ラット卵子における炭酸固定について

菅原七郎・辻井弘忠・竹内三郎

(東北大学農学部 家畜繁殖学教室)

着床前の哺乳動物卵子の発生に必要なエネルギー源やその前駆物質は卵管,あるいは子宮分泌液に依存している。各種動物の卵管や子宮分泌液でいろいろな無機物や有機成分の存在とそれらの変化が明らかにされている^{1,2)}。とくに、兎や羊の生殖管分泌液や胚盤胞液中には炭酸が血中のそれと比較して非常に高濃度に存在することが知られている^{3,4)}。また、*in vitro*における卵子の培養の際、培養液中に至適濃度の炭酸イオンがないと卵子は発生し得ないことも明らかにされている⁵⁻⁷⁾。

これらの事実は着床前の受精卵子の発生にとって、その機構が明らかではないが炭酸イオンが重要な役割をはたしていることを示唆している。ごく最近、マウス卵子で炭酸固定の研究がなされ興味ある知見が報告された⁸⁻¹⁰⁾。

本研究ではラット卵子における炭酸固定の可能性について検討したので報告する。

材料および方法

Fig. 1. Analytical procedures for isotopes.

On the fixation of carbon dioxide by preimplantation rat eggs *in vitro*.

SUGAWARA, Shichiro, H. TSUJII & S. TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980)

Jap. J. Animal Reprod. 19 (3), 1973.

動物: 当教室で累代繁殖した Wistar 系の幼若および成熟雌ラットを用いた。

卵子の採取: a) 1細胞期の卵子は常法により過排卵処理した幼若ラット (24~29 日令) の卵管膨大部から時計皿に取った。後、0.025% chymotrypsin で顆粒細胞を除去してから実験に供した。b) 2細胞期の卵子は成熟雌ラットを過排卵処理した後、交配し、交尾を確認した個体のみを翌日殺し卵管灌流法によって採取した。c) 胚盤胞: 交配後5日目に子宮を灌流して採取し実験に供した。

培養法: 実験に供した卵子数は卵子の発生段階によって多少異なってくるが、通常 50~150 個の卵子を 0.1 ml の Krebs Ringer phosphate buffer (pH=7.4) に浮遊させ 0.1 m μ Ci (0.05 ml) の NaH¹⁴CO₂ を添加した後、気相として空気または 100% O₂ にして 37.5°C で4時間培養した。なお、培養液として次の中間代謝物質を添加したものをを用いた。すなわち、a) KRP+0.1% glucose+2.5 $\times$ 10⁻³M pyruvate (KRP+G+P) b) KRP+0.25 $\times$ 10⁻²M lactic acid (KRP+L) c) KRP+0.25 $\times$ 10⁻²M lactic acid+2.5 $\times$ 10⁻³M succinic acid (KRP+L+S) の各培養液での炭酸固定を検討した。

放射能の分析法: 概要は Fig. 1 に示した。すなわち培養終了後、直ちに冷却し反応を中止させ、遠沈して卵子を分離し上清と卵子を別々にした。分析を容易にするため卵子に自家血清 1 μ l を加えた後、過塩素酸で蛋白

質を分けた。蛋白質区分は3回以上冷 10% トリクロール酢酸 (TCA) で洗浄して glass filter で濾過し、赤外線ランプ下で乾燥させた後、比放射能を測定した。一方、上清区分は遊離炭酸 (free form ¹⁴CO₂) を除去するために、2N NaOH の入った気密の容器に入れ、上清区分の入った試験管 (15 ml) に 0.2 ml の 2N HCl を加え、室温で 24 時間放置した。その後、methyle red を指示薬として 2N NaOH で中和した後、Hexane-Butanol (8:2) で抽出し、溶媒に可溶区分と不溶区分に分け、それぞれ液体シンチレーション用バイアルに入れ、前記のごとく乾燥させた後放射能を測定した。

結 果

TCA 不溶分画への取込み

TCA 不溶分画への炭酸固定は発生の段階や培養液によって異なるが各発生時の卵子において固定がみられた。この分画に取込まれた放射能は他の分画へのそれと比較して最も多く、卵子によって固定された全体の約 43~84% であった (Table 1)。

この分画への炭酸固定は発生が進むに従って増大して行き、2細胞期と胚盤胞期の卵子における取込みは1細胞期のそれと比較して著しく大きく、それぞれ約 3.9, 30.4 倍であった。

また、炭酸固定は培養液中エネルギー源の有無によって影響されることを認めた。すなわち、1細胞期の卵子

Table 1. Fixation of ¹⁴CO₂ in rat eggs

Stage	No. of analysis	Medium	Gas phase	DPM/ovum/hr		
				TCA insoluble fraction	Hexane-butanol (8:2)	
					Soluble fraction	Insoluble fraction
1-cell	3	KRP	Air	6.2	5.1	3.4
"	4	KRP+G+P	"	15.0 $\pm$ 4.2	35.1 $\pm$ 10.1	16.2 $\pm$ 4.8
2-cell	3	KRP	"	56.3 $\pm$ 18.4	29.0 $\pm$ 6.9	24.3 $\pm$ 6.2
"	3	KRP+G+P	"	58.0 $\pm$ 20.6	33.8 $\pm$ 12.1	16.2 $\pm$ 7.2
"	5	"	O ₂	137.1 $\pm$ 24.2	29.8 $\pm$ 11.8	28.8 $\pm$ 9.8
"	2	KRP+L	Air	39.1	1.5	5.9
"	2	KRP+L+S	"	32.1	4.9	12.5
"	3	KRP+L	O ₂	48.8	3.8	5.6
Blastocyst	3	KRP+G+P	Air	456.8 $\pm$ 120.4	114.0 $\pm$ 30.4	72.4 $\pm$ 25.6

KRP: Krebs Ringer Phosphate Buffer (pH=7.4)

G: 0.1% glucose

P: 2.5 $\times$ 10⁻³M pyruvate

L: 2.5 $\times$ 10⁻²M lactate

Table 2. Carbon atoms fixed in the rat eggs

Stage	Medium	Gas phase	pg atoms/ovum/hr		
			TCA insoluble fraction	Hexane-Butanol (8 : 2)	
				Soluble fraction	Insoluble fraction
1-cell	KRP	Air	0.18±	0.15	—
"	KRP+G+P	"	0.39±0.097	1.00±0.23	0.46±0.11
2-cell	KRP	"	1.61±0.49	0.83±0.21	0.69±0.17
"	KRP+G+P	"	1.66±0.56	0.97±0.31	0.46±0.21
"	"	O ₂	3.93±0.71	0.85±0.27	0.81±0.27
"	KRP+L	Air	1.12		0.17
"	KRP+L+S	"	0.92		0.36
"	KRP+L	O ₂	1.39		0.16
Blastocysts	KRP+G+P	Air	130.9±37.2	3.27±0.80	2.07±0.68

ではエネルギー源として, glucose と pyruvate を添加した場合, TCA 不溶分画への取込みは約 2.4 倍であった。一方, 2 細胞期の卵子ではこれらの基質を添加しても炭酸固定量は殆ど変わらなかった。

2 細胞期について, 培養液として KRP+G+P を用い, ガス腔を 100% O₂ にすると, 炭酸固定は空気にした場合のそれと比較して約 2.4 倍も増大した。一方, KRP+L でガス腔を 100% O₂ にしても空気の場合より炭酸固定量は増加の傾向を示すが有意の差は認められなかった。

Hexane-Butanol 可溶, 不溶区分への取込み

結果は Table 1 に示すごとくで, 両分画への取込みは TCA 不溶分画と比較して少ないが固定された ¹⁴CO₂ の約 20~25% が両分画に認められた。Hexane-Butanol の不溶分画中の放射能は可溶分画のそれと比べて有意差はないが高い傾向がみられた。

この両分画への炭酸固定は培養液中に添加した基質の種類によって著しい変化を示した。すなわち, 1, 2 細胞期で培養液として KRP+G+P を用いた場合, 両分画への取込みは 16.2~35.1 DPM/ovum/hr の範囲であったものが, KRP+L, または KRP+L+S の場合は 1.5~12.5 DPM/ovum/hr となり, 炭酸固定は著しく減少することを認めた。また, KRP+G+P を用いた場合は KRP あるいは, その他の基質添加液 (KRP+L or KRP+L+S など) を用いた場合よりも Hexane-Butanol 可溶分画への取込みが高くなる傾向を示した。

ガス腔と両分画への炭素固定の関係をみると, ガス腔を空気または 100% O₂ にしても炭酸固定量は両者の間で差はみられなかった。

固定炭素量

各発生時の卵子における, 1 時間当りに固定された炭素量 (pg) を算定すると Table 2 の通りである。表から明らかなように, 1 個の卵子が 1 時間当りに固定し得る炭素量は発生の段階によって異なるが, およそ 0.39~130.9 pg (10⁻¹²g) の範囲であることが認められた。

考 察

本研究の結果から, ラット卵子においても H¹⁴CO₃⁻ が卵子の蛋白質分画やその他の有機物に固定されることが明らかとなった。

ラット卵子における炭酸固定能はマウスにおいて報告されているごとく^{9,10)}, 発生の各段階において異なり, 発生が進むに従って固定能が増大し, 2 細胞では 1 細胞期の約 4 倍, 胚盤胞期では 2 細胞期の約 20 倍以上の炭酸を固定するようになる。

また, ラット卵子の炭酸固定はマウス卵子における固定と比較して, 蛋白質分画への固定が非常に多いことが特徴的と思われる。

その他, Hexane-Butanol 可溶, 不溶分画への取込みは細胞外物質への炭酸固定を意味するものであって興味深い。現在, この分画の物質の同定を行っていないがおそらく有機酸類 (citric, lactic, malic acids など) やアミノ酸類 (alanine, glutamic acids など) 等に固定されているものと思われる。また, 酸可溶分画へも取込まれており, マウス卵子における報告⁹⁾ から考えて核酸分画へ固定されているものと想像される。また, ラット卵子はマウス卵子と同様に細胞外物質への炭酸固定能があることが明らかとなった。マウス卵子における細胞外物

質への炭酸固定は羊精子における成績¹¹⁾と非常に類似していることが報告されているが¹⁰⁾、ラット卵子の場合は前述したごとく、溶媒分画中の物質の同定を行なっていないのでマウス卵子や精子と類似しているかどうかは明らかでない。今後はこの点に関して、炭酸中の炭素がどんな物質に固定されているかについて解析される必要がある。

ラット卵子における炭酸固定能は中間代謝物質、いわゆる基質の種類や存在によって異なり、lactic と succinic acid を培養液 (KRP) に添加した場合は殆ど影響を受けないが glucose と pyruvic acid の添加によって著しく増大した。

このことはラット卵子における炭酸固定に特定のエネルギー給源体を必要とすることを意味し、炭酸固定の経路を示唆するものと考えられる。

また、2細胞期の卵子で気相を空気と 100% O₂にした場合の炭酸固定量を比較してみると、後者の気相での炭酸固定は前者の約2倍になった。これは、ラット卵子ではかなり積極的にガス状炭酸を固定していることを示すと考えられる。しかし、この点については、標識したガス状炭酸を用いて解析される必要がある。

2細胞期のラット卵子における炭酸固定量を glucose から卵子への炭素の取込みと比較すると glucose-1-¹⁴C の約 1/20 に相当するし、glucose-6-¹⁴C の約 1/2~1/3 になることがわかった。この事実から考えても、卵子における炭酸固定はかなり主要な metabolic pathway になるものと思われ。

これまで述べたように、少なくとも初期発生時のマウスやラット卵子では炭酸固定が行なわれることは明白な事実であるが、一体、どんな enzyme system のもとに行なわれるものなのかは不明である。卵子でこの点に関する研究は殆どなされていないが、微生物や筋肉および肝臓における炭酸固定の機構に関するこれまでの研究成果^{12~15)}から考えて、恐らく malic enzyme あるいは pyruvic carboxylase の関与の下で起こると想像される。それゆえ、もし、哺乳動物卵子における炭酸固定は前記酵素系の働きによって起こるとすれば、これら酵素の存在やその活性を確める必要があると思われる。

要 約

In vitro において、ラット卵子の炭酸固定能について

実験し次の結果を得た。

1, 2細胞期と胚盤胞期のラット卵子は H¹⁴CO₃⁻ を卵子の蛋白質分画やその他の有機物に固定することを認めた。

炭酸固定能は発生の段階によって異なり、発生が進むに従って固定能が増大した。その活性は2細胞期の卵子では1細胞期の約4倍に、胚盤胞期では2細胞期の約20倍以上であった。TCA 不溶分画への固定が最も多く全体の約 43~84% であった。一方、細胞外物質への固定は全体の約 20~25% であった。

また、ラット卵子での炭酸固定は中間代謝物質の種類や添加によって影響を受けた。

(1973. 5. 11 受付)

文 献

- 1) HAMNER, C.E. & S.B. Fox: In the mammalian oviduct. ed. E. S. E. HAFEZ & R. J. BLANDAU. Univ. of Chicago Press. p. 33, 1969.
- 2) HAMNER, C.E.: Adv. in Biosci., 6. G. RASPI ed. Perg. Press. p. 143, 1971.
- 3) RESTALL, B. J. & R. G. WALLS: Aust. J. Biol. Sci., 19, 687, 1966.
- 4) LUTWAK-MANN, C. & H. LASER: Nature, 173, 268, 1954.
- 5) WHITTEN, W. K.: Nature, 179, 1081, 1957.
- 6) WHITTEN, W. K. & J. D. BIGGERS: J. Reprod. Fert., 17, 399, 1968.
- 7) BRINSTER, R. L., In the Mammalian oviduct. ed. E. S. E. HAFEZ & R. J. BLANDAU, Univ. of Chicago Press. p. 419, 1969.
- 8) WALES, R. G., P. QUINN & R. N. MURDOCH: J. Reprod. Fert., 20, 541, 1969.
- 9) GRAUES, C. N. & J. D. BRIGGERS: Science, 167, 1506, 1970.
- 10) QUINN, P. & R. G. WALES: Aust. J. Biol. Sci., 24, 1277, 1971.
- 11) O'SHEA, T. & R. G. WALES: Aust. J. Biol. Sci., 23, 889, 1970.
- 12) LACHICA, R. V. F.: Enzymologia, 34, 281, 1968.
- 13) BRECH, W., E. SHRAGO & D. WILKEN: Biochim. Biophys. Acta, 201, 145, 1970.
- 14) UTTER, M. F. & D. B. KEECK: J. Biol. Chem., 238, 1963.
- 15) WOOD, H. G. & M. F. UTTER: "Essays in Biochemistry" ed. P. N. CAMPBELL & G. D. GRENVILLE, Acad. Press. Vol. I, p. 1, 1965.

Summary

The experiments were attempted to survey a possibility of fixation from carbon dioxide in the rat egg *in vitro*.

The eggs in 1 or 2-cell stage were collected from the animals superovulated according to the methods reported elsewhere.

For each replicate 50 to 200 eggs, depending on the stage of development, were cultured for 4 hour at 37°C in Krebs-Ringer phosphate buffer (KRP) which contained 1 μ ci of NaHCO_3 as basic medium with a gas phase of air. This fixation of carbon dioxide was compared to that in a various medium such as KRP+0.1% glucose+ 2.5×10^{-2} M of pyruvic acid (KHP+G+P), KRP+ 2.5×10^{-1} M of lactic acid (KRP+L) and KRP+ 10^{-2} M of lactic acid+ 2.5×10^{-3} M of succinic acid (KRP+L+S) with a gas phase of air and 100% of oxygen.

After the incubation, the eggs were separated by centrifugation from the medium and recovered for further fractionation.

The eggs were recovered from the tip of the centrifuge tube and both the eggs and the incubation medium were acidified to remove unfixed carbon dioxide.

The incorporated isotopes were fractionated by the schedule in Fig. 1 and the fixed radioactivity in each fraction was estimated by liquid scintillation counter with PPO-POPOP system.

The rat eggs from 1-cell to blastocysts have fixed from carbon dioxide to organic materials *in vitro*.

In 2-cell stage of rat egg, the incorporation of fixed carbon from carbon dioxide was two or more times greater than that of 1-cell eggs cultured for a similar period. The labelled products in the eggs and the culture medium was greatest in the blastocysts stage.

TCA-insoluble compounds were the major part of the incorporation in the embryos.

The incorporation of the eggs cultured in the medium which contained glucose and pyruvate was two times greater than that of eggs cultured in KRP and KRP+L medium.

The rate of the fixed carbon had affected by the gas phase. The metabolic pathways of the fixation of carbon dioxide in rat eggs were discussed.