

クラゲ卵における極体形成および精子付着・融合過程のビデオ撮影

*出口 竜作・**荒川 美緒・**金 洋太・**小野寺麻由

石森 彩希・*並河 洋

Video recordings of polar body formation and sperm adhesion/fusion processes in jellyfish oocytes and eggs

DEGUCHI Ryusaku, ARAKAWA Mio, KON Yota, ONODERA Mayu,
ISHIMORI Saki and NAMIKAWA Hiroshi

要 旨

クラゲを含む刺胞動物の卵では、第二極体形成後に、動物極に限定された精子の付着・融合が起こる。本研究では、タマクラゲの卵母細胞の極体形成、およびタマクラゲとエダアシクラゲの卵への精子付着・融合の過程を、顕微鏡に装着したビデオカメラを用いて連続的に記録し、解析を行った。その結果、タマクラゲの極体形成過程では、第一極体のほうが第二極体よりも大きいこと、第一極体と第二極体は互いに近傍な位置に形成されるものの、両者の形成場所は完全には一致しないこと、第一極体が分裂する場合としない場合があること、などが分かった。また、タマクラゲとエダアシクラゲの卵に媒精した後の過程については、精子の付着・融合が動物極の周辺（エダアシクラゲでは、特に雌性前核の周縁部）で起こること、最初に付着した精子が融合に至り、その後の精子は融合できないこと、融合の際に精子が横向きになること、精子の融合に伴って卵が変形すること、などが見出された。今回得られた映像は、クラゲの卵成熟や受精過程を研究する上での基礎データとしてだけでなく、教育現場で使用する教材としても利用価値があると考えている。

Key words : 刺胞動物 Cnidarian
ヒドロ虫 Hydrozoan
クラゲ Medusa
卵 Egg
精子 Sperm
卵成熟 Oocyte maturation
受精 Fertilization

1 はじめに

クラゲやイソギンチャクを含む刺胞動物は、多細胞

動物の進化過程において早期に分岐した動物群であり、放射相称を基本とした単純な体制を備えている。

クラゲの多くは、ライフサイクルの中に浮遊性のクラ

* 宮城教育大学理科教育講座
** 宮城教育大学大学院理科教育専修
*** 宮城教育大学理科教育専攻
**** 国立科学博物館動物研究部

ゲ世代と付着性のポリプ世代の2つを持ち、一般的にクラゲ世代の間に有性生殖を行う。一方、イソギンチャクはポリプ世代のみをもち、有性生殖が行われるのもポリプ世代となる。

刺胞動物の有性生殖も、他の「高等な」多細胞動物と同様に、メスが放出した卵とオスが放出した精子が接合して受精卵となる、いわゆる受精の過程を経る。クラゲの受精過程では、1) 未受精卵による精子の誘引、2) 卵の動物極に限定された精子の付着・融合、3) 受精卵における精子誘引の停止、4) 卵内での雌性前核と雄性前核の合一、などの現象が短時間のうちに連続して起こるが、本研究は、2) の精子の付着・融合を対象として行った。クラゲの卵が雌性前核の局在する動物極付近でのみ精子を受容することは、今から約60年前にカミクラゲで初めて報告された (Dan, 1950)。その後、*Orthopyxis* において精子受容過程が詳しく観察され、第二極体を形成した後に卵は初めて精子を受容すること、精子受容部位には多くの精子が付着するが、受精後には融合できなかつた精子が卵から離脱すること、などが報告された (Miller, 1978)。Freeman and Miller (1982) は、複数のクラゲの卵で同様の精子受容過程を確認した上で、極体が形成された卵表層部を予めマーキングしておいた後、遠心分離により雌性前核を人工的に遠ざけるといふ実験を行い、精子受容は極体形成部位で起こり、雌性前核の存在には依存しないことを示した。さらに、Freeman (1987) による巧妙な実験の結果、現在では、第一極体と第二極体と同じ場所で形成された結果、動物極の卵表層に精子受容部位が形成されると考えられている。また、電子顕微鏡での観察により、動物極の精子受容部位は微絨毛 (microvilli) を欠いていること、この場所 (microvilli-free area: MVFA) に実際に精子が付着・融合することなどが見出されている (Yamashita, 1987; 出口・伊藤, 2005)。

本研究では、クラゲ卵における動物極に限定された精子受容メカニズムを解明するための基礎データの取得を目的に、顕微鏡に装着したビデオカメラで極体形成や精子付着・融合の過程を連続的に記録し、その解析を行った。また、制作した動画を、研究面のみならず、教育面でも活用していく方策について考察した。

2 材料

本研究では、刺胞動物門ヒドロ虫綱に属する2種のクラゲータマクラゲ (*Cytaeis uchidae*) (図1 A) とエダアシクラゲ (*Cladonema pacificum*) (図1 B) を材料として使用した。この2種では、フィールドでの採集方法や研究室での飼育方法が確立されており、1年間を通して成熟したクラゲを得ることができる (出口ら, 2002; 出口・伊藤, 2005; Deguchi et al., 2005)。タマクラゲでは、暗状態から明状態への移行 (明刺激) により放卵・放精を誘起できることが分かっている (出口ら, 2002)。今回は、研究室で長期にわたって維持している系統 (メス: ♀17, オス: A7とA8) を使用した。一方、エダアシクラゲには、明刺激が放卵・放精の引き金となる明タイプと、逆に明状態から暗状態への移行 (暗刺激) が引き金となる暗タイプが存在する (出口ら, 2008)。今回は、山形県鶴岡市で採集された個体の交配により得られたF₁ 個体 (明タイプ・メス) と、青森県むつ市で採集された個体の交配により得られたF₁ 個体 (明タイプ・オス) を用いた。タマクラゲやエダアシクラゲの飼育および実験は、インキュベーター内や室内の温度を20~23℃に調節して行った。

3 極体形成過程の記録

タマクラゲでは、明刺激から40~45分後に放卵が起こること、放出されてきた卵は2個または3個の極体を保持していることが報告されている (Takeda et al., 2006)。まず、透過照明の付いた実体顕微鏡 (SMZ745, Nikon) を用いて、メス個体から放出されてきた卵に付いている極体の個数を調べた。その結果、極体の個数は実験日や個体ごとに多少のばらつきがあるものの、全体としては、約70%の卵が2個の極体を、約20%の卵が3個の極体を有していることが分かった (図2 A)。次に、倒立顕微鏡 (TE300, Nikon) に一眼レフカメラ (D5000, Nikon) を装着し、60倍の対物レンズを用いて極体を撮影した後、同様に撮影した対物マイクロメーターの目盛りからその直径を算出した。その結果、極体の大きさも卵ごとにばらついているものの、2個および3個の極体を持つ場合を比較すると、最大の極体の直径が9 μm以上となるのは極

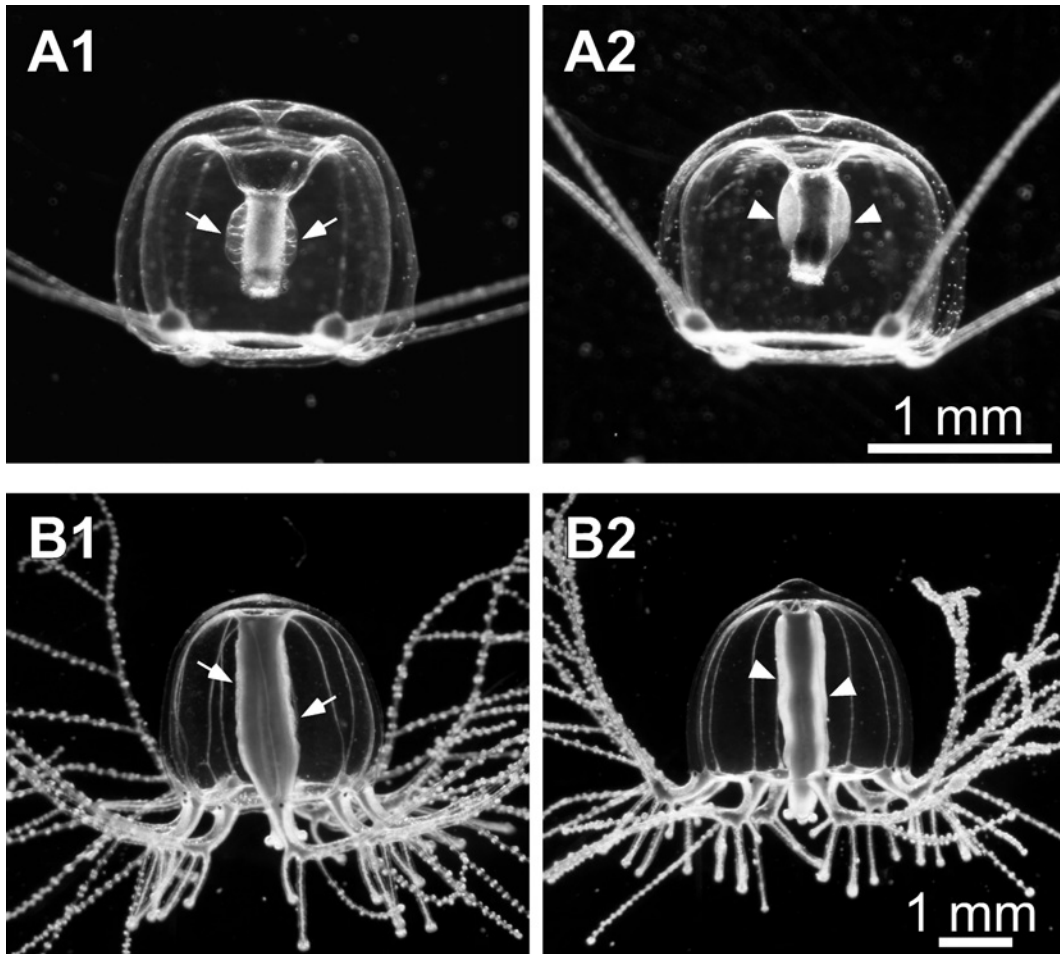


図1 タマクラゲとエダアシクラゲの成熟個体。タマクラゲのメス個体 (A 1) とオス個体 (A 2)、エダアシクラゲのメス個体 (B 1) とオス個体 (B 2) を、530 mM の $MgCl_2$ 水溶液と海水を 1 : 1 に混合した溶液中に入れて麻酔し、横方向から撮影した。矢印は卵巣の領域を、矢じりは精巣の領域を示している。

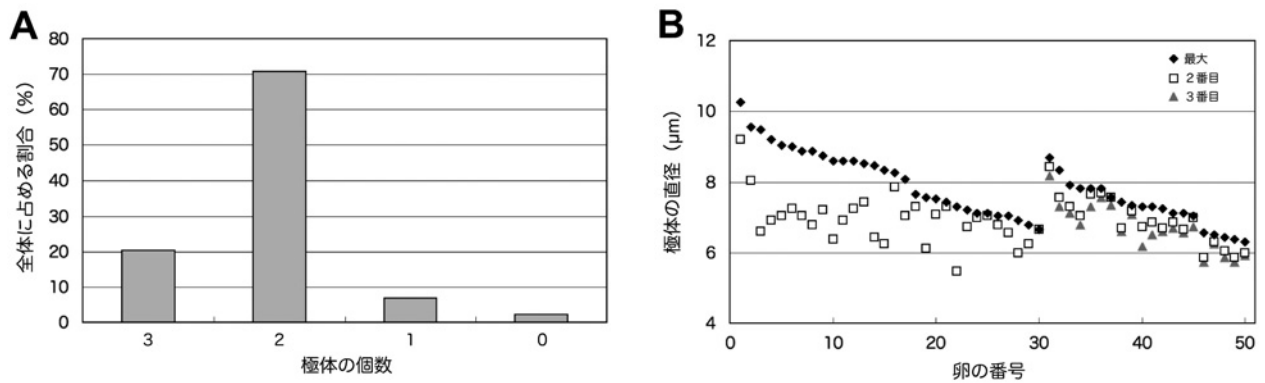


図2 タマクラゲの卵における極体の個数と直径。複数のメス個体から放出された計631個の卵を観察し、1個の卵あたりの極体の個数 (A) を調べた。また、これらの卵のうち、50個をランダムに選び、極体の直径 (B) を調べた。Bの横軸は、調べた卵に付した番号を示しており、1~30は極体が2個の卵、31~50は極体が3個の卵のデータとなっている。また、1~30および31~50は、それぞれ最大の極体の直径が大きい順に番号が付けられている。

体が2個の場合に限られる、最大の極体の直径が大きいと、2番目のものとの差も大きくなる、などの傾向が見られた (図2 B)。

クラゲにおいては、明刺激や暗刺激から一定時間経

過後に卵巣から単離した卵母細胞も、その後の減数分裂を正常に進行することが知られている (Takeda et al., 2006)。そこで、明刺激を与えてから12~15分後にタマクラゲの卵巣中の卵母細胞を取り出して、その

後の極体形成過程の撮影を行った。その際、卵母細胞が水流等により動かないように、2枚のカバーガラスを厚さ100 μm の両面テープで貼り合わせて作製したチャンバーに挟み込み、卵母細胞を軽く挟んだ状態にした。撮影は、ノマルスキー微分干渉装置を組み込んだ倒立顕微鏡 (Ti, Nikon) または正立顕微鏡 (80i, Nikon) にビデオカメラ (HDR-XR520V または HDR-CX550V, Sony) を装着し、20倍または40倍の対物レンズを使用して行った。また、ビデオカメラに記録した映像については、以前報告された方法 (中野ら, 2011) に従ってコンピュータに取り込み、種々の解析やモニター画面の作製等を行った。

撮影した動画を解析した結果、明刺激から25~30分後に第一極体が、その約10分後に第二極体が、それぞれ放出されること、第一極体のほうが第二極体よりも大きいこと、などが分かった (図3)。第二極体は、第一極体が放出された場所の近傍から放出されたが、両者の形成場所は必ずしも完全に一致するわけではなかった (図3)。また、第一極体が分裂した例も何回

も見られたが、そのタイミングは、第二極体放出よりも早い場合、遅い場合があり、一定していなかった。

4 精子付着・融合過程の記録

次に、タマクラゲとエダアシクラゲの卵に媒精したときの、精子の付着・融合過程の撮影を行った。撮影の手法等は基本的に上述の通りであるが、この撮影の際には、チャンバーを10mg/mLのBSA (bovine serum albumin, Sigma) 水溶液で予めコートすることによって、精子の付着を防いだ。なお、エダアシクラゲでは、チャンバーに厚さ50 μm の両面テープを使用し、さらに上記のBSA水溶液を1/20だけ加えた海水中で媒精した。

タマクラゲでは、第二極体放出直後の卵の受精率は高いが、時間が経過して雌性前核が明瞭に見えるようになってきた頃には受精率が低下することが分かっている (未発表データ)。そこで、卵成熟途中で単離した卵母細胞をチャンバーに移し、第二極体を放出した

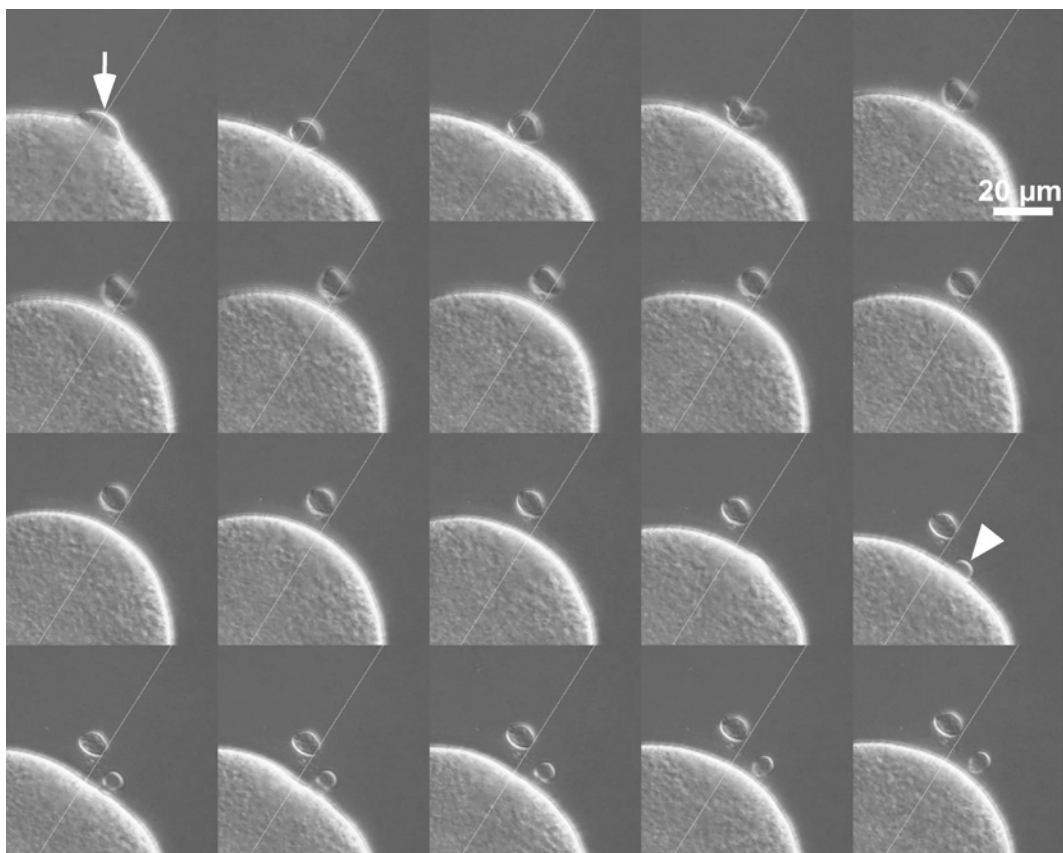


図3 タマクラゲの卵母細胞における極体形成。卵成熟途中の卵母細胞を取り出し、極体形成の過程をビデオカメラで記録した。モニター画面は、動画から45秒ごとに切り出した画像を並べたものである。矢印は放出途中の第一極体を、矢じりは放出途中の第二極体を示す。また、各画像の細線は、第一極体が形成された位置を示している。

直後に媒精を行った。その結果、卵に到達した精子は、第二極体形成場所の近傍に付着した（図4）。付着した精子の頭部は、数秒のうちに卵と融合して取り込まれていったが、その際には必ず横向きになっていた。また、融合直後から、卵の動物極側が1～2分間くらいかけて少しずつへこんでいき、その倍くらいの時間をかけて元に戻っていくという変形運動が起こった（図5）。

エダアシクラゲのメス個体から放出されてきた卵は、すでに減数分裂を完了しているが、極体が1個しか残っていない、または全く残っていない場合が多い（未発表データ）。一方で、雌性前核は明瞭に見える状態になっているため、これを指標に動物極を認識することができる。このような卵に媒精したところ、精子は雌性前核近傍に付着したが、付着点は雌性前核の

中央にくることはなく、必ずその周縁部に位置していた（図6）。その後の過程はタマクラゲと同様であり、精子の頭部が融合の際に横向きになること、融合直後から卵が変形していくことも共通していた（図6、7）。ただし、エダアシクラゲの場合には、卵の変形が2回続けて起こることが多かった。

タマクラゲ、エダアシクラゲに共通して、基本的に最初に卵の動物極付近に付着した精子が融合に至った。また、最初の精子の融合後に動物極付近に到達した精子は、付着できないか、付着したとしても融合には至らなかった（図7）。

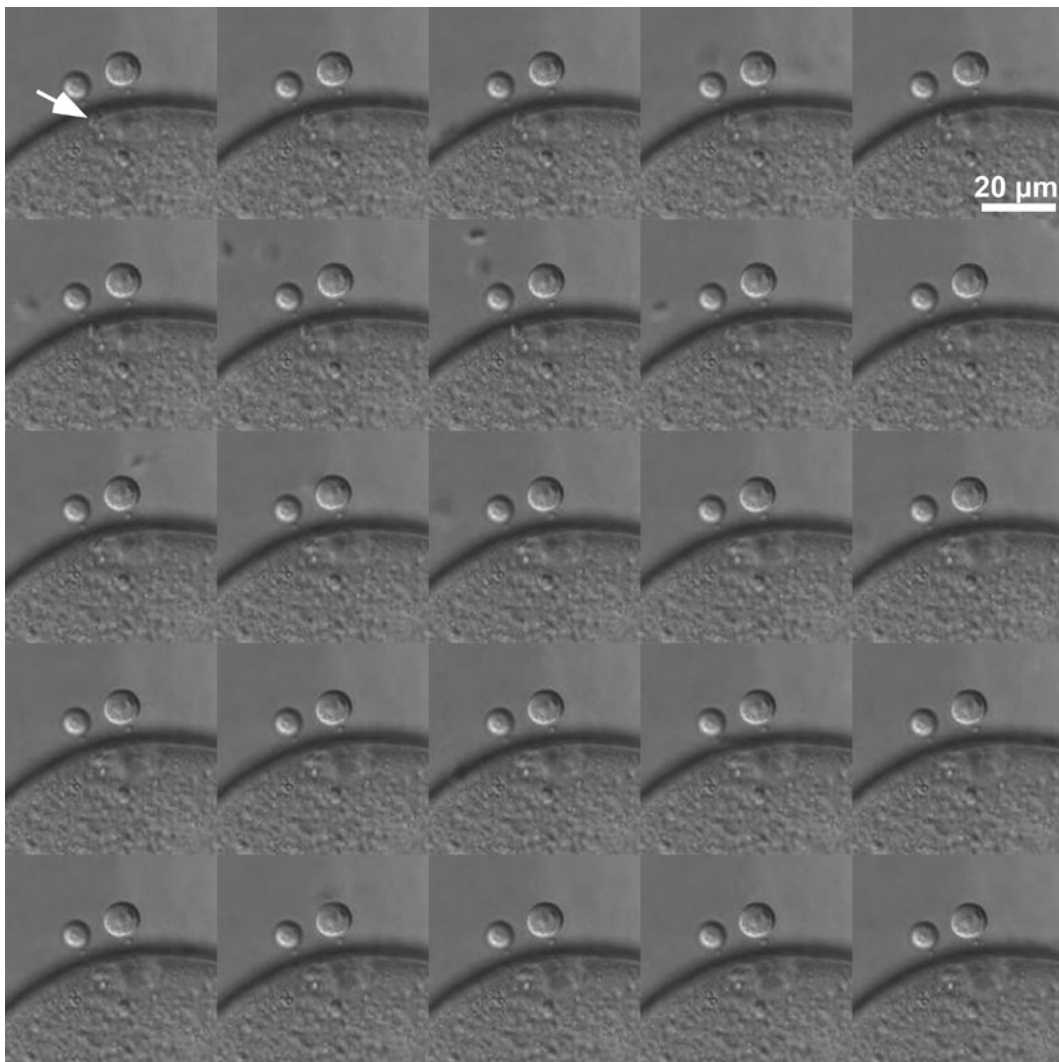


図4 タマクラゲの卵への精子の付着・融合。第二極体の放出直後の卵に媒精した後の過程をビデオカメラで記録した。モニタージュ画像は、動画から0.6秒ごとに切り出した画像を並べたものである。矢印は、卵に付着し、融合していく精子の頭部を示している。

5 研究面での考察

今回のビデオ撮影により、過去に別の手法により示されていた現象を確認することができた。例えば、精子の付着・融合が動物極付近で起こることや、融合の際に精子が横向きになることなどは、電子顕微鏡による「静止画」の観察を元に報告されていたが (Yamashita, 1987; 出口・伊藤, 2005)、今回得られた動画からも明確に確認することができた。また、

今回のビデオ撮影により、第一極体のほうが第二極体よりも大きいこと、第一極体と第二極体の形成場所は完全には一致しないこと、精子の融合は雌性前核の周縁部で起こること、融合に伴って卵の変形が起きること、最初に動物極付近に付着した精子が融合に至り、その後の精子は融合できないこと、なども明らかとなった。

上述のように、クラゲでは、精子の融合は卵の動物極の MVFA で起こると考えられている。今回の結果

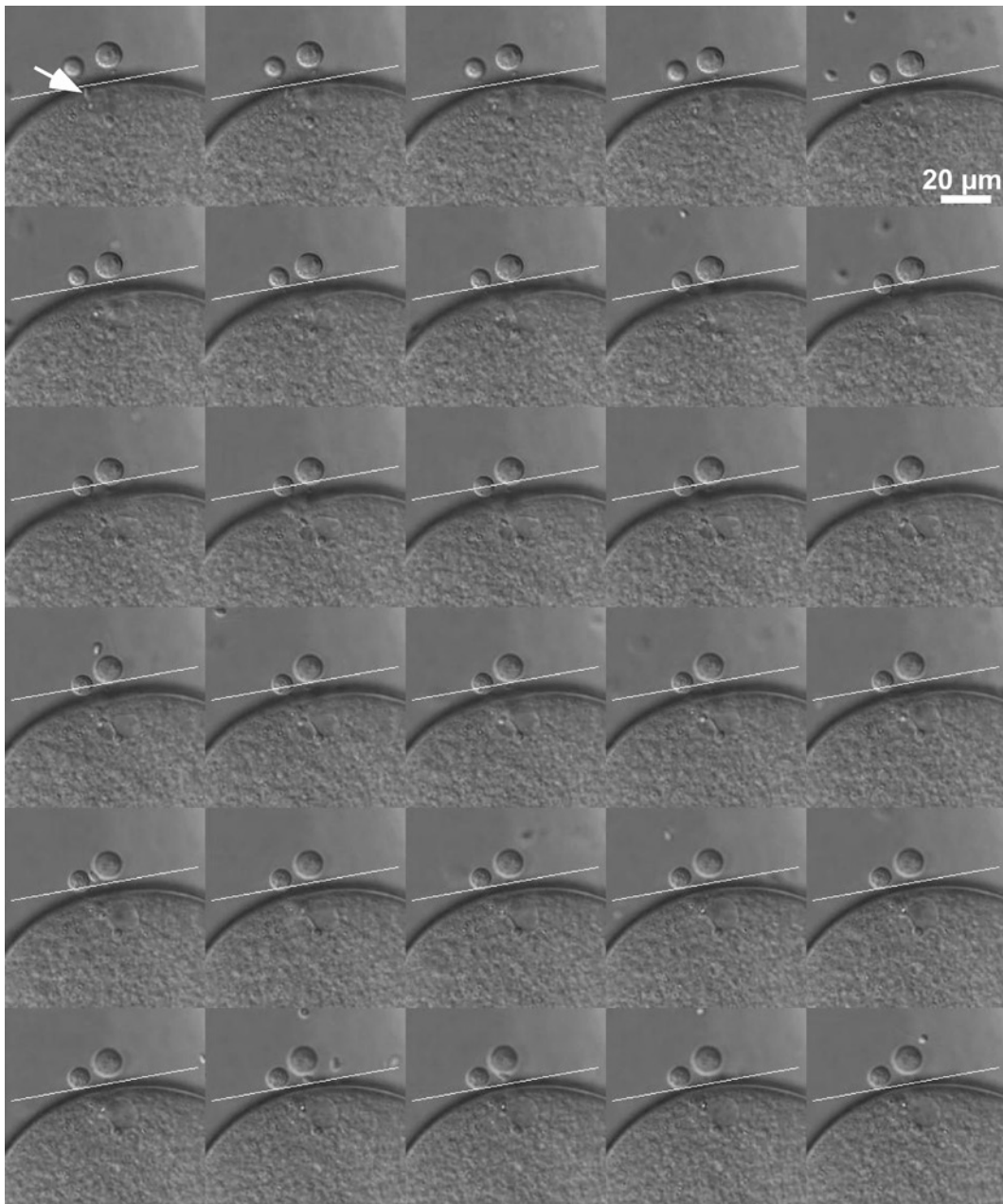


図5 タマクラゲの卵の精子融合に伴う変形。第二極体の放出直後の卵に受精した後の過程をビデオカメラで記録した。モニタージュ画像は、動画から9秒ごとに切り出した画像を並べたものである。矢印は、卵に付着し、融合していく精子の頭部を示す。また、各画像の細線は、卵の変形が起こる前の動物極端の位置を示している。

は、MVFA の中でも精子の付着・融合が特に起こりやすい領域があることを示唆している。近年、被子植物において、GCS1（または HAP2）と呼ばれる膜タンパク質が精細胞に特異的に発現し、卵細胞との融合に必須であることが示された（Mori et al., 2006）。GCS1はクラミドモナスなどの藻類やマラリア原虫などの原生生物にも広く分布し、やはり配偶子どうしの融合に重要な役割を果たすことが分かっている（Wong and Johnson, 2010）。面白いことに、多細胞動物のほとんどは GCS1 遺伝子を持たないが、刺胞動物や海綿動物など、いわゆる「原始的な」動物は持っている（Steele and Dana, 2009）。また、刺胞動物のヒドラでは、GCS1 遺伝子の mRNA は、精巣内の精原細胞が含まれる領域で特異的に発現している（Steele

and Dana, 2009）。以上のような結果から、GCS1は動物・植物の分岐以前から、動物・植物の起源となる真核生物の配偶子融合に関与していたのではないか—という仮説が出され、注目を集めている（Wong and Johnson, 2010）。GCS1はオス側の分子であるが、相手となるメス側の分子については、植物、原生生物を含め、いずれの生物でも現在のところ全く分かっていない。もし、GCS1が刺胞動物の精子でも膜融合必須分子として働いているとしたら、相手となる卵側の分子は MVFA（のさらに特定の領域）に局在している可能性が高い。*Aequorea* というクラゲでは、何らかの特異的な糖タンパク質がこの領域に局在し、精子の付着や融合に関与していると考えられている（Freeman, 1996）。今後、クラゲにおける精子側と

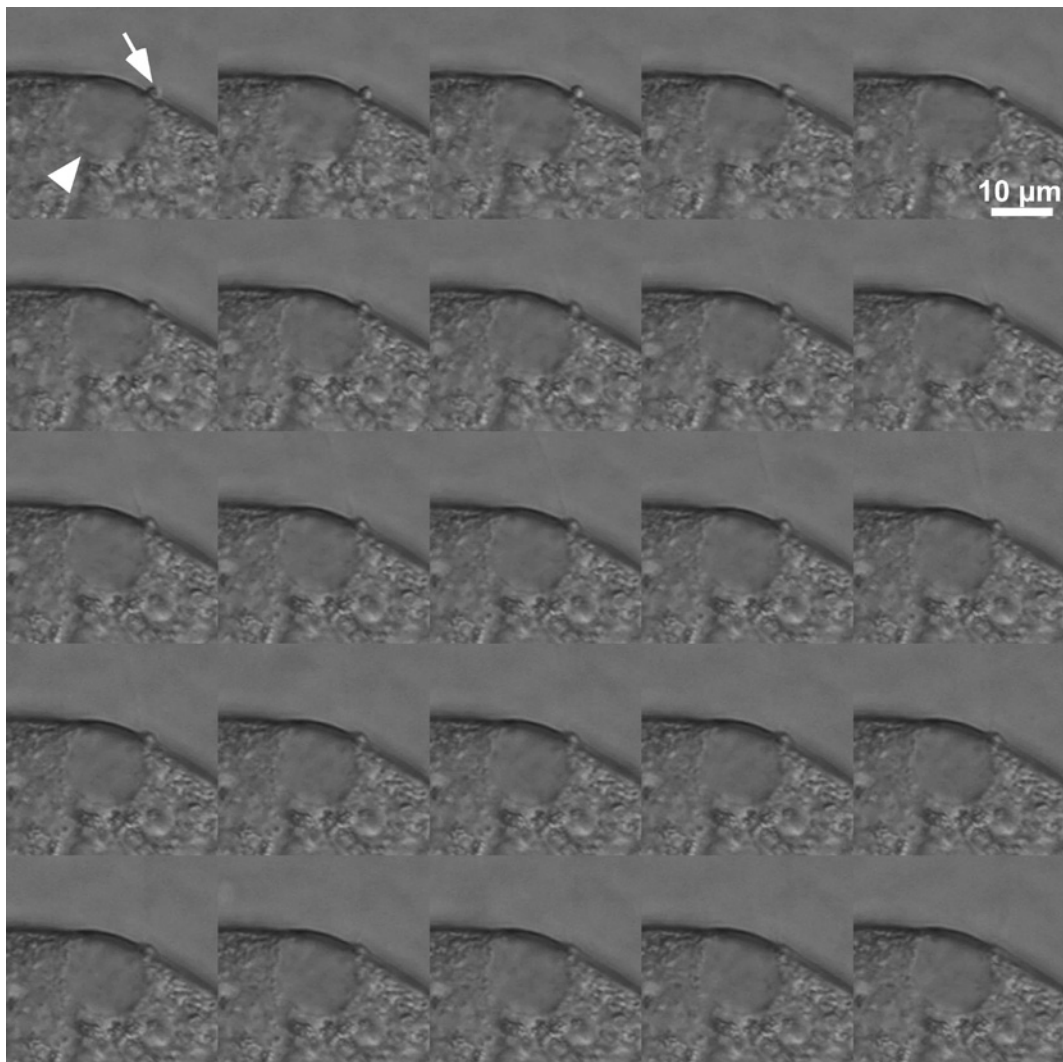


図6 エダアシクラゲの卵への精子の付着・融合。個体から放出された卵に媒精した後の過程をビデオカメラで記録した。モニター画像は、動画から0.5秒ごとに切り出した画像を並べたものである。矢印は、卵に付着し、融合していく精子の頭部を、矢じりは、雌性前核を示している。

卵側の双方の分子を解明していくことで、刺胞動物における配偶子の付着・融合機構のみならず、生物の配偶子間の認証機構の「原型」や「進化過程」の理解につながる可能性もある。

タマクラゲやエダアシクラゲを含む多くのクラゲの卵は卵膜を持たず、受精後にも特に目立った形態変化を示さない。この点は、卵膜を持ち、受精後に卵膜を変化させて多精を防止するウニやマウスなどの卵とは異なっている。一方、受精に伴い、精子の融合場所から対極に向けて波状に広がる卵内 Ca^{2+} 濃度の上昇 (Ca^{2+} 波) を示す点は、クラゲ、ウニ、マウスで共通している (Deguchi et al., 2000; Deguchi et al., 2005; Kondoh et al., 2006)。マウスでは、受精時の Ca^{2+} 波に伴って、卵が変形することが知られている (Deguchi et al., 2000)。今回、タマクラゲとエダアシクラゲの両種において、似たような卵の変形が起こることが分かったが、今後、 Ca^{2+} 波との因果関係について調査をしていく必要がある。また、クラゲでは最初の精子が融合した後に、それ以降の精子の付着や融合が抑制されるようになったことから、卵膜に依存しない何らか

の多精防止機構があると考えられるが、このことと Ca^{2+} 波や変形運動との関連も明らかにしていく必要がある。

6 教育面での考察

動物の生殖細胞 (卵と精子) や植物の生殖細胞 (卵細胞と精細胞) が減数分裂によって形成され、受精して発生していく過程については、中学校3年生になって本格的に学ぶ。また、高等学校の『生物 I』 (新学習指導要領では『生物』) では、これらの生殖細胞の形成過程や受精過程について、さらに詳しく学習する。

現行の『生物 I』の教科書には、動物の卵の形成過程について、減数分裂の際に著しく不均等な細胞質分裂が起こる結果、1個の一次卵母細胞から1個の二次卵母細胞と1個の第一極体が、1個の二次卵母細胞から1個の卵と1個の第二極体が生じること、極体は退化・消失することが記載されている。精子の形成過程では、1個の一次精母細胞から4個の精子が生じるため、これとの対比のためには、第一極体も分裂し、1

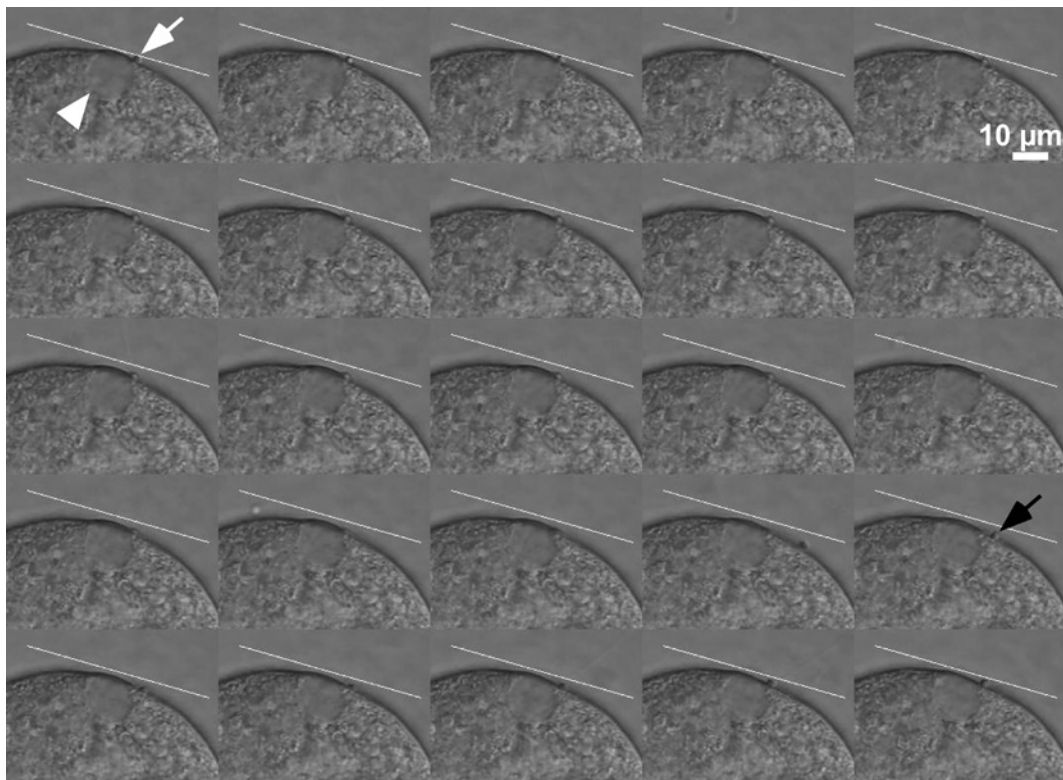


図7 エダアシクラゲの卵の精子融合に伴う変形。個体から放出された卵に媒精した後の過程をビデオカメラで記録した。モニター画面は、動画から3秒ごとに切り出した画像を並べたものである。白い矢印は、卵に付着後に融合していく精子の頭部を、黒い矢印は、卵の変形中に新たに付着した精子の頭部を示す。また、各画像の細線は、卵の変形が起こる前の動物極端の位置を示している。

個の一次卵母細胞から合計で4個の細胞（1個の卵と3個の極体）が生じたほうが理解はしやすい。しかし、実際には、第一極体は小さいため、細胞質分裂には至らない場合が多い。「極体は3個生じる」としか書かれていない教科書がある一方で、「第一極体が分裂しない動物もある」という記載のある教科書もある。多くのクラゲでは、卵と同様に卵母細胞にも卵膜がなく、極体の放出過程が観察しやすい。また、今回のビデオ撮影により、第一極体のほうが第二極体よりも大きいことが明らかとなった。この結果は、第一極体のほうが第二極体の2倍の染色体を含んでいる事実と合致しており、視覚的にも理解しやすい。また、第一極体が分裂する場合としない場合の両方が見られることも含め、極体形成の過程を学ぶ上で適した材料だと考えられる。

『生物I』の教科書では、ウニの受精過程が取り上げられており、精子が卵内に侵入すると受精膜が形成されること、次の精子の侵入が妨げられることなどが記載されている。しかし、ウニの場合は精子の付着や融合が卵の表面のどの部分でも起こるため、ちょうど見ている場所で精子の付着・融合が起こる確率は低い。これに対し、クラゲなどの刺胞動物では、極体や雌性前核の位置から予め精子の付着・融合部位が特定できるため、このような観察が可能となる。また、光刺激という単純な方法により、卵成熟や放卵・放精を誘起することができる。今後、今回得られたビデオ映像とともに、クラゲ自体を学校現場に提供する方法を模索し、卵成熟や受精を含めた有性生殖を学習するための教材として確立していきたいと考えている。

謝 辞

宮城県塩竈市にある東北区水産研究所からは、濾過海水を定期的に譲っていただいた。深く感謝申し上げます。本研究は、科学研究費補助金・新学術領域研究（動植物アロ認証）および国立科学博物館館長支援経費（生物多様性学習教材開発I「海産無脊椎動物」）の助成を受けて行われたものである。

文 献

- 出口竜作・伊藤貴洋（2005）. エダアシクラゲの採集とライフサイクルの制御——モデル動物・教材動物としての確立をめざして——. 宮城教育大学紀要 40, 107-119.
- 出口竜作・竹田典代・伊藤順子（2002）. シャーレの中の小さなクラゲ——タマクラゲの採集・飼育の方法と生物教育への活用の可能性——. 生物教育43, 16-24.
- 出口竜作・青木瞳・松田聖・佐藤英樹（2008）. エダアシクラゲの放卵・放精の光条件. 宮城教育大学紀要 43, 89-95.
- 中野剛・荒川美緒・清本正人・並河洋・出口竜作（2011）. 海産無脊椎動物の受精・初期卵割過程の動画制作. 宮城教育大学情報処理センター研究紀要——COMMUE—— 18, 45-50.
- Dan, J. C. (1950). Fertilization in the medusan, *Spirocodon saltatrix*. Biological Bulletin 99, 412-415.
- Deguchi, R., Shirakawa, H., Oda, S., Mohri, T. and Miyazaki, S. (2000). Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. Developmental Biology 218, 299-313.
- Deguchi, R., Kondoh, E. and Itoh, J. (2005). Spatiotemporal characteristics and mechanisms of intracellular Ca^{2+} increases at fertilization in eggs of jellyfish (Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa). Developmental Biology 279, 291-307.
- Freeman, G. (1987). The role of oocyte maturation in the ontogeny of the fertilization site in the hydrozoan *Hydractinia echinata*. Roux's Archives of Developmental Biology 196, 83-92.
- Freeman, G. (1996). The role of localized cell surface-associated glycoproteins during fertilization in the hydrozoan *Aequorea*. Developmental Biology 179, 17-26.
- Freeman, G. and Miller, R. L. (1982). Hydrozoan eggs can only be fertilized at the site of polar body formation. Developmental Biology 94, 142-152.
- Kondoh, E., Tachibana, K. and Deguchi, R. (2006). Intracellular Ca^{2+} increase induces post-fertilization events via MAP kinase dephosphorylation in eggs of the hydrozoan jellyfish *Cladonema pacificum*. Developmental Biology 293, 228-241.
- Miller, R. L. (1978). Site-specific sperm agglutination and the timed release of a sperm chemo-attractant by the egg of the leptomedusan, *Orthopyxis caliculata*.

- Journal of Experimental Zoology 205, 385-392.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. and Kuroiwa, T. (2006). GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biology* 8, 64-71.
- Steele, R. E. and Dana, C. E. (2009). Evolutionary history of the HAP2/GCS1 gene and sexual reproduction in metazoans. *PLoS One* 4, e7680.
- Takeda, N., Kyoizuka, K. and Deguchi, R. (2006). Increase in intracellular cAMP is a prerequisite signal for initiation of physiological oocyte meiotic maturation in the hydrozoan *Cytaeis uchidae*. *Developmental Biology* 298, 248-258.
- Wong, J. L. and Johnson, M. A. (2010). Is HAP2-GCS1 an ancestral gamete fusogen? *Trends in Cell Biology* 20, 134-141.
- Yamashita, M. (1987). A fine structural study of the fertilization process of the jellyfish *Cladonema uchidai*. *Development, Growth and Differentiation* 30, 81-91.

(平成23年9月30日受理)