

# オオタニシ異型精子における運動開始の特異性

舟木賢治\*・田村幹樹\*\*

Kenji FUNAKI\* and Motoki TAMURA\*\*

Specificity in the motility initiation of paraspermatozoa of *Cipangopaludina Japonica*

## ABSTRACT

Generation of two types of spermatozoa, eusperm and parasperm is a common feature in most Prosobranch snails. In addition, *Cipangopaludina Japonica* produces two different sized parasperms, micro and macro parasperm. The eusperm is a uniflagellate cell with a normal haploid nucleus, participating directly in fertilization. In contrast, the parasperm is a multiflagellate cell with a small amount of DNA in the head, and does not genetically contribute to fertilization.

In present study, the *in vitro* motility initiation of parasperm has been temporally investigated. There was a remarkable difference in the motility between micro and macro parasperms. At the start of culture, all the micro parasperms have actively moved, while the macro parasperms have never shown any motion. After ward, the micro parasperms gradually began to stop the motion. Since several hours had passed after the preparation of sperm suspension, some population of micro parasperms stopped the motion and macro parasperms began to move. This fact suggests that macro parasperms of *Cipangopaludina Japonica* acquire the motile capacity after they were discharged from the testis.

The number of flagella in the parasperms from three males which were different from each other was examined on the motility of macro parasperms, resulting that there was no correlation between the number of flagella and the time for the motility initiation in macro parasperms.

【Key words : *Cipangopaludina Japonica* , paraspermatozoon , motility initiation】

## はじめに

動物の精子は、頭部、中片部、および尾部（鞭毛）からなる基本的構造をしているが、その形態は種によって異なる。一方、こうした種による精子形態の多様性とは別に、同一種、同一個体においても、形態や運動性が異なる複数タイプの精子が形成されることが知られている。このような現象を精子の多型性といい、多型現象を示す精子は2つのタイプに大別される。その1つは受精能をもつ正型精子であり、他の1つは受精能をもたない異型精子である。異型精子には、染色体をもたない無核精子、正常一倍体より少ない染色体をもつ貧核精子、正常より多い染色体をもつ多核精子の3タイプがあり、そのタイプは種によって異なる。異型精子は、1836年にタニシで最初に発見されたが、その後、他の軟体動物や昆虫類、貧毛類などの無脊椎動物で多数報告されている<sup>(1)(2)</sup>。最近では、海産カジカなどの脊椎動物でも異型精子形成が確認された<sup>(3)</sup>。

異型精子については、主にその形態や微細構造が詳細に研究されてきた。その結果、タニシの異型精子は貧核の頭部と多数の軸系が束ねられてできた長い中片部とを

もち、さらに、それらの軸系が帚状に分散して多数の鞭毛となって短い尾部を形成していることが示された<sup>(4)(5)</sup>。また、これらの異型精子には大きさが異なる2つのタイプが存在することも報告されている<sup>(6)</sup>。

一方、異型精子の運動性などの機能面についてはほとんど研究されていない。そのため、異型精子の役割についてもいくつかの仮説が提唱されているだけで、実験的証明はなされていない。

今回、著者らはオオタニシ精子の運動性を研究する過程において、試験管内での運動能が大型異型精子と小型異型精子とで著しく異なること、さらに、大型異型精子が、未だに解明されていない精子の運動能獲得機構を追求するための有用なモデルになり得ることを見出した。

本稿では、その結果を報告するとともに異型精子の役割について考察する。

## 材料と方法

実験には、松江市福原町の水田および用水路から採集したオオタニシの成熟雄を用いた。

[精子試料の作製]

脱殻した成貝から精巢を摘出し、カミソリで薄切する。

\* 島根大学教育学部自然環境教育講座

\*\* 島根大学大学院教育学研究科教科教育専攻

薄切した精巢片を平衡塩類溶液の中に静置し、ピンセットで組織片を解しながら精子を遊離させる。精子だけが含まれるよう注意しながら懸濁液を試験管に採取する。これに新しい平衡塩類溶液を加えて精子密度を調製し、精子試料とする。

#### [精子運動の観察]

試験管内での精子運動に対する温度効果を調べるために、つぎの2つの温度条件下で精子を培養する。1つは海産動物の精子の運動が活発になるといわれている20（恒温器）であり、他の1つは逆に代謝が著しくおさえられる4（冷蔵庫）である。培養した精子については、精子運動の経時的变化を検討するために、数時間おきに試料を採取し、顕微鏡で観察する。

精子運動の顕微鏡観察では、セロハンテープに直径2.5mmのホールを3つあけ、それをスライドガラスに貼付けてホールガラスとして用いる。密度調製した精子試料を各ホールに1滴ずつ滴下し、乾燥を防ぐためにカバーガラスを被せて経時的に観察する。大型異型精子は倍率100倍、小型異型精子は倍率200倍で観察し、12時間毎に精子の動態をデジタルビデオカメラレコーダー（SONY DCR PC120）で撮影する。撮影データを動画ソフト（Windows Movie MakerとWindows Media Player）を用いてカメラから直接コンピュータに取り込み、モニターに画像を再生する。再生画像から、異型精子の運動率（運動している異型精子数/全異型精子数）を各ホール毎に算出し、3ホールの平均値を求める。

その結果をより数値化して比較するために、運動率の推移に近似曲線として正規分布曲線をフィッティングする。正規分布曲線による各試料の比較には、運動率の最大値（ $m_2$ ）、運動率が最大となる時間（ $m_3$ ）、運動開始から運動停止までの時間（ $m_4$ ）を用いる（図1）。特に、 $m_4$ 値には正規分布曲線の $\pm 1SD$ の幅を用いる。また、小型異型精子の運動率推移にフィッティングする正規分布曲線は、0時間を最大とする半釣鐘型とするために $m_3$ 値を0とする。

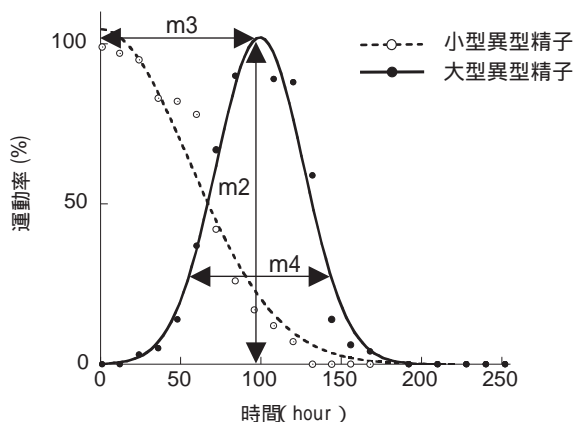


図1．正規分布曲線のフィッティングによる異型精子運動率推移の比較に用いた値

#### [精子塗抹標本の作製]

異型精子における運動の特性が運動装置である鞭毛の数に関係しているか否かを検討するために、精子塗抹標本作製し、鞭毛数をカウントする。標本作製では、精子試料を10%ホルマリンで15分間固定する。その後、リン酸緩衝液で固定試料を洗浄し、標本に適した精子密度になるよう調製する。調製した精子懸濁液をスライドガラス上に滴下し、空気乾燥する。精子を塗抹したスライドガラスを2%ギムザ染色液（リン酸緩衝液、pH6.8）で染色し、光学顕微鏡及び位相差顕微鏡下で1試料につき異型精子100匹の鞭毛数をカウントする。カウントした結果は度数分布で示される。

#### ・結果

#### [オオタニシ異型精子の外部形態]

図2に示すように、オオタニシの精子には、正常一倍体の正型精子のほかに受精には関与しない異型精子が存在する。この種の異型精子は、貧核の頭部（a）、多数の軸糸が束ねられてできた長い中片部（b）、およびそれらが分散して帚状に広がった短い尾部（c）からなる。異型精子は正型精子より大きく、その大きさによって小型と大型に分類される。

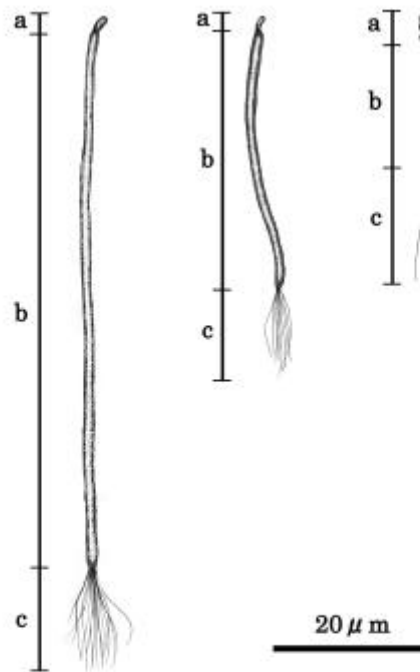


図2．オオタニシの精子。左から大型異型精子、小型異型精子、正型精子  
a, 頭部 b, 中片部 c, 尾部

#### [異型精子における運動率の経時的变化]

雄オオタニシ15個体の精子試料を作成した。その中の5試料を20℃、10試料を4℃の温度条件下で培養し、異型精子における運動率の経時的变化を調べた。結果を図3、図4に示す。

20 の温度条件下で培養した 5 試料の測定結果に正規分布曲線をフィッティングしてみた結果、小型異型精子における運動率の最大値 (m2) は、すべての試料において80%を超えていた。また、運動率が最大となる時間 (m3) は、すべての試料において0hであった。運動開始から運動停止までの時間 (m4) は、30hから60hの範囲に分布した。一方、大型異型精子におけるm2値は、図3 試料 以外の試料はすべて80%を超えていた。また、m3値は10hから50hの範囲に、m4値は55hから155hの範囲に分布していた (図3)。

4 で培養した試料では、1つの試料においてのみ運動率のピークが2つ存在したため、正規分布曲線をフィッティングして算出した各数値に大きな誤差が生じたが、残りの9試料では正規分布曲線のフィッティングによる比較が可能であった。正規分布曲線のフィッティングの結果、小型異型精子におけるm2値は、すべての試料で80%を超えていた。また、m3値はすべてにおいて0hであったが、m4値は50hから300hの広い範囲に分布していた。一方、大型異型精子のm2値は小型異型精子と同様、すべてにおいて80%を超えていた。また、m3値は100hから200hの広い範囲に分布していたが、逆に、m4値は小型異型精子より狭い155hから155hの範囲に分布していた (図4)。

以上の結果から、次の4つが結論づけられる。 小型

異型精子は温度条件に関わらず、そのほとんどが採取後すぐに運動するが、時間の経過に伴って次第に運動率が減少する。大型異型精子は採取時にはまったく運動しておらず、小型異型精子の運動率がある程度減少した頃から徐々に運動を開始する。運動率の経時変化は、4 より20 の温度条件下でより早く進行する。異型精子の運動開始から運動終了までの時間や大型異型精子の運動率がピークになるまでの時間には個体差がある。 [小型異型精子及び大型異型精子の鞭毛数]

精子の運動は、鞭毛の軸糸を構成する微小管とそれに連結するモータータンパクの働きによって生じることが知られている。したがって、上述のような異型精子の運動における差異が鞭毛数の違いに起因していることも考えられる。そこで、大型異型精子のm3値における個体差と鞭毛数との関係を検討するために、20 の培養条件下でm3値に差がみられた3試料について鞭毛数をカウントし、分散分析を行った。その結果、各試料のあいだに有意差は認められなかった (p=0.68)。そこで、3試料の結果をもとにして、大型異型精子の鞭毛数を度数分布で表わし、小型異型精子の鞭毛数と比較した。

その結果、小型、大型異型精子ともに鞭毛数は正規分布を示し、その中央値は前者が7本、後者が14本であった。両者の鞭毛数は明らかに異なるが、両者で鞭毛数が同数のものも20~30%の割合で存在していた (図5)。こ

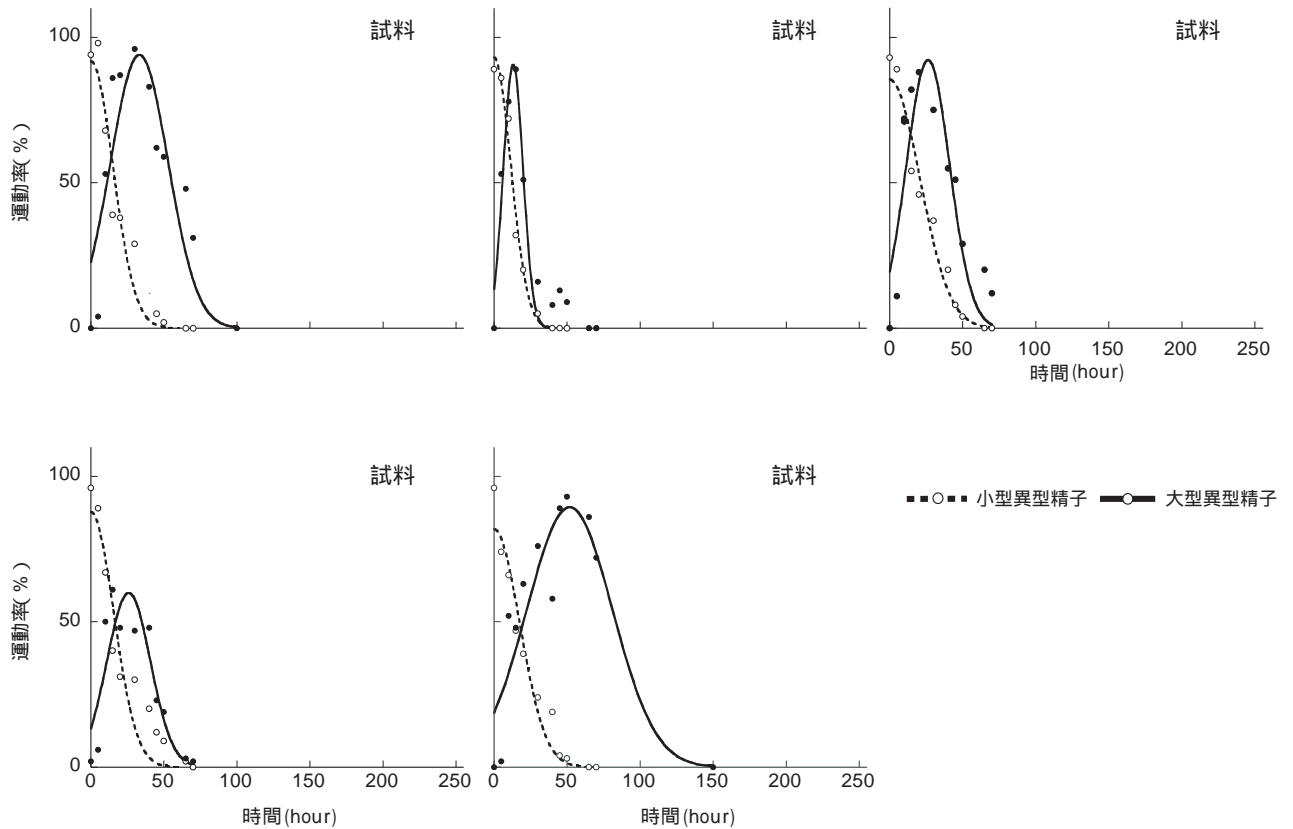


図3. 20 で培養した各試料における異型精子運動率の経時変化

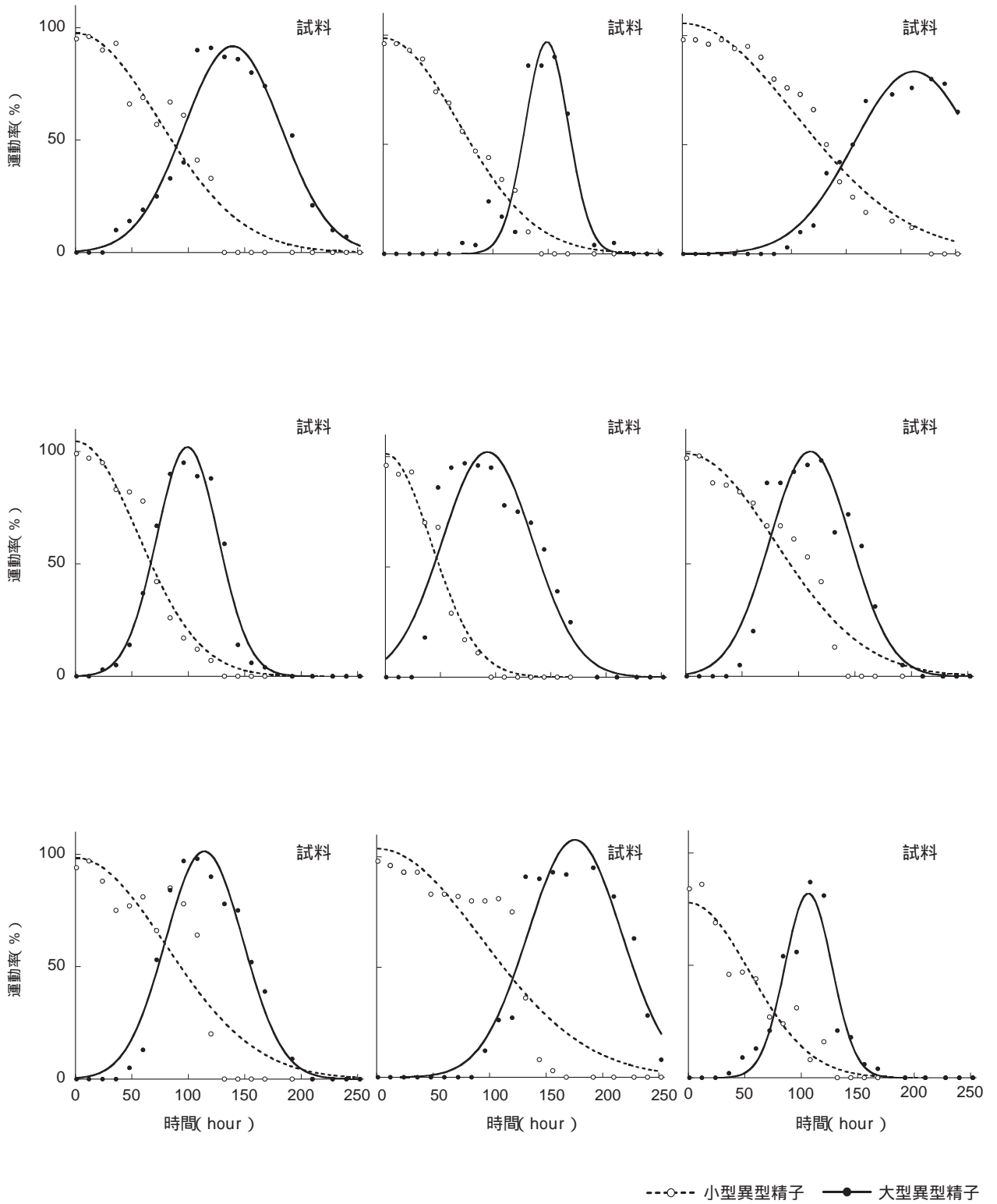


図4.4 で培養した各試料における異型精子運動率の経時変化

これらの結果は、異型精子の運動開始時間や運動率の経時的变化にみられた差異が鞭毛数の違いによるものではないことを示している。

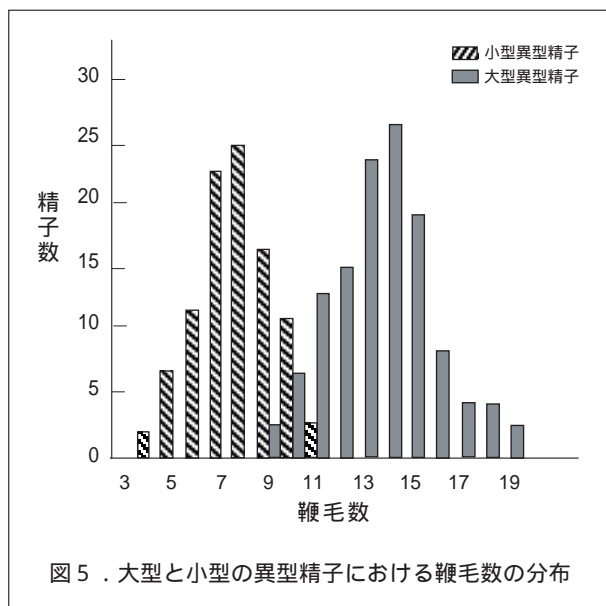


図5．大型と小型の異型精子における鞭毛数の分布

## ．考察

本研究の結果で最も興味深いのは、大きさ以外に構造的な違いはみられない大型と小型の異型精子で、運動性が著しく異なることである。実験では、ほとんどの小型異型精子は正型精子と同様、精巣から試験管内に取り出された時点で活発に運動している。一方、大型異型精子はその時点では全く動かず、数時間後に数パーセントの精子が運動するようになるという顕著な違いがみられた。

大型異型精子が運動開始までに長い時間を要することについては、2つの可能性が考えられる。1つは、運動装置である鞭毛が多いためにエネルギー供給に時間がかかることであり、もう1つは両者の運動能獲得時期が異なることである。鞭毛数との関係については、同数の鞭毛を持つ小型と大型の異型精子があるにもかかわらず、両者の運動開始時期は全く異なっていることから否定される。

一方、運動能獲得時期の違いについては、今回の研究では直接証明することはできない。しかし、大型異型精子が培養開始時には全く動かず、数時間後、徐々に運動を開始した精子が現れるようになるという事実は、大型異型精子の運動能獲得は精巣外で起こることを示唆している。一般に、精子は精巣内あるいは精巣上体内を移動する過程で運動能を獲得するが、精子が雄の体内にいるあいだは種々の要因によって運動が抑制されている。精子運動を抑制している要因は動物種によって異なるが、精子が水中に放出されたり、雌性生殖器内に射精されると直ちに運動を開始することが知られている<sup>(7)</sup>。オオタニシの大型異型精子のように、精子が精巣外に出されてから運動を開始するまでに数時間を要するという報告

は、著者らの知る限りにおいては無い。このような他にみられない特異性は、オオタニシ大型異型精子が未熟な状態で射精され、精巣外で運動能を獲得していることを強く示唆している。しかし、それを証明するためには、大型異型精子の運動が開始される前後で運動能獲得に関わる因子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ・ $\text{K}^{+}$ ・ $\text{Na}^{+}$ などのイオン、タンパク、pH、cAMPなど) がどのように変化するかについて詳細に検討する必要がある<sup>(7)</sup>。

精子の運動能獲得は、精巣外に出した精子が運動するかどうかによって確認することができるが、運動能獲得に関する形態学的あるいは生化学的知見はほとんど得られていない。その大きな原因としては、運動能獲得が雄性生殖器内で非同調的に起こるために、研究対象となる発生段階の精子(運動能獲得の過程にいる精子)を的確に把握できないことがあげられる。したがって、オオタニシ大型異型精子における試験管内での運動能獲得が立証されれば、これまでは究明することが困難であった精子の運動能獲得の実態を解明するのに役立つことが期待できる。

精子の運動装置である鞭毛の芯部は軸糸とよばれ、微小管が環状に配列している。多数の鞭毛をもつタニシ異型精子の中片部は、その中軸部に軸索が縦走し、それに接して軸糸が管状に配列している。軸索は、多数の小桿体が縦列したもので、内部にはミトコンドリアと同様な膜構造が見られる。そのため、軸索はミトコンドリアに由来する器官であり、異型精子のエネルギー代謝の中心であると考えられている(4)。軸索を機械の動力とするならば、微小管からなる軸糸は鞭毛運動を生じさせる機械本体である。それらの微小管には、長軸に沿って多数のタンパク質が結合しており、なかでもダイニンは鞭毛運動に最も関係のある微小管結合タンパクである。ダイニンはモータータンパクの1つであり、隣接する微小管との間に滑る力を発生させることによって鞭毛運動を引き起こす。また、ダイニンはATP加水分解酵素であり、ATPをADPとリン酸に解離することによって鞭毛運動のエネルギーを発生させる。しかし、エネルギー源であるATPが欠如した状態では、ダイニンは架橋を形成して硬くなり、微小管の滑りが生じないライゴール(rigor)と呼ばれる状態になる<sup>(7)(8)</sup>。したがって、鞭毛をより多くもつ大型異型精子では、エネルギー供給に時間がかかり、運動開始が遅れることが考えられた。しかし、実際には大型異型精子の運動開始時間と鞭毛数との関係について否定的な結果が得られた。そのため、他の因子として、一般的に鞭毛運動をコントロールされている $\text{Ca}^{2+}$ やcAMPの濃度について検討する必要がある。

運動率の経時的变化の推移傾向は、4 と20 で違いは見られなかったが、運動開始に要する時間は4 よりも20のほうが短かった。このことから、精子運動には酵素反応が関与していることが示唆される。

異型精子の役割については、正型精子に栄養を補給する、あるいは雌性生殖器内に入ってきた他の雄の精

子を攻撃する兵隊のような働きをされると考えられている<sup>(9)(10)(11)</sup>。オオタニシでは、大型異型精子が小型異型精子の運動停止時間に合わせるように運動を開始する。その結果、異型精子はより長い時間雌性生殖器官内に留まり、他の雄の精子の侵入を妨害ことになる。したがって、オオタニシの異型精子については兵隊説が支持される。

#### 引用および参考文献

- 1) Hodgson, A.N. : Invert. Reprod. Develop., 31, 21-28 (1997)
- 2) Silberglied, R. E., Shepherd, J. G. and Dickison, J. L. : Am. Nat., 123, 255-265(1984)
- 3) Hayakawa, Y., Munehara, H., Komaru, A., Akiyama, R., Hara, M., and Watanabe, Y. : J. Reprod. Develop, 44, suppl. 27(1998)
- 4) 石崎 武・加藤 薫 : 動物学雑誌, 67巻9号, 286-295 (1958)
- 5) Yasuzumi, G. : J Biophys Biochem Cytol.4, 621-637 (1957)
- 6) Morita, J. : Folia Anat Japan, 10, 35-51(1932)
- 7) 毛利秀雄監修, 森沢正昭・星元紀編 : 精子学, 東京大学出版会(1992)
- 8) Gibbons, B. H. and I. R. Gibbons. : J. Cell Biol., 63, 970 (1974)
- 9) Osanai, M., Kasuga, H. and Aigaki, T. : Experientia, 43 (6), 593-596(1987)
- 10) 早川 洋一・中嶋 康裕 : 生物の科学 遺伝, 54巻6号, 25-30, 裳華房(2000)
- 11) Hayakawa, Y., Akiyama, R., Komaru, A. and Munehara, H. : Advances-in-Ethology, No.32 ( Supplement 32 to Ethology ) 228(1997)
- 12) 毛利 秀雄 : 精子の生物学, 東京大学出版会(1991)
- 13) 毛利 秀雄 : 精子の話, 岩波新書(2004)
- 14) Inaba, K. : Zoological Science, 20, 1043-1056(2003)