

学 位 論 文 題 名

海産カジカ科魚類に見られる体内配偶子会合型の
繁殖様式に関する生理学的、微細構造学的研究

学位論文内容の要旨

カジカ科魚類は温帯から寒帯にかけての淡水域から深海域まで広く分布する底生性魚類で、日本では九州中部以北の沿岸域に110種余りが生息し、各地で沿岸漁業の対象となっている。カジカ科魚類についての生殖生理学的知見はこれまで極めて乏しく、僅かに数種で体内受精の繁殖様式をとる可能性が示唆されているにすぎない。しかし最近、交尾を行うニジカジカ (*Alcichthys alcicornis*) で、卵巣内では配偶子の会合のみが起き、受精は卵が海水中に放出されてから開始されることが明らかにされた。このような繁殖様式は体内配偶子会合型とよばれ、これまで体内受精を行うと考えられてきたカジカ類の多くがこの繁殖様式をとると示唆されている。本研究では繁殖生態が比較的良好に知られているニジカジカを主対象として、卵巣構造、卵巣内での雌雄配偶子の状態、配偶子会合環境である卵巣腔液の生理的特性、および雌雄配偶子の生理的特性と受精に伴う微細構造的変化などを詳細に調べ、他のカジカ類についての知見と併せて、海産カジカ科魚類の体内配偶子会合型の繁殖様式の成立機構と受精機構について論究した。

ニジカジカの卵巣腔は、結合組織を隔てる基底膜上に単層に配列する卵巣薄板上皮細胞と卵巣壁上皮細胞で覆われていた。これらの上皮細胞はその形態的特徴から外分泌細胞として機能することが明らかとなった。また、その分泌形態には開口分泌とミクロアポクリン分泌の2態が認められ、これらの分泌物は卵巣腔液の成分となるものと推定された。この分泌活性は産卵期（4月）に最も高く、退縮期（5～6月）にはやや低下し、回復期（7～3月）には僅かに開口分泌活動を見せるのみとなった。

産卵期には、交尾によって送り込まれた精子が卵巣腔内に浮遊した状態で貯留されていた。西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）をトレーサーとして調べた結果、卵巣腔を覆う上皮細胞間の閉鎖帯結合が血管から卵巣腔への HRP の透過を阻止することが確認された。この閉鎖帯結合は卵巣腔内の精子を免疫系から隔絶する血液卵巣腔関門として機能していると推定された。真卵生種のスジアイナメ (*Hexagrammos octogrammus*) の産卵期の卵巣にも同様な閉鎖帯結合

が存在しており、この構造が魚類の卵巣に共通したものであることを示唆した。退縮期の卵巣腔には退行状態を示す精子と、退行精子に由来するとみられる構造物を含む多数のマクロファージが存在しており、マクロファージが残留精子を取り込み除去するとみられた。また退縮期には血液卵巣腔閥門が消失しており、この現象が退縮期における精子の退行と消失に関与している可能性が示唆された。

卵巣内で配偶子会合を終えた卵では、精子は卵門管内に進入し卵原形質突起に頭部を密着させているのみで、卵原形質への陥入や膜融合を起こしてはいなかった。このような卵を海水に移すと、10秒後には精子頭部のほぼ中央部までが卵原形質中に陥入し、頭部先端付近の精子膜と卵原形質膜は数か所で胞状化を開始していた。精子頭部の膜と卵原形質膜の融合は30秒後までには完了していた。陥入した精子の尾部は微小管を失って均質な構造を呈した。1～2分後には精子の頭部と中片部が卵原形質中に埋没した。精子陥入の進行に伴い、卵原形質中にはリボゾームのみを集積した領域が精子頭部を中心にデルタ状に形成された。3分後には精子陥入は終了し、核膜が精子頭部先端付近から胞状化を起こし消失するとともに、核染色質が粒子状を呈して拡散した。以上の観察結果から、受精の初期過程における精子と卵の微細構造的変化の詳細が明らかとなり、精子陥入に伴う卵原形質の動態および精子尾部の変化についての新たな知見が得られた。

ニジカジカの卵巣腔液では pH が 7.7、浸透圧が 347 mOsm であり、おもな組成陽イオンのうち Na^+ が 190 mM でその大部分を占めていた。これらの値は既知の魚類卵巣腔液のそれと変らなかった。しかし、 Ca^{2+} 濃度は 0.41 mM で、スジアイナメの卵巣腔液の 1.61 mM と比較して著しく低いことが注目された。

ニジカジカの精子は NaCl 溶液では 300 mOsm 以上の浸透圧で運動活性を見せ、特に体液と等張な 300～400 mOsm で最も高い活性を示した。 KCl 溶液中でも運動活性を見せたが、その活性は NaCl 溶液中でよりも低く、マニトール溶液中では全く運動活性を示さなかった。各種類の陽イオンのうち Na^+ が精子運動に最も効果的に作用すること、および pH については 7.5 以上で高い運動活性が得られることが確認された。pH およびイオン組成を卵巣腔液のそれと等しくした人工卵巣腔液中では精子は 7～14 日間運動を続けた。従って、本種の卵巣腔液は pH および無機塩類組成のみに関しても精子の運動の場として極めて適していることが明らかとなった。さらに、交尾により卵巣内に送り込まれた精子は、産卵期間を通じて連続的に運動する可能性が示された。

ベロ (*Bero elegans*) の精子運動も Na^+ に依存し、運動活性は NaCl 溶液では 300 mOsm で最も高く、700 mOsm 以上の浸透圧条件では運動活性をみせなかった。アサヒアナハゼ (*Pseudoblennius cottioides*) の精子運動は特定のイオンには依存せず、体液と等張な浸透圧条件でのみ

運動活性を示した。イソバテング (*Blepsias cirrhosus*) の精子運動もイオン依存性をみせず、300～1000mOsm の浸透圧条件で比較的高い運動活性を示したが、海水中では活性をみせなかった。このような魚種により異なる精子運動の特性は、それぞれの種の繁殖習性と密接な関連を持つものと推定された。

卵巣腔液中で受精をみせなかった卵は、数段階に希釈した海水および平衡塩類溶液 (b.s.s.) 中では、卵巣腔液と等張な浸透圧下でも受精を起こした。しかし希釈 Ca^{2+} 欠如 b.s.s. 中では全く受精を起こさなかった。さらに卵は Ca^{2+} 濃度が 0.57mM 以下では全く受精を起こさなかった。従って、卵巣内での受精は、卵巣腔液の低い Ca^{2+} 濃度 (0.41mM) によって抑制されていると判断された。配偶子会合を終えた卵をカルシウム透過担体で処理すると、人工卵巣腔液中でも卵の付活は起きたが受精は起きなかった。また、カルシウムチャンネル阻害剤で処理しても海水中での受精は阻害されなかった。従って、受精開始の引き金となる要因は卵内への Ca^{2+} の透過ではなく、卵外の Ca^{2+} 濃度の上昇であると判断された。

配偶子会合前の卵をレクチンの一種 Con A で処理すると受精が阻害された。また、Con A は卵原形質表面に特異的に結合した。従って、Con A が卵原形質表面糖鎖に結合するとにより受精が阻害されたと推定され、この糖鎖、および受精開始に必要とされる Ca^{2+} が卵による精子の認識に関係する要因である可能性が示唆された。

本研究により、これまで困難とされてきた魚卵の受精初期過程の経時的变化の詳細が初めて明らかにされた。また、ニジカジカがカジカ類の祖先種が持っていたと考えられる基本的な生理的特性を保持したまま体内配偶子会合型の繁殖様式を成立させていると推定し、カジカ科魚類における繁殖様式の多型化の過程について考察した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 裕 哉

副 査 教 授 山 崎 文 雄

副 査 助 教 授 山 内 皓 平

沿岸漁業の重要な対象となる魚種を多く含むカジカ科魚類については、数種が体内受精の繁殖様式をとると報告されているが、その繁殖生理の詳細は殆ど知られていない。申請者は、従来体

内受精種とされてきたニジカジカ (*Alcichthys alcicornis*) において、卵巣腔に排卵された卵は交尾により卵巣腔内に入った精子を卵門内に受け入れるが、産卵により海水に接するまでは膜融合などの受精変化をみせないという特殊な繁殖様式を見出し、それを体内配偶子会合型と名付けた。本研究はこの体内配偶子会合および海水中での受精の成立要件を卵巣の構造的特徴、配偶子会合の場たる卵巣腔液の機能的特性、配偶子の生理的性質などの解析によって明らかにしようとしたもので、審査委員一同が特に高く評価した研究内容は以下のように要約される。

まず、ニジカジカの卵巣の微細構造的観察から、卵巣が精子貯留のための特殊構造の特化をみせず精子は卵巣腔液に浮遊した状態にあることを明らかにし、さらに電顕酵素組織化学的方法により産卵期の卵巣腔上皮細胞間に閉鎖帯結合を主体とした関門（血液卵巣腔関門）が明確に存在することを実証した。同様な関門は真卵生種のスジアイナメの卵巣にも存在したが、申請者はこの関門が体内配偶子会合型では精子を母体の免疫系から遮断して、その卵巣腔内での長期間の生存を可能にする機能を果たすと推定している。

申請者はまた、ニジカジカの卵巣腔を囲む上皮細胞が産卵期に活発な外分泌活動を営むことを電顕的に確認し、その合成分泌物が卵巣腔液の成分の一部となると判断した。この知見を基に卵巣腔液の電解質組成などを分析して真卵生魚種のそれと比較し、ニジカジカの卵巣腔液のイオン組成は後者のそれと類似するが、特に Ca^{2+} 濃度が相対的に著しく低い (0.41mM) という特徴を持つことを明らかにした。また、ニジカジカの卵が Ca^{2+} 濃度 0.57mM 以下では受精反応を全くみせないことを確かめ、それが卵巣腔液の低 Ca^{2+} 濃度に起因するものであって、産卵に伴う卵外の Ca^{2+} 濃度の上昇が受精を可能とする要因であることを実験的に立証した。

さらに、pH、浸透圧、およびイオン組成を卵巣腔液と同じくして調製した人工卵巣腔液中で精子が14日間にもわたって運動を継続することを確認し、ニジカジカの精子運動が高い Na^+ 依存性をみせ、海水中でもその運動が発現されるが、卵巣腔液はその物理化学的性状の上から精子の運動の場として最適の条件を備えていると結論し、交尾により卵巣腔内に入った精子が産卵期間を通じて運動を持続する可能性を示唆している。これは魚類生殖生理上きわめて興味ある事柄である。さらに4種のカジカ類の精子の運動発現条件を比較し、ニジカジカがアサヒアナハゼなどに比較して体内配偶子会合型としての特化度が低いこと、また繁殖様式が解明されていないベロとイソパテングが、それらの精子の生理的性質からみて体内配偶子会合型とみられることを指摘している。

これらの諸知見に基づいて、申請者は体内配偶子会合型を卵生と胎生との中間的な段階として把握し、その特化の過程についての推論を展開としている。その論述の根拠とされている点には

若干の問題があるが、申請者の今後の研究の指針を示したものと判断された。

申請者はさらに、精子との体内会合後海水に接して初めて受精反応を開始するというニジカジカの卵の特性に着目して、配偶子間の膜融合に始まる受精反応を電顕によって経時的に追い、陥入精子を内部に引き込む運動をみせると推定される特殊な部位が卵原形質表層に分化すること、陥入精子の尾部が鞭毛としての構造特徴を失うことなど、魚卵の受精現象に関する貴重な新知見を提示し、同種の卵が受精の初期過程の解析に好適な材料であることを力説している。

以上のように、本研究の内容はカジカ類の体内配偶子会合型とよばれる繁殖様式を多方面が追求して魚類生殖生物学に貴重な知見を提供したものであり、同分野での今後の研究の進展に資するところが大きい。よって審査委員一同は本研究が博士（水産学）の学位を授与するに十分な内容を持つと判定した。