

イカナゴ配偶子の微細構造と機能的特性

原 政子

〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学海洋研究所

(2002年8月26日受付；2002年12月26日改訂；2003年1月7日受理)

キーワード：イカナゴ卵，精子，微細構造，付着形態

魚類学雑誌
Japanese Journal of Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2003

Masako Hara. 2003. Fine structures and functional characteristics of the gamete of the Japanese sand lance, *Ammodytes personatus*. *Japan. J. Ichthyol.*, 50(1): 35–45.

Abstract The unfertilized egg of *Ammodytes personatus* was small spherical and has the adhesive membrane developed from the zona radiata externa covering entire surface. This membrane is composed of the adhesive projection of cylindrical structures of many filaments and basement layer with regular arrangement of small holes. The adhesive membrane of the fertilized egg showed tongue-like structure transformed from adhesive filament. When attached to substrates, the tips of the adhesive filament are subjected to adhesive types of transformation. The spermatozoon was about 25 µm in total length, which comprised the asymmetrically elongated nucleus with the hiatus near the top, a single small mitochondrion and a single flagellum. The mitochondrion was located at the posterior side of the elongated nucleus, abutting the flagellum. The flagellum showed the typical 9+2 structure and was remarkably swollen. The A-tubules of doublets 1, 2, 5 and 6 contained a dense substance. The sperm showed a progressive speed of 85.5 µm/sec. In seawater, the spermatozoa usually maintained a circular motion for 20 sec. Morphological and/or motility characteristics of gametes are discussed in relation to the functional aspects which are probably associated with the unique mode of spawning of this species.

Ocean Research Institute, The University of Tokyo, 1-15-1, Minamidai, Nakano, Tokyo 164-8639, Japan (e-mail: mhara@ori.u-tokyo.ac.jp)

イカナゴ *Ammodytes personatus* は沖縄を除く日本周辺に広く分布する沿岸性の重要な魚種である。漁獲量の年変動が大きいために北海道沿岸（元田・田中, 1950）、瀬戸内海（井上, 1949; 宮村・杉野, 1959; 浜田, 1966a; 1966b; 1971; 1972; 井上ほか, 1967; 糸川, 1981）、伊勢湾（山田ほか, 1999; 2000）、東北沿岸（児玉, 1980; 山下, 1983）等の各地で本種の再生産機構に関する研究が活発に行われてきた。その結果、繁殖の基礎となる産卵生態に関する知見として、本種の卵は粘着性の弱い沈性卵であり（井上, 1949; 井上ほか, 1967），天然においては二次的に浮遊する可能性もあること（千田, 1965）などが明らかにされたが、卵の分布域は未だ確認されてい

ない。一方精子についての知見は極めて少なく、僅かに完成した精子の微細構造（Hara and Okiyama, 1998）と運動の特徴（Ishijima et al., 1998）が簡単に報告されているにすぎない。

本研究ではイカナゴ精子の微細構造と運動能、卵については卵膜の表面構造を中心とした微細構造と付着形態の知見が得られたので報告する。

材料と方法

標本の採集 1992年12月、1993年1月と12月に、愛知県知多半島の沖合で漁獲した雌雄の成熟個体と、2001年1月に伊勢湾付近で採集した雌の成熟個体を本研究に用いた。生きている個体から精巣、精液、卵巣内の未受精卵を採取した。未受

精卵と比較するための受精卵としては、シャーレの中に雌の腹部を押して卵を採取し、その上に精液を絞り出した後に、海水を張って30分経過したものを固定して使用した。卵の粘着機構を観察するために、シャーレに砂を敷いたうえに海水を張った。そこに雌の腹を押すことによって絞り出された卵を入れ、その後砂に付着した卵を取り出した。これらの卵および精子の標本を下記の方法によって電子顕微鏡用試料に供するとともに、一部の精液を用いて Ishijima et al. (1998) に従って精子の運動を観察した。

卵の微細構造の名称は原則として高野 (1989) に従ったが、一部の本種に特異な構造については、基底層 (basement layer), 粘着突起 (adhesive projection) 等の新しい用語を用いた。

精巣の細切片、未受精卵、受精卵の透過型電子顕微鏡試料 前固定は0.1Mカコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で調整した0.5%パラフォルムアルデヒド、2%グルタ-ルアルデヒドの混合液中において、4°Cで1晩行った。その後0.1Mカコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で液を数回交換して洗浄し、この緩衝液中に4°Cで1晩浸漬した。後固定は0.1Mカコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で調整した1%四酸化オスミウムの混合液で、2時間室温で行った。脱水は、50%, 70%, 80%, 90%, 95%エタノール系列で5分間ずつ各2回と99%エタノールに15分間ずつ2回浸漬した後、酸化プロピレンとエポン812の等量混合液中で1晩浸漬して行った。翌日ローターを使用して5時間エポン812を浸透させた後、新しいエポン812に包埋して60°Cの恒温器で2晩重合させた。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超薄切片を作製した。切片は室温で5%酢酸ウラン水溶液15分間と0.1%クエン酸鉛水溶液5分間の二重染色を施し、JEM-100CX (日本電子社製) 透過型電子顕微鏡で観察した。

精子、未受精卵、受精卵、砂粒に付着した卵の走査型電子顕微鏡試料 精液は上記の前固定液を用いて室温で2時間固定した。2500 rpmで15分間遠沈を行い、上清みの固定液を捨てた後に0.1Mカコジル酸緩衝液10 mlを加えて精子を再懸濁させて洗浄し、再度遠沈して上清みを捨て、0.1Mカコジル酸緩衝液10 mlを加えて再懸濁させた。カバーガラスの小片をエタノールで洗浄し、片面に0.1%ポリ-L-リジン水溶液を滴下して5分間静置後、0.1Mカコジル酸緩衝液で表面を洗った。このカバーガラス上に精子の懸濁液を1滴のせて15分間静置してガラス面に精子を付着させ、50%, 70%,

80%, 90%, 95%エタノール系列で各3分間1回づつと99%エタノールで3分間2回浸漬して脱水した。さらに、酢酸イソアミルを通して、液化二酸化炭素で臨界点乾燥後、試料台に木工用ボンドを用いてカバーガラスを張り付け、白金パラジウムを蒸着して走査型電子顕微鏡 (日立製作所製 S-4500) で精子を観察した。

未受精卵、受精卵および砂に粘着させた卵は、上記の透過型電子顕微鏡試料作製法の脱水までと同じ手順で処理した。その後酢酸イソアミルを通して液化二酸化炭素で臨界点乾燥後、試料台にカーボンテープを用いて載物し、上記と同じ手順で蒸着、観察を行った。

精子の運動測定 精巣内からピペットで精液を採取し、スライドガラス上に精液と海水を一滴ずつのせ、その上にカバーガラスをかぶせて海水中に泳ぎ出す精子を、位相差顕微鏡を用いて観察した。運動の様子を顕微鏡に接続したハイスピード・ビデオ装置 MHS-200 (Nac 社製) で撮影した。それらの結果から精子個体の運動時間、前進速度を計測した。

結 果

卵の形態

未受精卵 卵巣内から採取した未受精卵は、卵径約0.5 mmの球形で、動物極に深いロート状の窪みを持っていた (Fig. 1-1)。その底部には直径約2 μmの卵門が開口していた (Fig. 1-1, -2)。卵門管の内壁は螺旋状を呈し、卵の表面から内部に向かって管径は徐々に細くなっていた (Fig. 1-1, -2)。卵の表面には卵膜を貫く卵膜孔管が規則的に穿たれていた (Fig. 1-5)。卵門の位置した窪みの周縁から植物極にいたる卵の表面は、粘着膜に覆われていた (Fig. 1-1, -3)。この粘着膜は、直径約2 μmの円形の穴が規則的に穿たれた基底層と、穴の上に直立した多数の微細な纖維が集合して形成された筒状の粘着突起の2層で構成され (Fig. 1-5)、突起の表面は細かく凸凹していた (Fig. 1-4)。

透過型電子顕微鏡で観察すると、卵の表層原形質を厚さ約12 μmの卵膜が取り囲んでいた (Fig. 1-6)。卵膜は明瞭な内外2層構造を呈していた (Fig. 1-6)。外層は薄く電子密度が高いのに対し、内層は複雑に入り組んだ纖維状の構造が交互に重なる層板構造で、電子密度は外層よりも低くかった (Fig. 1-6)。卵膜の外縁に位置する粘着膜は約5 μmの厚さで、基底層は電子密度が低くかった (Fig. 1-

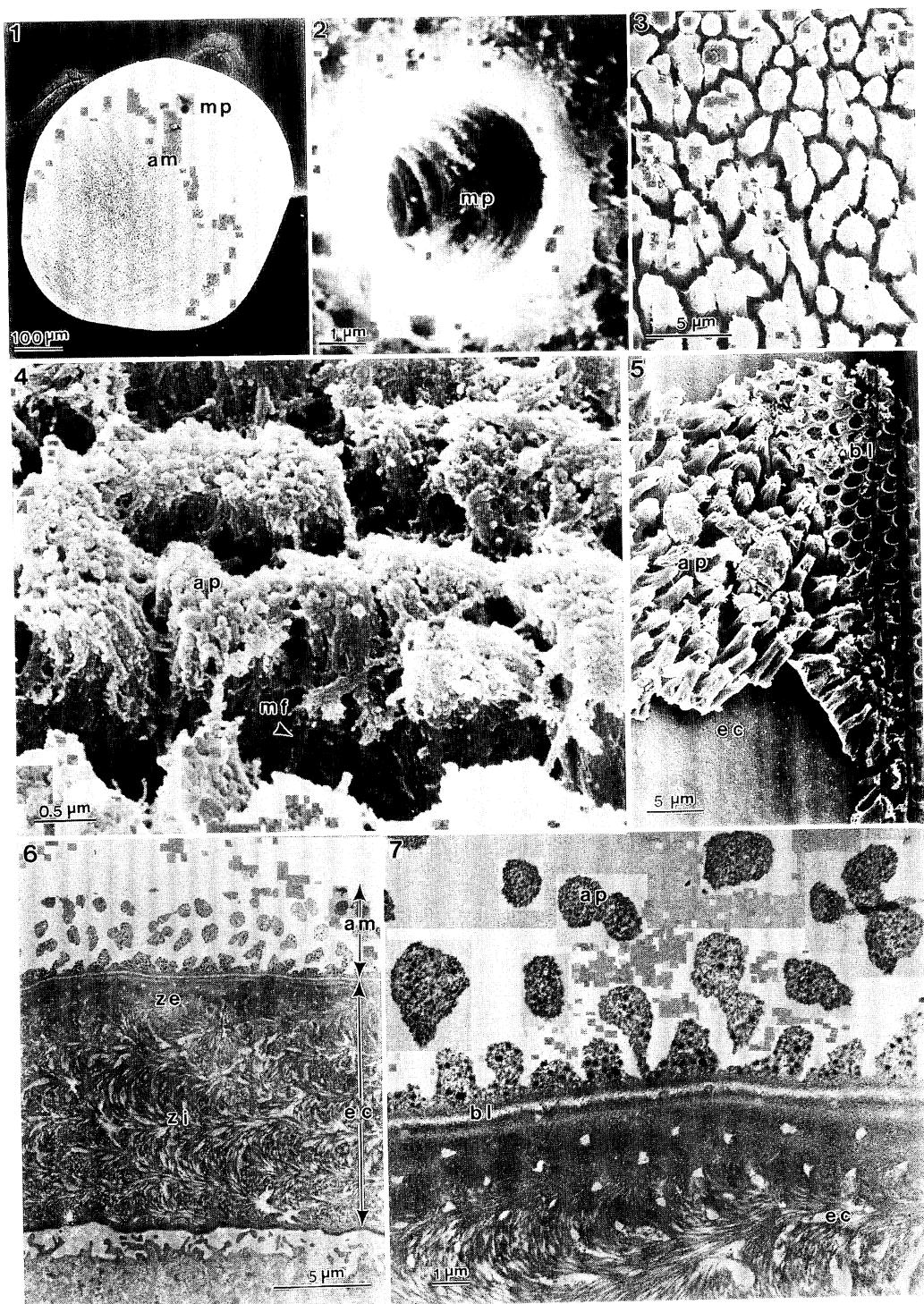


Fig. 1. SEM and TEM of unfertilized eggs of *Ammodytes personatus*. am: adhesive membrane, ap: adhesive projection, bl: basement layer, mf: microfilament, ec: egg chorion, mp: micropyle, ze: zona radiata externa, zi: zona radiata interna. 1. SEM of egg with the adhesive membrane covering entire surface. 2. SEM of the micropyle showing its outer edge and spiraling canal. 3. High magnification SEM of egg surface. 4. High magnification SEM of adhesive membrane on egg. Note the microfilament constituting the adhesive membrane. 5. SEM of the adhesive projections of cylinder-like structures showing many filaments perpendicular on regular hole. 6. TEM of the cross section of egg membrane. The zona radiata consists of two layers such as a zona radiata externa with adhesive membrane. The adhesive membrane consists of low density basement layer and middle density adhesive projection. The adhesive projection contains large granules densely located at the basal parts. 7. High magnification TEM of the cross section of egg chorion and adhesive membrane. The adhesive membrane consists of low density basement layer and middle density adhesive projection. The adhesive projection contains large granules densely located at the basal parts.

7). 粘着突起は電子密度が中程度の大小さまざまな顆粒が塊状を呈した構造で (Fig. 1-6, -7), その中に電子密度が高い顆粒が基底層に接して多く分布していた (Fig. 1-7).

受精卵 受精卵は、卵径が約 0.7 mm で、動物極がやや隆起した球形を呈していた (Fig. 2-1a). その極の中心に浅い窪みが位置し、その底部に縁取りのある卵門が開口していた (Fig. 2-1a, b). 卵門管は未受精卵と同様に、表面から内部に向かって細くなっているが、内壁に凹凸が観察された (Fig. 2-1b). 受精卵の粘着膜は、未受精卵のものと異なりそれぞれの突起が崩壊・溶融して塊を形成した構造となり、突起が間隔を持って拡がる傾向を示した (Fig. 2-1a, -2).

透過型電子顕微鏡で観察すると、卵膜は厚さ約 7 μm と未受精卵に比べて薄い層板構造を呈していた。内層と外層の電子密度に明瞭な差はみられず、中程度を示していた (Fig. 2-3). 卵膜の外縁に位置する粘着膜の厚さは約 6 μm で未受精卵に比べてやや厚くなっていた。粘着突起の電子密度は中程度で、顆粒が互いに融合して不揃いな塊状を呈し、基底層に電子密度の高い顆粒が少し観察されるが、未受精卵の同じ部位と比べると数も大きさも減少していた (Fig. 2-3).

砂粒に付着した卵 砂粒に粘着後 1 分間を経過した卵は、砂粒と接触した面で粘着膜の粘着突起が、崩壊・溶融するのと同時に、霜柱状に伸長していた (Fig. 3-1). そして突起の先端部が粘膜を形成して基質に張り付いていた (Fig. 3-1, -2). これを詳細に観察すると、粘着膜を形成する無数の粘着突起は、砂の微妙な凸凹や傾斜面に対応して長さや傾きを変化させた構造を示していた (Fig. 3-1). 球形の卵は、砂粒に粘着すると無数の粘着突起が中心部から周辺方向に長さを増して接着面積を広げて変形していた。1 個の砂粒に複数の卵が粘着する例や、付着した卵の上にさらに卵が層状して粘着する例もみられた。また砂粒に粘着した後に脱落した卵は、粘着膜が剥ぎ取られて砂粒に残るため、卵の表面が凸凹を呈していた (Fig. 3-3). 一方、卵が脱落した砂粒には、粘着膜の一部が直径約 100 μm ~300 μm の不揃いな痕跡として残っていた (Fig. 3-4). 痕跡は砂粒の平坦な面だけでなく、急傾斜な面にも観察された。一部の卵は、複数箇所で粘着膜の突起を傾斜しながら伸長し、隣接する卵の粘着突起の先端部と溶融して卵塊を形成していた (Fig. 3-5, -6). 砂粒に付着した卵は、粘着突起の伸長や傾きのために粘着膜が変形して、卵

の外観が部分的に尖って球形ではなくなっていた (Fig. 3-2).

精子の形態と運動

完成した精子 外部形態：精子の全長は約 25 μm で、核は長さ 2 μm 、最大幅が 0.8 μm の楕円形で、先体はみとめられなかった。核の両側は、中心小体から伸長する鞭毛を中心にして左右の大きさを比べると、著しい差を生じた不相称な形態を示していた。核の全表面は不規則な凸凹を呈していた (Fig. 4-1). 中心小体の近位中心子が核の先端部に位置し、これとは左にずれて位置した遠位中心子から鞭毛が伸長していた。1 個のミトコンドリアは鞭毛の基部と核の側面に接して位置していた (Fig. 4-1).

内部形態：核の中央に円柱状の鞭毛陷入域が形成され、その最深部に位置した遠位中心子から鞭毛が伸長していたが、この断面では近位中心子は観察できなかった。核は鞭毛の両側で長さと大きさに著しい差があり、ミトコンドリアが位置する側が大きく、反対側は小さかった。核内の顆粒は全体が均一に濃縮して電子密度は高かった (Fig. 4-2a).

1 個のミトコンドリアは長さ 0.4 μm 、幅 0.3 μm の小さな卵円形で、大きい核の側と鞭毛に接していた (Fig. 4-2a). ミトコンドリアのクリステはさまざまな形の櫛状や小胞状に発達していた (Fig. 4-2a).

鞭毛の軸糸構造は一般的な 9+2 型であるが、1, 2, 5, 6 のダブレット微小管の A 小管内に、高密度物質が観察された (Fig. 4-2b).

精子形成過程 精子細胞の核は大きく、細胞質の大部分を占めていた。核内の顆粒は均一な点状であった。細胞質内に中心小体が出現すると、遠位中心子から鞭毛が細胞質の外に伸長していた。中心小体は核の先端方向に、鞭毛と細胞膜を引き込むように移動していた (Fig. 4-3a). 核の側面と遠位中心子が接する部位に窪みが形成され (Fig. 4-3b). ここが鞭毛基部の最終的な位置となり、近位中心子は遠位中心子よりも核側にずれて窪みの外に位置していた (Fig. 4-3b). 核は鞭毛の基部となる遠位中心子を核の窪みに引き込むように回転し (Fig. 4-3a), 遠位中心子を越えて回転が停止していた (Fig. 4-4). 核内の顆粒は点状から互いに融合した小塊状を呈し、核の回転に同調しながら小塊はさらに融合して大きな塊を形成して電子密度が高くなっていた。核内の顆粒の濃縮は基底部から始

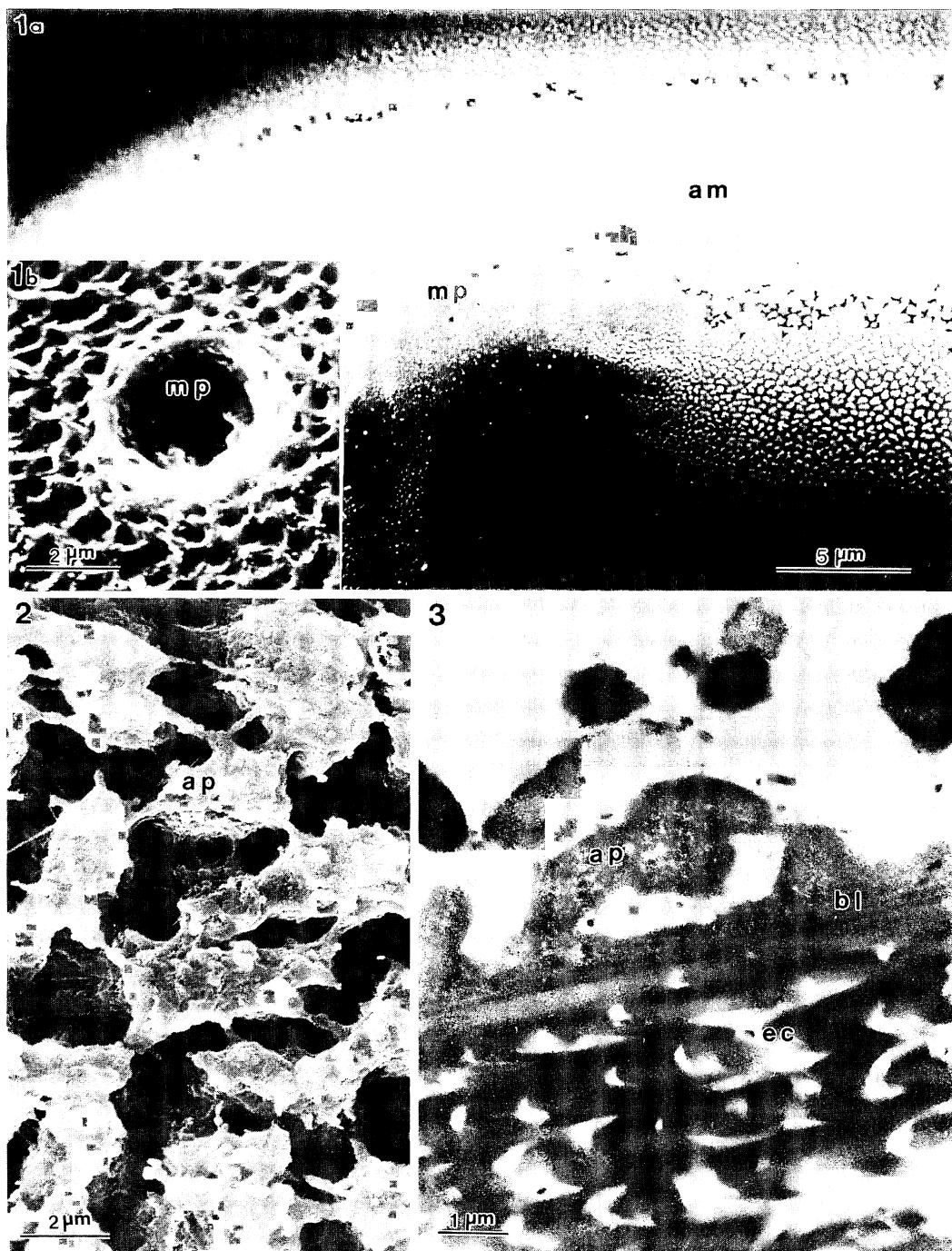


Fig. 2. SEM and TEM of fertilized eggs of *Ammodytes personatus*. am: adhesive membrane, ap: adhesive projection, bl: basement layer, ec: egg chorion, mp: micropyle. 1a. SEM of egg surface around slightly raised animal pole. Egg surface is completely covered with adhesive membrane except micropyle. 1b. High magnification SEM of the micropyle showing outer edge and spiraling canal. 2. High magnification SEM of adhesive membrane showing tongue-like structure transformed from adhesive filament. 3. High magnification TEM of egg membrane showing indistinct differentiation of densities between zona radiata externa and interna, and decrease of high density granules within adhesive membrane.