ラット卵子における ^{14}C -L-Leucine の取り込みについて

特に測定卵子数およびアミノ酸濃度の検討

辻井 弘 忠・菅原 七 郎・竹内 三 郎

(東北大学農学部 家畜繁殖学教室)

哺乳動物卵子の物質代謝に関する研究には *in vivo* および *in vitro* の種々の方法が応用されてきている。これまでの研究は主として呼吸代謝^{1,2)}や組織培養法³⁻⁵⁾によるものであり、物質の取込みについて定量的に研究したものは殆どない。わずかに、オートラジオグラフィ法⁶⁻⁹⁾を用いた研究がみられるのみでアイソトープを用いて物質の取込みを定量的に追求したものは WALES らのリンゴ酸¹⁰⁾および糖類¹¹⁾に関する研究以外はない。

著者らは哺乳動物卵子の発生過程における物質代謝、特にアミノ酸代謝および蛋白質の新成を解析する目的でラット卵子について、まず物質の取込みを把握するのにアイソトープを用いることが可能かどうかを検討した。本報告では、測定卵子数およびアミノ酸濃度について試験を行なったので、その概要を報告する。

実験材料および方法

実験には当研究室で自家繁殖している Wistar 系雌ラットを用いた。

1-cell stage (未受精卵); 生後 25~28 日令 (体重 65~75 g) の正常に発育した幼若雌ラットを用い、ZARROW ら¹²⁾の方法によって過排卵をおこさせ、PMS 注射後 75~76 時間後に頸動脈を切断して殺し、卵管のみを切断して滅菌 Ca-free Krebs Ringer Phosphate Buffer (pH 7.4) の液上で卵管膨大部を針でさいて採取し、0.025% のキモトリプシン (終末濃度約 0.008%) を 5~10 分間加えて顆粒細胞を消化させて卵子のみを得、卵子のキモトリプシンの影響を少なくするために数回同緩衝液で洗

滌した。

Early Blastocyst; 成熟雌ラットを用い成熟雄との交配により腔内に精子の確認された日を妊娠第 1 日として、妊娠 5 日 (受精後約 102 時間目) の雌ラットの頸動脈を切断して殺し、滅菌 Ca-free Krebs Ringer Phosphate Buffer (pH 7.4) を用いて子宮を灌流して受精卵を得た。

採取した卵子は、同緩衝液で数回洗滌した後、低倍率の実体顕微鏡下で形態を観察し正常な卵子のみを 0.3 ml 中の同緩衝液中に集めた。この間の所要時間は約 1~1.5 時間であった。直ちに 37.5°C の恒温水槽内で前培養を 10 分間行なった後、 ^{14}C -(U)-L-Leucine 0.1 ml を添加して、各時間の培養を行なった。それぞれの培養時間経過後、冷三塩化酢酸 (TCA) を加えて終末濃度 5% にして反応を停止させた。十数分後、直径 8 mm の自製の濾過器につけたミリポアフィルター (SCWP 8 μ) 上に集め、5% TCA で数回洗滌した。フィルターは、赤外線ランプの下で TCA を加温除去したのち、トルエンシンチレーター (トルエン 1000 ml, POPOP 300 mg, PPO 4 g) に入れ、Parkard Tri-Carb 液体シンチレーションスペクトロメーターを使用して、gain 90%, window 50~1,000 の条件下で 5 分間測定した。

カウント数は 1 分間あたりに取込まれた量を CPM で表示した。

結 果

1. ^{14}C -L-Leucine の濃度について

50 個の Early Blastocyst を ^{14}C -L-Leucine 0.25 μC (spec. act. 0.198 mci/mM), 0.5 μC (spec. act. 0.396 mci/mM), 2.5 μC (spec. act. 1.98 mci/mM) の各濃度で 3 時間培養した結果、それぞれのカウント数は 4,070, 10,600, 57,900 CPM であった。これは図 1 に示すように濃度の増加に伴いカウント数は直線的な増加をしめした。

Incorporation of ^{14}C -L-Leucine in rat eggs. With special reference to the number of eggs and the concentration of amino acid.

TSUZU, Hirotada, Shichiro SUGAWARA & Saburo TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980)

Jap. J. Animal Reprod. 15 (1), 1969.

Table 1. Incorporation of ^{14}C -L-Leucine into 1-cell stage egg (unfertilized) of rat

Time of incubation (hr.)	0	0.5	1	2	3
Incorporation of ^{14}C -L-Leucine (CPM/egg)	$60.98 \pm 3.56^*$ (8)	$96.97 \pm 14.10^*$ (9)	$125.85 \pm 15.47^*$ (8)	$131.01 \pm 24.06^*$ (8)	$125.99 \pm 24.42^*$ (8)

* Mean $\pm$ S.E. () Number of observation. Fig. 1. Relationship between concentration and incorporation of ^{14}C -L-Leucine in early blastocyst of rat.

Each tube contained 0.3 ml buffer solution, 50 early blastocyst, and 0.1 ml radio isotope. The eggs were incubated for 3 hr at 37.5°C .

Fig. 2. The relation of rate of incorporation to number of egg.

1-cell (unfertilized eggs) were incubated with the ^{14}C -L-Leucine for 2 hr at 37.5°C .

Each tube contained 0.4 ml final volume 25 or 50, 75 unfertilized eggs and $0.5 \mu\text{C}$ (spec. act. 0.396 mci/mM) ^{14}C -L-Leucine.

2. 測定卵子数について

1-cell stage (未受精卵) の卵子数をそれぞれ 25, 50, 75 個として, ^{14}C -L-Leucine $0.5 \mu\text{C}$ (spec. act. 0.396 mci/mM), 培養時間 2 時間の同一条件下で比較した結果, 図 2 で示すように得られたカウント数はそれぞれ 5,246.8, 11,134.3, 15,104.7 CPM と卵子数に応じて直線的な増加を示した。

3. 培養時間について

Fig. 3. Incorporation of ^{14}C -L-Leucine of 1-cell stage (unfertilized) of rat egg in each incubation time (cpm/egg).

50 個の 1-cell stage (未受精卵) を, ^{14}C -L-Leucine $0.5 \mu\text{C}$ (spec. act. 0.396 mci/mM) の同一条件下でそれぞれ 0, 0.5, 1, 2, 3 時間で培養した結果を表 1 に示した。0 時間の値は 60.98 CPM/egg で, この値を各時間の値から差引いた値を真の取込み値として図 3 に示した。各培養時間のアミノ酸の取込み値のうち 0.5 時間と 1 時間の間にのみ 5% の有意の差がみられた。

考 察

培養液 Ca-free Krebs Ringer Phosphate Buffer (pH 7.4) を用いて, 比較的得られやすい卵子数でアミノ酸の取込みを直接測定する目的で, ^{14}C -L-Leucine の濃度, 測定卵子数, 培養時間等について検討した。卵子数については, WALES ら^{10,11)} がマウス 2-cell で 150~250 個, 8-cell で 90~110 個で測定しているのに比べて比較的少数の 50 個で測定が可能であることが認められた。

これは L-Leucine がユニバーサルラベルのため比較的少数で取込みを測定し得たと思われる。

また培養時間については, 詳細な研究報告はみられないが, WALES らはリンゴ酸¹⁰⁾ および糖類¹¹⁾ の取込みで 30 分間のみの報告をしている。またオートラジオグラフィ法を用いた MINTZ⁹⁾ は 2~4 時間での取込みを報告しているにすぎない。この培養時間に関しては, 培養液の組成との関係があると思われるので, 今後培養液の組成と取込量等の関係について検索する。

要 約

哺乳動物卵子の発生過程における物質代謝, 特にアミノ酸代謝および蛋白質の新成を解析する目的で, ラット卵子における ^{14}C -L-Leucine の取込みの測定条件であるアミノ酸の濃度, 測定卵子数, 培養時間等を検討した。その結果 ^{14}C -L-Leucine の濃度は $0.25 \sim 2.5 \mu\text{C}$, 卵子数は $25 \sim 75$ 個の間でも十分測定が可能であることが認められた。それに基づき, 1-cell stage (未受精卵) 50 個, ^{14}C -L-Leucine $0.5 \mu\text{C}$ (spec. act. 0.396 mci/mM) で培養時間を検討した結果, 0.5 時間と 1 時間との間に有意差が認められた。(1969 年 4 月 5 日受付)

文 献

1) 菅原 (七): 本誌 9, 123, 1964.

- 2) FRIDHANDLER, L., E.S. HAFEZ & G. PINCUS: *Exp. Cell Res.*, **13**, 132, 1957.
- 3) BRINSTER, R.L.: *J. Exp. Zool.*, **158**, 59, 1965.
- 4) DANIEL, J.C. & OLSON, J.D.: *J. Reprod. Fert.*, **15**, 453, 1968.
- 5) GWATKIN, R.B.L.: *J. Reprod. Fert.*, **7**, 97, 1964.
- 6) LIN, T.P.: *Nature* **178**, 1175, 1956.
- 7) GREENWALD, G.S. & EVERETT, N.B.: *Anat. Rec.*, **130**, 171, 1959.
- 8) WEITLAUF, H.M. & GREENWALD, G.S.: *Anat. Rec.*, **159**, 249, 1967.
- 9) MINTZ, B.: *J. Exp. Zool.*, **157**, 85, 1964.
- 10) WALES, R.G., & BIGGER, J.D.: *J. Reprod. Fert.*, **15**, 103, 1968.
- 11) WALES, R.G., & BRINSTER, R.L.: *J. Reprod. Fert.*, **15**, 415, 1968.
- 12) ZARROW, M.X. & EVERETT, D.W.: *Endocrinol.* **69**, 851, 1961.

Summary

This report has extended to the measurement of ^{14}C -(U)-L-Leucine incorporation in rat's eggs.

The experimental procedure was as follows. Rat eggs were obtained from random-bred Wistar Strain rats. 1-cell eggs (unfertilized) were collected from immature female rat which had been treated with PMS and HCG, according to the method reported by Zarrow and Everett.

Early Blastocyst were collected by flushing of uterus at 102 hr post coitum from adult female rats.

The basic medium used in the study was Ca-free Krebs-Ringer Phosphate Buffer (pH 7.4). The same solution was used for all manipulations. The eggs were examined by microscope and the normal egg were transferred to test tube contained 0.3 ml of the solution. After preincubation for 10 minutes, 0.1 ml of ^{14}C -L-Leucine was added to test tube and incubated for 0, 0.5, 1, 2 and 3 hrs.

The reaction was stopped by addition of cold trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 5 per cent. The acid-insoluble was washed with 5 per cent TCA on the millipore filter (SCWP 8μ), and the filter was dried completely under an infra-red lamp.

The filter were transferred to the vials for determination of radioactivity by liquid scintillation counting (Parkard Tri-Carb), using $1,000 \text{ ml}$ toluene containing 4 g 2-5-diphenyl oxazole (PPO) and 300 mg 1-4 bis 2 (4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzene (dimethyl POPOP) as scintillator.

The results are summarized as follows:

1. Concentration of ^{14}C -L-Leucine

Relationship between concentration and incorporation of ^{14}C -L-Leucine in early blastocyst of rat were shown in Fig. 1. It is possible to count when the concentration of ^{14}C -L-Leucine is $0.25 \sim 2.5 \mu\text{C}$.

2. Number of eggs

The relation of the rate of incorporation to number of eggs were shown in Fig. 2. It is possible to count when the number of eggs are from 25 to 75 in incubation with $0.5 \mu\text{C}$ (Spec. ac. 0.396 mci/mM) ^{14}C -L-Leucine.

3. Incubation time

Incorporation of ^{14}C -L-Leucine into 1-cell stage (unfertilized) of rat egg are shown in Table 1 and Fig. 3. 1-cell (unfertilized egg) were much incorporated at 1 hr. incubation with $0.5 \mu\text{C}$ ^{14}C -L-Leucine at 37.5°C .