

## カブラハバチにおける精巢内未成熟精子を用いた顕微授精

島山 正統・大石 陸生

### Masatsugu HATAKEYAMA and Kugao OISHI: Intracytoplasmic injection of testicular spermatid into oocytes of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera)\*

Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

カブラハバチは昆虫で唯一、卵細胞質内精子注入法 (ICSI法) によって顕微授精が可能な実験系であり、成虫雄の貯精囊から取り出した精子を蒸留水に懸濁して成熟未受精卵に顕微注入すると10-20%が受精する (Sawa and Oishi, 1989a)。最近、ヒトを含むいくつかの哺乳類ではICSI法を利用して、成熟精子だけでなく精巢内精子、精細胞あるいは精母細胞にも受精能があることが示されている (Ng *et al.*, 1996; Mansour, 1998; Yanagimachi, 1998)。カブラハバチでも精細胞 (round spermatid) を成熟未受精卵に顕微注入すると低い頻度 (約1%) ではあるが、卵核とは独立に発生に参加して半数体の雄キメラ個体を生じる (Hatakeyama and Oishi, 1997)。そこで、精子変態過程のいくつかの段階にある精細胞および未成熟精子を精巢から取り出し、成熟未受精卵に顕微注入してその発生参加能、受精能を調べた。実験には、マーカー突然変異として蛹期の脂肪体の色に関する突然変異 (*yfb*: yellow fat body) と胚発生3日目以降区別のできる眼色の突然変異 (*cec*: cream eye color) を用い、また必要に応じて、子孫検定を行って注入された精細胞由来の核の発生参加を確認した。

精巢内での精細胞は発生段階によって特徴的な形態をしており、位相差顕微鏡下で区別ができる。蛹化直後 (PCF5) の精巢内ではほとんどの精細胞は球形をしており (round spermatid)、この時、すでに減数分裂を完了しているといわれている (Sugiura and Sawa, 1993)。蛹中期 (PCF7) になると頭部、尾部が伸長し始め、細胞質を放棄し始める (elongating spermatid)。羽化直後の成虫 (PCF10-11) では伸長が終了し、運動性のない針状の未成熟精子 (elongated spermatid) が大部分を占めている。

体色が *yfb* で眼色が野生型の雄 (*yfb*; +) の蛹から round spermatid、および elongating spermatid を取り出して0.15 M NaCl に懸濁し、体色が野生型で眼色が *cec* の雌 (+/+; *cec/cec*) から得た成熟未受精卵に顕微注入した。3日目胚の眼色が着色したものを、注入された精細胞由来の核が発生に参加したものとして選別した。round spermatid および elongating spermatid をそれぞれ285卵、356卵に顕微注入したところ5.3%、2.5%の胚で眼が着色した。最終的に2.2%、1.1%が蛹にまで成育し、その性と表現型を調べると全てが半数体サイズの雄で、精細胞由来、卵由来の両方のマーカー突然変異をもつキメラ個体であった。子孫検定の結果、これらのキメラ雄個体は半数体であることが確認された。しかしながら、これらの段階の精細胞の顕微注入では、受精個体 (二倍体雌) は全く得られなかった。一方、elongated spermatid を用いると、顕微注入された297卵のうち1.7%は眼が着色して蛹まで成育し、全て受精した二倍体の雌で、半数体キメラは全く得られなかった。elongated spermatid を0.15 M NaCl ではなく蒸留水に懸濁した場合には、注入された374卵のうち12%で眼が着色し、7.5%が二倍体の雌になったが、0.5%は半数体雄キメラであった。elongated spermatid の顕微注入によってキメラが得られたのは、これらを蒸留水に懸濁したために、浸透作用によってその形態が著しく変化し、elongated spermatid と elongating spermatid を区別できずに顕微注入したためだと考えられる。

成熟精子の顕微注入では、あらかじめ卵を付活しておいた場合、受精率が約2倍になる (Sawa and Oishi, 1989b)。また、蒸留水に懸濁することによる精子細胞膜へのダメージが受精率の上昇に関係している (Sawa and Oishi, 1989a)。そこで、round spermatid および elongating spermatid を付活した卵に注入したが、受精卵は得られず、半数体キメラ雄の出現頻度も上昇しなかった。また、凍結・融解によって精細胞の細胞膜にダメージを与えて注入しても、受精率やキメラ出現頻度には変化がなかった。

\* Abstract of paper read at the 34th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, May 21-22, 1998 (Mikawa, Aichi).

Table 1 Stage dependent potential difference of spermatid on participation in development.

	Developmental stage			
	PCF5	PCF7	PCF10-11	Adult
Morphology of spermatid	round spermatid	elongating spermatid	elongated spermatid	mature sperm in spermathecae
Suspended in 0.15 M NaCl	haploid male chimeras	haploid male chimeras	fertilized diploid females	fertilized diploid females
Suspended in distilled water	N.D.	N.D.	fertilized diploid females	fertilized diploid females

N.D.: not done

以上の結果から、精子変態過程中の精細胞および未成熟精子の発生参加の様式は、その変態過程の段階の違いで、異なることがわかった (Table 1)。round spermatid や elongating spermatid は卵核と独立に半数体のまま発生に参加するが、受精能はない。一方、elongated spermatid には受精能があるが、卵核と独立には発生参加しないことが示された。カブラハバチの精子変態過程でおこる顕著な変化のうち、何が発生参加様式の違いに関係するかは、今のところ不明である。キイロショウジョウバエでは、染色体蛋白質のヒストンからプロタミンへの置換が、精子伸長が完了する前後におこるといわれており (Das *et al.*, 1964; Russell and Kaiser, 1993)、これはカブラハバチ精細胞の発生参加の様式が変化する時期にあたる。染色体蛋白質の置換が精細胞発生参加能、受精能と関連があるのかもしれない。

#### 引用文献

- Das, C.C., B.P. Kaufmann and H. Gay (1964) *Exp. Cell Res.*, **35**, 507-514.  
 Hatakeyama, M. and K. Oishi (1997) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **32**, 39-40. (in Japanese).  
 Mansour, R. (1998) *Human Reprod. Update*, **4**, 43-56.  
 Ng, S.C., A. Bongso and A. Trounson (1996) *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, **8**, 171-177.  
 Russell, S.H. and K. Kaiser (1993) *Genetics*, **134**, 293-308.  
 Sawa, M. and K. Oishi (1989a) *Zool. Sci.*, **6**, 557-563.  
 Sawa, M. and K. Oishi (1989b) *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **203**, 450-453.  
 Sugiura, M. and M. Sawa (1993) *Jpn. J. Genet.*, **68**, 464.  
 Yanagimachi, R. (1998) *Human Reprod.*, **13** (Suppl.), 87-98.