ハムスター卵子における Adenylate Cyclase の 電顕組織化学的研究

新村末雄・佐々木博之・石田一夫

新潟大学農学部, 新潟市 950-21

(1978, 12. 11 受付)

adenylate cyclase は細胞膜中に存在している phosphatase で, ATP からピロリン酸を遊離して cyclic AMP を合成する酵素である. cyclic AMP はホルモンの second messenger としての役割を持っており, 泡の分裂や分化などにも関係している. adenylate cyclase は細胞生理学的にきわめて重要な酵素である. cyclic AMP はマウス¹⁾とウサギ²⁾の卵子で生化学的に出されている. 一方, adenylate cyclase はマウスの卵で電顕組織化学的に検出されているが³⁾, その他の哺乳動物の卵子については検出が試みられていない. 本研究は, 1 細胞期から胞胚期までのハムスターの卵について adenylate cyclase を電顕組織化学的に検出. adenylate cyclase-cyclic AMP 系の存在を推定したのである.

材料および方法

供試動物として成熟ハムスター(*Mesocricetus auratus*) 匹を使用した. 飼育はコイトロン (EA-8HW) 内行い, 点燈は午前 4 時から午後 6 時までの 14 時間とした. post-estrous discharge⁴⁾によって性周期を調べ, 後 5 時から 6 時までの間に発情を開始したハムスターを選んで雄と交配させた. ハムスターは発情開始後約 8 間で排卵することが報告されているので⁵⁾, 卵子の時は発情の開始を基準にして推定した. 使用した未受精卵子は排卵後 2 時間, 精子侵入卵子は 4 時間, 前核卵子 11 時間, 2 細胞卵子は 32 時間, 4 細胞卵子は 52 時間, 細胞卵子は 65 時間, 胞胚は 76 時間のものである. 4 細胞期までの卵子は 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) のった時計皿中で卵管を掻き破いて採集し, 8 細胞卵子

と胞胚は同種の緩衝液で子宮をかん流して採集した.

採集した卵子はシヨ糖を 5% 含む 4% グルタルアルデヒド 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) に 4°C で 30 分間前固定した. 引き続き, シヨ糖を 5% 含む 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) を数回交換しつつ一晩洗浄した後, adenylate cyclase 検出のための基質液に浸漬した. 基質液の組成は WAGNER *et al.*⁶⁾ が使用した処方に従った. すなわち, 5' アデニルイミド 2 リン酸 (AMP-PNP) 0.5 mM, 硝酸鉛 2 mM, フッ化ナトリウム 10 mM, 硫酸マグネシウム 4 mM, テオフィリン 2 mM, デキストラン (分子量 250,000) 6%, トリス・マレイン酸塩緩衝液 (pH 7.2) 80 mM である. 浸漬は 37°C で 30 分間行なった. なお, 基質 (AMP-PNP) を除いた液を対照として使用した. 基質液に浸漬後, 卵子はシヨ糖を 5% 含む 0.1M トリス・マレイン酸塩緩衝液 (pH 7.2) で 3 回洗浄し, さらに, シヨ糖を 5% 含む 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で 3 回洗浄した後, シヨ糖を 5% 含む 1% 四酸化オスミウム・カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) に 4°C で 1 時間, 後固定した. 脱水はアセトン上昇系列で行い, 包埋はエポキシ樹脂によった. 超薄切片の作製には JUM-7 型超ミクロトームを用い, 写真撮影には JEM-100B 型電子顕微鏡を使用した.

なお, 酵素活性は主として無染色切片によって観察したが, 適宜, ウラニウムと鉛で二重染色した切片も使用した.

結 果

WAGNER *et al.* の方法によって処理したハムスター卵には, いずれの発生時期のものも細胞膜に高電子密度

Fig. 1. The cell surface of an unfertilized hamster egg. The lead granules (arrowed) to show the adenylate cyclase activity are seen on the cytoplasmic membrane. WAGNER *et al.* method. $\times 30,000$.

の鉛の顆粒の沈着が見られた(図1)。この顆粒は基質を含まない液に浸漬した卵子の細胞膜には見られなかった。なお、細胞質小器官や基質には観察されなかった。

1 細胞期の卵子において、鉛の顆粒は細胞膜全体に沈着し、特に、微絨毛に多数見られた。未受精卵子の第1極体にはわずかに認められたが、受精未分割卵子の第1極体ではすでに消失しており、第2極体にわずかに沈着していた。なお、未受精卵子と受精未分割卵子の間では、鉛顆粒の沈着量に違いは認められなかった。2~8細胞期の分割卵子において、鉛顆粒は割球の細胞膜全体に沈着していたが、透明帯に面している細胞膜に多く、割球が隣接する部位の細胞膜では少なかった。胞胚において、鉛の顆粒はトロホブラスト細胞の透明帯側の細胞膜に多かったが、トロホブラスト細胞の胞胚腔側や、細胞同士が接合している部位の細胞膜では著しく少なかった。また、内細胞の細胞膜でも少なかった。

考 察

VORBRD *et al.*³⁾はマウスの卵子について、adenylate cyclase の電顕組織化学的検出を行い、未受精卵子には活性は見られないが、受精未分割期から胞胚期までの卵子には、細胞膜に酵素活性が見られると報告した。また、酵素活性は細胞膜全体にわたって出現するが、胞胚のトロホブラスト細胞では胞胚腔側の細胞膜には見られなかったと述べている。本実験のハムスター卵子では、マウス卵子と異なり未受精期のものも酵素活性を示した。また、受精未分割期ないし8細胞期の卵子では、酵素活性の局在はマウスの卵子に良く似ていたが、胞胚で

はトロホブラスト細胞の胞胚腔側の細胞膜にも活性が認められた。マウスの卵子で cyclic AMP 含量を測定した FISHER and GUNAGA の報告¹⁾によると、cyclic AMP は未受精卵子で最も多く、発生が進むに従って徐々に減少するという。このことから考えると、未受精卵子にも adenylate cyclase 活性が存在している可能性が示唆されるので、VORBRD *et al.*³⁾の成績には疑念が持たれる。

黄体などのステロイド合成組織において、ゴナドトロピンやプロスタグランジンは、細胞膜の特異的な receptor と結合して adenylate cyclase を活性化し、細胞質中のcyclic AMP 濃度の増加をもたらして、ステロイド合成を促進させるといわれている⁷⁻¹⁰⁾。一方、ハムスターの卵子にはステロイド合成能のあることが知られており^{11,12)}、この合成能はゴナドトロピンやプロスタグランジンによって刺激されると考えられる¹³⁾。本実験において、ハムスター卵子に adenylate cyclase-cyclic AMP 系が存在していることがうかがわれたので、ゴナドトロピンやプロスタグランジンの卵子のステロイド合成に対する刺激は、この系を介していることが推察された。

文 献

- 1) FISHER, D.L. and K.P. GUNAGA, *Biol. Reprod.*, **12**: 471-476. 1975.
- 2) DEY, S.K., F. KIMURA, A. MUKHERJEE and Z. DICKMANN, *J. Reprod. Fert.*, **52**: 235-237. 1978.
- 3) VORBRD, A., M. KONWINSKI, D. SOLTER and H. KOPROWSKI, *Dev. Biol.*, **55**: 117-134. 1977.
- 4) ORSINI, M.W., *Proc. Animal Care Penel*, **11**: 193-206. 1961.
- 5) HARVEY, E.B., R. YANAGIMACHI and M.C. CHANG, *J. Exp. Zool.*, **146**: 231-235. 1961.
- 6) WAGNER, R.C., P. KREINER, R.J. BARNETT and M.W. BITENSKY, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**: 3175-3179. 1972.
- 7) MARSH, J.M., R.W. BUTCHER, K. SAVARD and E. W. SUTHERLAND, *J. Biol. Chem.*, **241**: 5436-5440. 1966.
- 8) MARSH, J.M., *Ann. New York Acad. Sci.*, **180**: 416-425. 1971.
- 9) MARSH, J.M. and W.J. LEMAIRE, *J. Clin. Endocr. Metab.*, **38**: 99-106. 1974.
- 10) MAEYAMA, M., B. SAITA, K. ICHIHARA, M. MUNE-MURA and N. MORI, *J. Steroid Biochem.*, **7**: 295-300. 1976.
- 11) DICKMANN, Z., S.K. DEY and J.S. GUPTA, *Vitamins and Hormones*, **34**: 215-242. 1976.
- 12) NIIMURA, S. and K. ISHIDA, *J. Reprod. Fert.*, **48**: 275-278. 1976.
- 13) 新村末雄・石田一夫, 未発表.