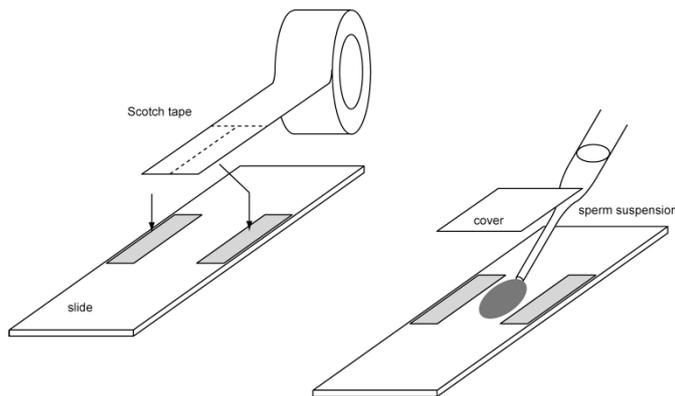
## 精子鞭毛運動の観察

棘皮動物の精子鞭毛の多くは、その運動が一平面内に限定されているため、その運動波形を詳しく調べることができる。ただし、鞭毛は太さが約  $0.2\mu\text{m}$  であり通常の光学系では観察することは難しい。また、鞭毛は約  $50\text{Hz}$ （1秒間に50回）で振動しているため、通常の照明では運動中の波形を観察することは難しい。ここでは、顕微鏡の分解能以下のサイズである鞭毛を見るために、暗視野顕微鏡を用いる。また、運動中の波形を「瞬間的に」捉えるためにはストロボ光源を用いる。

ウニ精子を海水に希釈しただけでは鞭毛がガラス表面に吸着されてしまうため、運動を観察することが難しい。吸着を防ぐために、海水に BSA（Bovine Serum Albumin, 牛血清アルブミン）を溶かし、その中に精子を希釈する。

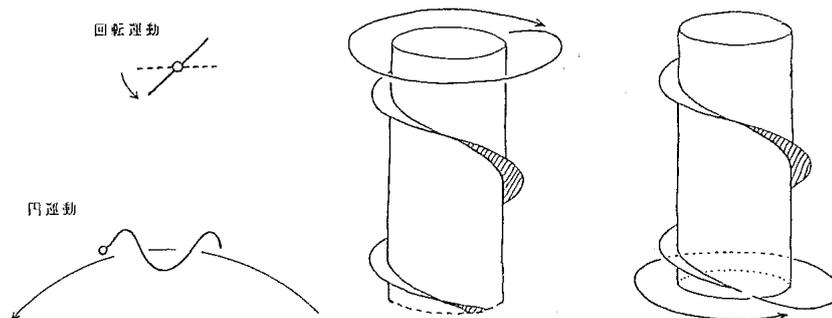
乾いたパスツールピペットを用い、その先端から  $5\text{mm}$  くらいのところまで dry sperm を吸い込み、全量を約  $3\text{ml}$  の海水に希釈する。その後、海水に希釈した精子の懸濁液  $1$  滴を、アルブミン海水（ $0.01\%$  BSA/SW） $1\text{ml}$  に希釈する。

ライドグラスにスコッチテープを貼ったものを用意し、その上にアルブミン海水中の精子懸濁液を乗せ、カバーグラスをかける。スライドグラスは予めキムワイプなどで汚れを良く拭き取ること。



## 連続光照明での観察

精子は海水中をラセンを描くようにして泳いでいるが、ガラス面に捕捉されると円を描くようにして泳ぐようになる。ラセン軌跡が捕捉されることで、カバーグラスの直下とスライドグラスの直上では円運動の方向が逆になる。そのときの方向は遊泳奇跡が左ラセンなのか右ラセンなのかで異なる。図（ここでは左ラセンの場合を示す）を参考にして、観察しているサンプルでのラセン性を決定する。



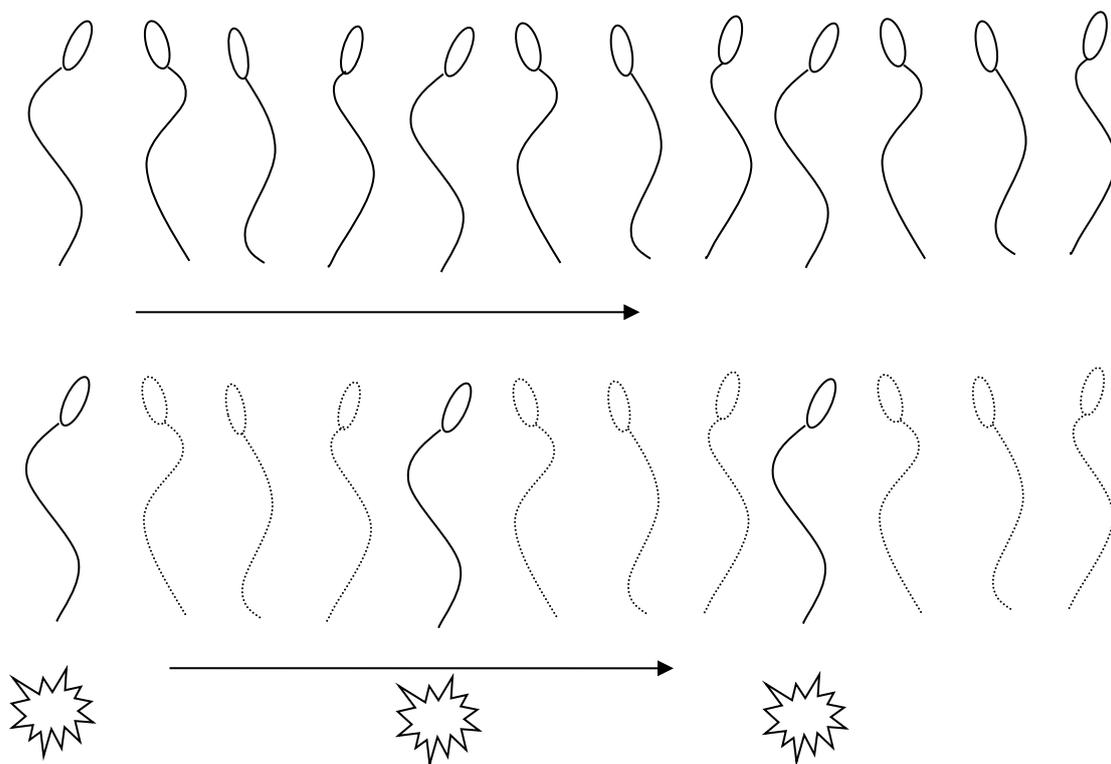
鞭毛の運動はとても速いので、連続照明のままでは個々の運動波形を見分けることはできないが、速い運動が重なり合って、精子頭部の後ろに羽状のシルエットとなって観察される。また、希釈後しばらくすると運動が遅くなり、運動波形が伝搬してゆく様子が観察される。

### ストロボ光照明での観察

ストロボはパルス状の発光を行う装置である。発光時間は数十マイクロ秒から数ミリ秒程度であり、連続した動きから、その時間内だけの動きを「切り出す」ことができる。従って、周期的な発行による照明により、連続的な動きをしている精子鞭毛の波形を逐次撮らえることが出来る。さらに、精子鞭毛のように、周期運動をするものをストロボ照明で観察すると、運動周期と発光周期が一致すると、鞭毛波形が止まって見えるようになる。

例えば下図のような時間経過(→)で鞭毛が周期的に振動するとする。ストロボ  の発光周期が運動周期と同期すれば、同じ波形が繰り返し観察される。

その結果波形が止まって見えるようになる。このときの発光周期が運動周波数を示している。



### 人工授精と受精膜の観察

シャーレに少量の未受精卵をとる。このとき、顕微鏡観察に支障のないように、海水の量は少め(深さ3mm程度)にする。精子を運動観察の場合と同様に海水で希釈し、顕微鏡の焦点を未受精卵に合わせた後、シャーレに加え攪拌する。精子が侵入した卵では侵入箇所から受精膜が形成されてゆくの観察できる。

## 初期発生の観察

受精した卵を海水で良く洗浄し（未受精卵の洗浄と同じように、沈殿と攪拌をくりかえす）、一部を観察容器に写し、顕微鏡で観察する。容器によっては、対物レンズが水没する恐れがあるので、レンズの作動距離を考えて倍率を選ぶ。

## 卵割

受精膜が形成されてから 1,2 時間後に細胞分裂(卵割)が始まる。最初の分裂は動物極と植物極を通る子午線方向に起こり、2つの割球ができる（2細胞期）。続いて最初の分裂面と直行する子午線方向で分裂が起こり割球は4個になる(4細胞期)。3番目の分裂はほぼ赤道面で起こり、動物極と植物極をそれぞれ含む割球となる(8細胞期)。続いて動物極側の割球は子午線方向に、植物極側の割球は緯度線方向に分裂する(16細胞期)。その後次々と細胞が分裂し、多数の細胞を持ち、内部に空間(卵割腔)を持つ桑実胚となる。その後も卵割は進み、一層の細胞が袋状になった、胞胚が形成される。胞胚の外部には繊毛が形成され、その運動によって受精膜内部で回転運動を行い、やがて受精膜を壊して胞胚は孵化する。

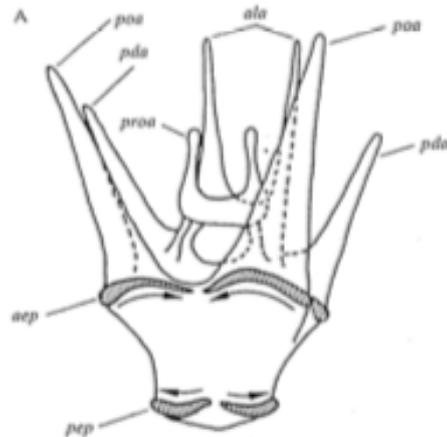
## 原腸陥入

胞胚は動物極に長い繊毛の束（頂毛）を持ち、回転運動をしながら動物極を前にして遊泳する。遊泳中の胞胚では、植物極側の細胞層が内側に陥入し（囊胚期幼生）、原腸が形成される（原腸胚）。原腸はしだいに伸びて、その先端に口が形成される。この時期になると幼生が変形し、角張ってくる（プリズム幼生）。プリズム幼生の内部には骨片が形成され、それが大きくなりながら、腕が発生する（プルテウス幼生）。プルテウス幼生は餌を取り始め、それに伴って後退遊泳をするようになる。

## 後期発生

初期のプルテウス幼生は4本の腕を持つが、2本の腕の間に新たに腕が形成され（6腕幼生）、さらに口の付近に2本の腕が付け加わり8本の腕を持つ後期プルテウス幼生（8腕幼生）となる。6腕幼生以降は遊泳のための繊毛帯を持ち、遊泳行動が多様化する。

後期プルテウス幼生内部にウニ原基が形成され、それをもとに生体へと過激な変態を遂げる。

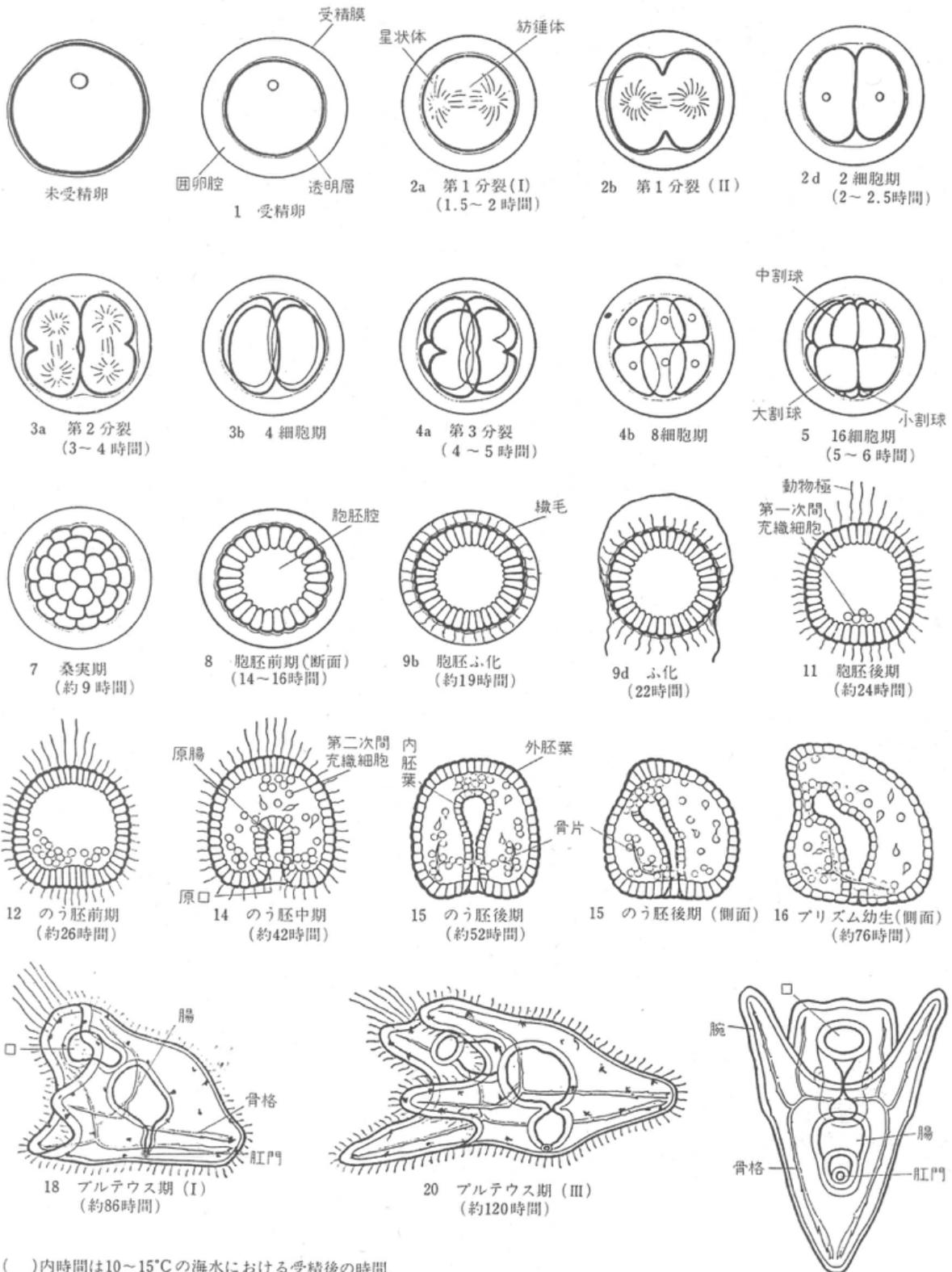


Mogami, Y., Fujima, K. and Baba, S.A. (1991) Five different states of ciliary activity in the epaulette of echinoplutei. *J. Exp. Biol.*, 155, 65-75.

参考：NHK ミクロワールド 大変身 ウニの秘密（ウニの発生に関する短編ビデオ）

[https://www2.nhk.or.jp/school/movie/outline.cgi?das\\_id=D0005100069\\_00000](https://www2.nhk.or.jp/school/movie/outline.cgi?das_id=D0005100069_00000)

バフウニの発生(発生段階図)



( )内時間は10~15°Cの海水における受精後の時間、  
数字は発生段階図の各期を示す(1は第1期)

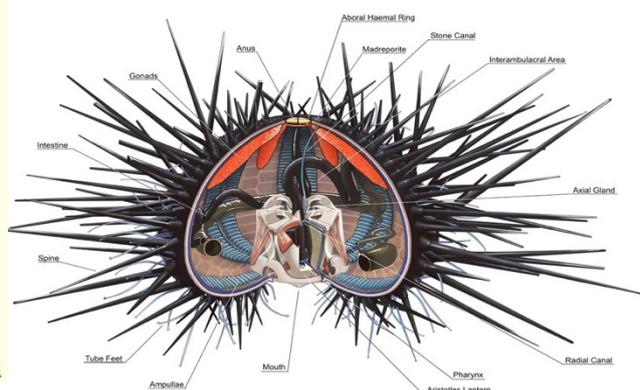
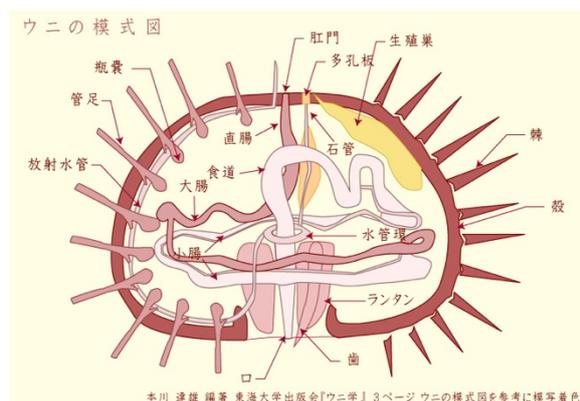
(岡田・宮内)

20 プルテウス期(III)腹面

## アナトミー

ウニは棘皮動物門に属し、その体表には特徴的な棘を持ち、いかにも強そうに見える。実際、棘皮動物は多くの礁で占有種となっており、大いに繁栄している。しかし、その繁栄は、汽水域や淡水域には拡大できていない。それは、ウニの体腔が多孔板を取水口とした水管系を通して外部の海水に繋がっているため、海水と同等の体液を維持するためには、海水域から離れることが出来ない。

丈夫な骨格（殻）をうまく取り外せば、内部の構造を観察することが出来るが、詳しい解剖は容易ではない。ここでは、ウニの外形を詳しく観察する。



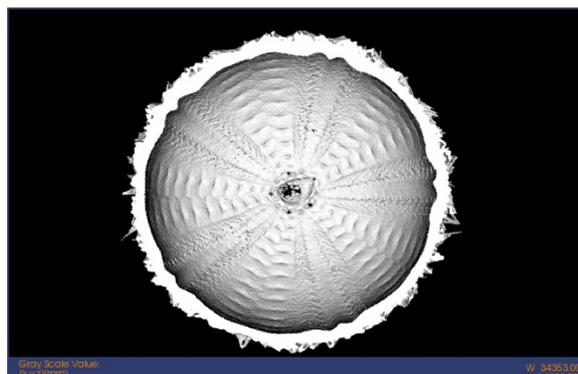
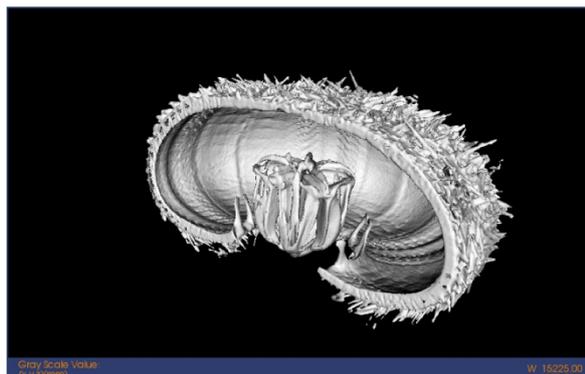
[https://www.akauni.com/unitoha\\_2.htm](https://www.akauni.com/unitoha_2.htm)

[https://en.wikipedia.org/wiki/Sea\\_urchin](https://en.wikipedia.org/wiki/Sea_urchin)

### 骨格と体軸, 口器

多くのウニ（ムラサキウニやバフンウニ）は口を下（海底側）に、その反対側に肛門を向けている。通常、動物は口と肛門を結ぶ体軸に沿って、口を先頭にして移動する。ウニは、体軸を海底に垂直に立て、それに直交した方向に動く。

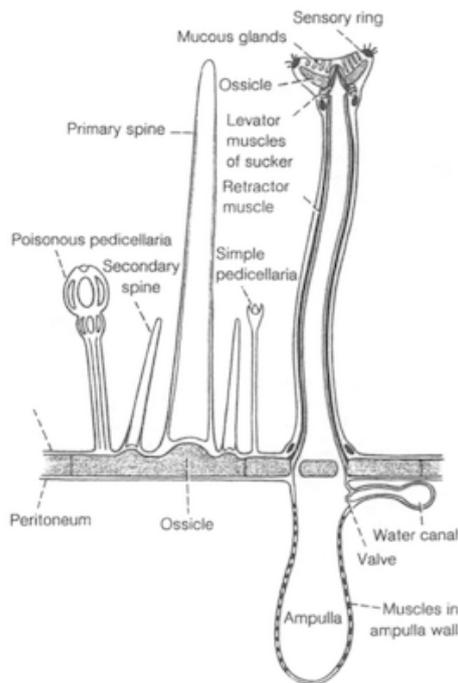
口の周りには丈夫な骨格を持つ口器があり、丈夫な歯で餌を嚙り取る。肛門は殻の反対側に開口し、その隣に多孔板があり、その周囲の5箇所生殖孔が配置している。



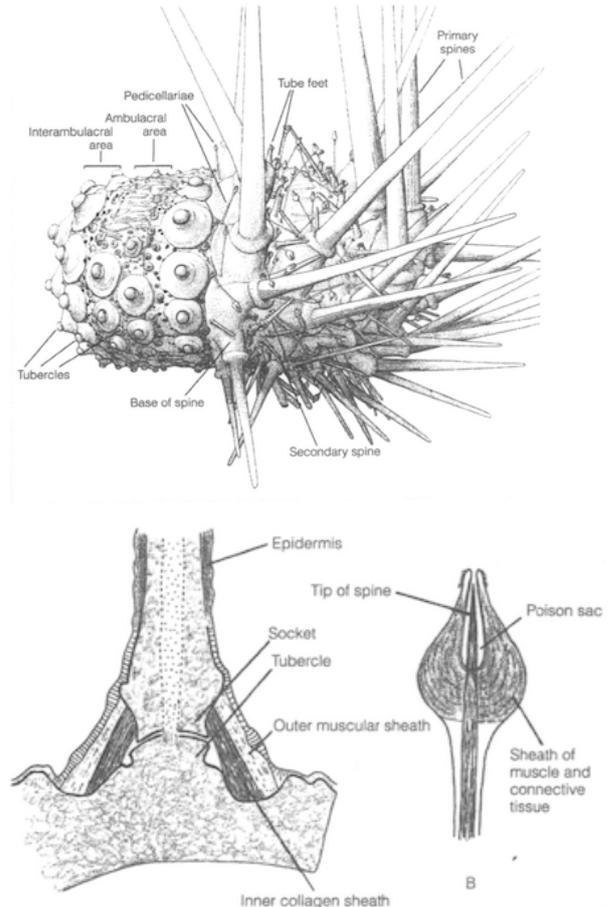
バフンウニの殻の X 線マイクロ CT 画像。殻と口器（左）と殻を内側から肛門開口部を見た図（右）（郷原優花，お茶の水女子大学修士論文から）。

## 棘

殻には管足が突き出す穴が並んだ部域（歩帯）が肛門から5放射状に配置している。その間の部域（間歩帯）に棘がボール・ソケット関節を介して突き出ている。関節部分の表皮の下には関節を取り囲んでいる平滑筋組織がある。その一部が収縮することで棘が任意の方向に傾く。筋組織の下には結合組織があり、細胞外マトリックスとして、コラーゲン繊維が豊富に含まれている。この組織が硬化（結合組織性緊張，キャッチ収縮）することで、棘を突っ張らせたり、傾きを維持したりする。



**Figure 19-35** Diagrammatic section through the body wall of a sea urchin, showing one ambulacral and one interambulacral ossicle and associated structures. [After Nichols, in part.]



Barnes, R.D. Invertebrate Zoology, 5th ed.

## 管足

管足の付け根には袋状の構造（瓶嚢，ampulla）があり，内部の水圧を変化させることで管足の伸縮を調節している。管足の先端は吸盤になっている。

## 叉棘

ウニの体表には棘と管足の他に，叉棘（pedicellaria）と呼ばれる特殊な器官がある。叉棘は色々な形態をしており，先端部が毒を含んだ袋状の構造を持つものや，三つ叉のハサミ状の構造を持つものがある。三つ叉の部分に触れる（例えば毛根などで）と，挟み込むのが観察される。

## 参考

叉棘の花園 Pedicellariae : <https://www.youtube.com/watch?v=wycvXTIVk7A&t=25s>

Dr.オクノのウニゼミ 放送大学 東京文京学習センター : <http://unisemi.fem.jp>

ウニを調べる レポート課題

氏名 \_\_\_\_\_ 番号 \_\_\_\_\_

実習終了時にこの用紙を提出し、スケッチ等は別紙で添付すること。

#### 発生生物学

1. 未受精卵のジェリー層を観察し、概略をスケッチで示せ。
2. ウニ精子の運動軌跡は右ラセンか左ラセンか、判定せよ。  
( ) ラセン  
判定理由；
3. ウニ精子鞭毛の運動周波数は ( ) Hz であった。
4. 卵割の様子について、2, 4, 8, 16 細胞期をスケッチで示せ。併せて授精からの時間経過を示せ。
5. 遊泳中の初期幼生の頂毛は観察できたか。  
(Y/N)
6. 初期幼生において骨片が形成されたおおよその時間  
受精後 ( ) 時間
7. プルテウス幼生の後退遊泳が観察できたか  
(Y/N)

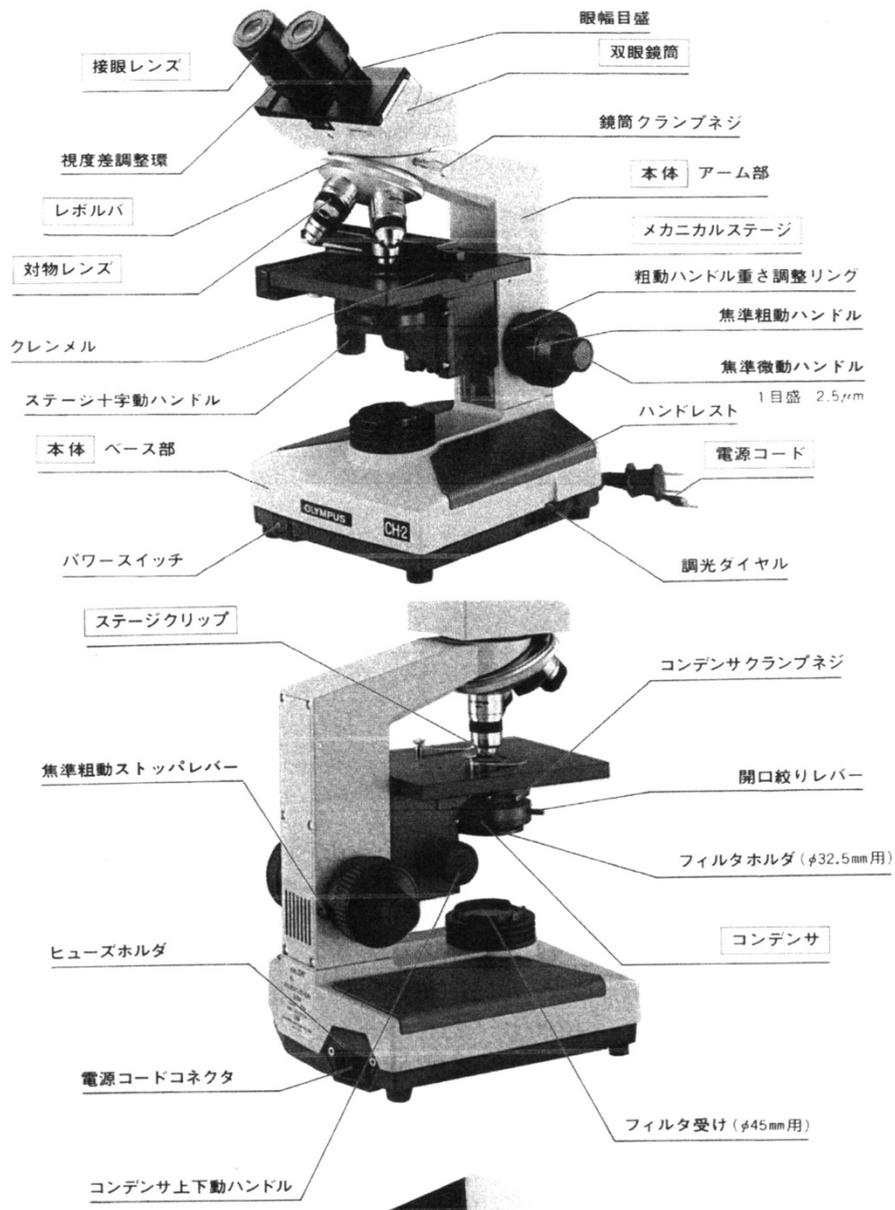
#### アナトミー

8. 観察に用いたウニの種類
9. 歩帯と間歩帯の区別がついたか。  
(Y/N)
10. 口器（アリストテレスの提灯）を取りだし、その概略をスケッチで示せ。
11. 棘の基部にある、ボール・ソケット構造が観察された。  
(Y/N)
12. 管足の先端の吸盤が観察された。  
(Y/N)
13. 観察した叉蕨の内、代表的なものをスケッチで示せ。

付録

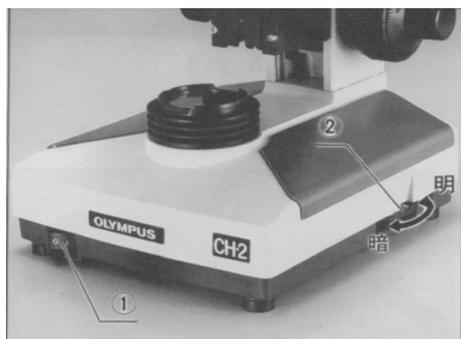
# 光学顕微鏡の操作

## 各部の名称



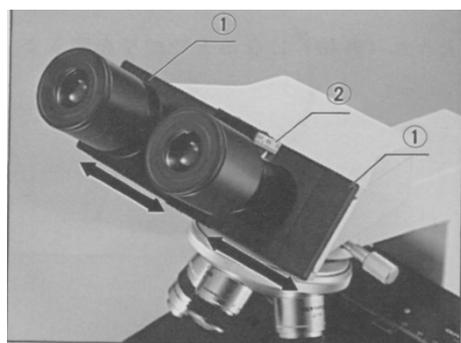
## 観察操作手順

### 光源の点灯



本体ベース部の前方にある電源スイッチ①をオンにし、側面の調光ダイヤル（スライド）②で明るさを調節する。

### 目幅調節



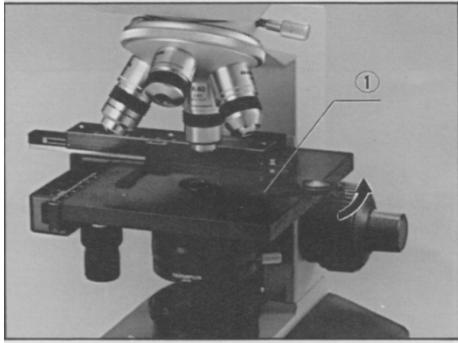
両方の接眼レンズを覗いて、両眼の視野が一致するように目幅調節スライドでレンズ間の距離を調節する。

### 対物レンズの交換



レボルバーを回して、使用する対物レンズを交換する。レボルバーはクリック位置でしっかり止める。このとき、真下を向いているレンズが使用できる（観察光路に入っている）ことになる。レンズの交換には必ずレボルバーを回すこと。レンズを持って動かすと、光軸がずれてしまう可能性があるので注意。

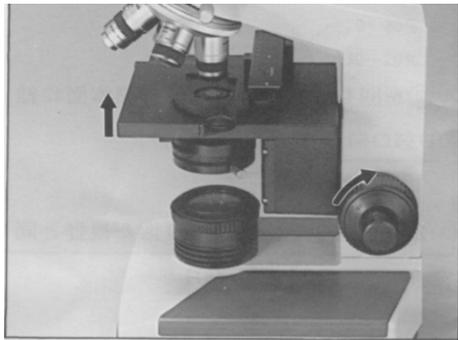
標本のセット ×4の対物レンズを光路に入れる。



顕微鏡の試料は概ね、スライドガラスの上に置かれ、カバーガラスで被われている（プレパラートと呼ぶ）。対物レンズとステージの間に十分な隙間を確保してから、カバーガラスのある面を上にしてスライドガラスを滑らすようにしてステージ上にセットする。プレパラートはクレンメル①で試料移動装置（メカニカルステージ）に固定する。

### 焦点（ピント）合わせ

次の手順に従って顕微鏡の焦点（ピント）を合わせる。

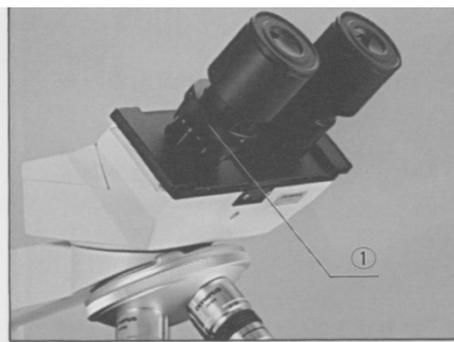


1. ステージ上下ハンドル（粗動）を回してステージを十分に遠ざける。
2. メカニカルステージを使い、観察しようとする試料に照明光が当たるようにプレパラートを移動させる。
3. ×40（40倍）の対物レンズを光路に入れる。
4. 顕微鏡を横から覗き、対物レンズとカバーガラスの表面との距離が1 mm以下（紙が入る程度）になるようにステージを

上に移動する。

5. 次に、×4（4倍）の対物レンズを光路に入れ、接眼レンズから覗く、このときに何か像が見えるはず。メカニカルステージを動かしたときに、像が移動するならば、それが観察しようとする試料であり、そこにおおよその焦点が合っている状態が作られていることになる。
6. ステージ上下ハンドル（粗動）を回して×4の対物レンズで焦点を合わせる。
7. メカニカルステージを動かして、観察したい部分を視野の中央に移動させる。
8. 対物レンズをひとつずつ倍率の高いものに変えてゆき、そのつどステージ上下ハンドル（微動）を回して焦点を合わせる。
9. 最終的に×40の対物レンズで焦点があった状態で、低倍率の対物レンズに変えて見て、それぞれで焦点が合っていることを確認する。

### 視度差調節

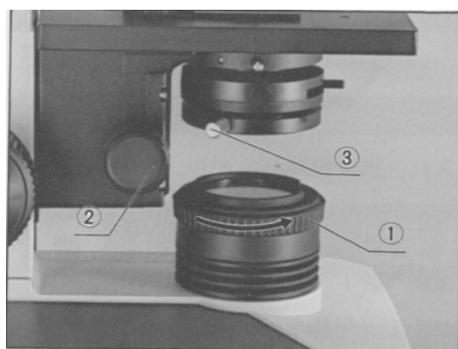


顕微鏡の焦点が正しく調節されていても、左右の視力の違いで像がはっきりと見えないことがある。このような場合に、以下に従って、左右の接眼レンズで視度差調節を行う。

1.  $\times 40$  の対物レンズで焦点を合わせる。
2. 左側の接眼レンズの下にある視度差調節リング①を回し、マークを0に合わせる。
3. 右眼だけで接眼レンズを覗き、ステージ上下ハンドル（微動）を回して試料に焦点を合わせる。

4. 次に、左眼だけで接眼レンズを覗き、視度差調節リングを回して同じ試料に焦点を合わせる。

### コンデンサーの調節



コンデンサー上下動ハンドル②を回して、コンデンサーの位置を調節する。通常の明視野観察であれば、コンデンサーの位置が一番上であればよい。コンデンサー絞りをを変えることで証明の光量を調節することが出来る。

### 長さ測定

顕微鏡での長さ測定には、接眼マイクロメーターを用いる。接眼マイクロメーターは対物レンズの実像が作られるところに置かれており、標本の像とメモリとを一緒に見ることができる。接眼マイクロメーターのメモリの間隔をあらかじめ対物マイクロメーターを用いて校正しておき、それをもとに長さを算出する。簡易的には、接眼マイクロメーターの最小目盛りの長さは、 $\times 4$ 、 $\times 10$ 、 $\times 20$ 、 $\times 40$  の対物レンズを用いた場合、それぞれ、25、10、5、2.5 マイクロメーターとして構わない。