

## オオミノガ雄幼生期における生殖細胞内ミトコンドリアの 動態 (ダイナミクス)

松 崎 眞 人

抄録：オオミノガ雄幼生期の生殖細胞を材料に、電子顕微鏡を用いて、細胞分裂期におけるミトコンドリアの動態を研究した。細胞分裂期には、ミトコンドリアは極めて長く伸長し、棒状ないし竿状となり、後期ないし終期で両娘細胞を繋いでいる狭窄部を跨って存在していた。従って、棒状ないし竿状ミトコンドリアは細胞質分裂期に両娘細胞間の縊れ込み部でほぼ均等に二つに分割されることが考えられた。また精子形成過程において、急速なミトコンドリア数の増加は確認出来なかったが、ミトコンドリアの伸長による実質的な容積の増量が行われる事が考えられた。ミトコンドリアの網目構造は確認出来なかった。

キーワード：ミトコンドリア動態，電子顕微鏡的観察，オオミノガ雄幼生生殖細胞

### I. 序 論

ミトコンドリアは細胞における有気的エネルギー産生の装置であり、その構造、機能については古くから極めて多数の研究報告がある。しかしながら、その増加あるいは分裂に関する研究は近年になってから、HeLa細胞、酵母菌及び緑色植物細胞で行われ始めたに過ぎない<sup>1,2,3)</sup>。そしてこれらの研究のほとんどが蛍光蛋白質を利用した光線顕微鏡的な方法によるもので<sup>1,2,3,4,5,6,7,8)</sup>、電子顕微鏡を用いた詳細な形態学的研究報告は少ない<sup>9,10,11,12)</sup>。

筆者はオオミノガ雄幼生の生殖細胞を用いて、ミトコンドリアの動態、特に1)細胞分裂によりミトコンドリアが娘細胞へどの様に分配されるか、2)エネルギーを殆ど消費しないであろう精子細胞がエネルギーを多量に必要とする精子に分化する際に、ミトコンドリアがどの様に増加するかの2点について、電子顕微鏡を用い、ミトコンドリアの動態(ダイナミクス)の観察を行った。

### II. 材料並びに方法

オオミノガ(蛾)雄の幼生(*Eumeta variegata* SNELLEN)から精巣を摘出し、2%グルタル・アルデヒド液(ペロナール酢酸緩衝液)で前固定、さらに3%過マンガン酸カリウム液(同前緩衝液)

で後固定、別の試料では2%オスミウム酸で後固定をした。いずれの試料もアルコール上昇系列・プロピレンオキサイド浸透を経て、エポキシ樹脂にて包埋した。包埋試料は700ないし800Åの厚さで超薄切片とし、酢酸ウラニール液・酢酸鉛液の二重染色を行い、電子顕微鏡で観察撮影した。また、同試料から厚さ2μmの薄切標本を作製し、ハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色並びにトルイジン青液で染色し、光線顕微鏡用標本を作製した。

なお電子顕微鏡用試料の作製に当っては、光線顕微鏡標本を観察して、細胞分裂が行われている包埋試料を選択し、超薄切片を作製した。

### III. 結 果

既に精子形成が始まっている包埋試料が多かった中で、精原(あるいは精母)細胞の静止期及び細胞分裂期が見られた包埋試料を選び、光線顕微鏡標本を作製し観察した(写真1-a, b)。

精祖細胞(あるいは第1次精母細胞)では、ミトコンドリアは顆粒状で、特に核周囲の細胞質に多数認められる(写真1-a)。

減数分裂の第一(あるいは第二)分裂の中期では、ミトコンドリアは顆粒状を示さず、紡錘体の周囲に厚い雲状の様相をなして集積している(写真1-b)。

写真1-aの包埋試料から超薄切された電子顕微鏡

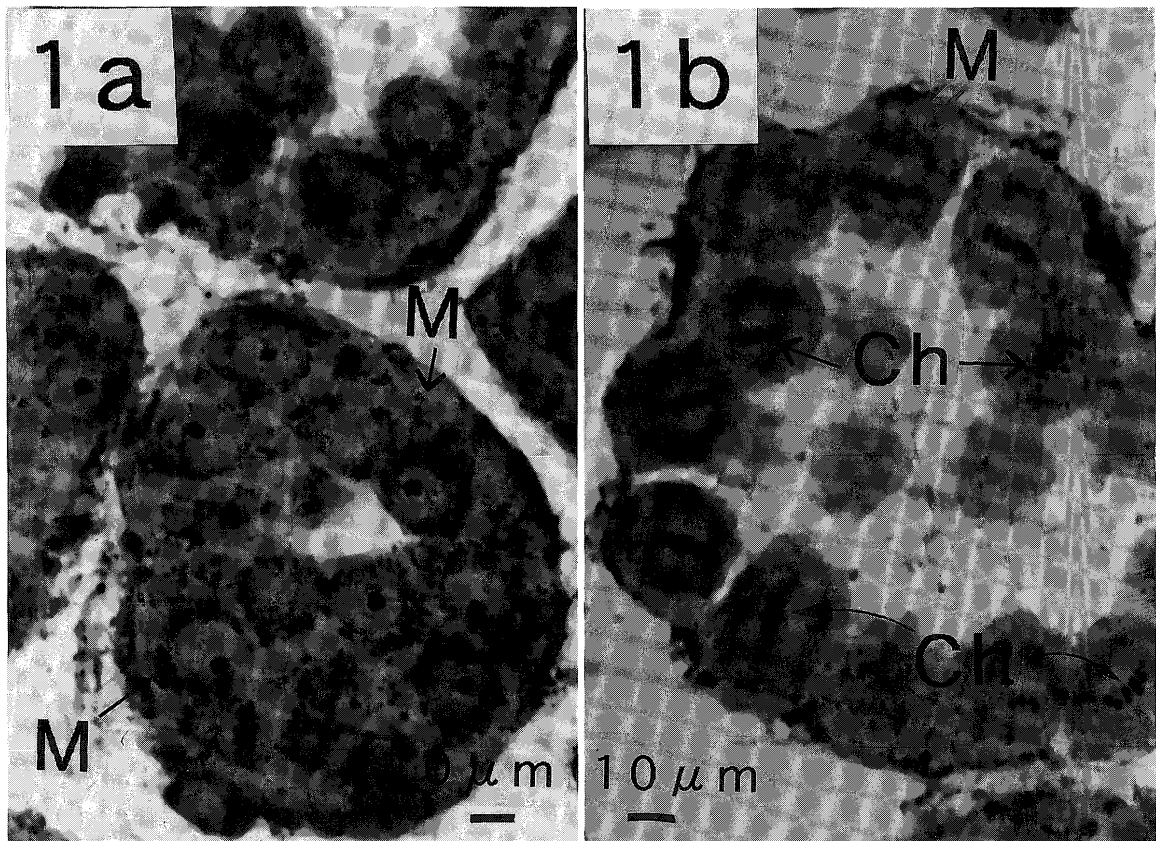


写真1 a; オオミノガ精細管内精祖細胞あるいは第1次精母細胞，顆粒状のミトコンドリア（黒粒）を核周辺に多数認める。M；ミトコンドリア  
1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，2 $\mu$ mの薄切標本，トルイジン青染色，600倍，光線顕微鏡写真。

写真1 b; オオミノガ精細管内第2次精母細胞，中期像，ミトコンドリアは紡錘体周辺に厚雲状に分布して認められる。粒状の様相を呈していない。  
M；ミトコンドリア，Ch；染色体  
1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，2 $\mu$ mの薄切標本，トルイジン青染色，600倍，光線顕微鏡写真。

写真では，顆粒状でやや電子密度の高い基質をもつミトコンドリアが細胞質に分散して認められる。ミトコンドリアの分裂や融合の姿は電子顕微鏡下の確認作業の結果では認め難かった（写真2）。

写真の中央部位で細胞質分裂の縊れ込み開始部が認められ，染色体が極で集合している減数分裂第一分裂後期の像では，ミトコンドリアは極めて長く伸びた棒状となり，その両端は両娘細胞に跨っていた。（写真3）。

減数分裂第一分裂後期の早い時期，染色体が二分して移動開始期の赤道板にやや平行する切断面で，ミトコンドリアは紡錘体の周囲に密集していて，細胞の表層領域には見られなかった（写真4）。また伸長して長くなったミトコンドリアの斜め切り面ないし輪切り面と考えられる像が見られた（写真4）。

減数分裂第一分裂後期，細胞質の縊れ目が深くなり，細胞質分裂が8割ないし9割方進行した状態では，極めて長いミトコンドリアが，両娘細胞を繋いでいる狭窄部，すなわち両娘細胞の連絡部位を通して，両娘細胞に跨っていた。またこの狭窄部位で長いミトコンドリアの分断像が見られた（写真5）。

減数分裂第二分裂中期では，ミトコンドリアは伸長して長棍棒状，アレイ状，さらに伸長して両端が膨らんだ竿状，竿状のものが湾曲した馬蹄状，さらに馬蹄状のものの両先端が融合してドーナツ（リング）状など，様々な形態をなした像が認められた。また一部のミトコンドリアには狭窄部位が見られミトコンドリア分裂の様相を示すもの，枝分かれした状態のものも存在した（写真6，7）。

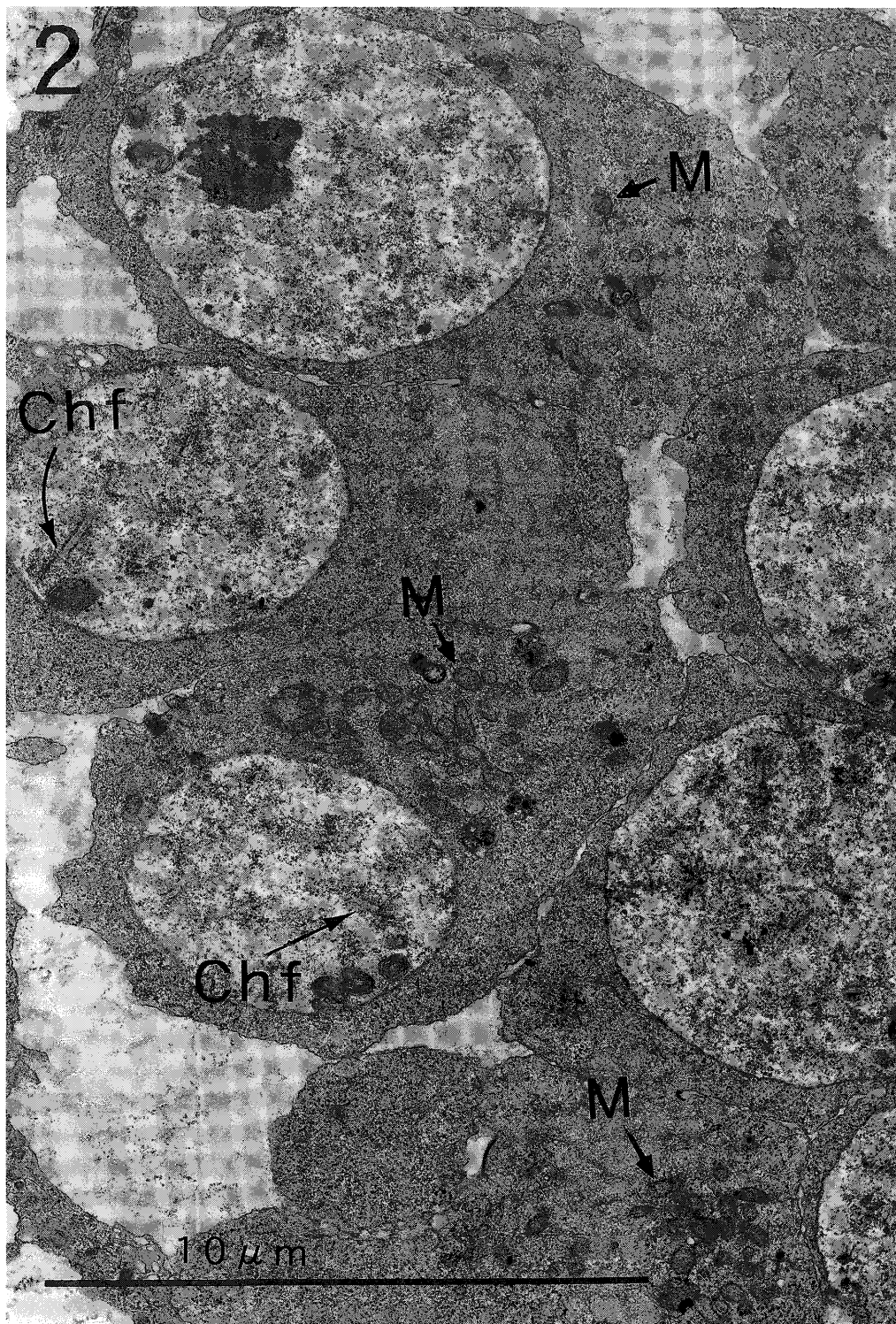


写真2；オオミノガ精細管内の精祖細胞あるいは第1次精母細胞，顆粒状のミトコンドリア（M）を細胞質内に認める。  
1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，超薄切標本，酢酸ウラニール染色，10000倍，電子顕微鏡写真。  
（Chf；染色体の中心部領域に見られる管状構造物の壁；名称不詳）

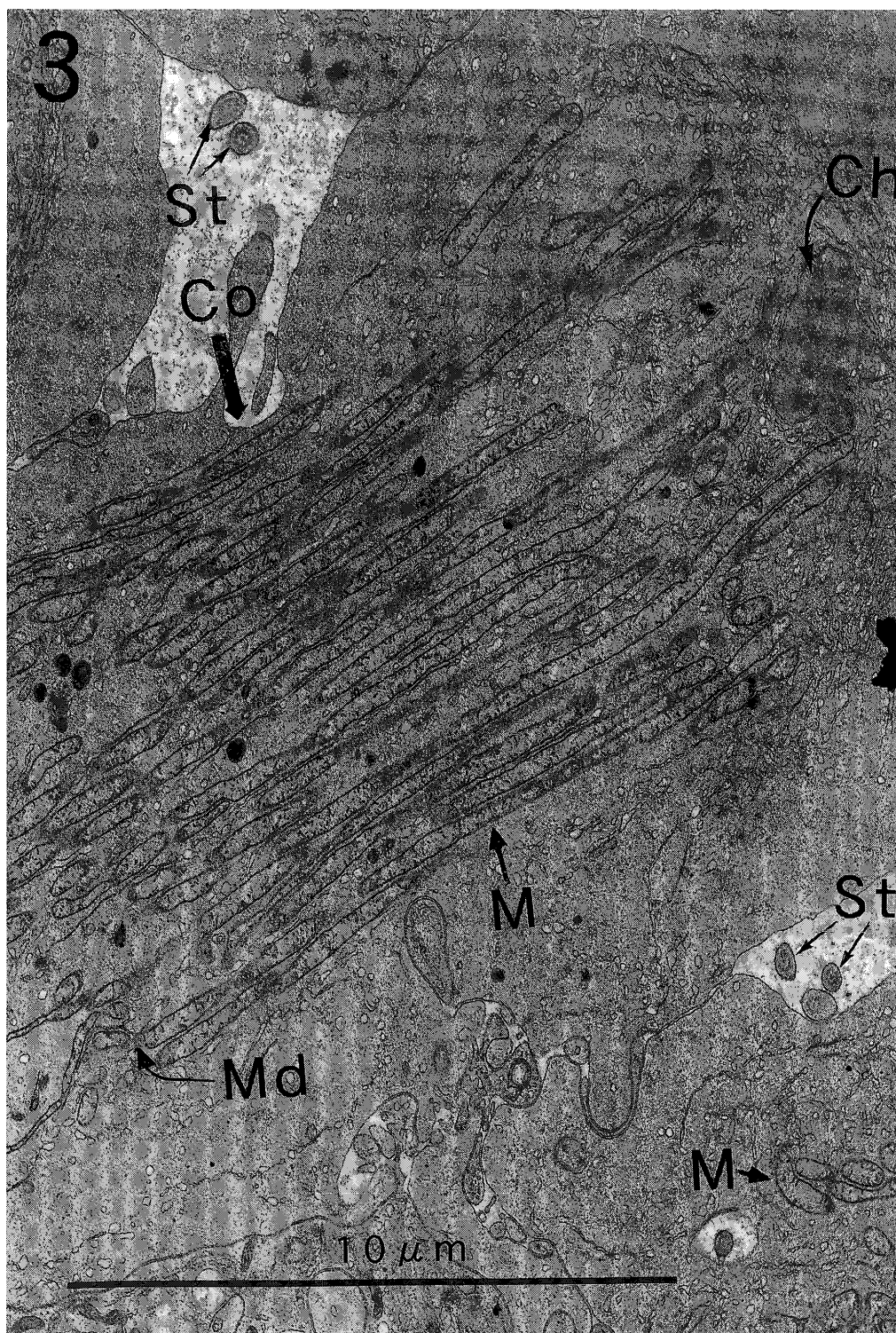


写真3；オオミノガ精母細胞，減数分裂の第1分裂後期像，右上に染色体（Ch）の集まりが認められる。細胞中心部に細胞質分裂のための縊れ込み（Co）の始まりが認められる。ミトコンドリアは極めて長い竿状となり，両娘細胞に達している。ミトコンドリアの分裂と考えられる像（Md）が見られる。

St；精子尾部の横断面

1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，超薄切標本，酢酸ウラニール染色，10000倍，電子顕微鏡写真。

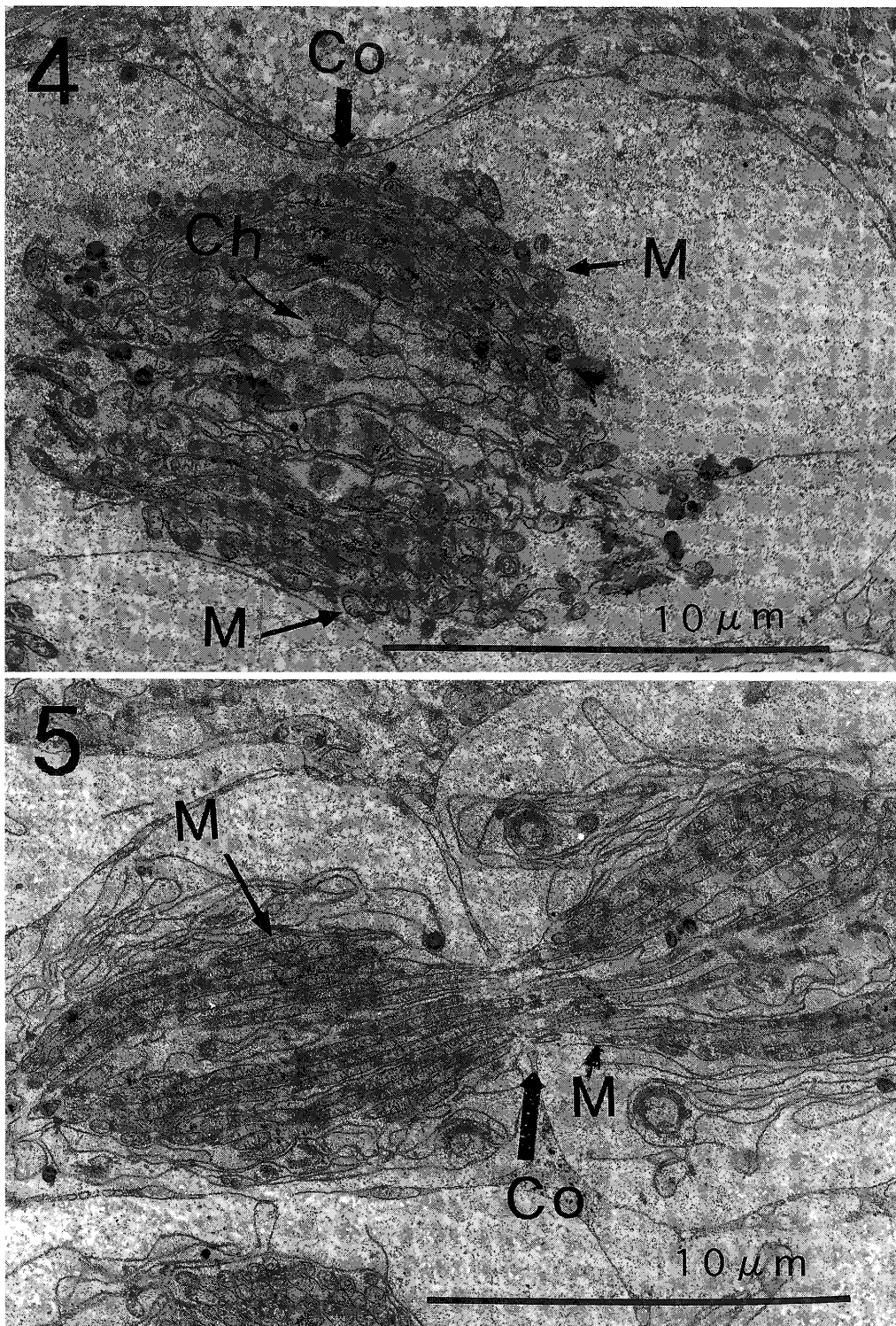


写真4；オオミノガ精母細胞，減数分裂の第1分裂中期像。紡錘体軸に並行するもやや斜めに切断された面，長いミトコンドリアの斜断面が多数見られる。ミトコンドリアは紡錘体の周囲に密集していて，細胞の周辺部位には見られない。

M；ミトコンドリア，Ch；染色体，

Co；細胞質分裂のための縊れ込み開始部。

3%過マンガン酸カリ液固定，酢酸ウラニール染色，7500倍，電子顕微鏡写真。

写真5；細胞分裂後期，細胞質の縊れ込みが8ないし9割に達している。両娘細胞が細い細胞質で未だ繋がっている。その繋がりの中に長棒状のミトコンドリアの中心部が認められ，一部切断されている像もある。M；ミトコンドリア

3%過マンガン酸カリ液固定，酢酸ウラニール染色，7000倍，電子顕微鏡写真。

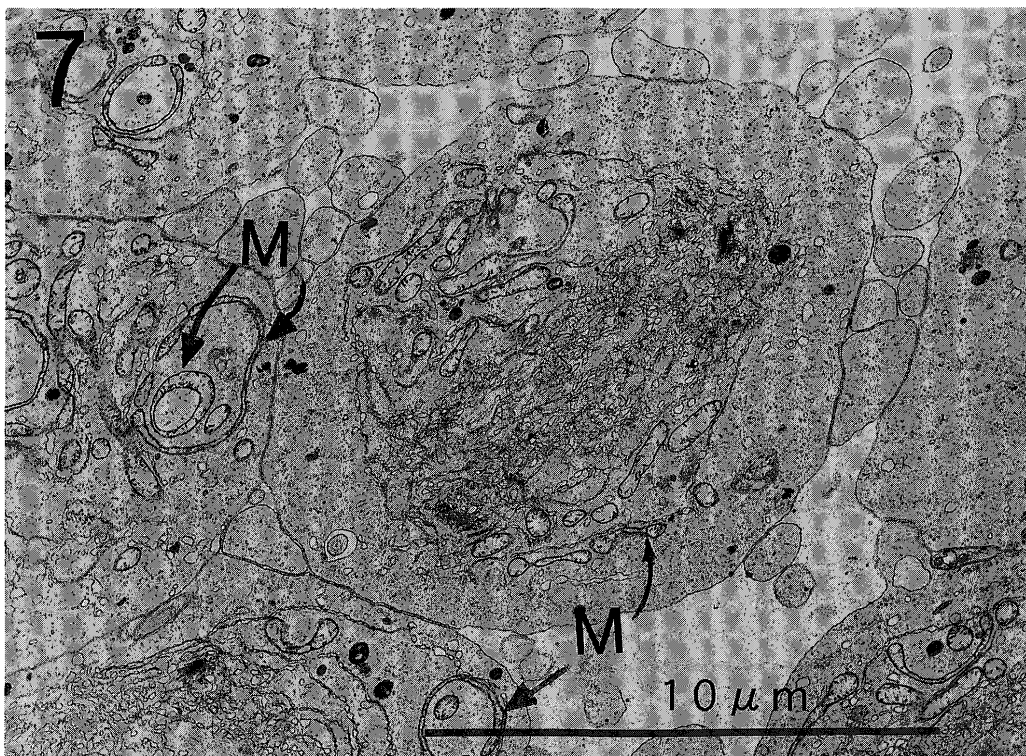
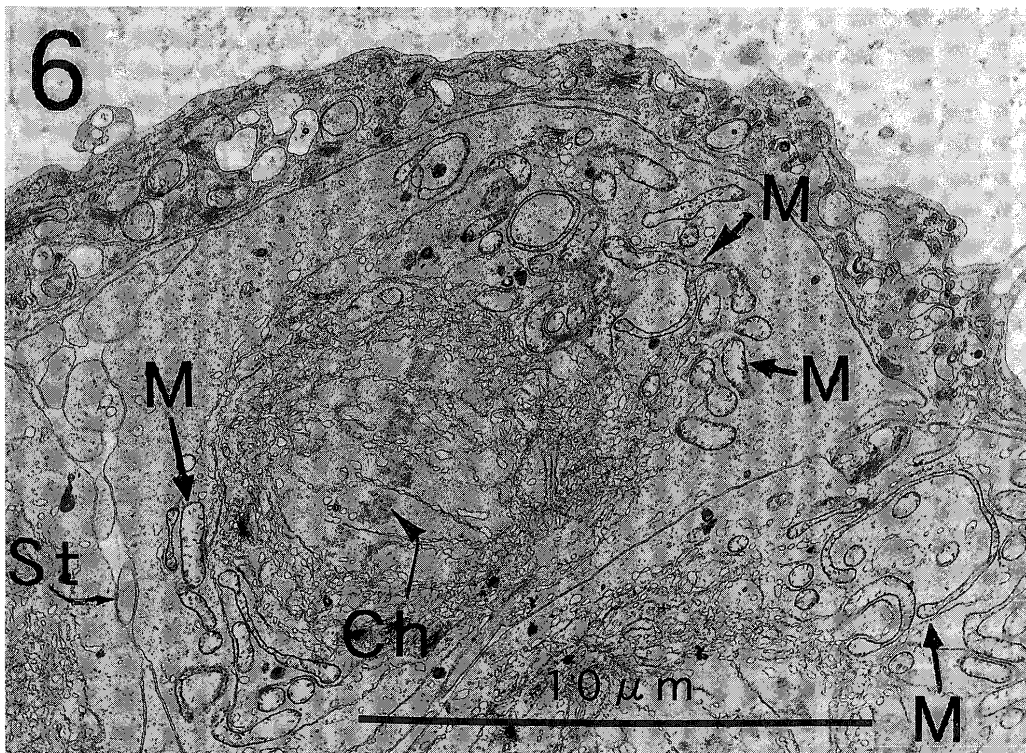


写真6；減数分裂第二分裂中期細胞の細胞両極を結んだ紡錘体軸に平行した切断面。  
1価染色体 (Ch) の分離が始まる時期と考えられる。  
1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，超薄切標本，酢酸ウラニール染色，7500倍，電子顕微鏡写真。

写真7；紡錘体の中心軸に直交した面で，細胞極近傍の像。  
オオミノガ第2次精母細胞，減数分裂（第2次分裂）中期像，ミトコンドリア (M) は多彩な形態，すなわち粒状，太い棍棒状，長い棒状，垂鈴状，馬蹄形状，ドーナツ（リング）状をなしている。  
1%オスミウム酸固定，エポキシ樹脂包埋，超薄切標本，酢酸ウラニール染色，7500倍，電子顕微鏡写真。

#### Ⅳ. 考 察

ミトコンドリアは細胞内における酸素呼吸の場であり、有気的エネルギー産生の装置であることは周知のことで、その研究報告は数えられない程多数存在する。しかしながら、ミトコンドリアの増加（あるいは分裂）に関する研究は少なく、近年になってHeLa細胞、酵母菌あるいは緑色植物細胞等を用いて、蛍光蛋白質を利用した光線顕微鏡による研究が盛んに行われるようになった<sup>1,2,3,4,5,6,7,8)</sup>。電子顕微鏡的にはミトコンドリアの分裂あるいは増加に関する、詳細な形態学的研究は少ない<sup>9,10,11,12)</sup>。

筆者は、下記の二つのことを目標に、電子顕微鏡的にミトコンドリアの動態を探究した。

研究目的の第1は、細胞分裂に際してミトコンドリアは二つの娘細胞へどの様に分配されるのか、すなわちイ) ほぼ均等に分配されるのか、もし均等に分配されるならばどのような方法をとるのか、あるいはロ) たまたま存在した細胞質内の位置によって適宜二つの娘細胞に分配されるのか、の探究であり、第2は、エネルギーを多量には必要としない細胞がエネルギーを多量に必要とする細胞へ分化する際に、ミトコンドリアはどの様に増加するののかの探究である。

この研究目的を達成するためには、組織中にはほぼ同じ分化状態にある細胞の存在のみならず様々な段階の細胞分裂像が多く観察される材料を選択しなければならない。オオミノガ幼生の精巣はそれらの条件を具備している。すなわち、オオミノガ幼生の精巣内には多数の精祖細胞、第1次および第2次精母細胞、精子細胞、精子などが存在し、精祖細胞の体細胞分裂像や精母細胞の減数分裂像が観察できる。また精子細胞から大きなエネルギーを必要とする精子への分化過程にある細胞の観察も可能である。ちなみにオオミノガ幼生は容易に入手でき、この研究を進める上で適切な生物試料であった。

本研究における観察の結果、第1の目的である細胞分裂時のミトコンドリアの分配に関しては、ミトコンドリアは存在した位置により適宜分配されるのではなく、企図的にほぼ均等に二分されることが考えられた。それを示すものとして、ミトコンドリアが長く伸長し、その両端が二つの娘細胞領域まで達していること、細胞質分裂が縊分法で行われる際に、細胞質が未だ繋がっている狭窄部位にも、ミトコン

ドリアの中間部位が存在し、幾つかのミトコンドリアが切れている像を示すものが見られることから、両娘細胞が繋がった狭窄部でミトコンドリアの切断が行われることが考えられた。また、ミトコンドリアが長く伸長する現象は、ミトコンドリアをほぼ均等に二分する手段と考えられた。

ミトコンドリアが伸長するという現象はショウジョウバエの精子形成時<sup>9)</sup>、副腎皮質の腫瘍細胞<sup>10)</sup>、肝細胞<sup>11)</sup>、ウニの卵母細胞<sup>15,16)</sup>等でも報告されている。しかしながらそれらミトコンドリアの伸長の度合いは、今回観察されたオオミノガのそれと比べようがないほど短いものである<sup>9,10,11)</sup>。また、ミトコンドリアの伸長と細胞分裂との関係には触れていない。さらに細胞分裂に際して、両娘細胞の中間部（縊れ込み部）を跨って、両娘細胞へ達しているという報告は未だ見当たらない。

ミトコンドリアの容積の増量に関しては、ショウジョウバエの精子形成時にミトコンドリアが融合してタマネギリング状をなすこと<sup>9)</sup>、またオオミノガの精子形成時にもミトコンドリアの増加が報告され、それらが集合したものが副核 (Neben kern) の名称で記載されている<sup>13,14)</sup>。今回は精子形成を開始する前の段階を主に観察した。長く伸長したミトコンドリアが多数観察できたことから、これらが集合して副核を形成することも考えられた。今回の観察では、極めて長いミトコンドリアは、ミトコンドリアの融合<sup>4,5,6)</sup>によるよりも、伸長（引き伸ばし）によって長くなる姿が観察された。ドーナツ状（＝リング状）になる場合も伸長したミトコンドリアの両端が接着（融合）することに起因することも観察された。

ミトコンドリアの形態は融合と分裂とのバランスの上に動的に調節されているといわれており<sup>1,2,3,4)</sup>、分裂の活性化により細かく断片化したミトコンドリアが、逆に融合の活性化により長いネットワーク状（網目構造）のミトコンドリアを形成するという報告があるが<sup>1-10)</sup>、オオミノガ精祖細胞、精母細胞、またこれらの細胞分裂期に際して、ミトコンドリアの網目構造（＝reticulum）は認められなかった。ウニ卵形成期の卵母細胞においても網目構造は存在しないことが報告されている<sup>15,16)</sup>。

今回はミトコンドリアの数の増加は電子顕微鏡上で、明確に認めることは出来なかったが、ミトコンドリアの伸長によって実質的な容積の増量が行われ

たとえられる。この伸長による容積の増量が精子運動のエネルギー増大を助ける基であると考えた。

## V. 結 論

オオミノガ雄幼生期の生殖細胞を材料に、電子顕微鏡を用いて、細胞分裂期におけるミトコンドリアの形態的变化と動態、特に細胞分裂時のミトコンドリア分配方法を探究した。細胞分裂期には、ミトコンドリアは極めて長く伸長し、棒状ないし竿状となり、両娘細胞を跨って存在していた。従って、棒状ないし竿状ミトコンドリアは細胞質分裂期に両娘細胞間の縊れ込み部位ではほぼ均等に二つに分割されることが考えられた。また精子形成過程において、急速なミトコンドリア数の増加は確認出来なかったが、ミトコンドリアの伸長による実質的な容積の増量が行われる事が考えられた。ミトコンドリアの網目構造は確認出来なかった。

## VI. 文 献

- 1) 三原勝芳：ミトコンドリアの生合成と分裂・融合の調節機構。  
福岡医学雑誌, 97巻1号：8-14, 2006.
- 2) Sesaki Hiromi and Robert E. Jensen. : Division versus fusion : Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape.  
The Journal of Cell Biology, Vol. 147 : No 4 : 699 - 706, 1999.
- 3) 有村慎一, 提伸浩：高等植物ミトコンドリアの分裂と融合。  
蛋白質 核酸 酵素, Vol. 50 : No. 14 : 1868 - 1871, 2005.
- 4) 石原直忠, 三原勝芳：ミトコンドリアの分裂融合の制御メカニズム。  
細胞工学, Vol. 24 : No. 8 : 799 - 303, 2005.
- 5) 石原直忠, 三原勝芳：ミトコンドリアの融合と分裂を制御する G T P ase 群。  
蛋白質 核酸 酵素, Vol. 50 : No. 14 : 1868 - 1871, 2005.
- 6) Yaffe Michael P. : The machinery of mitochondria inheritance and behavior.  
Science, Vol. 283 : No 5 : 1493 - 1497, 1999.
- 7) 原直忠, 三原勝芳：ミトコンドリアの生合成と膜構造制御。  
炎症と免疫, Vol. 13 : No. 3 : 27 - 34, 2005.
- 8) Karbowski M. and R. J. Youle. : Dynamics of mitochondrial morphology in health cell and during apoptosis.  
Cell Death and Differentiation, 10 : 870 - 880, 2003.
- 9) Karen G. Hales and Margaret T. Fuller. : Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase.  
Cell, Vol. 90 : 121 - 129, 1997.
- 10) Bornstein S. R., J. W. Brown, A. Carballeira, J. Goodman, W. A. Scherbaum and L. M. Fishman. : Ultrastructural dynamics of mitochondrial morphology in varying functional forms of human adrenal cortical adenoma.  
Hormone and metabolic reserch, Vol. 28 : 177 - 182, 1996.
- 11) Kolosova N.G., S.V. Aidagulova, G.I. Nepomnyashchikh, I.G. Shabalina and N.I. Shal'bueva. : Dynamics of structural and functional changes in hepatocyte mitochondria of senescence-accelerated OXYS rats.  
Bulletin of Experimental Biology and Medicine, No. 2 : 814 - 819, 2001.
- 12) Polyakov V. Yu., M. Yu. Soukhomlinova and D. Fais. : Fusion, Fragmentaion, and Fission of Mitochondria.  
Biochemistry (Moscow), Vol. 68 : No. 8 : 838 - 849, 2003.
- 13) 大浦親善, 片岡淳吉, 蔵本茂和：「オオミノガ」精子形成過程における精子細胞頭部の電子顕微鏡的研究。  
熊本医学会雑誌, 45巻1号：415 - 435, 1971.
- 14) 大浦親善, 片岡淳吉, 蔵本茂和：「オオミノガ」精子形成過程における尾部中間部の電子顕微鏡的研究。  
熊本医学会雑誌, 45巻6号：631 - 648, 1971.
- 15) Sukhomlinova M.Yu., I.I. Kireyev, D. Fais, G. Giudice and V. Yu. Polyakov : Quantitative and ultrastructural analysis of the chondriome in ovogenesis and embryogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*.

Member. Cell Biol., Vol. 12 : No. 4 : 453 - 468,  
1998.

- 16) Fais D., LKireev, M. Soukhomlinova, G. Morici  
and V. Polyakov : Mitochondriogenesis in  
maturing sea urchin oocytes : A computerized  
reconstruction analysis.  
Cell Biology International, Vol. 20 : No. 12 : 831  
- 838, 1996.

(平成19年 1 月29日受理)

松崎 真人

〒861 - 5598 熊本市和泉町325番地  
熊本保健科学大学  
保健科学部 衛生技術学科

## Mitochondrial Dynamics in Germ Cells of Male Moth Larvae

Makoto MATSUZAKI

### Abstract

Using electron microscope, mitochondrial dynamics were investigated in germ cell mitosis of male moth larvae. Mitochondria in interphase showed granular shape but mitochondria elongated to long rod shape in metaphase of mitosis and extended to the chromosomes area of both daughter cells. Furthermore, mitochondria took doughnut shape by fusion of its both ends. The reticular form of mitochondria were not observed in any stages of spermatogenesis. Therefore, it was considered that mitochondria were divided evenly into two daughter cells. In spermatid, mitochondria elongated remarkably to rod shape and horseshoe arch shape.