卵細胞のステロイド代謝動態に関する研究

東京大学医学部産科婦人科学教室

堤 治, 佐藤 和雄, 坂元 正一

Studies on Steroidogenesis in the Oocyte

Osamu TSUTSUMI, Kazuo SATOH, Shoichi SAKAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine,
University of Tokyo,
Tokyo, Japan

The steroid hormone has an important role in the early stages of reproduction. There has been abundant histochemical evidence that oocytes contain steroid hormones and are able to synthesize these hormones. But there have been few methods of analyzing one oocyte biochemically because it is too small and light.

In order to study steroidogenesis in the oocyte, a microassay method sensitive enough to analyze the enzyme activities in one oocyte was developed using enzymatic cycling for amplifying the reaction product to 10,000-fold. An oil-well technique and a microtube method were applied in the assay for achieving the reaction in a medium as small as 1.0 to 5.0 μ l under a stereomicroscope.

Immature Wistar rats were superovulated by PMS-hCG administration. Oocytes were collected by puncturing the follicle and flushing the tube. They were freeze-dried after washing to remove cumulus cells. The dry weight of one oocyte was 51.2 ± 6.2 ng in a quartz fiber fishpole balance. The activity of 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD) (picomol/oocyte/hr, substrate: pregnenolone) in the PMS-treated oocyte was 2.66 ± 0.59 , which corresponds to 3 times the activity of the ovarian homogenate as control, indicating the high capacity of oocytes to produce progesterone. The activity increased significantly ($P < 0.01$) by hCG administration up to 4.17 ± 0.29 after ovulation, suggesting that gonadotropin regulates steroidogenesis in the oocyte. The activities of G6PD and 6PGD were 8.41 ± 1.09 picomol/oocyte/min and 3.85 ± 2.02 picomol/oocyte/hr, respectively. The high activity of G6PD (more than 10 times that of the ovarian homogenate) suggests that the pentose phosphate shunt concerned with steroidogenesis is active in the oocyte. HCG decreased the activities of both G6PD and 6PGD.

The present results show that steroidogenesis in the oocyte is very active under the control of gonadotropin, suggesting that steroid hormones may play an important role in oocyte maturation, ovulation and fertilization.

まえがき

卵細胞が成熟し排卵受精をへて着床に至る生殖過程に、ステロイドホルモンが大きな役割を持ち不可欠な存在であることは古くから知られていた。近年組織化学的方法の進歩により卵細胞自身にステロイド産生能^{2)~4), 7) 18) 23)}があり、各種ステロイドホルモンの局在^{1) 22) 24)}あるいはゴナドトロピンレセプターの存在⁹⁾を裏づける報告がなされている。また受精卵の培養実験で、培養液にゴナドトロピンやプロスタグランディン(PG)を添加し、代謝酵素活性変化を観察したり¹⁹⁾、ステロイド合成酵素の阻害剤を添加し卵割の進行をみる²⁰⁾などの試みがなされている。それにより卵細胞のステロイド代謝調節にはゴナドトロピン、PGなどが関与し、生成されるステロイドホルモンは、卵割・着床を制御する因子であろうと考えられるに至った。しかしながら、研究者により相反する成績が報告されることもあり、組織化学的方法の限界が感じられ、生化学的定量法の開発が期待されてきた。しかしながら哺乳動物卵は微小試料であり、かつ同時に多数の試料を得ることが困難であるための方法論的制約により、有効な解析法がなかった。我々は酵素的サイクリング¹⁴⁾、oil-well法¹⁵⁾などを応用し、卵細胞1個の物質代謝を分析する超微量定量法を確立し、卵細胞のエネルギー代謝を解析、卵に高いステロイド代謝能のあることを示唆した²⁰⁾。今回その方法を更に発展させ、ステロイド合成酵素の活性測定法を開発、卵におけるステロイド代謝動態を、ステロイド合成酵素の一つである 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD)、ステロイド代謝に関連する五炭糖シャントの酵素である glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)、6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) の活性をゴナドトロピンの作用とともに解析したので報告する。

材料と方法

1. 実験試薬類

1) サイクリング反応に用いた酵素

alcohol dehydrogenase (ADH E C 1. 1. 1. 1) 100mg/3.5ml 硫酸浮遊液, Boehringer-Sohn, malate dehydrogenase (MDH E C 1. 1. 1. 37) 10mg/ml 硫酸浮遊液, Boehringer-Sohn, glutamate dehydrogenase (GDH E C 1. 4. 1. 3) 20mg/ml 硫酸浮遊液, Boehringer-Sohn glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD E C 1. 1. 1. 49) 10mg/ml 硫酸浮遊液, Boehringer-Sohn いづれも使用直前に遠沈により硫酸を取り除き 20mM Tris-HCl (pH8.0) に溶解した。

2) その他

NAD, NADH, NADP, NADPHはBoehringer-Sohn, pregnenoloneはSigmaのものをを用いた。その他の試薬もすべて特級のものをを用いた。

2. 実験材料

1) 動物実験法

Wistar 系幼若雌ラット25日齢(体重約50g)30匹にPMS (10iu/0.2ml 生食)を皮下注射し卵胞を成熟せしめ、PMS投与24時間および48時間後に各5匹を断頭により屠殺し、以下に述べる方法により卵細胞を採取した。残る20匹に対してPMS投与48時間後にhCG (30iu/0.2ml 生食)を皮下注射し、過排卵をおこした。本実験系では排卵はhCG投与後約12時間でおこり、8時間後の排卵率は0%、16時間後では100%であった。hCG投与後、8・16・24・48時間に各5匹を断頭により屠殺し、卵細胞を採取した。

2) 卵胞内卵細胞の採取

PMS 投与, 24・48時間後およびhCG投与8時間後のラット卵巣を, hole glassに移し, Buffer A (hyaluronidase 0.03%を含むphosphate buffered saline PBS pH7.5) 1mlを加え, 実体顕微鏡下で成熟した卵胞を23ゲージ針にて穿刺し, 卵細胞を Buffer A 中に浮遊せしめた。内径を卵の直径に合わせて作製したマイクロピペットに, 卵および付着する卵丘細胞を数回吸引排出することにより卵丘細胞を剝離除去し, 卵を単一の卵細胞とした。次いでこの卵細胞から, 卵胞液あるいはhyaluronidaseを洗浄除去するため, マイクロピペットにより他のhole glassにとった1mlのPBS (pH 7.5) に移した。本操作を2回繰り返して洗浄後, マイクロピペットにてガラス板上に載せただちに凍結した。

3) 卵管内卵細胞の採取

hCG投与後, 16・24・48時間のラット卵管をhole glassにとり, Buffer A 1mlを加え, 実体顕微鏡下で卵管内に卵細胞を確認した。該当部分をマイクロ手術用鉗にて切開し, 卵丘細胞に囲まれた卵子の集団を Buffer A 内に解放し, 次いでこれら卵細胞は2)で述べたと全く同様の操作により単一の卵細胞とし, 凍結乾燥した。

4) 卵巣ホモジェネート

卵細胞試料の対照試料として, 多種多様の細胞よりなる卵巣を選び, そのホモジェネートを用いた。すなわち, 1)で述べたPMS-hCGによる過排卵の実験で, ①無処理のもの, ②PMS投与48時間後のもの, ③hCGを投与して24時間後のもの, 各5匹を断頭開腹した。摘出した卵巣は湿重量を測定し, テフロン棒ホモジェナイザーを用い生理的食塩水にてホモジェネートとした。試料はLowryの原法¹²⁾により蛋白定量を行ない, 測定に用いるまで -35°C にて凍結保存した。PMS投与48時間のラットについては, 片側卵巣を用い乾燥重量を測定し, 湿重量に占める割合を測定した。

5) 卵細胞試料の乾燥重量

PMS投与48時間の卵5個について, ミクロ天秤¹⁰⁾(図1)にて乾燥重量を測定した。ミクロ天秤は, 径約1ミクロンの水晶糸をシリンダー内に封入装着し, 自由端に卵細胞をのせ, 重量によるたわみを, 顕微鏡的に測定するもので, 感度は0.1ngのものを使用した。

Fig. 1. Quartz fiber fishpole balance.

Table 1. Reaction condition.

Enzyme	Reagent*	Assay Volume	Cycling/Rate
3 β Hydroxy Steroid Dehydrogenase	1mM NAD 400 μ M Pregnenolone 1mM EDTA	4.0 μ l	NAD/10,000
Glucose 6-P Dehydrogenase	0.1mM NADP 1mM Glucose6-P 10mM MgCl	5.0 μ l	NADP/3,000
6-P Gluconate Dehydrogenase	0.2mM NADP 2mM 6-P Gluconate 1mM EDTA	1.0 μ l	NADP/6,000

*all reagents were prepared in 100mM Tris-HCl buffer containing 0.05%(w/v)BSA. The pH was 7.5 for 3 β HSD and G6PDH and 8.0 for 6PGDH.

2. 実験方法

1) 酵素反応

3 β HSD, G6PD, および6PGDの酵素反応液の組成は表1に示した。反応液量は, G6PD 4.99 μ l, 6PGD 1.04 μ l, HSD 4.02 μ lでconstriction型のマイクロピペット(比色法による定量にて誤差0.3%以下)を用いて正確を期した。microassayであるため, G6PDおよび6PGDについては, oil-well法を用いた。

oil-well法とは, テフロン板に直径2mm, 深さ2mmの小さなwell(井戸)を掘り, パラフィンオイルを満たしたもので, 反応液はオイル中の小水滴となり蒸発が防がれる, 一種の試験管である。実体顕微鏡下でoil-wellに投下した卵細胞が反応液に到達することをもって反応開始とし, 反応の停止は, NaOHを加え溶液のpHを変化させることによって行なった。3 β HSDの場合, 基質であるpregnenoloneおよび反応生成物であるprogesteroneがパラフィンオイルに可溶であるためoil-well法が用いられず, 新たに, 特殊加工を施したマイクロチューブ法を考案した。すなわちマイクロチューブ(Eppendorf社 200 μ l)を2cm残し上部を切除, 側面に, メスを用い幅1mmの窓を作り, 反応液量に応じたキャップを作製し装着した。3 β HSD用に調整したキャップを装着し, 反応を進行させた。反応停止は, NaOHを加え溶液のpHを変化させることによった。マイクロチューブ使用時の反応系の安定度を知るため, キャップの有無, 反応温度条件を変化させ, 液量の変化の検索を行なった。

G6PD, 6PGDは以下に述べている反応①, ②によって生成されるNADPHをサイクリング基質として, NADPサイクリングにより増幅定量した(図2)。

反応① G6PD+NADP→6-P Gluconate+NADPH

反応② 6-P Gluconate+NADP→D-ribulose 5-P+NADPH

3 β HSDは, 以下に述べる反応③によりprogesteroneと等量生成されるNADをサイクリング基質として, NADサイクリングを用いて増幅定量した(図3)。

反応③ pregnenolone+NAD→progesterone+NADH

卵巣ホモジェネートは, 表1と同一条件で反応①~③により生成するNADPHまたはNADHを直接蛍光測定して酵素活性の測定を行なった。この場合は反応液量は1mlで実施した。3 β HSDについては, 試料濃度, 基質濃度(pregnenolone, NAD), 反応時間について直線性の検討も行なった。

Fig. 2. Early steps in the phosphogluconate pathway.

Fig. 3.

2) サイクリング反応

酵素的サイクリングは、二つの酵素反応を組合わせて 10^{-15} モル以下の生体物質を測定する方法である。Lowry, O.H. らは、これを細胞レベルでの物質代謝分析法としてまとめている¹⁴⁾。サイクリングの原理²⁰⁾は、NADPサイクリングを例に簡単に説明すると、

過剰量のG6PD, α -ketoglutarateの存在下でNADPはG6PDによりNADPHに還元され, 続いてGDHにより酸化されてNADPに戻る。このサイクリックな反応をn回くりかえせば, 元のNADPのn倍の6-P gluconateが正確に得られる。サイクリングの増幅率(n)は酵素濃度が低い時は酵素濃度に比例するので, 必要な増幅率を得る酵素量を, 表2に示すサイクリング反応液に加えサイクリング液とした。実験に際しては, サイクリング液を小試験管(Pyrex 10×75mm)に50 μ lずつ分注し, NADHまたはNADPHの5段階の濃度液(10^{-13} ~ 10^{-12} mol/ μ l)をスタンダードとし, 酵素反応①~③による反応液を等量(1~3 μ l)に加え, サイクリング反応を行ない, 反応停止は100°Cにて3分間加熱することによった。次いで, 反応生成物すなわちNADサイクリングではmalate, NADPサイクリングでは6-P gluconateを指示反応により蛍光測定した。

Table 2. Enzymatic cycling.

	NAD cycling	NADP cycling
Reagent	100mM Tris—HClpH8.0 300mM E+OH 2mM oxalacetate 2mM mercaptoethanol 0.02% BSA	100mM Tris—HClpH8.0 5mM α -ketoglutarate 1mM glucose6-P 25mM ammonium acetate 0.1mM ADP 0.02% BSA
Enzymes	alcohol dehydrogenase (E.C.1.1.1.1) malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37)	glutamate dehydrogenase (E.C.1.4.1.3) G6P dehydrogenase (E.C.1.1.1.49)
Reaction	25°C, 1hr	37°C, 1hr
Indicator	malate dehydrogenase hydrazine	6-P gluconate dehydrogenase

成 績

1 卵細胞および卵巣試料

PMS投与48時間後の卵胞卵の乾燥重量は, 51.2 ± 6.2 ng (mean $\pm$ S.D. n=5)であった。卵巣湿重量は, 未処置のもの, PMS投与のもの, PMS+hCGでそれぞれ, 10.1 ± 2.2 , 17.7 ± 3.4 , 38.4 ± 9.95 mgであり, PMS, hCGの投与により卵巣重量は有意に増加した。PMS処理卵巣の乾燥重量は 4.94 ± 0.69 mg, 蛋白含量は 1.95 ± 0.08 mg (いずれも mean $\pm$ S.D.) であり湿重量, 乾燥重量に占める蛋白量は, それぞれ11.0%, 39.5%であった。卵細胞と卵巣で酵素活性の比較を行なう場合は, 乾燥重量に換算したが, 卵巣乾燥重量の40%を蛋白とした。

2. マイクロチューブ法

マイクロチューブに取った液量の蒸発による減少は, 0.5%パラニトロフェノール5.0 μ lの濃度変化を比色計により測定して計測したが, 38°C, 3時間のインキュベーションでは, キャップなしでは55%の減少をみたが, キャップありでは, ほとんど変化がなかった。ただし5 μ l用のキャップを装着して, 3.4, 2.6 μ lの液量をインキュベーションした場合, それぞれ15, 30%の容量減少をみたので, 容量に合ったキャップが必須であることがわかった。

3. 酵素活性

1) 3β HSD 測定法

表1に示した反応条件下では、反応時間は4時間、試料濃度は250 μ g protein/mlの範囲で反応の直線性が保たれた。

卵細胞の活性測定では、反応時間は1時間とした。また卵の蛋白量は約30ngと考えられ、反応液中の蛋白濃度は、10 μ g protein/ml程度であり、充分直線性の保たれる範囲内であることを確認した。pregnenolone, NADの濃度についても検討、それぞれ40 μ M, 300 μ M以上で、酵素反応は最大速度を得ることを確認した。

2) 3β HSD 活性

卵細胞における 3β HSD活性はPMS 24, 48 hCG投与8・16・24・48時間の各時期でそれぞれ、 2.56 ± 0.66 , 2.66 ± 0.59 , 2.60 ± 0.30 , 4.18 ± 0.79 , 4.17 ± 0.29 , $3.05 \pm 0.37 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/hr (mean $\pm$ S.D. n=8)であった。hCG投与8時間以前と、hCG投与16, 24時間すなわち排卵前後では活性に有意の上昇($p < 0.01$)がみられた。48時間後では、活性は低下しておりhCG投与16~24時間すなわち排卵直後より、12時間以内に活性のpeakがあると考えられる。卵巢ホモジネートにおける 3β HSD活性は無処置, PMS処理, PMS+hCG処理でそれぞれ、 14.4 ± 5.8 , 63.3 ± 21.8 , $41.1 \pm 29.0 \times 10^{-9}$ mol/mg protein/hr (mean $\pm$ S.D. n=5)で、乾燥重量当りではそれぞれ5.76, 25.3, 16.6×10^{-9} mol/mg dry weight/hrとなった。

PMS処理48時間およびhCG投与24時間の卵では、 53.2 ± 11.8 , $83.4 \pm 5.8 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hrと算定されるので卵細胞における 3β HSD活性は高いレベルにあるといえる(図4)。

Fig. 4. 3β HSD activity.

Fig. 5. G6PD activity.

3) G6PD

卵細胞のG6PD活性は、PMS投与24・48、hCG投与8・16・24の各時期でそれぞれ、 7.26 ± 0.84 , 8.41 ± 1.09 , 8.25 ± 0.80 , 7.41 ± 0.92 , $6.10 \pm 0.61 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/hr (mean S.D. n=8)であった(図5)。

hCG投与前後すなわちPMS投与48時間後とhCG投与24時間では、大検定にて有意の活性減少($p < 0.01$)が認められた。一方卵巣ホモジェネートにおけるG6PD活性は、無処置群、PMS投与群、PMS+hCG群でそれぞれ 22.1 ± 1.1 , 32.5 ± 5.1 , $30.8 \pm 5.2 \times 10^{-9}$ mol/mg protein/minであり、卵巣組織全体としてもゴナドトロピンの作用によって変化したことがわかった。PMS投与48時間の卵細胞の乾燥重量当たりのG6PD活性は $168 \pm 22 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/minとなり同時期卵巣の $13.0 \pm 2.0 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/minの約13倍の活性を示した。

4) 6PGD

卵細胞の6PGD活性は、PMS投与24・48、hCG投与8・16・24の各時期でそれぞれ、 3.85 ± 2.02 , 4.41 ± 2.76 , 5.61 ± 2.64 , 2.86 ± 1.41 , $1.40 \pm 0.89 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/hr (mean $\pm$ S.D. n=4)であった。hCG投与により活性の低下傾向は認められたが、統計的に有意ではなかった。卵巣ホモジェネートでの6PGD活性は、無処置、PMS処理、PMS+hCG処理群でそれぞれ、 15.2 ± 0.5 , 16.2 ± 2.6 , $15.7 \pm 1.5 \times 10^{-9}$ mol/mg protein/min (n=5)であり、ゴナドトロピンによる活性変化は認められなかった。乾燥重量に換算した活性は、卵では 88.2×10^{-9} mol/mg dry weight/hr、卵巣では 389×10^{-9} mol/mg dry weight/hrと、卵巣の方が高活性であった。

考 按

本研究により卵細胞にはpregnenoloneをprogesteroneに転換する 3β HSD活性が存在することが生化学的方法により、直接的に証明された。これまで哺乳動物卵の生化学的解析は、組成の明らかな培養液中で卵を培養し、必要成分を検討したり、組織化学的方法により各種酵素の存在を確認するという方法に頼り、直接的に卵細胞中の物質代謝動態を解析する方法に乏しかった。それはひとつには、哺乳動物卵がいずれも微小、微量であるという方法論的制約によっていた。マウス受精卵の乾燥重量は26ngという報告がある¹¹⁾が、本研究に用いたラット卵でも51.2ngと微量であり、1mgの試料を得るには、2万個の卵を必要とする。哺乳動物では均一の卵を同時に多数得がたいこともあり、一般に用いられる生化学的定量法は応用不可能であった。我々は酵素的サイクリングやoil-well法などのmicrochemical assay methodを応用し、卵細胞1個の物質代謝を分析する超微量定量法を確立し、卵細胞のエネルギー代謝について、すでに報告した。しかしステロイド生成代謝に関係する基質(pregnenolone等)はパラフィンオイルに可溶のため、正確な測定はoil-well法など先に報告した方法では不可能であった。そのため本研究では、新たにマイクロチューブ法を開発し、ステロイド代謝解析のために、microassay法として有用であることを明らかにした。

従来 3β HSDの活性測定は、pregnenoloneなど Δ^3 OH steroidを基質とし、progesteroneなど生成した Δ^3 keto steroidをradio immunoassayにて測定する方法によって行なっていた。そのような方法では1～数mgの蛋白量の試料を必要とし、多数の卵の採取が不可欠であった。それに比較し我々のサイクリングを用いたmicroassay法は卵の蛋白を30ngとすると、30000倍以上の感度を有することになる。

3β HSDは、卵巣以外では精巣・副腎皮質・胎盤に局在する酵素で、ステロイド合成には不可欠である。pregnenolone 17 OH-pregnenolone dehydroepiandrosteroneなどの Δ^3 OH steroidを基質としてprogesteroneが産生されるstepを検討した。

卵巣組織を用いた 3β HSDの活性については多くの報告があり、幼若ラットを用いたSuzukiらの報告²⁵⁾でもPMS, hCG投与により活性変化が見られることが明らかにされている。我々の実験でも、無処置群に比較してPMS投与群で有意の上昇を認めている。しかし更にhCGを投与しても、その活性上昇は認められない。

卵細胞におけるステロイドホルモン産生酵素の局在については、組織化学的方法により、明らかにされている。しかし組織化学的方法の限界として、定量化は困難で、また感度の違いから方法により活性が検出される時期がまちまちである。新村らは、ハムスター卵では、排卵後2時間の卵に 3β HSD活性を認めている¹⁸⁾が、Dickmannらは桑実胚が胞杯に分化する時に、活性が出現する^{3) 4)}としている。我々の成績では卵巣ホモジェネートの 3β HSD活性は処置によって、 $5\sim 25\times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hrの変動が見られるが、それに比較しPMS処理後の卵胞卵の活性 $53.2\pm 11.8\times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hrは高値であり、卵胞卵がすでにかなり強いステロイド産生能をもつことを示している。卵胞卵で 3β HSD活性を検出した我々の成績から考えると、従来の報告による出現時期の相異は、組織化学的方法の感度に由来するものと思われる。

hCG投与16・24時間後の卵細胞の 3β HSD活性はPMS投与後の卵胞卵に比較して有意の上昇を示しており、hCG投与により活性が賦活されることがわかる。卵細胞にはLHのreceptorが証明されており⁹⁾、hCG(LH)の作用により 3β HSDが誘導されることができると考えられるが、活性の変化は、hCG投与8時間と16時間の間、すなわち排卵前後で著しいことより、排卵による卵胞液に存在

しは阻害物質の消失等によることも否定できない。これに関しては今後の検討が必要であると考えている。

ゴナドトロピンのステロイド合成能に与える影響をみた実験は、in vivoではDickmannらの報告がある⁵⁾。彼らは受精後のラット下垂体を摘出し、胞胚の 3β HSD活性を組織化学的に調べ、 3β HSD活性は下垂体摘出により影響を認めず、胞胚のステロイド合成はゴナドトロピンの支配を受けないとした。しかし彼らの実験では、排卵前のLH surgeは受けているので、胞胚期では、下垂体の調節を受けていないということを示すにすぎない。新村らのin vitroの実験では、前核期ハムスター卵、ブタ胞胚をLHを含む培養液にてインキュベーションした後、 3β HSD活性を組織化学的に検討し、無処理のものに比較して強い活性を認め¹⁹⁾、卵の 3β HSD活性はゴナドトロピンによって変化するとしている。

3β HSD活性はpeakでは、 $83.4 \pm 5.8 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hrに達し、卵巣ホモジェネートのpeak値の3倍以上の活性を示し、peakが受精がおこる時期と一致していることもあり、生理的意義が注目される。Dickmannらはラット卵の 3β HSD活性は桑実胚から胞胚に変化する時に検出可能になり、胞胚期で最も強い活性を示し着床後消失することから、卵が合成するステロイドは桑実胚から胞胚への分化と胞胚の着床を制御していると考察している^{3) 4)}。新村らは、ステロイド合成を阻止したマウス卵で卵割胞胚形成能の衰退を報告し、ステロイド合成と卵の卵割、胞胚形成との密接な関係を推察している²⁰⁾。卵胞卵に 3β HSD活性を認め、LH刺激次いで排卵によりその活性が上昇することを見出した本実験成績は、卵の成熟ことにLHによる減数分裂の再開、排卵さらに受精という現象にステロイドホルモンが関与していることを強く示唆するデータである。

ステロイドホルモンと卵の成熟に関しては、多くのin vitro実験がある。estradiol- 17β が、卵成熟を妨げることは、家兎・ウシ・ブタ¹⁶⁾・マウス¹⁷⁾で確認され、progesteroneは促進効果をもつことは、家兎・ウシ・サル⁸⁾で認められている。LHによる卵の成熟は、LHが卵にあるLH receptorを介し、 3β HSD活性を賦活し、progesteroneを産生することによる可能性が推定される。

本研究では受精後の活性動態については究明しなかったが、卵割を繰り返えし、胞胚期にその活性が最も強度に認められ、着床後急速に消失するという成績は、卵が卵管内で母体との直接の接触を欠く、いわゆる“free living”の状態、分化を遂げる際の制御因子として内因性のステロイドが重要であることを示唆している。

エネルギー代謝の酵素malate dehydrogenase lactate dehydrogenaseはhCG投与24・48時間では同一レベルあるいは上昇傾向を示すが、hCG投与48時間で、 3β HSDは低下している。これは24時間後と48時間後でエネルギー代謝のレベルに変化はないが、 3β HSD活性は、受精能と関連し、受精能力の消失と活性の低下が平行することを示していると思われる。

G6PD, 6PGDは、五炭糖シャントの酵素であり、G6PDが律速酵素である。五炭糖シャントの意義は、エネルギー産生には不利であるが、ステロイド代謝に必須の還元型補酵素NADPHを生成するということである。同時に五炭糖riboseを作り、nucleotide, RNA, DNAの素材を供給するという役割もある。卵巣組織では活発なステロイド代謝が行なわれ、副腎・精巣とともに他の組織に比較して五炭糖シャントが活発である。卵巣ホモジェネートでも高いG6PD活性を示し、ゴナドトロピン投与で活性が上昇することが認められた。本研究から卵細胞では、卵巣の10倍以上の高いG6PD活性が検出され、卵細胞は五炭糖シャントが活発で、glucoseは五炭糖シャントを主な経路としてNADPH ribose等を供給していると考えられる。このことから、卵細胞ではステロイド代謝が活

発であると推定できる。またG6PD遺伝子はX染色体上にある⁶⁾²¹⁾ことが明らかにされており、X染色体が発生の初期に活発な機能を持つことを示唆する成績で、興味深い。しかしPMS投与により卵胞が成熟する間にG6PD活性は上昇すると考えられるが、hCG投与により卵細胞におけるG6PD活性は有意の低下を示す。その理由としてLH刺激により第2減数分裂が再開する間に、X染色体の不活化がおり、酵素の合成停止することが考えられるが、阻害物質の生成あるいは活性化物質の消失等の可能性もあり、推論の域を出ない。

6PGDは律速酵素ではないが、NADPH ribose生成に関与する。卵細胞での活性は、卵巣レベルより低い。五炭糖シャントの代謝制御のコントロールは、一般にはG6PDによるが、卵細胞ではG6PD活性が極限的高値を示しているため、6PGDが律速段階になっている可能性があるが、hCG投与によって一定の傾向を認めなかった。

結 語

卵細胞のステロイド代謝動態解析のために、酵素的サイクリングを用い、超微量定量法を開発し、 3β HSD, G6PD, 6PGDの酵素活性を測定し、次の成績を得た。

- 1) hCG投与前の卵胞卵に 3β HSD活性を検出し、卵胞卵にprogesterone産生能のあることを明らかにした。
- 2) hCG投与すなわちLH刺激により卵が成熟排卵される間に 3β HSD活性が上昇することを認め、卵のステロイド代謝にLHが関係することを明らかにした。
- 3) G6PDの活性が極めて高く、卵においてステロイド代謝に関連した五炭糖シャントが、大きな役割を占めていることを明らかにした。
- 4) hCG投与により、G6PDの活性が低下し、五炭糖シャントは不活化されることを明らかにした。

以上より卵細胞は卵胞内ですでに高いステロイド代謝能を有し、ゴナドトロピンにより制御を受けており、産生されるステロイド、ことにprogesteroneは卵成熟、排卵あるいは受精に関係すると考えられる。

文 献

- 1) Borland, R.M., Erickson, G.F. and Ducibella, T.: Accumulation of steroids in rabbit preimplantation blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 49: 219–224, 1977.
- 2) Dey, S.K. and Dickmann, Z.: Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid Dihydrogenase Activity in Rat Embryos on Day 1 Through 7 of Pregnancy. *Endo.* 95: 321–322, 1973.
- 3) Dickmann, Z. and Dey, S.K.: Two theories: the preimplantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) morulablastocyst transformation and (2) implantation. *J. Reprod. Fert.* 35: 615–616, 1973.
- 4) Dickmann, Z. and Dey, S.K.: Steroidogenesis in the Preimplantation Rat Embryo and its possible Influence on Morula-Blastocyst Transformation and Implantation. *J. Reprod. Fert.* 37: 91–93, 1974.
- 5) Dickmann, Z. and Dey, S.K.: Evidence that Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Rat Blastocysts is Autonomous. *J. Endocr.* 61: 513–514, 1974.
- 6) Epstein, C.J.: Mammalian oocytes: X chromosome activity. *Science, N.Y.* 163: 1078–1079, 1969.
- 7) Flood, P.F.: Steroid-Metabolizing Enzymes in the Early Pig Conceptus and in the Related Endometrium. *J. Endocr.* 63: 413–414, 1974.
- 8) Gould, K.G. and

- Graham, C.E.: Maturation in vitro of Oocytes recovered from prepubertal Rhesus Monkeys. *J. Reprod. Fert.* 46: 269–270, 1976.
- 9) Jagiello, G. and Ducayen, M.B.: Preliminary Evidence for the Intracellular Localization of Luteinizing Hormones in Mammalian Oocytes. *J. Exp. Zool.* 201: 345–358, 1977.
- 10) Kato, T. and Lowry, O.H.: An Enzymatic Cycling Method for Nicotinamide-Adenine Dinucleotide with Malic and Alcohol Dehydrogenase. *Anal. Biochem.* 53: 86–97, 1973.
- 11) Lowenstein, J.F. and Cohen, A.I.: Dry mass, lipid content of the intact and zona-free mouse ovum. *J. Embryol. exp. Morph.* 12: 113–121, 1964.
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275, 1951.
- 13) Lowry, O.H., Passonneau, J.V. and Schulz, D.W.: The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. *J. Biol. Chem.* 236: 2746–2755, 1961.
- 14) Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.: *A Flexible System of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York. 1972.
- 15) Matschinsky, F.M., Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.: Quantitative histochemical analysis of glycolytic intermediates and cofactors with an oil-well technique. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 29–39, 1968.
- 16) McGaughey, R.W.: The culture of pig oocytes in minimal medium, and influence of progesterone and estradiol-17 on meiotic maturation. *Endocrinology* 100: 39–45, 1977.
- 17) Nekola, M.V. and Smith, D.M.: Steroid inhibition of oocyte maturation in vitro. *Endocrinology* 94A, 165, 1974.
- 18) Niimura, S. and Ishida, K.: Histochemical studies of Δ^5 - 3β -, 20α - and 20β -hydroxy-steroid dehydrogenase and possible progestagen production in hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 48: 275–278, 1976.
- 19) 新村末雄, 石田一夫: ゴナドトロピン及びプロスタグランジンがブタ胎胚のハイドロオキシステロイド脱水素酵素活性に及ぼす影響に関する組織化学的観察。家畜繁殖誌, 25: 180–182, 1979.
- 20) 新村末雄, 石田一夫: ステロイド合成を阻止したマウス卵子における卵割, 胎胚形成能力の衰退, 日不妊会誌, 26: 142–147, 1981.
- 21) Ohno, S.: *Sex Chromosomes and Sex-linked Genes*. 58, Springer-Verlag, Berlin. 1967.
- 22) Seamark, R.F. and Lutwak-Mann, C.: Progestins in rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 29: 147–148, 1972.
- 23) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W.: Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 56: 181–185, 1979.
- 24) Singh, M.M. and Booth, W.D.: Studies on the metabolism of neutral steroids by preimplantation rabbit blastocysts in vitro and the origin of blastocyst oestrogen. *J. Reprod. Fert.* 53: 297–304, 1978.
- 25) Suzuki, K. and Tamaoki, B.: Enzymological Studies of Rat Luteinized Ovaries in Relation to Acute Reduction of Aromatizable Androgen Formation and Stimulated Production of Progestins. *Endocrinology*, 104: 1317–1323, 1979.
- 26) 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一, 加藤尚彦: 酵素的サイクリングによる超微量分析法の産婦人科領域における応用。臨婦産, 34: 653 – 659, 1980.
- 27) 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一: サイクリング法による卵細胞エネルギー代謝動態に関する研究。日産婦誌, (印刷中)

(受付日: 57. 6. 16)