

マイワシ精子の微細構造と運動の観察

原 政子¹・石島純夫²・沖山宗雄¹

¹〒164 東京都中野区南台 1-15-1 東京大学海洋研究所

²〒152 東京都目黒区大岡山 2-12-1
東京工業大学理学部

Ultrastructure and Motility of Spermatozoa of the Japanese Sardine, *Sardinops melanostictus*

Masako Hara,¹ Sumio Ishijima²
and Muneo Okiyama¹

¹Ocean Research Institute, University of Tokyo,
1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo 164, Japan

²Faculty of Science, Tokyo Institute of Technology,
2-12-1 O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan

(Received January 20, 1994; in revised form August 16,
1994; accepted September 20, 1994)

The ultrastructure of the spermatozoa of the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*, was examined under scanning and transmission electron microscopes. The spermatozoon comprised the head (nucleus), midpiece (mitochondrion), and a single tail (flagellum), as in most teleosts, with a total length of about 50 μm . The head was ovoid, being wider than long, and slightly depressed with a deep basal fossa containing the proximal centriole slanted at about 45 degrees to the distal centriole. A single, extremely large mitochondrion in close contact with the posterior border of the head was C-shaped in cross-section, with its inner membranes modified into variously-shaped cristae, including characteristic walls along the longitudinal axis of the mitochondrion, as well as tubular and vesicular structures. Microtubules of axonemal doublets 1, 3, 5, 6 and 7 were characterized by intratubular differentiation as in other clupeids. Measurements of sperm motility indicated a progressive speed of 221.9 $\mu\text{m}/\text{s}$, a beat frequency of 66.7 Hz, an amplitude of 3.1 μm and a wave length of 76.5 μm . In seawater, the spermatozoa usually maintained a circular motion, although they sometimes followed a straight path after 20 or more circular movements. Morphological characteristics were discussed in relation to their functional aspects.

近年、魚類精子の形態を系統学的な立場から考察した研究が Jamieson (1991) と Mattei (1991) によって相次いで発表された。前者には、魚類精子の形態が極めて多様化していることが豊富なデータで示されており、魚類精

子形態学の集成として注目される。しかし、対象種が淡水魚類中心で、海産魚類に関する情報が非常に少ないばかりか、日本産魚類についてはほとんど記されていない事など、まだ十分とはいえない。

筆者らは日本産魚類を中心に精子の形態と系統的意義を解明するための知見を蓄積する一方、多様化した精子が受精機構において、どのように機能しているかを考察するために、微細構造と運動とを合わせた研究の必要性を痛感した。そこで、精子の微細構造を電子顕微鏡により詳細に検索すると同時に、運動については精子の前進速度、鞭毛の振動数、振幅、波長および運動パターンなどの観察と計測を行った。従来、魚類精子を用いてこれらの運動特性の計測をおこなったものは、わずかに Gibbons et al. (1983), Gibbons et al. (1985) によるウナギ属の研究があるにすぎない。したがって、精子の微細構造と運動との関連を解明するには、更に多くの種類について観察をおこなうことが必要であると考える。

そこで、まず第一報としてマイワシを取り上げる。本種は代表的な多獲性魚種なので、繁殖に関する研究は極めて多く (Matsuura et al., 1991 その他), 卵の微細構造についてはすでに報告されているが (黒田, 1991), 精子については全く研究が行われていないため、その結果を報告する。

材料と方法

本研究に用いたマイワシ (*Sardinops melanostictus*) は、水産庁養殖研究所で 2 年間飼育された 4 歳以上の親魚に、ホルモン (LHRH) 処理を施して 2 日以上経過したものである。1993 年 6 月に、摘出した精液と精巣を電子顕微鏡用に固定するとともに、石島 (1992) に従って精子の運動について観察をおこなった。

透過型電子顕微鏡試料 精巣の細切片は、0.5% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒド及び 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) の混合液で、一夜室温で前固定した。その後、試料を 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、1% 四酸化オスミウムと 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) の混合液を用い、室温で 2 時間後固定し、常法によりエタノールシリーズで脱水し、エボン 812 に包埋した。超薄切片はウルトラトーム V (LKB 社製) でダイヤモンドナイフを使用して作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を施し、JEM-100CX (日本電子製) 透過型電子顕微鏡で観察した。

走査型電子顕微鏡試料 精液は、上記の前固定液を用い、室温で一夜固定した後、0.1 M カコジル酸緩衝液

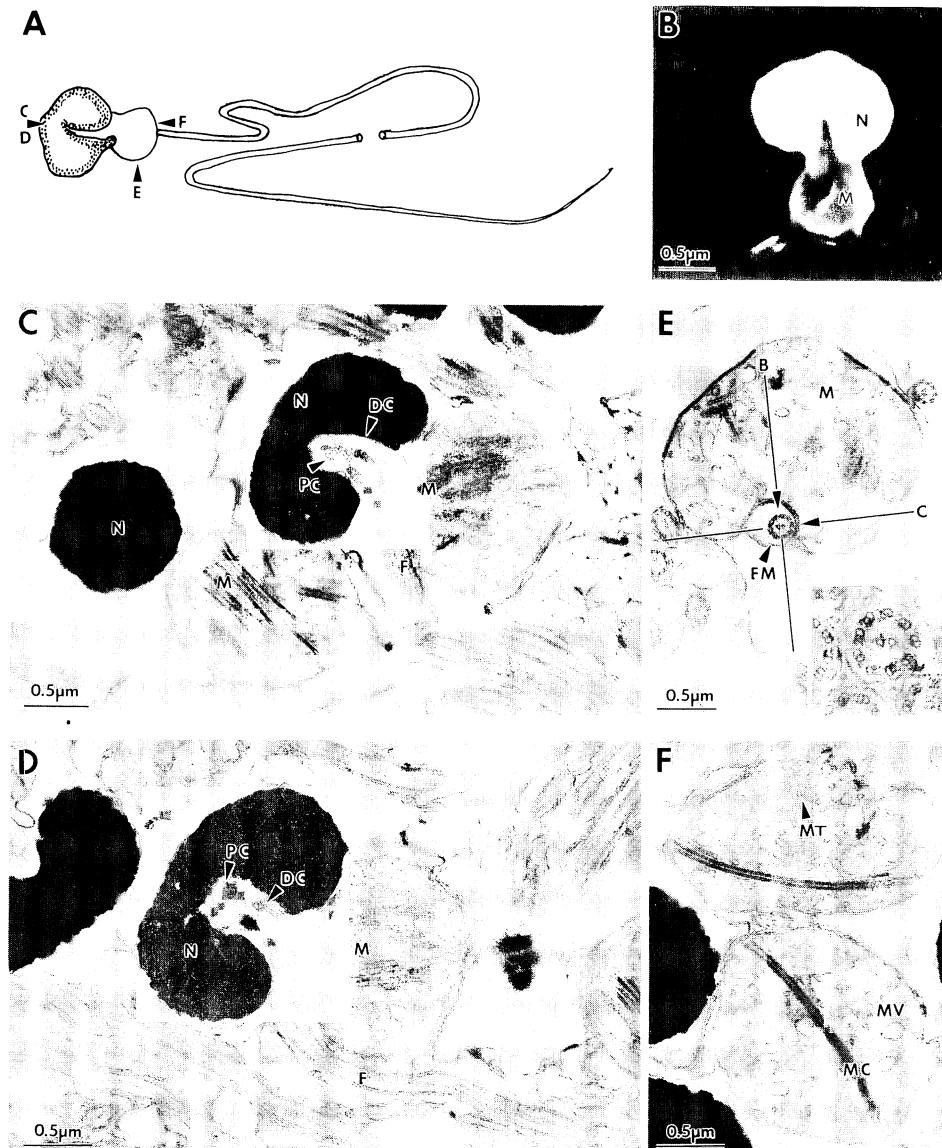


Fig. 1. Spermatozoon of the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*. A) Schematic illustration of spermatozoon (arrows C-F, indicate cross-sectional areas photographed); B) scanning electron micrograph of head; C) and D) longitudinal-sections; E) cross-section of midpiece; F) cross-section of mitochondria. N—nucleus; F—flagellum; M—mitochondrion; MC—mitochondrial cristae; MT—mitochondrial tubule; MV—mitochondrial vesicle; PC—proximal centriole; DC—distal centriole; FM—flagellar microtubules; C—C axis; B—B axis (beat).

(pH 7.4) で 2 回洗浄した。次に、ポリカチオン処理をしたカバーガラス上に精子懸濁液を滴下し、15 分間静止させた後、エタノール脱水し、二酸化炭素で臨界点乾燥した。乾燥後、金蒸着を施した試料を、ALPHA-25 (明石ビームテクノロジー製) 走査型電子顕微鏡で観察した。

精子運動の測定 精巣内からピペットで精液を採取し、海水で 1000 倍に希釈したものを、位相差顕微鏡を用いて観察した。精子の運動を顕微鏡に接続したハイスピード・ビデオシステム MHS-200 (Nac 社製) で撮影し、精子の前進速度、精子鞭毛の振動数、振幅、波長な

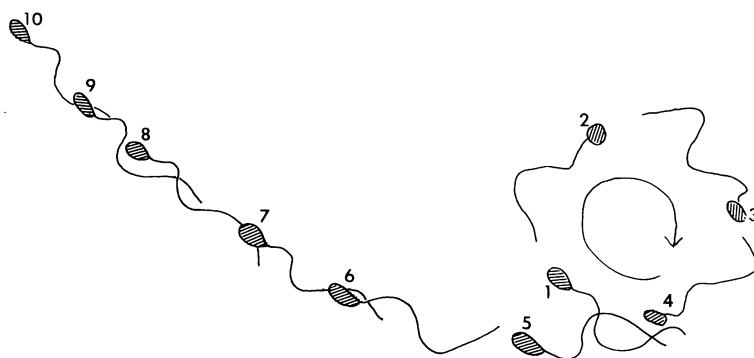


Fig. 2. Tracings of successive fields of a video recording showing typical sperm movement of *Sardinops melanostictus* in seawater.

どを計測した。

結 果

精子の外部形態 マイワシの精子は全長約 50 μm で、頭部（丸い核）、中片部（巨大なミトコンドリア）、一本の尾部（鞭毛）から構成されていた (Fig. 1A)。頭部は横にやや膨らんだ球形で、後端に凹入部が認められた (Fig. 1B)。頭部終末には、一個の巨大なミトコンドリアが存在していた (Fig. 1B)。

精子の内部構造 頭部に先体ではなく、ほとんどを核が占めていた。核内のクロマチンは不均一な顆粒状に濃縮されているので、電子密度に濃淡があり、核の周辺域には凹凸が観察された (Fig. 1C, D)。頭部基部には円柱状の深い陥入があり、その最深部に 2 個の中心子が位置していた (Fig. 1C, D)。近位中心子は核膜に接し、遠位中心子からは尾部が伸長していた (Fig. 1C)。頭部終末部には 1 個の大きなミトコンドリアがあり、尾部に接していた (Fig. 1C, D)。また横断像からみると、ミトコンドリアは軸糸構造の C 軸の片側に発達していた (Fig. 1E)。ミトコンドリアの内膜はよく発達しており、ミトコンドリア小管 (tubule) と小胞 (vesicle) のほか、内部を縦走する長いクリスタ (ミトコンドリア櫛) (Fig. 1F) を持つものが観察され、その形状は極めて多様化していた。尾部の軸糸は 9+2 型の一般的な構造であるが、1, 3, 5, 6, 7 のダブレット微小管の A 小管内には、高密度物質がみられた (Fig. 1E)。マイワシ精子は、細胞質を殆ど残さず形成され、原形質膜が精子の各部分に深く湾入しながら全体を覆っていた。

精子の運動特性 ハイスピードビデオ装置で撮影された画像より、個々の精子の運動を観察した結果、前進速

度 221.9 $\mu\text{m}/\text{s}$, 振動数 66.7 Hz, 振幅 3.1 μm , 波長 76.5 μm などの特性値が得られた。また、鞭毛は一般的な 2 次元の運動をすることが明らかとなった。精子は、時計まわりの一周期 1/2 秒の円運動を數十回連続させた後、1/2 秒の僅かな直進運動をし、再び円運動を繰り返した。また精子によっては時計まわりの円を描いて回転運動をした後、急に全体を伸長させた状態で小休止をし、再び以前と同様の円運動を行うものも認められた。

考 察

魚類精子の形態は、Mattei (1991) や Jamieson (1991) によってさまざまな分類群について記載されている。通常、これらの精子は、頭部（核）、中片部（ミトコンドリア）、尾部（鞭毛）の 3 部から構成される。これらのうち、中片部はミトコンドリアの数と形の特徴から、単ミトコンドリア型、複ミトコンドリア型、多ミトコンドリア型、鞘ミトコンドリア型の四タイプに大別される（黒倉, 1992）。マイワシ精子も頭部、中片部、尾部から構成され、硬骨魚類の一般的な形態を示し、中片はミトコンドリア数から単ミトコンドリア型に該当する。しかし、マイワシ精子のミトコンドリアは巨大で、頭部の半分ほどの大きさを持つ形状は、「中片部が小さい」という範疇に入れられた単ミトコンドリア型の特徴には合致しない。Fig. 1E に示した横断像から、巨大なミトコンドリアは、鞭毛の軸糸構造の C 軸に対して片側にのみ発達して鞭毛を取り巻いていた。また、縦断像ではミトコンドリアは鞭毛に接していることが観察された。前記した単ミトコンドリア型精子の特徴は、マイワシに近縁な *Anchoa guineensis* においても認められている (Mattei, 1991)。しかし、*A. guineensis* の精子は 1 個のリング状ミ

Table 1. Movement characteristics of spermatozoa of *Sardinops melanostictus* and *Anguilla anguilla*

Species	Progressive speed (μm/s)	Beat frequency (Hz)	Amplitude (μm)	Wave length (μm)
<i>Sardinops melanostictus</i>	221.9	66.7	3.1	76.5
<i>Anguilla anguilla</i> *	134	93	5.0	—

* Data from Gibbons et al. (1985).

トコンドリアを持っている点ではマイワシと共に通しているものの、頭部の形状が、マイワシでは水平方向に膨らんだ球形であるのに対し、*A. guineensis* では垂直方向に伸びた楕円球である点が異なっていた。しかし、中心小体は、これら 2 種類ともに、頭部に深く陷入して位置しており、*A. guineensis* では頭部の 2/3 の深さに存在している点が特徴的であった。なお、Mattei et al. (1981) がニシン目の 3 属 (*Sardinella*, *Ethmalosa*, *Anchoa*) で観察したダブルレット微小管における A 小管内の特化構造は、マイワシでも同様に認められた。

マイワシ精子の特徴としては、先ず巨大な 1 個の球形ミトコンドリアを持つことが上げられ、特にその内膜がよく発達し、内部を縦走するクリスタ、ミトコンドリア小管、ミトコンドリア小胞が観察される点において、構造が非常に特化していることが注目された。

魚類精子の運動特性の定量的な解析については、ただ 1 例大西洋ウナギに関する Gibbons et al. (1985) の報告があるのみである。今回得られたマイワシ精子の運動特性値をウナギと比較すると Table 1 のようになる。

この表からは、マイワシ精子がウナギに比べ前進速度が速いことが分かる。マイワシ精子の運動持続時間は、これまでに観察した数種の海産魚類と比較して、より長い可能性が示された（原、未発表）。黒倉（1992）は中片部面積と運動時間との間に正の相関があることを指摘しているが、このことは、精子の運動エネルギーを供給するミトコンドリアが非常に大きく、装置の内部構造に複雑なクリスタの発達を示すマイワシ精子の形態から、エネルギーの生産量を可視的に捕らえる可能性を示唆するものとして興味深い。おそらく、マイワシ精子における時計まわりの回転円運動から、直進運動への変更などの運動パターンの複雑な組み合わせは、複雑なクリステを持つ巨大なミトコンドリアによって、はじめて可能な適応的性状なのであろう。しかし、今回のマイワシは、ホルモン処理した親魚の精子を測定しているため、今後は

天然産マイワシについても検討をする必要があろう。

謝 辞

この研究を行うにあたり、実験魚の入手に多大の御協力を賜った、水産庁養殖研究所白石 学博士並びに東京大学海洋研究所東 伸行博士に厚く御礼申し上げる。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励研究 B（課題番号 06921001）によった。

引 用 文 献

- Gibbons, B. H., I. R. Gibbons and B. Baccetti. 1983. Structure and motility of the 9+0 flagellum of eel spermatozoa. *J. Submicroscop. Cytol.*, 15: 15–20.
- Gibbons B. H., B. Baccetti and I. R. Gibbons. 1985. Live and reactivated motility in the 9+0 flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Motil.*, 5: 333–350.
- 石島純夫. 1992. 精子の運動測定法. 毛利秀雄監修. 森沢正昭・星 元紀編. 精子学, pp. 212–222. 東京大学出版会, 東京.
- Jamieson, B. G. M. 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 319 pp.
- 黒田一紀. 1991. マイワシの初期生活期を中心とする再生産過程に関する研究. 中央水研研報, (3): 25–278.
- 黒倉 寿. 1992. 精子の凍結保存—魚類. 毛利秀雄監修. 森沢正昭・星 元紀編. 精子学, pp. 238–246. 東京大学出版会, 東京.
- Matsuura, S., M. Matsuyama, T. Otsuka, K. Takeshita, T. Mitani and N. Ogawa. 1991. Histological maturity scales, maturation and spawning in Kyushu-subpopulation sardine, *Sardinops melanostictus*. Pages 221–228 in T. Kawasaki, S. Tanaka, Y. Toba and A. Taniguchi, eds. Long-term variability of pelagic fish populations and their environment. Pergamon Press, Oxford.
- Mattei, C., X. Mattei, B. Marchand and R. Billard. 1981. Reinvestigation de la structure des flagelles spermatiques: cas particulier des spermatozoïdes à mitochondrie annulaire. *J. Ultrastr. Res.*, 74: 307–312.
- Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implication in fishes. *Can. J. Zool.*, 69: 3038–3055.