

## マガキガイ体内受精における異型精子の役割に関する研究

横屋稜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：稲葉 一男 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

生殖は生物が種を維持するのに必要なプロセスである。有性生殖において、精子は卵と結合し次世代を再生産する重要な役割を果たすが、生物によっては同一個体の精巣から形態が異なる2つの型の精子を作り出す。これを精子二型という。2種類の精子のうち一方は核を持ち、卵と受精する正型精子である。もう一つは核を持たず、卵と受精しない異型精子である<sup>1)</sup>。精子二型は巻貝などの腹足綱<sup>2)</sup>、ヤリイカ<sup>3)</sup>、硬骨魚類のカジカ<sup>4)</sup>、カイコなどの昆虫綱<sup>5)</sup>などに見られ、生物の生殖戦略として注目されてきた。しかし、異型精子の機能についてほとんど明らかになっていない。

本研究では浅海の砂地に生息するマガキガイ (*Conomurex luhuanus*) を用いて、異型精子の役割を明らかにすることを目的とした。先行研究により、マガキガイ異型精子に特異的に含まれるタンパク質 *parasperm 1* (PARAS1) が同定され、異型精子の顆粒体と正型精子頭部先端に局在することが明らかになっている<sup>6)</sup>。本研究では、異型精子の細胞質に存在する顆粒体構造の詳細、ならびに PARAS1 の局在と生理学的な役割について実験を進め、顆粒体内内容物の放出過程を明らかにした。

## 【材料】

静岡県下田市恵比寿島、及び沖縄県国頭郡本部町瀬底で採集したマガキガイの成熟雄個体を用いた。採集個体は、海水かけ流水槽で、海水温 24°C、12/12 時間の明暗周期で飼育した。

## 【実験方法】

## 間接蛍光抗体観察

人工海水 (ASW) で希釈した精子を poly-L-Lysin でコートしたカバーガラスに貼り付け、パラホルムアルデヒドで 10 分固定した。PBS で洗浄後、10% goat serum/PBS で室温 1 時間ブロッキングし、1/500 に希釈した 1 次抗体 (抗アセチル化チューブリン抗体及び抗 PARAS1 抗体) で室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1/1000 に希釈した二次抗体 (Alexa488 または Alexa555 で標識) で室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、DAPI で室温で 10 分核染色し、超解像顕微鏡 (ZEISS Elra7 with Lattice SIM) で観察した。

## 光学顕微鏡観察および運動解析

輸精管から採集した精子を ASW で希釈し、10、20 及び 60 倍の対物レンズを用いて位相差顕微鏡または微分干渉顕微鏡で観察した。運動及び顆粒体の放出は、高速カメラ (HAS220) により観察、撮影を行った。

## ウエスタンブロッティング

精子を ASW で希釈し、一定時間後に 15,000 rpm で 4°C、30 秒間遠心後、上清と沈殿を回収した。それぞれ SDS サンプルバッファーと混合し 95°C で 2 分加熱後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、タンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 PARAS1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。シグナルは ECL prime の

化学発光システムを用いて、イメージアナライザ LAS4000-mini で検知した。

## 透過電子顕微鏡 (TEM)

精巣及び輸精管精子を 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、Epon 樹脂に包埋後、ウルトラミクロトームを用いて厚さ 70 nm 超薄型切片を作成した。フォルムバール支持膜を貼った銅グリッドの上に載せ、4% 酢酸ウラニルとレイノルズ溶液で電子染色を行った後、透過電子顕微鏡 (JEM1200, JEOL) で観察した。

## 【結果】

## 顆粒体の形態と PARAS1 の局在

TEM による観察の結果、異型精子内の顆粒体は膜によって隔てられた小胞であることがわかった。いくつかの像では、エキソサイトーシスにより顆粒体内内容物が放出されている様子が観察された。また、顆粒体の膜付近に PARAS1 の強いシグナルが観察された。

## 海水への希釈により誘起される顆粒体の自律的崩壊

顆粒体のエキソサイトーシス過程についてさらに詳細に知るために、異型精子を ASW に希釈し、一定時間後の顆粒体の形態を観察した。その結果、異型精子を ASW に希釈したのみでエキソサイトーシスが誘起され、顆粒体が自律的に細胞外に内容物を放出することがわかった。また、希釈直後の異型精子ですでに少数の顆粒体がエキソサイトーシスを起こしていることがわかった。

一方、ウエスタンブロッティングから、顆粒体のエキソサイトーシスに伴い、細胞外に PARAS1 が放出、遊離され、遠心後の上清に回収されることが確認された。

## 【考察】

本研究により、異型精子を ASW に希釈しただけで顆粒体の内容物が自律的に細胞外に放出されることがわかった。輸精管内では顆粒体のエキソサイトーシスが抑制され、海水中のイオンなど何らかのトリガーによって自律的に引き起こされると考えられる。先行研究により、異型精子の内容物が雌の受精嚢内で放出されている像が確認されている<sup>6)</sup>。本研究から、この反応は雌由来の何らかの物質によって誘起されるのではなく、雌体内から異型精子が放出されたことが刺激となり、自律的に進行すると考えられる。エキソサイトーシスによって放出された PARAS1 の機能解明は、今後進めるべき重要な課題である。

## 【参考文献】

- Shibata et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 905748 (2022).
- 手塚 治, *奈良医学雑誌* Vol. 11, No. 5, p. 719-735 (1960).
- Iwata et al., *BMC Evol. Biol.* 11, 236 (2011).
- Hayakawa et al., *J Morphol.* 253, 243-254 (2002).
- Sakai et al., *PNAS.* 116, 10412-10417 (2019).
- 謝 沛然, 筑波大学生命環境科学研究科修士論文 (2017).