

ハムスター卵成熟過程におけるイノシトール三リン酸誘起性

Ca^{2+} 遊離機構の発達に関する研究

藤原 敏 博

①

ハムスター卵成熟過程におけるイノシトール三リン酸誘起性

Ca²⁺遊離機構の発達に関する研究

藤原 敏 博

I. 緒言

産婦人科不妊症診療において、体外受精・胚移植法が治療手技として採用され、従来は難治性であった不妊症症例に対しても有用な方法となった。しかしながら、その成績はいまだ十分なものとはいえない。特に受精障害の存在する症例では、対応に苦慮し治療成績も不良である。卵はその成熟過程において受精能力を獲得していくが、この卵成熟度が不十分であることが受精障害の原因として考えられる。従って受精能力の評価法を確立し、これにより卵の成熟度を把握することができれば、体外受精・胚移植法の成績向上に寄与することができると考えられる。

種々の動物卵において、その成熟過程の間に起こる変化が知られている。例えばヒトデ卵では、正常な受精能力を獲得することにより、早期膜電位変化による多精子受精阻止が起こり (Miyazaki and Hirai et al, 1979)、受精膜を形成し (Hirai et al, 1981)、星状体の形成と取り込まれた精子核の膨化 (Hirai et al, 1981) が起こる。この間にカルシウム遊離機構が発達する (Chiba et al, 1990)。これら全ての事象が、成熟誘起ホルモンである1-methyladenineの投与後30分以内に起こる。哺乳動物卵では、減数分裂はcyclic AMP依存性にprophase Iで停止しているが、in vivoでは性腺刺激ホルモンの投与に引続き、in vitroでは卵胞からの卵の遊離後に、それぞれ減数分裂の再開が起こる (Sato and Koide, 1987, Wassarman, 1988)。ハムスター卵やマウス卵ではprophase I からmetaphase IIに至るまで約14時間を要するが、その間に起こる成熟変化が主として形態学的観点から研究されてきている。この中には、第1極体放出に対応した微絨毛低密度領域の分化 (Ebensperger and Barros, 1984) や、围卵腔の拡大 (Okada et al, 1986)、表層顆粒数の減少および配列の変化 (Okada et al, 1986, Ducibella et al, 1988a, 1990b)、表層反応の反応性の発達 (Ducibella et al, 1988b, 1990a)、さらに精子核の膨化能の獲得 (Usui and Yanagimachi, 1976) という事項が含まれる。その一方で、受精電位やカルシウム遊離機構といった生理学的側面の変化に関する研究はほとんどなされていない。

ところで、急激かつ一過性の細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇が、種々の動物卵の受精過程において起こり、しかもそれは精子付着部位から始まる「 Ca^{2+} 波」の

形をとることが知られている (Jaffe, 1985, 1991)。この一過性 Ca^{2+} 増加は、多精子受精を阻止する表層顆粒分泌を引き起こすきっかけとなる (Epel, 1978, Yanagimachi, 1988) だけでなく、細胞周期を進行させる引金にもなっている (Whitaker and Patel, 1990)。成熟ハムスター卵 (Miyazaki et al, 1986) およびマウス卵 (Kline and Kline, 1986) でも、受精時に反復する一過性 Ca^{2+} 増加反応 (以下“受精 Ca^{2+} 反応”と呼称) が認められる。ハムスター卵では、 Ca^{2+} 増加が Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流を誘起することにより、反復性の過分極反応 (Hyperpolarizing Responses: HRS) からなる受精電位を形成する (Igusa and Miyazaki, 1986)。いくつかの知見からみて、ハムスター卵における精子-卵の反応は、おそらくは GTP-binding protein (G 蛋白) の活性化を介して、inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP_3) が産生され、細胞内ストアからの InsP_3 誘起性 Ca^{2+} 遊離 (InsP_3 induced calcium release: IICR) が起こるといふ、polyphosphoinositide (PI) turnover が関与していると考えられる (Miyazaki, 1988, 1990)。ただし精子から卵への最初のシグナルに関しては未だ定見をみておらず、精子細胞質中の物質 (cytosolic factor) が受精時に直接卵細胞内へ移行し、これが直接の刺激となって細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離が引き起こされるという考えも提唱されている (Swann, 1990)。 InsP_3 受容体に対する機能遮断性モノクローナル抗体 (mAb) を用いた最近の研究によると、精子付着部位における $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇の開始は IICR によるものであり、また Ca^{2+} 波および Ca^{2+} 振動は Ca^{2+} 感受性 IICR によるものであることが直接示された (Miyazaki et al, 1992b)。

さらにヒトデ卵では、IICR 機構が卵成熟過程で発達することが示された (Chiba et al, 1990)。マウス未成熟卵では、透明帯による多精子受精阻止が不十分である (Iwamatsu and Chang, 1972) ことや、卵に取り込まれた精子の前核形成がハムスター未成熟卵では起こらない (Usui and Yanagimachi, 1976) ことから、本研究では、ハムスター未成熟卵における受精電位および Ca^{2+} 増加反応を成熟卵と比較した。さらに *in vivo* および *in vitro* の2つの成熟過程における IICR の発達を、 InsP_3 の細胞内微量注入および fura 2 を用いた Ca^{2+} 画像解析により観察した。IICR の発達は、細胞質レベルでの機能的成熟の指標として、有用であると考えられた。

II. 材料と方法

1. 卵の調整

成熟雌ゴールデンハムスターを用い、発情期にpregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 30iu を腹腔内投与した。A群(in vivo maturation group) ではPMSG投与48時間後にhuman chorionic gonadotropin (hCG) 30iu を腹腔内投与し、その2~16時間後に卵巣または卵管から卵を採取し実験に用いた。B群(in vitro maturation group) ではPMSG投与48時間後に卵巣を摘出して、培養液中で27G針を用いて成熟卵胞を穿刺して未成熟卵を採取した。採卵した卵は培養器内(37°C, 5%CO₂)で、卵丘細胞を伴った状態で最長16時間まで培養を行い、実験に用いた〔図1〕。本論文では、卵の成熟段階を次のように表示している。すなわちA群ではhCG投与後の経過時間(単位: 時間)で示し、B群においては、卵胞から卵を取り出してからの経過時間(単位: 時間)で示している。また卵胞から採取後30分以内の卵核胞(GV)期にある卵を未成熟卵、A群およびB群において16~17時間経過した卵を成熟卵、両者の中途段階にある卵を成熟途上卵と定義した。

採取した卵はまず、BWW液(Biggers, Whitten and Whittingham, 1971)にhyaluronidase (P-L Biochemicals, Milwaukee, WI)を0.05%の濃度に溶解した溶液中で、ガラス毛细管をアルコールランプ中で加熱・牽引して作製したピペットを用いてピペッティングを数回行って、卵丘細胞を除去した。次いで卵を0.07%trypsin (GIBCO, Grand Island, NY)溶液中に約1分間おき、透明帯を溶解・除去した。なお成熟度の低い卵においては、本処理によっても、透明帯が完全に除去できないこともあった。

2. 精子の調整および媒精

成熟雄ゴールデンハムスターの精巣上体尾部を摘出後、これを針で穿刺して精液を採取した。これを37°Cで4~5時間培養し、capacitationおよびacrosome reactionを起こさせた。媒精実験に際しては、ガラスピペットを用いて、精子懸濁液2~3 μ lを卵の入ったディッシュ中に媒精した。

3. 溶液

卵の培養および処理を行うには、原則として、BWW溶液を用いた。本溶液の組成は、以下の通りである (いずれも mM): NaCl, 94.6, KCl, 4.8, CaCl_2 , 1.7, MgSO_4 , 1.2, KH_2PO_4 , 1.2, Na lactate, 22, Na pyruvate, 0.5, glucose, 5.6, NaHCO_3 , 25.1 本溶液は、5% CO_2 下で気相平衡させ、pH 7.4として用いた。また使用前に牛血清アルブミンを4mg/mlの濃度になるよう添加した。生理学的実験は、modified BWW溶液 (M2溶液)中で行った。本溶液は、19.4mM Hepes と 5.1mM NaHCO_3 を含んでいる。また一部の実験においては、serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) (Sigma, St. Louis, MO) 溶液を卵の入った溶液に添加した。

4. Ca^{2+} 濃度の測定と画像処理

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、以下のごとく行った。まず Ca^{2+} 結合性蛍光色素であるFura 2のacetoxymethyl体であるFura 2-AM溶液を作成した。本溶液はFura 2-AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)をBWW溶液に溶解して10 μM の濃度にしたものであり、界面活性剤であるpluronic F-127を0.04%含む。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定にあたっては、卵をFura 2-AM溶液中で7~20分間培養し、Fura 2-AMを卵内に取り込ませた。実験内容によっては、Fura 2をマイクロピペットを用いて直接卵内に微量注入した。なお卵内のFura 2濃度は、既知量のFura 2を卵内に微量注入した際の360nm紫外線に対する励起光の強度を元にして計算すると、Fura 2-AMで取り込ませたものでは5 \cdot 10 μM であり、Fura 2を微量注入したものでは14 \cdot 20 μM であった。。次にこの卵を35mm径のプラスチックディッシュのパラフィンオイル中に形成した0.4mlのM2溶液のドロップの中に移した。このプラスチックディッシュの底は中心に5~10mmの孔を開け、ここにカバーガラスを貼り付けてあり、紫外線 (UV)の通過を可能としている。またこのカバーガラスの表面はpoly-L-lysine (50 $\mu\text{g/ml}$)で処理しており、卵が付着しやすくしてある。プラスチックディッシュを倒立顕微鏡のステージにセットし、温度を32~34 $^{\circ}\text{C}$ に保った状態で実験を行った。

実験にあたっては、キセノンランプより発した光線を340 \pm 10nmのnarrow bandpass filterを通し、得られた340nmの波長の紫外線を卵に照射した。そして励起光を510 \pm 10nm

のnarrow bandpass filterを通して高感度カメラで捕捉した。なお顕微鏡の焦点は卵の赤道面に合わせた。340nm紫外線は実験中持続的に照射され、2秒間隔毎に最初の0.5秒間の励起イメージ(F340)をイメージプロセッサ (ARGUS 100 system, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)で積算した。同様にF340計測の前後に、360nm紫外線に対する励起イメージ(F360)を計測した。実験中F360は直線的に減衰するものと仮定した上で、各測定ポイントにおけるF340/F360の比を計算した。図2および3に実験方法の概要を示した。計算プログラムはU3990-01 (Hamamatsu Photonics)を用いた。また種々の Ca^{2+} 濃度に作成した Ca^{2+} -EDTAOH buffer solutionについて同様の計測を行い、F340/F360比に対する Ca^{2+} 濃度のcalibration curveを作成した。処理したイメージは $[\text{Ca}^{2+}]$ 疑似カラーで表示した。

なお実験中は微小ガラス電極を介して卵細胞膜電位を持続的に記録し、かつ一定量の電流パルスを定期的に与えることにより、膜抵抗の変化の観察も同時に行った。実験に用いた卵のうち、採取後時間が長く経過したものの中には反応が不良であるものが認められた。また一部に膜抵抗が明らかに低値を示す卵もみられたが、これはビベッティングなどの操作に伴う卵の劣化と考えられた。これらの卵は検討対象からは除外した。

Ⅲ. 結果

1. 成熟卵および未成熟卵における受精時細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

最初に、媒精して受精が成立したときに認められる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 変化、すなわち受精時細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を観察した。まずA群成熟卵における受精時細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を図4Aおよび4Bに示す。図4Aは膜電位変化をみたものであり、図4Bは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を直接計測したものである。膜電位変化としては、一過性かつ反復性の過分極反応 (HR) が認められるが、最初のHRは、卵表面に付着した精子の鞭毛運動が静止した時点で出現している。この鞭毛運動の静止は、精子と卵の融合を示していると考えられる。何故ならば卵と癒合する能力のない先体反応未誘起精子 (Yanagimachi, 1978) は、卵表面に付着はしても鞭毛運動が静止したりHRを起こすことはないからである (Miyazaki and Igusa, 1981)。最初のHRに引き続いて2~3のHRが短い間隔で生じている。

図4Baは最初の3回の反応について、精子付着部位、卵中央、精子付着部位の対側の3ヶ所における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を示している。ゆっくりとした小さな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が精子付着部位に生じ、これに引き続いてより速く大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められる。これらの大きい反応における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のピーク値は500~550nM ($n=10$) に達し、卵内の3ヶ所ではほぼ同様の値を示した。いずれの反応においても精子付着部位の対側では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は約2秒の遅れをもって増加した。以上の反応を疑似カラーで表示したものが写真1Aである。

最初の間隔の短い数回の反応の後には、ほぼ一定の間隔 (2~3分) で反応が続いている (図4A)。図4Bbおよび4Bcにみられるように、各々の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化はゆっくりとした小さな立ち上がりの部分と、これに引き続く速く大きい変化 (Ca^{2+} スパイク) から構成されている。そしてこれら2つの要素の移行は、濃度が140~170nMに至ったところで起こっている。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は卵全体においてほぼ同期して起こり、ピーク $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は500nMに達している ($n=10$)。以上に示したように、卵は受精時に、ホルモンや神経伝達物質や成長因子に対して種々の体細胞が反応するのと同様に Ca^{2+} 振動を起こす。

未成熟卵も媒精に際して、頻回なHRを示す (図4C)。一定の電流パルスに卵を与えることにより得られる膜抵抗の値は、未成熟卵においても成熟卵とほぼ同等であるが、媒精時に

みられるHRの大きさは未成熟卵でははるかに小さい。またHRは精子が卵の表面に付着した直後から出現しており、付着した精子の鞭毛運動が静止してから出現する成熟卵と比べると早い時期に始まっている。同じ卵における Ca^{2+} イメージをみると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初の6~8回は25~30秒の周期で、250~300nMのピーク値をとり、基線レベルまで戻ることなく振動している。そして空間的分布をみると、最初の3~4回の反応は精子が付着した部位の近傍から始まっており、卵内の局所に留まることなく2秒以内に卵全体に拡がっている。写真1Baに示すように、 Ca^{2+} 波らしきものは認められるものの、さほど明瞭ではない。4番目から8番目の反応における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は、卵内の特定の部位からでなく全体から一様に起こっている。最初の数回の Ca^{2+} 振動の後、HRは振幅が小さく、間隔が長くなっている。その後は振幅は元に戻り、約60秒周期の規則的なパターンが形成される。この時点ではいずれの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加も卵全体から同期して起こっており、緩徐な Ca^{2+} の微増加とそれに引き続く Ca^{2+} スパイクから成っている。

InsP_3 受容体の Ca^{2+} チャネル部位の近傍のエピトープを認識するモノクローナル抗体(mAb)である18A10は、マウス小脳のミクロゾームにおけるIICRを抑制することが知られている。このmAbは、成熟ハムスター卵において InsP_3 注入により誘起される Ca^{2+} 遊離と同様、精子により誘起される Ca^{2+} 波や Ca^{2+} 振動をも抑制することが報告されている。図4Eでは、記録中2つの精子が卵と融合している(鞭毛運動の停止で判断)。しかし、18A10を事前に細胞内注入(最終濃度は $115 \mu\text{g/ml}$)することにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は完全に抑制された。しかも、精子付着部位の近傍においてすら、局所的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加も認められていない($n=3$)。18A10を注入せず、同量のFura 2のみを注入した場合には、 Ca^{2+} 反応には影響を及ぼさなかった。従って成熟卵と同様未成熟卵においても、精子により誘起される Ca^{2+} 振動はIICRによるものであらうと考えられた。

未成熟卵のうち約半数において、媒精以前から自発性の Ca^{2+} 変化がみられている(図5A)。もっとも過分極反応は極めて小さく、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は200nM以下であった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は卵全体において一様に起こった(図5A)。これらの反応は18A10により抑制された。精子により誘起される最初の Ca^{2+} 反応は、精子が付着してから開始している点、より周期が短い

点、および反応が大きい点において自発性 Ca^{2+} 変化と区別される。

2. serotoninに対する Ca^{2+} 変化

serotonin (5-HT) は、成熟ハムスター卵において50nMの濃度で周期的な Ca^{2+} 濃度変化を起こすことが知られている (Miyazaki et al, 1990)。しかしながら5-HTに対する反応性の生物学的意義は不明である。これらの反応は、5-HT受容体のアンタゴニストにより抑制されるが、5-HT受容体はPI情報伝達系を活性化し、G蛋白を介してIICRを惹起する。未成熟卵のPI情報伝達系を検索する目的で5-HTを投与した。なお卵は卵丘細胞および透明帯を完全に除去して用いた。未成熟卵では0.5nMの5-HTが Ca^{2+} 濃度変化を引き起こすのに十分であった (n=6) (図5B)。すなわち反応を起こすのに必要な最少5-HT濃度は成熟卵と比較するとその1/100以下である。5-HTを投与してから反応が生じるまで約50秒の時間の遅れがあり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のピーク値は150~200nMであった。1nMの5-HTを投与すると、より短い遅れの後に、受精時と同様の周期的 Ca^{2+} 濃度変化が生じた (図5C)。これらの5-HT誘起性 Ca^{2+} 増加反応は、18A10により完全に抑制された。一方成熟卵においては、50~75nMの5-HTを投与しても反応は1回認められるのみであった (n=8) (図5D)。ただし図5Bの場合とはほぼ同等の時間的遅延をもちながら、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は500nM以上に達する反応がみられた。

3. 成熟卵および未成熟卵における InsP_3 誘起性 Ca^{2+} 遊離機構

受精 Ca^{2+} 反応は、卵において産生された InsP_3 によるIICRが関与したものであると考えられているが、 InsP_3 を成熟ハムスター卵に細胞内注入すると、 Ca^{2+} 遊離を起こすことができる (Miyazaki, 1988)。そこで InsP_3 誘起性 Ca^{2+} 増加反応を受精 Ca^{2+} 反応のモデルとして、成熟卵と未成熟卵における本反応の差異について検討した。図6は InsP_3 の注入電流量 (パルスの電流:nA×時間:sec で表示) および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のピーク値 (卵全体における平均値) の関係を示している。成熟卵および未成熟卵における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の基礎値はそれぞれ 66 ± 21 nM (n=40) および 62 ± 17 nM (n=24) であった。in vivoで成熟した卵では、容量-反応曲線は

0.6nA×1secのパルスによる注入量に対する80nMから1.2nA×1secのパルスによる注入量に対する500nMの間で急激な上昇を示した。より大きなInsP₃の注入量に対する反応の増加は逆に緩徐であった。20nA×2secのパルスによる注入時においても[Ca²⁺]_iのピーク値は605±50nM (n=5)であった。従って、成熟卵におけるIICRは、自己再生的 (regenerative) な性質をもつと思われた。

一方未成熟卵においては、いずれのInsP₃投与量においてもIICR反応は成熟卵よりかなり小さいものであった (図6)。1.2nA×1secのパルスに対するピーク[Ca²⁺]_iは181±60nM (n=7)であり、成熟卵における35%であった。InsP₃の投与量を増加したときの反応パターンは自己再生的ではなくgradedであった。20nA×2secのパルスに対するピーク[Ca²⁺]_iは485±65nM (n=6)であり、ほぼIICRの最大レベルと考えられる成熟卵の反応の約80%であった。

4. IICRの時間的・空間的解析

卵の一端からInsP₃を注入し、卵内における3ヶ所で[Ca²⁺]_iの測定をすることにより、IICRの時間的・空間的解析を行った。成熟卵では、0.9nA×1secのパルスに対して、InsP₃注入部位では200nMの、そして対側では100nMのCa²⁺ピーク値を示した (図7Aa)。詳細にみると、InsP₃の注入部位において局所的にCa²⁺遊離が起こり、これにより生じたCa²⁺が反対側まで拡散していったものと考えられる (写真1Ca)。これとは対照的に、1nA×1secのパルスに対しては約500nMのピーク値に至るCa²⁺増加が起こっている。これら2つの注入量に対する反応性は不連続的である。しかもこのピーク値は卵内の3ヶ所においていずれも同等の値を示した (図7Ab)。写真1Cbには、自己再生的なCa²⁺増加が卵内部におけるCa²⁺動員に対応しているのが示されている。5nA×1secのパルスに対する反応も同様のパターンを示している (図7Ac) が、[Ca²⁺]_iは卵内の3ヶ所でほとんど時間的な差がない状態で増加している。これはおそらく注入されたInsP₃が広い範囲に拡散するためであると考えられる。

一方未成熟卵では、1.2nA×1secのパルスおよび5nA×1secのパルスによるInsP₃注入に

対する反応は成熟卵における反応と比べてはるかに小さい。また InsP_3 の注入部位と反対側との間に、 $[\text{Ca}^{2+}]$ のピーク値の空間的濃度勾配が存在する（図7Baおよび図7Bb）。これらに対応する画像は写真1Daおよび写真1Dbであるが、もっとも高い $[\text{Ca}^{2+}]$ を示すのは、 InsP_3 注入部位の近傍であり、 $5\text{nA} \times 1\text{sec}$ のパルスによる InsP_3 注入に対しても、 Ca^{2+} 動員はみられない。 $10\text{nA} \times 2\text{sec}$ のパルスによる InsP_3 注入に対しては、 $[\text{Ca}^{2+}]$ は3ヶ所で同等の値をとっており、立ち上がりの時間的遅延はわずかである（図7Bc）。対応する画像の写真1Dcには、 Ca^{2+} 波様の $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加が認められるが、このような大容量の注入量においては、注入した InsP_3 の卵内での拡散によるものとの区別は困難である。

5. 卵成熟過程における11CR発達の時間的経過

InsP_3 注入に対する $[\text{Ca}^{2+}]$ 増加反応を、*in vivo*（A群）および*in vitro*（B群）の卵成熟過程における様々な段階において検討した。*in vivo*卵成熟過程では、hCGの投与2～3時間後までは、第1減数分裂の卵核胞崩壊（GVBD）が大部分の卵において認められた。ハムスター卵の減数分裂における核の成熟段階に関する報告によると、GVBDはhCG投与4時間後に全ての卵で完了し、prometaphase Iに移行する。その後ほとんどの卵は9～10時間後にはtelophase Iに進み、10～11時間後にはchromatin mass stageに、11～12時間後にはprometaphase IIに、12～14時間後にmetaphase IIに移行する。この時点で排卵が起こり、受精が成立するまで卵はmetaphase IIにとどまる。*in vitro*卵成熟過程では、早期の過程は若干速く進行する。GVBDは卵胞から遊離後1.5～2.5時間後には認められる。後期の核成熟段階は*in vitro*卵成熟過程では詳細には検討されていないが、*in vivo*卵成熟過程とほぼ同等であるとされる（Iwamatsu, 1975）。

$[\text{Ca}^{2+}]$ の基礎値はA群においては各測定時点においてほぼ一定であり、B群と比較しても同程度であった（図8および9）。2時間および3時間後の成熟途上卵では、自発性 Ca^{2+} 振動が認められたが、それ以前の段階の卵に比べると出現頻度は低かった。5時間後に $[\text{Ca}^{2+}]$ の微小な変動がみられた卵もあった。10時間後以降の卵では自発性 Ca^{2+} 振動は全く認められなかった。

InsP₃の卵細胞内への注入にあたっては、3種類の電流パルスを用いた。第1に成熟卵で自己再生的な反応を起こす閾値よりわずかに大きな値である $1.2\text{nA} \times 1\text{sec}$ （パルス1）、第2に閾値より十分に大きな値である $5\text{nA} \times 1\text{sec}$ （パルス2）、第3に最大レベルの反応を誘起する $20\text{nA} \times 2\text{sec}$ （パルス3）である。卵全体での平均でみた各反応の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のピーク値を図8および図9に示した。なお以後の記載において「%」と表記してある場合、同量のInsP₃パルスに対する反応の比〔成熟途上卵の値/成熟卵の値〕を示している。

A群では成熟過程を通して、パルス3に対する反応は80%から100%へと増加した（図8）。より小さい注入量（パルス1およびパルス2）に対する反応におけるIICRの発達には、明瞭に2つの相が認められた。最初の5時間までの第1相（早期相）と10時間以降の第2相（後期相）である。第1相ではパルス2に対する反応が急激に80%にまで増加している。反応は次の5時間では変化はみられていない。一方、パルス1に対する反応は初めの10時間では未成熟卵と同レベル（35%）のままでとどまっている。第2相ではパルス2に対する反応は再び増加している。しかしパルス1に対する反応性の増加はより顕著であり、12時間後の卵におけるピーク $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、80%に達している。

B群におけるIICR発達は基本的にはA群のそれと同様であるが、以下の点において差異が認められる。第1にパルス2に対する反応は1時間と2時間の間に増加し、5時間以内にほぼ100%に達している。第2にパルス1に対する反応性の増強は、10時間後には認められ、12時間後にはほぼ100%のレベルに達している。第3にB群成熟卵（16時間）では、パルス1に対する反応がA群成熟卵と比べ、理由は定かではないが若干低値である。以上のように卵胞から取り出した卵においてもIICRは発達をし、その時間経過はin vivo成熟過程よりも若干早い。

IV. 考察

本研究では哺乳動物の未成熟卵における受精電位および Ca^{2+} 変化を初めて示した。ハムスターの未成熟卵と成熟卵との間に、細胞質内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態における差異が認められた。本質的差異はIICR機構にあり、このため卵成熟過程におけるIICR機構の発達を明らかにした。

1. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の基礎値と自発性 Ca^{2+} 振動

未成熟卵における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の基礎値の平均は65nMであり、成熟卵との間に差はなかった。 InsP_3 受容体が関与する自発性 Ca^{2+} 振動がGV期およびGVBD期にある卵の多くにおいてみられた。本現象はマウスで報告されているものと同様である (Carroll and Swann, 1992)。一方で10時間以降の成熟段階にある卵では、自発性 Ca^{2+} 振動は全く認められなかった。ハムスター卵では、細胞外 Ca^{2+} 濃度を上げたり Ca^{2+} ionophore A23187を添加するとGVBDは促進される (Racowsky, 1986) ことから、自発性 Ca^{2+} 振動は卵胞から取り出した卵の減数分裂再開に関与している可能性がある。しかしマウス卵での検討では、 Ca^{2+} キレート剤であるBAPTAで処理して自発性 Ca^{2+} 振動を抑制してもGVBDは妨げられない (Carroll and Swann, 1992)。自発性 Ca^{2+} 振動の生物学的意義の解明には、さらに検討が必要である。

2. 受精 Ca^{2+} 反応

未成熟卵においても InsP_3 受容体の関与した受精 Ca^{2+} 反応が認められた。 Ca^{2+} の反応パターンは成熟卵の受精時と類似していた。すなわち反応早期にみられる周期の短い Ca^{2+} 振動が精子付着部位より開始し、その後一定の周期で独立した反応が続いた。最初の反応は、精子の付着あるいは融合が直接の引き金になり、その後の反応は受精した未成熟卵あるいは成熟卵の内部で確立した Ca^{2+} 動態に基づいているように思われた。一方で未成熟卵と成熟卵とは異なる点も認められた。

第1に未成熟卵では Ca^{2+} 増加は精子が卵に付着した直後に開始した。1つの可能性として、精子表面に存在する何らかの物質がIICRに至る情報伝達経路を刺激していると想定される。ハムスター卵では受精時にPI情報伝達系が関与すると考えられている

(Miyazaki, 1988; Miyazaki et al, 1990, 1992b)。5-HTはハムスター成熟卵において、受容体-G蛋白-PI turnoverを介して反復するIICRを誘起するが、未成熟卵でも5-HT投与により $[Ca^{2+}]$ 増加が認められたことから、成熟卵と同様未成熟卵でもPI情報伝達系が作動していることが示された。しかも成熟卵と比較すると未成熟卵は5-HTに対する感受性がかなり高かった。さらに5-HTの投与から Ca^{2+} 振動開始までの時間的遅延は、未成熟卵が成熟卵よりはるかに短く(図5Cおよび5D)、両者の受精 Ca^{2+} 反応の場合と類似していた。未成熟卵で精子並びに5-HTに対する Ca^{2+} 反応のサイズが小さい理由はPI情報伝達系が未発達なためではなく、IICRが何らかの修飾を受けていることに起因している可能性が示唆された。

第2に未成熟卵における受精時 $[Ca^{2+}]$ 増加は成熟卵の約1/2であった。未成熟卵には成熟卵の約80%の細胞内 Ca^{2+} 遊離ストアが備わっていることから、この主な原因はIICRにおける $InsP_3$ に対する感受性の低さであると考えられる。もっとも、ストアへの Ca^{2+} の再取込みが未熟である可能性は否定はできない。同様の現象は、ヒトデ卵においても報告されている(Chiba et al, 1990)。 Ca^{2+} 反応が小さいにもかかわらず、 $[Ca^{2+}]$ 増加は精子付着部位に限局はせず、広範囲に広がっている。しかし「 Ca^{2+} 波」は明瞭には確認できなかった。これはおそらく未成熟卵における Ca^{2+} 遊離の性質が十分に自己再生的でないことによると考えられる。

Ca^{2+} 反応が小さいと、これに引続き起こる表層顆粒の放出が十分に起こらないことが想定され、このために透明帯レベルでの多精子受精抑制が不完全となっている可能性が考えられる(Iwamatsu and Chang, 1972)。もっとも $[Ca^{2+}]$ 増加は小さいものの、200nMを越えるピークをもち成熟卵より頻回に起こっているので、 Ca^{2+} に対する表層顆粒放出の感受性が低いことが一因となっている可能性もある。またマウス卵で単為発生に用いる反復性の Ca^{2+} パルスの大きさとパターンが、前核形成に影響を与えるという報告があるが(Vitullo and Ozil, 1992)、 $[Ca^{2+}]$ 増加が小さいことにより未成熟卵において前核が十分に形成されない可能性も考えられる(Usui and Yanagimachi, 1976)。

成熟卵と比較すると未成熟卵では、受精電位を形成する反復性HRsは、個々の反応においてはるかに小さくまた持続は短かった。HRsにおけるこれらの差異は、 $[Ca^{2+}]$ の実測値

の差異よりもより顕著であった。このことから未成熟卵では、 Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネルが少なくまたは感受性が低い可能性がある。 InsP_3 受容体と同様 Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネルも、卵成熟過程において発達あるいは修飾される可能性がある。従って未成熟卵あるいは成熟卵において、HRは Ca^{2+} 遊離の大きさや時間経過の良い指標とはならないと考えられる。

3. InsP_3 に対する感受性の発達

InsP_3 注入実験により、未成熟卵では InsP_3 に対する反応性が低いことが明らかとなった。ただし Ca^{2+} ストアは約80%は既に備わっていた。また成熟卵で特徴的な自己再生的IICRは未成熟卵では認められなかった。このことは受精時あるいは InsP_3 注入時に、 Ca^{2+} 波が明瞭に認められないこととも呼応している。これと極めてよく似た Ca^{2+} 反応が、 InsP_3 感受性を抑制するmAb 18A10を注入しておいた成熟卵で認められる (Miyazaki et al, 1992)。以上の実験事実から、未成熟卵においては、 InsP_3 に対する感受性が低いと考えられる。ただし、未成熟卵において InsP_3 receptorの数あるいは密度が成熟卵と比較して小さい可能性も否定はされない。この点に関しては今後の研究に待たねばならないが、Shiraishi et al (1995)によると、ハムスター卵の成熟過程において細胞内 Ca^{2+} プールと考えられるendoplasmic reticulumの分布が変化することが示されており、このことがIICRあるいは受精 Ca^{2+} 反応の卵成熟段階による差異の一因となっている可能性もある。

中等量の InsP_3 (電流パルス量: $5\text{nA} \times 1\text{sec}$) を注入してIICRを誘起する場合、卵成熟過程においてその反応性の発達は2相性であるのに対して、ほぼ最大レベルの Ca^{2+} 遊離を誘起する $20\text{nA} \times 2\text{sec}$ のパルスに対する反応性は、卵成熟過程を通じてほぼ一様に発達した。前者における発達の第1相は、GV期からprometaphase Iにいたる過程に対応している。哺乳動物卵においては、第1減数分裂での停止はcyclic AMPが重要な役割を果たしており、その卵細胞内における減少が第1減数分裂の再開を引き起こす (Schultz et al, 1983, Racowsky, 1986, Sato and Koide, 1987, Wassarman, 1988)。一方 Supattapone et al (1988) は、cyclic AMP依存性protein kinaseが脳の InsP_3 受容体をリン酸化することに

より、 InsP_3 による Ca^{2+} 遊離の感受性を低くすると報告した。従ってハムスター未成熟卵において InsP_3 に対する反応性が低く、これがGVBDの間に増強することは、cyclic AMPの作用による可能性がある。しかしながらdibutyryl cyclic AMPを成熟卵に投与してもIICRは抑制されなかった。卵成熟過程における Ca^{2+} 遊離に対する InsP_3 感受性の増強の分子レベルでのメカニズムの解明には、さらなる検討が必要と思われる。

自己再生的なIICRは第2相において発達を示した。この相においては、例えばryanodine受容体/チャネル (Takeshima et al, 1989) を介する Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 遊離のような、他の Ca^{2+} 遊離機構の発達が関与しているとも考えられる。しかし InsP_3 の注入により誘起される、gradedなパターンのIICRから自己再生的IICRへの連続的移行は、様々な量のmAb 18A10を用いてIICRを調節的に抑制することにより再現される (Miyazaki et al, 1992b)。従って自己再生的IICRの発達は、 InsP_3 に対する感受性の変化として最もよく説明しうる。さらに細胞質内 Ca^{2+} がIICRの感受性を上げることが知られている (Iino, 1990, Bezprozvanny et al, 1991, Finch et al, 1991)。ハムスター卵においては、自己再生的 Ca^{2+} 遊離が Ca^{2+} とIICRのpositive feedbackに起因する、すなわちIICRにより生じた Ca^{2+} がIICRの感受性を上げることが示されている (Miyazaki et al, 1992a, 1992b)。従ってこの Ca^{2+} 感受性のあるIICRの獲得が第2相で起こっていると考えられる。

IICRの発達度は、卵の細胞質レベルでの成熟をみる有用な指標であると考えられる。 InsP_3 の反応性の増強における2つの相は、それぞれin vivo成熟の第1および第2減数分裂におけるprophaseからmetaphaseにいたる核成熟段階に対応していると思われる。卵胞から取り出した卵もまた、in vitroにおいて2段階のIICRの発達を示す。しかしながらin vivo成熟と比べると若干時間的経過が速い。IICR機構を含む細胞質レベルでの発達は、ある程度は核レベルの成熟と並行して進み、受精段階でその完成をみることが示唆される。ヒトテ卵は哺乳動物卵に比べてかなり速い減数分裂を起こすが、 InsP_3 の感受性はmetaphase Iにいたる30分の間に発達する (Chiba et al, 1990)。そしてこのステージは正常な受精が起こるのに最も適した時期である (Hirai et al, 1981, Miyazaki and Hirai, 1979)。細胞質レベルでの成熟が核レベルでの成熟と同様の因子により制御されて

いるかを明らかにすることは興味ある課題である。そのメカニズムがどうであれ、IICR機構の発達が正常な受精能獲得のために必要不可欠な因子の1つであると考えられる。

引用文献

1. Berridge, M. J., Cobbold, P. H., and Cuthbertson, K. S. R., Spatial and temporal aspects of cell signaling. *Philos. Trans. R. Soc. B.*, 320, 325-343, 1988
2. Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B. E., Bell-shaped calcium-response curve of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351, 751-754, 1991
3. Biggers, J. D., Whitten, W. K., and Whittingham, D. G., The culture of embryos in vitro. *Methods in Mammalian Embryology* (J. C. Daniel, Ed.), pp. 86-116, Freeman, San Francisco, 1971
4. Carroll, J., and Swann, K., Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267, 11196-11201, 1992
5. Chiba, K., Kado, R. T., and Jaffe, L. A., Development of calcium release mechanism during starfish oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 146, 300-306, 1990
6. Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J., and Rangarajan, S., Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev. Biol.*, 130, 184-197, 1988a
7. Ducibella, T., Rangarajan, S., and Anderson, E., The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Dev. Biol.*, 130, 789-792, 1988b
8. Ducibella, T., Duffy, P., Reindollar, R., and Su, B., Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol. Reprod.*, 43, 870-876, 1990a

9. Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G. S., and Schultz, R. M., Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev. Biol.*, 137, 46-55, 1990b
10. Ebensperger, C., and Barros, C., Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res.*, 9, 387-397, 1984
11. Epel, D., Mechanism of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 12, 185-261, 1978
12. Finch, E. A., Turner, J. T., and Goldin, S. M., Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*, 252, 443-446, 1991
13. Fujiwara, T., Nakada, K., Shirakawa, H., and Miyazaki, S., Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 156, 69-79, 1993
14. Fulton, B. P., and Whittingham, D. G., Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 273, 149-151, 1978
15. Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K., Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P_{40} . *Nature*, 342, 32-38, 1989
16. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y., A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450, 1985
17. Hirai, S., Nagahama, Y., Kishimoto, T., and Khatani, H., Cytoplasmic maturity revealed by the structural changes in incorporated spermatozoon during the course of starfish oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.*, 23, 465-478, 1981

18. Iino, M., Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.*, 95, 1103-1122, 1990
19. Igusa, Y., and Miyazaki, S., Periodic increase in cytoplasmic calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J. Physiol. (London)*, 377, 193-205, 1986
20. Iwamatsu, T., and Chang, M.C., Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 31, 237-247, 1972
21. Iwamatsu, T., and Yanagimachi, R., Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, 45, 83-90, 1975
22. Jaffe, L.F., The role of calcium explosions, waves and pulses in activating eggs. *Biology of Fertilization* (C.B. Metz and A. Monroy, Eds), pp.127-165, Academic Press, New York, 1985
23. Jaffe, L.F., The path of calcium in cytosolic calcium oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9883-9887, 1991
24. Kline, D., and Kline, J.T., Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.*, 149, 80-89, 1992
25. Maeda, N., Niinobe, M., Nakahira, K., and Mikoshiba, K., Purification and characterization of P_{400} protein, a glycoprotein characteristic of Purkinje cell, from mouse cerebellum. *J. Neurochem*, 51, 1724-1730, 1988
26. Miyazaki, S., Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell Biol.*, 106, 345-353, 1988
27. Miyazaki, S., Cell signalling at fertilization of hamster eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 42 (Suppl.), 163-175, 1990

28. Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y., and Hiramoto, Y., Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev. Biol.*, 118, 259-267, 1986
29. Miyazaki, S., and Hirai, S., Fast polyspermy block and activation potential: Correlated changes during oocytes maturation of a starfish. *Dev. Biol.*, 70, 327-340, 1979
30. Miyazaki, S., and Igusa, Y., Fertilization potential of golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature*, 290, 702-704, 1981
31. Miyazaki, S., Katayama, Y., and Swann, K., Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca^{2+} rises in hamster eggs. *J. Physiol. (London)*, 426, 209-227, 1990
32. Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y., Yuzaki, M., Nakade, S., and Mikoshiba, K., Antibody to the inositol trisphosphate receptor blocks thimerosal-enhanced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} oscillations in hamster eggs. *FEBS Lett.*, 309, 180-184, 1992a
33. Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., and Mikoshiba, K., Block of Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257, 251-255, 1992b
34. Nakade, S., Maeda, N., and Mikoshiba, K., Involvement of the C-terminus of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Ca^{2+} release analysed using region-specific monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, 277, 125-131, 1991
35. Okada, A., Yanagimachi, R., and Yanagimachi, H., Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following ovulation. *J. Submicrosc. Cytol.*, 18, 233-247, 1986

36. Peroutka, S. J., 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: Molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci.*, 11, 496-500, 1988
37. Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R., and Tsien, R. Y., Calcium rises abruptly and briefly throughout the onset of anaphase. *Science*, 223, 886-889, 1986
38. Racowsky, C., The releasing action of calcium upon cyclic AMP-dependent meiotic arrest in hamster oocytes. *J. Exp. Zool.*, 239, 263-275, 1986
39. Sato, E., and Koide, S. S., Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocytes. *Int. Rev. Cytol.*, 106, 1-33, 1987
40. Shiraishi, K., Okada, A., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Mikoshiba, K., and Miyazaki, S., Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca^{2+} release during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.*, 170, 594-606, 1995
41. Schultz, R. M., Montgomery, R. R., and Belanoff, J. R., Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein phosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, 97, 294-304, 1983
42. Supattapone, S., Danoff, S. K., Theibert, A., Joseph, S. K., Steiner, J., and Snyder, S. H., Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8747-8750, 1988
43. Swann, K., A cytosolic factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110, 1295-1302, 1990
44. Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., and Numa, S., Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 339, 439-445, 1989

45. Usui, N., and Yanagimachi, R., Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development. J. Ultrastruct. Res., 57, 289-308, 1976
46. Vitullo, A. D., and Ozil, J. P., Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. Dev. Biol., 151, 128-136, 1992
47. Wassarman, P. M., The mammalian ovum. The Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 69-102, Raven Press, New York, 1988
48. Whitaker, M., and Patel, R., Calcium and cell cycle control. Development, 108, 525-542, 1990
49. Yanagimachi, R., Sperm-egg association in mammals. Curr. Top. Dev. Biol., 12, 83-105, 1978
50. Yanagimachi, R., Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction (E. Knobil and J. Neill, Eds.), pp. 135-185, Raven Press, New York, 1988

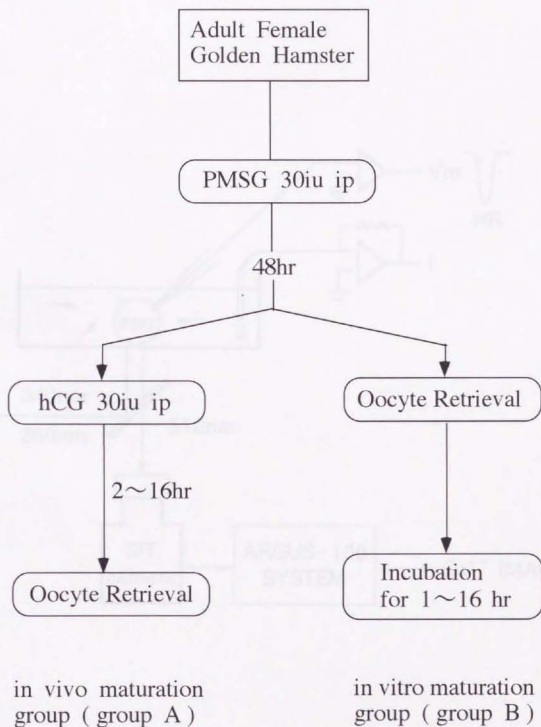


図1 実験材料

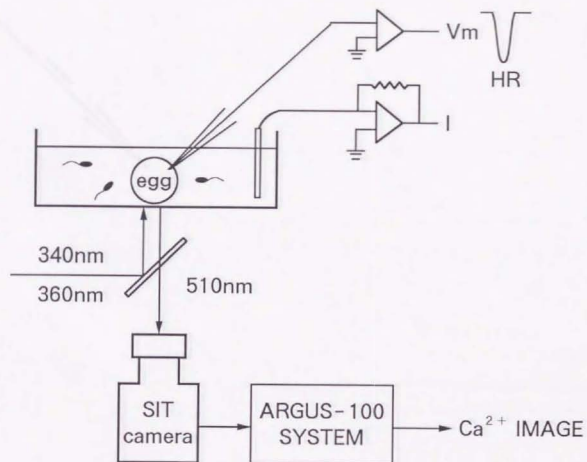


図2 受精時 Ca^{2+} 増加反応の記録方法

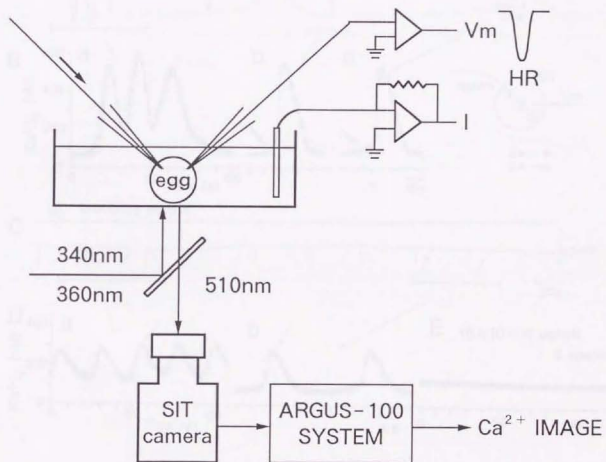


図3 11CRの記録方法

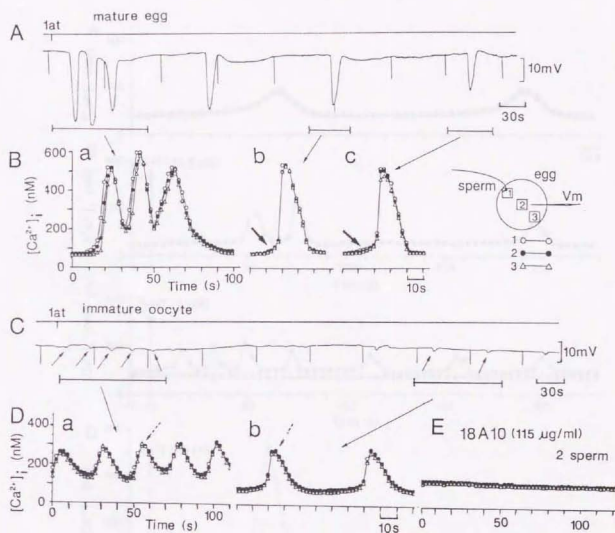


図4 受精時に認められる過分極反応 (A, C) と対応する卵細胞内 Ca^{2+} 増加反応 (B, D) 媒精開始より記録を行い、精子の卵への付着・静止に際して起こる変化を示す。
AおよびB: 成熟卵, CおよびD: 未成熟卵
[BおよびDでは、挿入図に示すように精子付着部位近傍, 卵中央, 精子付着部位の反対側の3ヶ所における $[Ca^{2+}]_i$ 濃度変化を表す]
E: 抗 $InsP_3$ 受容体mAb 18A10 (卵内濃度115 $\mu\text{g/ml}$) による未成熟卵の受精 Ca^{2+} 反応の完全抑制。

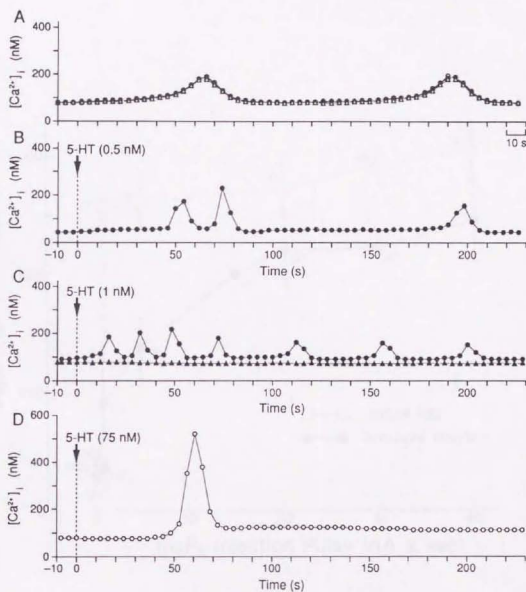


図5 A: BWW溶液中の未成熟卵に認められた自発性細胞内 Ca^{2+} 振動

B: 5-HT (0.5 nM) に対する未成熟卵の $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応.

C: 5-HT (1 nM) に対する未成熟卵の $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応.

▲は18A10 (卵内濃度150 μ g/ml) 添加による反応の抑制.

D: 5-HT (75 nM) に対する成熟卵の $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応.

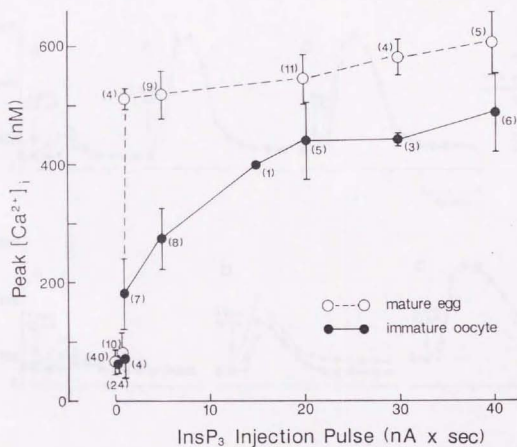


図6 $InsP_3$ の注入量 ($nA \times sec$)と反応のピーク $[Ca^{2+}]_i$ (mean \pm SD)との関係
() 内の数字は各々実験に用いた卵の数.

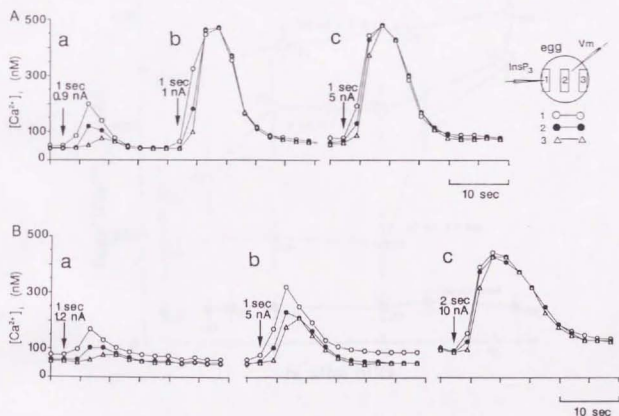


図7 $InsP_3$ 注入に対する $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応 (A: 成熟卵, B: 未成熟卵)

各々異なる3種類のパルスを用い、挿入図に示すように $InsP_3$ 注入部位近傍、卵中央、 $InsP_3$ 注入部位の反対側の3ヶ所における $[Ca^{2+}]_i$ を表示した。

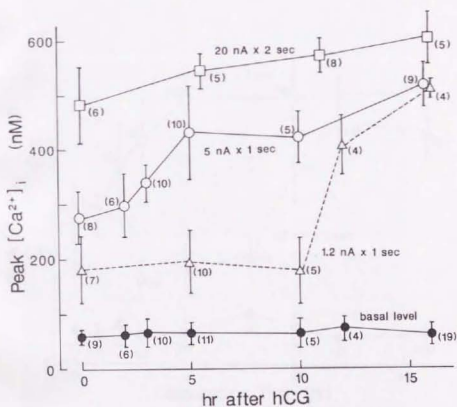


図8 A群における卵成熟過程に伴うIICRの発達

● 基礎値, △ 1.2nA×1sec, ○ 5nA×1sec, □ 20nA×2sec
() 内は用いた卵の数

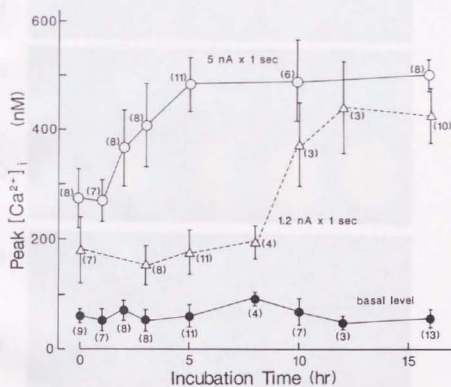


図9 B群における卵成熟過程に伴うICRの発達

● 基礎値, △ 1.2nA×1sec, ○ 5nA×1sec
() 内は用いた卵の数

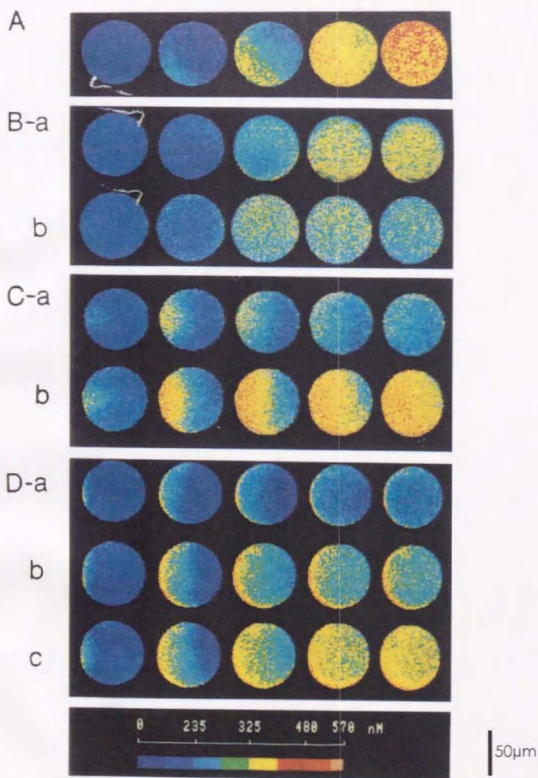


写真1 Ca^{2+} 増加反応増加相の疑似カラー表示

A: 成熟卵において媒精時に最初に認められた受精 Ca^{2+} 反応

B: 未成熟卵における受精 Ca^{2+} 反応. a, bは各々図4・Dの破線矢印の反応に相当.

C: 成熟卵における InsP_3 注入時の Ca^{2+} 増加反応. a- $0.9\text{nA} \times 1\text{sec}$, b- $1.2\text{nA} \times 1\text{sec}$

D: 未成熟卵における InsP_3 注入時の Ca^{2+} 増加反応. a- $1.2\text{nA} \times 1\text{sec}$, b- $5\text{nA} \times 1\text{sec}$,
c- $10\text{nA} \times 2\text{sec}$

各々の画像は, 2秒間隔毎に最初の0.5秒(A, B)または1秒(C, D)の F_{340}/F_{380} を積算したもの.

