

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2017) 第17巻:38-40.

平成27年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 2) 精子の thigmotaxis の解析と、そのための新たな顕微鏡光学系の開発

春見 達郎

子」は、核を持つ頭部、ミトコンドリアを含む中片、および運動装置の鞭毛から構成されている。精子は長い鞭毛を3次的に波打ちながら前進する。これまで、精子の運動解析は、培養液や海水、淡水などメディアウムの中で主に自由に3次的に遊泳できる条件で行われてきた。一方、精子は生体内では種々の組織表面、生体外では、例えば人工的なスライドガラスの表面を好んで遊泳する性質を持っている。この性質はthigmotaxisと呼ばれる。なぜ精子はthigmotaxisを示すのか、また、上記メディアウム中での3次的に自由に遊泳できる状態の精子運動とthigmotaxisの状態での精子運動を詳細に比較し調べた報告は無い。本研究では、高速度撮影装置とそれに追従するように高照度LEDとファンクションジェネレーターを組み合わせ、精子の種々の条件下での運動の比較、特に精子鞭毛と精子頭部の両方の運動解析を行うことを目的とした。魚類の受精では、精子は卵表面に存在する唯一の孔である卵門に進入し卵表面に到達しなければならない^{1),2)}。上記の装置を利用し、精子鞭毛運動および精子頭部の運動を同時に記録することによって、魚類精子がどのように卵門内に進入できるかを3次的に解析できると期待された。しかしながら、今回、予算の制限からLED光源装置やファンクションジェネレーターを購入することは叶わず、唯一高速度撮影カメラのみを購入した。本研究では、これを用いて精子頭部の軌跡から、精子の卵門進入における運動を解析した。

2) 精子の thigmotaxis の解析と、そのための新たな顕微鏡光学系の開発

Analysis of Sperm Thigmotaxis Movement with High Speed CMOS Sensor

研究代表者 春見 達郎

【目的】

多くの動物において、卵と受精する雄性配偶子「精

【方法】

材料には標津サーモン科学館から提供を受けたクロガレイ (Pleuronectes obscurus) を用いた。2016年4

月に東京農業大学臨海研究センター（網走市）において、卵および精子を採取し冷蔵保存し、適宜観察に供した。観察には、40倍の水浸対物レンズを装着したOLYMPUS BX40正立顕微鏡を用いた。海水中での卵門付近の精子の運動性の動画記録には、本助成金によって購入した、iDS社UI-3060CP-C-HQ Rev.2 CMOSセンサーとRAMディスクを装着したPCを用いた。本カメラでは、968x400画素で122fps (frame per second)の撮影が可能であった。記録動画はImageJで精子の軌跡の解析を行った。

【結果】

予算の制限から、高照度のLED照明装置を購入することが出来なかったため、高速度撮影カメラを用いて精子頭部のみの運動解析を行った。122fpsで撮影した卵の卵門付近の精子頭部のフレーム毎（0.008秒毎）の典型的な軌跡を図1aに、精子頭部の位置を示す写真を図1bに示した。精子は卵表面に沿って遊泳後、卵門の縁においてその表面に沿って垂直に方向を変え、卵門内に進入して行った。卵表面をthigmitaxisで遊泳する精子（○9点）の平均移動速度は $3.9\mu\text{m}/\text{フレーム}$ であったが、卵門の縁付近では急速に速度を落とし（●8点）、その平均移動速度は平均 $1.3\mu\text{m}/\text{フレーム}$ と、卵表面での移動速度の三分の一であった。また、その軌跡から、頭部が一時真横に動くことも認められた。その後、移動速度は回復し卵門内部に移動して行った（灰色丸）。横方向から観察した精子の卵門進入の軌跡の記録から、卵門の縁で見られた進入直後の精子頭部の移動速度の低下は、カメラ方向に遊泳しているためではなく、精子の遊泳方向が卵表面から卵門下方に向かってほぼ垂直に曲がったあたりで生じていることが明らかになった。

【考察】

本観察の結果から、クロガレイの精子「頭部」は卵表表面に沿ってthigmotaxisとして遊泳した後、卵門の縁において急速に遊泳方向を垂直に変え、卵門の壁に沿ってやはりthigmotaxisとして卵門内に進入していくことが初めて示された。精子の運動装置は頭部の後ろに続く長い鞭毛である。鞭毛のしなやかな回転運動によって、これまで精子は直進、あるいは緩やかな円運動を行うことが知られており、精子がほぼ「垂直に曲

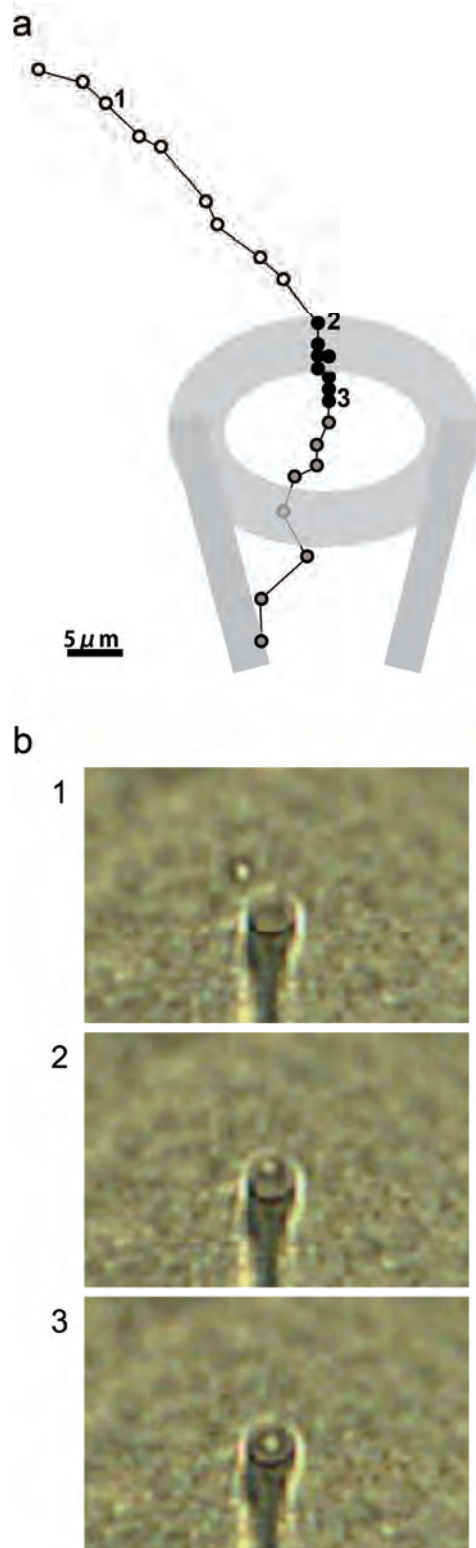


図1 クロガレイ卵門に進入する精子の軌跡
 a クロガレイ精子頭部の軌跡
 卵表面上（○）、卵門進入直後（●）および卵門進入後（灰色）の位置。各点の間隔は0.008秒（122 fps）。
 b 卵門付近のクロガレイ精子の7フレーム毎の位置
 1、2、3はそれぞれ図a中の数字に対応する。

がる」という現象は非常に珍しい。卵門の縁における精子頭部の急激な進路変更と遊泳速度の急激な減少に、精子鞭毛がどのように関わり、作用するのは今回は明らかにすることが出来なかった。今後、高照度LED照明装置とファンクションジェネレーターを利用し、卵表面や卵門進入時の精子の鞭毛運動を位相差や暗視野で観察することができれば、精子がどのようにして「垂直に曲がる」か明らかにできると期待される。

【参考文献】

- 1) Yanagimachi R, Cherr GN, Matsubara T, Andoh T, Harumi T, Vines C, Pillai M, Griffin F, Matsubara H, Weatherby T and Kaneshiro K: Sperm Attractant in the Micropylar Region of Fish and Insect Eggs. *Biol Reprod* 88, 1-11 (2013)
- 2) Yanagimachi R, Harumi T, Matsubara H, Yan W, Yuan S, Yamaha E, Arai K, Hirohashi N, Iida T, Matsubara T, Andoh T, Vines C and Cherr G: Chemical and Physical Guidance of Fish Spermatozoa into the Egg through the Micropyle. *Biol Reprod* (in press)