

サワガニ精子の微細構造

川崎医科大学 解剖学教室

佐藤 國 康

(昭和51年9月30日受理)

Fine Structures of Spermatozoa from the Common
Fresh-water Crabs, *Potamon (Geothelphusa) dehaani*

Kuniyasu SATOH

Department of Anatomy Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 30, 1976)

サワガニの雄および雌から得た精子を電子顕微鏡、走査電子顕微鏡および細胞化学的に光学顕微鏡で観察した。精子は半球形をした acrosomal complex, コップ状の核と核由来の nuclear processes から作られ、その表面は限界膜で包まれている。先体はその中央部に多数の microtubules を含む中心孔を持ち、頭部に非常に電子密度の高い先体蓋 (acrosomal lid) をかぶっている。先体はPAS反応により強く染色されるが、中心孔は同反応に陰染色性を示す。核は acrosomal complex の近くに vacuole, convoluted membranes を有し、内層部の核質は微小な顆粒状であり、表層部および nuclear processes では繊細な繊維状、管状の構造を示す。また雄のカニより得た精子は中等度の電子密度をもった capsule で包まれているが、雌からの精子は capsule を持っていない。

Spermatozoa from male and female common fresh-water crabs were observed with electron and scanning electron microscope and with light microscope by cytochemical methods. The spermatozoon consists of a half spherical acrosomal complex, a cup-shaped nucleus and its derivatives, nuclear processes. The outer surface of each spermatozoon is covered with a limiting membrane. The acrosome consisting of electron-dense substance has a central canal containing many microtubules in its central portion and is covered with an acrosomal lid of high electron density on its head. Each acrosome is stained strongly with PAS reaction, however the central canal containing microtubules exhibits PAS negative stainability. The nucleus contains vacuole and convoluted membranes near the acrosomal complex. Karyoplasm of the inner part exhibits fine granular structures and that of the cortical part and the nuclear processes shows thin fibrous and tubular form. The spermatozoon from a male crab encloses with a capsule of moderate electron density, but one from a female crab has no capsule.

甲殻類の精子の構造に関する研究業績は数多くあり、精子の形は放射状あるいは星形であることが報告されている。モクズガニ *Eriocheir japonicus* の精子は桐山 (1958), 春次 (1960) Yasuzumi (1960) により、その微細構造の観察がなされている。*Procambarus clarkii* の精子については Moses (1956, 1961a, 1961b), ザリガニ *Cambaroides japonicus* の精子については山本ら (1960), Lee (1964), Yasuzumi et al. (1966) の報告がある。*Callinectes sapidus* (Brown, 1966), *Nephrops norvegicus* (Chevaillier et al., 1965) の精子の微細構造もすでに観察がなされている。Chevaillier (1967) は 3 種の甲殻類すなわち *N. norvegicus*, *Eupagurus bernhardus*, *Carcinus maenas* の精子を比較観察している。甲殻類の精子は一般に知られる有尾精子と異なり、その前端中央部のよく発達した acrosomal complex, これをとり包むコップ状の核および核の外方に伸びる突起 (偽足又は腕) から作られる特異な形であることは上記諸報告に共通していることである。

本研究では未だ報告を見ない純淡水産のカニ、サワガニの精子の構造を電子顕微鏡、走査電子顕微鏡および細胞化学的方法により観察したのでその結果を報告する。

材 料 と 方 法

岡山県御津町で採集したサワガニ *Potamon (Geothelphusa) dehaani* WHITE の成体の雄の輸精管および雌の受精嚢内の精子を使用した。カニより採取した輸精管、受精嚢を氷冷磷酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒド内で細切し、同液で 30 分間前固定した。磷酸緩衝液で 30 分間洗浄後、氷冷磷酸緩衝 1% オスミック酸 (Millonig, 1962) により 60 分間後固定した。固定後、エタノール系列により脱水、Luft (1961) の方法に従ってエポンに包埋した。連続超薄切片を作製し、酢酸ウランと Reynolds (1963) のクエン酸鉛で二重染色の後、日立 HS-9 電子顕微鏡で観察した。

上記材料の一部は固定および脱水の後、酢酸アミルに入れ、臨界点乾燥法 (高野ら, 1974) により試料を作製し、日立 HHS-2 R 走査電子顕微鏡で観察した。

また精子の塗抹標本を作り、ブアン氏液で固定し、PAS 反応, Feulgen 反応を行なって光学顕微鏡により観察した。

結 果

図 1 および図 2 に示すようにサワガニの精子は前後に平たく、側方に広がる円盤形である。前正面からはそれは円形に観察され、その直径は約 $7.4\mu\text{m}$ で、前後は約 $4.3\mu\text{m}$ である。そして前端中央部に半球形の acrosomal complex, この acrosomal complex をとり巻くコップ状の核、および核の突起, nuclear processes から構成されている (図 1, 図 2, 図 3)。

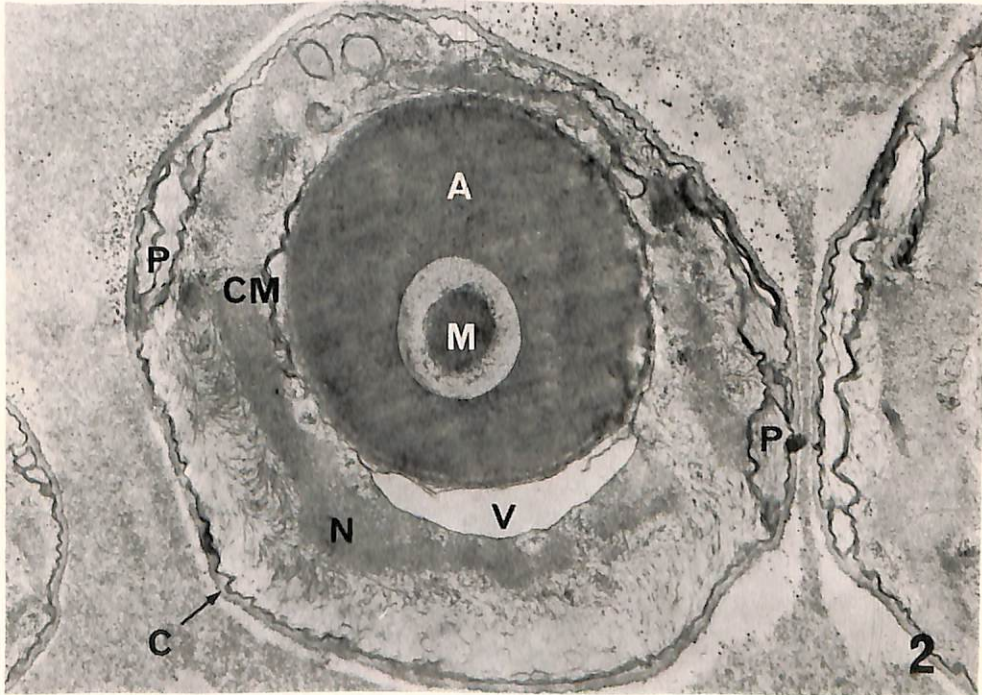
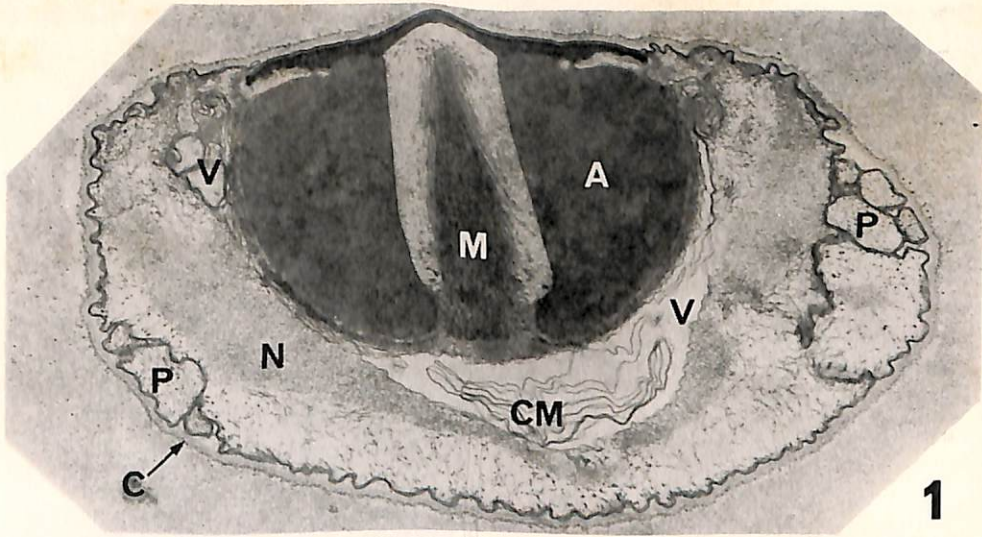


Fig. 1. Electronmicrograph of a longitudinal section through a spermatozoon from a male *Potamon*, showing the spermatozoon covered with a capsule (C). An acrosome (A) has a central canal involving many microtubules (M) and is covered with an acrosomal lid. A cup-shaped nucleus (N) contains a large vacuole (V) involving convoluted membranes (CM). Karyoplasm exhibits thin fibrous and tubular structures in the marginal part. P, nuclear processes. $\times 14,200$.

Fig. 2. Electron micrograph of a cross section of a spermatozoon of a *vas deferens* from a male crab. A ring-shaped acrosome (A) is surrounded by a nucleus (N) containing a vacuole (V) and convoluted membranes (CM). Nuclear processes (P) and many microtubules (M) are visible. Note a capsule (C) enclosing the spermatozoon. $\times 12,600$.

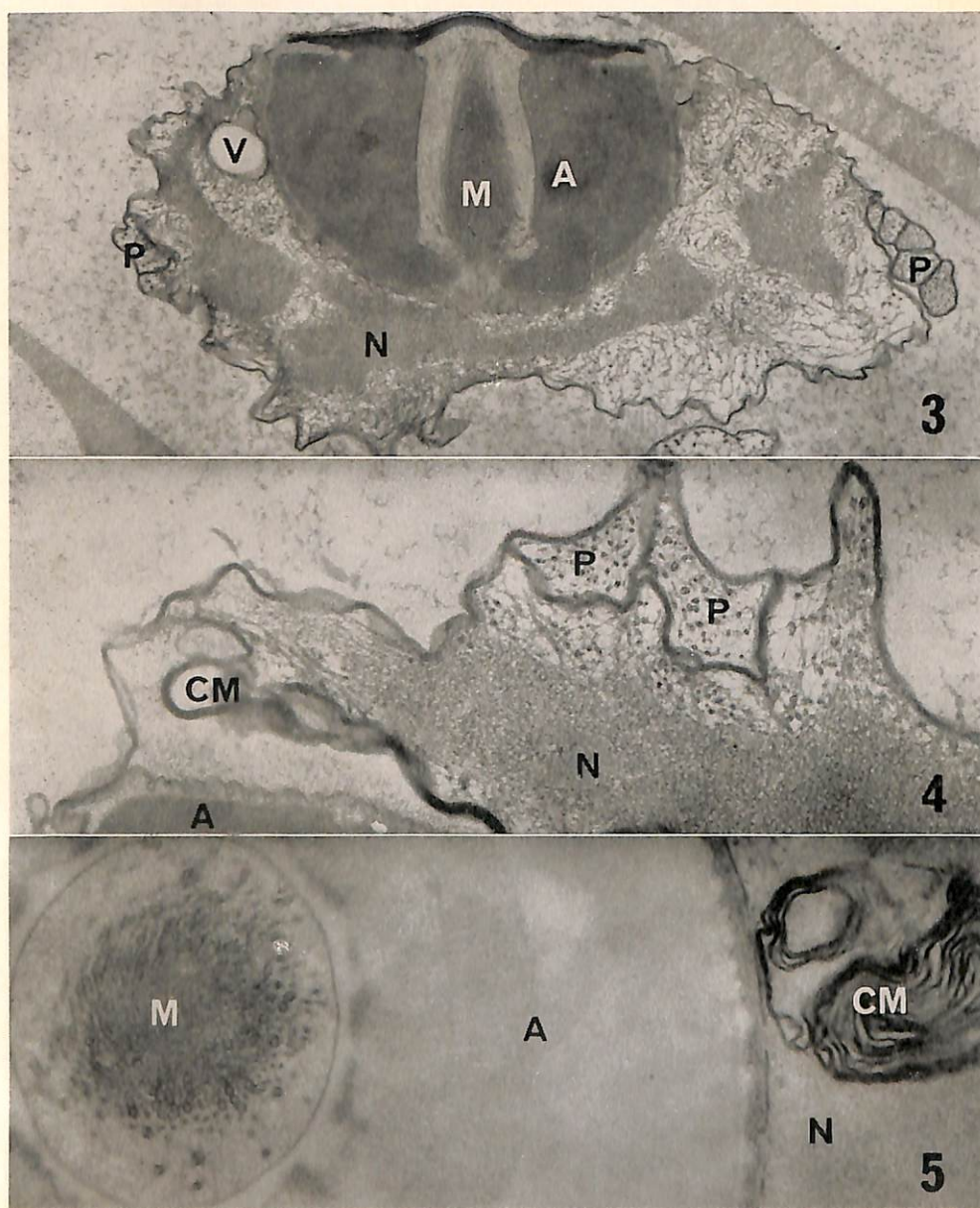
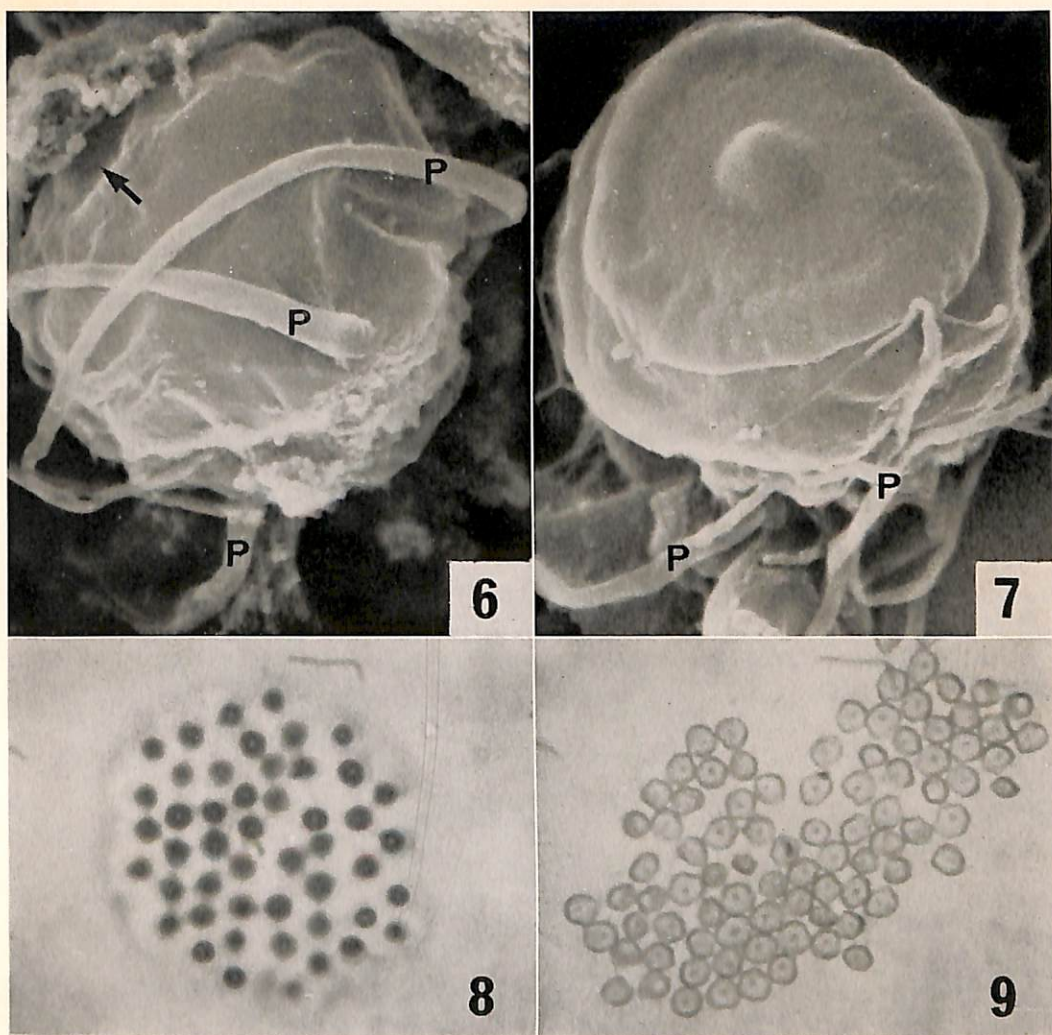


Fig. 3. Electronmicrograph of a longitudinal section of a spermatozoon of a seminal receptacle from a female crab. The spermatozoon has no capsule. A half moon-shaped acrosomal complex is surrounded by a cup-like nucleus (N) and nuclear processes (P). An acrosome (A) contains many microtubules (M) and is covered with a high electron-density acrosomal lid. V, vacuole. $\times 14,200$.

Fig. 4. A part of a longitudinal section of a spermatozoon from a female crab. The karyoplasm consists of fine granular elements and that of peripheral part of nucleus (N) and nuclear process (P) exhibits thin fibrous and tubular form. A, a part of acrosome. CM, convoluted membranes. $\times 38,100$.

Fig. 5. A central part of a cross section of a spermatozoon from a male crab. The



acrosomal contents exhibit an inner reticular structure and an outer amorphous one. Many microtubules (M) and convoluted membranes (CM) are visible. N, nucleus. A, acrosome. $\times 38,600$.

Fig. 6. Scanning electron micrograph of a spermatozoon from a female crab. Three nuclear processes (P) are seen. The surface of the spermatozoon is relatively smooth. A cone-shaped protrusion of the acrosomal lid is visible (arrow). $\times 12,700$.

Fig. 7. An oblique frontal view of a spermatozoon from a female crab in a scanning electron microscope. A cone-shaped protrusion is seen in the central portion of an acrosomal lid. Several nuclear processes (P) are seen. $\times 13,000$.

Fig. 8. Photomicrograph of spermatozoa from a female crab, showing the acrosomes stained strongly with PAS reaction. The one third of the acrosomes show ring-shaped form. $\times 780$.

Fig. 9. Photomicrograph of spermatozoa from a female crab, showing the nuclei stained with the Feulgen reaction. The nuclei are mostly ring-shaped form. $\times 780$.

acrosomal complex は精子内部に丸い半球形であり、円筒状の先体、先体の中心軸を貫通する直径約 $1\mu\text{m}$ の中心孔および先体蓋 (acrosomal lid) から構成されている (図 1, 図 2, 図 3)。円筒形の先体は電子密度の高い物質から作られ、中心孔をとり巻く内層部では網状構造、外層部では一様な構造を示す (図 1, 図 5)。中心孔は電子密度の低い物質で満たされ、長さ $2.3\mu\text{m}$ に及ぶ多数の microtubules を含んでいる (図 1, 図 3)。この 1 本の microtubule の径は約 27nm あり、周囲の基質よりやや電子密度の高い物質を含んでいる (図 5)。先体頭部を覆う先体蓋はその中央部に前方に突出する小さな円錐形の突起を持ち電子密度の高い 2 つの層から作られている (図 1, 図 3)。外層は非常に電子密度が高く、厚さはほぼ一定で約 28nm であり、その表面は約 12nm の膜で覆われている。内層はその電子密度は高いが、厚さは一様ではなく、中心の円錐状突起部では薄く約 45nm 、先体に接する部分では約 120nm の厚さを有し、辺縁部では薄くなり先体から離れている。先体は P A S 反応に強く染まり、環状に観察されるが、Feulgen 反応は陰反応を示す (図 8, 図 9)。また先体中心軸の中心孔の基質および microtubules は P A S 反応に陰性である (図 8)。

核はその表面を電子密度の高い限界膜で包まれ、膜の厚さは約 20nm で先体外表面の膜より少し厚い (図 4)。この限界膜は電子密度の低い層を内部に持つ三層構造 (図 4) を示し、nuclear processes 表面の膜および上記先体蓋上の膜と連続している (図 1, 図 3)。核質はその内層部では電子密度中等度の顆粒状構造であり、表層および nuclear processes 内では細い繊維状、管状の構造を示している (図 1, 図 2, 図 3, 図 4)。核と acrosomal complex との境界付近に三日月型の vacuole, convoluted membrane が観察される (図 1, 図 2)。これらの構造は雌のカニから得た精子では退縮的であり、核質と中心孔内基質は境界膜をうしない直接接している (図 3)。

nuclear processes は切片像では斜断あるいは横断されて観察され、連続超薄切片観察からはその数は $8\sim 10$ 本であり、核表面の限界膜と連続する膜で包まれる。図 6 に示すように nuclear process は長い突起で表面は比較的滑らかである。

雄のカニより得た精子は図 1 および図 2 に示すようにその周囲を約 70nm の capsule で包まれているが、雌からの精子はこの capsule は見られない (図 3)。

考 察

サワガニ精子の acrosomal complex は半球形であり、その構造上の特徴から 3 部分、すなわち円筒形の先体、先体中心を貫く中心孔および先体の前端を覆う先体蓋 (acrosomal lid) に区別される。この構造は *Callinectes sapidus* (Brown, 1966) の “acrosomal region” の構造と酷似している。他の甲殻類、*Procambarus clarkii* (Moses, 1961a, 1961b), ザリガニ、*Cambaroides japonicus* (山本ら, 1960, Lee, 1964, Yasuzumi et al, 1966) では先体はコップ状であり、モクズガニ、*Eriocheir japonicus* (桐山, 1958, 春次, 1960, Yasuzumi, 1960) の場合は前方に開いたコップ状であり、サワガニの円筒形とは異なっている。P A S 反

応の結果、精子内で染色されるのは先体であり (Yasuzumi, 1960, Brown, 1966), サワガニではこの円筒形の部分が強く染められるので、他の甲殻類と同様の物質から作られた先体と考えられる。先体蓋は非常に電子密度の高い外層およびそれより少し電子密度の低い内層から作られている。この外層と内層は *C. sapidus* (Brown, 1966) の “Apical cap” と “subcap zone” に相当する。そして外層はモクズガニ *E. japonicus* (Yasuzumi, 1960) における “dense band” および *C. japonicus* (Yasuzumi et al., 1966) の “hornlike process” に類似している。先体蓋の内層は *C. sapidus* の “subcap zone” よりも電子密度が高くしかも外層と密に接し、一つの蓋状の構造を形成するので、先体蓋の一つの構成員と考える。*C. sapidus* の場合と同じく、サワガニの先体は中心孔をもち、その内に多数の microtubules を有している。この中心孔内の基質と microtubules はPAS反応に陰性であるので先体とは別の物質から構成されると考えられる。

サワガニ精子の核はコップ形であり、これは桐山 (1958), 春次 (1960), Yasuzumi (1960) Moses (1956, 1961a, 1961b), 山本ら (1960), Lee (1964), Yasuzumi et al. (1966), Brown (1966) の報告に示される核, *Carcinus maenus* (Chevaillier, 1967) の核と同形である。Feulgen 反応に陽反応を示すので, deoxyribonucleoprotein を含み核であることは疑う余地はない。

サワガニ精子において nuclear processes の膜と核の限界膜とは一続きの膜であり、その内容の微細構造は核内の構造と酷似していることから、この nuclear processes は他の甲殻類の精子と同様、核からの突起である。その数は *P. clarkii* (Moses, 1961a, 1961b) では4本、*C. sapidus* (Brown, 1966) では8本であるが、サワガニの精子ではそれより多く、8～10本の nuclear processes を観察した。観察した多くの標本ではこの突起は精子表面に付着して観察される。

核内に見られる convoluted membranes, vacuole は他種甲殻類の場合と同様である。Yasuzumi et al. (1966) はザリガニ *C. japonicus* では精子成熟と共にこの convoluted membranes が退縮消失することを示した。サワガニの場合でも輸精管内の精子は受精囊内の精子より多量の convoluted membranes を含むので、この膜は精子の成熟と共に退縮すると考えられる。

以上のべたようにサワガニは他種甲殻類と同様に、一般の有尾精子とは異なる特異な形態を示す精子を持っている。

稿を終わるにあたり、有益なる御助言をいただいた川崎医科大学生物学教室、松本邦夫教授に深謝の意を表します。なお本研究の一部は川崎医科大学、昭和49年度プロジェクト研究費でおこなわれた。

文 献

- Brown, G.G. (1966) Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*. J. Ultrastruct. Res. 14 : 425-440.
- Chevallier, P. (1967) Mise en evidence et etude cytochimique d'une proteine basique extra-nucleaire dans les spermatozoides des crustaces decapodes. J. Cell Biol. 32 : 547-556.
- and Maillet, P. L. (1965) Structure fine et constitution cytochimique du spermatozoide de la langoustine *Nephrops norvegicus* L. (crustace decapode). J. Microscopie 4 : 679-700.
- 春次政明 (1960) 電子顕微鏡による甲殻類の精子形成過程の研究。奈医誌, 11. 82-94。
- 桐山増太郎 (1958) 甲殻類の精子形成過程の電子顕微鏡的研究。奈医誌, 9. 269-276.
- Lee, K. J. (1964) The fine structure of the crayfish mature sperm. J. Nara Med. Ass. 15 : 243-250.
- Luft, J. H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 : 409-414.
- Millonig, G. (1962) Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. Electron Microscopy, Fifth Intern. Congr. Electron Microsc. Academic Press, U.S.A. 2 : p-8.
- Moses, M. J. (1956) Studies on nuclei using correlated cytochemical, light, electron microscope techniques. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2 : Supple. 397-406.
- (1961a) Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). I. Structural characterization of the mature sperm. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9 : 222-228.
- (1961b) Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*) II. Description of stages. J. Biochem. Cytol. 10 : 301-333.
- Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208-212.
- 高野行夫, 幡場良明, 長谷川与一 (1974) 臨界点乾燥法。細胞 6 : 81-87.
- 山本浩司, 石橋俊元, 岡田好則, 大住弥三一, 小石友宏, 高田明 (1960) 甲殻類のアクロゾームの形成及び成熟精子について。奈医誌. 11 : 851-859.
- Yasuzumi, G. (1960) Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy, VII. Spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7 : 73-78.
- and Lee, K. J. (1966) Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XVI. The microtubular structure and sites of thiamine pyrophosphatase activity in premature sperm of the Japanese crayfish. Z. Zellforsch. 73 : 384-404.