

# オオタニシ異型精子におけるミトコンドリア活性 と精子運動への $\text{Ca}^{2+}$ 及び $\text{K}^+$ の影響

舟木賢治\*・田村幹樹\*\*

Kenji FUNAKI\* and Motoki TAMURA\*\*

Mitochondria activity and effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  to the motility in the paraspermatozoa of  
*Cipangopaludina japonica*

## ABSTRACT

In order to prove the existence of the mitochondria and examine the relation between the motility of paraspermatozoa and mitochondria activity in the paraspermatozoa of *Cipangopaludina japonica*, the specimen was administered the vital staining by rhodamine which adheres to the activated mitochondria selectively, and were investigated by a fluorescence microscopy. As a result, the activated mitochondria existed in the region of rear 1/3 - 1/2 of the middle piece in paraspermatozoa. Moreover, the mitochondria activity was detected also in the paraspermatozoon which was not moving, indicating that the motility of paraspermatozoa is suppressed by some factor(s) in spite of the produce of ATP as the energy of the motility.

Furthermore, concerning the action of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  as the factors which participate in the adjustment of the motility of paraspermatozoa, the time-dependent changes in the degree of motility (the number of spermatozoa which are moving/the all number of the spermatozoa) of small- and large-sized paraspermatozoa maintained in the solution adjusted at various densities of both ions were examined. The results indicated that  $\text{K}^+$  is effective to raise the degree of the paraspermatozoon motility, and  $\text{Ca}^{2+}$  is necessary to activate the paraspermatozoa, while the motility of paraspermatozoa was completely suppressed at hyper concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ .

【Key words : *Cipangopaludina Japonica*, paraspermatozoon, motility, mitochondria,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ 】

## I. はじめに

動物の精子は、基本的に頭部、中片部、および尾部（鞭毛）からなっているが、その形態は種によって異なる。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う<sup>(1)(2)</sup>。精子の多型現象がみられる動物では、2つのタイプの精子、すなわち受精能をもつ正型精子と受精能をもたない異型精子が形成される。

異型精子が最初に発見された腹足類のタニシでは、従来より異型精子の形成過程やその微細構造について主に研究がなされ、その詳細が明らかにされてきた<sup>(4)(5)</sup>。一方、異型精子の運動性や機能についてはほとんど研究されておらず、その役割についても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。

最近、我々は、大きさが異なる2つのタイプの異型精子を形成するオオタニシを用いて、試験管内における精子の運動性をしらべ、大型異型精子では小型異型精子に比べて運動開始が著しく遅れることを見出した<sup>(6)(7)</sup>。

一般的に精子運動には、それに必要なエネルギーを産

生するためのミトコンドリアの活性化<sup>(8)</sup>に加え、運動を調節するための様々な因子が関与していると考えられている。タニシ異型精子におけるミトコンドリアの存在については、透過電子顕微鏡の観察結果から、中片部に存在する軸索がミトコンドリア由来ではないかと推測されているが、実証はされていない<sup>(9)</sup>。

また、精子運動を調節する一般的な因子としては、互いに拮抗的に作用する  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{K}^+$  がよく知られている。 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内シグナルである cAMP の増加を促し精子運動を活性化させ<sup>(10)</sup>、逆に  $\text{K}^+$  は鞭毛に直接働きかけて精子運動を抑制するといわれている<sup>(11)</sup>。しかし、両イオンの精子運動に対する作用は種によって異なることが報告されている<sup>(12)</sup>。

今回、著者らは、異型精子中片部に存在する軸索がミトコンドリアであるという従来からの推測を実証すべく、実験を試みた。さらに、オオタニシ異型精子の運動とミトコンドリア活性との関係、および異型精子の運動調節に対する  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{K}^+$  の作用について詳細に検討した。

本稿では、その結果を報告するとともに、タニシ異型精子の運動調節機構、及びタニシ精子の運動様式が示す異型精子の役割について考察する。

\* 高根大学教育学部自然環境教育講座

\*\* 高根大学大学院教育学研究科教科教育専攻

## II. 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。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。次に、組織の残渣ができるだけ混入しないよう注意しながら精子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。

### [異型精子ミトコンドリアの観察]

異型精子におけるミトコンドリアの存在、及び精子運動の開始とミトコンドリア活性の関係を調べるために、活性化したミトコンドリアのみを選択的に識別することができるローダミン 123 を用いて生体染色する。

まず、運動開始前後の精子試料 0.5ml に  $10 \mu\text{g/ml}$  に希釈したローダミン 123 溶液を 2ml 加え 30 分間染色する。染色した試料を 1000rpm で 15 分間遠沈し、上澄みのローダミン 123 を取り除き、残りの試料にリンガー液を加えて洗浄する(以上の操作を 5 回おこなう)。洗浄後、試料をスライドガラスに載せ、カバーガラスで封入して蛍光顕微鏡 (485nm) で観察する。

### [精子運動への $\text{Ca}^{2+}$ 及び $\text{K}^+$ の影響]

精子運動への  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  の影響を調べるために、精子試料を  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  を含む溶液に入れ、冷蔵庫内 (4℃) で保存する。精子運動の経時的変化を調べるために、精子試料を冷蔵庫から定期的に取り出して顕微鏡観察し、各時点における異型精子の運動率を求める。観察に用いる溶液は以下の 4 種類とする。

- ① タニシ用リンガー液 ( $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{K}^+$  の両方を含む)。
- ②  $\text{K}^+$  は含まず、 $\text{Ca}^{2+}$  をリンガー液と同量 (通常) あるいは 2.5 倍、5 倍、7.5 倍、10 倍の濃度で含む各溶液。
- ③  $\text{Ca}^{2+}$  は含まず、 $\text{K}^+$  を通常あるいは 2.5 倍、5 倍、7.5 倍、10 倍の濃度で含む各溶液。
- ④ 両イオンとも含まない修正リンガー液。

精子運動の観察は 12 時間毎に行い、試料を自製の 3 穴スライドガラス上の各ホールに 1 滴ずつ滴下し、カバーガラスをかけて光学顕微鏡下で観察する。精子の運動率を求めるために、大型異型精子は倍率 100 倍で、小型異型精子は倍率 200 倍で観察し、デジタルビデオカメラレコーダー (SONY DCR-PC120) を用いて 1 回に 3 視野を撮影する。画像は、動画ソフト (Windowsムービーメーカー) を用いてカメラから直接コンピュータに取り込む。撮影した画像を動画ソフト (Windows Media Player) を用いてコンピュータ上で再生し、精子運動を調べる。運動率の算出には、すべての異型精子中に占める運動異型精子の割合を求め、3 視野の平均値をその時間での値とする。

また、得られた結果は正規分布曲線をフィッティングすることで比較する。その際、正規分布曲線の最大値 (m2) を運動率最大値、このときの時間 (m3) を運動率

最大時間、正規分布曲線の  $\pm 1\text{SD}$  の値 (m4) を運動継続時間とし、各グラフを比較する際の基準とする。

### [精子の運動様式]

タニシ精子の運動様式を調べるために、精子試料を位相差顕微鏡で観察し、正型精子は 1000 倍で、異型精子は 400 倍でビデオ撮影する。撮影後、コンピューター画面上に再生された動画をもとに、OHP シートを用いて精子運動 (5 秒間) の軌跡をなぞり、正型精子と異型精子の運動様式を比較する。

## III. 結果

### [異型精子のミトコンドリア]

精子試料の作製時から既に運動を開始した小型異型精子では、中片部の後方 1/3 ~ 1/2 がローダミン 123 で特異的に染色されていた。一方、まだ運動を開始していない大型異型精子も運動開始後と同様に、中片部の後方 1/3 ~ 1/2 が特異的に染色されていた (図 1・図 2)。

### [精子運動への $\text{Ca}^{2+}$ 及び $\text{K}^+$ の影響]

各溶液中における小型・大型異型精子の運動率の経時変化は、図 4 ~ 図 9 に示されている。

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{K}^+$  の両イオンを含まない修正リンガー液中では、両イオンを含む各リンガー液にくらべ、異型精子の運動率の最大値が低く、また、高い運動率を持続している時間も短かった (図 4・図 5)。

$\text{Ca}^{2+}$  を添加せず  $\text{K}^+$  を添加した溶液については、濃度の違いによって運動性が異なる傾向はみられなかった。(図 6・図 7)。

$\text{K}^+$  を添加せず  $\text{Ca}^{2+}$  を添加した溶液では、通常の 2.5 倍の濃度で、大型異型精子の運動開始が早くなり、また、運動率の高い状態が長時間保たれた。しかし、さらに濃度を高くすると運動率が下がり、最高濃度の 10 倍では、ほとんどの大型異型精子は運動しなかった。小型異型精子でも同様に、通常の 2.5 倍の濃度で運動率の高い状態が長時間保持された。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が通常の 5 倍以上になると、精子採取の直後から運動率が下がり、最高濃度の 10 倍では約半分まで低下した (図 8・図 9)。

### [精子の運動様式]

正型精子は頭部を固定し、鞭毛を波状に動かして前進するため、その運動の軌跡は直線的なものとなる。

一方、異型精子は尾部を固定して中片部を回転させて前進するため、周囲をぐるぐると旋回するような軌跡を描いて運動するものが多かった (図 10)。

## IV. 考察

異型精子のミトコンドリアについては、これまでの透過電子顕微鏡による観察結果から、ミトコンドリア由来と推測される軸索が中片部の後方 2/3 に存在すると報告されていた。今回の結果は、その報告とほぼ一致していることから、精子中片部で軸索を取り巻いている軸索がミトコンドリア由来であることが明らかになった。しか



図1 ローダミン 123 で染色された異型精子 (剖出後 0 時間)

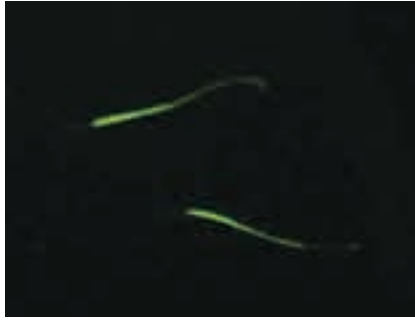


図2 ローダミン 123 で染色された異型精子 (剖出後 96 h)

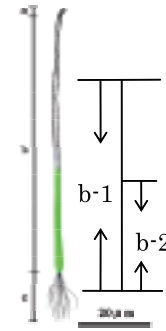


図3 ローダミン 123 で染色された異型精子の模式図  
a: 頭部 b: 中片部 c: 尾部 b-1: 軸索 b-2: ローダミンによって染色される部位

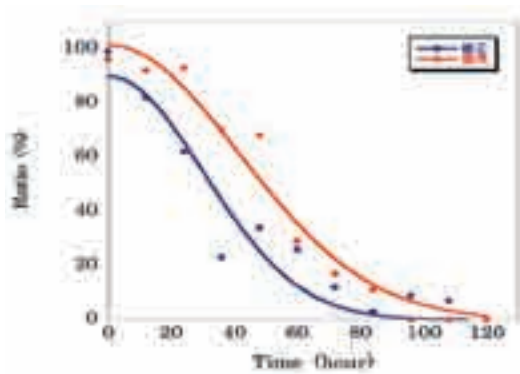


図4 溶液①④における小型異型精子の運動率の経時的変化

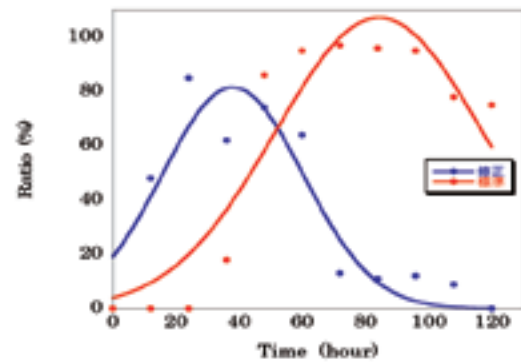


図5 溶液①④における大型異型精子の運動率の経時的変化

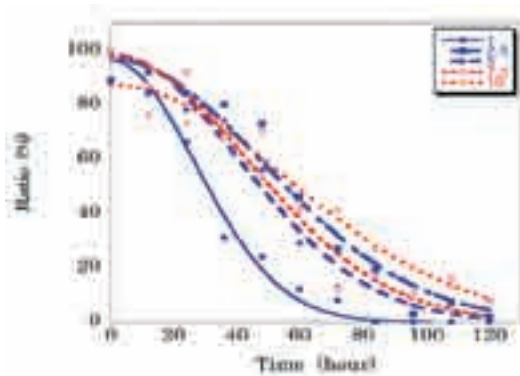


図6 溶液③における小型異型精子の運動率の経時的変化

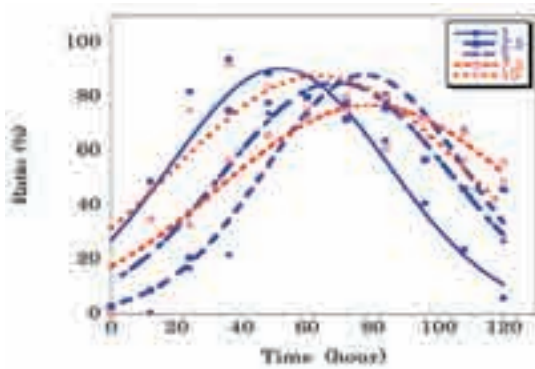


図7 溶液③における大型異型精子の運動率の経時的変化

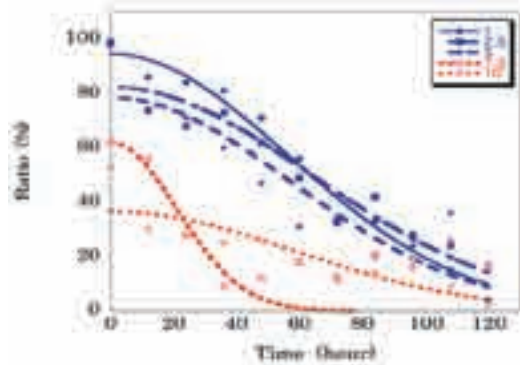


図8 溶液②における小型異型精子の運動率の経時的変化

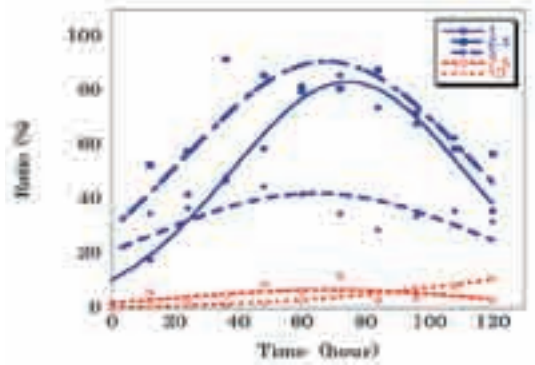


図9 溶液②における大型異型精子の運動率の経時的変化



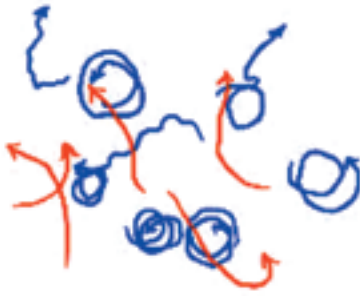


図10 正型精子および異型精子の運動様式と  
その軌跡 (5 S)

赤=正型精子 (1000 倍で観察)

青=異型精子 (400 倍で観察)

し、今回のローダミン 123 染色では、異型精子中片部の後方 1/3 ~ 1/2 が染色されており、中片部の後方 2/3 に存在する軸糸がミトコンドリア由来であるとした透過電子顕微鏡による研究結果とは多少異なっている。

透過電子顕微鏡による研究結果が正確であるならば、異型精子のミトコンドリアの前方約 1/3 は活性化していないことになる。この点については、今後の検討が必要である。さらに、運動開始前の大型異型精子でも、すでにミトコンドリアの活性化が起っていることが示されたことから、大型異型精子ではエネルギーである ATP が産生されているに関わらず、他の要因によってその運動が抑制されていることが示唆された。

精子運動への  $\text{K}^+$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の影響については、 $\text{Ca}^{2+}$  は含まず  $\text{K}^+$  を含む溶液では、両イオンを全く含まない修正リンガー液より高い運動率を示し、その継続時間も長かったことから、 $\text{K}^+$  は異型精子の運動率を高めるのに必要な因子であると考えられる。しかし、濃度による違いは見られなかったので、 $\text{K}^+$  は存在するかしないかによってのみ、精子運動に影響を及ぼすと考えられる。

一方、 $\text{Ca}^{2+}$  の影響については、ある最適な濃度で異型精子運動の活性化がみられた。これは、一般的に考えられているのと同様に、オオタニシの異型精子でも、 $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内シグナルとなる cAMP を産生するアデニル酸シクラーゼを活性化していると考えられる。また、 $\text{Ca}^{2+}$  が最適濃度以上になると逆に運動を抑制することが示唆されたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  が酵素の反応に関与している可能性が高い。

以上の結果から、オオタニシ異型精子の運動調節機構について、次のような機構が考えられる。すなわち、大型異型精子では、エネルギーとなる ATP が存在しているにもかかわらず、鞭毛運動の要となっている ATP 加水分解酵素のダイニンが活性化されていないと考えられる。一般的にダイニンの活性化は、pH の変化によって調節されているとされている。しかし、オオタニシの大型異型精子では、pH の変化とは別に  $\text{Ca}^{2+}$  がダイニンの活性に関与していることが考えられる。つまり、 $\text{Ca}^{2+}$  の濃度が最適濃度になった場合、アデニル酸シクラーゼが活性化されることにより cAMP 濃度が上昇し、それに

よってダイニンの活性化が起こるのではないかと考えられる。実際に精子鞭毛のモデルを用いた研究では、ATP と cAMP の両者が存在しないと軸糸のすべり運動がおこらないことが報告されている。しかし、詳しい機構についてはわかっていない<sup>(13)</sup>。

タニシ異型精子の役割については、小型異型精子と大型異型精子の運動開始時間が著しくずれていることから、他個体による正型精子の進入を妨害するという「兵隊精子説」が支持されることをこれまでも述べた<sup>(6)(7)</sup>。今回の観察によって明らかになった異型精子の運動様式、すなわち周囲を旋回するような運動は、異型精子が雌の生殖器官内に長期間留まり、他雄の正型精子の進入を妨害するのに非常に適していると考えられる。したがって、今回の結果は、オオタニシ異型精子の「兵隊精子説」をさらに支持するものであるといえる。

今回述べたオオタニシ異型精子における精子運動の調節機構や役割を実証するためには、さらなる詳細な研究が必要である。特に、 $\text{Ca}^{2+}$  が本種における運動調節機構の因子として実際に関与しているかどうかを明らかにすることが重要である。そのためには、雄精巣内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、雌生殖器官内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に加え、cAMP 濃度の変化についても検討しなければならない。また、ダイニンの活性に関与する要因として重要な pH の影響についても検討する必要がある。

#### 引用および参考文献

- 1) Sivinski, J. : Sperm competition and the evolution of animal mating system. (Smith RL, ed), p.86-115 Academic Press, New York (1984)
- 2) Jamieson, B. G. M. : New horizons in sperm cell research. (Mohri, H. ed), pp.311-332. Gordon & Breach Science Publishers, New York (1987)
- 3) Swallow, J. G. and Wilkinson, G. S. : Biol. Rev. 77, pp.153-182 (2002)
- 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) 舟木賢治・田村幹樹:鳥根大学教育学部紀要, 第 39 巻, 135-140 (2006)
- 7) 舟木賢治・田村幹樹:The 77th Annual Meeting of the Zool. Soci. of Japan (2006)
- 8) Tombes, R. M. and Shapiro, B. M.:Cell, 41, 325-334 (1985)
- 9) 石崎 武・加藤 薫:動物学雑誌, 67 巻 9 号, 286-295 (1958)
- 10) Hyne, R. V. and Garbers, D. L. : Biol. Reprod., 21, 1135-1142 (1979)
- 11) Inoda, T., Ohtake, H. and Morisawa, M. : Zool. Sci., 5, 939-945 (1988)
- 12) Tash, J. S. and Means, A. R. : Biol. Reprod., 28, 75-104 (1983)
- 13) Morisawa, M. and Okuno, M. : Nature, 295, 703-704 (1982)