

## 二酸化炭素によるニホンウナギ精子の運動停止反応

森 凜太郎 (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】

魚類の精子は、様々な受精環境に適応し、多様な進化を遂げてきた。特にカレイ類では、精子懸濁液に対してCO<sub>2</sub>を噴射すると、すぐさま精子が停止するという特異な反応が知られている<sup>1)</sup>。この反応は、精子に多量に含まれる炭酸脱水酵素 (CA) によって引き起こされる。CA はCO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O ⇌ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup>の反応を触媒し、細胞内 pH の維持に重要な役割を果たしている。カレイ類精子ではCA が高発現しており、CO<sub>2</sub>噴射により産生されたHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が軸糸の運動を抑制すると考えられている。また、カレイ類は低pH 溶液でも十分な精子運動が確認されており、CA との関連が示唆される。先行研究により、ウナギ精子におけるNaHCO<sub>3</sub>溶液中での運動抑制が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、カレイ類精子と同様にCA による精子運動停止メカニズムが存在するの否か、その詳細や意義は明らかになっていない。また、ウナギ精子の軸糸構造は「9+0」構造であり、多くの生物が持つ「9+2」構造とは異なる。すなわち、ウナギ精子の軸糸は中心対微小管、ラジアルスポーク、外腕ダイニンを欠いた構造しており、最も単純な軸糸構造を持つ生物だと考えられている。

本研究では、ニホンウナギ精子のCO<sub>2</sub>による運動停止反応を詳細に調べることで、精子鞭毛軸糸のCO<sub>2</sub>およびHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>による運動調節メカニズムの解明を目的とした。

## 【材料】

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) (雄)

FRP 製 500 L 水槽を用いて、水温 20 °C、全暗条件にて飼育した。雄ウナギの性成熟は、ウナギ組換え LH (0.5 mg/ml, Repro Master rLH, アークリソース社) 200 µl を週 1 回、10 週間注射して促した。成熟したウナギを2-フェノキシエタノールで麻酔し、腹部圧迫により精子を採取した。

## 【方法】

CO<sub>2</sub>噴射時の精子鞭毛波形解析

BSA コートしたスライドガラス上にNaCl 溶液を置き、少量の精子を滴下し、運動を活性化させた。その後、CO<sub>2</sub>ボンベに接続したチューブを介してCO<sub>2</sub>ガスを精子に噴射し、その様子を位相差顕微鏡で 10 倍の対物レンズを用いて観察し、高速カメラ (HAS-U2) により 1000 fps で記録した。

## 精子運動率、遊泳速度の測定

BSA コートしたスライドガラス上に各溶液を 20 µl 置き、50 倍希釈した精子 1 µl を滴下した。位相差顕微鏡で 10 倍の対物レンズを用いて観察を行い、精子運動解析ソフトウェア SMAS により精子運動率、遊泳速度を測定した。

## 実験溶液の組成

精子運動の活性化には、NaCl 溶液 (450 mM NaCl, 0.5% BSA, 10 mM Hepes-NaOH, pH 8.0) を用いた。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の影響は、運動活性化溶液に 25-400 mM になるようにNaHCO<sub>3</sub>を加えた溶液を用いて調べた。NaCl と NaHCO<sub>3</sub>の総濃度は 450 mM とした。pH の影響については、溶液の pH を pH 3.0-9.0 の範囲で変化させた。pH 3.0, 4.0 は K-acetate、pH 5.0, 6.0 は MES を用いて調

整した。Nigericin は 10 mM ストック水溶液、Ethoxzolamide (ETZ) は、0-40 mM ストック DMSO 溶液を適宜希釈して用いた。溶液中の DMSO の最終濃度は 0.5 % とした。

## 【結果】

ウナギ精子懸濁液にCO<sub>2</sub>ガスを吹き付けた結果、運動中の精子はカレイ類精子と同様に直ちに停止した。また、CO<sub>2</sub>噴射停止直後、すぐさま運動性が回復した。カレイ類精子がCO<sub>2</sub>停止から回復する場合と異なり、ウナギ精子鞭毛の屈曲は鞭毛の先端から回復した。カレイ類精子は、25-100 mM のNaHCO<sub>3</sub>で運動が抑制される。しかし、ウナギ精子をNaHCO<sub>3</sub>溶液中で観察すると、400 mM NaHCO<sub>3</sub>でも運動は全く停止せず、曲線速度にも顕著な違いはなかった。様々な pH でのウナギ精子の運動性を評価した結果、pH 4.0-9.0 では運動性に変化がなかったが、pH 3.0 では運動性が著しく低下した。Nigericin を用いて、細胞内外の pH 差を無くしたところ、pH 6.0 以下の溶液で精子運動性が低下した。CA の阻害剤である ETZ の効果を低 pH 条件である pH 5.0 と、通常の pH である pH 8.0 で比較したところ、pH 5.0 では精子の運動性が低下したが、pH 8.0 では運動性に変化はなかった。

## 【考察】

カレイ類と同様に、ウナギ精子もCO<sub>2</sub>の噴射による運動停止反応を示した。停止効果は非常に高く、吐息を吹きかけただけでもCO<sub>2</sub>による速度低下が観察された。しかしながら、本研究では、カレイ類精子では停止反応を示したNaHCO<sub>3</sub>溶液で、ウナギ精子が全く停止しないという結果を得た。この結果の相違は、ウナギの運動性を確保するために使用したBSAに原因がある可能性と、CO<sub>2</sub>による運動停止メカニズムがカレイ類とウナギで異なる可能性が考えられる。また、CO<sub>2</sub>停止後に運動を回復させる際の波形回復を観察した結果、ウナギ精子の波形は鞭毛の先端から回復した。それに対して、カレイ類では鞭毛基部から波形が回復し、両者では全く異なる反応を示した。この特殊な回復反応は、ウナギ精子が持つ「9+0」構造が寄与しているのではないかと考えられる。

一方、カレイ類精子と同様に、ウナギ精子も低 pH 溶液で高い運動性を持つことが示された。低 pH 条件下では、Nigericin や ETZ の添加により運動性が低下したことから、CA が低 pH 溶液における運動に寄与していることが示唆された。これらのことから、CA はウナギ精子内の pH 維持に寄与しており、これはカレイ類と同様の性質であることが明らかにされた。

本研究では、ウナギ精子がカレイ類と同様に多量のCAを持ち、低 pH 溶液における運動維持に寄与していることが示唆された。今後は、質量分析によるCAの特定や生化学的な解析、さらに系統的に離れたカレイ類とウナギが、いかに同じ性質を獲得したのかを明らかにしていきたい。

## 【参考文献】

1. Inaba *et al.*, Cell Motility and the Cytoskeleton 55:174-187 (2003).
2. Tanaka *et al.*, Fisheries Science 70: 780-787 (2004).