

氏名・(本籍)	きょう づか けいいちろう 経 塚 啓一郎
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 9 4 3 号
学位授与年月日	平 成 2 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和53年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	卵の精子受容機構に関する解析
論文審査委員	(主査) 教 授 長 内 健 治 教 授 小 西 和 彦 教 授 竹 内 拓 司

論 文 目 次

第1章	序論, 精子侵入機構に関する問題点
第2章	ヒトデ卵の精子受容過程の観察
	序 論
	材料と方法
	結 果
	考 察
	要 約
	文 献
第3章	精子侵入過程におけるマイクロフィラメント系の関与
	序 論
	材料と方法
	結 果

考 察

要 約

文 献

第4章 精子頭部包み込み反応に関する解析

第1節. 先体系切断精子に対するヒトデ卵表の受容反応

序 論

材料と方法

結 果

考 察

要 約

文 献

第2節. ウニ卵によるヒトデ精子頭部包み込み反応

—Polyethylene glycol による交雑受精の誘起—

序 論

材料と方法

結 果

考 察

要 約

文 献

第5章 総合考察

謝 辞

図及び表

参考論文

論文内容要旨

1. 序論, 精子侵入機構に関する問題点

受精過程は精子が卵の外胚構造（ゼリー層，卵黄膜など）に接触してから卵内へ侵入して精核が卵核と合体するまでをさす。本研究は，この受精過程のうち精子先体突起が卵原形質膜に接触してから精子核が卵内に取り込まれるまでにみられる現象を解析し，精子侵入の機構を明らかにしようとするものである。ウニ卵では受精時に精子は鞭毛運動により卵表面に到達するが，卵黄膜に結合するとその運動を停止する。そこで，精子はそれ自身の運動によって卵内へ入るのではなく，受動的に卵によって引き込まれるか，あるいは卵との相互作用によって侵入するものと考えられている。精子侵入機構の解析にあたって，次の問題点を指摘できる。

(1) 卵表に到達した精子は先体反応を起こし，先体突起を形成し，この部域で卵表と最初に接触，融合する。精子先体突起と卵原形質膜との結合またはそれに続く原形質膜融合が精子頭部（核）を卵内へ導く先行過程として必要なのであろうか。ほ乳類では精子頭部の先端部ではなく側面の原形質膜が卵原形質膜と融合した後に，精子頭部は卵内へ侵入する。また，石灰海綿では，精子は一旦襟細胞中に取り込まれた後卵母細胞に渡されるため，直接両性配偶子間の原形質膜融合は起こらない。これらのことは精子侵入過程の一部が原形質融合に先行して，あるいは膜融合とは独立に進行する可能性を示唆する。

(2) 先体突起が卵表面と融合し卵表層へ侵入すると，その部分に卵細胞質の突起（受精丘または精子侵入路）が発達してくるが，この細胞質突起は精子侵入に積極的な役割を果たしているのであろうか。ウニ卵で観察される受精丘は精子侵入後にさらに大きく発達することから，受精丘の形成は精子受容の結果である可能性がある。

(3) 棘皮動物の精子先体突起（糸）及び卵表層にはアクチンフィラメントが存在する。ウニ卵表の精子侵入部位に形成される受精丘中にもアクチンフィラメントが観察され，マイクロフィラメント系の運動阻害剤である cytochalasin B は精子侵入を抑制する。このことより，精子の卵内への侵入には精子先体系及び卵表層のアクチンフィラメントが関与しているものと考えられている。

(4) 精子頭部の卵内への侵入時にいくつかの種において顕著な卵表面の精子頭部の包み込み（sperm engulfment）が観察されている。これは卵表層の一部もしくは卵微絨毛が受精する精子の周囲に突出し，頭部の周囲に絡みつく反応である。この反応はウニの場合には原形質融合の後に起こり，ほ乳類の場合には原形質膜融合に先行している。従って，この反応は原形質膜融合に依存するものでもなければ原形質膜融合を導くものでもないと考えられる。

本研究では上記の問題を解析する材料としてヒトデ類を用いた。ヒトデ類はウニ類と同様に海産無脊椎動物の受精と発生の研究材料として扱い易いと同時に，ウニ類にない特色及び利点を兼ね備えている。ヒトデ精子は先体反応に伴い15 μ m以上に達する長い先体系を形成する。そこで受精時の精子と卵表との反応を精子先体系と卵表及び精子頭部と卵表との反応に区別し，

精子侵入過程を段階分けして詳細に観察することが可能である。また顕著な受精丘が発達することから、精子侵入部位の卵表の変化の観察も容易である。

2. ヒトデ卵の精子受容過程の観察

減数分裂を完了したヒトデ過熟卵は多精受精になりやすく、精子侵入機構の微細構造の解析が容易である。そこでヒトデ (*Asterias amurensis*) 過熟卵への精子侵入過程の経時変化及びその微細構造を、ノマルスキー微分干渉顕微鏡に組み込んだビデオ撮影装置及び走査型、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。ヒトデ卵は原形質膜の外側を、ゼリー層と卵黄膜の二層の外囲構造が包み、受精する精子はこの外囲構造をぬけて卵内へ侵入する。媒精直後、精子は厚さ10 μm の卵ゼリー層表面に接触して先体反応を起こし、先体系を侵入させた。ゼリー層をぬけた先体系先端は卵黄膜を通過し、卵原形質膜と融合した。媒精30秒後に卵表面では細胞質突起（受精丘）の形成と表層変化が開始し、受精膜が上昇し始めた。受精丘は先体系周囲に集合した電子密度の高い微細な細胞質顆粒の集合であり、この中には卵表と卵中心を結ぶ方向に多数の繊維構造（アクチンフィラメント）が出現し、卵表を底面、卵内へ侵入した先体系先端を頂点とした円錐形に発達した。先体系の受精丘中への侵入に伴い精子頭部は0.13 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の速度でゼリー層中を通り、媒精75秒後に上昇しつつある受精膜をはさんで受精丘表面と接触した。ここで20秒間侵入が停止し、この間に精子頭部周囲の卵細胞質（受精丘の一部）が受精膜の外側に突出してきて精子頭部を包み込んだ。媒精120秒後までにこの突出は退縮（吸収）し、これに伴って精子頭部は受精丘中へ引き込まれた。本観察の結果により、精子侵入時にはまず先体系先端と卵原形質膜が融合し、先体系が卵受精丘中へ侵入すること、これに続く精子頭部の受精膜通過及び受精丘中への侵入は卵表面の微絨毛による包み込み反応（sperm-engulfing response）の後で起こることが明らかになった。

3. 精子侵入過程のマイクロフィラメント系の関与

受精時にヒトデ精子は卵表に新たに形成される受精丘中へ侵入する。F-アクチンと親和性の高いNBD-phalloidinにより蛍光染色したところ、卵内へ侵入しつつある精子先体系の周囲に多数のアクチンフィラメントが発達し、円錐形状の受精丘を形成していた。Cytochalasin B海水中で媒精した時、精子は先体反応を起こし、先体系先端は卵黄膜をぬけて卵原形質膜（卵表）と融合した。卵表層では、先体系の融合部のまわりに微細な細胞質顆粒が移動（集合）していたが、この領域にアクチンフィラメントは出現せず、円錐形状の受精丘の発達も見られなかった。先体系は受精丘中へ侵入せず、先体系先端で卵表と融合したまま精子頭部は上昇した受精膜の外側に留まっていた。このことは、精子先体系及び精子頭部の卵細胞質内への侵入に受精丘の発達が必要であり、この発達にはアクチンフィラメントの関与する細胞質の動きが必要であることを示唆する。

4. 精子頭部包み込み反応に関する解析

(1) 先体系切断精子に対するヒトデ卵表の受容反応

受精時におけるヒトデ（イトマキヒトデ, *Asterina pectinifera*）精子頭部及び先体系の役割を検討するため、先体反応を誘起した直後の精子懸濁液をウルトラディスペーサーで処理し、精子から先体系及び尾部を切除して、精子頭部を単離した。イトマキヒトデの裸卵（ゼリー層及び卵黄膜を除去した卵）にこの精子頭部を加えたところ、精子頭部は卵表に結合したが卵を付活しなかった。精子頭部は卵原形質膜と融合せず、二重の原形質膜に包まれたまま卵内へ取り込まれた。先体系を欠く精子頭部は、卵表に精子頭部包み込み反応を誘起するが、頭部自体には卵表と膜融合し、また卵を付活する能力はないものと考えられる。

(2) ウニ卵によるヒトデ精子頭部包み込み反応

キタムラサキウニ (*Strongylocentrotus nudus*) 卵とイトマキヒトデ精子の交雑組合せにおいて、あらかじめ先体反応を誘起したヒトデ精子をウニ裸卵に媒精した。ウニ裸卵は細胞質突起でヒトデ精子頭部を包み込むが、受精はしなかった。これらのヒトデ精子の結合しているウニ裸卵を polyethylene glycol 海水（平均分子量3000）で処理したところで、精子は原形質膜融合を伴って卵内に侵入した。この時、卵は付活され核分裂を進行した。一方、先体胞を持った未反応精子を媒精しても精子頭部包み込み反応は誘起されなかった。このような卵に polyethylene glycol 処理を行っても、精子の卵内への侵入は起こらなかった。以上の結果は精子の受容には卵と精子の原形質膜の融合と、卵表による精子（頭部）の包み込み反応の独立した二つの過程が関係していることを示唆する。

5. 総合考察

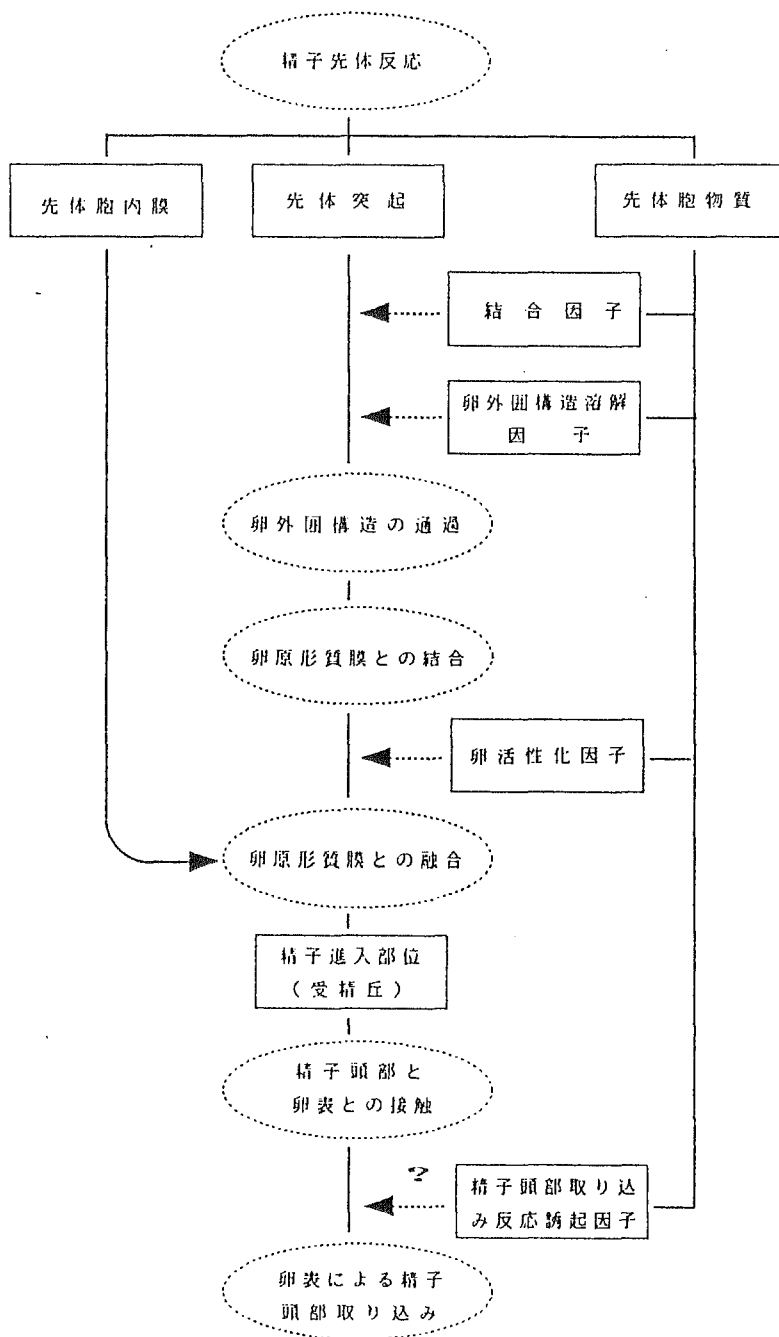
精子は卵表面に到達すると先体反応を起こす。先体反応には3つの重要な機能がある。すなわち(1)先体胞物質の放出、(2)先体胞内膜の露出、及び(3)先体突起（糸）の形成である。ヒトデの精子侵入過程における先体反応の役割を図1に模式的に示した。

先体胞物質の役割として卵膜 lysin による卵外囲構造溶解、bindin による卵表面との種特異的な結合及び卵の付活に関与することが報告されているが、著者は新たに精子頭部取り込み反応にも関与する可能性を指摘した。精子先体系は先体胞内膜由来の原形質膜で包まれているが、先体系を切除された精子は融合能を失うことから、先体胞内膜由来の部分が卵原形質膜との融合部位であると考えた。ヒトデの場合卵表層に侵入した先体系を中心に受精丘が発達してくることから、先体系は受精丘の発達にも必要であると推定した。

先体系の卵表との融合後、受精丘は先体系に沿って発達し、その頂端部の卵表面は精子頭部と接触可能となる。卵表面は頭部と接触した後、微絨毛状突起で精子頭部を包み込みこれを取り込む。精子頭部の取り込みを可能にする卵表面と精子頭部との接触をもたらず過程として、マイクロフィラメント系の関与した受精丘の発達が重要である。精子頭部包み込み反応は細胞

の食作用と類似し，先体反応後の精子頭部によって誘起される。この反応は両性配偶子間の膜融合とも卵の付活とも独立した現象である。本研究は卵表の精子頭部包み込み反応の役割について初めて実験的な根拠を与えたものである。

図1 先体反応の役割を示す模式図



論文審査の結果の要旨

本論文は棘皮動物（主としてヒトデ類）の配偶子を用いて、卵表による精子の取り込みの機構について解析したものである。

経塚は、まず、ヒトデの精子の卵への侵入過程を詳細に観察し、精子の先体反応、先体糸のゼリー一層通過、先体糸先端と卵原形質膜との融合、受精丘の発達、受精丘頂端部による精子頭部包み込み、受精丘の退行にともなう精子オルガネラの卵内への移行が順時進行することを明らかにした。

次に、これらの諸現象の相互関係と精子取り込みに関する役割を明らかにするため、以下の実験的解析を行なった。

(1) サイトカラシンBの存在下で、精子は先体糸で卵と融合するが受精丘は発達せず、精子は卵内へ侵入しないことを観察し、精子の先体糸と頭部の侵入には受精丘の発達が必要であり、受精丘の発達にはアクチンフィラメンの関与する細胞質の動きが必要であることを示した。

(2) イトマキヒトデの先体反応直後の精子から先体糸を除去する方法を考案し、先体糸の役割を解析した。先体糸を除去された精子の頭部は卵と融合できず、二重の原形質膜に包まれたまま卵に取り込まれ、卵を活性化しない。この結果は卵表は精子頭部に直接反応できることを示している。

(3) キタムラサキウニの裸卵にイトマキヒトデの先体反応した精子を加えると、精子は卵に融合しないが、卵表の突起によって包み込まれる。このような卵をポリエチレン・グリコールに曝すと、原形質膜の融合が起こり、精子は卵に取り込まれ、卵は活性化する。この結果は、精子の受容には卵と精子の膜融合と卵表による精子頭部の包み込み反応が共に必要であることを示唆している。

これらの成果は、精子侵入における先体糸、受精丘及び卵表の役割を明らかにしたものであり、特に卵表による精子の取り込みを実験によって示したものとして高く評価できる。

以上の成果は卵の精子受容機構の解明に貢献するところ大であり、経塚啓一郎が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、経塚啓一郎提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。