



Title	低温によるウニ脱腸胚の形成 I
Author(s)	高橋, 恒夫; TAKAHASHI, Tsuneo; 星, 元紀 他
Citation	低温科学. 生物篇, 33, 29-38
Issue Date	1976-03-18
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17819
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p29-38.pdf



低温によるウニ脱腸胚の形成 I*

高橋 恒 夫

(北海道大学大学院理学研究科)

星 元 紀・朝比奈英三

(低温科学研究所)

(昭和 50 年 11 月受理)

I. 緒 言

ウニ胚の嚢胚形成は、日本の団・岡崎を中心としたグループ、スウェーデンの Gustafson・Kinnander にイギリスの Wolpert 等が加わったグループにより詳しく研究されてきた¹⁻⁴⁾。その結果、原腸の陥入過程は大きく 2 つの段階にわかれることが明らかになった。第 1 期は植物極側細胞壁の自律的な陥入、つづく第 2 期は第 2 次間充細胞の虚足による原腸の動物極側へのひっぱりによって陥入は完成する。この原腸陥入の時期のウニ胚を低温 0~4°C において飼育すると、ウニの種によっては高頻度で脱腸胚が形成された。そこで低温という条件がこの陥入の過程のどこに影響を与えているのかという疑問を明らかにする為に、いくつかの実験を試みた。

II. 材料と方法

材料：エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius* は北海道厚岸湾厚岸，キタムラサキウニ *St. nudus* とバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* は青森県陸奥湾浅虫，ムラサキウニ *Anthocidaris crassispina* は神奈川県相模湾三崎において採取した。卵，精子は通常の KCl 法で採取した。卵細胞は濾過海水で数度洗ったのちに受精させ，過剰の精子を洗い流したあと，ミリポアフィルター濾過海水中でゆっくり攪拌しながら発生を進行させた。エゾバフンウニ，キタムラサキウニは 15°C，バフンウニは 10°C，ムラサキウニは 20°C で発生をすすめた。

ウニ胚は第 1 図に示した次の 4 つの時期に低温および薬品で処理し，その影響を観察した。G-1 期：第 1 次間充細胞が胞胚腔に落ちこんだあと，肥厚した植物極側細胞壁は胞胚腔の中にくぼみこむ (第 1 図 a)。G-2 期：原腸先端部から第 2 次間充細胞の虚足が出現し，それは動物極へと伸びだす (第 1 図 b)。G-3 期：虚足は動物極へ届き収縮による張力を発揮して原腸を動物極側へとひっぱりこむ (第 1 図 c)。G-4 期：原腸の先端部がほぼ動物極にくっつく (第 1 図 d)。

低温処理：目的の発生段階に達したウニ胚の浮遊液を，直径 35 mm，高さ 10 mm のペトリ皿に 1~2 ml ずつ移し，あらかじめ目的の温度にひやした海水を加えてすみやかに温度が

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1755 号

下がるようにした後に、各温度に設定した恒温槽に一定時間おいた。恒温槽の温度のふれは $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ であった。観察は室温で迅速に行った。

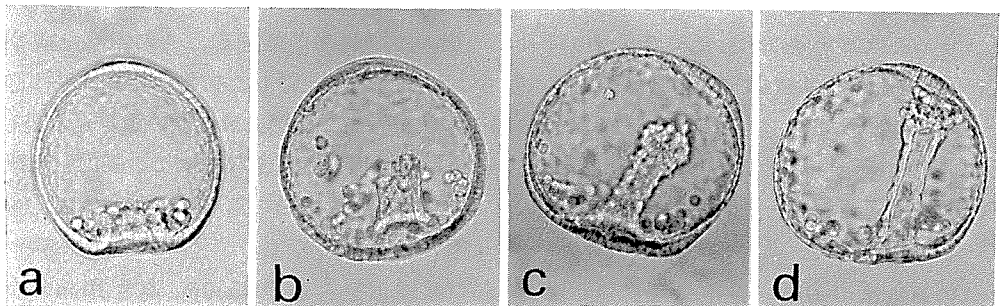
薬品処理： 直径16mm、深さ16mmのマイクロテストプレートにウニ胚の浮遊液を0.5~1.0ml入れ、試薬溶液を加えてその中で発生をすすめた。処理時間はG-1期の胚は3時間、G-2期~G-4期の胚は2時間である。発生はそれぞれのウニ胚の飼育温度ですすめた。

試薬： コルヒチン、N-エチルマレイミド、ジチオスレイトールは半井化学、*p*-クロロマーキュリフェニルスルホン酸はSigma、ビンブラスチン(硫酸塩)は塩野義製薬のものをミリポアフィルター濾過海水に溶かした。サイトカラシンC及びDは塩野義製薬で開発されたものを同研究所の湊均博士より頂いた。サイトカラシンBは、東京大学教養学部の馬淵一誠博士より供与されたImperial Chemical Industriesのものをを用いた。サイトカラシンはいづれもジメチルスルフォキシド(和光、半井化学)に溶かしたものを海水で希釈して用いた。

III. 結 果

エゾバフンウニの胚において、G-1期、すなわち第1次間充織細胞が胞胚腔に落ちこんだあとのウニ胚を $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ に温度を下げて発生をすすめると、植物極側細胞壁は胞胚腔の高さの $1/3\sim 1/2$ まで陥入した。しかし第2次間充織細胞の虚足は形成されず、原腸は反転し次第に外に出てきた。またG-2期の胚を 4°C に温度を下げると、一度のびだした虚足は退縮し、その基部は丸味をおびてきた。既に陥入していた原腸は反転し、胞胚腔の外に出てきた(第2図a)。一度外へ出るように方向づけされた原腸はどんどん外へ出ていき、外腸胚が形成された(第2図b)。この状態で温度をあげると、原腸が外に出ただけで、その他の外観は典型的なプルテウス胚となった(第2図c)。このような外腸胚は、第2次間充織細胞の位置、頂毛の存在など正常な囊胚、あるいはプルテウス胚と変わらないことから、塩化リチウムなどで植物極化されてきた外腸胚と区別して、脱腸胚と呼ぶことができる⁵⁾。

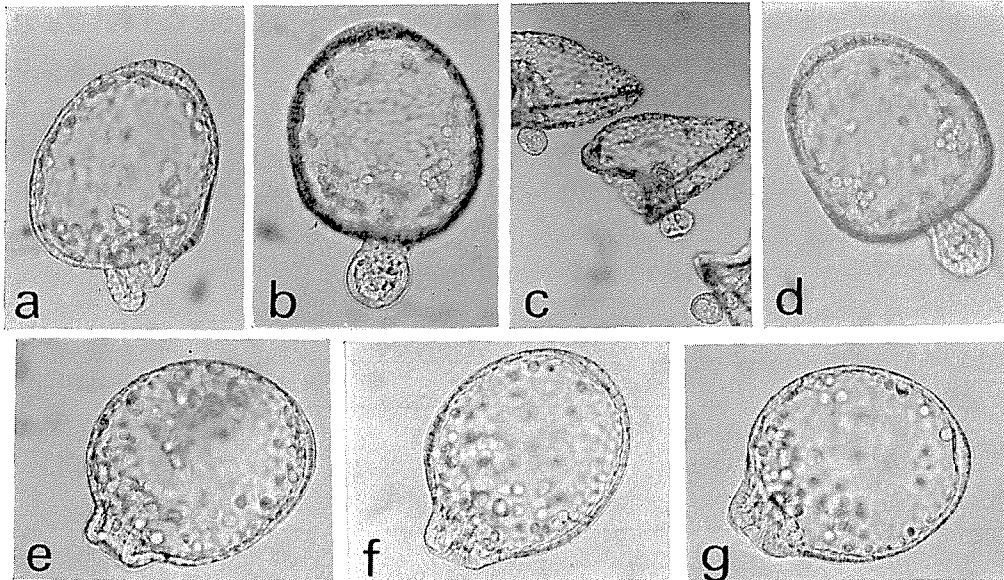
3種のウニを低温に48時間おいた時の脱腸胚の出現率は第1表にまとめて示した。エゾバフンウニでは、G-1期、G-2期、G-3期のものを 0°C 及び 4°C に移すと、48時間以内にすべての胚が脱腸胚になった。G-4期のものでは、虚足は退縮して原腸は胞胚腔の中で横に倒れる



第1図 エゾバフンウニの 15°C における正常な陥入 $\times 200$

a: G-1期 b: G-2期
c: G-3期 d: G-4期

ことはあっても外には出てこなかった。G-4期以後原腸が完全に動物極に届いた胚では、低温下で原腸の位置が変化することはなかった。6°C以上では陥入は正常に進行した。また-5°Cの過冷却の状態では、陥入は低温にうつしたそれぞれの段階で停止したままであった。キタムラサキウニではエゾバフンウニと同様に0°C及び4°Cで脱腸胚が形成された。しかし4°Cでは



第2図 エゾバフンウニの脱腸胚 ×200 (cは×100)

- a: G-2期の胚を4°Cに移して2時間後
- b: G-2期の胚を4°Cに移して12時間後
- c: bの胚を15°Cに戻して12時間後
- d: G-3期の胚を 10^{-5} M コルヒチン海水に移して2時間後
- e: G-2期の胚を 7×10^{-5} M サイトカラシン B 海水に移して2時間後
- f: G-2期の胚を 10^{-6} M サイトカラシン C 海水に移して2時間後
- g: G-2期の胚を 10^{-4} M ジチオスレイトール海水に移して30分後

第1表 低温処理による脱腸胚の形成*

種名	処理温度 (°C)	出現率 (%)			
		G-1期	G-2期	G-3期	G-4期
エゾバフンウニ <i>St. intermedius</i>	6	0	0	0	0
	4	100	100	100	0
	0	100	100	100	0
	-5	0	0	0	0
キタムラサキウニ <i>St. nudus</i>	4	100	83	40	0
	0	100	100	100	0
バフンウニ <i>H. pulcherrimus</i>	0	0	0	0	0

* 低温処理時間は48時間

G-2期, G-3期と後期になるほど脱腸胚の出現率は低下した。ムラサキウニは胚全体が不透明で原腸陥入過程の観察はむづかしく, 4段階にわけて低温にうつす操作はできなかった。しかし原腸陥入の時期と推察できる胚を, 4~6°Cに温度を下げて発生をすすめると, ほとんどの胚で原腸が外に出てきた。

エゾバフンウニにおいて脱腸胚が形成される温度と時間の関係を第2表にまとめた。15°Cでの正常な陥入ではG-1期からG-4期まではほぼ5時間を要した。4°CではG-1期, G-2期, G-3期のいずれの胚も6時間で全て脱腸胚になった。0°Cではほとんどの胚が脱腸胚となるのには, G-3期の胚では24時間, G-1期とG-2期の胚では48時間かかり4°Cの場合よりも脱腸胚の出現には時間を要した。一方-5°Cでは第1表でみたとおり, 48時間たっても陥入は進行せず原腸の反転もみられなかった。このような胚は温度をあげると虚足を形成して正常に陥入が進行した。

第2表 低温における脱腸胚の出現速度
(エゾバフンウニ *St. intermedius*)

温 度 (°C)	移す時期	出 現 率 (%)		
		6時間	24時間	48時間
4	G-1	100	100	100
	G-2	100	100	100
	G-3	100	100	100
0	G-1	10	25	100
	G-2	15	52	100
	G-3	25	93	100
-5	G-1	0	0	0
	G-2	0	0	0
	G-3	0	0	0

次に微小管とマイクロフィラメントに特異的に作用するいくつかの試薬を使ってエゾバフンウニの胚に対する影響をみた(第3表)。コルヒチンでは 10^{-4} ~ 10^{-5} Mで, G-1期からG-3期の胚が脱腸胚になった。このコルヒチン濃度のもとで腸は完全に外に出て, 低温による脱腸胚と同じ形であった(第2図d)。 10^{-4} MではG-4期の胚も23%脱腸胚になった。しかしコルヒチン海水に浸しておく時間が長くなると, 胞胚腔の中は遊離の細胞が増え最終的には細胞崩壊をおこした。 10^{-6} M以下の濃度では陥入は正常に進行し, 10^{-3} Mでは2時間以内に細胞崩壊をおこした。ビンブラスチンは 10^{-4} Mでコルヒチンの場合と同様原腸が完全に出た脱腸胚が形成された。サイトカラシンBは 2×10^{-7} M, サイトカラシンCは 10^{-6} Mで脱腸胚が最も高頻度に形成された(第3表)。サイトカラシンの溶媒, ジメチルスルフォキシドは最終的に0.05%以下になっており, この濃度でジメチルスルフォキシド自体は発生に何ら影響を与えなかった。サイトカラシンDは 10^{-7} M以下では発生は正常に進行し, また 10^{-6} M以上では細胞崩壊をおこし脱腸胚の形成はみられなかった。いずれの試薬の場合も脱腸胚形成の過程は低温による場合と同じく虚足の形成の停止あるいは退縮が最初にみられ, つづいて原腸が反転して外に出て

第3表 微小管，マイクロフィラメントに特異的に作用する
試薬の効果 (エゾバフンウニ *St. intermedius*)

試薬	濃度 M	脱腸胚の出現率 (%)			
		G-1期	G-2期	G-3期	G-4期
コルヒチン	10 ⁻⁴	100	100	100	23
	10 ⁻⁵	100	100	100	0
ビンブラスチン	10 ⁻⁴	100	100	100	0
サイトカラシンB	2×10 ⁻⁷	—	100	100	0
サイトカラシンC	10 ⁻⁶	—	90	82	0

きた。しかしコルヒチン，ビンブラスチンの脱腸胚は完全に腸が外に出てくるのに対し，サイトカラシンB, Cによる脱腸胚は，腸は反転してくるものの，完全には外には出てこなかった(第2図 e, f)。キタムラサキウニでも，コルヒチン，ビンブラスチン，サイトカラシンBで同様な結果が得られた。またムラサキウニでもビンブラスチン，コルヒチンで脱腸胚が形成された。これらの結果は，いずれも各試薬に入れっぱなしの場合であるが，10⁻⁴Mコルヒチン海水でG-2期の胚を10分処理すると虚足は退縮するが，正常海水にもどすと再び虚足のはびだして正常に陥入が進行した。ジチオスレイトールでは10⁻⁴MでG-1期からG-3期の胚で高頻度に脱腸胚が形成された(第2図 g)。ジチオスレイトール海水で虚足は退縮してくるが，正常海水にもどすと再び虚足のはびだして正常に陥入が進行した。一方SH試薬，*p*-クロロマーキュリフェニルスルホン酸は10⁻³~10⁻⁴M，N-エチールマレイミドは10⁻⁴MでG-1期~G-3期のいずれの段階の胚にも脱腸胚を形成させなかった。

IV. 考 察

ウニ胚に対する低温の影響についての観察は，古くはWaterman (1934) によってなされている⁶⁾。彼は *Arbacia punctulata* で，受精直後から胞胚期に至る各段階で低温処理すると，外腸胚を含む奇型胚が生じることを報告している。しかし彼のこの記載は簡単なものであり，またその当時はOkazakiによって論じられているように⁷⁾，外腸胚と植物極化胚が混同されていたことからいくつかの不明な点を含んでいる。著者は，エゾバフンウニの場合，受精直後から遊泳胞胚期の各発生段階で，0°Cで24時間低温処理した場合，64細胞期以降のものは正常な囊胚になるが，32細胞期以前のものには低温の影響を受け様々な奇型胚が生じてくるのをみている⁸⁾。しかし原腸陥入時期に低温処理して生じる外腸胚は植物極化を伴わない脱腸胚であるといえる。

低温下では，第2次間充織細胞の虚足は形成されないこと，またすでにできあがった虚足は温度が下がると退縮し消失すること，低温下でも陥入の第1段階，即ち植物極側細胞壁の自律的な陥入は起こることから，脱腸胚の形成は，低温下で第2次間充織細胞の虚足の形成ならびに活動が停止することに起因していると考えられる。既にDan等は化学的な処理，たとえばCa濃度を下げる，蛋白分解酵素を作用させるという方法で胚を処理すると，第2次間充織細胞の虚足が影響を受け，その結果脱腸胚が形成されるのをみている^{1,7)}。更に，Tilneyと

Gibbins (1969) は、第2次間充織細胞とその虚足に、微小管とマイクロフィラメントが存在することを確認した⁹⁾。そしてコルヒチン、高水圧のもとで虚足の形成がさまたげられ原腸の動きは停止すること、その時第2次間充織細胞と虚足内の微小管とマイクロフィラメントが解離あるいは消失していることから、虚足の形成には微小管が、虚足の収縮にはマイクロフィラメントが関与していることを示唆した。細胞内の微小管に対する低温の影響に関しては、卵母細胞の紡錘体の複屈折が低温によって消失するという Inoué (1952) の観察にはじまり¹⁰⁾、現在では微小管が低温で脱重合をおこすことが知られている^{11,12)}。そこで低温で虚足の形成ならびに活動が停止するのは、第2次間充織細胞およびその虚足内の微小管が脱重合したことによるのではないかと考えられる。コルヒチン、ビンブラスチンといった微小管に特異的に作用する試薬で脱腸胚が生じることは、この可能性をよりたしかなものにしている。脱腸胚を形成するのに最適なこれらの試薬の濃度は、ツバサゴカイ *Chaetopterus pergamentaceus* の紡錘体の複屈折を消失せしめるコルヒチン濃度 5×10^{-4} M、L-strain 繊維芽細胞や白血球で微小管の結晶状構造をつくるビンブラスチン濃度 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M とほぼ同じである^{13,14)}。著者の一人は、遊泳胞胚期までの各発生段階のウニ胚を重水海水に移して発生をすすめると高頻度で脱腸胚が形成されることを報告した¹⁵⁾。そして最近、第1次間充織細胞が胞胚腔に落ちこんだあとの段階でも重水海水に移すと脱腸胚が形成されることがわかった¹⁶⁾。重水は細胞分裂を阻止するなど、細胞内の微小管を過大に安定化させる作用をもつことが知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。重水海中での脱腸胚形成も、第2次間充織細胞及びその虚足に存在する微小管が影響をうけて、その結果虚足の形成、活動が抑えられたことによるのかもしれない。微小管の構成蛋白チューブリンが重合する際に、チューブリンの SH 基が関与していることがあきらかになってきていることから²⁰⁾、その SH 基に特異的に結合して微小管を脱重合させる SH 試薬、*p*-クロロマーキュリフェニルスルホン酸、N-エチルマレイミドの存在下で発生をすすめたが、脱腸胚の形成はみられなかった。しかし SH 試薬とは逆にジチオスレイトールで高頻度で脱腸胚が形成されたことはどう考えればよいだろうか。過剰のチオール、 β -メルカプトエタノールがウニ卵の細胞分裂を阻害し、分裂装置を不定形化することから²¹⁾、ジチオスレイトールも微小管構造をこわす作用をもっているのではないかと思われる。しかし再構成微小管においてジチオスレイトールは脱重合をおこす作用がないことがみられているので²⁰⁾、上記の説明はさらに検討を要する。マイクロフィラメントに作用するサイトカラシン B および C の存在下で脱腸胚が形成されることは、上述の Tilney 等のマイクロフィラメントが虚足の収縮に関与しているという考えの裏付けとなろう。しかしサイトカラシン C の異性体であるサイトカラシン D が、脱腸胚形成に効果がなかった事実は現在説明が難しい。

ウニの種によっては、低温で脱腸胚が形成されないのはなぜだろうか。エゾバフンウニ、キタムラサキウニは $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で脱腸胚は出現するがバフンウニは 0°C でも虚足は形成されて陥入は正常に進行する (第1表)。一方ムラサキウニは $4 \sim 6^{\circ}\text{C}$ で脱腸胚が形成されるが、 12°C でも原腸が出てくることがみられている²²⁾。このようなウニの種による脱腸胚形成の温度域の違いは、それぞれのウニの初期発生の時期 (産卵時期) の環境温度と関連があるかもしれない。北方産のエゾバフンウニ、キタムラサキウニ、そして青森県以南に産するムラサキウニは、い

わゆる夏のウニであり、産卵時期の環境温度は前二者は15~18°C、後者は20~25°Cであるのに対して、バフンウニは冬のウニであり、採集地浅虫では4~8°Cである。即ち、第2次間充織細胞、及びその虚足に存在する微小管の温度に対する安定性がそれぞれのウニで異っているのではないと思われる。Stephens (1972)は冷海水産のウニ、*St. droebachiensis*が0°Cでも受精後発生が進行できることに注目し、その生態と発生過程を観察し、また紡錘体微小管の性質をしらべ、このウニの微小管が低温で非常に安定であり、温暖な地域に生息するウニの微小管とは、その性質に大きな違いがあることを報告している^{23,24)}。

最後にそれでは脱腸胚の形成は全て第2次間充織細胞の虚足の形成、活動の停止のみで考えることができるだろうか。エゾバフンウニでは、脱腸胚は4°Cで、0°Cよりも早く形成されること(第2表)、-5°Cの過冷却の状態では、原腸の動きは完全に停止すること、G-4期で原腸が十分伸び切った状態では低温下で虚足は退縮して、原腸は胞胚腔内で横に倒れることはあっても外には出てこないこと(第1表)などの事実から、原腸陥入の第2段階には、虚足による原腸の動物極側へのひっぱり他に、原腸自身の伸長力——それが-5°Cでは発揮できない——が存在し、その力が虚足の消失とともに脱腸胚を形成する要因に加わっているのではないかと考えられる。この陥入の第2段階に別の力が存在する可能性については既にDanとOkazaki¹⁾、又最近ではTrinkausによって指摘されている²⁵⁾。サイトカラシンB、C溶液の中で、虚足は退縮し原腸は反転して一部が外へ出てくるが、その出方がコルヒチン、ビンブラスチンにくらべて少いのは、これらの試薬が原腸の伸びる力を抑えているからなのかもしれない。

摘 要

囊胚形成時期のウニ胚を低温において飼育すると、高頻度に脱腸胚が形成された。エゾバフンウニは0~4°Cの温度域で脱腸胚になった。6°C以上では脱腸胚が形成されず陥入は正常であった。-5°Cの過冷却の状態では、低温に移したそれぞれの段階で陥入は停止し、温度をあげると第2次間充織細胞は虚足を形成して正常に陥入した。キタムラサキウニも0~4°Cで脱腸胚が形成された。バフンウニでは0°Cでも脱腸胚はあられず正常に陥入が進行した。ムラサキウニでは12°Cでも脱腸胚ができた。このような脱腸胚の形成に有効な温度範囲のウニの種による違いは、それぞれのウニの発生の時期の環境温度と関係があると思われる。

低温で第2次間充織細胞の虚足の形成ならびに活動が抑えられること、この細胞及び虚足に微小管、マイクロフィラメントの存在が確認されていることから、微小管、マイクロフィラメントに特異的に作用する、コルヒチン、ビンブラスチン、サイトカラシンB、サイトカラシンC等のそれぞれの存在下でウニ胚を飼育した。この場合にも、低温下と同様、脱腸胚が形成された。これらのことから、低温による脱腸胚の形成には、第2次間充織細胞及びこの虚足に存在する微小管の脱重合が関与していると考えられる。

一方、虚足の形成、活動の停止に続く原腸の外側への動きは、より低い温度ではおこらないこと、原腸が動物極へ十分伸長した時期では、温度を下げると原腸は横に倒れるのみで外には出ないことから、脱腸胚の形成には、虚足の消失の他に、原腸自身の自律的な伸張も必要ではないかと推察される。

本実験にあたり、ウニを採取し、又実験室を使用させて下さいました東京大学三崎臨海実験所、東北大学浅虫臨海実験所、北海道大学厚岸臨海実験所の皆様に感謝いたします。東京大学理学部生物化学教室の酒井彦一博士をはじめ研究室の方々、同教養学部生物学教室の馬淵一誠博士には微小管について有益な御助言を頂きました。またサイトカラシンを供与して下さいました塩野義製薬の湊均博士に深謝いたします。最後に、終始有益な御助言を頂きました当研究所竹原一郎助教授に、ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Dan, K. and Okazaki, K. 1956 Cyto-embryological studies of sea urchins. III. Role of the secondary mesenchyme cells in the formation of the primitive gut in sea urchin larvae. *Biol. Bull.*, **110**, 29-42.
- 2) Gustafson, T. and Kinnander, H. 1956 Microacquaria for time-lapse cinematographic studies of morphogenesis in swimming larvae and observations on sea urchin gastrulation. *Exptl. Cell Res.*, **11**, 36-51.
- 3) Gustafson, T. and Wolpert, L. 1963 The cellular basis of morphogenesis and sea urchin development. *Int. Rev. Cytol.*, **15**, 139-214.
- 4) Wolpert, L. and Mercher, E. H. 1963 An electron microscope study of the development of the blastula of the sea urchin embryo and its radial polarity. *Exptl. Cell Res.*, **30**, 280-300.
- 5) 団 勝磨 1957 棘皮動物 (久米・団共著編; 無脊椎動物発生学). 培風館, 東京, 199-212.
- 6) Waterman, A. J. 1934 Further studies of exogastrulation in the sea urchin. *Biol. Bull.*, **67**, 172-181.
- 7) Okazaki, K. 1956 Exogastrulation induced by calcium deficiency in the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*. *Embryologia*, **3**, 23-36.
- 8) 高橋恒夫 未発表.
- 9) Tilney, L. G. and Gibbins, J. R. 1969 Microtubules and filaments in the filopodia of the secondary mesenchyme cells of *Arbacia punctulata* and *Echinarachnius parme*. *J. Cell Sci.*, **5**, 195-210.
- 10) Inoué, S. 1952 Effects of temperature on the birefringence of the mitotic spindle. *Biol. Bull.*, **103**, 316.
- 11) Inoué, S. 1964 Organization and function of the mitotic spindle. In *Primitive Motile Systems in Cell Biology* (R. D. Allen and N. Kamiya, eds.), Academic Press, New York and London, 549-598.
- 12) Tilney, L. G. and Porter, K. R. 1967 Studies on the microtubules in Heliozoa. II. The effect of low temperature on these structures in the formation and maintenance of the axopodia. *J. Cell Biol.*, **34**, 327-343.
- 13) Inoué, S. 1952 The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. *Exptl. Cell Res.*, Suppl. **2**, 305-318.
- 14) Bensch, K. G. and Malawista, S. E. 1968 Microtubule crystals; A new biophysical phenomenon induced by *Vinka* alkaloids. *Nature*, **218**, 1176-1177.
- 15) 星 元紀・小野寺一清・永井克孝 1973 重水によるウニ外腸胚の形成. *動雑.*, **82**, 252.
- 16) 星 元紀 未発表.
- 17) Inoué, S., Sato, H. and Tucker, R. W. 1963 Heavy water enhancement of mitotic spindle birefringence. *Biol. Bull.*, **125**, 380-381.
- 18) Marsland, D. A. and Zimmerman, A. M. 1965 Structural stabilization of the mitotic apparatus by heavy water in the cleaving egg of *Arbacia punctulata*. *Exptl. Cell Res.*, **38**,

- 306-313.
- 19) Tilney, L. G. and Gibbins, J. R. 1969 Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in *Arbacia punctulata*. II. An experimental analysis of their role in development and maintenance of cell shape. *J. Cell Biol.*, **41**, 227-250.
 - 20) Kuriyama, R. and Sakai, H. 1974 Role of tubulin -SH groups in polymerization to microtubules. Functional -SH groups in tubulin for polymerization. *J. Biochem.*, **76**, 651-654.
 - 21) Mazia, D. 1958 SH compounds in mitosis. I. The action of mercaptoethanol on the eggs of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Exptl. Cell Res.*, **14**, 486-494.
 - 22) 雨宮昭南 私信.
 - 23) Stephens, R. E. 1972 Studies on the development of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. I. Ecology and normal development. *Biol. Bull.*, **142**, 132-144.
 - 24) Stephens, R. E. 1972 Studies on the development of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. II. Regulation of mitotic spindle equilibrium by environmental temperature. *Biol. Bull.*, **142**, 145-159.
 - 25) Trinkaus, J. P. 1973 Cells and Tissue Interactions: 細胞行動と器官形成 (岡田善雄監訳). 丸善, 東京, 193-205.

Summary

Exogastrulae were formed at low temperatures in various kinds of the sea urchin. Larvae at various developmental stages were chilled and reared at low temperatures between 0°C and 4°C. At low temperatures the autonomous invagination of cells in the vegetal region normally took place, but formation of pseudopodia of secondary mesenchyme cells was retarded. The pseudopodia once formed at normal temperatures disappeared and the archenteron began to retreat at low temperatures. In the larvae of *Strongylocentrotus intermedius*, exogastrulae were formed at temperatures between 0°C and 4°C. At temperatures above 6°C, no exogastrula was formed and all larvae gastrulated normally. By supercooling at -5°C, the invagination in the larvae was completely inhibited. The larvae of *St. nudus* also became exogastrulae at low temperatures. However, in the case of *Hemicentrotus pulcherrimus*, the larvae gastrulated normally at 0°C. On the other hand, in a southern species of sea urchin, *Anthocidaris crassispina*, the larvae became exogastrulae even at 12°C. From these facts, the efficiency of low temperature treatment on exogastrula formation appears to depend on the environmental temperature at which the larvae of each species are used to develop.

From the observations that the pseudopodia of the secondary mesenchyme cells were not formed or disappeared at low temperatures, the main cause of the exogastrulation at low temperatures may be assumed to be the difficulty in pseudopodia formation. It has been known that both microtubules and microfilaments exist in the secondary mesenchyme cells and their pseudopodia, and that the microtubules are depolymerized at low temperatures. The exogastrulae were also formed when the larvae were reared in the presence of specific reagents affecting the formation of microtubule or microfilaments such as colchicine, vinblastine, cytochalasin B and cytochalasin C. From these observations, the formation of exogastrulae induced by low temperature treatment may assumably be caused by the depolymerization of microtubules in the secondary mesenchyme cells and their pseudopodia.

In the larvae of *St. intermedius*, archenteron did not retreat at -5°C . At the last stage of invagination, archenteron which had been fully elongated by the contraction of pseudopodia, when exposed to low temperatures, lay down laterally in the blastocoel and did not retreat. In the second step of invagination, not only the stretching of archenteron by the contraction of pseudopodia, but also an autonomous stretching of archenteron itself is assumed to be necessary to undergo invagination.