

# ブタの卵母細胞と初期胚における グルコース-6-リン酸脱水素酵素の組織化学的研究

新村末雄<sup>1\*</sup>・大槻香苗<sup>2</sup>

(平成17年3月20日受付)

## 要約

体外で成熟過程にあるブタの卵母細胞、1細胞期から拡張胚盤胞期までの体外受精に由来するブタの卵子と初期胚について、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) の活性を組織化学的に検出した。

G-6-PDH 活性は、胞状卵胞から採取直後の卵母細胞では強く、この強い活性は培養後44時間の卵母細胞まで維持された。また、この酵素の活性は、媒精後の受精卵子でも強かったが、2細胞期から16細胞期の胚ではやや弱まり、弱度ないし強度となった。桑実胚期以降、酵素活性はさらに弱まり、活性を示さない胚も出現するとともに、拡張胚盤胞では活性はまったくみられなかった。

以上の結果と従来のステロイド代謝能の結果とを考え合わせると、成熟過程にあるブタの卵母細胞と発生過程にあるブタの初期胚は、G-6-PDH の作用によって産生した NADPH をステロイドの生合成のために利用していることが推察された。

新大農研報, 58(1):39-43, 2005

キーワード: グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ステロイド代謝、組織化学、ブタ初期胚、ブタ卵母細胞

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) は、ペントースリン酸回路の重要な位置を占める酵素で、グルコース-6-リン酸と 6 ホスホグルコノラクトン酸との間の相互転換に関与し、6 ホスホグルコン酸脱水素酵素とともに NADPH を産生している。黄体などのステロイドを合成している組織においては、この経路によって産生される NADPH は、ステロイドの水酸化に役割を果たしていると考えられている (Savard *et al.*, 1963)。

哺乳動物の卵母細胞と初期胚において、G-6-PDH 活性の組織化学的検出は、これまでにウシ (Iwasaki *et al.*, 1989)、ハムスター (新村と石田, 1977)、マウス (Lin *et al.*, 1964) およびウサギ (Sugawara and Hafez, 1967) で行われている。それらによると、この活性は、ウシでは成熟した卵母細胞と受精卵子の間では相違なく強く、この強い活性は8細胞胚までは維持されるが、桑実胚ではみられなくなるといわれている (Iwasaki *et al.*, 1989)。またハムスターでは、G-6-PDH 活性は、未成熟卵母細胞から前核期までの卵子では強いが、2細胞胚では低下し、この弱い活性は胚盤胞まで維持されるという (新村と石田, 1977)。なお、マウスとウサギの胚では、発生初期を通してこの酵素の活性が検出されている (Lin *et al.*, 1964; Sugawara and Hafez, 1967)。

一方、ブタの卵母細胞と発生初期胚はステロイド代謝を行っていることが調べられており (石田と新村, 1977; Ishida and Niimura, 1978; Takano and Niimura, 2002)、卵母細胞と初期胚のステロイド代謝には G-6-PDH によって産生された NADPH が利用されていることが考えられる。しかしこれまでに、ブタの卵母細胞の成熟や初期胚の発生に伴って G-6-PDH 活性がどのように変化するのは調べられていない。

本研究は、成熟過程にあるブタの卵母細胞と発生過程にあるブタの初期胚について、G-6-PDH 活性を組織化学的に検出し、

卵母細胞と初期胚におけるステロイド代謝との関係を検討したものである。

## 材料および方法

### 卵母細胞の採取と体外成熟

屠場で採取したブタの卵巣を、39℃に保温した生理食塩水に入れて速やかに研究室に持ち帰り、生理食塩水500ml中にペニシリンGカリウム (明治製菓) を100,000単位含む液で洗浄した。次いで、直径3ないし6mmの小型胞状卵胞から、21Gの注射針を取り付けた10mlの注射器で、卵丘細胞に囲まれた卵母細胞 (COC) を吸引採取した。採取した COC のうち、卵母細胞の細胞質が均一で、卵丘細胞が緊密な塊をなして卵母細胞に附着しているもののみを実体顕微鏡下で選び、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH7.4) (Dulbecco and Vogt, 1954) で3回洗浄した。これらの COC は、成熟用培養液で3回洗浄後、表面をミネラルオイルで覆った成熟用培養液で、39℃でCO<sub>2</sub> 5%、空気95%の気相下で培養した。なお成熟用培養液には、ピルビン酸ナトリウム0.01% (w/v)、グルコース0.055% (w/v)、乳酸カルシウム0.09% (w/v)、ペニシリンGカリウム20万単位0.01% (w/v)、ウシ胎子血清10% (v/v) を含むTCM-199 (GIBCO BRL, U.S.A.) に、PMSG (セロトロピン, 帝国臓器) 1,000IU/1、hCG (ゴナトロピン, 帝国臓器) 1,000IU/1、エストラジオール-17β (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 0.01% (w/v)、ブタ卵胞液10%を添加したものをを用いた (Yoshida *et al.*, 1991)。COCは4-well dish (NUNC, Denmark) を用いて培養し、1wellあたりの培養液の量は400μl、1wellあたりのCOCの数は50ないし70個とした。

### 体外受精胚の作出と培養

受精能獲得処置を施すために、Wangらの方法 (Wang *et*

<sup>1</sup>新潟大学農学部

<sup>2</sup>新潟大学大学院自然科学研究科

\*代表著者: niimura@agr.niigata-u.ac.jp

al., 1995) に従って射出精子を処理した。すなわち、新鮮射出精子を 5 mM カフェインと 0.3% ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma Chemical Co.) を含む mBO 液 (Brackett and Oliphant, 1975) で 3 回遠心洗浄した。次いで、受精能獲得処置を施した精子を上記の mBO 液で希釈し、 $5 \times 10^5$  個/ml の濃度になるように調整した。この精子懸濁液 400  $\mu$ l に 44 時間培養して成熟させた COC を 50 ないし 70 個入れ、39°C で CO<sub>2</sub> 5%、空気 95% の気相下で 6 時間培養して受精させた。なお、成熟培養後に卵丘細胞が膨化していない COC や細胞質が著しく偏っている卵母細胞は体外受精には用いなかった。

媒精後、卵母細胞を、0.4% の BSA を含む NCSU37 (Petters, 1992) で 3 回洗浄し、表面をミネラルオイルで覆った同種培養液 400  $\mu$ l 中に 50 ないし 70 個入れ、39°C で CO<sub>2</sub> 5%、空気 95% の気相下で培養した。培養 48 時間後に、2 細胞期以降に発生した胚のみを選別し、0.4% の BSA を含む NCSU37 で数回洗浄した後、同種培養液でさらに培養を続けた。なお、発生培養中に退行した胚は観察から除外した。

#### G-6-PDH 活性の検出

成熟培養後 0、8、22、32 および 44 時間の卵母細胞、媒精後 6 時間の受精卵子、2 細胞期ないし胚盤胞期の初期胚を、G-6-PDH 活性検出のための基質液に、37°C で 2 時間浸漬した。G-6-PDH 活性検出のための基質液は、Rudolph と Klein が使用した処方 (Rudolph and Klein, 1964) に準じて作成した。すなわち、基質液の組成は、D-glucose-6-phosphate disodium salt 0.4mg、NADP 0.5mg、0.1M トリス緩衝液 (pH7.2) 0.4ml、0.1% Nitro-BT 水溶液 (w/v) 0.2ml および蒸留水 0.4ml である。なお、基質 (D-glucose-6-phosphate disodium salt) を含まない液に浸漬した卵母細胞と初期胚を対照として用いた。

G-6-PDH 活性の検出には、成熟培養後 0 ないし 44 時間の卵母細胞、媒精後の受精卵子および各発生時期の初期胚それぞれ 20 ないし 30 個を用いた。また、G-6-PDH 活性の強さは、沈着したジホルマザン顆粒の量により、強度 (++)、弱度 (+) および陰性 (-) の 3 段階に分類した。

## 結 果

成熟培養後 0 ないし 44 時間の卵母細胞、媒精後の受精卵子および各発生時期の初期胚を、Rudolph と Klein の方法に従って作成した基質液に浸漬すると、卵母細胞、受精卵子および初期胚の細胞質にジホルマザン顆粒の沈着が認められた (図 1-5)。この顆粒は、基質を含まない液に浸漬した卵母細胞 (図 6)、受精卵子および初期胚には出現しなかったため、ジホルマザン顆粒が G-6-PDH 活性の存在を示していることが確かめられた。

### 1. 卵母細胞の成熟に伴う G-6-PDH 活性の変化

ブタ卵母細胞の成熟に伴う G-6-PDH 活性の変化について得られた成績は表 1 に示した通りである。すなわち、G-6-PDH 活性は、胞状卵胞から採取直後の卵母細胞 (図 1) では強く、この強い活性は培養後 44 時間の卵母細胞まで維持された。なおジホルマザン顆粒は、いずれの培養時間の卵母細胞でも細胞質全域に一樣に分布していた。

### 2. 胚の発生に伴う G-6-PDH 活性の変化

ブタ体外受精胚の発生に伴う G-6-PDH 活性の変化について得られた成績は表 1 に示した通りである。G-6-PDH 活性は、媒精後の 1 細胞期の受精卵子では強かったが、2 細胞期から 16 細胞期までの胚 (図 2, 3) ではやや弱まり弱度ないし強度に

なった。またこの酵素活性は、桑実胚期 (図 4) 以降さらに弱まり、活性を示さない胚も出現するとともに、拡張胚盤胞では活性は全くみられなかった。なおジホルマザン顆粒は、媒精後の受精卵子では細胞質全域に一樣に沈着していたが、2 ないし 8 細胞期の胚では割球によって沈着量が異なっていると同時に、16 細胞胚と桑実胚では一部の割球にのみ沈着が認められるものが多かった。さらに初期胚盤胞では、ジホルマザン顆粒は、内細胞塊ではすべての細胞の細胞質に沈着していたが、栄養膜では一部の細胞にのみ沈着しており、ほとんどの栄養膜細胞にはこの顆粒はみられなかった (図 5)。

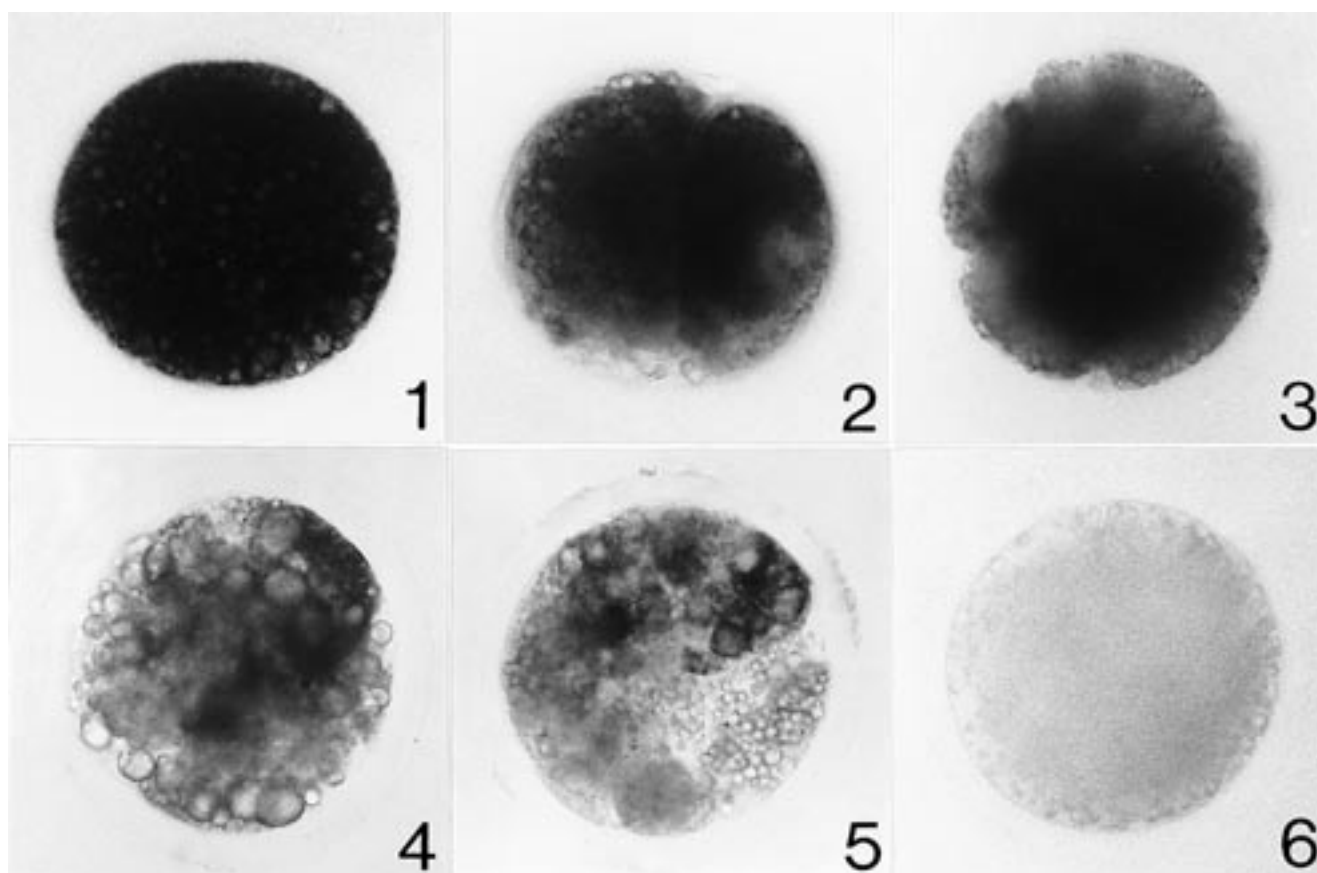
## 考 察

マウスとウサギの初期胚で G-6-PDH 活性を生化学的に測定した報告 (Brinster, 1966; 1970; Epstein *et al.*, 1969) によると、この酵素の活性は、未受精卵子から初期の分割胚では高いが、それ以降低下し、胚盤胞では未受精卵子の 13% (マウス) あるいは 9.8 ないし 23.6% (ウサギ) にそれぞれなったといわれている。また既述のように、ハムスター (新村と石田, 1977)、マウス (Lin *et al.*, 1964) およびウサギ (Sugawara and Hafez, 1967) の卵母細胞と初期胚でも G-6-PDH 活性が組織化学的に検出されており、この酵素の活性は発生に伴って変化するものの、卵母細胞から胚盤胞まで常に存在していたといわれている。

一方本実験において、成熟過程にあるブタの卵母細胞および 1 細胞期から拡張胚盤胞期までのブタ初期胚で、G-6-PDH 活性の検出を組織化学的に試みた。その結果、この酵素の活性は、胞状卵胞から採取した直後の卵母細胞から媒精後の 1 細胞卵子までは強かったが、2 細胞期ないし 16 細胞期の初期胚では若干弱まって弱度ないし強度になるとともに、桑実胚期以降さらに弱まり、活性を示さない胚も出現することが確かめられた。さらに、拡張胚盤胞期ではすべての胚がこの酵素の活性を有していないことも確かめられた。

黄体において、G-6-PDH によって産生された NADPH は、プロゲステロンの生合成を促進すると考えられており、培養液に NADP とグルコース-6-リン酸を添加したものでは LH を添加したものに比べてプロゲステロンの合成が促進されたといわれている (Savard *et al.*, 1963)。さらに、ハムスターの発情黄体でもプロゲステロンの分泌と G-6-PDH の活性との間には関係のあることが報告されている (Chatterjee and Greenwald, 1976)。

最近 Takano と Niimura (Takano and Niimura, 2002) は、体外で成熟過程にあるブタの卵母細胞で各種ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (HSD) の活性を組織化学的に検出してステロイド代謝能を検討している。その結果、卵母細胞の成熟に伴って活性が消失する HSD もいくつかはみられるが、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD および 20 $\beta$ -HSD の活性は培養後 0 ないし 44 時間まで常に認められたことから、成熟過程にあるブタの卵母細胞はアンドロゲンとプロゲステロンの生合成を行っていることを推察している。また、排卵後の 1 細胞期の卵子から胚盤胞期までのブタの胚には、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、20 $\alpha$ -HSD および 20 $\beta$ -HSD の活性が常に認められることから、ブタ胚は発生初期を通してプロゲステロンとエストロゲンの生合成を行っていることが示唆されている (石田と新村, 1977; Ishida and Niimura, 1978)。本実験において、G-6-PDH の活性は、胞状卵胞より採取直後の卵母細胞から培養後 44 時間までの卵母細胞、媒精後の受精卵子および 2 細胞期から初期胚盤胞期までの



All the porcine oocytes and embryos were stained by the Rudolph and Klein method for the demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH).

**Fig.1.** An oocyte just after collection from antral follicle.  $\times 350$ .

Diformazan granules showing the presence of G-6-PDH activity are located evenly throughout the cytoplasm.

**Fig.2.** A 2-cell embryo.  $\times 350$ .

Diformazan granules showing the presence of G-6-PDH activity are located in the cytoplasm of blastomeres.

**Fig.3.** An 8-cell embryo.  $\times 350$ .

Diformazan granules showing the presence of G-6-PDH activity are located in the cytoplasm of blastomeres.

**Fig.4.** A morula.  $\times 350$ .

Diformazan granules showing the presence of G-6-PDH activity are located in the cytoplasm of blastomeres.

**Fig.5.** An early blastocyst.  $\times 300$ .

Diformazan granules showing the presence of G-6-PDH activity are located in the cytoplasm of inner-cell-mass cells, but not in the cytoplasm of trophoblast cells.

**Fig.6.** A control oocyte cultured for 22 hrs, which was incubated in a substrate-free solution.  $\times 350$ .

No diformazan granules are located in the cytoplasm.

**Table 1.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in porcine oocytes and embryos

Oocytes					Embryos							
0*	8*	22*	32*	44*	1-Cell**	2-Cell	4-Cell	8-Cell	16-Cell	Morula	Blastocyst	
											Early	Expanded
++	++	++	++	++	++	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++	- ~ +	- ~ +	-

\* Hours after maturation culture.

\*\* 6 hours after insemination.

++ : Strong, +: weak, - : negative.

胚に観察された。このことから、ブタの卵母細胞と初期胚は、成熟過程ならびに初期発生の過程を通して、G-6-PDHによってNADPHを産生しているとともに、産生したNADPHをステロイドの生合成のために利用していることが推察された。

G-6-PDHは、X染色体に結合している酵素であることが知られているので (Leing *et al.*, 1983)、G-6-PDHの活性はX染色体の活性と密接な関係のあることが考えられる。既述のように、マウス、ハムスター、ウサギのような実験小動物の初期胚では、G-6-PDHの活性は発生に伴って低下するものの胚盤胞期まで維持されているので (Lin *et al.*, 1964; Brinster, 1966; 1970; Sugawara and Hafez, 1967; Epstein *et al.*, 1969; 新村と石田, 1977)、これらの動物の胚は胚盤胞期でもX染色体が活性を持っていることが考えられる。一方、本実験のG-6-PDH活性の検出結果から考えると、ブタの初期胚におけるX染色体の活性は、1細胞期の受精卵子では高いが、2細胞期以降低下し、拡張胚盤胞期では完全に消失することがうかがわれた。また、ウシの初期胚におけるG-6-PDH活性は、成熟後の卵母細胞から8細胞期までの胚では強いが、桑実胚ではみられなくなったといわれており (Iwasaki *et al.*, 1989)、ウシ胚におけるX染色体の活性は、8細胞期までは存在しているが、桑実胚期では完全に消失してしまうことが考えられる。従って、X染色体の不活化の時期は、マウス、ハムスター、ウサギのような実験小動物の胚に比べ、ウシやブタのような家畜の胚の方が早いように思われた。

## 引用文献

- Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **12**:260-274.
- Brinster, R. L. 1966. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the preimplantation mouse embryo. *Biochem. J.*, **101**:161-163.
- Brinster, R. L. 1970. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the early rabbit and mouse embryo. *Biochem. Gen.*, **4**:669-676.
- Chatterjee, S. and G. S. Greenwald. 1976. Biochemical changes in the corpus luteum of the cyclic hamster. *J. Endocr.*, **68**:251-256.
- Dulbecco, R. and M. Vogt. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**:167-174.
- Epstein, C. J., E. A. Wegienka and C. W. Smith. 1969. Biochemical development of preimplantation mouse embryos: *in vivo* activities of fructose 1, 6-diphosphate aldolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. *Biochem. Gen.*, **3**:271-281.
- 石田一夫・新村末雄. 1977. 発生初期におけるブタ卵子の estradiol-17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 活性について. *日畜会報*, **48**:373-375.
- Ishida, K. and S. Niimura. 1978. Histochemical studies of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -, 20 $\alpha$ - and 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and possible progesterone production in pig embryos. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **49**:295-300.
- Iwasaki, S., Y. Shioya, Y. Monji and T. Nakahara. 1989. Developmental change and sex difference in glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of bovine oocytes and embryos fertilized *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **35**:198-203.
- Leing, M., C. Lin and R. Ruth. 1983. The localization of genes for HPRT, G6PDH, and alpha-GAL onto the X-chromosome of domestic pig (*Sus scrofa domestica*). *Can. J. Genet. Cytol.*, **25**:239-245.
- Lin, C. H., C. F. Huang and T. K. Chang. 1964. Histochemical changes in mouse eggs before and after fertilization and during their early development. *Acta Biol. Exp. Sinica*, **9**:281-289.
- 新村末雄・石田一夫. 1977. ハムスターおよびブタの卵子におけるグルコース6リン酸脱水素酵素の組織化学的研究. *家畜繁殖誌*, **23**:72-75.
- Petters, R. M. 1992. *In vitro* culture of early stage embryos from livestock. *Tiss. Cul. Res. Commun.*, **11**:305-313.
- Rudolph, G. and H. J. Klein. 1964. Histochemical demonstration and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal rat organs. *Histochemie*, **4**:238-251.
- Savard, K., J. M. Marsh and D. S. Howell. 1963. Progesterone biosynthesis in luteal tissue: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and NADP-linked dehydrogenases. *Endocrinology*, **73**:554-563.
- Sugawara, S. and E. S. E. Hafez. 1967. Developmental changes in dehydrogenase activities in rabbit eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**:849-853.
- Takano, H. and S. Niimura. 2002. Changes in the activities of hydroxysteroid dehydrogenases in porcine oocytes during meiotic maturation *in vitro*. *J. Reprod. Dev.*, **48**:303-308.
- Wang, W. H., L. R. Abeydeera, L. R. Fraser and K. Niwa. 1995. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, **104**:305-313.
- Yoshida, M., Y. Ishizaki and H. Kawagishi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **88**:1-8.

## Histochemical Studies of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Porcine Oocytes and Preimplantation Embryos

Sueo NIIMURA<sup>1\*</sup> and Kanae OHNUKI<sup>2</sup>

(Received March 20, 2005)

### Summary

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) in porcine oocytes and embryos was histochemically examined by the Rudolph and Klein method.

Strong activity of G-6-PDH was observed in oocytes cultured for maturation and in fertilized oocytes, and blue diformazan granules produced by the enzyme reaction were spread evenly throughout the cytoplasm. In embryos, the activity somewhat decreased at the 2-cell stage, and the such activity was maintained up to the 16-cell stage. The activity weakened in embryos at the morula and early blastocyst stages, and some of them showed no enzyme activity. The enzyme activity completely disappeared from expanded blastocysts. In cleaved embryos, diformazan granules were distributed throughout the cytoplasm of blastomeres, while the amount of the granules differed among blastomeres. In early blastocysts, the granules were distributed in the cytoplasm of inner-cell-mass cells, but not in the cytoplasm of trophoblasts.

The results obtained from this investigation and former studies concerning steroid metabolism seem to suggest that porcine oocytes and preimplantation embryos utilize NADPH produced by G-6-PDH for biosynthesis of steroids.

*Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, 58(1):39-43, 2005

**Key words:** G-6-PDH, histochemistry, porcine embryo, porcine oocyte, steroid metabolism

---

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Niigata University

<sup>2</sup>Graduate School of Science and Technology, Niigata University

\*Corresponding author: niimura@agr.niigata-u.ac.jp