

学 位 論 文 題 名

ヨコスジカジカ *Hemilepidotus gilberti* の繁殖生態  
と異型生殖細胞に関する機能形態学的研究

学位論文内容の要旨

動物には、精子形成過程で精子とは大きさや形態が異なる生殖細胞（異型生殖細胞； aberrant sperm）を、精子と並行して形成する種が存在する。このような現象を精子の多型性と呼び、無脊椎動物から脊椎動物まで広くみられる。異型生殖細胞は、減数分裂時に核や細胞質が不均等に分裂し、一部の細胞が無核、貧核あるいは多核化して生じる。こうした異型生殖細胞は、一種の奇形とみなされることが多く、それらが生態学的にどのような意味を持つのかについては殆ど知られていない。

魚類においては、カジカ上科魚類（以下カジカ類）の13種から異型生殖細胞が観察されている。本研究では、異型生殖細胞を形成するヨコスジカジカ *Hemilepidotus gilberti* を用いて、異型生殖細胞の形成過程を微細構造レベルを含む精巢の組織観察から明らかにするとともに、繁殖行動の観察および精子の運動特性など受精生理学的実験をもとに、異型生殖細胞機能を明らかにした。

【異型生殖細胞の形成過程】

南北海道太平洋岸の南茅部沖で採集した個体をもとに、本種の生殖周期を明らかにした。その過程において、精巢内にヘマトキシレン好染性の円盤状の細胞（直径5～7 $\mu$ m、厚さ2～3 $\mu$ m）が成熟とともに出現した。そして繁殖期（10～11月）には、全ての包囊は精子と円盤状の細胞が混在した状態となった。さらに、精子変態過程の微細構造観察を行ったところ、通常の精母細胞は、細胞質中に中心子や軸糸構造が出現する精細胞初期、核

内でクロマチン濃縮が開始する精細胞中期、およびクロマチンの濃縮が進行する精子完成に至る精細胞後期を経て精子完成に至った。しかし、精細胞以降の包囊には、細胞質に富むが尾部がなく、クロマチンが高密度に濃縮した核を複数個有する円形の多核細胞（直径5~7 $\mu\text{m}$ ）も多数観察された。それらは、細胞間橋で精子と連絡していることから、減数分裂時に細胞質が不均等に分裂して生じたものと考えられた。そして、これらの細胞が異型生殖細胞であり、多核化しているため、光顕下ではヘマトキシレンに濃染して観察されたと考えられた。

精母細胞以降の生殖細胞では、しばしば層版状構造を持つ細胞間橋が多数観察された。一般に層版状構造は、器官の分化・形成の初期段階で出現し、細胞分裂の進行を制御する働きをするとされることから、これらが異型生殖細胞の形成に関与すると考えられた。

#### 【ヨコスジカジカの繁殖行動】

水槽内で繁殖行動を観察した。本種の産卵は、雄の求愛を受け入れた雌が雄のなわばり内で産卵し、なわばり雄が放精したのち、他の雄による盗み放精が続くという形態であった。卵は粘性の高い卵巢腔液とともに20~50分を要して基質上に産み出された。卵巢腔液は約2時間後には海水と溶解し、完全に消失するが、産卵中は終始卵を取り巻いていた。産卵途中に、なわばり雄は放精を数回繰り返し、最初と2回目の放精（産卵開始からそれぞれ約6分と11分後）までは、なわばり内に侵入する雄を激しく排除した。しかし、2回目の放精を終えると、ガードは次第に緩和し、盗み放精を許した（同；約15分後）。

#### 【ヨコスジカジカの受精環境】

繁殖行動の観察では、いずれの放精も卵巢腔液が消失する前に行われた。そこで、卵巢腔液の役割に注目し、精子の運動活性などの調査からヨコスジカジカの受精環境を調べた。本種の精子は輸精管から取り出した時から既に運動を開始していた。浸透圧の異なる試験溶液中では、電解質、非電解質を問わず卵巢腔液と海水の中間に相当する400~800mOsmで最も高い運動活性を

示した。また、卵巢腔液中での運動活性は海水中よりも高く、プレパラート上では約90分、密閉容器内では1週間以上運動が確認された。

体内および体外における人工媒精実験の結果、本種の卵は卵巢腔液中で受精可能であった。また、未受精卵を海水中に20分以上浸した後に媒精しても受精可能であったことから、長時間の産卵と間欠的な放精に対し、卵巢腔液は体外で卵を自然付活から保護する働きがあることが分かった。これらの結果から、精子は卵巢腔液と海水との境界面で活発に運動し、卵巢腔液の層を通過して卵と到達すると考えられた。

### 【異型生殖細胞の機能】

行動観察および精子活性などの実験結果に基づき、異型生殖細胞の機能の解明を試みた。はじめに、放精の際、異型生殖細胞が精液の卵塊への輸送にどのような影響を及ぼすかを調べた。精液中の異型生殖細胞、精子および精漿を遠心分離し、各成分の容積比を調べ、精液を構成する細胞が、異型生殖細胞のみ、精子のみ、および両者が原精液と同じ割合で混在する試験精液を作製した。それにコントロールとして原精液を加えた4試液について水槽内で射出実験を行い、各試液の到達距離を測定した。

その結果、精子のみの場合に比べ、異型生殖細胞を含む全試液で到達距離が伸長した。しかし、異型生殖細胞は精子と同じ生殖細胞由来である。そのため、異型生殖細胞が形成されることによって、全てが精子となった場合に比べ、精液中の精子量が減少すると考えられる。そこで、精液の到達距離の伸長によって精子輸送にもたらす効果を、放精時の雄と卵塊との距離および卵塊の大きさを考慮して試算した結果、精液中に異型生殖細胞を含むことで、精子のみの場合に比べて精液中の精子量は少いにも関わらず、卵塊に到達する精子量は逆に多くなることが示唆された。これらの結果から、異型生殖細胞には、放精の際、精子をより多く卵塊へ輸送させる効果を持つことが示された。

次に、卵塊に到達した異型生殖細胞が、盗み放精によって他個体から出された精子に対してどのような影響を及ぼすかを調べた。海水、卵巢腔液およびそれら2液を各々1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1に混合した溶液中で異型生殖細胞の運動を観察した。その結果、異型生殖細胞には運動性はないが、

海水中や海水と卵巣腔液を4:1に混合した溶液中では、精子の活発な運動により移動し、互いに接着し合って細胞塊を形成することが分かった。異型生殖細胞の移動は、卵巣腔液中あるいは卵巣腔液を多く含む高粘性の混合液中ではみられなかった。

そこで、プレパラート上に卵塊表面の環境（海水と卵巣腔液の境界面）を再現し、そこに精液を射出し、精子と異型生殖細胞の挙動を観察した。その結果、精液が卵塊表面に到達すると、精子は卵巣腔液中に侵入し、すぐさま拡散するが、異型生殖細胞は侵入できず卵塊表面に堆積し、射出後5~10分には境界面に広く細胞塊を形成した。盗み放精を想定して、他個体から採取し個体識別のため蛍光染色した精子を、細胞塊形成中の海水と卵巣腔液の混合液（4:1）に滴下すると、それらは細胞塊に取り込まれた。細胞塊によって取り込まれる精子量に個体差はみられなかったが、一旦取り込まれた精子は再び細胞塊の外に出ることはなかった。このことから、異型生殖細胞は卵塊表面で形成される細胞塊の中核となることによって、盗み放精由来の精子が卵巣腔液の層に侵入し、卵に到達することを物理的に阻害することが示された。

これらの結果から、ヨコスジカジカにおける異型生殖細胞の排出は、精子形成過程で生じた奇形細胞の処理ではなく、精子の輸送および父性の確保に有効なものであると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 健 二

副 査 教 授 小 城 春 男

副 査 助 教 授 桜 井 憲 泰

副 査 助 教 授 上 田 宏

## 学 位 論 文 題 名

### ヨコスジカジカ *Hemilepidotus gilberti* の繁殖生態 と異型生殖細胞に関する機能形態学的研究

動物には、精子のほかに、それとは大きさや形態が異なる異型化した生殖細胞（異型生殖細胞；atypical sperm）を形成する種が存在する。このような現象を精子の多型性と呼び、無脊椎動物から魚類を含む脊椎動物まで幅広い動物群でみられる。これまで異型生殖細胞は奇形とみなされ、それらが形成される生態学的意味は不明であった。本研究では、異型生殖細胞を形成するヨコスジカジカ *Hemilepidotus gilberti* を用いて、その形成過程を明らかにし、繁殖生理学および行動生態学的な調査を基に、異型生殖細胞の機能を明らかにした。

微細構造レベルを含む精巣の組織観察などから、異型生殖細胞は精子と同じ生殖細胞起源であり、減数分裂時に一部の精母細胞が不均等に分裂して生じること、さらに、それらは射出精液中の約50%の容積を占めることが分かった。

水槽内で繁殖行動を観察した。本種の産卵は、雌が雄のなわばり内で産卵し、なわばり雄が放精したのち、他の雄が盗み放精を行うという形態であった。産卵中、卵は終始粘性の高い卵巣腔液に取り巻かれ、数十分を要して基質上に産み出された。なわばり雄は、産卵中、放精を数回繰り返す、最初と2回目の放精（産卵開始から約6分と11分後）までは、他の雄を厳しく警戒したが、2回目の放精以降、ガードが次第に緩和し、盗み放精を許した（同；約15分後）。

卵巣腔液の役割に注目し、本種の受精環境を調べた。精子の運動活性を調べたところ、卵巣腔液中で極めて高い活性を示し、海水中の6倍近くに達した。また、体内外での人工媒精実験の結果、本種の卵は卵巣腔液中で受精可能であった。これらの結果から、精子は卵巣腔液と海水との境界面で活発に運動し、卵巣腔液の層を通過して卵に到達すると考えられた。

以上の結果に基づき、異型生殖細胞の機能を明らかにした。はじめに、放精の際に、異型生殖細胞が及ぼす精液の卵塊への輸送への影響を調べた。精液中の異型生殖細胞、精子および精漿を遠心分離し、各成分の容積比を調べ、精液を構成する細胞が、異型生殖細胞のみ、精子のみ、および両者が原精液と同じ割合で混在する試験精液を作製した。それに原精液を加えた4試液について水槽内で射出実験を行い、各試液の到達距離を測定した。

その結果、精子のみの場合に比べ、異型生殖細胞を含む全試液で到達距離が伸長した。しかし、異型生殖細胞は精子と同じ生殖細胞由来であるため、異型生殖細胞形成によって、全てが精子となった場合に比べ、精液中の精子量は減少する。そこで、精液の到達距離の伸長による精子輸送への効果を、放精時の雄と卵塊との距離および卵塊の大きさを考慮し試算した結果、精液中に異型生殖細胞を含むことで、精子のみの場合に比べて精液中の精子量は少いにも関わらず、卵塊に到達する精子量は逆に多くなることが示唆された。このことから異型生殖細胞には、放精の際、精子をより多く卵塊へ輸送させる効果を持つことが示された。

次に、卵塊に到達した異型生殖細胞の、盗み放精によって他個体から出された精子の運動に及ぼす影響を調べた。海水、卵巢腔液およびそれら2液を各々1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1に混合した溶液中で異型生殖細胞の運動を観察した。その結果、異型生殖細胞には運動性はないが、それらは海水中や海水と卵巢腔液を4:1に混合した溶液中で、精子の活発な運動により移動し、接着し合って細胞塊を形成した。一方、卵巢腔液や卵巢腔液を多く含む高粘性の混合液中では異型生殖細胞は移動しなかった。

そこで、プレパラート上に卵塊表面の環境（海水と卵巢腔液の境界面）を再現し、そこに精液を射出し、精子と異型生殖細胞の挙動を観察した。その結果、精液が卵塊表面に到達すると、精子は卵巢腔液中に侵入し、すぐさま拡散するが、異型生殖細胞は卵塊表面に堆積し、射出後5~10分には境界面に細胞塊を形成した。盗み放精を想定し、他個体から採取し個体識別のため蛍光染色した精子を、細胞塊形成中の海水と卵巢腔液の混合液（4:1）に滴下すると、それらは細胞塊に取り込まれた。細胞塊によって取り込まれる精子量に個体差はなかったが、一旦取り込まれた精子は再び細胞塊の外に出ることはなかった。このことから、異型生殖細胞は卵塊表面で形成される細胞塊の中核となることで、盗み放精雄由来の精子が卵巢腔液の層に侵入し、卵に到達することを物理的に阻害することが示された。

このように、ヨコスジカジカにおける異型生殖細胞の排出は、精子形成過程で生じた奇形細胞の処理ではなく、精子の輸送および父性の確保に有効なことが示された。

以上の研究成果は、精子の多型性が生態学的に適応的であることを示した初の実証例として高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。