

機関番号：23401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780140

研究課題名 (和文) 一般魚類ではみられない、淡水カジカ類の異型精子の機能解明と精子保存への機能利用

研究課題名 (英文) Studies on the functions of parasperm and the usage of parasperm on cryopreservation of eusperm in freshwater sculpins

研究代表者

田原 大輔 (TAHARA DAISUKE)

公立大学法人 福井県立大学海洋生物資源学部・講師

研究者番号：20295538

研究成果の概要 (和文)：淡水カジカ類を種々の条件で水温・光を制御して飼育しても、精子形成に伴い異型精子の形成が確認された。これより、異型精子欠如個体の作製はできなかったが、異型精子は精子形成で正型精子とともに形成される精子であることが分かった。また、淡水カジカ類で確認されている異型精子のステロイドホルモン合成能は海産カジカでも確認できた。淡水カジカ類の精子運動特性を明らかにし、それらの情報を基にアユカケの精子凍結保存条件を確立した。

研究成果の概要 (英文)：The formation of parasperm was found in testis of freshwater sculpins maintained under various conditions (water temperature and photoperiod). Therefore, the strains of freshwater sculpins without parasperm could not be made and this result suggested that parasperms were certainly produced along with eusperm during spermatogenesis. As reported in freshwater sculpins, the biosynthesis of sex steroid hormones in parasperms was found in marine sculpin. Characteristics of sperm mobility of freshwater sculpins and cryopreservation of fourspine sculpins eusperm were clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：淡水カジカ類・異型精子・精子凍結保存・人工授精・精子多型

## 1. 研究開始当初の背景

動物には同一種、同一個体でありながら、正常状態においても受精する精子 (正型精子) 以外に、形態や運動性が異なる受精能をもたない精子 (異型精子) を形成するものがある。これは“精子の多型現象 (多様性)”と呼ばれ、無脊椎動物で広く確認されているが、脊椎動物では魚類のカジカ上科魚類 (カジカ類) においてのみ確認されている。

カジカ類では、雌雄が体外で放精・放卵を行う通常の卵生 (非交尾型) のほか、卵生であるが配偶子の会合に際して交尾を行うものと交尾を行わないものがあり、多様な繁殖様式をもつ。本研究で扱うカジカ類の異型精子は、その多様化した繁殖様式のひとつであると考えられている。しかし、異型精子の機能はヨコスジカジカ (海産カジカ) 一種で明らかにされているが、淡水カジカ類における異

型精子の機能は不明である。

## 2. 研究の目的

(1)カジカ科魚類の異型精子は、周年一定水温で飼育すると異型精子が形成されないというが、その形成要因は不明である。異型精子欠如個体の作出が可能となれば、異型精子の形成メカニズムを明らかにすることが可能となる。

(2)淡水カジカ類で広く確認されている異型精子が、海産カジカ類でも形成されているかは不明な点が多い。また、淡水カジカ類の精子では、異型および正型精子の両方において性ステロイドホルモン産生能が確認されている。

(3)淡水カジカ類は産卵を海で行う降河回遊型から川または湖で産卵する両側回遊型および湖封型まで様々な生活史をもつ。しかし、淡水カジカ類の精子に関する知見は乏しく、カジカ類の精子凍結保存方法は不明である。

## 3. 研究の方法

(1)秋(短日化&水温低下)の精子形成期に、日長と水温を制御した実験区(①短日化&一定水温, ②短日化&水温低下, ③一定日長&一定水温, ④一定日長&水温低下)で飼育したときの異型精子形成の有無を調査した。

(2)精巣から漏出した精巣液から異型精子と正型精子を遠心分離で分離し、性ステロイドホルモン前駆体を入れた培養液で24時間培養し、培養液中の性ステロイドホルモン(DHPおよび $20\beta$ -S)濃度を測定した。

(3)①降河回遊型のアユカケ, 両側回遊型のカジカ小卵型および中卵型, 湖封型のウツセミカジカを用いて、種々の浸透圧条件における精子運動率を測定した。

②アユカケ精子を用いて、凍結防止剤の種類およびその濃度, 凍結速度, 到達温度を調べ、精子凍結条件を調べた。

## 4. 研究成果

(1)水温低下の実験区②および④において異型精子の形成は確認できたが、一定水温の実

験区①および③では精子形成が正常に進行していないため異型精子の形成も確認できなかった。これより、一定水温により精子形成が正常に進行しないため、異型精子が形成されないと考えられる。よって、精子形成に伴い異型精子は必ず形成されることから、異型精子欠如個体の作出は困難であると判断した。

(2)海産カジカの異型精子の形態も円盤状を呈し、淡水カジカの異型精子と比べて長径が有意に大きかった。海産カジカの異型精子においても、淡水カジカ類と同程度の合成能を有することが明らかとなった(図1)。これより、異型精子の性ステロイド合成能は、淡水産および海産カジカともに見られる機能であると考えられた。今後は、これら性ステロイドホルモンの繁殖における役割を明らかにすることが、異型精子の未知の機能の解明に繋がると考えられる。

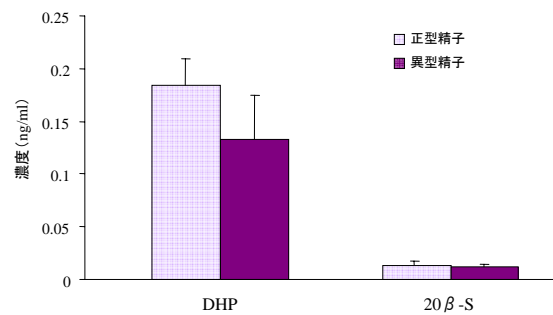


図1. ケムシカジカ(海産カジカ)異型精子の性ステロイド合成能

(3)①両側回遊型または湖封型の淡水カジカ類(カジカ中卵型・小卵型・ウツセミカジカ)の精子は淡水よりも少し高い浸透圧付近(0~200mOsm/kg)で、降河回遊型のアユカケは

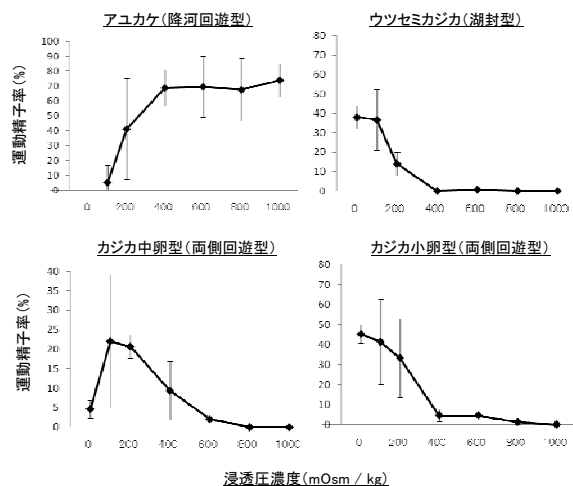


図2. 淡水カジカ類の精子運動特性  
汽水から海水に相当する400~1000mOsm/kg

で高い運動精子率を示した（図2）。これより、種々の生活史をもつ淡水カジカ類の精子運動特性が明らかとなった。

②アユカケの正型精子は凍結保存溶液（10% DMSO/FBS）で液体窒素液面から10cmの高さに固定して-50℃まで冷却後、液体窒素に保存した。その結果、2009年では、精液量が十分に回収できなかったため凍結前の運動精子率の測定はできなかったが、凍結後も運動精子率は約89%と高かった。2010年では、凍結前で49.1%、解凍後は39.8%（凍結前に対する相対比は81.0%）の運動精子率であった（図3および4）。

これらの凍結精子を用いて人工授精を行った結果、2009年から約1年間長期保存した凍結精子および2010年の短期間保存した凍結精子のいずれを用いても、正常な発生が確認され、稚魚まで成長することが確認できた。しかし、人工授精時の成否を左右する発眼率やふ化率は、解凍後運動精子率よりも媒精した卵の卵質（過熟卵率）によって大きく影響を受け、過熟卵率が7%以上では発眼率は低下した（図5）。

これより、カジカ類において初めて精子凍結保存条件および凍結精子を用いた人工授精法を明らかにすることができた。しかし、人工授精を成功させるには、過熟卵が少ない卵を用いて授精させることが重要であることが示唆された。

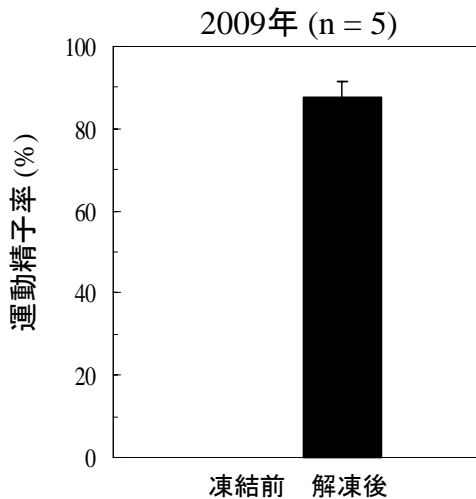


図3. アユカケ精子の凍結前および解凍後の運動精子率(2009年)

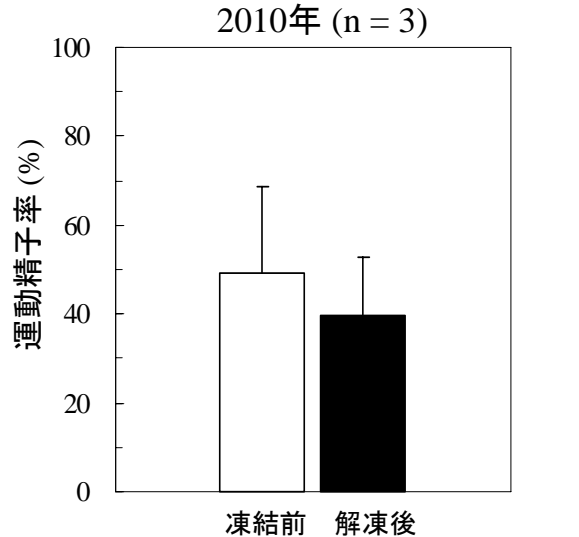


図4. アユカケ精子の凍結前および解凍後の運動精子率(2010年)

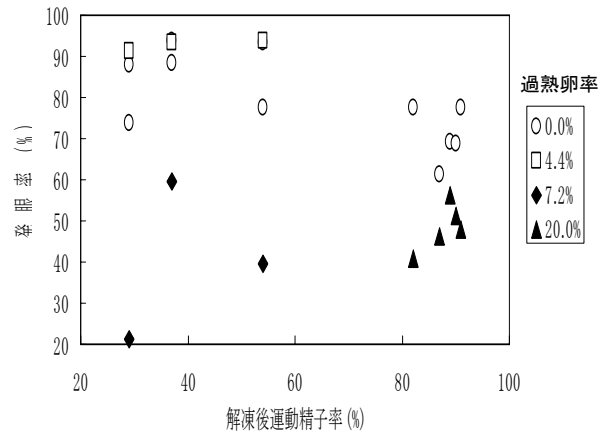


図5. 凍結精子を用いた人工授精における、解凍後運動率と発眼率および過熟卵率との関係

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Tahara, D., R. Hatano, H. Iwatani, Y. Koya, Y. Hayakawa. Annual changes in testicular development and occurrence of parasperm in the male reproductive organs of fourspine sculpin, *Cottus kazika*. Ichthyological Research, 査読有, Vol. 57, 2010, 62-70.

〔学会発表〕（計9件）

- ① 田原大輔, 九頭竜川のアラレガコ伝統文化, 福井県立大学地域経済所研究フォーラム, 2010年11月26日, 福井県立大学.
- ② 谷口怜・田原大輔, 淡水カジカ類の精子

- 運動特性，第5回繁殖生理生態研究会，2010年11月13日，千葉科学大学。
- ③ 田原大輔・谷口怜・伊藤史章・太田博巳，アユカケ凍結精子による人工授精，平成22年度日本水産学会秋季大会，2010年9月22日，京都大学。
  - ④ 伊藤史章・田原大輔，カマキリの精子凍結保存技術の開発。第4回繁殖生理生態研究会，2009年11月15日，福井県立大学臨海研究センター。
  - ⑤ 田原大輔，アラレガコ的生活史と九頭竜川～アラレガコの伝統文化とは？～，応用生態工学会 第8回北陸地区ワークショップ in 福井，2009年10月30日，福井県立大学。
  - ⑥ 古屋康則・川代一誠・田原大輔・山家秀信・早川洋一・藤井亮吏，カジカ（小卵型）雄における性成熟に伴う腎臓組織の変化と繁殖期の尿中に見られる糖タンパクについて，平成21年度日本水産学会春季大会，2009年3月29日，東京海洋大学。
  - ⑦ 谷川有里・田原大輔・宗原弘幸・早川洋一・古屋康則，海産カジカ類の一種、ケムシカジカの異型精子における性ステロイド合成，平成21年度日本水産学会春季大会，2009年3月28日，東京海洋大学。
  - ⑧ 田原大輔・羽田野亮・石川貴之，淡水カジカ類の異型精子における性ステロイドホルモン合成，第79回日本動物学会，2008年9月7日，福岡大学。
  - ⑨ 谷川有里・田原大輔，カジカ中卵型オスの精子形成に及ぼす光周期および水温の影響，第3回繁殖生理生態学会，2008年6月21日，岐阜大学フィールド科学教育研究センター 位山演習林。

[その他]

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/youhei1029/index1.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田原 大輔 (TAHARA DAISUKE)

公立大学法人 福井県立大学海洋生物資源学部・講師

研究者番号：20295538