

雄性発生の細胞学的メカニズムについて

古丸 明 (三重大学生物資源学部)

Cytological Mechanism of Androgenesis in *Corbicula* Clams

Akira KOMARU

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

The androgenesis is unique developmental mode found only in stick insect and hermaphroditic *Corbicula* species. We investigated the process of the meiosis and fertilization of androgenesis to know the cytological mechanism of androgenesis. At the first meiosis the axis of meiotic spindle was parallel to the egg surface. This orientation was due to the alternation of attachment sites of centrosomes. The centrosomes at meiotic pole were attached to the egg cortex in androgenetic species. At later stage of first meiosis the cytoplasm around the centrosomes protruded. All chromosomes and centrosomes at spindle pole were extruded as two first polar bodies. We conducted the cytochalasin experiment of eggs to prevent the polar body formation. In cytochalasin treated eggs, the second meiosis occurred. Female pronuclei were formed and process of first mitosis was observed. These results suggest that androgenesis may be generated from the ancestral type with normal meiosis by the alternation of the attachment site of the centrosomes. The polyploidy was found in *Corbicula* species. We suggest the possible ploidy elevation hypothesis from diploids to triploids and tetraploids.

(accepted January 23, 2006)

雄性発生は卵由来の染色体をすべて極体として放出し、精子核のみで発生する非常に特殊な様式である^{1,2)}。本稿ではこの特殊な雌雄同体シジミの雄性発生過程を細胞学的に解明しようとして行なったいくつかの実験を中心に紹介していきたい。

雄性発生過程の観察

まず、雄性発生過程について、概説する。貝類では放出された直後の卵は第一分裂中期であることがわかっている (Fig. 1-1, Fig. 2-1)。第一中期では2つの星状体は卵の表層に近い所に位置しており、紡錘体の向きがセタシジミやマガキなどとは異なり、完全に卵の表面と平行になっているのが特徴である。第一減数分裂後期における、染色体の分離は正常であった (Fig. 1-2, Fig. 2-2)。第一分裂後期において、しだいに星状体付近（中心体付近）の細胞質が突出するようになつた (Fig. 1-3, Fig. 2-3)。染色体はこの突出部の先端を

占めるようになった。さらにこの突出部は細くなり、基部に細胞質分裂がおこり (Fig. 2-4)、極体が二個同時に形成された (Fig. 1-4)。

雌性前核は形成されず、1個の雄性前核のみが細胞質のなかに存在している状態となった (Fig. 1-5)。この雄性前核は膨潤し (Fig. 1-6)、次第に染色体状にクロマチンが凝縮し、第一卵割を経て (Fig. 1-7, -8)、二細胞期 (Fig. 1-9) へと至った。

通常、向き合った星状体からの微小管が交叉する部位に分裂溝が形成される。しかし極体形成過程においては、1個の星状体から放射される扇状の構造のみで分裂溝を形成する事ができるようである (Fig. 2-5, -6)。内側の星状体の存在は必ずしも極体形成時の細胞質分裂面を決定するのには必要ないのであろう。さらに中心体とすべての染色体は2個とも極体中に放出され、第二分裂の紡錘体は形成されなかった。したがって第一分裂時にすべての染色体と中心体が放出さ

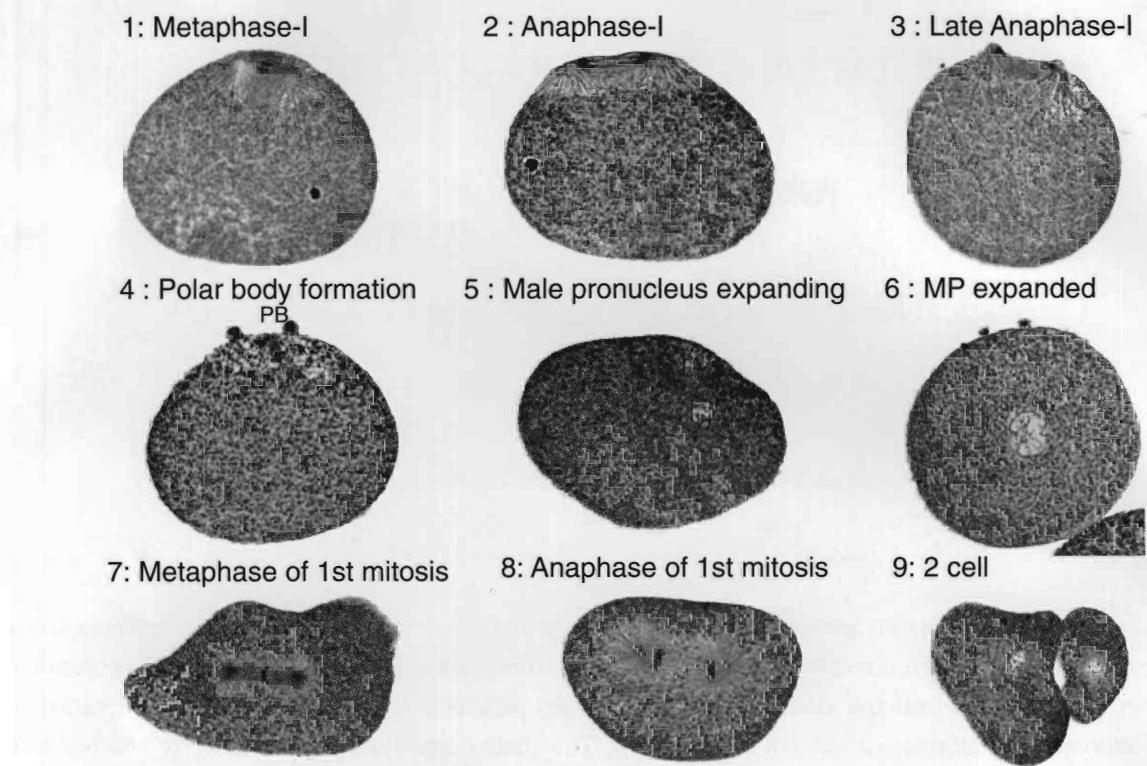


Fig. 1. シジミ *Corbicula leana* 受精卵の雄性発生過程 (Bouin 固定, 6 μm パラフィン切片 HE 染色). 1: 第一減数分裂中期, 2,3: 第一後期, 4: 第一極体形成, 5,6: 雄性前核膨潤期, 7: 第一卵割中期, 8: 第一卵割後期, 9: 二細胞期 (Scale: 50 μm).

れてしまうことが明らかになった。以上の過程を模式的にまとめて Fig. 3 に示した。

この過程において、紡錘体が横向きになる事は、中心体の位置に起因している事が明らかになっている。Fig. 1-1, Fig. 2-1 に示したように雄性発生過程における減数分裂紡錘体は、卵表層にはりついたような形になっている。一方、両性生殖種セタシジミの減数分裂過程においては、片側の中心体のみが表層に位置しており (Fig. 4-1)、その結果、紡錘体軸が卵の接線と垂直になっていた³⁾。この中心体が卵の表層に付着するメカニズムについては、微小管をプラス端から脱重合させるモータータンパクが卵表層部位にあり、そのため中心体が引き付けられるようになると思われる。このモータータンパクの分布する部位はセタシジミでは動物極付近に一ヶ所のみであろう。しかしマシジミとタイワンシジミでは、この部位が拡大あるいは複数形成されることによって、紡錘体両端の中心体とも卵表層にひきつけられるため (Fig. 4-2)、紡錘体が完全に卵の接線に平行になっている。このことが雄性発生の引き金になっているようである。

サイトカラシン処理による知見

極体放出を阻害してこの中心体と染色体を細胞質内

にとめたらどうなるであろうか。第一分裂後に第二分裂がおきるのではないかと考えた。極体形成を阻害するために、三倍体マシジミ受精卵にサイトカラシンを作用させた。すると、第一分裂後に 2 個の中心体が分離し 4 個となった。その結果、第二分裂において 2 個の二極型紡錘体、あるいは 1 個の四極型紡錘体が出現在した。さらにこれらの紡錘体の機能は正常で、染色体の分離も観察された。さらに複数の雌性前核も形成された⁴⁾。すなわち第二分裂を動かす仕組みは未だに「正常に」機能していることを示している。

このサイトカラシン処理実験の結果から、雄性発生は通常の減数分裂をおこなっているシジミに突然変異が起きて生じたと想定している。突然変異により減数分裂紡錘体の向きが変化し、1 回の分裂で卵由来のすべての染色体を 2 個の極体として同時に放出するような雄性発生に移行したと考えられる。ただし、雄性発生が起きる為には、卵の極体形成の変化だけでなく、精子形成過程にも変化がおきていないと染色体数が変化してしまう。

さらに興味深い事に、二倍体のタイワンシジミで同様な実験を行うと、正常な第二分裂紡錘体は出現しない⁵⁾。2 個の中心体は 4 個になるが、分離が不十分でしかも、微小管の放射が弱く、2 個の单星の星状体

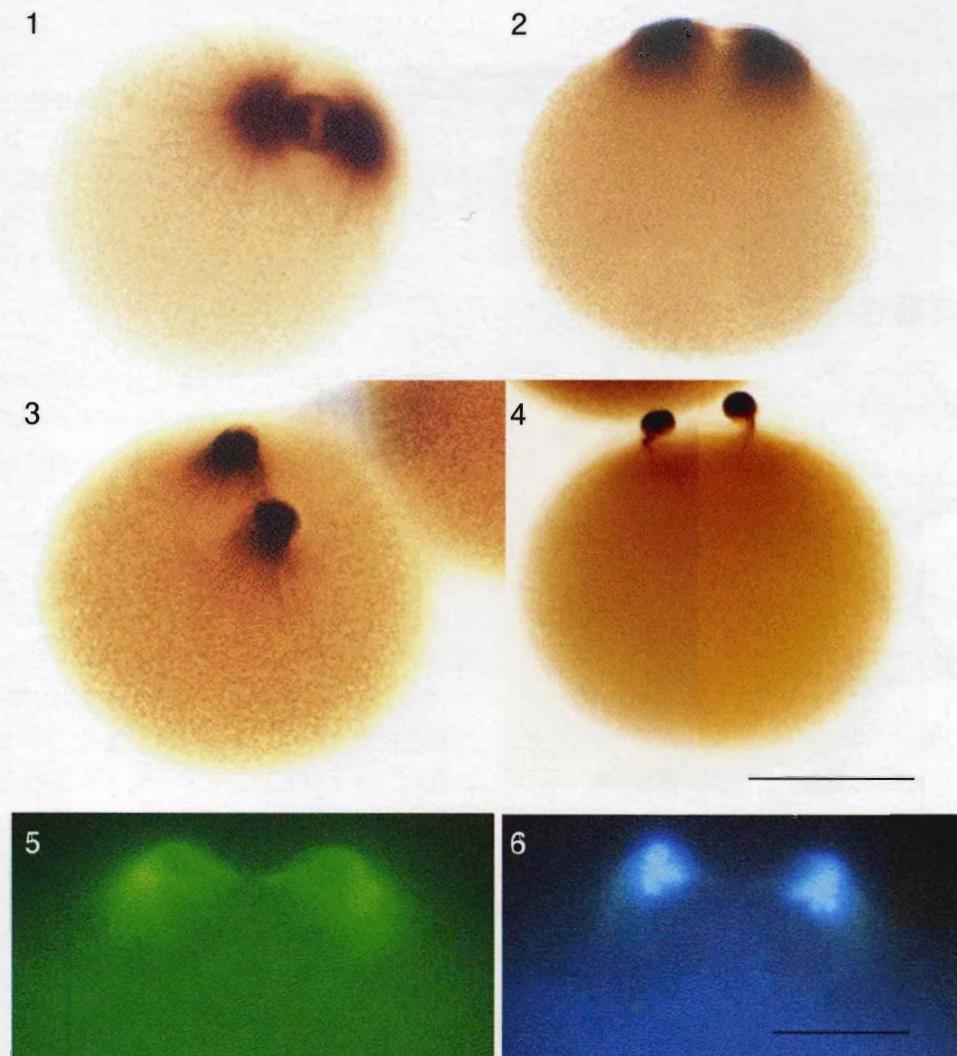


Fig. 2. マシジミ *C. leana* 受精卵雄性発生過程における微小管の変化 (α チューブリン抗体染色 whole mount 標本). HRP 発色 (1-4), FITC (5), DAPI (6). 1: 第一減数分裂中期, 2: 第一後期 (early stage), 3: 第一後期 (late stage), 4: 第一極体形成, 5, 6: 第一減数分裂後期.

が見られるのみである。この事は雄性発生に移行してある程度時間が経過すると、次第に第二分裂を支配している因子は機能を失っていくことを示している。第二分裂を支配する因子は雄性発生に移行した時点で機能的な制約が第二分裂に関しては緩くなっているのであろう。従って、機能的制約が極めて強いとおもわれる減数分裂を支配する遺伝子群も、雄性発生に移行した時点で、第二分裂に関しては、制約を部分的に失い変化がおこりやすくなっていることが想定される。一方、三倍体においては、第二分裂は全く問題なく正常に機能している。この結果の不一致については後述する。

雄性発生と倍数体

単為発生、あるいは雌性発生する生物においては、

必ずといって良い程、倍数体が出現する⁶⁾。雄性発生シジミにおいても例外では無かった。当初、雄性発生は三倍体のマシジミにのみ起こった特殊な発生方法だと考えていた。調査の過程で、三倍体のみならず、二倍体、四倍体に遭遇する事になった。四川大学の石安靜教授の御協力で四川省安岳県の淡水産真珠の養殖場に生息するシジミ入手した (Fig. 5)。これらの核型を見ると (Fig. 6)、同質三倍体、同質四倍体らしい⁷⁾。タイワン⁸⁾、琵琶湖水系⁹⁾、利根川河口域⁵⁾においては二倍体と三倍体が同所的に分布していた。また、精子DNA量を顕微蛍光測定法で測定した結果、いずれも非減数精子が形成されていることが判明した。

またこれらのシジミはすべて雌雄同体であり、鰓内で幼生が哺育されていた。いずれの倍数体においても、雄性発生をしている可能性が高い。さらに日本

国内の利根川、琵琶湖疏水のタイワンシジミも雄性発生する事が確認されている⁵⁾。すなわち、いずれの倍数体も雌雄同体、自家受精、雄性発生していることになる。これらの倍数体はどのように生じたのであろうか。

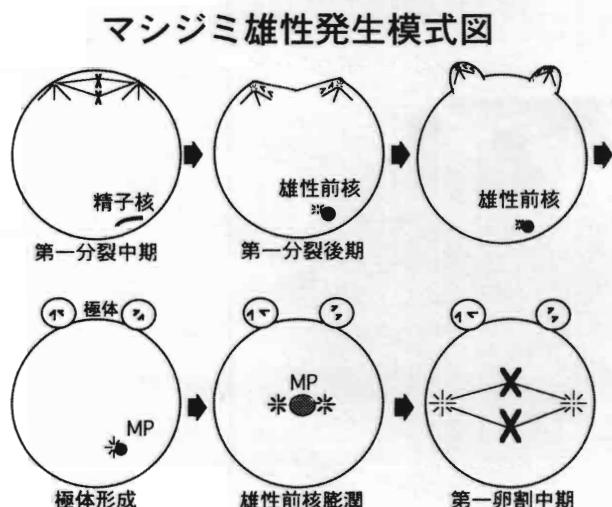


Fig. 3. 雄性発生模式図

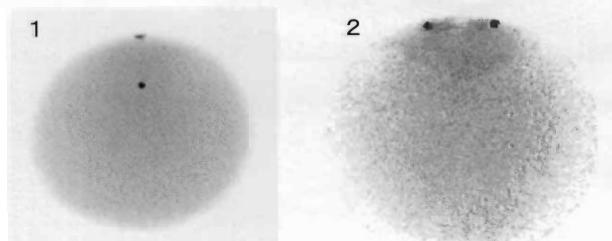


Fig. 4. 未受精卵第一減数分裂中期像 (γチューブリン抗体による中心体免疫染色). whole mount 標本.
1: セタシジミ *Corbicula sandai*, 2: タイワンシジミ *C. fluminea*. (小幡氏提供)

二倍体雄性発生観察中にみられた「異常な発生」について

利根川で採集されたタイワンシジミ二倍体を材料として産卵誘発を行った。多くの卵は雄性発生過程をへて発生した。第一分裂時にすべての染色体が放出されるので、卵内には1個の雄性前核しか観察されない。ところが、一部の卵で、極体形成時に「異常」がみられた (Fig. 7)。すべての染色体が放出されずに、一部の染色体が卵内に残り、引き続いて第二分裂がおきたのである。さらに第二分裂によって、第二極体と雌性前核が形成された。この雌性前核は理論的には半数体である。また雄性前核も形成されたが、これは非減数精子由来の二倍体である。これらの前核が正常に融合すれば、三倍体として発生する事になる¹⁰⁾。このような卵が常に生じているかについては、例数が少なく、さらに検討が必要である。しかし一つの重要な示唆を与える。すなわち、同じ親から産まれた卵であっても、二倍体と三倍体が生じうる事を意味している。さらに片方の極体が形成されず、染色体が卵内に留まつた場合には、二倍体の雌性前核も生じうる。この場合には四倍体となる。いずれにしても雄性発生シジミにおいては非常に簡単に、倍数性を上昇させる事が可能であるということになる。倍数性によって、減数分裂の際の乗り換える頻度が異なっているとすれば、三倍体はクローリン発生で、二倍体、四倍体は非クローリン発生をしているということもありうる。各地の雄性発生シジミの倍数性を調査していると、必ずと言っていいほど、二倍体と三倍体が同所的に分布している^{5,8,9)}。意外に頻度高く、倍数性の変化が起こっていると考えた方が良さそうである。

倍数性が上昇する意味?

単為生殖する生物では、倍数性を回復させるため、様々な過程が知られている。卵の第一減数分裂が省略される場合、第二分裂が省略される場合、卵割が省略される場合等、種によって様々である¹¹⁾。また、減数分裂に入る前に染色体の複製がおこり、非減数卵を形

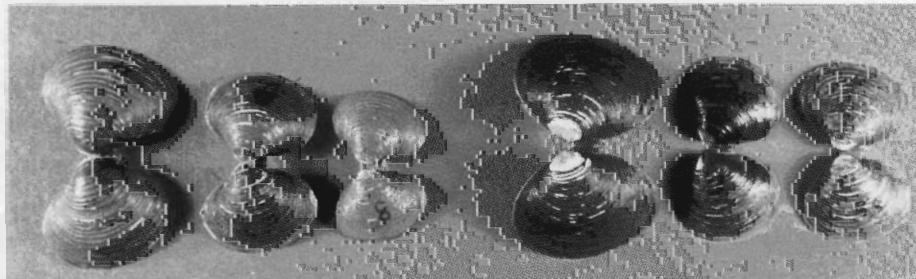


Fig. 5. 四川省安岳県の淡水産真珠養殖場で採集されたタイワンシジミ. (左3個体は三倍体, 右3個体は四倍体)

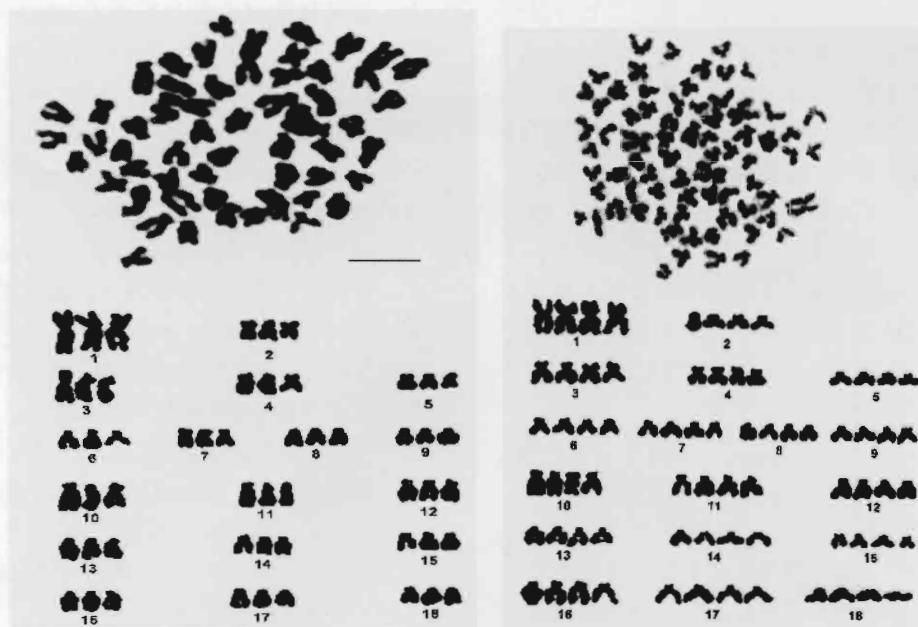


Fig. 6. 四川省安岳県で採集されたタイワンシジミの核型。左:三倍体 右:四倍体 スケール 10 μ m

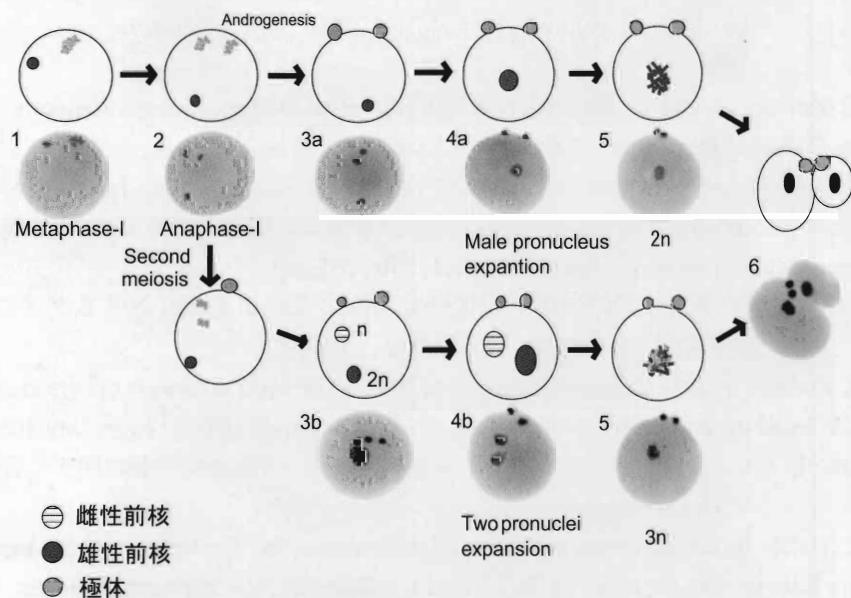


Fig. 7. 利根川で採集されたタイワンシジミの雄性発生過程。上段は通常の雄性発生、下段は雌性前核が形成された卵を示す。第一卵割期には両者は区別できなくなる。

成する場合も知られている。いずれの場合も形成される配偶子の遺伝的な組成は異なってくる。従って、単為発生だからといって一括りにしてしまうのは危険である。単為発生すなわちクローニング発生を意味していない。しかし、単為発生では他個体から遺伝子を受け取らないので、概して有性生殖と比較して遺伝的変異性には乏しい。

一度生じた突然変異は、クローナルな発生をするタイプにおいては、取り除かれる事はない。時間とともに

に有害な遺伝子が増えていく一方である。そのため機能的な遺伝子の数を保つために、倍数性を上昇させるという考えも提唱されている。倍数性が高くなればなるほど、同じ遺伝子座の数は増える訳である。有害な変異が蓄積しても、倍数化して機能的な遺伝子の数が増えれば、その遺伝子が完全に機能を失うまでには時間がかかる¹²⁾。

サイトカラシン処理実験の結果では、第二減数分裂が正常に起こるかどうかは倍数性によって結果が異

なっていた。すなわち、三倍体では、第二減数分裂が起きていたのに対し、二倍体タイワンシジミではすべての実験例で、第二分裂は正常ではなかった。これも倍数性を上昇させる事で機能的な遺伝子を実質的に確保するという仮説を支持する状況証拠の一つにはなるであろう。もっとも長い時間を経れば、次第に三倍体でも第二分裂は正常でなくなっていくであろう。また、倍数性を上昇させる事にも細胞学的な限界があるはずである。五倍体以上のシジミはいまだ報告されていない。倍数性が上がり過ぎると生理的に問題が生じるのであろう。

精子形成過程は？

卵の極体形成過程だけではなく、精子形成過程にも変化がおきていないと雄性発生による繁殖は成立しない。何故ならば、精子形成過程における減数分裂がスキップされて、体細胞と同じ染色体数になっていない

と、染色体数が変化し正常に発生しない可能性が高いからである。精子形成過程においては、三倍体マジミにおいて精母細胞の分裂後期像と思われる異常な像が多数観察された（吉丸未発表）。染色体が分離した後、細胞質分裂が正常におきていないと判断される像は観察されたが、決定的な根拠はまだつかめていない。精母細胞の分裂時にも紡錘体の軸が変化し、それが収縮環の形成に影響を与え、細胞質分裂不全につながっているのではないか、と考えている。雌雄同体個体における一つの突然変異により、中心体の位置が変化し、卵減数分裂が雄性発生となり、精子形成過程においては非減数精子の形成になっているというのが現在の仮説である。卵形成過程、精子形成過程、同じ突然変異によるものか、異なる別の突然変異によるものかを明らかにする為には、精子形成過程の精査があらためて必要であると考えている。

文 献

- 1) Komaru, A., T. Kawagishi and K. Konishi (1998) Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. Dev. Genes Evol., 208 : 46-50.
- 2) Komaru, A., K. Ookubo and M. Kiyomoto (2000) All meiotic chromosomes and both centrosomes at the spindle pole in the zygotes discarded as two polar bodies in clam *Corbicula leana*: unusual polar body formation observed by antitubulin immunofluorescence. Dev. Genes Evol., 210 : 263-269.
- 3) 小幡麻友・西森克浩・吉丸 明 (2006) 中心体付着部位の変化によっておこるタイワンシジミ *Corbicula fluminea* の雄性発生 セタシジミとの比較. 貝類学雑誌, (印刷中).
- 4) Ishibashi, R., A. Komaru, K. Ookubo and M. Kiyomoto (2002) The second meiosis occurs in cytochalasin D treated eggs of *Corbicula leana* even though it is not observed in control androgenetic eggs. Dev. Biol., 244 : 37-43.
- 5) 石橋 亮 (2003) 移入シジミ及び日本産シジミの初期発生過程と系統類縁関係に関する研究. 学位論文, 三重大学.
- 6) Dawley, R. M. (1989): An introduction to unisexual vertebrates. In "Evolution and ecology of unisexual vertebrates". Musium Bulletin 466, (eds Dawley R. M., and J. P. Bogart), New York state musium, New York, U.S.A.
- 7) Qiu, A., A. Shi and A. Komaru (2001) Yellow and brown shell colour morphs of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) from Sichuan province, China, are triploids and tetraploids. J. Shellfish Res., 20 : 323-328.
- 8) Komaru, A. and K. Konishi (1999) Non-reductional spermatozoa in three-shell colour types of the freshwater clam *Corbicula fluminea* in Taiwan. Zool. Sci., 16 : 105-108.
- 9) Ishibashi, R. and A. Komaru (2003) Invasion of *Corbicula fluminea* into the Lake Biwa-Yodo River system. Venus, 62 : 65-70.
- 10) Komaru, A., A. Kumamoto, T. Kato, R. Ishibashi, M. Obata and T. Nemoto (2006) Ploidy elevation hypothesis by formation of female pronucleus in the androgenetic *Corbicula fluminea* found in the Tone River estuary, Japan. Zool. Sci., (in press).
- 11) Cuellar, O. (1987) The Evolution of parthenogenesis: A historical perspective. In Meiosis eds by Moen P. B., Academic Press INC. Orland, Florida.
- 12) Hughes, R. (1988) A functional biology of clonal animals. Chapman and Hall, London. pp.331.