

(26)

|          |   |         |         |         |
|----------|---|---------|---------|---------|
| 氏名(生年月日) | シラ<br>白   | イシ<br>石 | コウ<br>浩 | イチ<br>一 |
| 本籍       |   |         |         |         |
| 学位の種類    | 博士(医学)  |         |         |         |
| 学位授与の番号  | 乙第 1871 号   |         |         |         |
| 学位授与の日付  | 平成 10 年 7 月 17 日  |         |         |         |
| 学位授与の要件  | 学位規則第 4 条第 2 項該当(博士の学位論文提出者)  |         |         |         |
| 学位論文題目   | <b>Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca<sup>2+</sup> release during maturation of hamster oocytes</b><br>(ハムスター卵成熟過程における小胞体, IP <sub>3</sub> 受容体の分布変化と Ca <sup>2+</sup> 増加の空間的パターンの変化) |         |         |         |
| 論文審査委員   | (主査) 教授 宮崎 俊一   |         |         |         |
|          | (副査) 教授 村木 篁, 小林 慎雄   |         |         |         |

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

動物種に普遍的に受精時の卵子では, 細胞内 Ca<sup>2+</sup> の著明な増加が起こり, 卵活性化の引き金になる必須の現象となっている. Ca<sup>2+</sup> 増加は精子付着部位から発する Ca<sup>2+</sup> 波として卵全体へ伝播するシグナルであり, 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 貯蔵器官である小胞体から主に IP<sub>3</sub> 受容体を介する細胞質への Ca<sup>2+</sup> 遊離による. 本研究は, 哺乳類卵子が卵成熟により受精能を獲得する過程を解明するため, ハムスター卵の減数分裂過程における小胞体および IP<sub>3</sub> 受容体の分布変化を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM), 電子顕微鏡, 免疫組織化学を用いて観察し, Ca<sup>2+</sup> 画像解析装置で記録した Ca<sup>2+</sup> 増加の空間パターンと対応づけた.

#### 〔対象および方法〕

絨毛性生殖腺刺激ホルモン注射 0, 4, 5, 8, 12 時間後に未成熟卵および成熟中の卵を卵巣卵胞から, また排卵された成熟卵を 14 時間後に卵管膨大部から採取した. 小胞体の分布は, 大豆油に溶解させた脂溶性蛍光色素 DiIc<sub>18</sub> を卵内に注入し, 生の標本で CLSM の焦点面を数 μm ずつ連続切片的に観察した. 小胞体は電顕で確認した. IP<sub>3</sub> 受容体は組織切片を抗血清で染色して観察した. Ca<sup>2+</sup> 増加は Ca<sup>2+</sup> 結合性蛍光色素 calcium green を予め卵内に注入し, CLSM で観察した.

#### 〔結果〕

①卵内に注入された脂溶性蛍光色素が oil drop に接

する小器官膜に移行し拡散することにより, 細胞全体に及ぶ膜系のネットワークが示された. これが小胞体の分布を示すことが電顕で確認された. ②未成熟卵の小胞体は, 表層細胞質および核周囲に最大径数 μm にも及ぶ数個のパッチとして偏在し, 深層では低密度の細網を形成していた. IP<sub>3</sub> 受容体はこの分布に一致していた. ③未成熟卵は媒精時に明瞭な Ca<sup>2+</sup> 波を形成せず, またヒト血清による刺激に対し表層に局限した Ca<sup>2+</sup> 増加を示した. ④表層の小胞体のパッチは, 第一減数分裂前中期まで数および径が増加した. ⑤この後第一減数分裂中期から第二減数分裂に至る過程で, 小胞体のパッチは表層全域に小さく分散し, 深部の細網の密度が増加した. ⑥成熟卵(第二減数分裂中期)では小胞体は細胞全体に一樣なネットワークを構成し, 細胞膜直下およびネットにやや高密度の小さい集落が散在していた. IP<sub>3</sub> 受容体もこの分布に一致した. 受精時に典型的な Ca<sup>2+</sup> 波を形成した.

#### 〔考察〕

小胞体は細胞全体におよぶ連続的なネットワーク構造であることが示された. 卵成熟過程で小胞体はまず量的に増加してパッチ状に偏在し, 次いで一樣なネットワークに再分布するという, 二段階で発達すると考えられる. これとともに IP<sub>3</sub> 受容体も再分布し, 細胞内で一樣に Ca<sup>2+</sup> 遊離が可能になると考えられる.

## 〔結論〕

卵成熟過程において小胞体および IP<sub>3</sub> 受容体の分布が劇的に変化し、Ca<sup>2+</sup>波形成の基礎となる Ca<sup>2+</sup>遊離機

能の確立が、正常な受精能獲得の一つの要件であると結論される。

## 論文審査の要旨

動物種に普遍的に卵子細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が受精の引き金になる。Ca<sup>2+</sup>増加は主に IP<sub>3</sub>受容体を介する小胞体から細胞質への Ca<sup>2+</sup>遊離による。ハムスター卵の減数分裂（成熟）過程における小胞体と IP<sub>3</sub>受容体の分布変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。卵内に注入した脂溶性蛍光色素により染色された小胞体、抗体染色により同定された IP<sub>3</sub>受容体は、未成熟卵では表層細胞質および核周辺に数ミクロンのパッチ状に偏在しているが、卵成熟に伴い細胞質全体に小さく分散し、一様な網状のネットワークへと変化した。成熟卵では、受精時に精子結合部位から発する伝播性の Ca<sup>2+</sup>波が形成された。卵成熟過程で Ca<sup>2+</sup>波形成の基礎となる Ca<sup>2+</sup>遊離機構の確立が、正常な受精能獲得の一つの要件であると結論された。本論文は、最新の技術を駆使して細胞内小器官および Ca<sup>2+</sup>の精密な画像解析を行った学術上先駆的な価値ある論文である。

## 主論文公表誌

Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca<sup>2+</sup> release during maturation of hamster oocytes (ハムスター卵成熟過程における小胞体、IP<sub>3</sub>受容体の分布変化と Ca<sup>2+</sup>増加の空間的パターンの変化)

Developmental Biology Vol 170 594-606 頁  
(1995年8月発行)白石浩一, 岡田詔子, 白川英樹, 中西節子, 御子柴克彦, 宮崎俊一

## 副論文公表誌

- 1) Initiation, persistence, and cessation of the series of intracellular Ca<sup>2+</sup> responses during fertilization of bovine eggs (ウシ受精卵における Ca<sup>2+</sup>反応の開始, 持続および停止). J Reprod Dev 41(1): 77-84 (1995) 中田 健, 水野仁二, 白石浩一, 遠藤健治, 宮崎俊一
- 2) Developmental changes of testicular gonadotropin receptors and serum gonadotropin levels in

two strains of mice (2系統マウスの性成熟過程における精巣ゴナドトロピン受容体量と血中ゴナドトロピン濃度の関係). Zool Sci 10: 497-504 (1993) 白石浩一, Singtripop Tippawan, 朴 民根, 川島誠一郎

- 3) Prolactin binding sites in normal uterus and the uterus with adenomyosis in mice (マウス正常子宮および担腺筋症子宮におけるプロラクチン結合部位). Zool Sci 10: 353-360 (1993) Singtripop Tippawan, 守 隆夫, 朴 民根, 白石浩一, 針谷敏夫, 川島誠一郎
- 4) Age-related change in gonadotropin, prolactin, and growth hormone levels with reference to the development of uterine adenomyosis in female SHN mice (子宮腺筋症の発生と生殖腺刺激ホルモン, プロラクチンおよび成長ホルモン濃度の経時的变化との関係). In Vivo 7: 147-150 (1993) Singtripop Tippawan, 守 隆夫, 白石浩一, 朴 民根, 川島誠一郎