

サイクリング法による卵細胞エネルギー 代謝動態に関する研究

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

堤 治 佐藤 和雄 坂元 正一

Study of Energy Metabolism in the Oocyte by Cycling Method

Osamu TSUTSUMI, Kazuo SATOH and Shoichi SAKAMOTO

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

(Director: Prof. Shoichi Sakamoto)

概要 酵素的サイクリングを応用し卵細胞1個の物質代謝を分析する超微量定量法を確立し, 特殊な代謝型をとり初期発生の過程で大きな変化をとげるとされているエネルギー代謝を解析し, ゴナドトロピンの卵細胞代謝調節機構への関与について検討した。

1) 幼若 Wistar ラットに PMS-hCG により過排卵をおこし, 卵胞の穿刺または卵管, 子宮腔の flush により卵を採取, 凍結乾燥し試料とした。卵の乾燥重量は約50ngで, 酵素反応は oil-well 法により 1~5 μ l の反応液量でおこない, 反応生成物を NAD サイクリングまたは NADP サイクリングにより増幅定量する方法を開発した。

2) 卵のエネルギー代謝解析のため hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH) 以上4種の酵素活性を測定した。

3) hexokinase は解糖系の最初に位置し, glucose 利用に不可欠な酵素であるが, hCG 投与前の卵胞卵で $1.75 \pm 0.14 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/hr (mean \pm S.D. n=8) と, 対照とした卵巣ホモジネートの1/10の低活性であった。hCG 投与により活性は有意の上昇を示し卵の glucose 利用率は高められた。

4) G6PD は五炭糖シャントの律速酵素であり, 卵胞卵で $8.41 \pm 0.34 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (n=8) と対照の10倍以上の高活性を示し, 卵に活発なステロイド代謝, 核酸合成のあることが示唆された。hCG 投与により活性は有意に低下した。

5) LDH は解糖系の末端に位置し嫌氣的条件下で pyruvate よりエネルギーを産生するが, 卵では $35.7 \pm 2.9 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (n=8) で対照の2.4倍と嫌氣的エネルギー産生が活発であった。hCG 投与により活性に変化は認められなかった。

6) MDH は TCA サイクルの酵素で好氣的代謝を代表するが, 卵胞卵では $11.1 \pm 2.5 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (n=8) と対照の約65%であるが, hCG 投与により活性は上昇し, 排卵後エネルギー代謝が活発になる際 TCA サイクルの比重が大きくなることが示唆された。

以上の成績より未成熟卵は hexokinase の活性が低く glucose 依存性ではなく, pyruvate をエネルギー源として独特の代謝を営むが, LH 刺激により通常の細胞レベルの代謝型に分化すると考えられる。

Synopsis A microassay method sensitive enough to analyze the enzyme activities in one oocyte was developed using enzymatic cycling for amplifying the reaction product to 10,000 fold. An oil-well technique was applied in the assay for achieving the reaction in the medium as small as 1.0 to 5.0 μ l. Immature Wistar rats were superovulated by PMS-hCG administration. Oocytes were collected by the puncture of the follicle and the flushing of the tube. They were freeze-dried after washing to remove cumulus cells. The dry weight was about 50ng on a quartz fiber fishpole balance. The activity of hexokinase was 1.75 ± 0.14 picomol/oocyte/hr corresponding to one-tenth of the ovarian homogenate as control, indicating low capacity of glucose utilization in the oocyte. The activities of G6PD, LDH, and MDH were 8.41 ± 0.34 , 35.7 ± 2.89 , 11.1 ± 2.5 picomol/oocyte/min, respectively. High activity of G6PD suggests the pentose phosphate shunt concerned with steroidogenesis is active in the oocyte. HCG increased the activities of hexokinase and MDH and decreased that of G6PD. The activity of LDH remained unchanged.

Key words: Oocyte • Enzymatic cycling • Energy metabolism

結 言

哺乳動物の受精卵が母体外で培養可能であることを Brachet³⁾が報告したのは1912年であつた。その後組成の明らかな培養液中で卵を培養し¹⁷⁾、その成分の必要性を検討することによつて卵における代謝の研究がすすんだ。それらの成績から、初期発生時の卵の物質代謝はすでに分化の完了した細胞組織と異なり特殊な代謝型であり、しかも発生の経過中に代謝動態に大きな変化があることが明らかとなつた。ことにエネルギー代謝の面では、排卵以前の状態にある卵胞卵および発生初期の受精卵ともに pyruvate 依存型であり glucose はエネルギー基質とならないという²⁾⁴⁾¹⁸⁾事実が注目されるようになった。それ故エネルギー代謝の面から見ても、未分化な卵は限られた物質しか利用できないが卵割分化がすすみ着床する時点では glucose をエネルギー源とすることが可能なことより、卵割をへて着床に至る間に卵は分化し通常の細胞と同様のエネルギー代謝能を獲得すると考えられる。

電顕を用いた形態学的研究から卵成熟より着床に至る生殖過程での卵細胞内の構造変化に関しては多くの報告がみられる。しかしそれら変化に伴う物質代謝の生化学的な分析は哺乳動物では均一な卵を多数得ることが困難でありかつ超微量試料である等の方法論的制約により未知であつた。

本研究では卵細胞1個の物質代謝を分析するために、酵素的サイクリング、oil-well等の micro-chemical assay 法を応用した超微量定量法を確立し、次いでそれを用いて特殊な代謝型をとり初期発生の過程で大きな変化をとげるとされている卵細胞のエネルギー代謝を4種類 (hexokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH)(図1)の酵素活性を測定することにより解析し、更にその代謝調節機構へのゴナドトロピンの関与について検討した。

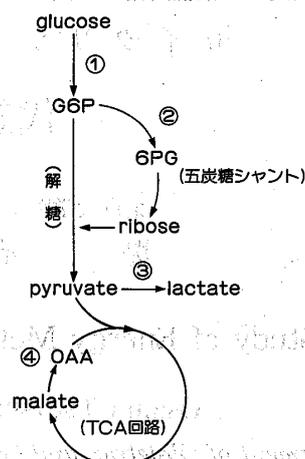
方 法

1. 実験試料

1) ゴナドトロピンによる過排卵

Wistar 系幼若雌ラット(25日齢約50g)に、PMS

図1 糖代謝路と主要酵素



① hexokinase

② G6PD
(glucose 6-P dehydrogenase)

③ LDH
(lactate dehydrogenase)

④ MDH
(malate dehydrogenase)

10iu/0.2ml 生食, その48時間後に hCG 30iu/0.2 ml 生食を皮下注射し過排卵をおこした。排卵は hCG 投与後約12時間でおこり排卵率は8時間後0%, 16時間後100%であつた。屠殺は断頭によつておこない子宮及び付属器を摘出し、以下に述べる方法により実体顕微鏡下で卵細胞を採取した。

2) 卵胞内の卵細胞の採取

PMS 投与後48時間および hCG 投与後8時間のラット(各5匹)卵巣を、hole glassに移し Buffer A (hyaluronidase 0.03%を含む phosphate buffered saline (PBS) pH 7.5) 1 ml を加え、成熟した卵胞を23ゲージ針にて穿刺し、卵細胞および付着した卵丘細胞を Buffer A 中に浮遊せしめた。次いで内径を卵の直径に合わせて調製したマイクロピペットにて、卵および卵丘細胞を数回吸引排出することにより卵丘細胞を剝離除去し、卵細胞のみを遊離した。この卵細胞は hyaluronidase を洗滌するため、他の hole glass にとつて1 ml の PBS, (pH 7.5) にマイクロピペットにより移し洗滌した。本操作を2回おこなつた後マイクロピペットにてガラス板上に移し、ただちに凍結した。更にこれら卵細胞を、耐圧ガラス管内にて真空凍結器により -30°C , 10^{-12} mmHg 以下の真空状態に一昼夜保ち、凍結乾燥した。

3) 卵管内及び子宮腔内の卵細胞の採取

表1 Enzyme reaction condition

Enzyme	Reagents ^①	Reaction Volume	Volume of NaOH or HCl ^②	Incubation period
hexokinase (E.C.2.7.1.1)	5 mM MgCl ₂ ; 0.5% (V/v) TritonX-100; 5 mM glucose; 6 mM ATP; 0.6 mM NADP; G6PD 0.9 μg/ml	1.04 μl	NaOH 1.04 μl	60 min
G6PD (E.C.1.1.1.49)	10 mM MgCl ₂ ; 1 mM glucose 6-P 0.1 mM NADP	4.99 μl	NaOH 4.81 μl	15 min
MDH (E.C.1.1.1.37)	0.5 mM oxalacetate; 0.3 mM NADH	4.99 μl	HCl 4.81 μl	5 min
LDH (E.C.1.1.1.27)	2.0 mM pyruvate; 0.3 mM NADH	4.99 μl	HCl 4.81 μl	5 min

① All reagents were prepared in 100 mM Tris-HCl buffer containing 0.05% (W/v) bovine serum albumin. The pH was 8.5 for MDH, 8.0 for hexokinase and 7.5 for the rest

② 0.2 M NaOH or 0.3 M HCl; stop the reaction and adjust pH

hCG 投与後16, 24, 48時間のラット卵管を1 ml の Buffer A を加えた hole glass にとり, 卵管内に卵細胞を確認した後, 該当部分をマイクロ手術用鉗にて切開し卵丘細胞に包まれた卵細胞を Buffer A 中に移した. 96時間後では, 子宮を hole glass の Buffer A 1ml 中に浮遊させ, 腔内を flushing することにより回収した. これら卵細胞も, 卵胞内の卵細胞と全く同様の操作により卵丘細胞を除去後凍結乾燥し試料とした.

4) 卵巣ホモジェネート

単一卵細胞試料との比較対照試料として卵巣組織を選んだ. 幼若 Wistar ラット25日齢5匹に PMS 10iu を投与し48時間後に断頭, 開腹し卵巣を摘出して湿重量を測定した. そのうちの側を乾燥重量の測定に用い, 対側をテフロン棒ホモジェナイザーを用い生理的食塩水にてホモジェネートとし, Lowry 法¹¹⁾により蛋白定量をおこない-30℃にて凍結保存した.

5) 卵細胞試料の乾燥重量

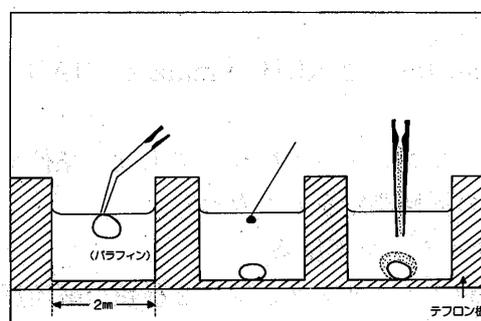
PMS 投与48時間の卵胞卵5個の乾燥重量をマイクロ天秤にて測定した. ミクロ天秤は, 径1ミクロン以下の水晶糸の先端に卵細胞をのせ, 重量によるたわみを顕微鏡的に測定するもので, 感度は ng 以下である.

2. 実験方法

1) 酵素反応

4種の酵素反応液の組成を表1に示す. 反応液量は1~5 μl と微量であるため, oil-well 法¹⁴⁾ (図2)を用いた. oil-well とはテフロン板に直径2 mm 深さ2 mm の小さな井戸 (well) を掘った

図2 Oil-well 法



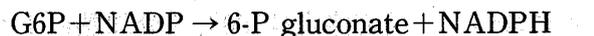
左: 1~5 μl の反応液をoil-well 中にとる

中: 卵細胞を加え反応を開始する

右: NaOH (またはHCl) を加え, 反応を停止する

もので, その中にパラフィンオイルを満し反応液をオイル中の小水滴として蒸発を防ぎつつ反応をすすめる一種の試験管である. oil-well 中に投下した卵細胞が反応液に到達することをもって反応開始とし, 反応の停止は NaOH または HCl を加え pH を変化されることによつておこなつた.

hexokinase は反応 (1), (2) によつて生成される NADPH をサイクリング基質とし NADP サイクリング¹²⁾により増幅定量した.



..... (2)

G6P は反応 (2) によつて生成される NADPH を NADP サイクリングによつて測定した.

LDH, MDH はそれぞれ反応 (3), (4) により生成される NAD をサイクリング基質とし NAD サイクリング⁸⁾を利用して増幅定量した.

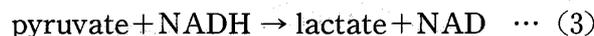


表2 Enzymatic Cycling

	NAD cycling	NADP cycling
Reagent	100 mM Tris—HClpH 8.0 300 mM E+OH 2 mM oxalacetate 2 mM mercaptoethanol 0.02% BSA	100 mM Tris—HClpH 8.0 5 mM α -ketoglutarate 1 mM glucose 6-P 25 mM ammonium acetate 0.1 mM ADP 0.02% BSA
Enzymes	alcohol dehydrogenase (E.C.1.1.1.1) malate dehydrogenase (E.C.1.1.1.37)	glutamate dehydrogenase (E.C.1.4.1.3) G6P dehydrogenase (E.C.1.1.1.49)
Reaction	25°C, 1 hr	37°C, 1 hr
Indicator	malate dehydrogenase hydrazine	6-P gluconate dehydrogenase

oxalacetate + NADH \rightarrow malate + NAD

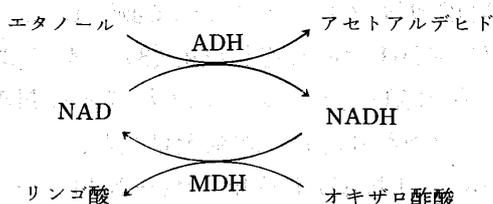
………… (4)

卵巣ホモジェネートについても同一条件で上記4酵素の活性測定をおこなった。

2) サイクリング反応

酵素的サイクリングとは、2種類の酵素反応を組合わせて 10^{-15} mol以下の物質を測定し、細胞レベルの物質代謝分析を可能とする超微量定量法で、Lowry, O.H. et al.により完成された¹³⁾。表2に今回用いたサイクリング反応の反応系を示した。

サイクリングの増幅率は、サイクリング基質のKmより充分小さい範囲では酵素の濃度に比例するので、まず必要な増幅率を得る酵素量を反応液系に加えサイクリング液とし、小試験管(10×75 mm Pyrex)に50 μ lずつ分注した。次にNADHまたはNADPHの5種類の濃度(10^{-13} ~ 10^{-12} mol/ μ l)のスタンダード液と、上記酵素反応(①~④)の反応液を、それぞれ同容量(1~2 μ l)ずつを50 μ lのサイクリング液に加え、サイクリング反応をおこなった。反応停止は100°C 3分加熱によった。ついで反応生成物すなわちNADサイクリングでは、6-phosphogluconateを指示反応により蛍



光光度計 (Farrand Ratio II) にて測定した。

サイクリング反応の原理¹⁾をNADサイクリングを例に説明すると以下のようなになる。

過剰量のエタノールとオキサロ酢酸の存在下でNADは上記の如くADH(アルコール脱水素酵素)によりNADHに還元され、続いてMDH(リンゴ酸脱水素酵素)により酸化されてNADにもどる。この1回のサイクリックな反応でNADと等量のリンゴ酸が生成される。従つてこの反応を10,000回くりかえせば元のNADの正確に10,000倍のリンゴ酸が蓄積されるので任意の増幅が可能となる。なお試薬はすべて特級酵素補酵素類はベリンガー社のものを用いた。

成績

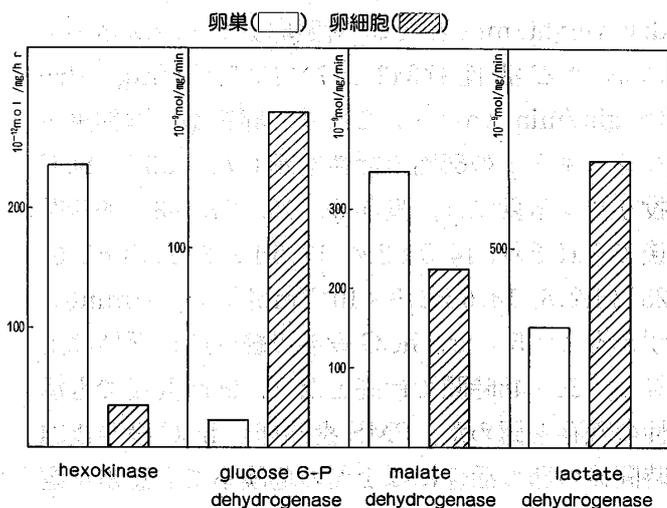
1. 卵細胞及び卵巣試料

卵細胞は卵胞内、排卵後など各時期のもの計200個を得た。PMS処理後の卵胞内の卵の乾燥重量は、 51.2 ± 6.2 ng (mean \pm S.D. n=5)であった。PMS処理の卵巣1個あたりの湿重量は 17.7 ± 3.4 mg (n=5)、乾燥重量は 4.94 ± 0.69 mg (n=5)、蛋白含量は 1.95 ± 0.08 mg (n=5)いずれもmean \pm S.D.であり、湿重量、乾燥重量に占める蛋白量は、それぞれ、11.0%、39.5%であった。卵巣ホモジェネートの酵素活性の表現は、卵細胞と比較するため乾燥重量当りでおこなったが、蛋白含量を40%として換算した。

2. 酵素活性

1) hexokinase

図3 酵素活性の比較 (乾燥重量当り)



PMS 投与48時間の卵細胞の hexokinase 活性は, $1.75 \pm 0.14 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/hr ($n=8$) であった。これは, 卵細胞の乾燥重量50ng より換算すると $35.0 \pm 2.8 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hr となる。これに対して, 対照とした卵巣ホモジェネートでは $10.2 \pm 0.68 \times 10^{-9}$ mol/mg protein/hr ($n=5$) すなわち $245 \pm 16 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/hr であり, 卵細胞では対照の約14%と活性が低いことがわかる(図3)。hCG 投与後8, 16, 24時間ではそれぞれ, 1.96 ± 0.16 , 2.15 ± 0.20 , $2.28 \pm 0.18 \times 10^{-9}$ mol/oocyte/hr (いずれも $n=8$) と活性は徐々に上昇する。t 検定にて PMS と hCG 投与24時間では1%の危険率で有意差を認めた(図4)。

2) glucose 6-phosphate dehydrogenase

PMS 投与48時間の卵細胞の G6PD 活性は, $8.41 \pm 0.34 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min ($n=8$) であり乾燥重量あたりでは $168 \pm 6.8 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/min となる。対照卵巣ホモジェネートでは, $13.0 \pm 1.4 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/min ($n=5$) であり, 卵細胞では対照の13倍の高活性を示した(図3)。hCG 投与では, 8, 16, 24時間後それぞれ 8.25 ± 0.33 , 7.41 ± 0.37 , $6.10 \pm 0.30 \times 10^{-9}$ mol/oocyte/min (いずれも $n=8$) で活性は徐々に低下がみられ PMS 投与卵と hCG 投与24時間後では, 活性低下は t 検定により1%以下の有意水準に達した。

図4 Hexokinase

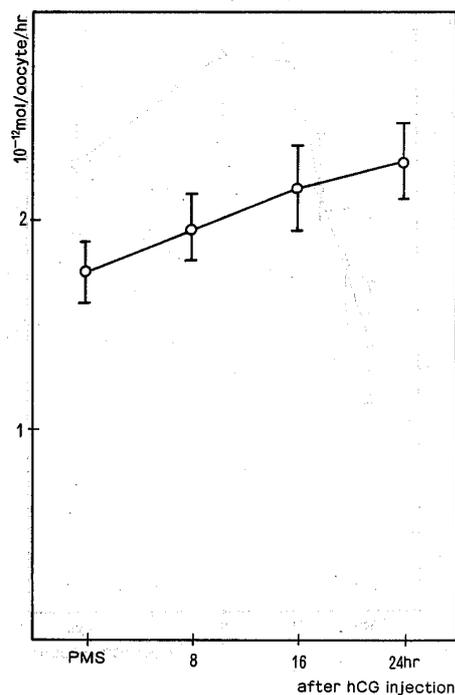
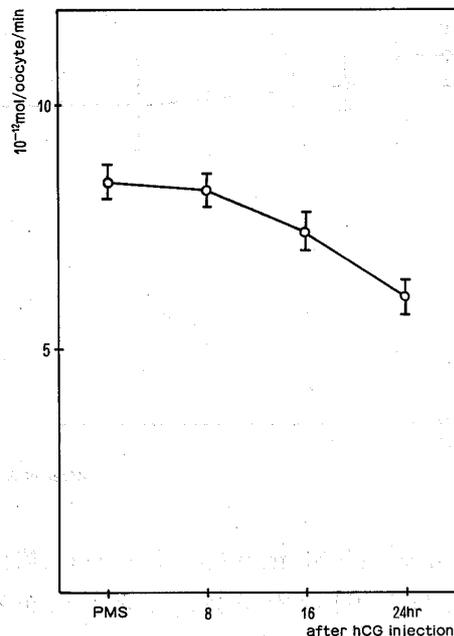


図5 G6PD



3) lactate dehydrogenase

PMS 投与後48時間の卵細胞の LDH 活性は $35.7 \pm 2.89 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min ($n=8$) であり乾燥重量あたりでは $714 \pm 58 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/min となる。これら対照卵巣ホモジェネートの乾燥重量あたりの活性 $301 \pm 11 \times 10^{-9}$

図6 Malate dehydrogenase

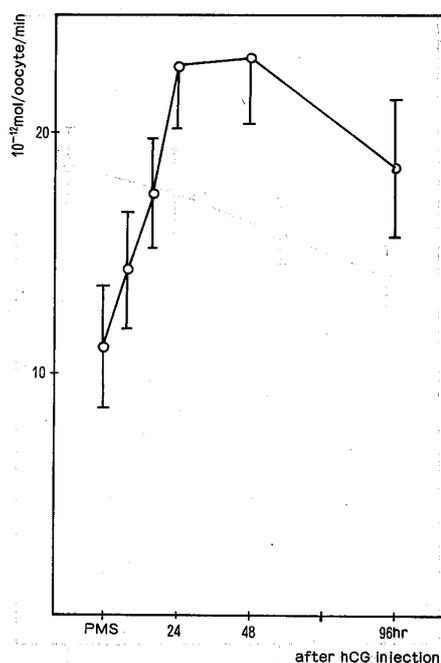
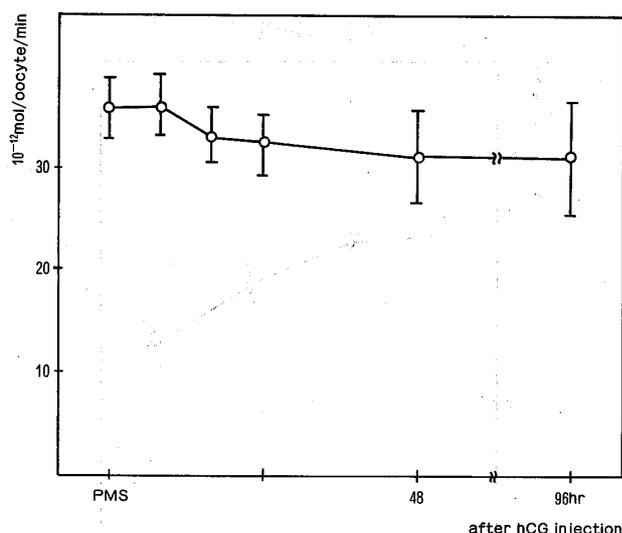


図7 Lactate dehydrogenase



mol/mg dry weight/min (n=5) の2.4倍であり卵細胞ではLDH活性が高いことがわかる(図3)。hCG投与による変化は投与8, 16, 24, 48, 96時間後で、 36.0 ± 2.95 , 33.2 ± 2.61 , 32.3 ± 3.01 , 31.1 ± 4.50 , $31.0 \pm 5.60 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (いずれも n=8) であり活性に変化は認められなかった。

4) malate dehydrogenase

PMS投与48時間の卵細胞のMDH活性は $11.1 \pm 2.5 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (n=8) であ

り、乾燥重量に換算すると $222 \pm 50 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/min となる。対照卵巣ホモジェネートにおける活性は $343 \pm 17 \times 10^{-9}$ mol/mg dry weight/min (n=5) であり、卵細胞では卵巣ホモジェネートの65%の活性を示した(図3)。hCG投与による変化は、投与8, 16, 24, 48, 96時間後でそれぞれ、 14.3 ± 2.4 , 17.5 ± 2.3 , 22.8 ± 2.6 , 23.2 ± 2.8 , $18.6 \pm 2.9 \times 10^{-12}$ mol/oocyte/min (いずれも n=5) で、hCG投与で経時的に活性は上昇し、24~48時間で最高となり、96時間後でも活性の残存を認めた。PMS投与卵とhCG投与後24時間後の卵の活性には1%の危険率で有意差を認めた(図6)。

考 察

哺乳動物卵の重量を測定したデータは、Lowenstein, J.E. et al.¹⁰⁾がマイクロ天秤を用いてマウス卵を測定したものがある。それによればマウス卵の乾燥重量は 32.0 ± 5.9 ng であつた。彼らはその蛋白含量も測定し 20.2 ng (乾燥重量の63%) と報告している。今回の実験ではラット卵の乾燥重量は 51.2 ± 6.2 ng でありマウス卵の1.6倍となるが、これは卵の容積比によく一致する。Lowensteinの成績より換算すると、ラット卵の蛋白量は 32.3 ng となる。ラット卵巣ホモジェネートの蛋白含量は39.5%であり、卵細胞は蛋白の占める割合が高い⁶⁾といえる。

卵細胞における酵素活性は、図3に示した如く対照とした卵巣組織ホモジェネートと比べ大きな差異を示し卵細胞が独特のエネルギー代謝を営んでいることがわかる。

hexokinaseは、図1の①に示すように glucose をリン酸化し解糖系にとりこむ役割をもち、glucose 利用には不可欠の酵素である。本酵素活性が対照卵巣ホモジェネートの14%と低値であることは、卵胞卵において glucose の利用率が悪いことを意味する。既に述べたように卵細胞の蛋白量を 32.3 ng とすると、比活性は10%以下となりこのことはより著明となる。実際、卵胞卵の成熟あるいは初期受精卵の卵割を指標とした培養実験では、glucose は卵をやしなうエネルギー基質とはならないことが明らかとなつている²⁴⁾。種あるい

は組織をとわずほとんどすべての細胞において glucose は主たるエネルギー基質であるだけに, glucose が未分化卵においてエネルギー供給源となりえないことは興味ある点である. glucose の卵細胞膜の透過性等は差のないことより解糖系の酵素活性にその原因があると考えられていたが, hexokinase が極めて低活性であるという本実験成績は, 卵細胞が glucose を解糖系に十分とりこめずエネルギー源として利用できないという事実の生化学的証明となりうる. しかし, 卵割がすすみ 8 細胞期以降着床に至るまでの受精卵は, glucose をエネルギー基質として利用することが可能となる. これは, 未受精卵あるいは受精後も初期の段階では, 卵はかぎられた物質しか利用できず細胞としては未熟な状態であるが, 卵割をくりかえし分化が進む間に hexokinase をはじめとする解糖系の酵素が誘導され機能するようになり細胞として分化成熟すると考えられる. Brinster は多数の卵を集め試料として hexokinase 活性の測定をサイクリング法を利用しておこなった⁷⁾. 彼は初期受精卵では低活性であるが卵割が進むにつれて活性が上昇することを認め, hexokinase 活性が卵のエネルギー利用の鍵を握ると先駆的報告をしている. 図 4 に見るように hCG 投与により hexokinase 活性は有意の上昇を示す. これは刺激により卵が成熟し排卵されていく過程で hexokinase 活性が賦活されるということである. 未熟卵が分化して着床に至る間に糖代謝能が完成するという観点からすると, 機能完成への trigger として hCG すなわち LH 刺激が関与していると考えられる.

G6PD は五炭糖シャント (pentose phosphate cycle) の入口に位置する律速酵素である (図 1 の ②). 五炭糖シャントはエネルギーを供給することには役立たないが, NADP を還元しステロイドホルモン合成に不可欠な還元型補酵素 NADPH を供給する⁸⁾. また別の役割として五炭糖 ribose をつくり nucleotide RNA DNA 合成の素材を供給するという働きがある. 卵巣組織では活発なステロイド代謝がおこなわれており他の組織に比較して高い G6PD 活性を示している. 卵細胞では卵巣

の13倍という極めて高い活性を示している (図 3). このことは卵細胞で代謝される glucose は五炭糖シャントによつて NADPH, ribose 等を供給して, 糖代謝以外の代謝系の働きに役立ついると考えられる. これらのことから卵細胞ではステロイド代謝, 核酸合成が活発であると推定できる. しかし hCG 投与により G6PD 活性は有意の低下を示す (図 5). その理由として酵素合成の停止阻害物質の生成, あるいは活性化物質の消失等の可能性が考えられるが, 推論の域を越えず, 今後の課題であろう.

LDH は解糖系の末端に位置し, 酸素供給が不十分な嫌氣的条件下で pyruvate を還元しエネルギーを供給するが, 卵細胞では対照卵巣の 2.4 倍で高い LDH 活性が認められる. 卵細胞のエネルギー基質は pyruvate 依存型であり初期卵は主に LDH により産生されるエネルギーに依存していると考えられる. hCG 投与によりその活性に有意の変化は認められず高いレベルを保っているが, TCA cycle の活性化にともない排卵後は MDH の活性が上昇するので, エネルギー産生における LDH の役割は相対的に減少すると思われる. hCG 投与後 96 時間すなわち排卵後 80 時間以上経過し受精能を失いすでに変性過程にあると思われる卵でも, 高レベルの LDH 活性が存在するという事は, 排卵後の卵の細胞としての生存には, 受精が必ずしも必須ではないと解釈することができ興味深い.

MDH は TCA cycle (Krebs 回路) の酵素である (図 1 の ④). 糖は TCA cycle を通り好氣的条件下で大きなエネルギーを産生し, H₂O, CO₂ までに代謝される. PMS 処理の卵胞卵では, MDH 活性は対照卵巣の 65% とやや低く, この時期では LDH による嫌氣的代謝が主で好氣的代謝は相対的に不活発と考えられる. しかし hCG 投与によつて MDH 活性は直線的な上昇を示し, 24~48 時間後で peak に達し hCG 投与前の約 2 倍の活性を認める. 受精後の卵は着床に至る間に酸素消費量が経時的に増加する¹⁵⁾とされ, この間に TCA cycle の活性化が起こると考えられていた. 受精前後では酸素消費率に変化がないという報告と合

わせると、本実験成績より、卵における好氣的代謝の活性化はLHの作用によつて起こることが示唆された。

以上の成績考察をふまえて卵細胞のエネルギー代謝を総括すると、① 卵胞内の未成熟な卵はhexokinaseの活性が低くglucose依存性ではない。② 五炭糖シャントの比重が大であり卵ではステロイド核酸等の代謝が活発であると考えられる。③ 卵のエネルギー基質としてはpyruvateが主でありLDHが直接エネルギーを産生する重要酵素である。④ LH刺激により卵が成熟する間に、hexokinase, MDHの活性も賦活され糖代謝能が高まる。

本論文の要旨は第33回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

- 堤 治, 佐藤和雄, 坂元正一, 加藤尚彦: 酵素的サイクリングによる超微量分析法の産婦人科領域における応用. 臨婦産, 34: 653, 1980.
- Biggers, J.D., Whittingham, D.G. and Donahue, R.P.: The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58: 560, 1967.
- Brachet, A.: Développement in vitro de blastomères et jeunes embryons de mammifères. C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris, 1191: 155, 1912.
- Brinster, R.L.: Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. J. Exptl. Zool, 158: 59, 1965.
- Brinster, R.L. and Thomson, J.L.: Development of eight cell mouse embryo in vitro. Exptl. Cell Res., 42: 308, 1966.
- Brinster, R.L.: Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. J. Reprod. Fert., 13: 413, 1967.
- Brinster, R.L.: Hexokinase activity in the preimplantation mouse embryo. Enzymologia, 34L: 304, 1968.
- Kato, T. and Lowry, O.H.: Enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenase. Anal. Biochem., 53: 86, 1973.
- Lehninger, A.L.: Biochemistry second edition. 467 Worth Publishers, Inc., New York, 1975.
- Lowenstein, J.F. and Cohen, A.I.: Dry mass, lipid content of the intact and zona-free mouse ovum. J. Embryol. Exp. Morph., 12: 113, 1964.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V. and Schulz, D. W.: The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling. J. Biol. Chem., 236: 2746, 1961.
- Lowry, O.H. and Passonneau, J.V.: A Flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York, 1972.
- Matschinsky, F.M., Passonneau, J.V. and Lowry, O.H.: Quantitative histochemical analysis of glycolytic intermediates and cofactors with an oil well technique. J. Histochem. Cytochem., 16: 29, 1968.
- Mills, R. and Brinster, R.L.: Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Expl. Cell Res., 47: 337, 1967.
- Wales, R.G. and Brinster, R.L.: The uptake of hexoses by preimplantation mouse embryos in vitro. J. Reprod. Fert., 15: 415, 1968.
- Witten, W.K.: Culture of tubal mouse ova. Nature, Lond., 177: 96, 1956.
- Witten, W.K.: Culture of tubal ova. Nature, Lond., 179: 1081, 1957.

(特別掲載 No. 5120 昭57・7・9 受付)