



二価陽イオンと精子抽出物によるブタ体外成熟卵母細胞の活性化に関する研究

岡田, 幸之助

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2010-06-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3069

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003069>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

二価陽イオンと精子抽出物による
ブタ体外成熟卵母細胞の活性化に関する研究

平成 16 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

岡田 幸之助

二価陽イオンと精子抽出物によるブタ体外成熟卵母細胞の活性化に関する研究

第1章 緒論.....	1
第2章 Sr^{2+} および精子抽出物によるブタ成熟卵母細胞の活性化	
第1節 緒言.....	4
第2節 Sr^{2+} および精子抽出物によるマウスおよびブタ卵母細胞の活性化.....	6
第3節 ブタ卵母細胞の活性化に及ぼす成熟培養時間の影響.....	20
第3章 二価陽イオンを含む培養液によるブタ成熟卵母細胞の活性化	
第1節 緒言.....	27
第2節 Sr^{2+} , Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液によるマウスおよび ブタ卵母細胞の活性化.....	29
第3節 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液によるブタ卵母細胞の活性化に及ぼす Ca^{2+} 輸送系阻害の影響.....	36
第4章 二価陽イオンおよび精子抽出物の顕微注入がブタ成熟卵母細胞に及ぼす影響	
第1節 緒言.....	45
第2節 Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} の顕微注入によるブタ卵母細胞の活性化.....	47
第3節 活性化処理後の細胞内遊離カルシウムイオン濃度の変化.....	50
第4節 活性化処理後の表層粒の崩壊.....	63
第5節 活性化処理後のCdc2キナーゼの不活性化.....	70
第6節 活性化処理した卵母細胞の体外発生.....	76
第5章 総括.....	85
謝辞.....	89
引用文献.....	90

第1章 緒論

哺乳類の卵巣内で発育した卵母細胞は、下垂体からの性腺刺激ホルモンの刺激によって第 I 減数分裂前期で休止していた減数分裂を再開し、第 I 極体を放出して第 II 減数分裂中期へと成熟し、受精可能な状態となる。この過程は卵母細胞の成熟と呼ばれ、ほとんどの哺乳類の卵母細胞は、第 II 減数分裂中期へと成熟し、ここで減数分裂を停止する。卵母細胞に精子が侵入すると、成熟卵母細胞は減数分裂を再開して第 2 極体を放出し、雌性前核を形成して減数分裂を完了する。その後、精子によって活性化された卵母細胞は胚としての発生を開始する。

精子侵入が起こるまで卵母細胞が停止している減数分裂のステージは種によって異なる。例えば、二枚貝やユムシでは第 I 減数分裂前期、ホヤでは第 I 減数分裂中期、大多数の脊椎動物では第 II 減数分裂中期で卵母細胞は停止し、また、ウニでは第一卵割の G1 期で細胞周期を停止する (Stricker, 1999)。しかし、卵母細胞の活性化は、いずれの種においても卵母細胞内の遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇によって起こる。活性化時の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、種々の実験によって間接的に示唆されていたが、1977 年、オワンクラゲ由来の Ca^{2+} 感受性発光タンパク質のエクオリンを注入したメダカ (*Oryzias latipes*) およびウニ (*Lytechinus pictus*) の卵母細胞において初めて実証され (Ridgway et al., 1977; Steinhardt et al., 1977), その後、研究されたすべての動物種の受精時に観察されている (Jaffe, 1985; Stricker, 1999)。精子が侵入すると、多くの種において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、精子侵入箇所から単一あるいは複数の波となって卵母細胞を伝播し、卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ レベルは 0.05 から 2 μ M まで上昇する (Gilkey et al., 1978; Jaffe, 1985; Stricker, 1999)。精子侵入時に起こる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、卵母細胞が減数分裂のいずれのステージで停止しているかによらず、卵母細胞の細胞周期を再開させるのに十分であると考えられている。この結論は、卵母細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ を人為的に上昇させる実験や、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を人為的に阻害する実験から導き出されている (ホヤ: Sensui and Morisawa, 1996; Russo et al., 1996, 脊椎動物: Steinhardt et al., 1974; Kline, 1988; Kline and Kline, 1992; Yamamoto et al., 1999, 棘皮動物: Steinhardt and Epel, 1974;

Nomura and Nemoto, 1998; Carroll et al., 1999, 2000)。

哺乳類の卵母細胞の活性化は、卵母細胞への精子侵入のほか、浸透圧の変化（マウス）、温度の変化（マウス）、エタノール（マウス）、イオンストレス（マウス）、酵素（マウス）および麻酔剤（マウス・ラット）といった多くの物理学的あるいは化学的な要因によって誘起される（Whittingham, 1980; Cuthbertson, 1983; Kaufman, 1983）。これらの人為的な刺激を受けて活性化した卵母細胞は、“単為発生（parthenogenesis）”を開始する。“単為発生”という言葉は1849年にOwenによって初めて用いられており、彼は、“単為発生”とは“雄の影響を直接受けずに子を産み出すこと”と定義している。近年Kaufman（1979）は、“単為発生”とは、“最終的に成体へと発生するか否かを問わず、雄の配偶子からの寄与を全く受けずに雌の配偶子から胚が形成されること”と定義している。未受精卵母細胞を人為的に活性化して得られた胚は、イギリスでは“parthenogene”（Beatty, 1957）、アメリカ合衆国では“parthenote”（Webster's Third New International Dictionary, 1961）と呼ばれている。

哺乳類の卵母細胞を用いた単為発生を導く人為的活性化の研究は、1930年代、Pincusらのグループによって始められている（Pincus, 1936）。1983年、Cuthbertsonは、排卵されたマウスの卵母細胞を希釈したエタノールで5～10分間処理すると、卵母細胞が容易に活性化され、活性化された卵由来の胚は体節期まで発生することを報告した。その後、単為発生に関する研究は、ゲノミック・インプリンティング機構の解明へと展開されることになる（Barton et al., 1984）。一方、卵母細胞の活性化処理は、無精子症や globozoospermia といった男性不妊の治療に利用される卵母細胞の細胞質中への精子の顕微注入（ICSI: Intra-cytoplasmic sperm injection）（Van Steirteghem et al., 1993; Kilani et al., 1998）、あるいは核移植によるクローン動物の作出技術（Wilmot et al., 1997; Wakayama et al., 1998）へと応用されてきている。ICSIあるいは体細胞核の移植後の卵母細胞の活性化は十分ではないため、これらの卵母細胞には人為的な活性化刺激が必要と考えられている（Macháty and Prather, 1998）。

ブタの卵母細胞を人為的に活性化するには電気刺激が用いられることが多い（Onodera and Tsunoda, 1989; Sun et al., 1992; Kure-bayashi et al., 1996）。一方、マウスの卵母細胞を効

率よく活性化するには、二価陽イオンのストロンチウム (Sr^{2+}) が広く用いられている (Whittingham and Siracusa, 1978; Fraser, 1987; Bos-Mikich et al., 1995)。本研究では、体外成熟培養によって得られた第 II 減数分裂中期のブタ卵母細胞の活性化における、ブタ精子抽出物および二価陽イオン (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+}) の有効性を検討した。培養液中への二価陽イオン添加による活性化処理では、マウスとブタの卵母細胞でその反応性が大きく異なったことから、二価陽イオンによる活性化処理についてさらに検討を進めた。また、これらの活性化処理によって、受精時と同様な一連の卵母細胞の反応が誘起されるか否かを検討した。

第2章 Sr²⁺およびブタ精子抽出物によるブタ成熟卵母細胞の活性化

第1節 緒言

哺乳類の成熟卵母細胞の減数分裂の再開は、精子の侵入以外に、低温あるいは高温処理による温度刺激、低張液あるいは高張液による浸透圧刺激 (Kaufman, 1983), 電気刺激などの物理的的刺激 (Rickords and White, 1992; Sun et al., 1992; Collas et al., 1993), エタノール (Cuthbertson, 1983), タンパク質合成阻害剤 (Bos-Mikich et al., 1995) やカルシウムイオノフォア (Steinhardt et al., 1974) などの化学的処理によっても誘起されることが知られている。エタノール処理および電気刺激は、マウス (Cuthbertson and Cobbold, 1985; 角田と杉江, 1987; Onodera and Tsunoda, 1989), ウサギ (Onodera and Tsunoda, 1989; Ozil, 1990) およびブタ (Sun et al., 1992; Kure-bayashi et al., 1995; Kure-bayashi et al., 1996; Cha et al., 1997; Jolliff and Prather, 1997) の卵母細胞を高率に活性化する。これらの人為的活性化法の多くは、卵母細胞に単一の細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を誘起する (Swann and Lai, 1997)。一方, Sr²⁺ (Fraser, 1987; Kline and Kline, 1992; Bos-Mikich et al., 1995) や、精子から抽出した水溶性タンパク質因子 (精子抽出物あるいは sperm factor: Dale et al., 1985; Swann, 1990) は、受精時にみられるのと類似した反復的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇 (Ca²⁺オシレーション) を起こすことが知られている。また, Sr²⁺処理あるいは精子抽出物の顕微注入によってマウスの体内成熟卵母細胞は高率に活性化される (Kono et al., 1995)。しかし, マウス以外の哺乳類の卵母細胞に及ぼす Sr²⁺処理の影響は、ほとんど調べられていない。ブタでは、卵母細胞を人為的に活性化するために電気刺激がよく用いられている。電気刺激は、ブタの成熟卵母細胞に単一の一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、卵母細胞を高率に活性化する (Sun et al., 1992; Kure-bayashi et al., 1994)。

哺乳類の卵母細胞を人為的に効率よく活性化させるには、成熟直後の卵母細胞ではなく、成熟後一定の時間を経た卵母細胞を用いる必要があると考えられている (マウス: Kaufman, 1983; Collas et al., 1989, ブタ: Nagai, 1987; Hagen et al., 1991, ウシ: King et al., 1988; Ware et al.,

1989)。一方、活性化された卵母細胞のその後の生存性や発生能を考慮すると、加齢 (aging) が進んでいない、成熟後の経過時間の少ない卵母細胞を用いる必要があると考えられる。

本章では、ブタ体外成熟卵母細胞を用いて、 Sr^{2+} およびブタ射出精子から抽出した精子抽出物がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響について検討し、ブタにおいて一般的に用いられている電気刺激による活性化と比較した。また、卵母細胞の活性化率に影響を及ぼす要因の1つと考えられる体外での成熟培養時間と活性化率との関係について、ブタ卵母細胞を電気刺激あるいは精子抽出物を顕微注入することによって検討した。

第2節 Sr²⁺およびブタ精子抽出物によるマウスおよびブタ卵母細胞の活性化

マウスの成熟卵母細胞は、Sr²⁺を含む培養液中で容易に活性化される (Whittingham and Siracusa, 1978; Fraser, 1987; Kline and Kline, 1992; Bos-Mikich et al., 1995)。最近、ラットの卵母細胞も Sr²⁺によって活性化されることが報告されている (Roh et al., 2003; Krivokharchenko et al., 2003)。しかし、マウスおよびラット以外の動物種で、Sr²⁺が卵母細胞を活性化するとの報告はない。一方、精子抽出物の顕微注入は、哺乳類の卵母細胞を高率に活性化するだけでなく、精子が卵母細胞に侵入したときと同様な Ca²⁺オシレーションを誘起することが知られている (マウス: Swann, 1990, ハムスター: Swann, 1992, ヒト: Palermo et al., 1997, ウシ: Wu et al., 1997, ブタ: Macháty et al., 2000)。

本節では、ブタの体外成熟卵母細胞が Sr²⁺を含む培養液によって、マウスの成熟卵母細胞と同様に活性化されるか否かを調べた。また、ブタ射出精子から抽出した精子抽出物をブタの体外成熟卵母細胞に顕微注入し、その後の卵母細胞の活性化を電気刺激によって活性化した場合と比較した。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の準備

①マウス

日本 SLC あるいは日本クレアより購入した ICR 系雌マウスを、14L:10D, 20±2°Cの条件下で自家繁殖した。13~17 週齢の雌マウスにウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG; セロトロピン, 帝国臓器) 5 IU を腹腔内投与し, 48 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG; プベローゲン, 三共) 5 IU を腹腔内投与して過剰排卵を誘起した。hCG 投与 15~16 時間後に頸椎を脱臼してと殺した後, 流動パラフィン (アミノ酸分析用, ナカライテスク) 中で卵管膨大部を針で裂き, 卵母細胞-卵丘細胞複合体 (OCC: oocyte-cumulus-complexes) を

採取した。流動パラフィン下に小滴状に作製した 100 μ l の 0.1% (W/V) ヒアルロニダーゼ (290 NF units/mg, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) を含む Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 中に OCC を移し、ガラスピペットを用いて卵丘細胞を除去した。卵母細胞を M2 液 (Whittingham, 1971) で 3 回、次いで M16 液 (Whittingham, 1971) で 3 回洗浄し、第 1 極体を放出している第 II 減数分裂中期の卵母細胞を活性化処理に用いた (図 1a)。

②ブタ

と畜場で未経産雌ブタから採取した卵巣を、20~25°C に保温して 2 時間以内に実験室に持ち帰った。0.2% (W/V) cetylmethylammonium bromide (和光純薬) 溶液中に浸して卵巣を殺菌洗浄した後、0.1% (W/V) ポリビニルアルコール (PVA, Sigma) を含む PBS (PBS-PVA) で 3 回洗浄した。その後、少量の PBS-PVA を入れたガラスシャーレ内に卵巣を移し、直径 4~6 mm の卵胞をメスで切り出した (図 2a, b)。卵胞周囲に付着した結合組織を実体顕微鏡下でピンセットを用いて剥離し (図 2c)、壁顆粒膜細胞層の剥離および卵母細胞の卵丘からの脱落が認められない卵胞を選出した (Moor and Trounson, 1977)。0.1% PVA を含む TCM-199 (Earl's salts, 日水製薬) に 10 mM NaHCO_3 と 25 mM N-2 (-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, 同仁化学) を添加し、1N NaOH で pH 7.4 に調整した HEPES-199 培養液を入れたプラスチックシャーレ (35×10 mm, No. 1008; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 中に卵胞を移した (図 2d)。実体顕微鏡下で卵胞壁を 2 本のピンセットでつまんで破り、壁顆粒膜細胞の一部が付着した状態の卵母細胞-卵丘細胞-壁顆粒膜細胞複合体 (OCGC: oocyte-cumulus-granulosa-complexes) を採取した (図 2e, f)。OCGC を HEPES-199 で 2 回洗浄した後、卵丘細胞が緊密に付着し、かつ細胞質が均質な卵母細胞を有する OCGC を選出して成熟培養に供した。

26.2 mM の NaHCO_3 を添加した TCM-199 に、0.91 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク)、0.08 mg/ml カナマイシン (Sigma) および 10% (V/V) 不活化ウシ胎児血清 (FBS, 大日本製薬) を添加した修正 TCM-199 を基本培養液とした。修正 TCM-199 に 0.1

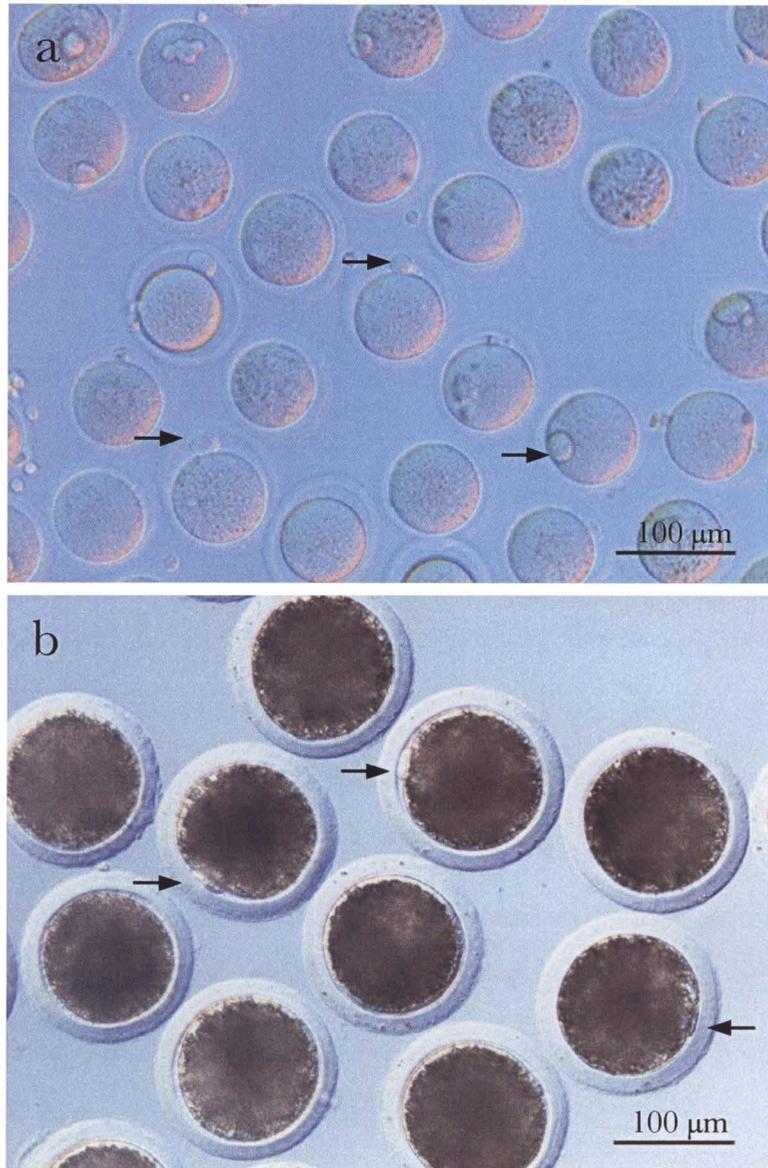


図1 マウス体内成熟卵母細胞 (a) およびブタ体外成熟卵母細胞 (b)

(a) 13~17週齢のICR系雌マウスにeCGおよびhCGを投与して過剰排卵を誘起し、hCG投与15~16時間後に卵管膨大部から卵母細胞を回収した。(b) ブタ卵巣から卵母細胞を採取し、体外で48時間成熟培養した。図中の矢印は第1極体を示す。

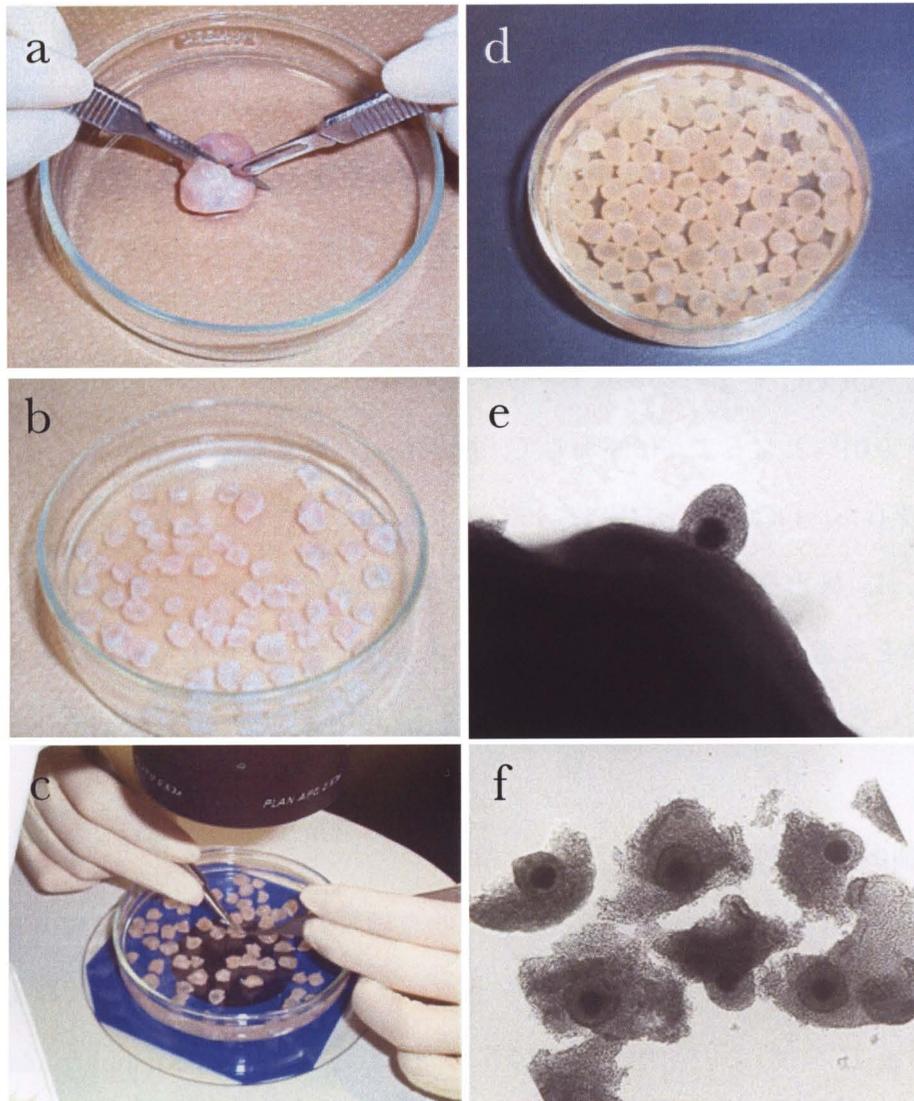


図2 ブタ卵母細胞の採取および成熟培養

ブタ卵巣から直径4~6 mmの卵胞を切り出し (a, b), 卵胞に付着した結合組織を剥離した (c, d)。HEPES-199中で、採取した卵胞の壁を破り、さらに反転して卵胞内壁に付着した卵母細胞 (e) を壁顆粒膜細胞とともに取り出した (f: 卵母細胞-卵丘細胞-壁顆粒膜細胞複合体)。

IU/ml ヒト閉経期性腺刺激ホルモン (hMG; パーゴナル, 帝国臓器) を添加し, 成熟培養液とした。プラスチックシャーレ (35×10 mm, No.1008; Becton Dickinson Labware) 内に入れた 2 ml の成熟培養液中に 30~50 個の OCGC を移し, さらに 2 個の卵胞殻を加えて, 5%炭酸ガス-95%空気, 38.5°C, 湿潤状態の炭酸ガス培養器内の振盪装置上で 48 時間成熟培養した。卵胞殻は, 前述の方法によって採取した卵胞をピンセットで引き裂いて反転し, 内壁に付着した卵母細胞と壁顆粒膜細胞を除去して作製した。卵胞殻を HEPES-199 で 2 回, 次いで成熟培養液で 1 回洗浄して卵胞液を除去した後に使用した (Ding and Foxcroft, 1992; Kano et al., 1993)。

成熟培養後, OCGC を含むプラスチックシャーレに 0.1% (W/V) ヒアルロニダーゼを最終濃度が 0.01%となるように添加して, 膨潤化した卵丘細胞層を伴うブタ卵母細胞を 1~2 分間処理した。OCGC を HEPES-199 で 3 回洗浄した後, ガラスピペットによって卵母細胞の吸引, 排出を繰り返し, 卵母細胞に付着した卵丘細胞を完全に除去した。次いで, 第 1 極体を放出しており, 細胞質の萎縮や希薄化, 変性の認められない卵母細胞を成熟卵母細胞として選別し, 活性化処理に用いた (図 1b)。

2) ブタ精子抽出物の調製

Swann (1990) の方法に従ってブタ精子抽出物を調製した。成熟した雄梅山豚から, 手掌圧迫法により射出精液を採取し, タイロード T6 液 (Quinn et al., 1982) で精子を 3 回遠心洗浄 (2,500 g, 15 分間) した。次いで pH 7.5 に調整した抽出液 (ICM: intracellular medium, 表 1) で精子を 3 回遠心洗浄 (2,500 g, 15 分間) し, 最終濃度を $5\sim 10\times 10^8$ sperm/ml に調製した。ICM 中で精子を 3 回凍結・融解を繰り返すことにより細胞膜を破碎し, その後, 4°C, 1 時間, 100,000 g で超遠心 (分離用超遠心機 70P-72, アングルロータ RP-65, 日立製作所) し, 可溶性細胞分画として上清を回収した。Centriplus-100 (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) 限外濾過膜で高分子量分画 ($MW\geq 100,000$) を調製した (タンパク質濃度: 3.5~7 mg/ml)。調製した抽出物をエッペンドルフチューブに分注し, -80°C で凍結保存した。実験前に融解し, 濾過滅菌 (ポアサイズ, 0.20 μm) した後, 顕微注入実験に用いた。

表1 精子抽出液 (ICM; Swann, 1990) の組成

成分	mM	mg/100ml
KCl	120.0	894.8
HEPES	20.0	476.6
EGTA	0.1	3.8
Na-glycerophosphate	10.0	216.0
<i>p</i> -APMSF ¹	0.2	5.0
DTT (dithiothreitol)	1.0	15.4

¹) *p*-amidinophenylmethylsulfonyl fluoride
pH 7.5

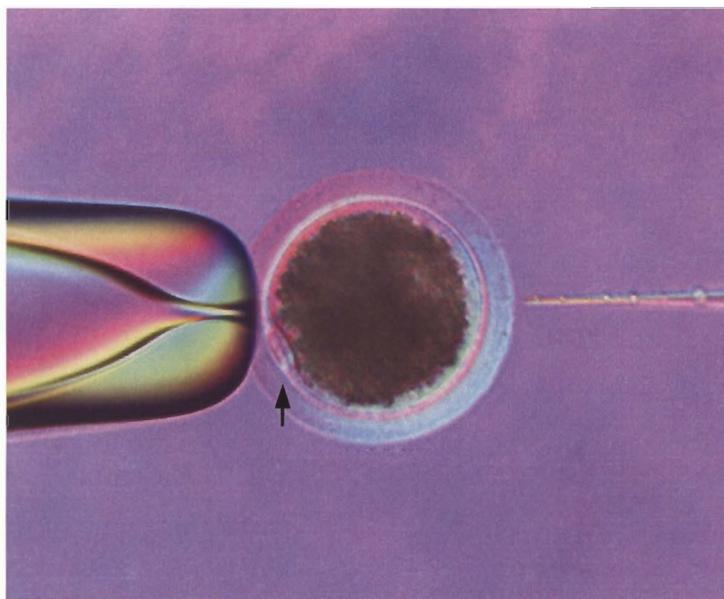


図3 ブタ卵母細胞への顕微注入

第1極体がホールディングピペット側 (図中左側) に位置するようにブタ卵母細胞を保持し、注入操作を行った。図中の矢印は第1極体を示す。

3) インジェクションピペットおよびホールディングピペットの作製

インジェクション用のガラス管 (GC-1, ナリシゲ) およびホールディング用のガラス管 (0.80×100 mm, Microcaps 100 μ l; Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA) をプラー (P-97/IVF, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) で引き延ばした後, エタノールで洗浄した。外径が 2 μ m 以下のものをインジェクションピペットとして使用した。外径が 90~120 μ m のホールディングピペットの先端をマイクロフォージ (MF-90, ナリシゲ) によって加工した。

4) 活性化処理

①Sr²⁺処理

Ca²⁺および Mg²⁺を除去し, 1, 2.5, 5 あるいは 10 mM の塩化ストロンチウム (ナカリテスク) を含む M16 液 の小滴を流動パラフィン下に作製し, そこへ採取した卵母細胞を入れて炭酸ガス培養器内でマウス卵母細胞については 37°C で, ブタ卵母細胞については 38.5°C で 2 時間培養した。培養後, M16 液で卵母細胞を 3 回洗浄し, マウス卵母細胞については M16 液中, 37°C で, ブタ卵母細胞については修正 TCM-199 中, 38.5°C で, さらに 4 時間培養した。Sr²⁺を含まない通常の M16 液中で同様に培養した卵母細胞を対照とした。

②ブタ精子抽出物の顕微注入

プラスチックシャーレ (60×15 mm, No. 1007; Becton Dickinson Labware) の蓋に流動パラフィンで覆った 50 μ l の HEPES-199 の小滴を作製し, 裸化したブタの成熟卵母細胞を移した。マイクロマニピュレーター (MMO-202, ナリシゲ) に装着したホールディングピペットで卵母細胞を保持し, インジェクションピペットでブタ精子抽出物を顕微注入した (図 3)。注入操作は, 顕微鏡用加温装置 (Microwarmer Plate, 北里サプライ) を装着した倒立型位相差顕微鏡 (IX-70, オリンパス) 下で行った。ブタ卵母細胞の直径は約 120 μ m であることから, 卵母細胞の容積を 900 pl と見積もり, その容積の 2.5~5% (23~45 pl) のブタ精子抽出物を注入した (Kono et al., 1995)。注入には電動式のマイクロインジェク

ター (IM-300, ナリシゲ) を使用した。注入前に精子抽出物を流動パラフィン中に排出し、形成された球の直径から容積を算出することによって 1 回の操作での注入容量を調節した。注入後、卵母細胞を修正 TCM-199 で 3 回洗浄し、38.5°C の炭酸ガス培養器内で 6～12 時間培養した。ICM を同量注入した卵母細胞を対照とした。

③電気刺激

Kure-bayashi ら (1995) の方法によってブタ成熟卵母細胞を電気刺激した。0.05 mM Ca^{2+} および 0.10 mM Mg^{2+} を含む 0.3 M マンニトール溶液 (Zimmermann and Viemken, 1982) を用いた。10～20 個の裸化したブタ成熟卵母細胞をマンニトール溶液で 3 回洗浄した後、環状並行電極 (電極間距離 2 mm, FTC-03; 島津製作所) 間に入れた 100 μl のマンニトール溶液中に浮遊させ、細胞融合装置 (ECF-2001, 理工学研究所) で、パルス幅 100 μsec の単矩形波、電圧 1,500 V/cm DC の電気刺激を 1 回与えた。なお、洗浄から印荷までの作業を 2 分以内に行った。電気刺激後、直ちに卵母細胞を修正 TCM-199 中で 5 回洗浄し、修正 TCM-199 中で、38.5°C の炭酸ガス培養器内で 6～12 時間培養した。

5) 活性化の判定

培養後、ワセリンを滴下したスライドガラス上に少量の培養液とともに卵母細胞を置き、カバーガラスを乗せてホールマウント標本を作製した。マウスでは、2.5% グルタルアルデヒドで卵母細胞をリンスし、直ちに 3% パラホルムアルデヒドに浸漬して 1 昼夜固定し、0.25% アセトラクモイドで染色した。ブタでは、酢酸エタノール (3:1) に 1～3 昼夜浸漬して卵母細胞を固定・脱脂し、1% アセトオルセインで染色した。染色後、アセトグリセロールで染色液を置換した後、カバーガラスの周囲をマニキュアで封入した。ホールマウント標本をノマルスキー微分干渉顕微鏡下で観察し、雌性前核の形成が認められる卵母細胞を活性化卵母細胞と判定した。

6) 統計処理

実験を 3 回以上繰り返した。 χ^2 検定によって実験結果の統計的有意性を検定した。

結果

培養液中の Sr^{2+} によるマウスおよびブタ成熟卵母細胞の活性化を表 2 に示す。マウス成熟卵母細胞では、1 mM の Sr^{2+} 濃度において 60% が活性化され、5 mM で 82%、10 mM で 90% と Sr^{2+} 濃度の上昇とともに卵母細胞の活性化率が上昇した。対照区のマウス卵母細胞は活性化されなかった。また、活性化された卵母細胞の核相は、2 極体 1 前核のものが 23% (1 mM)、48% (5 mM) および 68% (10 mM) で、1 極体 1 前核のものが 38% (1 mM)、34% (5 mM) および 22% (10 mM) と Sr^{2+} 濃度の上昇とともに第 2 極体を放出した卵母細胞数が増加した (図 4)。一方、ブタ卵母細胞では、いずれの Sr^{2+} 濃度でも活性化はまったく認められなかった。

ブタ精子抽出物の顕微注入によるブタ成熟卵母細胞の活性化を表 3 に示す。ポジティブコントロールとした電気刺激では、83% の卵母細胞が活性化された。ブタ精子抽出物を注入した卵母細胞は、85% と高い活性化率を示した。いずれの処理においても、2 極体 1 前核型の卵母細胞が、活性化された卵母細胞の 90% 前後を占めていた (図 5)。ICM を同量注入した対照区の卵母細胞の活性化率は実験区と比較して有意に低い値であった ($P < 0.01$)。

考察

マウスの卵母細胞は、 Sr^{2+} 存在下での 2 時間の培養によって、高い割合で活性化した。この結果は、これまでの報告と同様であった (Fraser, 1987; Bos-Mikich et al., 1995; Kono et al., 1995)。一方、ブタ卵母細胞を同様に処理した場合、1~10 mM いずれの Sr^{2+} 濃度においても卵母細胞はまったく活性化しなかった。この結果は、ブタ卵母細胞とマウス卵母細胞では細胞膜の Sr^{2+} の透過性、あるいは Sr^{2+} に対する反応性が異なることを示唆している。

ハムスター (Swann, 1990)、マウス (Kono et al., 1995; Wu et al., 1998)、ウサギ (Stice and Robl, 1990)、ウシ (Fissore et al., 1998) およびブタの卵母細胞は (Macháty et al., 2000) 精

表2 培養液中に添加したSr²⁺によるマウスおよびブタ成熟卵母細胞の活性化

マウス ²	Sr ²⁺ 濃度 (mM)	供試卵母 細胞数	活性化卵母細胞数(%)			非活性化卵母細胞数(%)		
			計	2極体1前核	1極体1前核	MII ¹	MII ¹	退行
	0	54	0 (0)	0 (0)	0 (0)	54 (100)	0 (0)	0 (0)
	1	53	32 (60) ^a	12 (23) ^a	20 (38) ^a	18 (34)	3 (6)	3 (6)
	5	56	46 (82) ^{ab}	27 (48) ^b	19 (34) ^b	10 (18)	0 (0)	0 (0)
	10	73	66 (90) ^b	50 (68) ^b	16 (22) ^b	7 (10)	0 (0)	0 (0)
ブタ ³	0	78	0 (0)	0 (0)	0 (0)	78 (100)	0 (0)	0 (0)
	1	39	0 (0)	0 (0)	0 (0)	39 (100)	0 (0)	0 (0)
	5	49	0 (0)	0 (0)	0 (0)	49 (100)	0 (0)	0 (0)
	10	58	0 (0)	0 (0)	0 (0)	58 (100)	0 (0)	0 (0)

¹⁾ MII: 第II減数分裂中期。

²⁾ hCG投与15～16時間後に採取した体内成熟卵母細胞。

³⁾ 体外で48時間成熟培養した卵母細胞。

^{ab)} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

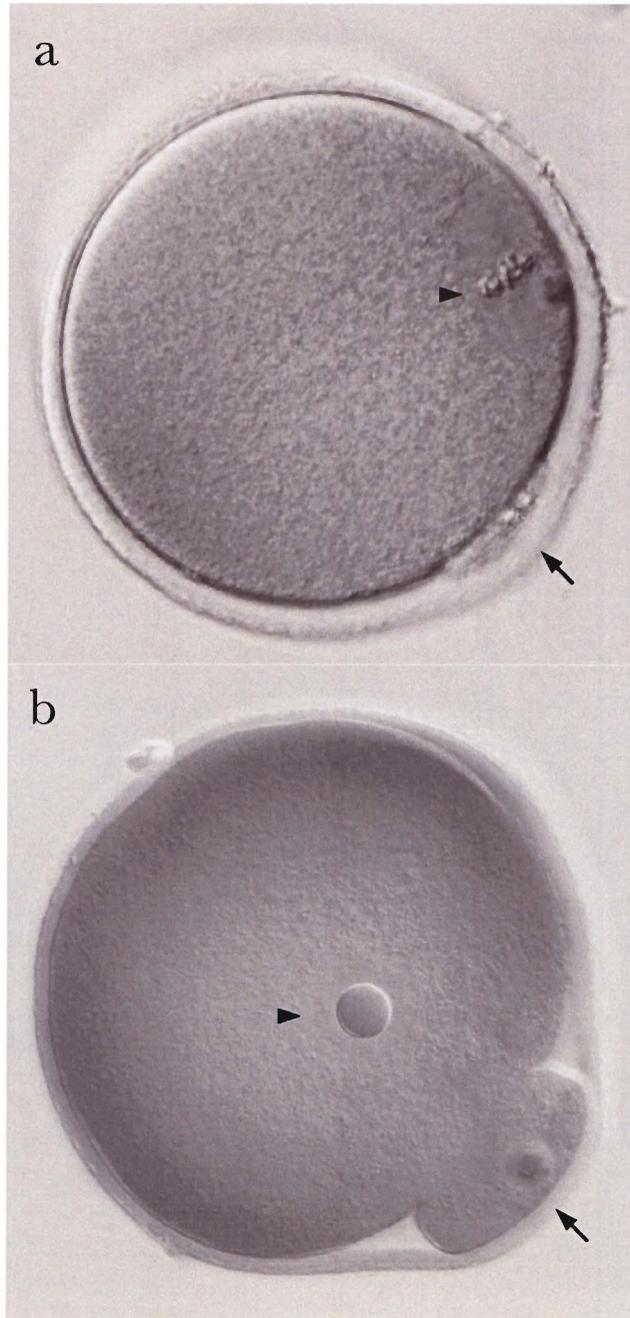


図4 Sr^{2+} を含む培養液によって処理したマウス卵母細胞の核相

マウスの成熟卵母細胞を10 mMの Sr^{2+} を含む培養液で2時間処理し，M16液中でさらに4時間培養した。培養後，卵母細胞を固定・染色して核相を観察した。図中の矢印は極体，矢尻は紡錘体あるいは雌性前核を示す。(a) 第II減数分裂中期の卵母細胞。(b) 2極体1雌性前核を有する活性化した卵母細胞。

表3 ブタ精子抽出物の顕微注入によるブタ成熟卵母細胞の活性化

活性化処理	供試卵母細胞数	活性化卵母細胞数(%)			非活性化卵母細胞数(%)		
		計	2極体1前核	1極体1前核	MII ¹	退行	
対照 ²	40	5 (13) ^a	5 (13) ^a	0 (0)	32 (80) ^a	3 (8)	
精子抽出物 ³	89	76 (85) ^b	66 (74) ^b	10 (11)	12 (13) ^b	1 (1)	
電気刺激 ⁴	54	45 (83) ^b	42 (78) ^b	3 (6)	5 (9) ^b	4 (7)	

¹⁾MII: 第II減数分裂中期。

²⁾体外で48時間成熟培養した卵母細胞に23~45 plのICMを顕微注入した。

³⁾体外で48時間成熟培養した卵母細胞に23~45 plの精子抽出物を顕微注入した。

⁴⁾体外で48時間成熟培養した卵母細胞を電気刺激した。

^{a,b)}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.01)。

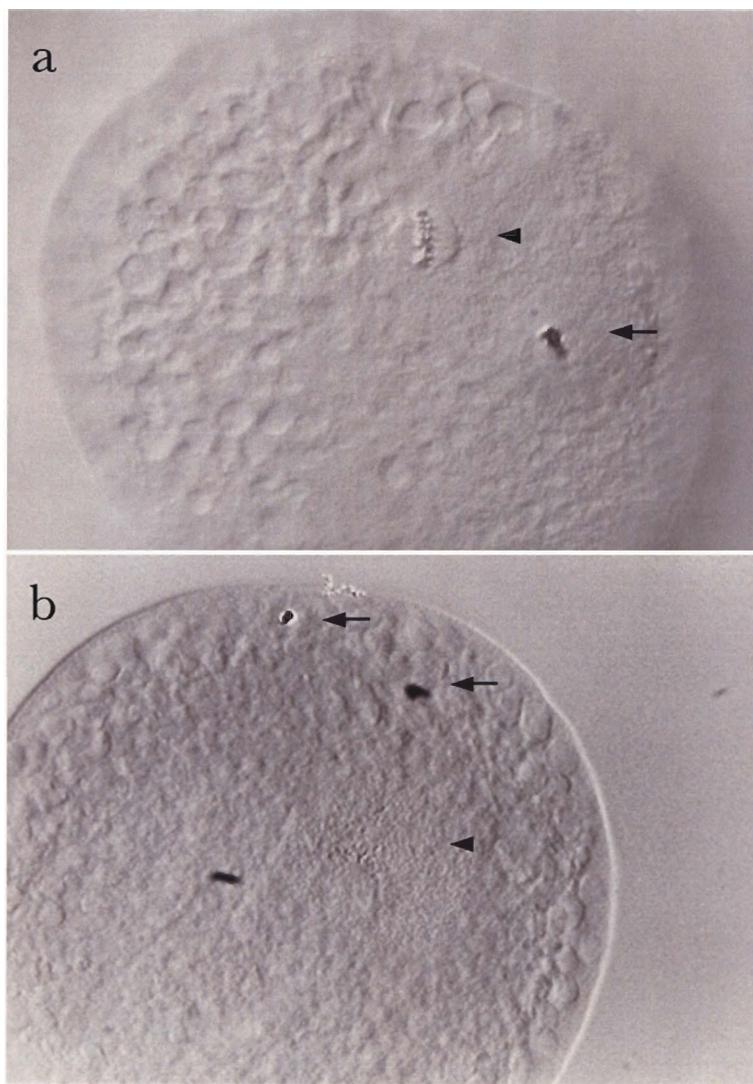


図5 ブタ精子抽出物を顕微注入したブタ卵母細胞の核相の変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞に23~45 plの精子抽出物を顕微注入し、6時間培養した。培養後、卵母細胞を固定・染色して核相を観察した。図中の矢印は極体、矢尻は紡錘体あるいは雌性前核を示す。(a) 第II減数分裂中期の卵母細胞。(b) 2極体1雌性前核を有する活性化した卵母細胞。

精子抽出物の顕微注入によって活性化される。本節の実験においても、精子抽出物の顕微注入により高い割合でブタ卵母細胞は活性化した。卵母細胞内に侵入した精子は、卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を誘起して、卵母細胞を活性化すると考えられている (Swann, 1990)。この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、小胞体からの Ca^{2+} の放出によると考えられている (Miyazaki et al., 1993)。 Ca^{2+} の放出には、主にイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP_3) 受容体を介する Ca^{2+} 放出と、リアノジン受容体を介する Ca^{2+} 放出機構がある (Swann and Parrington, 1999)。精子が誘起する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇機構として 2 つの仮説 (Homa et al., 1993)、精子受容体説 (receptor-mediated hypotheses: Jaffe, 1990; Miyazaki, 1988) と精子細胞質因子説 (sperm-factor hypotheses: Swann, 1990) が提唱されている。前者では、精子と卵母細胞の細胞表面に存在する分子の結合が下流のシグナル伝達系を經由して、ホスホリパーゼ C の活性化を介して IP_3 を生成し、 IP_3 が Ca^{2+} 放出を誘起すると考えられている。後者では、精子-卵母細胞の膜融合後、精子の細胞質中の因子が卵母細胞質中に移行し、これが $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を誘起すると考えられている (Whitaker and Swann, 1993)。本節の実験結果は、後者の経路が、ブタの卵母細胞にも存在することを示している。

精子抽出物の顕微注入によって活性化されたブタ卵母細胞の割合は、電気刺激と比較しても差はなかった。ブタ卵母細胞では、電気刺激直後に卵母細胞は減数分裂を再開し、4 時間後には、雌性前核が形成される (Kure-bayashi et al., 1996)。本節の実験において、精子抽出物の注入 6 時間後には雌性前核が形成されていたことから、電気刺激と同様に、精子抽出物注入直後にブタ卵母細胞は減数分裂を再開していると考えられる。

第3節 ブタ卵母細胞の活性化に及ぼす成熟培養時間の影響

成熟直後あるいは排卵直後の卵母細胞を活性化してもその活性化率は低いが、排卵後時間が経過した、あるいは体外での成熟培養時間を延長した卵母細胞では活性化率は上昇する (Siracusa et al., 1978; Fulton and Whittingham, 1978; Kaufman, 1983; Kubiak, 1989; Marcus, 1990; Vincent et al., 1992; Swann and Ozil, 1994)。本節では、卵母細胞の活性化率に影響を及ぼす要因の1つとして知られている成熟培養時間と活性化率の関係について検討した。本節の実験では、前節で高い活性化率が得られた精子抽出物の顕微注入および電気刺激によってブタ体外成熟卵母細胞を活性化処理した。

材料および方法

1) ブタ卵母細胞の採取および成熟培養

前節と同様の方法によってブタ卵母細胞を成熟培養した。卵母細胞の成熟過程を検討するために、培養開始、0, 6, 12, 18, 24, 30, 33, 36, 42 および 48 時間後に卵母細胞を回収し、固定・染色して卵母細胞の核相を調べた。

2) ブタ精子抽出物の調製

抽出物中のタンパク質濃度をさらに高めるために前節の方法を修正した。ブタ射出精液を採取し、HEPES 緩衝タイロード T6 液で2回遠心洗浄 (2,800 g, 10 分間) した。次いで、ICM で1回遠心洗浄 (2,800 g, 10 分間) し、最終濃度が 5×10^8 sperm/ml の精子懸濁液を調製した。以下の操作は 2~4°C で行った。精子懸濁液に超音波プローブを挿入して精子を超音波破碎した (超音波破碎装置: VC-501, プローブ: 直径 13 mm; Sonic and Material Inc., CT, USA)。超音波破碎は、3 分間破碎-10 分間冷却を1サイクルとして合計 5 サイクルの処理を行った。破碎液を 10,000 g で 15 分間冷却遠心して上清を採取し、さ

らに上清を 10,000 g で 15 分間冷却遠心後, 再び上清を採取した。次いで, この上清を 100,000 g で 45 分間超遠心してその上清を採取し, Centriplus-30 (Amicon) 限外濾過膜で分子量 (MW \geq 30,000) 以上の分画を濃縮回収した。限外濾過処理中に ICM を単純な組成の KCl 溶液 (75 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.2) に置換した。限外濾過後, 濃縮液のタンパク質濃度を 25 mg/ml に調製した。調製した溶液をエッペンドルフチューブに分注して -80°C で凍結保存し, 実験前に融解して使用した。

3) 活性化処理

ブタ精子抽出物の顕微注入および電気刺激ともに前節と同様の方法で行った。成熟培養実験の結果に従って, 第 II 減数分裂中期への成熟がほぼ完了する培養 36 時間後から 6 時間ごとに 48 時間後までの卵母細胞を活性化処理した。第 1 極体を有している卵母細胞を第 II 減数分裂中期と判定し, 実験に用いた。予備実験において卵母細胞あたり 23~45 μl の精子抽出物を顕微注入した卵母細胞では, 注入 12 時間後の卵母細胞の退行率は 7% であった。しかし, 培養時間を 24 時間まで延長すると, 52% (11/21) の卵母細胞が退行したため, 本節では卵母細胞への精子抽出物の注入量を 9~15 μl に変更した。この場合の活性化率 (81%, 13/16) は, 23~45 μl の精子抽出物を注入した卵母細胞の活性化率 (85%) と同等であり, 24 時間後の卵母細胞の退行率は 24% へと低下した。対照としては, 48 時間成熟培養した卵母細胞に, 実験区と同量の KCl 溶液を注入した。処理後 6 時間卵母細胞を培養し, 前節と同様の方法で卵母細胞の活性化を判定した。

4) 統計処理

実験を 3 回以上繰り返した。 χ^2 検定によって実験結果の統計的有意性を検定した。

結果

成熟培養前および培養 18 時間後までのブタ卵母細胞は卵核胞期にあった (表 4)。培養 24 時間後には、卵母細胞は第 I 減数分裂中期に達した。培養 33 時間後には約半数の卵母細胞が第 II 減数分裂中期に達し、成熟培養 42 時間以降には培養されたすべての卵母細胞は第 II 減数分裂中期に達していた。

精子抽出物の注入および電気刺激のいずれによっても、成熟培養時間が 36 時間から 42 時間へと長くなると卵母細胞の活性化率は上昇した (表 5)。第 II 減数分裂中期への移行直後と考えられる培養 36 時間後では、精子抽出物を注入した 67%、電気刺激を与えた 38% の卵母細胞がそれぞれ雌性前核を形成し、精子抽出物を注入した区が有意に高い活性化率を示した ($P<0.05$)。42 あるいは 48 時間成熟培養した卵母細胞では、精子抽出物を注入した卵母細胞すべてが、電気刺激を与えた卵母細胞の 95% および 89% が活性化した。これらの活性化率は 36 時間成熟培養した卵母細胞と比較すると有意に高い値であった ($P<0.05$)。成熟培養 48 時間後に KCl 溶液を顕微注入した対照区の卵母細胞はほとんど活性化しなかった。

活性化した卵母細胞の核相は、2 個の極体と 1 個の雌性前核を有する 1 倍体と推測されるものがどちらの処理区においても最も多く観察されたが、36 時間成熟培養した卵母細胞を電気刺激した場合には、2 個の極体と 1 個の紡錘体を有する核相 (MIII) が 38% と有意に高い割合で観察された。

考察

排卵直後のマウス卵母細胞では、人為的な活性化処理による活性化率は低く、排卵後の経過時間が長くなるとともに卵母細胞の活性化率は上昇する (Siracusa et al., 1978; Fulton and Whittingham, 1978; Kaufman, 1983; Kubiak, 1989; Marcus, 1990; Vincent et al., 1992; Swann and Ozil, 1994)。体外成熟卵母細胞の活性化率が培養時間の延長とともに上昇することは、

表4 プタ卵母細胞の成熟培養時間と核相の変化

培養 時間	供試卵母 細胞数	各成熟段階にある卵母細胞数 ¹ (%)			
		GV	MI	AI-TI	MII
0	16	16 (100)			
6	23	23 (100)			
12	13	13 (100)			
18	22	22 (100)			
24	16		16 (100)		
30	29		29 (100)		
33	22		3 (14)	7 (32) ^a	12 (55) ^a
36	11			1 (9) ^b	10 (91) ^b
42	16				16 (100)
48	31				31 (100)

¹)GV: 卵核胞期, MI: 第I減数分裂中期, AI: 第I減数分裂後期,
TI: 第I減数分裂終期, MII: 第II減数分裂中期。

^{a,b}) 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

表5 成熟培養時間がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響

活性化処理	成熟培養		供試卵母細胞数	活性化卵母細胞数(%)				非活性化卵母細胞数(%)		
	時間	細胞数		計	2極体1前核	1極体1前核	1極体2前核	MII ¹	MIII ²	退行
対照 ³	48	71	1 (1) ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	70 (99) ^a	0 (0)	0 (0)	
精子抽出物 ⁴	36	33	21 (67) ^b	18 (55) ^a	0 (0)	3 (9)	6 (18) ^b	6 (18) ^a	0 (0)	
	42	16	16 (100)	13 (81) ^b	0 (0)	3 (19)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	48	23	23 (100)	18 (78) ^b	2 (9)	3 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
電気刺激 ⁵	36	32	12 (38) ^c	10 (31) ^c	1 (3)	1 (3)	6 (19) ^b	12 (38) ^b	2 (6)	
	42	20	19 (95) ^d	12 (60) ^a	2 (10)	5 (25)	0 (0)	1 (5) ^a	0 (0)	
	48	28	25 (89) ^d	20 (71) ^{ab}	0 (0)	5 (18)	0 (0)	0 (0)	3 (11)	

¹⁾MII: 第II減数分裂中期。

²⁾MIII: 2個の極体と1個の分裂中期の紡錘体をもつ。

³⁾体外で48時間成熟培養した卵母細胞に9~15 plのKCl溶液を顕微注入した。

⁴⁾体外で各時間成熟培養した卵母細胞に9~15 plの精子抽出物を顕微注入した。

⁵⁾体外で各時間成熟培養した卵母細胞を電気刺激した。

^{a-d)}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

ウシ (Nagai, 1987; King et al., 1988; Ware et al., 1989), ブタ (Hagen, 1991) およびマウス (Bos-Mikich et al., 1995) において報告されている。本節の実験においても、精子抽出物の顕微注入および電気刺激による活性化率は、成熟培養 36 時間後ではそれぞれ 67%および 38%であったが、成熟培養 42 時間後にはいずれの処理区においても 89~100%へと急激に上昇した。

第 II 減数分裂中期へと成熟した後の卵母細胞は加齢 (aging) する。卵母細胞の活性化を誘起する $[Ca^{2+}]_i$ には、閾値があると考えられており (Rickords and White, 1992), 加齢が進むにつれてこの閾値が低下すると考えられている。成熟直後の卵母細胞では、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こるにもかかわらず活性化率が低いのは、 $[Ca^{2+}]_i$ が閾値に達しないことによると思われる (Vincent et al., 1992)。このことは、hCG 投与 12 時間後に採取された排卵直後のマウス卵母細胞を Sr^{2+} で処理すると、 Ca^{2+} オシレーションが起こるにもかかわらず、加齢が進んだ卵母細胞と比べて活性化率が低いことから推察される (Bos-Mikich et al., 1995)。

排卵あるいは成熟直後の卵母細胞を人為的に活性化することが容易でない理由としては、Cdc2 キナーゼの関与が考えられる。排卵された第 II 減数分裂中期の卵母細胞は、高い MPF 活性をもっている。単一の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇しか起こさない人為的活性化法では、一旦、Cdc2 キナーゼの活性が低下し、卵母細胞は減数分裂を再開して第 2 極体を放出するものの、活発なタンパク質おそらくサイクリン B の合成によって、再び Cdc2 キナーゼ活性が高まり、分裂中期の紡錘体を再形成する (MIII) ことが、マウス (Kubiak, 1989; Vincent et al., 1992) およびウシ (Susko-Parrish et al., 1994; Liu et al., 1998) で報告されている。本節の実験においても、成熟培養 36 時間後に精子抽出物を注入した卵母細胞の 18%が、また、電気刺激した卵母細胞の 38%がそれぞれ MIII の核相を示したこともこの理由によると考えられる。成熟培養 36 時間後の卵母細胞に精子抽出物を注入した場合、電気刺激と比較して有意に高い割合で卵母細胞は活性化し、また、MIII の卵母細胞の割合も低かった。Collas ら (1993) は、成熟直後のウシの卵母細胞を単一の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇しか起こさない Ca^{2+} イオノフォアによって処理すると、処理後 2~4 時間には Cdc2 キナーゼ活性が再び上昇することを報告している。しかし、 Ca^{2+} イオノフォア処理を反復する (Collas et al., 1993), もしくは Ca^{2+}

イオノフォア処理とタンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドとの同時処理 (Presicce and Yang, 1994; Liu et al., 1998; Wu et al., 1998) によって, Cdc2 キナーゼの再活性化を阻止すると, 卵母細胞は活性化する。精子抽出物を注入された卵母細胞は Ca^{2+} オシレーションを起こすことが知られており, この Ca^{2+} オシレーションが成熟直後のブタ卵母細胞においても誘起された結果, 単一の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇しか起こさない電気刺激よりも効果的に卵母細胞を活性化した可能性がある。

第3章 二価陽イオンを含む培養液によるブタ成熟卵母細胞の活性化

第1節 緒言

マウスの体内成熟卵母細胞を Sr^{2+} を含む培養液に浸漬すると、卵母細胞は容易に活性化される (Whittingham and Siracusa, 1978)。ラットの体内成熟卵母細胞も同様に Sr^{2+} を含む培養液によって効率よく活性化することが最近報告された (Roh et al., 2003; Krivokharchenko et al., 2003)。一方、ブタの体外成熟卵母細胞は Sr^{2+} を含む培養液に浸漬してもまったく活性化されない。マウスでは Sr^{2+} のほかに、培養液に添加した Ba^{2+} が卵母細胞を活性化することが知られている (Whittingham and Siracusa, 1978)。

体細胞では、様々な刺激によって細胞内で上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、細胞膜に存在する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系や Ca^{2+} ATPase などの Ca^{2+} の輸送系を介して細胞外に排出されるか、あるいは小胞体の膜に存在する Ca^{2+} ATPase を介して細胞内 Ca^{2+} ストアに取り込まれ、もとのレベルに戻る。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は種々の細胞に存在しており、3 個の Na^+ を細胞内へ取り込むと同時に 1 個の Ca^{2+} を細胞外へと排出する (Reeves and Hale, 1984)。生理的な条件下では、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は Ca^{2+} を細胞外へ排出することに機能するが、細胞内 Na^+ 濃度の増加あるいは細胞外 Na^+ 濃度の低下など細胞内外の Na^+ 濃度が逆転すると、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の輸送機構は逆転する。すなわち、細胞内への Ca^{2+} の流入と細胞外への Na^+ の排出が起こる (Blaustein and Lederer, 1999)。細胞膜の Ca^{2+} ATPase は、これまで調べられたすべての真核細胞に存在している (Schatzmann, 1989)。細胞膜の Ca^{2+} ATPase は Ca^{2+} に対して高い親和性をもっており、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の休止レベルを調節している。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇すると、細胞膜の Ca^{2+} ATPase は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系と協力して細胞外へと Ca^{2+} を排出する (Monteith et al., 1998)。

哺乳類の卵母細胞では、ハムスターにおいて初めて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の存在が示唆された (Igusa and Miyazaki, 1983)。その後、マウス (Pepperell et al., 1999; Carroll, 2000) およびブタ卵母細胞 (Macháty et al., 2002) において、 Na^+ を含まない培養液を用いて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

交換系の機能を逆転させる実験や、アミロライドやベプリジルなどの阻害薬を用いて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を阻害する実験から、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系が卵母細胞膜に存在することが明らかにされた。一方、哺乳類の卵母細胞において、細胞膜にある Ca^{2+} ATPase の存在を示唆する報告は、現在のところない。

本章では、卵母細胞の活性化における Sr^{2+} および Sr^{2+} 以外の二価陽イオンとして Ba^{2+} および Ca^{2+} の有効性をマウスの卵母細胞を用いて確認するとともに、ブタにおいても Ba^{2+} および Ca^{2+} が卵母細胞を活性化するか否かを検討した。また、細胞内からの Ca^{2+} の排出に機能すると考えられる $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系および細胞膜の Ca^{2+} ATPase を阻害することによって、ブタ卵母細胞が活性化されるか否かを検討した。

第2節 Sr^{2+} , Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液によるマウスおよびブタ卵母細胞の活性化

マウスの卵母細胞は、 Sr^{2+} 以外にも培養液中の Ba^{2+} によっても活性化する (Whittingham and Siracusa, 1978)。卵丘細胞が付着したマウスの成熟卵母細胞は、 Mg^{2+} を含まない培養液中で培養されると活性化する (Surani and Kaufman, 1977)。また、まったく二価陽イオンを含まない培養液によってもマウスの卵母細胞は活性化することが報告されている (Surani and Kaufman, 1977; Whittingham and Siracusa, 1978)。本節では、 Sr^{2+} 以外の二価陽イオンの Ba^{2+} および Ca^{2+} のマウス卵母細胞の活性化に及ぼす影響を確認するとともに、これらの二価陽イオンがブタ卵母細胞を活性化するか否か調べた。また、二価陽イオンを含まない培養液がブタの卵母細胞を活性化する可能性についてもあわせて検討した。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の準備

前章第2節と同様な方法で、9~11週齢のICR系雌マウスから体内成熟卵母細胞を準備し、また、前章第2節と同様な方法でブタの体外成熟卵母細胞を準備した。準備した成熟卵母細胞を裸化した後、第1極体の放出が認められた卵母細胞を実験に用いた。卵母細胞を、ピルビン酸ナトリウムおよびウシ血清アルブミン (BSA) を除き、0.1%ポリビニールアルコール (PVA) を添加したHEPES緩衝TALP液 (HEPES-TL; Bavister et al., 1983) で3回洗浄した後、活性化処理した。

2) 活性化処理

活性化処理のための基本培養液としては、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , NaHCO_3 および $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を除いたHEPES-TL液 (修正HEPES-TL) を用いた。このうち、 NaHCO_3 および $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ は、二価陽イオンの沈殿を防ぐために除いた。マウスおよびブタの体外成熟卵母細胞

胞を修正 HEPES-TL 液で 3 回洗浄した後, 0, 1, 5 あるいは 10 mM の塩化ストロンチウム (Sr^{2+}), 塩化バリウム (Ba^{2+}) または塩化カルシウム (Ca^{2+}) を含む修正 HEPES-TL 液中で 2 時間培養した。すべての処理は, マウスでは 37°C , ブタでは 38.5°C で行った。活性化処理後, BSA (Serologicals Co., GA, USA) を添加し, ビルビン酸ナトリウムを除いた NaHCO_3 緩衝 TALP 液 (TL-BSA) 中で卵母細胞を培養した。培養後, HEPES-TL 液で 5 回, TL-BSA 液で 3 回卵母細胞を洗浄した。次いで, TL-BSA 液中で卵母細胞をさらに 6 時間培養した。HEPES-TL 液中で同様に卵母細胞を 2 時間処理し, その後同様に培養したものを対照とした。培養後, 卵母細胞を固定・染色し, 核相から卵母細胞の活性化を判定した。マウス卵母細胞を二価陽イオンで処理した場合, 第 II 減数分裂後期あるいは終期で停止したと考えられる卵母細胞が多数出現したが, これらの卵母細胞は, 活性化卵母細胞に分類した。 χ^2 検定によって実験結果の統計的有意性を検定した。

結果

Sr^{2+} , Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液によるマウス卵母細胞の活性化の結果を表 6 に示す。対照区の HEPES-TL 液中で培養した卵母細胞は, まったく活性化しなかった。二価陽イオンを含まない修正 HEPES-TL 液で培養した卵母細胞の 54% が活性化し, 25% (7/28) の卵母細胞が雌性前核を形成した。1, 5 あるいは 10 mM の Sr^{2+} を含む培養液によって処理した卵母細胞は, 88%, 95% および 98% といずれの濃度においても他の実験区と比較して有意に高い活性化率を示した ($P < 0.05$)。また, 活性化したほとんどのマウス卵母細胞は 2 極体 1 前核の核相を示した。

1 mM の Ba^{2+} を含む培養液によって処理したマウス卵母細胞の 76% が活性化したが, Ba^{2+} 濃度の上昇とともに活性化率は低下した。活性化した卵母細胞の多くは前核形成に至らず, 第 II 減数分裂後期あるいは終期で停止していた。また, 5 あるいは 10 mM の Ba^{2+} を含む培養液で処理した場合, それぞれ 26% および 31% の卵母細胞では第 2 極体は放出されず, 卵母細胞の染色体は凝縮した形態を示した。10 mM の Ba^{2+} を含む培養液で培養した卵母

表6 Sr²⁺, Ba²⁺あるいはCa²⁺を含む培養液によるマウス成熟卵母細胞の活性化

活性化処理	濃度 供試卵母細胞数		活性化卵母細胞数 ¹⁾ (%)					非活性化卵母細胞数 ²⁾ (%)		
	(mM)	細胞数	計	AII-TII	2極体1前核	1極体1前核	1極体2前核	MII	IPBICC	退行
HEPES-TL	-	21	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
修正HEPES-TL ³⁾	-	28	15 (54) ^a	8 (29) ^a	4 (14) ^{acd}	2 (7)	1 (4)	13 (46) ^a	0 (0)	0 (0)
Sr ²⁺	1	42	37 (88) ^{bc}	4 (10) ^{ab}	30 (71) ^b	1 (2)	2 (5)	4 (10) ^b	0 (0)	1 (2) ^a
	5	42	40 (95) ^b	1 (2) ^b	38 (90) ^b	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5) ^a
	10	45	44 (98) ^b	0 (0)	44 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (2) ^b	0 (0)	0 (0)
Ba ²⁺	1	34	26 (76) ^{ac}	17 (50) ^a	8 (24) ^{ac}	1 (3)	0 (0)	5 (15) ^b	0 (0)	3 (9) ^a
	5	42	24 (57) ^a	20 (48) ^a	2 (5) ^d	2 (5)	0 (0)	4 (10) ^b	11 (26)	3 (7) ^a
	10	36	10 (28) ^d	9 (25) ^a	1 (3) ^d	0 (0)	0 (0)	4 (11) ^b	11 (31)	11 (31) ^b
Ca ²⁺	1	38	14 (37) ^d	2 (5) ^b	12 (32) ^{ac}	0 (0)	0 (0)	23 (61) ^{ac}	0 (0)	1 (3) ^a
	5	39	7 (18) ^{de}	1 (3) ^b	6 (15) ^{acd}	0 (0)	0 (0)	32 (82) ^{cd}	0 (0)	0 (0)
	10	41	4 (10) ^e	0 (0)	4 (10) ^{acd}	0 (0)	0 (0)	37 (90) ^d	0 (0)	0 (0)

¹⁾AII: 第II減数分裂後期, TII: 第II減数分裂終期。

²⁾MII: 第II減数分裂中期, IPBICC: 第2極体は放出されず, 染色体が凝縮した卵母細胞。

³⁾NaHCO₃, NaH₂PO₄・H₂O, Ca²⁺およびMg²⁺が含まれていないHEPES-TL液。

^{a-e)}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

細胞の 31%は退行した ($P < 0.05$)。

1 mM の Ca^{2+} を含む培養液で処理した卵母細胞の 37%が活性化され、32%が雌性前核を形成したが、5 あるいは 10 mM の Ca^{2+} を含む培養液で培養した卵母細胞の活性化率は低く、 Ca^{2+} 濃度の上昇とともに活性化率は低下した。

ブタ体外成熟卵母細胞の活性化に及ぼす Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液の影響を表 7 に示す。マウスと同様の条件で活性化を試みたが、いずれの実験区においてもブタの卵母細胞はまったく活性化されなかった。

考 察

マウスの排卵された卵母細胞は、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} などの二価陽イオンを含む培養液、あるいは二価陽イオンをまったく含まない培養液、いずれによっても活性化される (Whittingham and Siracusa, 1978)。Whittingham と Siracusa (1978) は、2 mM の Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} あるいは 1.71 mM の Ca^{2+} を含む培養液によってマウスの卵母細胞を処理すると、高率に卵母細胞が活性化することを報告している (Sr^{2+} : 約 90%、 Ba^{2+} : 約 75%、 Mn^{2+} : 約 60%、 Ca^{2+} : 約 50%)。この結果は、 Ca^{2+} 以外の二価陽イオンが、 Ca^{2+} に代わって卵母細胞を活性化する引き金になりうることを示唆している。本節の実験においても、 Sr^{2+} (1 ~ 10 mM) あるいは Ba^{2+} (1 mM) を含む培養液によって、マウス卵母細胞は高率に活性化された。しかし、 Ca^{2+} を含む培養液で処理した場合の卵母細胞の活性化率は、37% (1 mM) と低かった。培養液中の二価陽イオンの濃度あるいは二価陽イオンを含む培養液による処理時間がこれまでの報告との差の原因となっている可能性がある (Whittingham and Siracusa: 1 時間処理, 本節の実験: 2 時間処理)。

アフリカツメガエルの卵母細胞において、 Ba^{2+} および Sr^{2+} は、細胞内 Ca^{2+} ストア上に存在する Ca^{2+} 感受性の Ca^{2+} チャネルに対して Ca^{2+} と同様に作用し、ストアからの Ca^{2+} の放出を引き起こす (Yao and Parker, 1992)。本節の実験においても、培養液中の Sr^{2+} や Ba^{2+} はマウス卵母細胞の減数分裂の再開を誘起したが、これは卵母細胞内に入った Sr^{2+} や Ba^{2+}

表7 Sr^{2+} , Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液によるブタ成熟卵母細胞の活性化

活性化処理	濃度 (mM)	供試卵母細胞数	活性化卵母細胞数
HEPES-TL	–	35	0
修正HEPES-TL ¹	–	29	0
Sr^{2+}	1	29	0
	5	29	0
	10	28	0
Ba^{2+}	1	21	0
	5	21	0
	10	22	0
Ca^{2+}	1	24	0
	5	20	0
	10	22	0

¹⁾ NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないHEPES-TL液。

が細胞内 Ca^{2+} ストアに存在する Ca^{2+} チャンネルに作用し、 Ca^{2+} の放出を引き起こして卵母細胞を活性化したと考えられる。しかし、 Ba^{2+} で処理した卵母細胞の多くは、前核形成に至らず、第 II 減数分裂後期あるいは終期で減数分裂を停止した。また、培養液中の Ba^{2+} 濃度が 10 mM の場合には、有意に高い割合で卵母細胞が退行した。これらの結果から、 Ba^{2+} は、 Sr^{2+} や Ca^{2+} と比べて卵母細胞に対する毒性が強いと推測される。

培養液中の Ca^{2+} はマウス卵母細胞を活性化したものの、 Ca^{2+} 濃度の上昇とともに活性化率は低下した。 Ca^{2+} は、様々な細胞において細胞の機能や増殖に重要な機能を果たしている。一方で、 Ca^{2+} はアポトーシスといった細胞死を起こすためのメッセンジャーとしても働く (Berridge et al., 1998)。このため、細胞は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を厳密に制御している。細胞は過剰な Ca^{2+} の流入を感知すると、それ以上の Ca^{2+} の流入を阻止するために Ca^{2+} チャンネルなど Ca^{2+} 流入経路を遮断する (Taylor, 2002)。このため、細胞外の Ca^{2+} 濃度の上昇とともにマウス卵母細胞は Ca^{2+} の流入を抑制し、その結果、活性化率が低下したと推測される。

本節の実験において、二価陽イオンを含まない培養液によって処理されたマウス卵母細胞の約 50%が活性化した。同様な結果は、これまでいくつか報告されている (55~66%: Surani and Kaufman, 1977; 約 53%: Whittingham and Siracusa, 1978)。二価陽イオンを含まない培養液がマウスの卵母細胞を活性化する機構はよくわかっていないが、理由の 1 つとして $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の関与が考えられる。二価陽イオンを含まない培養液中でカエル (*Rana pipiens*) の卵母細胞を 1 時間培養すると、細胞膜の脱分極が起こって Na^+ が細胞内に蓄積されることが報告されている (Morrill et al., 1964)。また、通常、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は Ca^{2+} を細胞外へ排出することに機能しているが、細胞内 Na^+ 濃度の上昇あるいは細胞外 Na^+ 濃度の低下など細胞内外の Na^+ 濃度が逆転すると、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の機能は逆転する ('reverse mode' ; Blaustein and Lederer, 1999)。二価陽イオンを含まない培養液中で培養されたマウス卵母細胞は Na^+ を細胞内に蓄積し、卵母細胞内の Na^+ 濃度が細胞外より高くなり、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は 'reverse mode' になる。この状態で、卵母細胞が Ca^{2+} を含む通常の培養液中に戻されると、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介して、細胞内へ急速な Ca^{2+} の流入が起こり、卵母細胞が活性化すると考えられる。

ブタの成熟卵母細胞は、 Sr^{2+} 処理と同様に、 Ba^{2+} や Ca^{2+} によって活性化しなかった。こ

の原因としては、マウスとブタの卵母細胞において Ca^{2+} を含めた二価陽イオンの輸送機構の違いが推測される。卵母細胞が活性化されるには、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一定以上の値（閾値）まで上昇する必要があると考えられている（Rickords and White, 1992）。マウスでは、培養液中の二価陽イオンが卵母細胞に流入することによって、卵母細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が活性化を起こすために必要な閾値に達し、活性化が誘起されたと考えられる。一方、ブタでは、二価陽イオンを含む培養液による処理によって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が活性化に必要な閾値に達しなかったため卵母細胞が活性化されなかったのであろう。マウスとブタでは細胞膜の二価陽イオンに対する透過性が異なる可能性が考えられる。マウスの卵母細胞と同様に、ブタの卵母細胞においても二価陽イオンの流入が起こるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が卵母細胞の活性化を引き起こす閾値に達する前に、二価陽イオンが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系や Ca^{2+} ATPase などの輸送機構によって細胞内 Ca^{2+} ストアにすばやく取り込まれるか、あるいは細胞外へ排出される可能性も考えられる。

第3節 Sr²⁺あるいはCa²⁺を含む培養液によるブタ卵母細胞の活性化に及ぼす

Ca²⁺輸送系阻害の影響

マウスの成熟卵母細胞は Sr²⁺あるいは Ca²⁺を含む培養液によって活性化したが、ブタの成熟卵母細胞は活性化しなかったことから、マウスとブタでは、二価陽イオンの流入および排出に関わる機構に差があると推察される。この違いとしては、1) ブタ卵母細胞の細胞膜の二価陽イオンに対する透過性がマウスより低い、2) 二価陽イオンは卵母細胞内に流入するが、卵母細胞を活性化させるために必要な[Ca²⁺]_iの閾値に達する前に、卵母細胞質内からすばやく除去される2つの可能性が考えられる。ブタの卵母細胞において二価陽イオンの流入が起こっているにもかかわらず、急速に細胞外へと排出され、卵母細胞の活性化が起こらないのであれば、これらの輸送機構を阻害することによって、[Ca²⁺]_iを上昇させれば、卵母細胞は活性化するかもしれない(図6)。

細胞のCa²⁺排出機構には、細胞膜のNa⁺/Ca²⁺交換系とCa²⁺ ATPaseがある(DiPolo and Beauge, 1979; DiPolo, 1989)。マウス(Pepperell et al., 1999; Carroll, 2000)およびブタの卵母細胞(Macháty et al., 2002)には、細胞膜にNa⁺/Ca²⁺交換系が存在することが報告されている。しかし、哺乳類の卵母細胞の細胞膜Ca²⁺ ATPaseの存在を示す報告はない。

本節では、Na⁺/Ca²⁺交換系およびCa²⁺ ATPaseの機能を阻害した条件下でSr²⁺あるいはCa²⁺を含む培養液にブタの成熟卵母細胞を浸漬し、ブタ卵母細胞の活性化を試みた。Na⁺/Ca²⁺交換系の機能を逆転させるためには、Na⁺を含まない培養液を用いた。Ca²⁺ ATPaseの阻害には、細胞膜のCa²⁺ ATPaseを特異的に阻害することが報告されているカルボキシエオシンを用いた(Gatto and Milanick, 1993; Gatto et al., 1995)。また、Na⁺/Ca²⁺交換系あるいはCa²⁺ ATPaseの単独阻害、およびNa⁺/Ca²⁺交換系とCa²⁺ ATPaseの両方を阻害した場合の[Ca²⁺]_iの変化についても調べた。

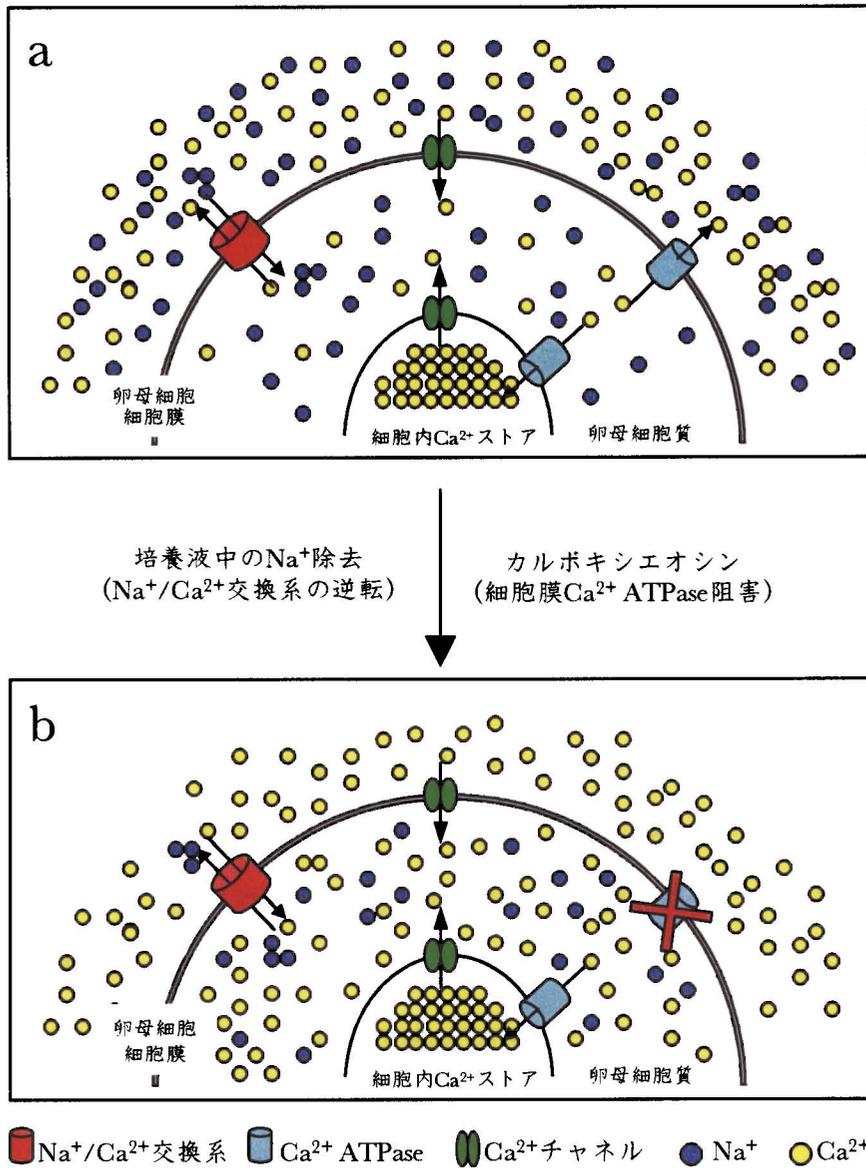


図6 卵母細胞膜上のNa⁺/Ca²⁺交換系およびCa²⁺ ATPase阻害によって予測される[Ca²⁺]_iの変化

生理的な条件下 (a) では、卵母細胞膜に存在するNa⁺/Ca²⁺交換系およびCa²⁺ ATPaseは[Ca²⁺]_iを低くするように機能している。培養液中のNa⁺を取り除くと (b)、Na⁺/Ca²⁺交換系の機能は逆転し、細胞内にCa²⁺が流入する。一方、カルボキシエオシンによってCa²⁺ ATPaseを阻害すると、Ca²⁺の細胞外への排出は阻害されると考えられる。この結果、卵母細胞内の[Ca²⁺]_iは上昇し、卵母細胞は活性化すると推測される。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の活性化処理

第2章第2節と同様の方法でブタの体外成熟卵母細胞を準備した。卵母細胞の活性化処理には、3種の培養液、1) Na^+ を含まない修正 HEPES-TL (Na^+ -free-TL) 液、2) カルボキシエオシン (CE) を含む修正 HEPES-TL 液、3) CE を含む Na^+ -free-TL 液を用いた。 Na^+ -free-TL液としては、塩化ナトリウムを114 mM塩化コリン (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) に置換し、培養液の pH を水酸化カリウム溶液で調整した修正 HEPES-TL 液を用いた。細胞膜の Ca^{2+} ATPase の阻害には CE (5-(and-6)-carboxyeosin diacetate, succinimidyl ester 'mixed isomers'; Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA) を用いた。10 mM の CE のストック溶液を dimethylsulfoxide (DMSO, 同仁化学) で調製し、 -20°C で保存した。CE の最終濃度が $20\ \mu\text{M}$ となるように培養液に添加した。10 mM Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を添加した上記3種の培養液中でブタの成熟卵母細胞を 38.5°C で1時間処理した。前節の実験で Ba^{2+} はマウスの卵母細胞に対して毒性を示したことから、本実験では用いていない。処理後、卵母細胞を TL-BSA 液で5回洗浄した後、TL-BSA 液中で、 38.5°C の炭酸ガス培養器内で、さらに7時間培養した。ブタ成熟卵母細胞を実験区と同量の DMSO のみを添加した修正 HEPES-TL 液で1時間処理し、その後、同様に7時間培養したものを対照とした。培養7時間後、第2章第2節と同様の方法で卵母細胞の活性化を判定した。 χ^2 検定によって実験結果の統計的有意性を検定した。

2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定

Ca^{2+} 蛍光指示薬には fluo-4 dextran (Molecular Probes Inc.) を用いた。1 mM fluo-4 dextran のストック溶液を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で調製し、 -20°C で凍結保存した。使用前に融解して、卵母細胞内の fluo-4 dextran の最終濃度が $5\sim 10\ \mu\text{M}$ になるようにストック溶液を卵母細胞に顕微注入した。1 μl の HEPES-TL 液の小滴を poly-d-lysine-coated glass-bottomed Petri dish (Mattek Co., Ashland, MA, USA) 上に作製し、流動パラフィンで覆ったのち、この小滴中に fluo-4 dextran を注入した卵母細胞を移した。ディッシュを共焦点レー

レーザー顕微鏡のステージに備えたヒートチャンバー (38.5°C) 上に設置し、1 μ l の HEPES-TL 液にさらに 99 μ l の各実験区の培養液を添加した後、ただちに共焦点レーザー顕微鏡で $[Ca^{2+}]_i$ の測定を開始した。測定は、約 30 分間行った。LSM-LU-100 レーザーユニット、DM 488 励起フィルターおよび BP 535 吸収フィルターを備えた共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-GB200, オリンパス) で $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った。

結果

修正 HEPES-TL 液中で処理した対照区の卵母細胞は、まったく活性化しなかった (図 7a, 表 8)。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む Na^+ -free-TL 液中で処理した卵母細胞では、それぞれ、11% および 14% が活性化し、雌性前核を形成した。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む CE 添加修正 HEPES-TL 液中で処理した卵母細胞では、それぞれ、14% および 9% が活性化し、雌性前核を形成した。CE 添加修正 HEPES-TL 液による処理区では、第 2 極体を放出せず、1 個の凝集した染色体をもつ卵母細胞が高率に出現した (図 7b, $P < 0.05$)。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む CE 添加 Na^+ -free-TL 液では、それぞれ 24% および 21% と、やや高い割合で卵母細胞が活性化し、雌性前核を形成した (図 7c)。

各培養液で処理した後の成熟卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を図 8 に示す。修正 HEPES-TL 液 (対照区, 図 8a, 0/12), および Sr^{2+} (図 8b, 0/7) あるいは Ca^{2+} (図 8c, 0/7) を含む Na^+ -free-TL 液で処理した卵母細胞では、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はみられなかった。CE を含む培養液で処理されたすべての卵母細胞において、CE の蓄積によると考えられる緩やかな蛍光の上昇がみられた (図 8d~g)。 Sr^{2+} (図 8d, 0/9) あるいは Ca^{2+} (図 8e, 0/9) を含む CE 添加修正 HEPES-TL 液で処理した卵母細胞では、CE による蛍光の上昇がみられたが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示す変化は認められなかった。一方、 Sr^{2+} (図 8f, 2/10) あるいは Ca^{2+} (図 8g, 0/6) を含む CE 添加 Na^+ -free-TL 液で処理した卵母細胞では、 Sr^{2+} で処理した卵母細胞においてのみ、CE によると考えられる緩やかな蛍光の上昇に比べて立ち上がりの速い急激な蛍光の上昇が観察された。



図7 Na^+ を含まない培養液およびカルボキシエオシン (CE) 処理後のブタ成熟卵母細胞の核相の変化
 48時間成熟培養したブタ卵母細胞を修正HEPES-TL液 (a, 対照区), 10 mMの Ca^{2+} を含む20 μM CE添加 Na^+ -free-TL液 (b),
 10 mMの Ca^{2+} を含む20 μM CE添加修正HEPES-TL液 (c)で1時間処理した後, TL-BSA液中で7時間培養した。培養後, 固
 定・染色して核相を観察した。(a) 第II減数分裂中期の卵母細胞, (b) 第2極体を放出せず, 染色体が凝集した卵母細胞,
 (c) 2極体1雌性前核を有する活性化した卵母細胞。図中の矢印は極体, 矢尻は染色体あるいは前核を示す。

表8 Na⁺を含まない培養液およびカルボキシエオシン (CE) 処理によるブタ成熟卵母細胞の活性化

CE濃度 (mM)	培養液 ¹⁾	二価 陽イオン ²⁾	供試卵母 細胞数	活性化卵母細胞数 (%)		非活性化卵母細胞数 ³⁾ (%)		退行
				計	前核形成	MII	IPBICC	
0	HEPES-TL	-	36	0 (0)	0 (0)	35 (97) ^a	1 (3) ^a	0 (0)
0	Na ⁺ -free-TL	-	37	4 (11) ^{ab}	4 (11)	31 (84) ^a	0 (0)	2 (5)
		Sr ²⁺	44	5 (11) ^{ab}	5 (11)	39 (89) ^a	0 (0)	0 (0)
20	HEPES-TL	Ca ²⁺	36	5 (14) ^{ab}	5 (14)	30 (83) ^a	1 (3) ^a	0 (0)
		-	39	1 (3) ^b	0 (0)	13 (33) ^b	24 (62) ^b	1 (3)
20	Na ⁺ -free-TL	Sr ²⁺	44	6 (14) ^{ab}	6 (14)	14 (32) ^b	21 (48) ^b	3 (7)
		Ca ²⁺	46	4 (9) ^{ab}	4 (9)	19 (41) ^b	22 (49) ^b	1 (2)
20	Na ⁺ -free-TL	-	39	6 (15) ^{ab}	6 (15)	29 (74) ^a	4 (10) ^c	0 (0)
		Sr ²⁺	45	11 (24) ^a	10 (22)	23 (51) ^b	11 (24) ^c	0 (0)
		Ca ²⁺	47	10 (21) ^a	10 (21)	23 (49) ^b	11 (23) ^c	3 (7)

¹⁾ NaHCO₃, NaH₂PO₄·H₂O, Ca²⁺, およびMg²⁺を含まないNa⁺-free-TL液およびHEPES-TL液。

²⁾ Sr²⁺およびCa²⁺の濃度は10 mM。

³⁾ MII: 第II減数分裂中期, IPBICC: 第2極体は放出されず, 染色体が凝集した卵母細胞。

^{a-c)} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

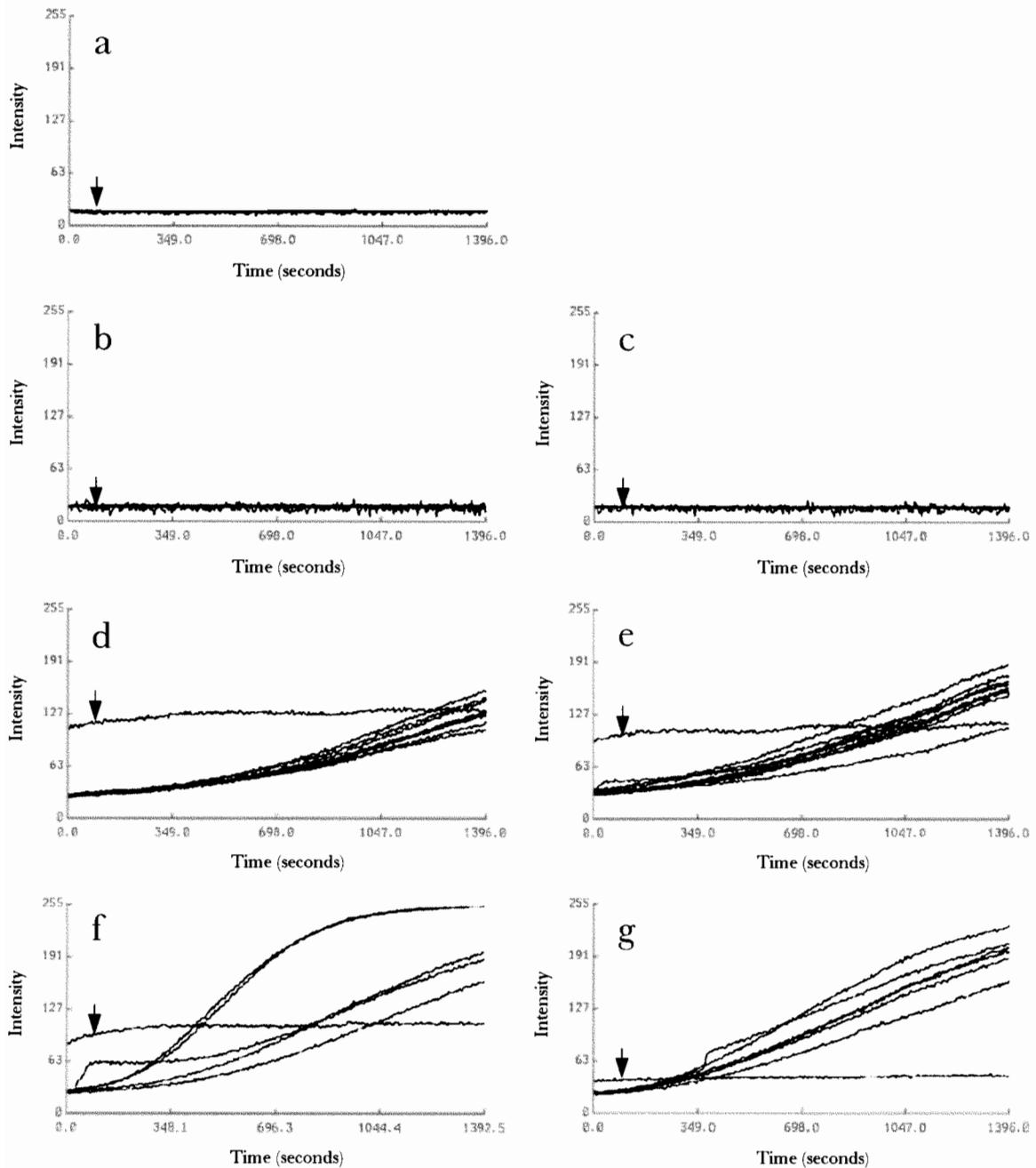


図8 Na⁺を含まない培養液およびカルボキシエオシン (CE) 処理後のブタ体外成熟卵母細胞の[Ca²⁺]_iの変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞にCa²⁺蛍光指示薬のfluo-4 dextranを注入した。fluo-4を注入した卵母細胞を修正HEPES-TL液 (a, 対照区), 10 mMのSr²⁺ (b) あるいはCa²⁺ (c) を含むNa⁺-free-TL液, 10 mMのSr²⁺ (d) あるいはCa²⁺ (e) を含む20 μM CE添加修正HEPES-TL液, あるいは10 mMのSr²⁺ (f) あるいはCa²⁺ (g) を含む20 μM CE添加Na⁺-free-TL液中で約30分間処理した。この処理の間、共焦点レーザー顕微鏡によって卵母細胞の[Ca²⁺]_iの変化を記録した。線1本が卵母細胞1個の[Ca²⁺]_iの変化を示す。図中の矢印で示した線はバックグラウンドを示す。

考察

Na⁺を含まない培養液によって、Na⁺/Ca²⁺交換系の機能の逆転を試みたが、活性化したブタ成熟卵母細胞の割合は14%にとどまった。Machátyら(2002)は、Na⁺を含まない培養液あるいはNa⁺/Ca²⁺交換系の阻害剤であるアミロライドおよびベプリジルを用いることによって、ブタの成熟卵母細胞の細胞膜にNa⁺/Ca²⁺交換系が存在し、Ca²⁺の排出に機能していることを示している。本節の実験条件では[Ca²⁺]_iの上昇は確認されなかったが、Machátyら(2002)は、逆転させたNa⁺/Ca²⁺交換系が細胞外からのCa²⁺の流入を誘起して[Ca²⁺]_iを上昇させることを示している。しかし、このCa²⁺の流入によって卵母細胞は減数分裂を再開していない。Ca²⁺ ATPase を特異的に阻害するCEを含む培養液でブタの成熟卵母細胞を処理したが、二価陽イオン存在下においても卵母細胞の活性化率は14% (Sr²⁺) および9% (Ca²⁺) と低く、[Ca²⁺]_iも有意な変化を示さなかった。これらの結果は、Na⁺を含まない培養液あるいはCE単独で処理された卵母細胞では、十分な[Ca²⁺]_iの上昇が起こらず、卵母細胞の活性化が起こらないことを示唆している。Na⁺を含まない培養液とCEで同時に処理することによって、Sr²⁺あるいはCa²⁺による卵母細胞の活性化率は上昇した。また、Sr²⁺で処理された卵母細胞では、CEによる緩やかな蛍光の上昇とは異なる顕著な蛍光の上昇が観察された。この結果は、Na⁺を含まない培養液とCEの同時処理によって、卵母細胞の[Ca²⁺]_iが上昇し、卵母細胞は活性化することを示している。一方、Ca²⁺で処理された卵母細胞では、[Ca²⁺]_iの上昇と思われる蛍光の上昇は観察されなかった。この理由については不明であるが、[Ca²⁺]_iの上昇がCEによる蛍光の上昇と同時に起こったか、あるいは遅れて起こったために[Ca²⁺]_iの変化が検出されなかった可能性が考えられる。

本節で用いた培養方法によって成熟させたブタ卵母細胞は、前章の実験からも明らかのように電気刺激によってはほぼすべてが活性化する。電気刺激(ブタ: Sun et al., 1992)あるいはCa²⁺を注入(ハムスター: Igusa and Miyazaki, 1983)した直後の卵母細胞では、急激な一過性の[Ca²⁺]_iの上昇が起こることが知られている。本節の実験において、Sr²⁺を含むCE添加Na⁺-free-TL液で処理された卵母細胞は[Ca²⁺]_iの上昇を起こしたが、[Ca²⁺]_iの上

昇は緩やかであった。卵母細胞の活性化を効率よく引き起こすには、一過性のより大きな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が必要と思われる。

CE 添加修正 HEPES-TL 液で処理された卵母細胞の約半数では第 2 極体が放出されず、紡錘体は崩壊して 1 個の凝集した染色体の塊が形成された。CE 添加 Na^+ -free-TL 液中で処理された卵母細胞では凝集した染色体を有する卵母細胞の割合は減少した。この原因はまったく不明であるが、HEPES-TL 液と Na^+ -free-TL 液に CE を添加することによって起こる卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ と $[Na^+]_i$ の変化は異なると考えられることから、この両イオンの濃度バランスと CE の何らかの作用によって染色体の凝集が引き起こされたと思われる。

第4章 二価陽イオンおよび精子抽出物の顕微注入がブタ成熟卵母細胞に及ぼす影響

第1節 緒言

哺乳類の成熟卵母細胞は、精子の侵入あるいは活性化刺激を受けるまで、第II減数分裂中期で停止している。卵母細胞が活性化される際に、表層粒の崩壊、第2極体の放出、前核の形成などの一連の細胞反応が起こる(図9)。卵母細胞の減数分裂の再開は、成熟促進因子(MPF: Masui and Markert, 1971)の活性の低下によって誘起される。

卵母細胞が活性化される際にみられる一連の細胞反応は、細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇によって誘起されると考えられている(Cuthbertson and Cobbold, 1985; Collas et al., 1993; Swann and Ozil, 1994)。電気刺激(ブタ)および Sr^{2+} 処理(マウス)は、卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こし(Sun et al., 1992; Kline and Kline, 1992)、ブタ(電気刺激: Kure-bayashi et al., 1996)やマウスの卵母細胞(Sr^{2+} 処理: Kline and Kline, 1992)を活性化する。

第2章および前章の結果より、二価陽イオンの存在下においてマウス卵母細胞は活性化したが、ブタ卵母細胞は活性化しなかった。 Ca^{2+} 輸送系を阻害することによってブタ卵母細胞は活性化したが、その割合は低かった。マウスでは、二価陽イオンの注入によっても卵母細胞が活性化することが報告されていることから(Fulton and Whittingham, 1978)、本章では二価陽イオンをブタ卵母細胞に注入して活性化誘起を試みた。また、これらの処理によって、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、表層粒の崩壊、Cdc2キナーゼの不活性化といった卵母細胞の活性化時にみられる一連の細胞反応について検討し、その後の胚発生についても調べた。これらの結果を電気刺激および精子抽出物を顕微注入した卵母細胞と比較した。

- 細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇
- 表層粒の崩壊
- MPF (成熟促進因子) の不活性化
- 細胞内カルシウム濃度の反復的な上昇 (Ca²⁺ オシレーション)
- 減数分裂の再開

- 第2極体の放出
- 前核の形成
- 胚発生の開始

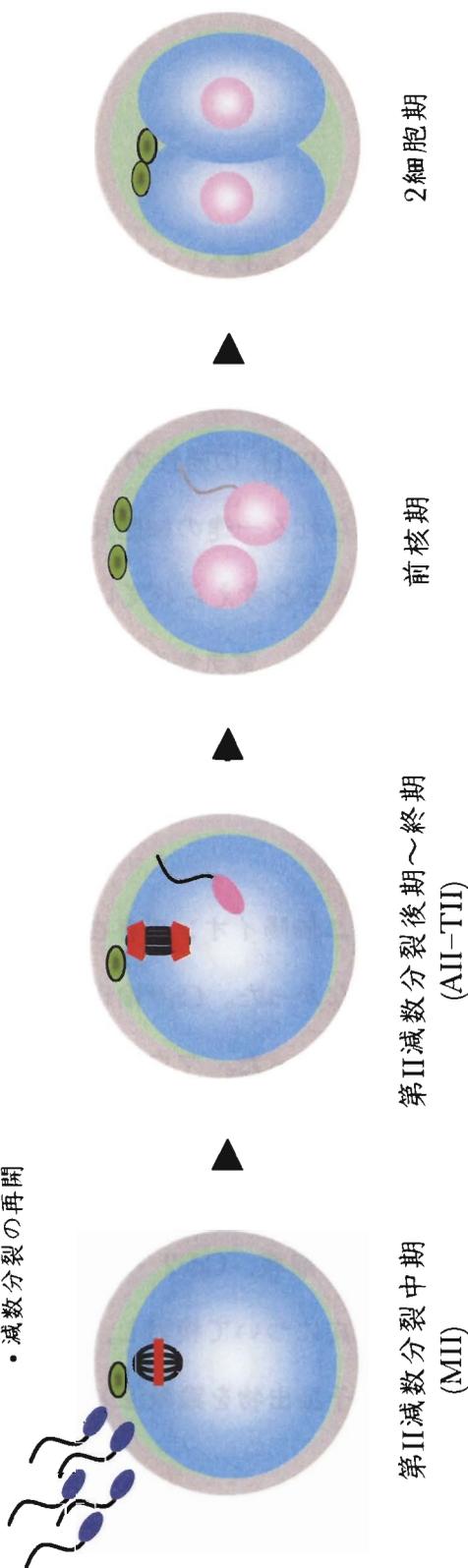


図9 哺乳類の成熟卵母細胞の精子侵入後にみられる変化

第2節 Sr²⁺あるいはBa²⁺の顕微注入によるブタ卵母細胞の活性化

マウスの成熟卵母細胞に Sr²⁺, Ba²⁺あるいは Ca²⁺を注入すると, 卵母細胞は活性化する (Fulton and Whittingham, 1978)。ブタの成熟卵母細胞に Ca²⁺を顕微注入すると, 卵母細胞は減数分裂を再開し, 前核を形成することが報告されている (Macháty et al., 1996)。本節では, Ca²⁺に加え, Sr²⁺あるいは Ba²⁺をブタ成熟卵母細胞に顕微注入することによって, 卵母細胞の活性化誘起を試みた。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞への二価陽イオンの顕微注入

第2章第2節と同様の方法によって体外で48時間成熟培養したブタ卵母細胞を準備した。卵母細胞の容積の1~1.7%にあたる9~15 plの0.1 M Sr²⁺あるいは Ba²⁺を含む20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を成熟卵母細胞に顕微注入した。ポジティブコントロールとして, Ca²⁺を含む HEPES 緩衝液を同様に卵母細胞に注入した。ネガティブコントロールとしては, 二価陽イオンを含まない HEPES 緩衝液を注入した。注入後, 卵母細胞を TL-BSA 液中で6時間培養した。顕微注入の操作は, 第2章第2節と同様の方法で行った。活性化の判定は, 第2章第2節と同様の方法で行い, χ^2 検定によって実験結果の統計的有意性を検定した。

結果

二価陽イオンを顕微注入したブタ卵母細胞の活性化率を表9に示す。Sr²⁺, Ba²⁺あるいは Ca²⁺の注入6時間後に, 注入した卵母細胞のそれぞれ55%, 67%および84%が活性化

表9 Sr²⁺, Ba²⁺あるいはCa²⁺の顕微注入によるブタ成熟卵母細胞の活性化

二価陽イオン ¹⁾	供試卵母細胞数	活性化卵母細胞数(%)				非活性化卵母細胞数 ²⁾ (%)			
		計	2極体1前核	1極体1前核	1極体2前核	MII	MIII	IPBICC	退行
対照	47	1 (2) ^a	0 (0)	1 (2)	0 (0)	44 (94) ^a	1 (2)	0 (0)	1 (2)
Sr ²⁺	49	26 (53) ^b	22 (45) ^a	1 (2)	1 (2)	11 (22) ^b	6 (12)	2 (4)	4 (8)
Ba ²⁺	51	34 (67) ^b	31 (61) ^{ab}	3 (6)	0 (0)	9 (18) ^b	2 (4)	1 (2)	5 (10)
Ca ²⁺	49	41 (84) ^c	36 (73) ^b	4 (8)	1 (2)	1 (2) ^c	1 (2)	2 (4)	4 (8)

¹⁾ 対照のブタ卵母細胞には、HEPES緩衝液を同量注入した。

²⁾ MII: 第II減数分裂中期, MIII: 2個の極体と1個の分裂中期の紡錘体をもつ, IPBICC: 第2極体は放出されず, 染色体が凝集した卵母細胞。

^{a-c)} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

し、雌性前核を形成した。雌性前核を形成した卵母細胞の多くは、2個の極体と1個の雌性前核を有していた。Sr²⁺を注入した卵母細胞において、他の実験区よりやや高い割合で2個の極体と1個の分裂中期の紡錘体(MIII)をもつ卵母細胞が現れた。二価陽イオンを含まないHEPES緩衝液のみを注入した卵母細胞は、ほとんど活性化しなかった。

考 察

本節の実験結果は、二価陽イオンが卵母細胞内に注入されれば、ブタ卵母細胞は活性化することを示している。ブタ卵母細胞へのCa²⁺の顕微注入によって、Machátyら(1996)の結果と同様に、高い活性化率が得られた。マウスではSr²⁺あるいはBa²⁺を卵母細胞に注入すると活性化する(Sr²⁺: 50%, Ba²⁺: 39%; Fulton and Whittingham, 1978)。Sr²⁺あるいはBa²⁺の顕微注入によってブタ卵母細胞も活性化されることが明らかとなった(Sr²⁺: 53%, Ba²⁺: 67%)。アフリカツメガエルでは、卵母細胞内に注入されたSr²⁺やBa²⁺は、Ca²⁺の代わりに、細胞内Ca²⁺ストアに存在するCa²⁺感受性Ca²⁺チャンネルに作用して、ストアからのCa²⁺の放出を誘起する(Yao and Parker, 1992)。ブタの卵母細胞を用いた本節の実験においても、注入されたSr²⁺やBa²⁺は、細胞内Ca²⁺ストアに存在するCa²⁺感受性Ca²⁺チャンネルに同様に作用し、細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺の放出を起こし、卵母細胞が活性化したと考えられる。一方、Sr²⁺あるいはBa²⁺が、Ca²⁺ストアから放出されるCa²⁺に代わって卵母細胞を直接活性化した可能性も否定できない。

Ca²⁺を注入したブタ卵母細胞の活性化率が、Sr²⁺やBa²⁺を注入した卵母細胞の活性化率と比べて有意に高い値を示した。Sr²⁺やBa²⁺も細胞内Ca²⁺ストアに存在するCa²⁺感受性Ca²⁺チャンネルに結合すると考えられるが、このCa²⁺チャンネルに対するSr²⁺やBa²⁺の親和性はCa²⁺に比べて低く、Ca²⁺ストアからのCa²⁺の放出が不十分であり、活性化率に影響を及ぼした可能性が考えられる。

第3節 活性化処理後の細胞内遊離カルシウムイオン濃度の変化

卵母細胞に侵入した精子は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こす。この Ca^{2+} の源は、小胞体と考えられており (Terasaki and Sardet, 1991), 小胞体の膜上に存在するイノシトール 1,4,5 三リン酸 (IP_3) 受容体やリアノジン受容体といった Ca^{2+} チャンネルに IP_3 (Ross et al., 1989; Furuichi et al., 1989), Ca^{2+} (Lai et al., 1988; Finch et al., 1991) あるいはサイクリック ADP リボース (Galione et al., 1991; Ayabe et al., 1995) が結合するとチャンネルが開いて、小胞体中の Ca^{2+} が放出されると考えられている。 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇すると、卵母細胞は減数分裂を再開し、その後、前核が形成される頃まで $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が反復して起こるが、これは精子侵入直後に起こる最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とは分けて、 Ca^{2+} オシレーションと呼ばれている (Cuthbertson and Cobbold, 1985; Miyazaki et al., 1993; Swann and Ozil, 1994)。

$[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、精子以外の人為的活性化によっても誘起されるが、電気刺激や Ca^{2+} イオノフォアによる活性化処理では、単一の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇しか起こらない。一方、 Sr^{2+} 処理や精子抽出物の注入によって、マウスの卵母細胞は一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に続いて Ca^{2+} オシレーションを起こすことが知られている (Kline and Kline, 1992; Parrington, 2001)。本節では、電気刺激あるいは精子抽出物を注入したブタ卵母細胞をポジティブコントロールとして $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こることを確認するとともに、前節においてブタ卵母細胞を活性化させることが明らかとなった Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} の顕微注入がブタ卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるか否かを調べた。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の活性化処理

第2章第2節と同様の方法によって体外で48時間成熟培養したブタ卵母細胞を準備し、二価陽イオンあるいは精子抽出物の顕微注入および電気刺激によって卵母細胞を活性化処

理した。前節と同様の方法によって卵母細胞に二価陽イオンを顕微注入した。また、精子抽出物を第2章第3節と同様の方法によって調製し、第2章第2節と同様の方法によって卵母細胞に顕微注入した。電気刺激には、第2章第2節と同様の方法を用いた。

2) $[Ca^{2+}]_i$ の測定

卵母細胞に注入された Sr^{2+} 、 Ba^{2+} および Ca^{2+} が直接 Ca^{2+} 蛍光指示薬の fluo-4 dextran を発光させる可能性があることから、二価陽イオンに対する fluo-4 dextran の反応性を調べた。1, 10 あるいは 100 μM の fluo-4 dextran を含む修正 HEPES-TL 液の小滴を準備した。共焦点レーザー顕微鏡下で、これらの小滴中に、卵母細胞に注入するのと同量の 0.1 M の Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む HEPES 緩衝液をインジェクションピペットで添加した後、約 1 分間蛍光の変化を記録した。また、対照の HEPES 緩衝液および精子抽出物についても同様に検討した。

前章第3節と同様の方法によって fluo-4 dextran を注入した卵母細胞（卵母細胞中での濃度: 5~10 μM ）を、poly-d-lysine-coated glass-bottomed Petri dish (Mattek Co.) 上に作製し、流動パラフィンで覆った 50 μl の HEPES-TL 液の小滴中に移した。共焦点レーザー顕微鏡によって卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を記録した。測定開始の約 30 秒後に前述の活性化処理を行った。実験の都合上、測定を2回に分けて行った。1回目は、活性化処理直後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を記録するために、1個の卵母細胞について5分間測定した。2回目は、活性化処理によって Ca^{2+} オシレーションが起こるか否か調べるために、活性化処理 10~30 分後の卵母細胞数個をまとめて、その後1時間にわたって $[Ca^{2+}]_i$ の変化を記録した。なお、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞については、注入後に上昇した $[Ca^{2+}]_i$ のレベルがもとにもどるのに時間を要したため、1回目の測定を10分間とし、電気刺激後の測定については、流動パラフィンで覆っていないマンニトール溶液中での卵母細胞の変性をなるべく抑えるため1回目の測定時間を3分間とした。その後、流動パラフィンで覆った 50 μl の HEPES-TL 液の小滴中に移し、2回目の測定を1時間行った。それぞれの活性化処理後の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇持続時間については、*t* 検定によって統計的有意性を検定した。

結果

Sr²⁺, Ba²⁺およびCa²⁺による fluo-4 dextran の反応性を表 10 および図 10 に示す。1 μM の fluo-4 dextran を含む修正 HEPES-TL 液に各二価陽イオンの溶液を添加しても fluo-4 の蛍光は認められなかった。10 μM の fluo-4 dextran では、Ca²⁺を添加した場合にのみ fluo-4 による蛍光が観察された。100 μM の fluo-4 dextran では、Sr²⁺あるいはBa²⁺を添加した場合、fluo-4 による弱い蛍光が、Ca²⁺の添加によって強い蛍光が観察された。精子抽出物に対しては、いずれの濃度の fluo-4 dextran もまったく反応しなかった。

卵母細胞中に注入された fluo-4 dextran の最終濃度は5~10 μMと見積もられることから、注入されたSr²⁺, Ba²⁺あるいは精子抽出物が直接 fluo-4 dextran に結合して発光させる可能性は低い。この条件下で二価陽イオン、および精子抽出物の顕微注入あるいは電気刺激を行い、[Ca²⁺]_iの変化を調べたところ、すべてのブタ卵母細胞において[Ca²⁺]_iの上昇が確認された (Sr²⁺: 8/8, Ba²⁺: 8/8, Ca²⁺: 10/10, 精子抽出物: 6/6, 電気刺激: 5/5)。各実験区における代表的な[Ca²⁺]_iの上昇パターンを図 11~15 に示す。いずれの処理によっても、処理直後に[Ca²⁺]_iの急激な上昇がみられた。Sr²⁺, Ca²⁺あるいは精子抽出物を顕微注入した卵母細胞では、注入直後に[Ca²⁺]_iは急激に上昇し (図 11, 13, 14), 約1分間この上昇が持続した後、もとの[Ca²⁺]_iレベルにもどった (表 11)。Ba²⁺を注入した卵母細胞では、上昇した[Ca²⁺]_iがもとのレベルにもどるには約7分間かかった (図 12, 表 11, P<0.05)。電気刺激した卵母細胞では、他の実験区と同様に刺激直後に[Ca²⁺]_iが急激に上昇したが (図 15), 1回目の測定の3分間の間にCa²⁺レベルがもともにもどることはなかった。2回目の約60分間の測定では、二価陽イオンを注入した卵母細胞および電気刺激した卵母細胞では、測定中に再び[Ca²⁺]_iの上昇が観察されることはなかったが、精子抽出物を注入した一部の卵母細胞 (2/6) において、測定期間中におよそ等間隔で6回あるいは9回 (図 16) の[Ca²⁺]_iの上昇 (Ca²⁺オシレーション) が観察された。二価陽イオンあるいは精子抽出物の注入と同様の方法で、HEPES 緩衝液を注入した対照区の卵母細胞では、[Ca²⁺]_iの有意な変化は観察されなかった (図 11, 赤線)。

表10 二価陽イオンによる fluo-4 dextran の反応性

検査溶液 ¹	fluo-4 dextran 濃度 ² (μM)		
	1	10	100
対照	-	-	-
Sr ²⁺	-	-	+
Ba ²⁺	-	-	+
Ca ²⁺	-	+	++
精子抽出物	-	-	-

¹⁾ 各濃度の fluo-4 dextran 溶液に、卵母細胞に注入するのと同量の各溶液を添加した。対照には HEPES 緩衝液を用いた。

²⁾ -: 反応なし, +: 反応あり, ++: 強い反応あり。

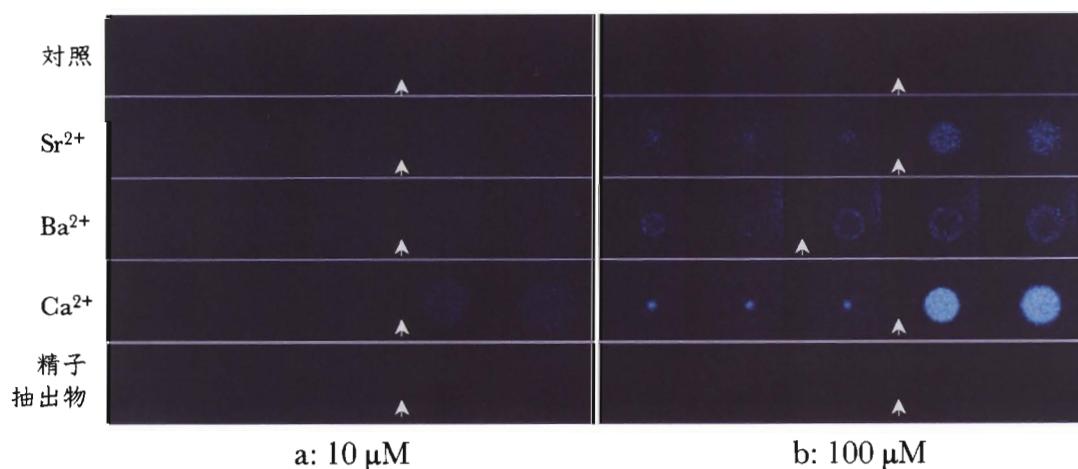


図10 二価陽イオンによる fluo-4 dextran の蛍光

10 μM (a) あるいは100 μM (b) の fluo-4 dextran を含む溶液に、卵母細胞に注入するのと同量の HEPES 緩衝液 (対照), 0.1 M の Sr²⁺, Ba²⁺ あるいは Ca²⁺ を含む HEPES 緩衝液, あるいは精子抽出物を注入し, fluo-4 dextran の反応性を調べた。図中の矢印は各溶液の添加時点を示す。

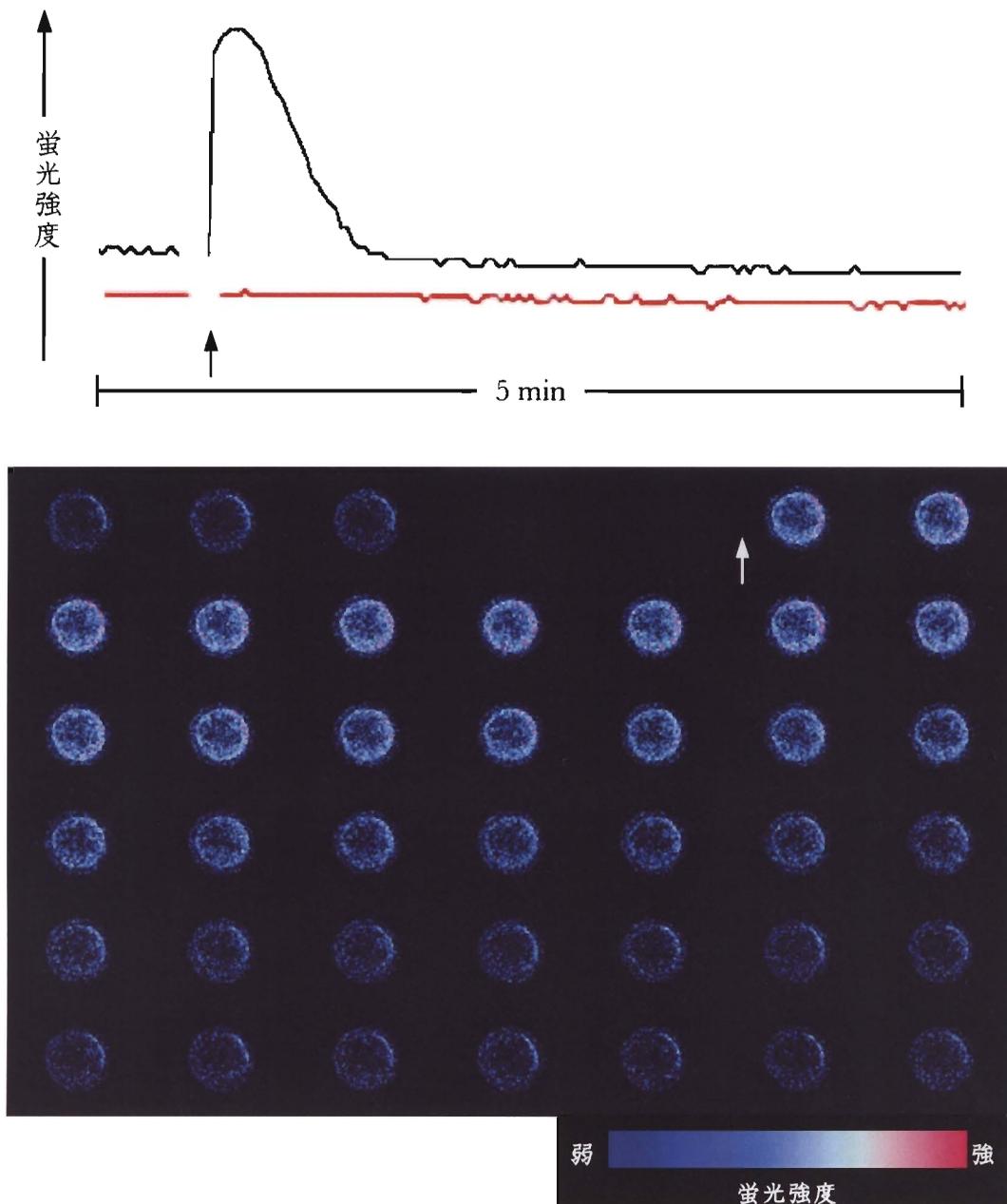


図11 Sr²⁺顕微注入後のブタ卵母細胞の[Ca²⁺]_iの変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞にCa²⁺蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、Sr²⁺を注入してその後の[Ca²⁺]_iの変化を約5分間記録した。上段のグラフは、下段の蛍光イメージ像をグラフ化したものである。グラフ中の赤線は対照を示す（HEPES緩衝液を注入）。図中の蛍光イメージ像が一部消失しているのは、レーザー光を遮断して卵母細胞へSr²⁺を注入しているためである。また、蛍光イメージ像は擬似色で表されており、青色から赤色に変化するほど蛍光が強くなることを示している。図中の矢印は注入時点を示す。

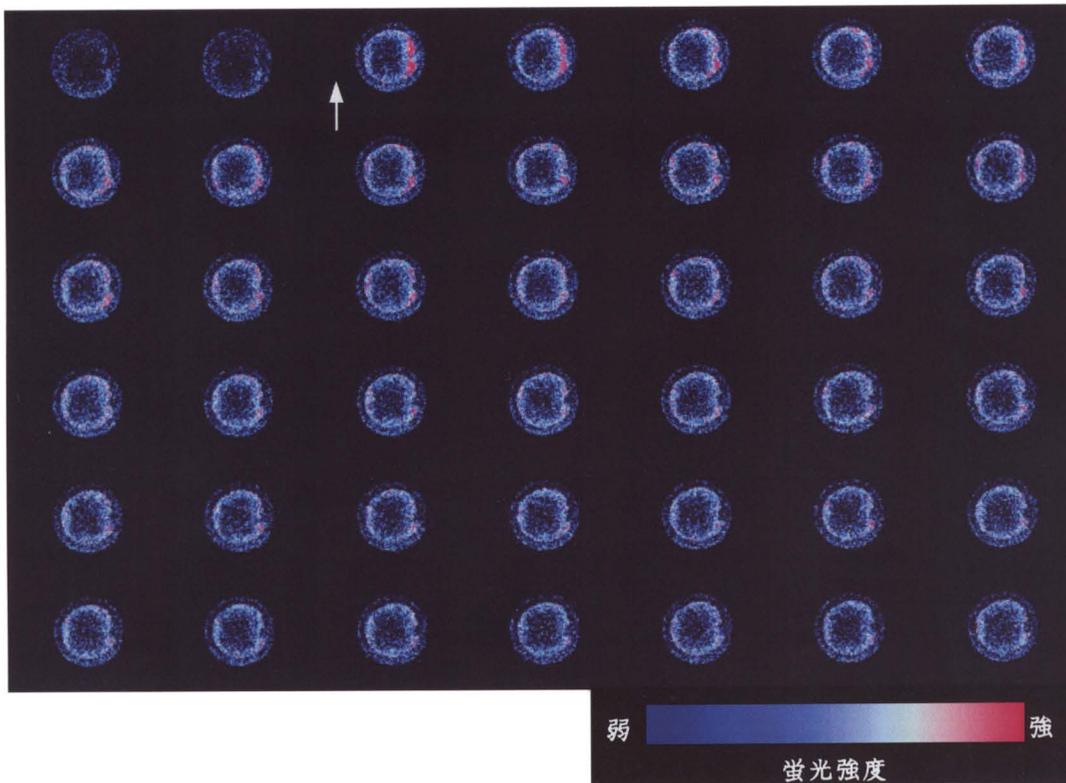
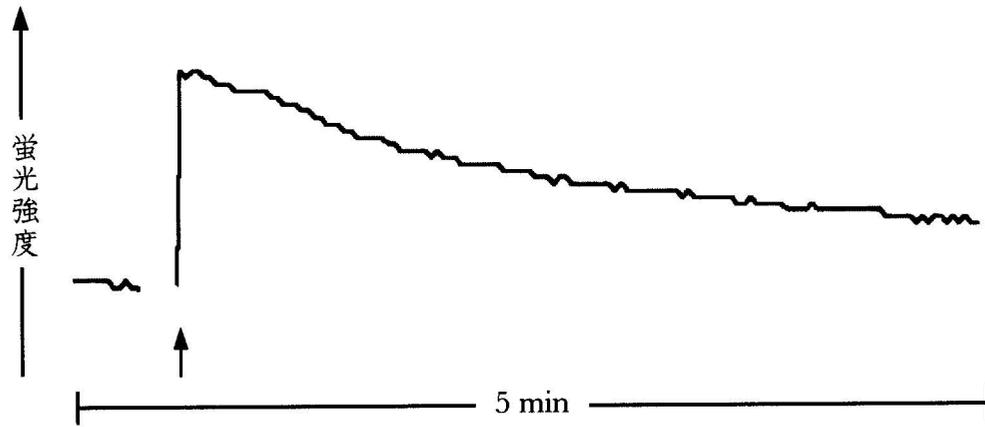


図12 Ba²⁺顕微注入後のブタ卵母細胞の[Ca²⁺]_iの変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞にCa²⁺蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、Ba²⁺を注入してその後の[Ca²⁺]_iの変化を約5分間記録した。

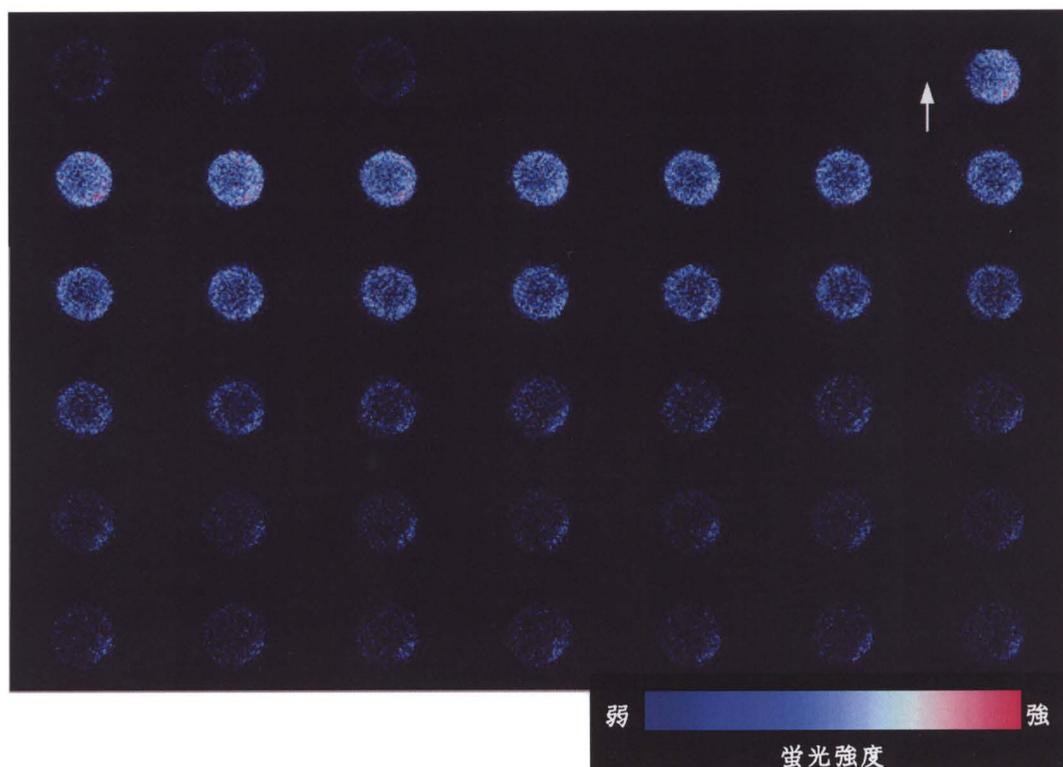
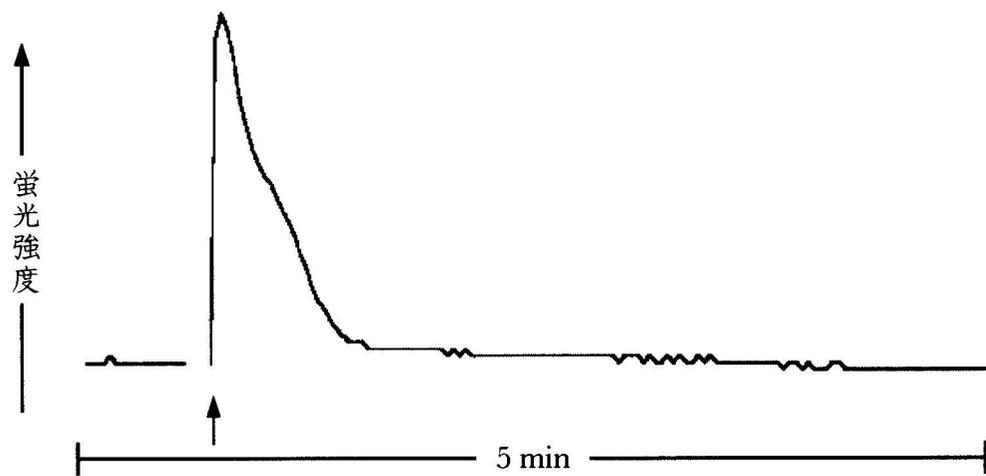


図13 Ca^{2+} 顕微注入後のブタ卵母細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、 Ca^{2+} を注入してその後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を約5分間記録した。

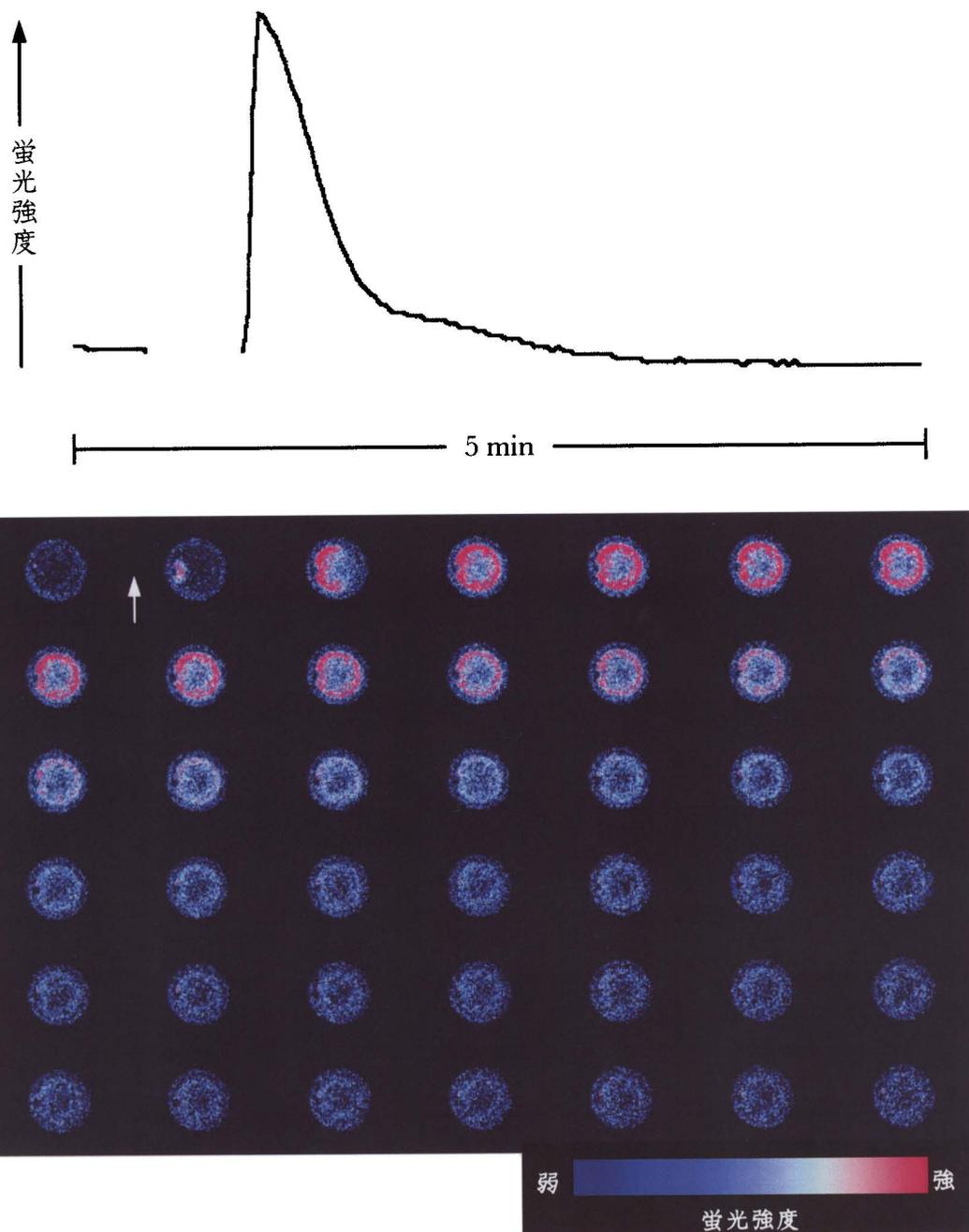


図14 精子抽出物顕微注入後のブタ卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、精子抽出物を注入してその後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を約5分間記録した。

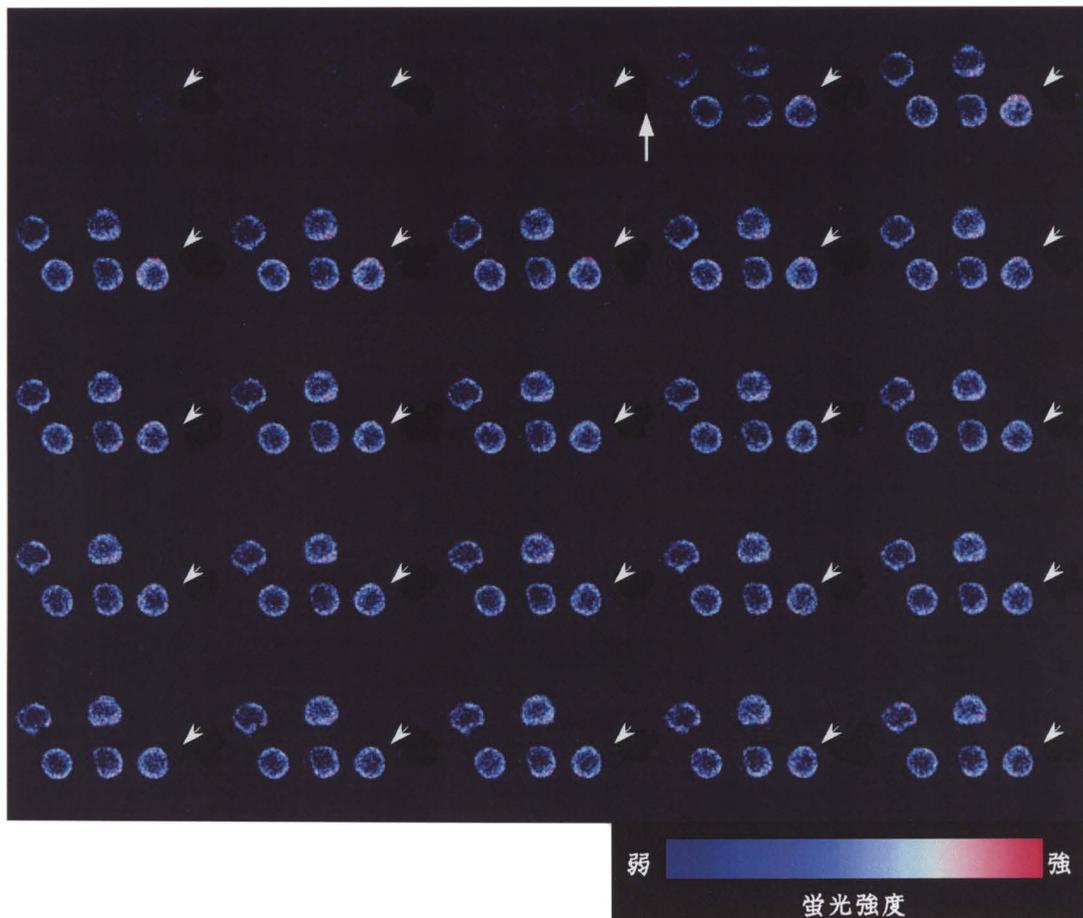
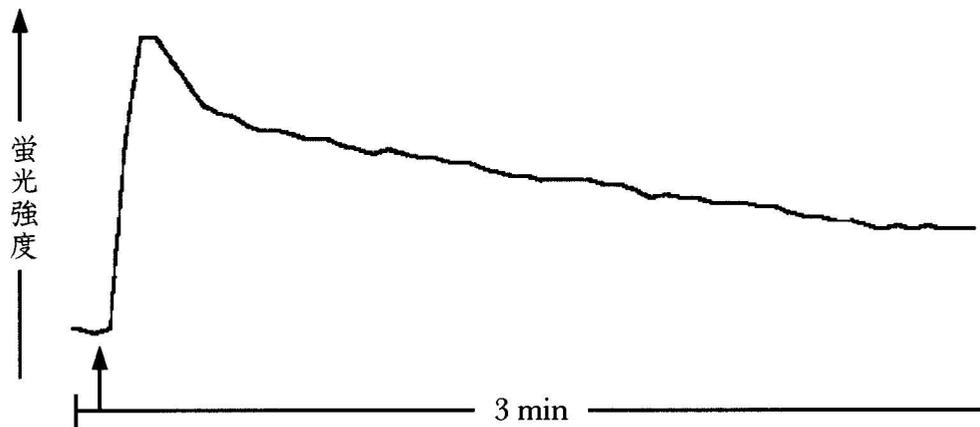


図15 電気刺激後のブタ卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の変化

48時間成熟培養したブタ卵母細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、電気刺激してその後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を約3分間記録した。図中の矢印は電気刺激した時点を示し、矢尻は $[Ca^{2+}]_i$ の変化をグラフ化した卵母細胞を示している。

表11 活性化処理後のブタ卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇持続時間

活性化処理	測定した 卵母細胞数	$[Ca^{2+}]_i$ の上昇 持続時間 (秒)
Sr ²⁺	8	52.2 ± 21.3 ^a
Ba ²⁺	8	446.2 ± 69.5 ^b
Ca ²⁺	10	65.6 ± 30.8 ^a
精子抽出物	5	75.7 ± 19.9 ^a
電気刺激	6	ND ¹

^{a,b)} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

¹⁾ ND: 測定不能

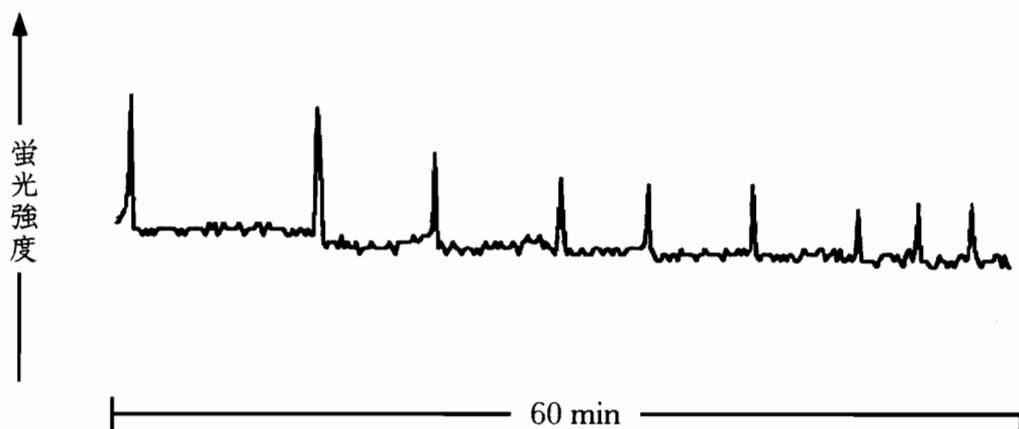


図16 精子抽出物の注入によって誘起されたブタ卵母細胞における反復的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇 (Ca^{2+} オシレーション)

48時間成熟培養したブタ卵母細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬fluo-4 dextranを注入し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡下で、精子抽出物を注入してその後の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を約60分間記録した。

考察

二価陽イオンに対する fluo-4 dextran の反応性について検討した結果から、本節の実験でみられた二価陽イオン注入後の蛍光の上昇は、細胞内 Ca^{2+} ストアから放出された Ca^{2+} に起因する可能性が高い。すなわち実験結果は、ブタの成熟卵母細胞に二価陽イオンが注入されると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することを示唆している。また、これまでの報告と同様に、精子抽出物の注入あるいは電気刺激によってブタ成熟卵母細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することが確認された（精子抽出物: Macháty et al., 2000, 電気刺激: Sun et al., 1992）。

卵母細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、精子抽出物（sperm factor: Dale et al., 1985; Swann, 1990）のほか、細胞外に Ca^{2+} が存在する条件下において、 Ca^{2+} イオノフォア A23187（Steinhardt et al., 1974）や電気刺激（Rickords and White, 1992; Sun et al., 1992; Collas et al., 1993）によって誘起される。また、ハムスターの卵母細胞では Ca^{2+} を顕微注入することによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が誘起されることが報告されている（Igusa and Miyazaki, 1983）。本節においても、二価陽イオンや精子抽出物の顕微注入、あるいは電気刺激を受けたすべてのブタ卵母細胞が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を示し、二価陽イオンがブタ卵母細胞においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことが明らかになった。

アフリカツメガエルの卵母細胞では、 Ba^{2+} および Sr^{2+} は、細胞内 Ca^{2+} ストア上に存在する Ca^{2+} 感受性の Ca^{2+} チャネルに対して Ca^{2+} と同様に作用し、 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} の放出を引き起こす（Yao and Parker, 1992）。二価陽イオンに対する fluo-4 の反応性を調べた結果、 Sr^{2+} や Ba^{2+} によって誘起された fluo-4 の蛍光は Ca^{2+} に比べると明らかに弱いことから、 Sr^{2+} や Ba^{2+} の顕微注入によってブタ卵母細胞で生じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、注入された二価陽イオンが細胞内 Ca^{2+} ストアに存在する Ca^{2+} 感受性の Ca^{2+} チャネルに作用し、 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} を放出した結果によると考えられる。

Sr^{2+} および Ca^{2+} を注入した卵母細胞では、一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が観察されたが、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞は、長時間にわたる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を示した。アフリカツメガエルの卵母細胞では、 Ba^{2+} は Ca^{2+} チャネルに作用し、開放状態を維持する（Weber, 1999）。これと同様に Ba^{2+} が Ca^{2+} ストアに存在する Ca^{2+} チャネルに持続的に作用して Ca^{2+} を放出させ続

けた結果、 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が連続的に起こり、卵母細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が低下するのに時間を要した可能性が考えられる。また、 Ba^{2+} の何らかの副次的な作用によって細胞外への Ca^{2+} の排出が妨害されたとも考えられる。

本節の実験でポジティブコントロールとして用いた電気刺激は、ブタの卵母細胞において単一で一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことが報告されている (Sun et al., 1992)。しかし、本節で用いた電気刺激では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は長時間にわたって続き、 Ba^{2+} を注入した場合と類似していた。Sun ら (1992) の実験では、Petri dish にミネラルオイルで覆った培養液の小滴を作製して、この小滴中でブタ卵母細胞を 2 本の微小電極で直接挟むことによって電気刺激を与えている。一方、本研究では、溶液の乾燥を防ぐための流動パラフィンを使用せず、2 つの板状の電極が設置されたチャンバー型電極に 100 μl のマンニトール溶液を入れた状態で卵母細胞に電気刺激を与えた。この方法は、短い時間であれば問題ないが、長時間にわたる測定では、培養液中の水分が蒸発して培養液の浸透圧が変化し、卵母細胞にダメージを与える可能性がある。このため、本節の電気刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、正常な卵母細胞での電気刺激後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化とは異なる可能性は否定できない。

いずれの二価陽イオンを注入したブタ卵母細胞においても Ca^{2+} オシレーションはみられなかったが、精子抽出物注入後のブタ卵母細胞では、これまでの報告 (ハムスター: Swann, 1990, マウス: Swann, 1994, ヒト: Homa and Swann, 1994; Palermo et al., 1997, ウシ: Wu et al., 1997, ブタ: Macháty et al., 2000) と同様に、急激な一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇の後に Ca^{2+} オシレーションが観察された。現在のところ、精子先体に含まれる精子に特異的なホスホリパーゼ C (PLC ζ : Saunders et al., 2002) が、精子侵入後に Ca^{2+} オシレーションを引き起こす要因と考えられており、 Ca^{2+} オシレーションを誘起するにはこのような生理的な活性物質が必要なかもしれない。

第4節 活性化処理後の表層粒の崩壊

成熟した卵母細胞が精子の侵入を受けると、卵母細胞膜の直下に分布する表層粒の内容物が、囲卵腔に放出される (Steinhardt et al., 1974)。表層粒の成分が透明帯に作用し、卵母細胞への多精子受精を防御することに機能すると考えられている (Gulyas, 1979; Guraya, 1982; Cran and Cheng, 1986)。ブタも含めて、これまで調べられた多くの哺乳類の成熟卵母細胞において、精子侵入直後に表層粒が崩壊することが知られている。表層粒の崩壊は人為的活性化によっても引き起こすことができる。ブタ卵母細胞においては、 Ca^{2+} (Macháty et al., 1996)、精子抽出物の顕微注入 (Macháty et al., 2000)、あるいは電気刺激 (Sun et al., 1992) によって表層粒が崩壊することが報告されている。

本節では、前節において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことが明らかとなった Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} の顕微注入後の表層粒の状態を調べ、 Ca^{2+} および精子抽出物の顕微注入、あるいは電気刺激と比較した。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の活性化処理

第2章第2節と同様の方法によって、体外で48時間成熟培養したブタ卵母細胞を準備した。二価陽イオンあるいは精子抽出物の顕微注入および電気刺激によって卵母細胞を活性化処理した。本章第2節と同様の方法によって卵母細胞に Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を注入した。また、精子抽出物を第2章第3節と同様の方法によって調製し、第2章第2節と同様の方法によって卵母細胞に顕微注入した。電気刺激には、第2章第2節と同様の方法を用いた。

2) 卵母細胞の表層粒の蛍光染色

Katayama ら (2002) の方法に従って表層粒を蛍光染色した。活性化処理したブタの成

熟卵母細胞を TL-BSA 液中で 6 時間培養した。培養後、3%パラホルムアルデヒドを含む PBS-PVA で卵母細胞を 30 分間、室温で固定した。固定後、10 mg/ml BSA と 100 mM グリシンを添加した PBS (PBS-BSA, ブロッキング液) で卵母細胞を 2 回洗浄し、一晚、卵母細胞を PBS-BSA に浸漬した。次いで、卵母細胞を 0.1% Triton X-100 を添加した PBS で 5 分間処理した後、PBS-BSA で 2 回洗浄した。洗浄後、20 μ g/ml の fluorescein isothiocyanate 標識 peanut agglutinin (FITC-PNA, Sigma) を添加した PBS-PVA で表層粒を 30 分間蛍光染色した。卵母細胞を PBS-BSA で洗浄後、400 μ g/ml の propidium iodide (PI, Sigma) を添加した PBS-PVA で DNA を 20 分間対比染色した。PBS-BSA で洗浄後、卵母細胞を減光防止剤 (Vectashield mounting medium; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) とともにスライドガラスにホールマウントし、マニキュアで封入した。観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1024MP; Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。アルゴンレーザーと T1/T2 フィルターを用いて励起波長 488/514 nm のもとで、蛍光波長 520 nm の FITC と 615 nm の PI の蛍光を観察した。対照としては、成熟培養直後の未処理の卵母細胞および HEPES 緩衝液を注入した卵母細胞を同様に染色して観察した。 χ^2 検定によって、表層粒が崩壊した卵母細胞数および雌性前核を形成した卵母細胞数の群間における差の統計的有意性を検定した。

結果

活性化処理前のブタ成熟卵母細胞では、表層粒の分布を示す FITC の蛍光 (緑色) は卵母細胞の細胞膜直下に強く均一に認められた (図 17a, b)。精子抽出物を注入した卵母細胞では、FITC の蛍光は細胞膜付近から完全に消失しており、透明帯表層で FITC の強い蛍光が観察された (図 17c, d)。電気刺激した卵母細胞では、処理 6 時間後において、一部、細胞膜に FITC の蛍光が残ってはいたが、表層粒の崩壊が観察された (図 17e)。卵母細胞の表層においては、凝集したパッチ状の FITC の蛍光が観察された (図 17f)。

図 18 に二価陽イオンの注入によって引き起こされた表層粒の変化を示す。HEPES 緩衝

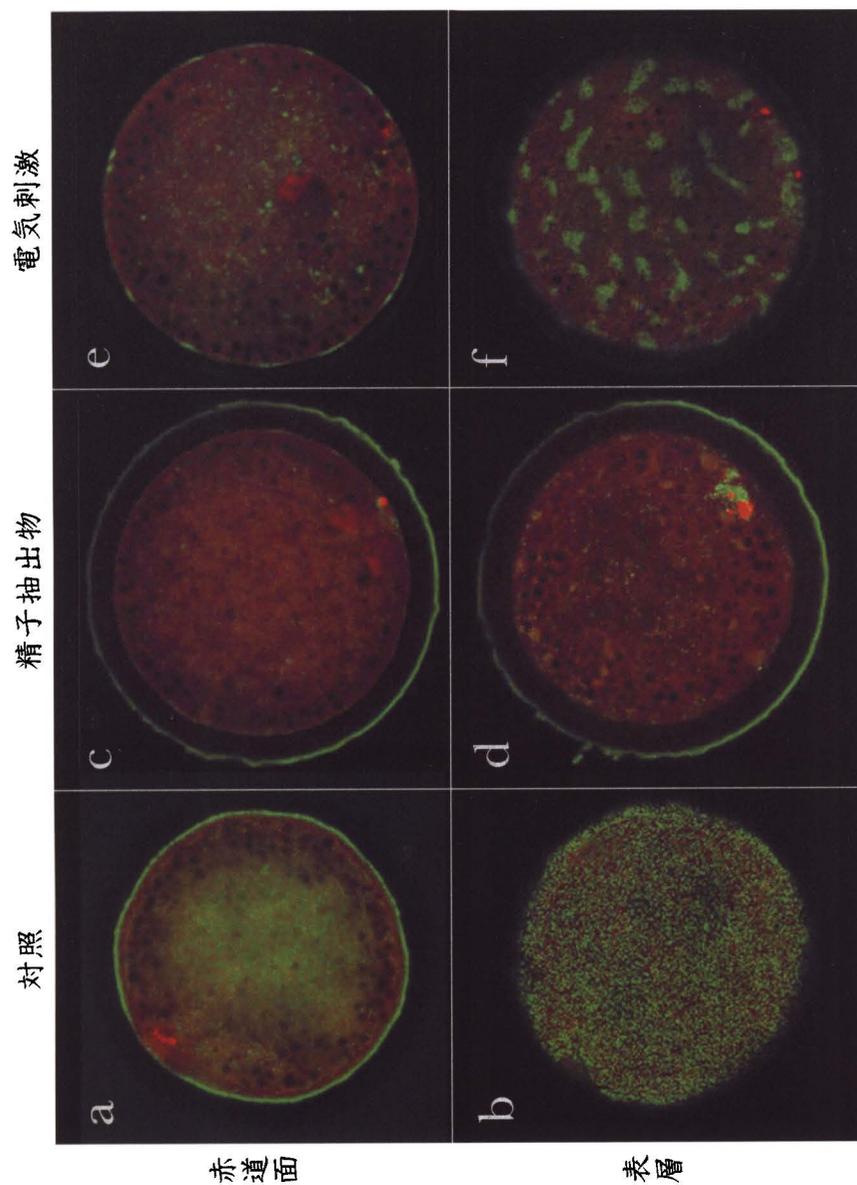


図17 精子抽出物の注入および電気刺激によって誘起されたブタ成熟卵母細胞の表層粒の崩壊パターン

未処理のブタ成熟卵母細胞 (a, b: 対照)および、精子抽出物を注入 (c, d)あるいは電気刺激 (e, f)したブタ卵母細胞を、TL-BSA液中で6時間培養し、表層粒をFITC-PNA (緑色)で、DNAをPI (赤色)で染色した。a, c, eでは卵母細胞の赤道面を、b, d, fでは卵母細胞の表層を観察した。

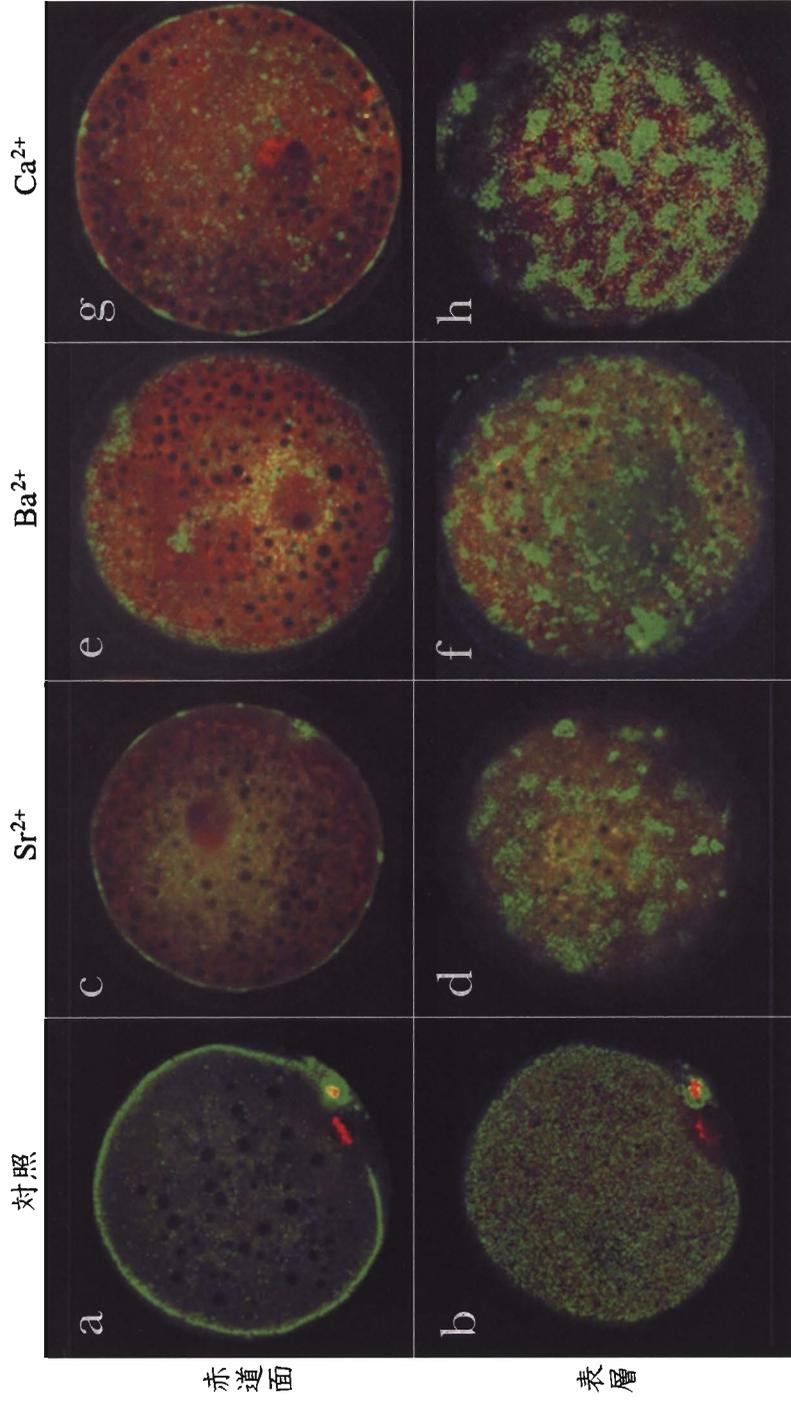


図18 二価陽イオンの注入によって誘起されたブタ成熟卵母細胞の表層粒の崩壊パターン
 HEPES緩衝液 (a, b: 対照), Sr²⁺ (c, d), Ba²⁺ (e, f) あるいはCa²⁺ (g, h) を顕微注入したブタ卵母細胞を, TL-BSA液中で6時間培養し, 表層粒をFITC-PNA (緑色) で, DNAをPI (赤色) で染色した。a, c, e, gでは卵母細胞の赤道面を, b, d, f, hでは卵母細胞の表層を観察した。

液を注入した対照の卵母細胞では、活性化処理していない卵母細胞の蛍光パターンと同様に、細胞膜直下に FITC の強くて均一な、粒状の蛍光がみられた。また、第 1 極体にも FITC の強い蛍光が認められた (図 18a, b)。Sr²⁺、Ba²⁺あるいは Ca²⁺を注入した卵母細胞では、細胞膜付近の蛍光は不連続となり (図 18c, e, g)。卵母細胞の表層では、凝集したパッチ状の蛍光がみられた (図 18d, f, h)。二価陽イオンの注入によって引き起こされた表層粒の崩壊パターンは電気刺激した卵母細胞でみられたものと類似していた。

それぞれの活性化処理によって表層粒が崩壊した卵母細胞の割合および卵母細胞の雌性前核形成率を表 12 に示す。活性化処理によって表層粒が崩壊した卵母細胞の割合は、二価陽イオンの注入では 91~95%、精子抽出物では 100%、電気刺激では 75%と、対照区 (未処理: 7%, 対照: 27%) より、有意に高い値を示した (P<0.05)。また、各活性化処理した卵母細胞の、63~90%が雌性前核を形成していた。

考 察

卵母細胞への精子侵入直後に起こる [Ca²⁺]_i の上昇は、多精子受精を化学的にブロックする卵母細胞の細胞膜直下の表層粒崩壊を誘起する (Zucker and Steinhardt, 1978; Kline, 1988; Kline and Kline, 1992)。表層粒の崩壊は、精子侵入以外の人為的な活性化刺激によっても引き起こされる。ブタでは電気刺激 (Sun et al., 1992)、Ca²⁺ (Macháty et al., 1996) あるいは精子抽出物 (Macháty et al., 2000) の顕微注入によって、ハムスターでは Ca²⁺イオノフォア処理 (Steinhardt et al., 1974) によって、また、マウスでは Sr²⁺を含む培養液中での処理 (Kline and Kline, 1992) によって表層粒が崩壊することが報告されている。これらの処理では、いずれも卵母細胞の [Ca²⁺]_i の上昇が起こることが知られている。本節の実験において用いたすべての活性化法は [Ca²⁺]_i の上昇を起こすことから、表層粒の崩壊パターンに処理間で違いはみられるが、おそらくそれぞれの活性化処理によって引き起こされた [Ca²⁺]_i の上昇が、ブタ成熟卵母細胞の表層粒の崩壊を導いたと考えられる。

精子抽出物の注入とそれ以外の活性化処理では、表層粒の崩壊パターンに差がみられた。

表12 活性化処理後のブタ卵母細胞における表層粒の崩壊および雌性前核形成率

活性化処理 ¹⁾	供試卵母細胞数	表層粒の崩壊 ²⁾ (%)		雌性前核を形成した卵母細胞数 (%)
		+	-	
未処理	29	2 (7) ^a	27 (93) ^a	0 (0)
対照	22	6 (27) ^a	16 (73) ^a	1 (5) ^a
Sr ²⁺	46	42 (91) ^b	4 (9) ^b	29 (63) ^b
Ba ²⁺	44	42 (95) ^b	2 (5) ^b	36 (82) ^{bc}
Ca ²⁺	41	39 (95) ^b	2 (5) ^b	37 (90) ^c
精子抽出物	7	7 (100)	0 (0)	5 (71) ^{bc}
電気刺激	8	6 (75) ^b	2 (25) ^b	5 (63) ^b

¹⁾ 未処理: 活性化処理していない成熟培養後の卵母細胞。対照: HEPES緩衝液を注入した卵母細胞。

²⁾ +: 表層粒が崩壊した卵母細胞数。卵母細胞の表層にパッチ状の表層粒の蛍光が認められた卵母細胞も含む。 -: 表層粒が崩壊していない卵母細胞数。

^{a-c)} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

精子抽出物を注入した卵母細胞では、表層粒は完全に細胞膜から消失していた。一方、二価陽イオンの注入あるいは電気刺激した卵母細胞では表層粒は崩壊しているが、すべての表層粒は崩壊せず、卵母細胞表層にパッチ状に凝集して残っている表層粒が観察された。この理由としては、活性化処理の違いによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇パターンの違いが考えられる。前節の実験によって示されたように、精子抽出物を注入した卵母細胞は Ca^{2+} オシレーションを起こす。一方、二価陽イオンの注入あるいは電気刺激では、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇しか起こらない。 Ca^{2+} オシレーションを誘起できる Sr^{2+} を含む培養液によって処理されたマウス卵母細胞では、ほぼすべての表層粒が崩壊するが、 Ca^{2+} 拮抗剤のBAPTA (*O,O*-bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate) で処理することによって Ca^{2+} オシレーションの頻度を低下させると表層粒が崩壊する卵母細胞の割合が低下する (Kline and Kline, 1992)。また、ブタ卵母細胞の体外受精では、媒精5時間後には検査されたすべての卵母細胞で表層粒が崩壊することが示されている (Yoshida et al., 1993)。これらのことより、表層粒を完全に崩壊させるには、反復的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、すなわち Ca^{2+} オシレーションが必要であると考えられる。

第5節 活性化処理後の Cdc2 キナーゼの不活性化

排卵された哺乳類の卵母細胞は、第 II 減数分裂中期で停止し、高い Cdc2 キナーゼ活性をもっている。Cdc2 キナーゼは、触媒サブユニットの Cdc2 と制御サブユニットのサイクリン B から成り、成熟促進因子 (maturation promoting factor: MPF) として予言された因子の実体であり、減数分裂も含めて細胞分裂の重要な制御因子であることが知られている (Nurse, 1990)。セリン/スレオニンキナーゼである mitogen activated protein (MAP) キナーゼは、Cdc2 キナーゼとともに卵母細胞の成熟過程における重要な細胞周期制御因子と考えられている。哺乳類の卵母細胞では、成熟過程で Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼの活性はともに上昇し、第 II 減数分裂中期では両キナーゼ活性はともに高く維持されているが、その後、精子が卵母細胞に侵入すると、Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼの活性が低下することが知られている (Kikuchi et al., 1995a)。

第 II 減数分裂中期の卵母細胞では、精子侵入以外の人為的活性化刺激によっても Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼの活性は低下する。電気刺激 (Kikuchi et al., 1995b) あるいは Ca^{2+} を注入 (Macháty et al., 1996) したブタの成熟卵母細胞において Cdc2 キナーゼ活性が低下することが報告されている。しかし、人為的な活性化刺激を与えたブタ卵母細胞の MAP キナーゼ活性の変化については知られていない。本節では、電気刺激あるいは精子抽出物、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} を顕微注入したブタ成熟卵母細胞の Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼ活性の変化を調べた。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の活性化処理

第2章第2節と同様の方法によって、体外で48時間成熟培養したブタ卵母細胞を準備した。二価陽イオンあるいは精子抽出物の顕微注入、および電気刺激によってブタ卵母細胞

胞を活性化処理した。Sr²⁺、Ba²⁺あるいはCa²⁺を本章第2節と同様の方法によってブタ卵母細胞に顕微注入した。精子抽出物を第2章第3節と同様の方法によって調製し、第2章第2節と同様の方法によってブタ卵母細胞に顕微注入した。電気刺激には、第2章第2節と同様の方法を用いた。

2) Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼ活性の測定

各活性化処理後、卵母細胞を0.5, 1あるいは6時間TL-BSA液中で培養した。培養後、卵母細胞をPBS-PVAで3回洗浄した後、卵母細胞を2個ずつエッペンドルフチューブに1 µlのPBS-PVAとともに移した。その後、4 µlの氷冷した抽出バッファーを加え、活性測定まで-80°Cで保存した。抽出バッファーとしては、80 mM β-glycerophosphate, 10 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM *p*-APMSF, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml aprotinin (Sigma) および 1 µg/ml leupeptin (Sigma) を添加した 25 mM HEPES (pH 7.2) バッファー (Nebreda et al., 1995) を用いた。

サンプルを融解後、13,000 g で2分間、遠心分離し、卵母細胞のタンパク質を抽出した。5 µlの氷冷したキナーゼバッファーおよび5 µlの基質溶液を加え、37°Cで10分間インキュベートした。キナーゼバッファーとしては、75 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM EGTA, 75 mM MgCl₂, 6 mM DTT, 10 mM ATP, 15 µM cAMP-dependent protein kinase inhibitor peptide (sequence: TTYADFIASGRTGRRNAIHD, Sigma) および 0.3 µCi/µl [³²P]ATP (250 µCi/25 µl, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を添加した 75 mM HEPES (pH 7.2) バッファー (Nebreda et al., 1995) を用いた。Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼの基質としては、それぞれ 4.25 µl の histon H1 (5 mg/ml, from calf thymus, Boehringer, Tokyo, Japan) および 0.75 µl の myelin basic protein (5 mg/ml, from bovine brain, Sigma) を用いた。5 µl の 4×SDS サンプルバッファー (Laemmli, 1970) を加え、5分間煮沸することによって反応を停止し、直ちに、サンプルを 13% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。泳動後、ゲルを 7%酢酸-30%エタノール溶液中で 15分間固定した後に、ゲルドライヤーによって乾燥させ、オートラジオグラフィーによってそれぞれの基質のリン酸化を検出した。キナーゼ活性の測定は、3回行った。対照としては、成熟培養前の卵核胞期

の卵母細胞，48 時間成熟培養した第 II 減数分裂中期の卵母細胞および HEPES 緩衝液を注入した成熟卵母細胞を用いた。

結果

卵核胞期の卵母細胞では，Cdc2 キナーゼおよび MAP キナーゼの活性はほとんど認められなかったが，第 II 減数分裂中期の卵母細胞では両キナーゼによる histone H1 および myelin basic protein (MBP) の強いリン酸化がみられた (図 19a, b)。電気刺激ならびに精子抽出物を注入した卵母細胞における，Cdc2 キナーゼによる histone H1 のリン酸化レベルは，電気刺激 1 時間後にやや低下し，6 時間後にはさらに低下した (図 19a)。Ca²⁺を注入した卵母細胞では，第 II 減数分裂中期の卵母細胞と比較して注入 1 時間後には Cdc2 キナーゼ活性はかなり低下した (図 19b)。Sr²⁺あるいは Ba²⁺を注入した卵母細胞においては，いずれも，注入 1 時間後に Cdc2 キナーゼ活性がやや低下し，6 時間後には卵核胞期の卵母細胞と同等のレベルにまで低下した (図 19b)。ネガティブコントロールの HEPES 緩衝液を注入した卵母細胞では，注入 6 時間後には Cdc2 キナーゼ活性の低下がみられたが，各実験区の 6 時間の活性と比較すると依然高いレベルにあった (図 19a, b)。

第 II 減数分裂中期の卵母細胞では，高い MAP キナーゼ活性が認められたが，電気刺激 6 時間後，精子抽出物，Sr²⁺あるいは Ba²⁺の注入 6 時間後の卵母細胞の MAP キナーゼ活性はやや低下した (図 19a, b)。

考察

第 II 減数分裂中期での減数分裂の停止には少なくとも 2 種の因子，MPF と CSF (細胞分裂抑制因子: cytostatic factor) が関わっていると考えられている (Masui and Markert, 1971)。現在ではそのうちのひとつは Cdc2 キナーゼ (Maller et al., 1989; Lewin, 1990) であり，も

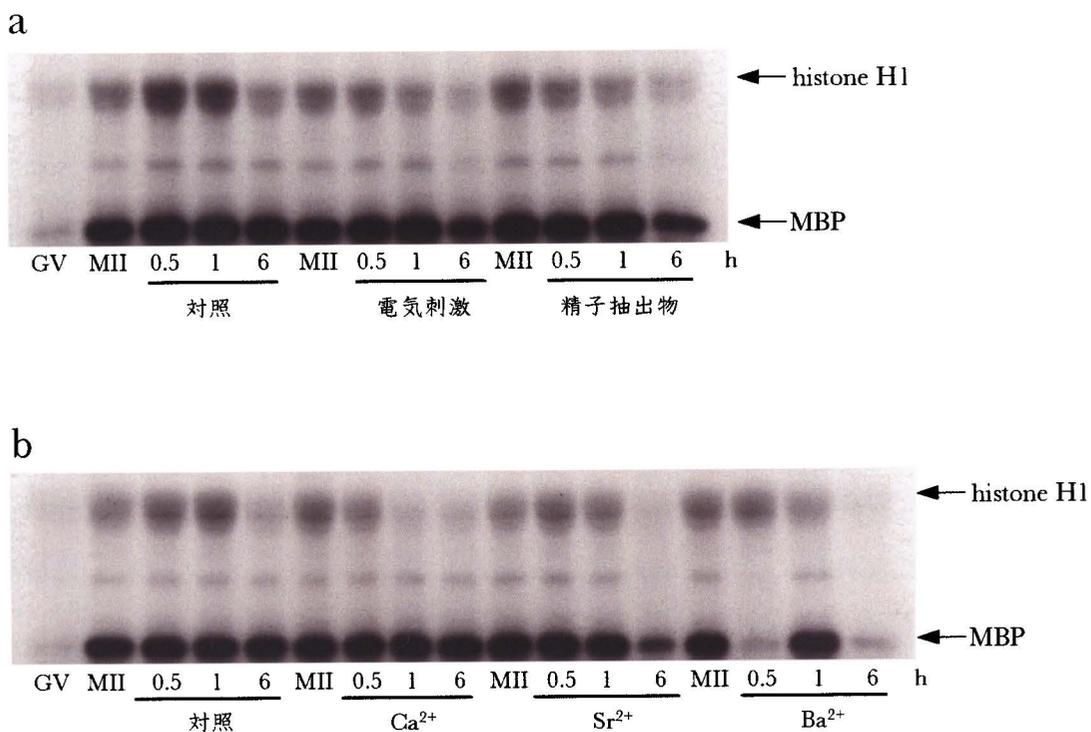


図19 電気刺激あるいは精子抽出物の顕微注入 (a), 二価陽イオンの顕微注入 (b)によって活性化処理したブタ卵母細胞におけるCdc2キナーゼおよびMAPキナーゼ活性の変化

histone H1およびMBPのリン酸化によって、卵母細胞2個あたりのCdc2キナーゼおよびMAPキナーゼ活性の変化を同時に調べた。各活性化処理0.5, 1および6時間後に卵母細胞を回収してサンプルとし、オートラジオグラフィーによってhistone H1およびMBPのリン酸化を検出した。GV: 卵核胞期(ネガティブコントロール), MII: 第II減数分裂中期(ポジティブコントロール), 対照: 48時間成熟培養したブタ卵母細胞にHEPES緩衝液を注入した。なお, Cdc2キナーゼの変化が最も典型的であったので (b)の図を示したがBa²⁺注入0.5時間後の卵母細胞においてみられるMAPキナーゼ活性の著しい低下は, 他の2回の実験ではみられなかった。

うひとつは *c-mos* 原癌遺伝子の産物である Mos (Sagata et al., 1989) であることが明らかとなっている。Cdc2 キナーゼは体外で histone H1 を強くリン酸化する。哺乳類の卵母細胞の成熟過程において Cdc2 キナーゼ活性は卵核胞崩壊が起こる頃に上昇し、Cdc2 キナーゼの高い活性が第 II 減数分裂中期の間維持され、受精あるいは人為的活性化後に急激に低下することが報告されている (マウス: Choi et al., 1991; Wu et al., 1998, ウシ: Collas et al., 1993, ブタ: Kikuchi et al., 1995a, b; Miyano et al., 2000)。Cdc2 キナーゼ活性の低下は、精子侵入後に起こる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によって、ユビキチン依存性のタンパク質分解系を介し (Glotzer et al., 1991), 制御サブユニットのサイクリン B が崩壊する結果、誘起されると考えられている。

本節の実験では、いずれの活性化処理においても活性化処理 6 時間後には Cdc2 キナーゼ活性は低下した。本章第 3 節の結果において示されたように、今回用いたすべての活性化処理によって、卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は上昇する。このことから、Cdc2 キナーゼ活性の低下はいずれも、活性化処理によって誘起された $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がサイクリン B の崩壊を引き起こしたことに起因すると考えられる。また、精子抽出物のみが Ca^{2+} オシレーションを引き起こすが、他の実験区と比較して、Cdc2 キナーゼの不活性化に大きな違いは認められなかった。

卵母細胞の MAP キナーゼ活性は成熟過程で上昇することがマウス (Sobajima et al., 1993; Verlhac et al., 1993; Choi et al., 1996), ブタ (Inoue et al., 1995), ヤギ (Dedieu et al., 1996), ウシ (Fissore et al., 1996) およびラット (Zernicka-Goetz et al., 1997) で報告されている。Cdc2 キナーゼと同様に、MAP キナーゼも卵核胞が崩壊する頃にその活性が上昇し、受精 (Moos et al., 1995) あるいは人為的活性化刺激 (Verlhac et al., 1994; Wu et al., 1998) によって不活性化される。MAP キナーゼの不活性化がどのような機構で起こるのかは明らかではないが、Cdc2 キナーゼが不活性化された後、前核が形成される時期に不活性化することがマウスでは報告されている (Verlhac et al., 1994; Moos et al., 1995)。本節の結果からも、Cdc2 キナーゼの不活性化は活性化処理 1 時間後から徐々にみられたが、MAP キナーゼの明らかな不活性化は活性化処理 6 時間後でわずかに認められたにすぎなかった。本節で用いた活性化処理によって活性化された卵母細胞は、処理 6 時間後には雌性前核を形成している

ことから、卵母細胞の活性化には完全な MAP キナーゼの不活性化は必要ないと考えられる。

第6節 活性化処理した卵母細胞の体外発生

精子抽出物あるいは二価陽イオンを顕微注入することによって活性化したブタ卵母細胞の体外での発生能力を調べた。精子抽出物を注入したマウス (Fissore et al., 1998), ウシ (Fissore et al., 1998) およびブタ卵母細胞 (Macháty et al., 2000) は, 胚盤胞へと発生することが報告されている。また, Ca^{2+} を注入したマウス (Fulton and Whittingham, 1978) あるいはブタの卵母細胞 (Macháty et al., 1996) も胚盤胞へと発生する。一方, 培養液中の Sr^{2+} はマウス卵母細胞を活性化し, 発生を開始させるが, 他の動物種において Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} によって処理した卵母細胞の発生能は調べられていない。電気刺激後, サイトカラシン B 処理によって第2極体の放出を阻害することによって作出した2倍体のブタ卵母細胞は, 第2極体を放出した1倍体の卵母細胞より発生能力が高いことが報告されている (Kurebayashi et al., 1996; Van Thuan et al., 2002a)。

本節の実験では, 精子抽出物あるいは二価陽イオンを顕微注入したブタ卵母細胞をサイトカラシン B 処理によって倍数化した後, 体外発生させ, 電気刺激した卵母細胞の発生能力と比較した。

材料および方法

1) 成熟卵母細胞の活性化処理

第2章第2節と同様の方法によって体外で48時間成熟培養したブタ卵母細胞を準備し, 第1極体の放出が認められた卵母細胞を実験に用いた。 Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} あるいは精子抽出物の顕微注入, および電気刺激によってブタ卵母細胞を活性化処理した。二価陽イオンを本章第2節と同様の方法によってブタ卵母細胞に顕微注入した。精子抽出物を第2章第3節と同様の方法によって調製し, 第2章第2節と同様の方法によってブタ卵母細胞に顕微注入した。電気刺激には, 第2章第2節と同様の方法を用いた。

2) 体外発生培養

第 2 極体の放出を抑制するために、活性化処理した卵母細胞を 5 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン B (Sigma) を添加した修正 TCM-199 の小滴中に移し、4 時間、38.5°C で培養した。発生用培養液には、4 mg/ml の BSA を添加した NCSU 23 (Petters, 1992) を用いた。サイトカラシン B で処理した卵母細胞を修正 TCM-199 中で 5 回洗浄した後、卵母細胞 1 個あたり 1 μl になるように作製した流動パラフィンで覆った NCSU 23 の小滴中に移し、5% 炭酸ガス-95% 空気、38.5°C で 168 時間培養した。対照としては、同量の HEPES 緩衝液を注入した成熟卵母細胞を同様に培養した。

活性化処理から合計 168 時間の培養期間中、24 時間ごとに倒立顕微鏡下で発生状況を観察した。本節の実験において「胚盤胞」とは、胚盤胞腔の形成が始まった胚盤胞および拡張胚盤胞を指す。培養中に細胞質の断片化や変性が認められた胚を退行と判定した。コンパクトを起こしておらず 5 個以上の割球を有する胚を「>4 細胞期胚」、コンパクトを起こした胚を「桑実期」とした。また、培養 48 時間後に「2 細胞期」、72 時間後に「3-4 細胞期」、96 時間後に「>4 細胞期」、120 時間後に「桑実期」に達していない胚を発生遅延として退行に分類した。

3) 細胞数の計測

培養後、得られた胚盤胞の細胞数を Kure-bayashi ら (1995) の方法に従って計測した。胚盤胞を PBS-PVA で 3 回洗浄した後、3% パラホルムアルデヒド溶液で 60 分間固定した。胚盤胞を PBS-PVA で 3 回洗浄した後、2 $\mu\text{g/ml}$ の hoechst 33342 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) を含む PBS-PVA 中に移し、胚盤胞の DNA を 20 分間染色した。PBS-PVA で 3 回洗浄後、蛍光染色した胚盤胞をスライドガラス上にホルマウントし、その後、落射式蛍光顕微鏡 (Optiphot-2, ニコン) で核数を計測し、これを胚盤胞の細胞数とした。分裂期の核が観察された場合は、2 個として数えた。

4) 統計処理

実験を 3 回以上繰り返した。発生率の差を χ^2 検定によって、胚盤胞の細胞数の統計的

有意性を t 検定によって検定した。なお、本節では、電気刺激あるいは精子抽出物を注入した 2 区と二価陽イオンを注入した各区は、同時に実験していないので統計的な比較はしていない。

結果

電気刺激および精子抽出物を顕微注入したブタ卵母細胞の体外発生の結果を表 13 に示す。培養 24 時間後の 2 細胞期あるいは 3-4 細胞期への発生率は、電気刺激した卵母細胞で 42%、精子抽出物を注入した卵母細胞で 18%であり ($P<0.05$)、精子抽出物を注入した卵母細胞において第 1 卵割の遅れがみられた。培養 72 時間後には電気刺激した卵母細胞の 54%が、精子抽出物を注入した卵母細胞の 48%が 3-4 細胞期あるいは 4 細胞期以降へと発生した。培養 168 時間後には電気刺激した卵母細胞の 44%が、精子抽出物を注入した卵母細胞の 28%が胚盤胞期へと発生した。対照の HEPES 緩衝液を注入した卵母細胞の 9%が培養 72 時間後に 3-4 細胞期に達したが、これ以降の発生ステージに進んだ胚はなかった。培養期間中の退行率は、電気刺激あるいは精子抽出物を注入した処理区間で有意な差は認められなかった。

二価陽イオンを顕微注入したブタ卵母細胞の体外発生の結果を表 14 に示す。培養 24 時間後の 2 細胞期あるいは 3-4 細胞期への発生率は、 Sr^{2+} を注入した卵母細胞で 33%、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞で 35%、 Ca^{2+} を注入した卵母細胞で 40%であった。培養 120 時間後では Sr^{2+} を注入した卵母細胞の 30%が、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞の 33%、 Ca^{2+} を注入した卵母細胞の 56%が桑実期あるいは胚盤胞期へと発生した (図 20a; Sr^{2+} , Ba^{2+} vs. Ca^{2+} , $P<0.05$)。培養 168 時間後には Sr^{2+} を注入した卵母細胞の 29%が、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞の 29%、 Ca^{2+} を注入した卵母細胞の 52%が胚盤胞期へと発生した (Sr^{2+} , Ba^{2+} vs. Ca^{2+} , $P<0.05$)。対照の HEPES 緩衝液を注入した卵母細胞の 2%が培養 72 時間後に 3-4 細胞期に達したが、これ以降のステージには進まなかった。培養期間中の退行率は、培養 48 時間以降、 Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} を注入した処理区が Ca^{2+} を注入した処理区より有意に高い値を

表13 電気刺激およびブタ精子抽出物を顕微注入したブタ卵母細胞の体外発生

活性化処理	培養時間	供試卵母細胞数	各ステージの胚数 (%)					退行 (%)	
			1細胞期	2細胞期	3-4細胞期	>4細胞期	桑実期 胚盤胞期		
電気刺激 ¹	24	43	14 (33) ^a	14 (33)	4 (9)			11 (26)	
精子抽出物 ²		40	28 (70) ^b	6 (15)	1 (3)			5 (13)	
対照 ³		23	8 (35) ^a	0 (0)	0 (0)			5 (22)	
電気刺激	48			15 (35)	11 (26) ^a			17 (40) ^a	
精子抽出物				13 (33)	17 (43) ^a			10 (25) ^a	
対照				3 (13)	1 (4) ^b			19 (83) ^b	
電気刺激	72				20 (47) ^a	3 (7)		20 (47) ^a	
精子抽出物					19 (48) ^a	0 (0)		21 (53) ^a	
対照					2 (9) ^b	0 (0)		21 (91) ^b	
電気刺激	96					5 (12)	16 (37)	1 (23)	21 (49)
精子抽出物						9 (23)	9 (23)	0 (0)	22 (55)
対照						0 (0)	0 (0)	0 (0)	23 (100)
電気刺激	120						15 (35)	5 (12)	23 (53)
精子抽出物							14 (35)	2 (5)	24 (60)
対照							0 (0)	0 (0)	23 (100)
電気刺激	144						6 (14)	14 (33)	23 (53)
精子抽出物							7 (18)	8 (20)	25 (63)
対照							0 (0)	0 (0)	23 (100)
電気刺激	168							19 (44)	24 (56)
精子抽出物								12 (28)	28 (70)
対照								0 (0)	23 (100)

¹⁾ 48時間成熟培養したブタ卵母細胞に精子抽出物を注入し、NCSU 23中で168時間培養した。

²⁾ 48時間成熟培養したブタ卵母細胞を電気刺激し、NCSU 23中で168時間培養した。

³⁾ 48時間成熟培養したブタ卵母細胞にHEPES緩衝液を注入し、NCSU 23中で168時間培養した。

^{a,b)} 各培養時間における同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

表14 二価陽イオンを顕微注入したブタ卵母細胞の体外発生

二価陽イオン ¹	培養時間	供試卵母細胞数	各ステージの胚数 (%)					退行 (%)		
			1細胞期	2細胞期	3-4細胞期	>4細胞期	桑実期		胚盤胞期	
Sr ²⁺	24	51	25 (49) ^a	8 (16) ^{ab}	9 (18)			9 (18)		
Ba ²⁺		51	25 (49) ^a	14 (27) ^a	4 (8)			8 (16)		
Ca ²⁺		50	25 (50) ^a	15 (30) ^a	5 (10)			5 (10)		
対照 ²		42	38 (90) ^b	1 (2) ^b	0 (0)			3 (7)		
Sr ²⁺	48			8 (16) ^a	19 (37)	0 (0)		24 (47) ^a		
Ba ²⁺				9 (18) ^{ab}	20 (39)	1 (2)		21 (41) ^a		
Ca ²⁺				18 (36) ^b	22 (44)	0 (0)		10 (20) ^b		
対照				4 (10) ^a	0 (0)	0 (0)		38 (90) ^c		
Sr ²⁺	72				11 (22) ^a	10 (20)	3 (6)	26 (51) ^a		
Ba ²⁺					17 (33) ^{ab}	7 (14)	0 (0)	27 (53) ^a		
Ca ²⁺					25 (50) ^b	6 (12)	5 (10)	12 (24) ^b		
対照					1 (2) ^c	0 (0)	0 (0)	41 (98) ^c		
Sr ²⁺	96					7 (14)	13 (25)	0 (0)	31 (61) ^a	
Ba ²⁺						5 (10)	15 (29)	0 (0)	31 (61) ^a	
Ca ²⁺							11 (22)	20 (40)	1 (2)	18 (36) ^b
対照							0 (0)	0 (0)	0 (0)	42 (100)
Sr ²⁺	120						11 (22) ^a	4 (8)	36 (71) ^a	
Ba ²⁺							16 (31) ^{ab}	1 (2)	34 (67) ^a	
Ca ²⁺								22 (44) ^b	6 (12)	22 (44) ^b
対照								0 (0)	0 (0)	42 (100)
Sr ²⁺	144						4 (8)	13 (25)	34 (67) ^a	
Ba ²⁺							3 (6)	14 (27)	34 (67) ^a	
Ca ²⁺							7 (14)	21 (42)	22 (44) ^b	
対照							0 (0)	0 (0)	42 (100)	
Sr ²⁺	168							15 (29) ^a	36 (71) ^a	
Ba ²⁺								15 (29) ^a	36 (71) ^a	
Ca ²⁺								26 (52) ^b	24 (48) ^b	
対照								0 (0)	42 (100)	

¹⁾ 48時間成熟培養したブタ卵母細胞にSr²⁺, Ba²⁺あるいはCa²⁺を顕微注入し, NCSU 23中で168時間培養した。

²⁾ 48時間成熟培養したブタ卵母細胞にHEPES緩衝液を注入し, NCSU 23中で168時間培養した。

^{a-c)} 各培養時間における同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意 (P<0.05)。

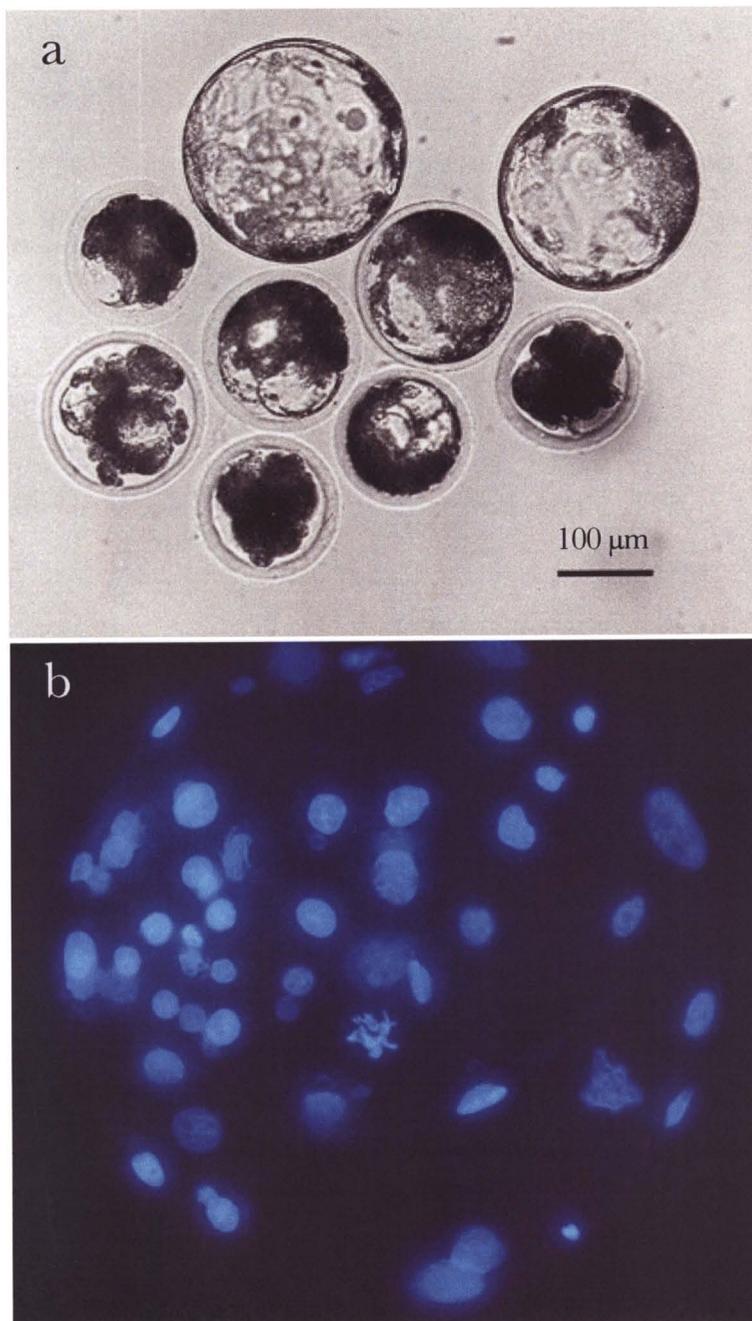


図20 活性化処理後，168時間培養して得られたブタ胚盤胞 (a)
およびhoechst 33342で蛍光染色した胚盤胞 (b)

ブタ成熟卵母細胞に Sr^{2+} を顕微注入後，NCSU 23中で168時間培養した。
培養後，得られた胚盤胞をhoechst 33342で蛍光染色して細胞数を計測した。

示した ($P < 0.05$)。

精子抽出物の注入によって発生した胚盤胞の平均細胞数は、全処理区のなかで最も少なく、最大細胞数も最も少なかった (図 20b, 表 15)。胚盤胞の平均細胞数が最も多かったのは、 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を注入した区であった。 Ba^{2+} を注入して得られた胚盤胞の平均細胞数は、 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} に比べると少なかった。

考 察

本節の実験結果は、 Sr^{2+} あるいは Ba^{2+} を注入した卵母細胞も、電気刺激、精子抽出物あるいは Ca^{2+} を注入した卵母細胞と同様に、胚盤胞へ発生することを示している。

電気刺激したブタ卵母細胞の胚盤胞への発生率は、Van Thuan ら (2002b) の報告と同等の値であった。Macháty ら (2000) は、精子抽出物を注入したブタ卵母細胞を NCSU 23 中で 168 時間培養すると、約 2%が胚盤胞へと発生すると報告している。本節の実験では、Macháty らと同様に NCSU 23 を用いたが、精子抽出物を注入した卵母細胞の 28%が胚盤胞へと発生した。この違いは活性化処理後のサイトカラシン B による卵母細胞の倍数化処理の有無によると考えられる。すなわち、第 II 減数分裂中期で停止している卵母細胞を人為的に活性化すると、卵母細胞は減数分裂を再開して第 2 極体を放出し、減数分裂を完了する。その結果、卵母細胞の DNA 量は半減して 1 倍体となる。エタノール処理したマウス (Henery and Kaufman, 1992)、およびウシ卵母細胞 (Presicce and Yang, 1994)、電気刺激したブタ卵母細胞 (Kure-bayashi et al., 1996; Van Thuan et al., 2002a) では、1 倍体より 2 倍体の卵母細胞が胚盤胞への発生率が高いことが示されている。

精子抽出物を注入した卵母細胞の胚盤胞への発生率は電気刺激した卵母細胞より低かった。精子抽出物中には、卵母細胞を活性化する因子以外にアクロシンやヒアルロニダーゼなど、本来は精子が卵母細胞へ侵入する過程で放出され消失する物質が含まれている可能性があることから、これらの物質が卵母細胞の発生を阻害したと考えられる。

表15 種々の活性化処理によって得られたブタ胚盤胞の細胞数¹

活性化処理	胚盤胞の細胞数		
	平均 ²	最小	最大
電気刺激	28 ± 11.8	15	53
精子抽出物	21 ± 8.1	13	33
Sr ²⁺	35 ± 16.8	15	63
Ba ²⁺	27 ± 14.9	12	64
Ca ²⁺	35 ± 14.9	12	68

¹⁾ 培養168時間後に得られた胚盤胞の核をhoechst 33342で染色して核数を計測し、これを細胞数とした。

²⁾ 平均値±標準偏差。電気刺激および精子抽出物の注入と、二価陽イオンの注入は同時に実験していない。

Ca²⁺を注入した卵母細胞は、電気刺激によって活性化された卵母細胞と同等の割合で胚盤胞へ発生した。Macháty ら (1996) は、Ca²⁺を注入したブタ卵母細胞を 2 細胞期まで体外で培養し、その後、レシピエントの卵管に移植して体内で 7 日間培養し、移植した胚の 16%が胚盤胞へと発生したと報告している。本節の実験では、Ca²⁺の注入によって 52%の卵母細胞が胚盤胞へと発生したが、この違いは、精子抽出物注入の場合と同様に、サイトカラシンによる卵母細胞の倍数化処理の有無が主な原因と考えられる。

マウスの卵母細胞を Sr²⁺を含む培養液で処理した後、サイトカラシンによって倍数化すると、胚盤胞へ高率 (73~87%) に発生することが報告されている (Bos-Mikich et al., 1997)。本節の実験では、Sr²⁺あるいは Ba²⁺を注入することによってブタ卵母細胞を活性化したが、胚盤胞への発生率は、ポジティブコントロールである Ca²⁺を注入した区より有意に低かった (P<0.05)。Sr²⁺を注入したブタ卵母細胞では、注入後に起こる [Ca²⁺]_i の上昇が卵母細胞を活性化するのに十分でなかった可能性がある。本章第 2 節のブタ卵母細胞への Sr²⁺注入実験では、Ba²⁺あるいは Ca²⁺に比べて MIII の核相を示す卵母細胞の割合が高かった。本節の実験でも、MIII へと移行した卵母細胞が含まれていると推測される。一方、Ba²⁺を注入した卵母細胞の胚盤胞への発生率も Ca²⁺より低かったが、Ba²⁺による毒性が考えられる。本章第 3 節において Ba²⁺顕微注入後のブタ卵母細胞の [Ca²⁺]_i の上昇は長時間継続した。持続的な [Ca²⁺]_i の上昇は細胞死につながるため (Berridge et al., 1998)、このことが活性化処理後のブタ卵母細胞の発生に悪影響を及ぼしたのかもしれない。

精子抽出物を注入して得られた胚盤胞の細胞数は他の処理区より少なかった。精子抽出物を注入した卵母細胞では、注入 24 時間後に 2 細胞期以降に発生した胚は 18%と、電気刺激した卵母細胞 (42%) と比べると有意に少なかった (P<0.05)。しかし、注入 48 時間後では、77%の胚が 2 細胞期以降に発生したことから、精子抽出物を注入した卵母細胞では第 1 卵割が遅れた可能性がある。この原因としても前述と同様、精子抽出物中に含まれ、本来は精子が卵母細胞へ侵入する過程で消失する物質が卵母細胞の発生に悪影響を及ぼしている可能性が考えられる。

第5章 総括

本研究では、第 II 減数分裂中期のブタ卵母細胞の活性化における、ブタ精子抽出物および二価陽イオン (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+}) の有効性を検討した。培養液中への二価陽イオン添加による活性化法では、マウスとブタの卵母細胞でその反応性が大きく異なったことから、二価陽イオンによる活性化法について検討を進めた。また、これらの活性化法によって、受精時にみられると同様な一連の卵母細胞の反応が誘起されるか否かを検討した。

1) マウスおよびラットの卵母細胞は、 Sr^{2+} を含む培養液中で容易に活性化されるが、これら以外の動物種で、 Sr^{2+} が卵母細胞を活性化するとの報告はない。一方、精子抽出物の顕微注入は、哺乳類の卵母細胞を活性化するだけでなく、 Sr^{2+} と同様に Ca^{2+} オシレーションを誘起する。このことから、ブタ卵母細胞が Sr^{2+} を含む培養液によって活性化されるか否かを調べた。また、ブタ精子抽出物をブタ卵母細胞に顕微注入し、その活性化率を電気刺激による活性化率と比較した。

過剰排卵誘起した雌マウスの卵管から第 II 減数分裂中期の卵母細胞を採取した。また、ブタ卵巢内の卵胞から卵母細胞-卵丘細胞-壁顆粒膜細胞複合体を採取して、48 時間成熟培養し、第 II 減数分裂中期のブタ卵母細胞を準備した。 Sr^{2+} を含む培養液中で処理したマウス卵母細胞は高率に活性化したが (60~90%)、ブタ卵母細胞はまったく活性化しなかった。一方、精子抽出物を顕微注入したブタ卵母細胞は、電気刺激の場合 (83%) と同様に高率に活性化した (85%)。

次に、第 II 減数分裂中期への成熟後の経過時間がブタ卵母細胞の活性化に及ぼす影響を調べた。成熟培養 36, 42 および 48 時間後の第 II 減数分裂中期の卵母細胞に精子抽出物を注入、あるいは電気刺激し、それぞれの活性化率を調べた。36 時間成熟培養した卵母細胞では、精子抽出物注入による活性化率 (67%) は電気刺激 (38%) より有意に高い値を示した。42 あるいは 48 時間成熟培養した卵母細胞では、両活性化処理区において高い活性化率 (89~100%) を示した。

2) マウスの卵母細胞は、 Sr^{2+} 以外にも培養液中に添加した Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} によっても活性化する。このことから、培養液中に含まれる Sr^{2+} 、 Ba^{2+} および Ca^{2+} のマウス卵母細胞への活性化に及ぼす影響を確認するとともに、同様の処理がブタ卵母細胞を活性化するか否かを調べた。また、二価陽イオンをまったく含まない培養液によってもマウス卵母細胞は活性化されることから、この処理によってブタ卵母細胞が活性化されるか否かを調べた。

マウス卵母細胞を、二価陽イオンを含まない、あるいは Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液中で処理した。二価陽イオンを含まない培養液中で処理したマウス卵母細胞の 54% が活性化した。 Sr^{2+} (1~10 mM) を含む培養液で処理した卵母細胞の 88~98%が活性化した。一方、1 mM Ba^{2+} を含む培養液によって処理した卵母細胞の 28~76%は活性化したが、 Ba^{2+} 濃度の上昇とともに活性化率は 28%へと低下した。 Ca^{2+} (1~10 mM) を含む培養液で処理した卵母細胞の活性化率は 10~37%と低かった。同様の条件でブタ卵母細胞の活性化誘起を試みたが、いずれの処理においてもブタ卵母細胞はまったく活性化しなかった。

3) マウスとブタの卵母細胞では、二価陽イオンの流入および排出に関わる機構に差があると推察されたことから、細胞膜に存在すると考えられる Ca^{2+} 輸送系の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系と Ca^{2+} ATPase を阻害することによって、ブタ卵母細胞の活性化誘起を試みた。

Na^+ を含まない培養液 (Na^+ -free-TL 液) を用いてブタ卵母細胞の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の機能を逆転させ、また、カルボキシエオシン (CE) によって Ca^{2+} ATPase の機能を阻害した条件で、 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む培養液でブタ卵母細胞を処理した。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む Na^+ -free-TL 液あるいは CE 添加培養液中で処理した場合、卵母細胞の 9~14%が活性化されたにすぎなかった。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を含む CE 添加 Na^+ -free-TL 液処理された卵母細胞は、それぞれ、22%および 21%とやや高い割合で活性化された。この条件においては、急激な細胞内カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が観察された (Sr^{2+} : 2/10)。

4) Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} をブタ卵母細胞に顕微注入することによって卵母細胞の活性化誘起を試みた。その結果、53% (Sr^{2+})、67% (Ba^{2+}) および 84% (Ca^{2+}) の卵母細胞が

活性化された。これらの二価陽イオン注入直後、いずれも卵母細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が起こった。 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を注入した卵母細胞では約1分間 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したが、 Ba^{2+} を注入した卵母細胞では、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は約7分間持続した。また、精子抽出物を注入した卵母細胞では約1分間の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の後、 Ca^{2+} オシレーションが起こったが、これは二価陽イオンの注入では認められなかった。

5) 卵母細胞に精子が侵入すると、表層粒の崩壊、Cdc2 キナーゼの不活性化、胚発生の開始などの一連の細胞反応が起こるが、これらの反応は、精子が引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が引き金になっていると考えられている。二価陽イオンを注入したブタ卵母細胞において、これらの細胞反応が起こるか否かを検討した。二価陽イオンあるいは精子抽出物の注入6時間後に卵母細胞の表層粒を FITC 標識 peanut agglutinin で染色した。注入前および対照区の卵母細胞では、表層粒は細胞膜付近に均一に分布していた。 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは Ca^{2+} を顕微注入した卵母細胞では、細胞膜付近の表層粒の蛍光は不連続となり、表層では凝集したパッチ状の蛍光として観察された。この変化は卵母細胞を電気刺激した場合と類似していたが、表層粒が完全に崩壊し、その内容物が透明帯の表層へと移行する精子抽出物の注入によって起こる反応とは異なっていた。

各活性化処理後の Cdc2 キナーゼ活性の変化を調べた。卵核胞期の卵母細胞では Cdc2 キナーゼ活性はほとんど認められなかったが、第II減数分裂中期では活性は高かった。 Ca^{2+} を注入した卵母細胞では、注入1時間後に Cdc2 キナーゼ活性は著しく低下した。 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞の Cdc2 キナーゼ活性は、注入1時間後にやや低下し、6時間後にさらに低下した。対照の卵母細胞では、注入6時間後に Cdc2 キナーゼ活性は低下したが、各二価陽イオン注入の6時間後での活性と比較すると依然高いレベルにあった。

活性化処理したブタ卵母細胞の体外発生能について調べた。活性化処理後、卵母細胞をサイトカラシン B で処理して、2倍体胚を作出し、NCSU 23 液中で168時間培養した。培養24時間後の2細胞期あるいは3-4細胞期への発生率は、それぞれ42% (電気刺激)、18% (精子抽出物)、33% (Sr^{2+})、35% (Ba^{2+}) および40% (Ca^{2+}) であり、精子抽出物

を注入した卵母細胞において第1卵割の遅れがみられた。培養168時間後には、それぞれ44%（電気刺激）、28%（精子抽出物）、29%（ Sr^{2+} ）、29%（ Ba^{2+} ）および52%（ Ca^{2+} ）の卵母細胞が胚盤胞期へと発生した。対照のHEPES緩衝液を注入した卵母細胞では、3-4細胞期へと発生した卵母細胞もみられたが、これ以降のステージに発生した胚はなかった。また、精子抽出物の注入によって得られた胚盤胞の平均細胞数は、全処理区のなかで最も少なく、 Sr^{2+} あるいは Ca^{2+} を注入した区で最も多かった。

以上の結果より、ブタ成熟卵母細胞は、培養液中の Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} によっては活性化しないが、これらの二価陽イオンを卵母細胞中に顕微注入すると、卵母細胞は活性化されること、また、 Ca^{2+} 輸送系を阻害した条件下で、培養液中の二価陽イオンによって一部の卵母細胞が活性化することが示された。これらの結果は、卵母細胞内に二価陽イオンが急激に流入するか、あるいは培養液中の二価陽イオンが卵母細胞に流入して短時間に蓄積すれば、ブタ卵母細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が誘起されて卵母細胞が活性化することを示している。また、精子抽出物は、電気刺激と同様に卵母細胞を効果的に活性化した。

Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} あるいは精子抽出物を注入した卵母細胞および電気刺激した卵母細胞は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇、表層粒の崩壊、Cdc2キナーゼの不活性化、 Ca^{2+} オシレーション（精子抽出物のみ）、および雌性前核の形成といった卵母細胞への精子侵入時にみられると同様な一連の反応を起こし、その後、胚盤胞へと発生することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、本当に多くの方々から絶大なるご指導ならびにご協力をいただいた。ここに記して心から謝意を表す。

研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、終始暖かいご指導とご教示を賜った、神戸大学大学院自然科学研究科教授 三宅 正史 博士に深甚なる謝意を表すとともに、研究の考え方から実験の進め方についてご教示くださり、非常に多くの刺激を与えてくださった、神戸大学農学部教授 宮野 隆 博士に深く謝意を表す。また、ご指導ならびにご助言いただいた、神戸大学農学部名誉教授 加藤 征史郎 博士に謝意を表す。ブタ精液の採取ならびに精子の扱いについて細やかにご指導してくださった、神戸大学大学院自然科学研究科助教授 原山 洋 博士に謝意を表す。

動物の生殖に関わる研究に対して眼を開かせていただいた、日本獣医畜産大学応用生命科学部教授 友金 弘 博士、同専任講師 大星 茂樹 博士に心から感謝する。

実験材料を快く提供していただいた、神戸市食肉衛生検査所ならびに神戸市中央卸売市場西部市場の職員の方々に心から感謝する。

実験遂行ならびに研究室での生活にあたり、あらゆる面で多くのご協力をいただいた、故 紅林 賢臣 博士をはじめとする神戸大学生殖生物学・発生工学研究室の諸先輩、大学院生、専攻生各位に心から感謝する。

最後に、大学院での研究生活を理解し、常に勉学に専念できるよう協力してくれた私の家族、私を終始暖かく励ましてくれた高等学校時代の先生方ならびに私の友人に心から感謝する。

引用文献

- Ayabe T, Kopf GS, Schultz RM. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uninseminated and inseminated eggs. *Development* 1995; 121: 2233–2244.
- Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 1984; 311: 374–376.
- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28: 235–247.
- Beatty RA. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. London: Cambridge University Press; 1957.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium—a life and death signal. *Nature* 1998; 395: 645–648.
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763–854.
- Bos-Mikich A, Swann K, Whittingham DG. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 84–90.
- Bos-Mikich A, Whittingham DG, Jones KT. Meiotic and mitotic Ca^{2+} oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Dev Biol* 1997; 182: 172–179.
- Carroll DJ, Albay DT, Terasaki M, Jaffe LA, Foltz KR. Identification of PLC γ -dependent and -independent events during fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* 1999; 206: 232–247.
- Carroll DJ, Albay DT, Hoang KM, O'Neill FJ, Kumano M, Foltz KR. The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev Biol* 2000; 217: 179–191.
- Carroll J. Na^+ - Ca^{2+} exchange in mouse oocytes: modifications in the regulation of intracellular free Ca^{2+} during oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 337–342.
- Cha SK, Kim NH, Lee SM, Baik CS, Lee HT, Chung KS. Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and in vitro development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 441–446.
- Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. Activation of p34^{cdc2} protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* 1991; 113: 789–795.
- Choi T, Fukasawa K, Zhou R, Tessarollo L, Borror K, Resau J, Vande Woude GF. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7032–7035.
- Collas P, Balise JJ, Hofman GA, Robl JM. Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology* 1989; 32: 835–844.
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 212–223.

- Cran DG, Cheng WTK. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Res* 1986; 13: 241–251.
- Cuthbertson KS. Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J Exp Zool* 1983; 226: 311–314.
- Cuthbertson KS, Cobbold PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 1985; 316: 541–542.
- Dale B, DeFelice LJ, Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm fraction into sea urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 1985; 41: 1068–1070.
- Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 351–358.
- Ding J, Foxcroft GR. Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs. *Biol Reprod* 1992; 47: 648–655.
- DiPolo R, Beauge L. Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon. *Nature* 1979; 278: 271–273.
- DiPolo R. The Na^{+} - Ca^{2+} exchange in intact cells. In: Allen TJA, Noble D, Reuter H (eds.), Sodium-calcium exchange, Oxford: Oxford University Press; 1989: 5–26.
- Finch EA, Turner TJ, Goldin SM. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* 1991; 252: 443–446.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GE. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1261–1270.
- Fissore RA, Gordo AC, Wu H. Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor? *Theriogenology* 1998; 49: 43–52.
- Fraser LR. Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. *Gamete Res* 1987; 18: 363–374.
- Fulton BP, Whittingham DG. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 1978; 273: 149–151.
- Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 1989; 342: 32–38.
- Galione A, Lee HC, Busa WB. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 1991; 253: 1143–1146.
- Gatto C, Milanick MA. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am J Physiol* 1993; 264: C1577–1586.
- Gatto C, Hale CC, Xu W, Milanick MA. Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry* 1995; 34: 965–972.
- Gilkey JC, Jaffe LF, Ridgway EB, Reynolds GT. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Cell Biol* 1978; 76: 448–466.
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; 349: 132–138.

- Gulyas BJ. Cortical granules of mammalian eggs. *Int Rev Cytol* 1979; 63: 357–392.
- Guraya SS. Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal egg. *Int Rev Cytol* 1982; 78: 257–360.
- Hagen DR, Prather RS, First NL. Response of porcine oocytes to electrical and chemical activation during maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 70–73.
- Henery CC, Kaufman MH. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 258–263.
- Homa ST, Carroll J, Swann K. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum Reprod* 1993; 8: 1274–1281.
- Homa ST, Swann K. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod* 1994; 9: 2356–2361.
- Igusa Y, Miyazaki S. Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J Physiol* 1983; 340: 611–632.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 1995; 3: 265–271.
- Jaffe LE. The role of calcium explosions, waves and pulses in activating eggs. In: Metz CB, Monroy A (eds.), *Biology of fertilization*, New York: Academic Press; 1985: 27–165.
- Jaffe LF. First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil* 1990; 42 (supple): 107–116.
- Jolliff WJ, Prather RS. Parthenogenetic development of in vitro-matured, in vivo-cultured porcine oocytes beyond blastocyst. *Biol Reprod* 1997; 56: 544–548.
- Kano K, Hiro-oka R, Miyano T, Kato S. Effects of the time of maturation culture and subsequent co-culture with spermatozoa on fertilization and early cleavage of pig oocytes in vitro. *J Mamm Ova Res* 1993; 10: 175–184.
- Katayama M, Koshida M, Miyake M. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2002; 17: 2657–2664.
- Kaufman MH. Mammalian parthenogenetic development. Bibliography (with review). *Bibliography of Reproduction* 1979; 33: 261–264, 341–343.
- Kaufman MH. *Early mammalian development: Parthenogenetic studies*. London: Cambridge University Press; 1983.
- Kikuchi K, Naito K, Daen FP, Izaïke Y, Toyoda Y. Histone H1 kinase activity during in vitro fertilisation of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1995a; 43: 523–532.
- Kikuchi K, Izaïke Y, Noguchi J, Furukawa T, Daen FP, Naito K, Toyoda Y. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *J Reprod Fertil* 1995b; 105: 325–330.
- Kilani ZM, Shaban MA, Ghunaim SD, Keilani SS, Dakkak AI. Triplet pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of round-headed spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 2177–2179.
- King WA, Xu KP, Sirard MA, Greve T, Leclerc P, Lambert RD, Jacques P. Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vivo and in vitro. *Gamete Res* 1988; 20: 265–274.

- Kline D. Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol* 1988; 126: 346–361.
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80–89.
- Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG. Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development* 1995; 121: 1123–1128.
- Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva I, Vil'ianovich L, Ganten D, Bader M. Development of parthenogenetic rat embryos. *Biol Reprod* 2003; 68: 829–836.
- Kubiak JZ. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during metaphase II arrest. *Dev Biol* 1989; 136: 537–545.
- Kure-bayashi S, Miyake M, Kohno K, Miyano T, Kato S. The meiotic resumption and cleaving ability of porcine oocytes matured in vitro and followed by electroactivation. *J Mamm Ova Res* 1994; 11: 164–174.
- Kure-bayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T, Kato S. Improvement of developmental ability to the blastocyst stage by addition of hyaluronic acid to chemically defined medium in diploid porcine eggs matured in vitro and subsequently electro-activated. *J Mamm Ova Res* 1995; 12: 119–125.
- Kure-bayashi S, Miyake M, Katayama M, Miyano T, Kato S. Development of porcine blastocysts from in vitro-matured and activated haploid and diploid oocytes. *Theriogenology* 1996; 46: 1027–1036.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988; 331: 315–319.
- Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* 1990; 61: 743–752.
- Liu L, Ju JC, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; 59: 537–545.
- Macháty Z, Funahashi H, Mayes MA, Day BN, Prather RS. Effects of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 54: 316–322.
- Macháty Z, Prather RS. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 599–613.
- Macháty Z, Bonk AJ, Kuhholzer B, Prather RS. Porcine oocyte activation induced by a cytosolic sperm factor. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 290–295.
- Macháty Z, Ramsoondar JJ, Bonk AJ, Prather RS, Bondioli KR. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 67: 1133–1139.
- Maller J, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D, Nurse P. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J Cell Sci* 1989; 12 (Suppl) : 53–63.
- Marcus GJ. Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 159–162.

- Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; 177: 129–145.
- Miyano T, Dai Y, Lee J, Kano K, Moor RM. Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase dephosphorylation during fertilisation of the oocytes. *Zygote* 2000; 8: 153–158.
- Miyazaki S. Inositol 1,4,5 trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rise in golden hamster eggs. *J Cell Biol* 1988; 106: 345–353.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; 158: 62–78.
- Monteith GR, Wanigasekara Y, Roufogalis BD. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 40: 183–190.
- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977; 49: 101–109.
- Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod* 1995; 53: 692–699.
- Morrill GA, Kaback HR, Robbins E. Effect of calcium on intracellular sodium and potassium concentrations in plant and animal cells. *Nature* 1964; 204: 641–642.
- Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res* 1987; 16: 243–249.
- Nebreda AR, Gannon JV, Hunt T. Newly synthesized protein(s) must associate with p34^{cdc2} to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1995; 14: 5597–5607.
- Nomura A, Nemoto S. DNA replication cycle in parthenogenetically developing eggs of the starfish *Asterina pectinifera*. *Dev Growth Differ* 1998; 40: 377–386.
- Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503–508.
- Onodera M, Tsunoda Y. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. *Gamete Res* 1989; 22: 277–283.
- Ozil JP. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 1990; 109: 117–127.
- Owen R. On parthenogenesis, or the successive production of procreating individuals from a single ovum. London: John van Voorst; 1849.
- Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny YM, Fissore RA, Rosenwaks Z. Human sperm cytosolic factor triggers Ca^{2+} oscillations and overcomes activation failure of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 367–374.
- Parrington J. Does a soluble sperm factor trigger calcium release in the egg at fertilization? *J Androl* 2001; 22: 1–11.
- Pepperell JR, Kommineni K, Buradagunta S, Smith PJ, Keefe DL. Transmembrane regulation of intracellular calcium by a plasma membrane sodium/calcium exchanger in mouse ova. *Biol Reprod* 1999; 60: 1137–1143.

- Petters RM. In vitro culture of early stage embryos from livestock. *Tissue Culture Res Commun* 1992; 11: 305–313.
- Pincus G. The eggs of mammals. New York: Macmillan; 1936.
- Presicce GA, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 380–385.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1982; 66: 161–168.
- Reeves JP, Hale CC. The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* 1984; 259: 7733–7739.
- Rickords LF, White KL. Electroporation-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 152–159.
- Ridgway EB, Gilkey JC, Jaffe LF. Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 623–627.
- Roh S, Malakooti N, Morrison JR, Trounson AO, Du ZT. Parthenogenetic activation of rat oocytes and their development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2003; 15: 135–140.
- Ross CA, Meldolesi J, Milner TA, Satoh T, Supattapone S, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 1989; 339: 468–470.
- Russo GL, Kyojuka K, Antonazzo L, Tosti E, Dale B. Maturation promoting factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals at meiosis I and II. *Development* 1996; 122: 1995–2003.
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. The *c-mos* proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 1989; 342: 512–518.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129: 3533–3544.
- Schatzmann HJ. The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 473–485.
- Sensui N, Morisawa M. Effect of Ca^{2+} on deformation, polar body extrusion and pronucleus formation in the egg of the ascidian, *Ciona savignyi*. *Dev Growth Differ* 1996; 38: 341–350.
- Siracusa G, Whittingham DG, Molinaro M, Vivarelli E. Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J Embryol Exp Morphol* 1978; 43: 157–166.
- Sobajima T, Aoki F, Kohmoto K. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 389–394.
- Steinhardt RA, Epel D. Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1915–1919.
- Steinhardt RA, Epel D, Carroll EJ Jr, Yanagimachi R. Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature* 1974; 252: 41–43.
- Steinhardt R, Zucker R, Schatten G. Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Dev Biol* 1977; 58: 185–196.

- Stice SL, Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 272–280.
- Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 1999; 211: 157–176.
- Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 1992; 115: 947–956.
- Surani MAH, Kaufman MH. Influence of extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} ions on the second meiotic division of mouse oocytes: relevance to obtaining haploid and diploid parthenogenetic embryos. *Dev Biol* 1977; 59: 86–90.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994; 166: 729–739.
- Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 1990; 110: 1295–1302.
- Swann K. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine-sensitive calcium store. *Biochem J* 1992; 287: 79–84.
- Swann K, Ozil JP. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 1994; 152: 183–222.
- Swann K. Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 1994; 15: 331–339.
- Swann K, Lai FA. A novel signalling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *BioEssays* 1997; 19: 371–378.
- Swann K, Parrington J. Mechanism of Ca^{2+} release at fertilization in mammals. *J Exp Zool* 1999; 285: 267–275.
- Taylor CW. Controlling calcium entry. *Cell* 2002; 111: 767–769.
- Terasaki M, Sardet C. Demonstration of calcium uptake and release by sea urchin egg cortical endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1991; 115: 1031–1037.
- 角田 幸生, 杉江 信. エタノール処理によるマウス卵子の単為発生誘起と割球融合および受精卵細胞質の注入. 日本不妊学会誌 1987; 32: 105–113.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061–1066.
- Van Thuan N, Harayama H, Miyake M. The development of porcine parthenogenetic diploid oocytes with homogeneous genomic components in vitro. *J Reprod Dev* 2002a; 48: 157–166.
- Van Thuan N, Harayama H, Miyake M. Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids in vitro. *Biol Reprod* 2002b; 67: 1688–1698.
- Verlhac MH, de Pennart H, Maro B, Cobb MH, Clarke HJ. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1993; 158: 330–340.

- Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 1994; 120: 1017–1025.
- Vincent C, Cheek TR, Johnson MH. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *J Cell Sci* 1992; 103: 389–396.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–374.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, First NL. Age dependence of bovine oocytes activation. *Gamete Res* 1989;22: 265–275.
- Weber W. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1421: 213–233.
- Webster's Third New International Dictionary. Merriam Webster; 1961.
- Whitaker MJ, Steinhardt RA. Ionic signaling in the sea urchin egg at fertilization. In: Metz CB, Monroy A (eds.), *Biology of fertilization*, vol. 3, New York: Academic Press; 1985: 167–221.
- Whitaker M, Swann K. Lighting the fuse at fertilization. *Development* 1993; 117: 1–12.
- Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil* 1971; 14 (suppl): 7–21.
- Whittingham DG, Siracusa G. The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. *Exp Cell Res* 1978; 113: 311–317.
- Whittingham DG. Parthenogenesis in mammals. In: Finn CA (ed.), *Oxford reviews of reproductive biology*, vol. 2. Oxford: Clarendon Press; 1980: 205–231.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810–813.
- Wu H, He CL, Fissore RA. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 176–189.
- Wu H, He CL, Fissore RA. Injection of a porcine sperm factor induces activation of mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 37–47.
- Yamamoto S, Yamashita M, Iwao Y. Rise of intracellular Ca^{2+} level causes the decrease of cyclin B1 and Mos in the newt eggs at fertilization. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 341–349.
- Yao Y, Parker I. Potentiation of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} mobilization in *Xenopus* oocytes by cytosolic Ca^{2+} . *J Physiol* 1992; 458: 319–338.
- Yoshida M, Cran DG, Pursel VG. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 462–468.
- Zernicka-Goetz M, Verlhac MH, Geraud G, Kubiak JZ. Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur J Cell Biol* 1997; 72: 30–38.
- Zimmermann U, Viemken J. Electric field-induce cell-to-cell fusion. *J Membrane Biol* 1982; 67: 165–182.

Zucker RS, Steinhardt RA. Prevention of the cortical reaction in fertilized sea urchin eggs by injection of calcium-chelating ligands. *Biochim Biophys Acta* 1978; 541: 459–466.