

# ムラサキイガイの受精, 特に精子の 尖体反応について<sup>1)</sup>

和田 清 治

## Fertilization of *Mytilus edulis*, with Special Reference to the Acrosome Reaction of the Spermatozoa

Seiji K. WADA

最近 DAN (1952, 1954) はウニ及ヒトデの精子が卵海水等の刺戟で尖体に著しい変化の起ることを報告している。団及著者は二枚貝の受精においても精子が之等と同様なしかもより一層明らかな反応(尖体反応)を起すことを見付けた<sup>2)</sup>。この事実はムラサキイガイを含めて 12 種類の二枚貝で観察され、その形態学的研究は近く団と共著の形で別報で発表する。この反応に共通な現象として尖体の完全な破壊、長い filament の突出、頭部(核)の変形、中片の輪郭の明瞭化、運動様式の変化等があげられる。受精における意義から言えば前の二つの現象が本質的なもので後の三つはこれらに附随して起る現象と考えられる。尖体反応が受精現象にどのような役割を持つかという事は受精機構の本質にふれる問題と考えられるので、それを明にする目的で行ったムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) の受精の研究結果を報告する。

最近 BERG (1950) は *M. edulis* 及 *M. californianus* の精子に卵膜を溶かす物質が含まれている事を報告しているが、私達はそれが精子の尖体に含まれている事をつきとめることができた。この事実に関しては近く著者、J. C. DAN 及 J. COLLIER 共著で発表する予定であるから、この報告では簡単にふれるだけに止める。

実験は 1954, 1955 年の冬東京大学三崎実験所で行った。実験室の使用を許された三崎実験所長富山一郎教授、実験中終始協力して下さいた Dr. J. C. DAN に厚く感謝する。

### 材料及方法

貝は三崎実験所附近の真珠養殖用筏のフロートに附着していたものを、岩田 (1950) の方法に従って電気刺戟で放卵放精させて用いた。三崎における産卵期は12月～3月であるが、刺戟すれば 10 月下旬既に熟した生殖素を放出させる事が出来る。雄は刺戟後通常 30～40分、雌は 50～90分 (15°C) で放出を始める。放出卵は殆ど 100 % 受精する。観察には Bausch & Lomb 位相差顕微鏡を用い、×97対物レンズ、油浸剤としてアニソールを使用した。媒精後10～15秒から後の受精過程の観察は生きた材料で行い、それより早い時期は中性フォルマリンで固定後直ちに検鏡した。

### 結 果

**卵の性状。** 卵は胚胞が壊れた状態で放出される。放出卵は球形乃至随円体形でその直

1) 東京大学理学部附属三崎臨海実験所業績

2) 1953年11月 日本水産学会, 1954年4月 日本動物学会, 5月名古屋大学臨海実験所 発生 シンポジウム にて発表

径は  $63\sim 69\mu$ , 薄い卵膜で包まれ, その内側に厚さ約  $1\mu$  の均一に見える層がある。FIELD (1923), CHIPPERFIELD (1953) はこの層をも卵膜と考えているが, 種々な事実から卵膜より原形質的な構造をもっていると考えられる。今便宜的に之を囲卵層と呼ぶ(HEILBRUNN, 1920; HILLIER et al, 1952 参照)。この層は単に液体によつて充されているのではなく或る種の構造を持つている事は, 卵を高調海水に入れた時細胞質が決して球形に縮少することがないので判る。卵膜と卵細胞質とを離す様な処置をするこの層(少くともその大部分)は卵膜に附着する。卵の表面には極めて細い模様が見られる。卵膜がとけ去つたと信ぜられる卵ではこの構造は稍不明瞭となる。卵の外側には厚さ約  $10\mu$  のジェリーがある。BERG (1950) はジェリーがないと述べているが, ジェリーを持たぬ卵も見られるけれども寧ろ例外というべきである。

**受精による卵表面の変化。** 精子は卵のどの部分から入ることが出来る。正常な受精は第1極体放出前に起り, CHIPPERFIELD (1953) のいう所と異つて第1極体放出後起るという事はない。受精すると卵はより球形となり, その原形質膜(囲卵層とその内部の細胞質との界面)は滑となつて囲卵層は稍広くなる。併しこの変化は徐々であつてウニ卵に見られる様な急速な著しい表層の可視的变化は見られない。又受精前後で卵膜の性質の変化を示す事実はない。精子の頭部のはいる時, 卵膜, 囲卵層, 原形質膜に顕微鏡で見られる様な変化は何等認められない場合も多いけれども, 原形質膜に頭部が近づくとその部分が少時凹む事も稀ならず観察された。又頭部のはいつた後に, MEVES (1915) が固定標本で観察した様に, 卵膜に約  $3\mu$  位の孔があきこの縁の部分で卵膜が稍外側に曲ることも屢々見られた。併し精子のはいる前後に原形質膜の膨出する事は一度も観察されなかつた。

卵を未受精の儘長く放置する様な方法でその条件を稍悪くして精子が長く(2,3分)卵膜面に附着している場合頭に接した部分の卵膜が膨れてくるのが見られる。これは精子の附着(尖体反応)によつて卵膜が弱くなつたためと考えられる。

**精子の性状及尖体反応。** 精子の頭部は大きく尖体, 中片をも含めると長さ約  $7\mu$  巾  $2.5\mu$  で, 殊に尖体は他の二枚貝の精子に比べて極めて大きくその長さは頭部全長の半以上を占め, その尖端は稍膨れる。尖体の基部には輪状の他の部分と光学的に区別される構造がある。又中央には細い棒状(管?)のものがあきこの中に filament の尖端部が藏せられていると信ぜられる。これに続いて核の部分の中心にも棒状の構造(axostyle)が見られる。中片は頭の後部に接して規則正しく並んだ5個の小球として存在する(第1図, A)。

尖体反応を起すと尖体は通常跡方なく破壊し去り, この部分に長さ  $12\mu$  に及ぶ filament が突出する。頭(核)も前端部が稍巾広くなり, 中片の輪郭は明瞭となつて尾の運動鈍もくなる。(第1図, B)。

尖体反応は種々の物理的, 化学的刺戟で惹き起される。卵との接触, 卵海水の添加,  $\text{Ca}^{++}$  の添加, 硝子面との接触, 遠心分離等は夫々かなりの率で反応を起す。放出させた場合には全く反応をした者のない状態で精子懸濁液を得る事は寧ろ難しい。カキ, シオフキの場合には卵海水の添加のみでは反応せず接触という事が必要な条件であるが, イガイの場合には卵海水の刺戟のみでも反応を起す。 $\text{Ca}$  欠除海水中では卵と接触しても反応を起さない。この事は  $\text{Ca}$  欠除海水中で受精の起らぬ理由と考えられる。

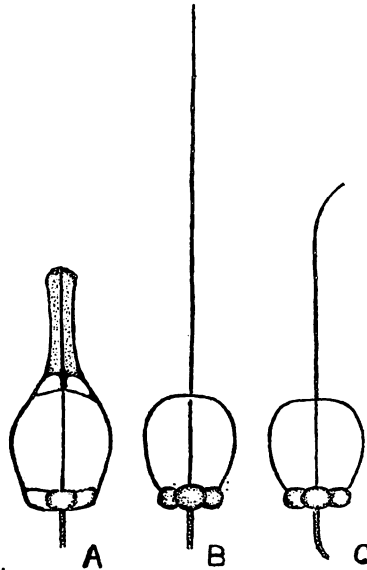


Figure 1. *Mytilus* spermatozoa.  $\times$ ca. 5000

A, discharged; B, reacted (intact); C, expelled (supernumerary).

Distal part of the acrosome filament of expelled sperm is readily flexible, less rigid than that of reacted, intact sperm.

**受精する精子の行動。** 卵に精子を加えて観察すると精子は卵膜面で反応して卵に密着する。精子の頭部が完全に卵膜内に没するまでに正常の場合  $20^{\circ}\text{C}$  で平均 90 秒  $15^{\circ}\text{C}$  で平均 3 分 20 秒を要する。頭部のはいる間尾は活潑な運動をすることなく緩かに左右に振られるか殆ど静止している。頭部がはいって数秒後短い間激しい運動をする。尾は 7～8 分 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) で卵内に引き込まれる。

精子を低調海水 (25～40%) で処理すると頭部に急激な変化は見られないが尾は直ちに損はれる。卵を通常海水中で媒精後直ちに 30 % 海水に移し 10 秒後通常海水に戻すと受精は正常に起り発生をする。この事から精子が卵にはいるのは尾の推進力によるのでない事が判る。之と同様な事はカキの精子でも観察される (和田, 1954)。

**尖体物質の卵膜溶解作用。** 濃い精子懸濁液に卵海水或は等調の  $\text{CaCl}_2$  溶液 (5～20%) を加え、尖体反応を起させて之を遠心分離しその上澄液に卵を浸すと卵膜が容易に溶け去るのが観察される。尖体反応を起さない精子懸濁液の上澄液にはこの溶解作用は見られない。尖体反応を起した精子を凍結して抽出した液ではこの作用は著しく減ずる。卵に直接濃い元気な精子をかけた場合にも容易に卵膜が溶け去る。之等の事実から精子の尖体部には卵膜を溶かす物質が含まれ、之が尖体反応によつて自由になると結論出来る。この物質はジェリーを溶かさない。この物質を含んだ海水のジェリーのある卵と酸性海水でジェリーを取除いた卵に対する作用を比較すると後者の場合の方が膜が早く溶ける。これは有効物質の拡散がジェリーによつてある程度制えられたためと考えられる。

有効物質の濃度の濃い場合には卵膜のみならず囲卵層も溶け去る。この過程において

(恐らく囲卵層がある程度溶された時) 卵の周囲に無数の細い毛状の突起が見られる。この事から囲卵層の構造が示唆される。

**余分な精子の行動。** 卵に精子を加えて5~10秒(15°C)以内に固定して観察すると多くの反応をした精子が頭の先端部で卵膜に密着しているのが見られる。又こわれかかった精子の尖体の先が卵膜に達しているのが見られる。媒精後15秒を経過したものでは大部分の精子は卵から4~6 $\mu$ 離れており、この時精子の頭と卵の間には filament が明らかに見られる。附着した精子が離れて行く過程は生きた状態でも観察することが出来る。多くの場合15~20秒後には受精する精子を除いて余分な精子は皆離れて了う。これらの事実は精子は卵膜に接触して反応を起し、精子の刺戟によつて卵内に生じた変化によつて余分な精子が離れる事を示すと考えられる。

4~6 $\mu$ 離れた精子は間もなく卵から泳ぎ去つて行く。この様な精子を見ると尖体 filament は卵海水等で反応したものに比べて著しく短く、且その先端は曲り軟化された様に見える(第1図C)。

受精卵に加精した時も精子は全く同様な行動を示し、多くの精子が一旦卵に密着する。又特に早く離れるという事はない。

媒精後直ちに30%海水に浸して精子の尾は損ねても遊離現象は起る。又離れて行く間尾の運動は見られない。即ち精子の運動によつて離れるのではない。又卵膜溶解物質で卵膜及囲卵層を溶かした卵でも正常の場合と全く同様に受精をし余分な精子は離れて行く。この事から卵膜及囲卵層とは無関係な現象であると考えられる。卵を40°Cに5分間熱して冷却後媒精すると受精も起り余分な精子も離れて行くが(併し分裂はしない)、45°Cに5分間熱すると精子は卵に接触して反応とするけれども受精も起らず遊離する精子もない。受精卵を同様に加温して再媒精した場合も精子は長く附着した状態で留まる。之等の事実から余分な精子が離れるのは囲卵層より内部の細胞質の作用によると考えられる。

卵を潰して海水でよく洗うと細胞質の抜けた卵膜と囲卵層からなる袋状のものが得られる。これに精子をかけると精子は正常卵の場合と同様に卵膜面で反応を起して密着する。尖体 filament は極めて細いので厚さ約1 $\mu$ の囲卵層の存在はその状態の観察を極めて困難にするけれども、卵膜、囲卵層を突き抜けて内部に伸びている事が観察される。受精卵を潰して袋を作つた場合も同様である。この事実と卵海水等で反応させた時尖体の破壊したものには必ず filament の見られること及卵から離れた余分な精子と卵の間にも又必ず filament が見られることと併せ考えると正常卵に媒精した時受精する精子及余分な精子の filament は反応と同時に卵内に突きさゝると考えられる。

**受精に対するゼリー層の役割。** 尖体反応が受精に不可欠であるとすれば外囲海水中で反応して了つた精子は受精能力を失うことも考えられる。精子懸濁液に卵海水を加えると殆どの精子が反応を起す場合もある。この様な精子を用いた実験の1例を第1表に示す。対照に比較して受精率が著しく減ずる。又  $\text{Ca}^{++}$  を加えて反応を起させた精子でも同様に受精能力の低下するのが見られた。併し尖体部が変化すると同時に運動が鈍くなるのでこの両者を切離して分析することは難しい。

卵海水中には当然ゼリー物質が溶解していると考えられる。尖体反応が一つの生理学的反応である事及卵海水によつて尖体反応が誘起される事から、実際の受精において精子

Table 1. Fertilizing capacity of reacted sperm.

Relative concentration of the sperm	1	2	4	8
Reacted sperm	0	1	1.5	2.5
Control	44	85	90	94

The figures represent the percentage of development. Majority of the spermatozoa underwent acrosome reaction on addition of egg-sea water. Addition of egg water was made 15 minutes before use (16°C).

Table 2. Increase in fertilizing capacity of *Mytilus* sperm by a short exposure to egg-sea water.

Exposure time to egg-sea water before fertilization	Relative concentration of sperm		
	1	2	4
30 sec. Exposed	83	77	85
Control	10.5	20	50
60 sec. Exposed	13	33	59
Control	17	11.5	63

The figures represent the percentage of development. Temp., 18.5°C.

がジェリー層を通過する時にその興奮性がたかまつて卵膜に達した時容易に反応を起す様になると当然推論される。精子懸濁液に卵海水を加えて直ちに受精させると卵海水を加えない精子より受精率はよくなる(第2表)。この実験では精子の濃度を充分薄め対照において100%の受精率を与えない様にして行つた。精子のある%のものは器壁、水面に附着して反応し実際の濃度を計算値より小さくするけれども、この傾向は卵海水を加えた時の方が著しく上述の結果を損うものではない。

## 論 議

精子の尖体に卵膜を溶かす物質が含まれ、受精の際尖体の破壊によつて卵膜面でこの物質が自由となる事実は当然この物質が精子の卵に入るのに役立つと考えられる。若し後述する様に尖体 filament を通じて卵の精子を引込む力が働くとすれば、精子のはいるのには卵膜をある程度弱めれば充分で、すっかり溶解する必要はないと考えられる。

精子が卵膜上で反応した時 filament が卵内につきささるという直接の証拠はないが、前章に述べた種々の事実から然と推定される。多くの動物で精子のはいるのは尾の推進力によるのではないと信ぜられている(WILSON, 1925 p. 414)。とすれば卵の方にその力を求めねばならぬ。尖体物質で卵膜を溶解したイガイ卵の受精の場合精子が附着してからその頭が原形質膜下に没するまでの時間は2分15秒～2分45秒(15°C, 5回の観察, 平均2分36秒)であり、同一 batch の卵精子を用いた通常の受精の時精子の頭が卵膜下に

没するまでの時間は3分10秒～3分40秒(15°C, 5回の観察, 平均3分21秒)であつて, 前者の方が稍短く, 少くとも長くはない。又卵膜, 囲卵層のみの袋に精子が反応してもその頭がはいる事は決してない。之等の事實は卵の精子を引込む力は囲卵層より内部の機構による事を示すと考えられる。受精の初期にあつては精子と卵細胞質との物理的連絡は filament によつてのみなされているのであるから, filament を通じて卵の力が精子に及ぶものと考えられる。この事は又受精卵内に精子の filament を引き込む力を生ずる系の存在する事を示す。

これと同様な事はヒトデ (*Asterias amurensis*) の受精について更にはつきり示される。ヒトデの卵には厚さ約  $20\mu$  の固いジェリーがある。DAN (1954) によると精子は尖体反応によつて長さ約  $25\mu$  の filament を出す。そして受精の時はジェリーの外側面で反応を起し, filament によつて卵と連絡する。即卵と精子の頭との距離は約  $20\mu$  であり, 精子が卵に近づくのは filament を通じて卵の力が及ぶと考えざるを得ない。

余分な精子が卵に附着後間もなく離れる現象も, 前章に記した実験結果から卵の力によると推定されるが, これは所謂 polyspermy block の形態学的なあらわれの一つと考えられる。Polyspermy block の問題は既に長い間論議されている事柄であるが, 余分な精子の行動は殆ど注意されなかつた。筆者はカキ及シオフキの彼等の行動を簡単に発表した(和田, 1954), イガイでも之等と同様な機構によつて余分な精子が排斥されるものと思われる。余分な精子の場合にも精子と卵原形質とは filament によつてのみ連絡されているから, 卵内に生じた力が filament を通じて精子に及ぶものと考えられ, (受精する) 精子の刺戟によつて filament を押出す様な力学的系が卵原形質内に生ずるものと推定される。

シオフキ, バカガイ, サルノカシラ等では余分な精子が第2段の遊離現象としてジェリーの外層まで押出されるがイガイでは通常この様な現象は見られない。恐らくイガイでは第1段の遊離で精子の頭が相当距離離れて了うためと考えられる。

余分な精子が押出される現象は受精する精子の頭が未だ卵膜上にある時に見られる。即ち polyspermy block は尖体物質の作用か filament の刺戟によつて或はその両者によつて形成されるものと考えられる。尖体物質を含む海水に少時間卵を浸すと, 卵は活性化され極体を放出するに至るが, 卵膜囲卵層が溶け去るまで浸したもののでも精子は正常の場合と同様にはいり受精率の低下する事なく, 且余分な精子は排斥され多精卵の増加する様な事は見られない。この事から polyspermy block の形成には尖体 filament の刺戟が不可欠のものと考えられる。

余分な精子も卵膜面で反応し filament も一旦卵内につきささるという事は之等の精子も卵に何等かの影響を与え得る事を示す。精子の濃度と受精率との関係に関する諸事実もこの点から説明を得られるであろう。

## 結 論

精子は卵膜に接触して尖体反応を起し尖体は破壊し filament は卵内につきささる。尖体には卵膜を溶かす物質が含まれ, この物質の作用と卵原形質内に存在する力学的系によつて filament を通じて力が働き受精する精子は卵内に引き込まれる。精子 filament の

刺戟によつて卵原形質内に別の力学的系が形成され余分な精子の filament を押出すことによつて余分な精子が排斥される。卵をとりまくジェリーは精子の興奮性をたかめるに役立つと考えられる。

### Résumé

Spawned-out gametes were used throughout the experiments. The observation was made under a phase-contrast microscope.

Sperm of *Mytilus edulis* undergo acrosome reaction by various stimuli, e.g., contact with eggs or glass surface, addition of egg-sea water, etc. Main morphological changes involved in the reaction are the complete breakdown of the acrosome and the protrusion of a long ( $12\mu$ ) filament in its place (Figure 1, A, B).

In case of fertilization, the sperm react in the acrosomal region when they come into actual contact with the vitelline membrane. It was found that a substance which dissolves the vitelline membrane is released by the breakdown of the acrosome. The filament, though not detected as such, is believed to extend into the egg cytoplasm. A penetrating filament can be observed in case the sperm react on the "vitelline membrane and perivitelline layer preparation" which is obtained by rupture of the (fertilized or unfertilized) egg.

Sperm entrance proceeds normally when the tail of fertilizing sperm is markedly harmed by a short exposure to hypotonic (30%) sea water immediately after attachment. It is postulated that the fertilizing spermatozoon is passively drawn into the egg with the aid of the filament by a certain dynamical system operating in the egg.

The supernumerary spermatozoa also react at the egg surface, the filament likewise penetrating through the egg cortex. In 10-15 seconds after the attachment of the sperm head to the vitelline membrane, the spermatozoa are detached by  $4-6\mu$ ; the filament is clearly visible between the egg and the detached spermatozoa. The detachment does not occur in killed eggs. In a rather dense solution of acrosome substances, not only the vitelline membrane but the perivitelline layer are dissolved away. In such naked eggs, entrance and detachment of sperm occur normally. It may be postulated that the detachment of the supernumerary sperm is also executed with the aid of the acrosome filament by a force produced in the egg protoplasm. The detachment is regarded as a morphological representation of the block to polyspermy. A dynamical system is activated in the egg by a stimulus of (fertilizing) sperm. The penetration of the acrosome filament is indispensable for the full establishment of the block to polyspermy.

Sperm which have undergone the acrosome reaction before contact with

eggs lose their fertilizing capacity (Table 1).

The egg has a jelly-hull about  $10\ \mu$  in the thickness. The jelly is supposed to increase the irritability of spermatozoa, to react on the vitelline membrane and thus facilitates fertilization. (Table 2).

(Received March 20, 1955)

文 献

- Berg, W. 1950 Biol. Bull., **98**, 128.  
Chipperfield, P. N. J. 1953 J. Mar. Biol. Assoc., **32**, 449.  
Dan, J. C. 1952 Biol. Bull., **103**, 54.  
Dan, J. C. 1954 Biol. Bull., **107**, 203.  
Field, I. 1924 Bull. U. S. Bureau Fish., **38**, 127.  
Heilbrunn, L. V. 1920 Biol. Bull., **38**, 317.  
Hillier, J., A. I. Lansing and T. B. Rosenthal. 1952 Biol. Bull., **103**, 293.  
岩田清二 1950 日水会報, **15**, 443.  
Meves, F. 1915 Arch. mikro. Anat., **78**, Abt. 2, 47.  
和田清治 1954 動雑, **63**, 442.  
Wilson, E. B. 1925 The cell in development and heredity. 3rd ed. New York.