

# オオタニシにおける精子成熟と異型精子の運動開始パターン

舟木 賢治\*・杵築 啓太\*\*

Kenji FUNAKI and Keita KIZUKI

Sperm Maturation and Motility Initiation Pattern in the 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. Recently, we have reported that there was a remarkable difference in the motility initiation *in vitro* between micro and macro parasperms, that is, at the start of culture, all the micro parasperms have actively moved, while the macro parasperms have never shown any motion. After then, the fact was newly observed in some individuals that both micro and macro parasperms had actively moved at the start of culture. About these differential patterns of motility initiation were divided into two type, namely, the former is type A and the later is type B.

In present investigation, the motility initiation pattern of the macro parasperms was type A in individuals with well-developed testis in which almost all the eusperms were on the way of metamorphosis, indicating that the spermatogenesis is very active. In contrast, the motility initiation pattern was type B in individuals with under-developed testis in which almost all the eusperms have done metamorphosis. Furthermore, the motility activity of eusperm was very low in individuals which parasperm indicate the motility initiation pattern of type B. These findings indicated that the motility initiation pattern of parasperm is type A in the bleeding season of this species and it is important for reproductive advantage.

【キーワード：オオタニシ，運動開始パターン，異型精子，精子成熟】

【Keywords : *Cipangopaludina Japonica*, motility initiation pattern, parasperm, sperm maturation】

## 1. はじめに

多くの動物では、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 (Sivinski, 1984; 早川・中嶋, 2000)。

多型性がみられる精子のうち、受精能を持つ精子は通常1種類のみで、他の精子は受精能を欠く。受精能をもつ精子を正型精子、受精能をもたない精子を異型精子という。

異型精子は1836年にタニシで最初に発見され、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た (Hodgson 1997; Silberglied et al., 1984)。また、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ている (Hayakawa et al., 1998)。タニシ異型精子は、貧核の小さな頭部、多数の軸糸が束ねられてできた太くて長い中片部およびそれらの軸糸が帚状に分散してできた短い尾部からなっている (Yasuzumi, 1957)。また、図1に示すように、オオタニシの異型精子には小型と大型の2つのタイプが存在することが知られている (Morita,

1932; 舟木・田村, 2006)。

これまで、異型精子の形態や形成過程については詳細な観察が行われてきたが、その役割についてはいまだ確証は得られていない。異型精子の機能を解明するためには、その運動についての生理学的なアプローチが必要

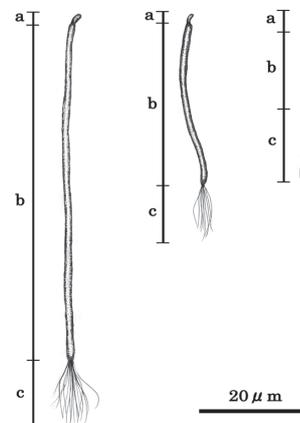


図1 オオタニシの精子 (舟木・田村, 2006)  
左から大型異型精子 小型異型精子 正型精子  
(a: 頭部 b: 中片部 c: 尾部)

\* 高根大学教育学部人間生活環境教育講座

\*\* 高根大学大学院教育学研究科教育内容開発専攻

である。

オオタニシ異型精子の運動について、舟木・田村(2006)は小型異型精子が正型精子と同様に培養開始時から運動するのに対し、大型異型精子は培養後1日以上経過してから動き始めるという興味深い現象を見出した。しかし、最近になって大型異型精子も小型異型精子と同様に培養開始時から運動する個体もいることがわかった。

本稿では、これまでの研究結果にもとづいて、オオタニシ異型精子の試験管内での運動開始パターンの違いが何に起因するかを述べるとともに、異型精子の運動調節機構と異型精子の役割について考察する。

## 2. 材料と方法

実験には、2008年4月から2009年3月にかけて松江市福原町休耕田から採集したオオタニシの成熟雄を用いた。

### 【精巢の外部形態の観察と精巢重量比の算出】

脱殻した成貝から精巢を摘出し、精巢の外部形態を観察し、精巢重量比〔精巢重量/脱殻後の軟体部重量×100(%)〕を算出した。

### 【精子試料の作製】

摘出した精巢をカミソリで薄切し、平衡塩類溶液中で組織片を解すことによって精子懸濁液を作製する。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し、精子試料とする。精子試料を冷蔵庫内で10~15日間保存し、経時的な精子運動の観察を行なうために用いた。

### 【精子運動の観察】

冷蔵保存した精子懸濁液を十数時間おきに取り出し、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精子運動を観察する。観察倍率は、大型異型精子が100倍、小型異型精子が200倍で、いずれもデジタルカメラレコーダー

(SONY DCR-PC120)を用いて1回に3視野を撮影する。映像は、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。次に、取り込んだ動画を動画再生ソフト(Windows Media Player)を用いてコンピュータ上で再生し、精子運動を詳細に観察する。

### 【精子形態の観察】

精子の形態を観察するために、精子懸濁液をスライドガラス上に塗抹する。塗抹した試料を軽く乾燥させ、ホルマリン固定したあと、ギムザ染色を施す。染色した標本を光学顕微鏡(OLYMPUS BX60)で観察し、顕微鏡撮影装置(pixera Penguin 600CL)で撮影する。

## 3. 結果

### 【精巢の外観と精巢重量比】

図2に示すように、精巢の発達の違いによってその外観は大きく異なり、かなりの個体差がみられた。よく発達した精巢は、大きさに関係なく乳白色や明黄色を呈し、膨らみがあって固い感じがした。また、精巢表面に放射状に伸びる皺がみられた。



図2 精巢の外観

左：よく発達した精巢

右：あまり発達していない精巢

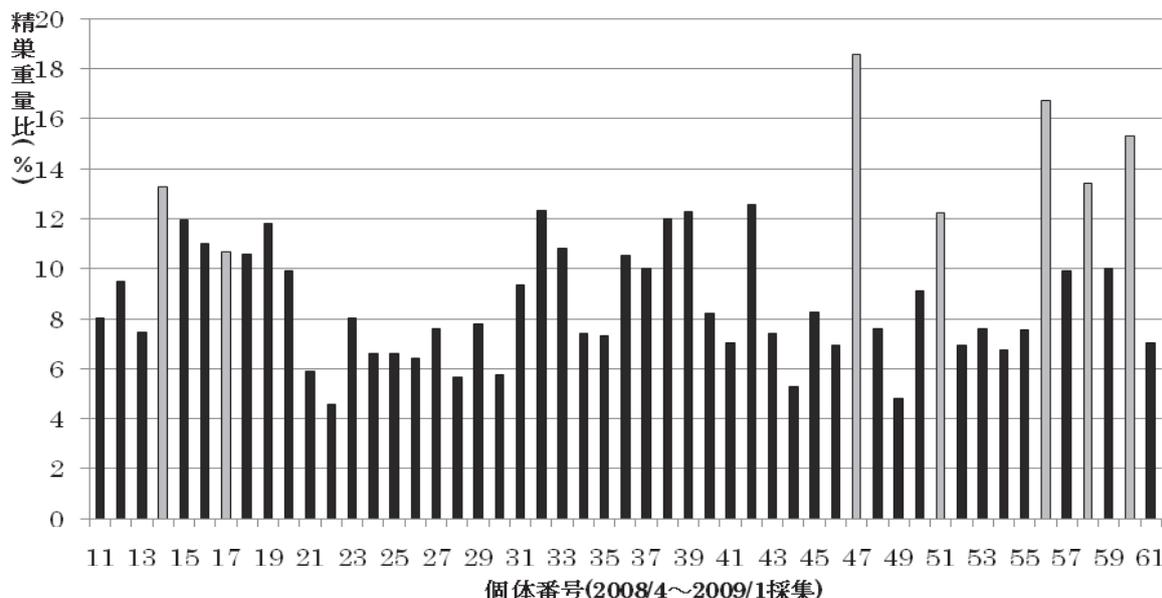


図3 実験個体の精巢重量比

■ Aタイプの運動開始パターンを示す個体

■ Bタイプの運動開始パターンを示す個体

一方、あまり発達していない精巣は黄土色や暗黄色を呈し、膨らみがなく、軟らかかった。また、放射状に伸びる皺も見られなかった。

精巣重量比は個体によって大きさにばらつきがあり、小さい個体では5%程度、大きい個体では19%弱まで及ぶ個体も見られた(図3)。個体の大きさに関わらず、外見的に良く発達している精巣を持つ個体では精巣重量比が大きく、反対に、外見的にあまり精巣が発達していない個体では精巣重量比が小さかった。

【異型精子の運動開始パターン】

図4に示すように、異型精子の運動開始パターンには大別して2つのタイプがみられた。すなわち、舟木・田村によって最初に報告されたような、大型異型精子が培養開始後1日以上を経過してから動き始めるパターン(Aタイプ:図4上)と、培養開始時から運動を開始するパターン(Bタイプ:図4下)である。

各月に採取された個体毎の運動開始パターンを図5に示す。

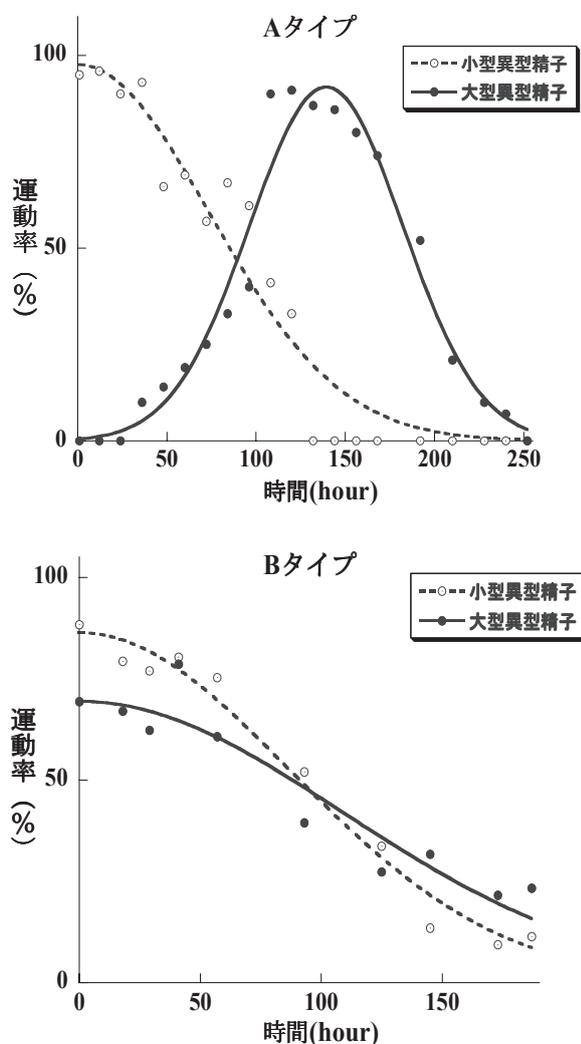


図4 タニシ異型精子の運動開始パターン  
上:大型異型精子が培養開始後1日以上経過して動き始める(Aタイプ)  
下:培養開始時から大型異型精子が運動開始する(Bタイプ)

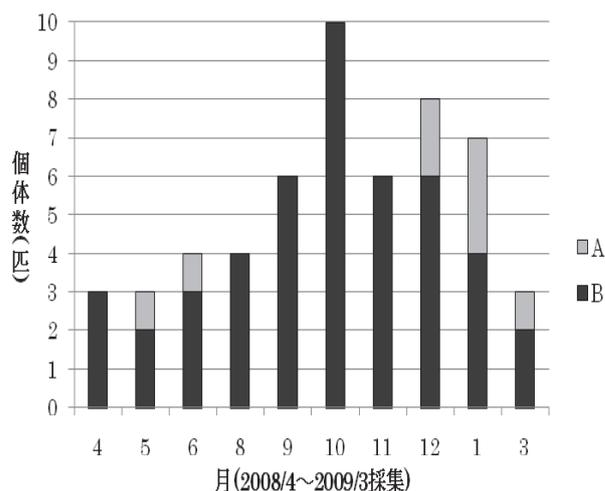


図5 各月における異型精子運動開始パターンの変動  
Aタイプ Bタイプ

2008年4月に採取した3個体はすべてBタイプの運動開始パターンを示した。2008年5月~6月にかけては、Aタイプの個体とBタイプの個体が混在し、7個体中2個体がAタイプ、5個体がBタイプであった。2008年8月~11月では、26個体すべてがBタイプであったが、2008年12月~2009年3月にかけては、再び両方の運動開始パターンが混在し、18個体中6個体がAタイプ、12個体がBタイプであった。

【異型精子の運動開始パターンと精巣重量比の関係】

図3に示すように、運動開始パターンがAタイプを示す個体の精巣重量比は10%以上で、10%未満の個体はすべてBタイプを示した。しかし、以下の結果が示すように、精巣重量比が10%以上のものがすべてAタイプのパターンを示すという可逆的な関係は認められなかった。すなわち、2008年5月、6月に採集した7個体のうちの4個体の精巣重量比は10%以上であったが、運動開始パターンはBタイプであった。また、2008年10月~11月に採集した16個体すべての異型精子運動開始パターンはBタイプであったが、内7個体の精巣重量比は10%以上であった。

【正型精子頭部の形状と異型精子運動開始パターンとの関係】

通常、オオタニシの正型精子は成熟を完了すると、頭部が鋭く尖ったドリル状になる。しかし、今回観察されたオオタニシでは、変態を完了した完全なドリル状の頭部をもつ正型精子だけからなる個体と、ほとんどが不完全なドリル状の頭部をもつ変態途中の正型精子からなる個体が混在していた(図6)。

よく発達した精巣から採取した正型精子は、ほとんどが未成熟であり、反対にあまり発達していない精巣の正型精子はすべて変態を完了していた。

また、異型精子の運動開始パターンがAタイプを示した個体のすべてにおいて、正型精子の頭部は不完全なドリル状をしていた。反対に、異型精子の運動開始パターンがBを示した個体では、すべての個体において、正型精子頭部が完全なドリル状をしていた。

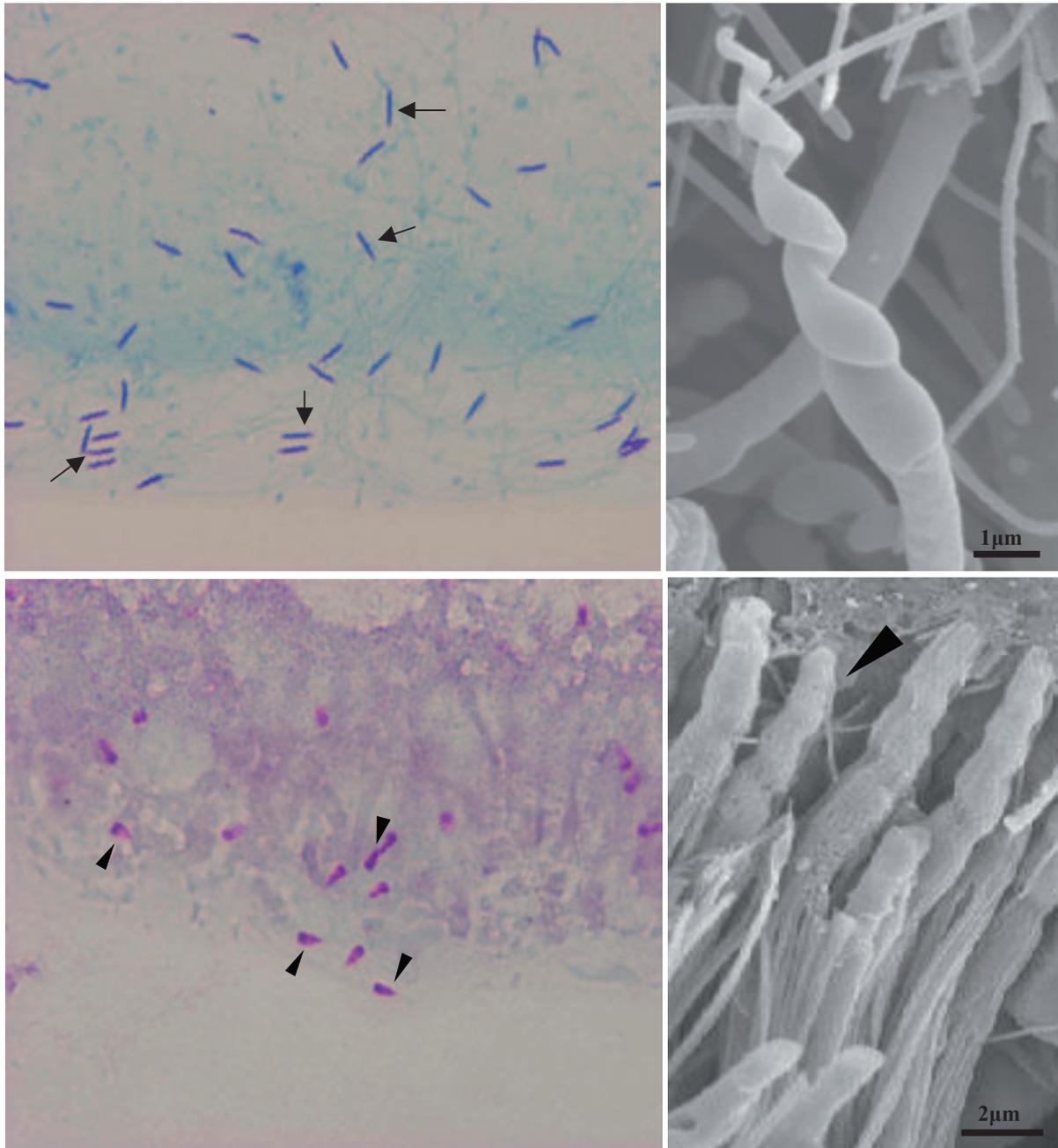


図6 成熟した正型精子頭部（上：矢印）と未熟な正型精子頭部（下：矢頭）  
光学顕微鏡像（左），走査電子顕微鏡像（右）

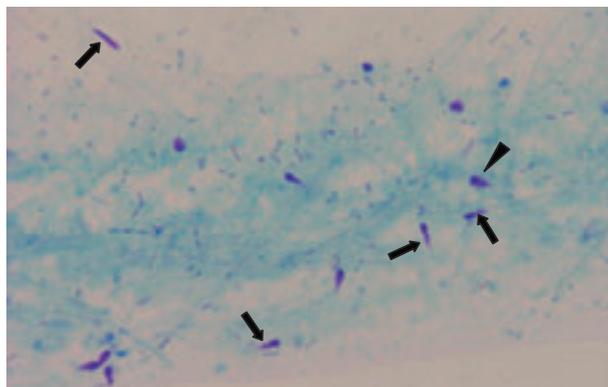


図7 培養開始から156時間経過した正型精子頭部（図6左下 剖出直後）  
矢印：成長した頭部 矢頭：成長がみられない頭部

これに関し、採取時に変態途中の状態にあった正型精子の培養実験を行った。その結果、頭部が完全なドリル状に近い状態になるまで成熟が進行した(図7)。培養した正型精子の運動を観察したところ、変態を完了した正型精子は運動性が著しく低下したが、反対に、変態途中の正型精子は活発な運動性を示した。

#### 4. 考察

一般的に精子の運動に必要なエネルギーであるATPはミトコンドリアによって産生される。タニシ異型精子のミトコンドリア活性については、運動開始前と運動開始後の大型異型精子のいずれにおいても同様の活性がみられることから、大型異型精子では何らかの要因によって運動開始が抑制されていると報告している(舟木・田村, 2007)。しかし今回、タニシ大型異型精子の運動開始パターンにはAとBの2タイプがあり、精子形成が活発で変態中の正型精子が多くみられる個体の大型異型精子はAタイプを示し、精子形成が不活発で変態中の正型精子がほとんどみられない個体の大型異型精子はBタイプを示すことが明らかになった。このことから、大型異型精子は運動を抑制されているのではなく、変態途上において運動能を獲得していないという可能性が高い。

精子の運動は、軸糸に存在する9+2構造の微小管の滑り運動を起点とした鞭毛運動である。その滑り運動を起こす力は、微小管どうしを介して存在するモータータンパク質であるダイニン(dynein)によって発生する(Gibbons, 1963)。運動開始は、ダイニンが活性化し、ATPを消費することによって起る。運動開始までの過程にはミトコンドリアからのATP供給と様々な酵素や細胞内シグナル、イオン、pHなどが関与し、複雑な調節が行われている。

ダイニンには活性化型と不活性化型が存在し、pHの変化によって調節されている。また、精子運動を活性化させる要因として、タンパク質のリン酸化が関与する。それを引き起こすcAMPは、アデニル酸シクラーゼによって合成される。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化にCa<sup>2+</sup>が関与すると言われている(Hyne and Garbers, 1979)。

一方、活性化したダイニンにATPを供給する機構には、ダイニンATPアーゼが関与していることが分かっている(毛利・星, 2006)。ダイニンATPアーゼは、H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>の交換による細胞内pHの上昇によって活性化し、その結果、鞭毛内でATPが消費され、ミトコンドリアから新たなATPが供給される(Tombes and Shapiro, 1985)。

オオタニシでは、大型異型精子の運動開始パターンのタイプにかかわらず、正型精子と小型異型精子は培養開始時から運動を開始していることから、精子尾部の形成は完了していることが容易に推測できる。したがって、運動開始パターンがAタイプ(培養開始時に運動していない)の大型異型精子では、形態的構造ではなく物質的あるいは酵素化学的な点において未完成であり、運動能

を獲得していないと考えられる。

今回、同一実験系にもかかわらず、両タイプの運動開始パターンがみられたことから、用いた平衡塩類溶液のpHや液中に含まれるCa<sup>2+</sup>が運動開始に関与しているとは考えにくい。むしろ、運動していない大型異型精子では、cAMPが合成されていないか、あるいはアデニル酸シクラーゼが不活性化状態にある可能性が高いと考えられる。しかし、種によってはcAMPが関与しない経路も考えられているので、それぞれについて直接測定する必要がある(Takai and Morisawa, 1995; Krasznai et al., 2000)。

また、鞭毛全体にATPを供給する機構として、クレアチンリン酸シャトルが存在する。産生されたATPがクレアチンに結合することにより鞭毛基部での多量のATP消費を防ぎ、鞭毛全体にATPが供給される(Bessman and Geiger, 1981; Christen et al., 1983; Shapiro and Tombes, 1985)。このATPとクレアチンを結合させる機構が未成熟であった可能性も考えられる。

いずれにせよ、精子が運動を開始するためにはダイニンを活性化し、ATPを供給するための様々な機構が存在するが、今回の結果はこれらの機構が未成熟であった可能性を示した。しかし、詳細については今後検討する必要がある。

異型精子の生殖における役割については様々な説が挙げられており、特に同一精液中の精子の輸送、栄養、成熟促進を行う「ヘルパー精子」(Trivers, 1985)、複数の雄の精子が媒精されたときに、ライバル雄との受精の妨害をする「兵隊精子」(Kura and Nakashima, 2000)などがある。オオタニシについては先の研究より、兵隊精子説を支持するという報告がされている(舟木・田村, 2006)。

今回の結果から、よく発達し、精巣重量比が大きい個体の大型異型精子運動開始パターンはAタイプになり、反対に、個体の精巣重量比が小さい個体ではBタイプになることが示された。また、Bタイプを示す個体では正型精子の運動性が著しく低いことが分かっている。これらのことから、Aタイプの個体が生殖に適していると考えられる。一般的にタニシは春ごろ交尾期に入り、12月~3月にかけて冬眠するといわれており(樽松, 1979)、生殖に適したAタイプが冬から春ごろにかけてみられた今回の結果は、それと合致している。

舟木・田村(2007)は、小型異型精子と大型異型精子の活動時間帯がずれることによって雌生殖器内での異型精子の活動時間が延長され、他個体の精子の侵入を防ぐのに適していると述べているが、今回の結果はそれを支持している。

今後は、運動開始機構や異型精子の役割を証明するために雌生殖器内に射精された精子について実証しなければならない。

## 引用文献および参考文献

- [1] Sivinski, J. : Sperm competition and the evolution of animal mating system. (Smith RL, ed), p.86-115 Academic Press, New York (1984)
- [2] 早川 洋一・中嶋 康裕 : 精子の多型現象と兵隊精子説. 遺伝, 54: 25-30 (2000)
- [3] Hodgson, A.N. : Invert. Reprod. Develop., 31, 21-28 (1997)
- [4] Silberglied, R. E., Shepherd, J. G. and Dickison, J. L. : Am. Nat., 123, 255-265 (1984)
- [5] Hayakawa, Y., Munehara, H., Komaru, A., Akiyama, R., Hara, M., and Watanabe, Y. : J. Reprod. Develop, 44, suppl. 27 (1998)
- [6] Yasuzumi, G : J Biophys Biochem Cytol.4, 621-637 (1957)
- [7] Morita, J. : Folia Anat Japan, 10, 35-51 (1932)
- [8] 舟木賢治・田村幹樹 : 島根大学教育学部紀要, 第39巻, 135-140 (2006)
- [9] 舟木賢治・田村幹樹 : 島根大学教育学部紀要, 第41巻, 155-158 (2007)
- [10] Gibbons, I. R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50: 1002-1010 (1963)
- [11] Hyne, R. V. and Garbers, D. L. : Biol. Reprod., 21, 1135-1142 (1979)
- [12] 毛利秀雄・星元紀 監修, 森沢正昭・星和彦・岡部勝 編 : 新編 精子学, 東京大学出版会 (2006)
- [13] Tombes, R. M. and Shapiro, B. M. : Cell, 41, 325-334 (1985)
- [14] Takai, H. and Morisawa, M. : J. Cell Sci., 108: 1175-1181 (1995)
- [15] Krasznai, Z., Márián, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L. and Tron, L. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 2052-2057 (2000)
- [16] Bessman, S. P. and Geiger, P. J. : Science, 211, 448-452 (1981)
- [17] Christen, R., Shackmann, R. W. and Shapiro, B. M. : J. Biol. Chem., 258, 5392-5399 (1983)
- [18] Shapiro, B. M. and Tombes, R. M. : Bio Essays, 3, 100-103 (1985)
- [19] Trivers, R. : Social Evolution. The Benjamin/Cummings Publ. Co., Menlo Park, California (1985) (中嶋康裕ほか訳 『生物の社会進化』, 産業図書, 東京, 1991)
- [20] Kura, T. and Nakashima, Y. : Evolution, 54: 72-80 (2000)
- [21] 樽松文雄 著 : タニシー人工養殖の実際 - , 農山漁村文化協会 (1979)