

ブタの卵丘・卵母細胞複合体におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性と卵母細胞の核成熟との関係

鈴木 亮¹・新村末雄^{2*}

(平成23年7月4日受付)

要 約

胞状卵胞から採取して培養したブタ卵丘・卵母細胞複合体 (COC) について、卵丘細胞と卵母細胞のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 活性および卵母細胞の核成熟の変化を観察し、G6PDH 活性と卵母細胞の核成熟との間にどのような関係があるのかを検討した。

COC の卵母細胞において、強度の G6PDH 活性を示すものの割合は、培養後0、8および22時間では75.0ないし89.3%と高かったが、それ以降低下し、培養後32および44時間ではそれぞれ36.2および18.3%となった。また、G6PDH 活性の低下に伴って卵母細胞の核成熟は進行し、培養後32および44時間では、核は第一成熟分裂中期から第二成熟分裂中期にあった。

G6PDH 活性の阻害剤である DHEA を含む培養液で22時間培養した COC において、卵母細胞の成熟分裂の再開はほとんど抑制されているとともに、卵丘細胞と卵母細胞の両者で G6PDH 活性も明らかに抑制されていた。また、DHEA とともにコレステロールあるいはプロゲステロンを含む培養液で22時間培養した COC の卵母細胞において、成熟分裂を再開したものの割合は、それぞれ70.0および60.0%であり、DHEA のみで処置した対照のもの18.3および20.4%に比べて有意に高かった。

以上の結果から、COC における G6PDH 活性と卵母細胞の核成熟との間には密接な関係があり、卵母細胞の核成熟には、卵丘細胞の G6PDH 活性によって産生される NADPH が産生を促すコレステロールとプロゲステロンが成熟誘起物質として役割を果たしていることが示唆された。

新大農研報, 64(1): 1-6, 2011

キーワード：ブタ卵母細胞、核成熟、G6PDH 活性、成熟誘起物質

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) は、ペントースリン酸経路の重要な位置を占める酵素で、この酵素作用によって産生される NADPH は、脂肪酸合成やコレステロールの還元的生合成に役割を果たすとともに、黄体などのステロイド合成組織ではステロイドホルモンの生合成を促進することも知られている (Savard ら, 1963)。

哺乳動物の卵母細胞における G6PDH 活性の検出は、これまでにマウス (Mangia と Epstein, 1975)、ウシ (Ferrandi ら, 1993) およびラット (Tsutsumi ら, 1992) で試みられている。それらによると、G6PDH 活性は、卵巣内で発育中の未成熟卵母細胞では高いが、発育および成熟に伴って低下するといわれている (Mangia と Epstein, 1975; Tsutsumi ら, 1992; Ferrandi ら, 1993)。また、G6PDH 活性は卵母細胞の成熟分裂再開に重要な役割を果たしていることが報告されている (Downs ら, 1998)。すなわち、マウス卵母細胞の G6PDH 活性を抑制すると、核の成熟分裂再開が抑制されるといわれている。従って、G6PDH 活性と卵母細胞の核成熟との間には関連性のあることが考えられる。しかし、G6PDH 活性と卵母細胞の核成熟との関係については不明な点が多いとともに、ブタ卵母細胞では成熟に伴って G6PDH 活性がどのように変化するのかも調べられていない。

本研究は、胞状卵胞から採取して培養したブタ卵丘・卵母細胞複合体 (COC) の卵母細胞について、G6PDH 活性を組織化学的に検出するとともに、核の成熟に伴って G6PDH 活性がどのように変化するのかを観察したものである。また、G6PDH 活性の阻害剤である DHEA (Schwartz と Pashko, 2004) で

処置した COC の卵母細胞について、核の成熟状態を観察し、G6PDH 活性と核の成熟との間に関連性があるのか否かを検討したものである。さらに、DHEA とともにコレステロールあるいはプロゲステロンを含む培養液で培養した COC について、卵母細胞の核の成熟を観察し、卵母細胞の成熟と G6PDH 活性との関係ならびにコレステロールとプロゲステロンがブタ卵母細胞の成熟誘起物質 (MIS) としての作用を有しているのかも検討したものである。

材料および方法

卵母細胞の採取と体外成熟

屠場で採取したブタの卵巣を、39℃に保温した0.9%生理食塩水に入れて30分以内に研究室に持ち帰り、0.9%生理食塩水500ml中にペニシリンGカリウム (明治製薬, 東京) を100,000単位含む液で洗浄した。次いで、COC を直径3ないし5mmの小型胞状卵胞から21Gの注射針を付けた10mlのシリンジで吸引採取した。採取したCOCは、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH7.4) (Dulbecco と Vogt, 1954) で数回洗浄した。これらのCOCを、ブタ卵胞液 (PF) 10% (v/v)、10単位/ml PMSG (セロトロピン, あすか製薬, 東京)、10単位/ml hCG (ゴナトロピン, あすか製薬, 東京)、0.57mM システインを含むNCSU37 (Petters と Wells, 1993) で数回洗浄し、表面をミネラルオイルで覆ったNCSU37で、39℃でCO₂5%、空気95%の気相下で培養した。なお、COCの培養には4-well dish (Nunc, Roskilde, Denmark) を用い、1-well に30ないし50個のCOCを入れるとともに、1wellあたりの培養液の量は400μlとした。

¹ 新潟大学大学院自然科学研究科

² 新潟大学農学部

*代表著者: niimura@agr.niigata-u.ac.jp

G6PDH 活性の検出と核の成熟状態の観察

成熟培養後0、8、22、32および44時間に、COCをヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical Co., MO, USA) 0.1%を含むPBSに浸漬し、ピペット操作により卵母細胞の周囲に付着している卵丘細胞を除去した。次いで、卵母細胞をG6PDH活性検出のための基質液に、37℃で90ないし120分間浸漬した。G6PDH活性検出のための基質液は、RudolphとKleinが使用した処方(1964)に準じて作成した。すなわち、基質液の組成は、0.4mg D-glucose-6-phosphate disodium salt (Sigma Chemical Co.)、0.5mg NADP (Sigma Chemical Co.)、0.4ml 0.1M Tris-HCl buffer (pH7.2)、0.2ml 0.1% Nitro-TB (同仁化学研究所、熊本)水溶液(w/v)および0.4ml蒸留水である。なお、基質(D-glucose-6-phosphate disodium salt)を含まない液に浸漬した卵母細胞を対照として用いた。

G6PDH活性の強さは、卵母細胞の細胞質に沈着したジホルマザン顆粒の量により、強度、弱度および陰性の3段階に分類した。

一方、G6PDH活性を検出した卵母細胞には、Hoechst33342 (Molecular Probes, OR, USA) 染色を施し、核の成熟状態を落射蛍光顕微鏡で観察した。

COCにおける卵母細胞の核の成熟とG6PDH活性に及ぼすDHEAの影響の観察

COCにおける卵母細胞の核成熟とG6PDH活性に及ぼすDHEAの影響を調べるために、胞状卵胞から採取したCOCを、DHEA(和光純薬、大阪)を100 μ M含む成熟用培養液で、39℃でCO₂5%、空気95%の気相下で22時間培養した。DHEAはあらかじめエタノールに溶解し、100 μ Mの濃度になるように培養液で希釈した。また、培養液中のエタノール濃度は0.1%になるように調整した。DHEAは油溶性であるため、成熟培養にはミネラルオイルを使用せず、1-wellあたりの培養液の量は650 μ lとした。なお対照として、DHEAを含まず、エタノールを0.1%含む培養液で22時間培養したCOCを使用した。

培養後、これらのCOCをヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical Co.) 0.1%を含むPBSに浸漬し、ピペット操作により卵母細胞周囲の卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵母細胞は、G6PDH活性検出のための基質液に、37℃で90ないし120分間浸漬した。基質液には、前述のものに10 μ MのDHEAを添加したものを使用した。対照として、DHEAを含まず、エタノールを0.1%含む基質液に浸漬した卵母細胞を使用した。卵母細胞はG6PDH活性の検出後、Hoechst33342で染色し、核の成熟状態を落射蛍光顕微鏡で観察した。

一方、DHEA処置したCOCにおける卵母細胞の生存性を確認するために、DHEAを含む培養液で22時間培養後、DHEAを含まない培養液でさらに22時間培養し、G6PDH活性の検出と核の成熟状態の観察を行った。これらの対照として、エタノールを0.1%含む培養液で22時間、次いで成熟用培養液のみで22時間培養したCOCの卵母細胞を使用した。

DHEA処置したCOCにおける卵母細胞のG6PDH活性の観察

DHEA処置したCOCにおける卵母細胞のG6PDH活性を観察するために、胞状卵胞から採取したCOCを、DHEA(和光純薬)を100 μ M含む成熟用培養液で、39℃でCO₂5%、空気95%の気相下で22時間培養した。なお対照として、DHEAを含まず、エタノールを0.1%含む培養液で22時間培養した

COCを使用した。

胞状卵胞から採取直後および22時間培養したCOCを、10 μ MのDHEAを含むG6PDH活性検出のための基質液に、37℃で90ないし120分間浸漬した。

DHEA処置したCOCにおける卵母細胞の核成熟に及ぼすコレステロールおよびプロゲステロンの影響の観察

COCにおける卵母細胞の核成熟に及ぼす各種ステロイドの影響を調べるために、胞状卵胞から採取したCOCを、DHEA(和光純薬)100 μ Mとともにコレステロール (Sigma Chemical Co.)あるいはプロゲステロン(ナカライテック)を100 μ M含む成熟用培養液で、39℃でCO₂5%、空気95%の気相下で22時間培養した。DHEAはあらかじめエタノールに溶解し、100 μ Mの濃度になるように培養液で希釈した。コレステロールおよびプロゲステロンは、あらかじめアセトンあるいはエタノールに溶解し、100 μ Mの濃度になるようにそれぞれ培養液で希釈した。対照として、DHEAを100 μ Mおよびアセトンあるいはエタノールを0.05%含む培養液で培養したCOCを使用した。

成熟培養後22時間に、ヒアルロニダーゼ処置して卵丘細胞を除去した卵母細胞を、Hoechst33342で染色し、核の成熟状態を落射蛍光顕微鏡で観察した。

統計処理

G6PDH活性に関する数値の統計処理には χ^2 検定法を用いた。

結果

核の成熟状態

表1に示したように、胞状卵胞から採取直後の卵母細胞において、90.6%のものは卵核胞期にあったが、残りの9.4%は移動期にあった。培養8時間後では、54.2%の卵母細胞が卵核胞期に、45.8%が移動期にあった。培養22時間後では、卵核胞期の卵母細胞はさらに減少し、12.8%になるとともに、87.2%の卵母細胞で卵核胞が崩壊しており、23.4%が移動期、59.6%が第一成熟分裂中期、2.1%が第一成熟分裂後期、2.1%が第二成熟分裂中期にそれぞれあった。培養後32および44時間では、91.5および90.0%の卵母細胞で成熟分裂が再開しており、第二成熟分裂中期のものがそれぞれ36.2および71.7%出現した。この結果から、卵母細胞の核成熟は培養時間の経過に伴って正常に進行していることが確認された。

G6PDH活性の変化

培養後0ないし44時間の卵母細胞をG6PDH活性検出のための基質液に浸漬すると、多くの卵母細胞の細胞質全域にジホルマザン顆粒の沈着がみられた(図1a, b)。一方、基質を含まない液に浸漬した対照の卵母細胞では(図1c)、ジホルマザン顆粒の沈着がみられなかったため、この顆粒がG6PDH活性を現していることが確かめられた。

表2に示したように、胞状卵胞から採取直後では、卵母細胞の81.3%が強度の活性を、18.7%が弱度の活性を示し、陰性のものはみられなかった。培養後8および22時間でも、強度、弱度および陰性の活性を示す卵母細胞の割合は採取直後の卵母細胞のものと相違なかったが、培養32時間以降、強度の活性を示す卵母細胞の割合は有意に低下するとともに、弱度の活性を示す卵母細胞の割合が有意に増加した。

Table 1. Nuclei of cultured porcine oocytes

Hours of culture	No. of oocytes examined	No. and (%) of oocytes					
		Germinal vesicle ¹⁾	Diakinesis ¹⁾	Metaphase I ¹⁾	Telophase I ¹⁾	Anaphase I ¹⁾	Metaphase II ¹⁾
0	64	58 (90.6)*	6 (9.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
8	48	26 (54.2)	22 (45.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
22	47	6 (12.8)	11 (23.4)	28 (59.6)	1 (2.1)	0 (0.0)	1 (2.1)
32	47	4 (8.5)	2 (4.3)	12 (25.5)	12 (25.5)	0 (0.0)	17 (36.2)
44	60	6 (10.0)	0 (0.0)	9 (15.0)	0 (0.0)	1 (1.7)	43 (71.7)

¹⁾ Stages of oocyte maturation.

*The number of oocytes with percentages in parentheses.

Table 2. Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cultured porcine oocytes

Hours of culture	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with each activity		
		Strong	Weak	Negative
0	64	52(81.3) ^a	12(18.7) ^b	0 (0.0) ^b
8	48	36(75.0) ^a	10(20.8) ^b	2 (4.2) ^{a,b}
22	47	42(89.3) ^a	4(8.5) ^b	1 (2.1) ^{a,b}
32	47	17(36.2) ^b	27(57.4) ^a	3 (6.4) ^{a,b}
44	60	11(18.3) ^b	43(71.7) ^a	6 (10.0) ^a

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

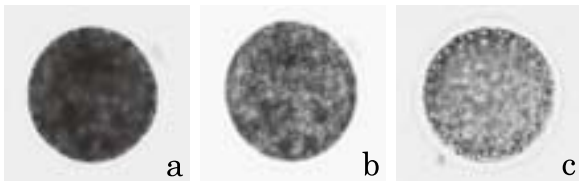


Fig.1 Porcine oocytes cultured for 44 hrs and stained by Rudolph & Klein method for the demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). $\times 150$.
 a. A strong activity of G6PDH. Diformazan granules showing the presence of G6PDH activity are abundantly deposited in the cytoplasm of oocyte.
 b. A weak activity of G6PDH. Diformazan granules showing the presence of G6PDH activity are slightly deposited in the cytoplasm of oocyte.
 c. No activity of G6PDH. Diformazan granules showing the presence of G6PDH activity are not deposited in the cytoplasm of oocyte when incubated in a substrate-free medium.

DHEA 処置した COC における卵母細胞の核の成熟状態と G6PDH 活性

DHEA で処置した COC における卵母細胞の核の成熟状態と G6PDH 活性について得られた成績は表 3 に示した通りである。すなわち、培養後 22 時間に成熟分裂を再開した卵母細胞の割合は、DHEA を含まない培養液で培養した対照のものでは 88.0% であったが、DHEA で処置したものでは有意に低く、20.0% であった。従って、DHEA の処置によって卵母細胞の核

の成熟分裂再開は有意に抑制されていることが確かめられた。

一方、培養後 22 時間に強度の G6PDH 活性を示す卵母細胞は、DHEA を含まない培養液で培養した対照のものでは 84.0% 出現したが、DHEA 処置したものではみられなかった。また、弱度の G6PDH 活性を示す卵母細胞の割合は、DHEA 処置したものと対照のものとの間で相違なかったが、陰性の卵母細胞の割合は、対照のものに比べて DHEA 処置したものでは有意に高く、77.8% であった。従って、DHEA 処置によって G6PDH の活性が有意に抑制されていることが確かめられた。

なお本研究において、DHEA を含む培養液で 22 時間、次いで DHEA を含まない培養液でさらに 22 時間培養した COC における卵母細胞の核の成熟状態と G6PDH 活性を調べたところ、核が第二成熟分裂中期に成熟した卵母細胞の割合は、DHEA 処置したものでは 65.5% であり、対照の卵母細胞の 69.2% と相違なかった。また、DHEA 処置したものと対照の卵母細胞の間で、強度、弱度および陰性の G6PDH 活性を示すものの割合に有意な差はみられなかった。従って、DHEA 処置した卵母細胞では生存性は維持されていることが確かめられた。

DHEA 処置した COC における卵丘細胞の G6PDH 活性

胞状卵胞から採取直後の COC および 22 時間培養した COC を、G6PDH 活性検出のための基質液に浸漬したところ、これらの COC の卵丘細胞にジホルマザン顆粒の沈着がみられた(図 2 a, b)。なお、このジホルマザン顆粒は、基質を含まない液に浸漬した COC の卵丘細胞には出現しなかった(図 2 c)、このジホルマザン顆粒が G6PDH 活性を現していることが確認された。なおジホルマザン顆粒は、採取直後の卵丘では放射冠細胞に多量沈着していたが(図 2 a)、培養後では卵丘細胞全体に沈着していた(図 2 b)。

胞状卵胞から採取直後では、82.6% (19/23) のCOCの卵丘でG6PDH活性がみられた。また培養後では、G6PDH活性を示す卵丘を有するCOCの割合は、対照のものでは84.0% (21/25)であったが、DHEA処置したものでは有意に低く、3.3% (1/30)であった (図2 d)。従って、DHEA処置によって卵丘細胞ではG6PDH活性が有意に抑制されていることが確かめられた。

DHEA処置した卵母細胞の核成熟に及ぼすコレステロールあるいはプロゲステロンの影響

DHEA処置したCOCにおける卵母細胞の核の成熟に及ぼすコレステロールおよびプロゲステロンの影響について得られた成績は表4に示した通りである。すなわち、培養後22時間に成熟分裂を再開した卵母細胞の割合は、コレステロールを含まない培養液で培養した対照のものでは18.3%であったが、コレステロールを含む培養液で培養したものでは有意に高く、70.0%であった。また、成熟分裂を再開した卵母細胞の割合は、プロゲステロンを含む培養液で培養したものでは60.0%であり、対照のもの20.4%と比べて有意に高かった。

考察

既述のように、G6PDH活性と卵母細胞の発育および成熟との間には関連性のあることが考えられるが、培養時間の経過に伴うブタ卵母細胞のG6PDH活性の変化ならびにG6PDH活性と卵母細胞の成熟との関係については明らかにされていない。

本研究において、培養したブタCOCにおける卵母細胞の成熟に伴うG6PDH活性の変化を観察し、卵母細胞のG6PDH活性と核の成熟との間の関係を検討した。その結果、強度のG6PDH活性を示す卵母細胞の割合は、培養後22時間までは高かったが、培養32時間で低下し、弱度の活性を示す卵母細胞の割合が増加した。また核は、培養32時間で第一成熟分裂中期から第二成熟分裂中期に移行する過程にあった。この

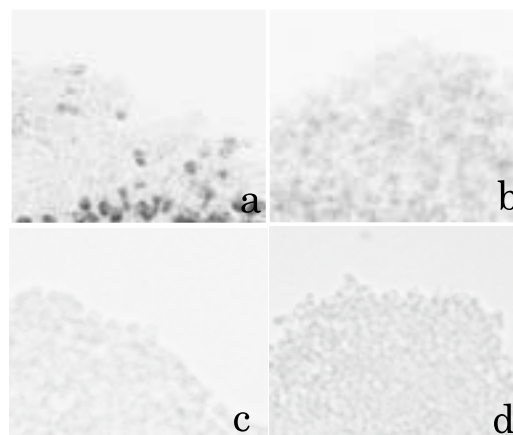


Fig.2 Porcine cumuli stained by Rudolph & Klein method for the demonstration of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). $\times 150$.
a. Cumulus cells immediately after collection from antral follicle. Diformazan granules are mainly deposited in the cytoplasm of corona radiata cells.
b. Cumulus cells cultured for 22 hrs in the medium without DHEA. Diformazan granules are deposited in the cytoplasm of all cells.
c. Control cumulus cells collected from antral follicle and incubated in a substrate-free medium. No diformazan granules are deposited in the cytoplasm of all cells.
d. Cumulus cells cultured for 22 hrs in the medium with DHEA. No diformazan granules are deposited in the cytoplasm of all cells.

Table 3. Nuclear maturation and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in porcine oocytes cultured with DHEA

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with each activity			No. and (%) of oocytes Germinal vesicle \leq Diakinesis	
		Strong	Weak	Negative		
DHEA	45	0 (0.0) ^b	10 (22.2) ^a	35 (77.8) ^a	36 (80.0) ^a	9 (20.0) ^b
Control	50	42 (84.0) ^a	6 (12.0) ^a	2 (4.0) ^b	6 (12.0) ^b	44 (88.0) ^a

Oocytes were observed after 22 hrs of culture in NCSU37 medium containing 100 μ M DHEA (DHEA) or in NCSU37 medium without DHEA (Control).

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of cholesterol and progesterone on nuclear maturation of porcine oocytes cultured with DHEA

Treatments	No. of oocytes examined	Germinal vesicle \leq Diakinesis	No. and (%) of oocytes				
			Diakinesis	Metaphase I	Telophase I \cdot Anaphase I	Metaphase II	
Cholesterol	40	12 (30.0) ^b	28 (70.0) ^a	19 (47.5)	9 (22.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
Control	49	40 (81.7) ^a	9 (18.3) ^b	8 (16.3)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Progesterone	45	18 (40.0) ^b	27 (60.0) ^a	19 (42.2)	6 (13.3)	0 (0.0)	2 (4.4)
Control	49	39 (79.6) ^a	10 (20.4) ^b	9 (18.4)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Oocytes were observed after 22 hrs of culture in NCSU37 medium containing 100 μ M DHEA and 100 μ M cholesterol (Cholesterol) or 100 μ M progesterone (Progesterone), or in NCSU37 medium with only 100 μ M DHEA (Control).

Values with different superscripts in the same column in each experimental lot are significantly different ($P < 0.05$).

ことから、ブタ COC の卵母細胞の G6PDH 活性と核の成熟との間には関係のあることが示唆された。

次いで、ブタ卵母細胞の G6PDH 活性と核の成熟との関係を確認するために、G6PDH 活性の阻害剤である DHEA で処置した COC における卵母細胞について、核の成熟状態を観察した。その結果、DHEA 処置した COC の卵母細胞では、G6PDH 活性は明らかに抑制されているとともに、成熟分裂の再開もほとんどで抑制されていることが確かめられた。G6PDH 活性によって産生される NADPH は、酸化ストレスから卵母細胞および初期胚を保護する役割を有していることが知られているので (Funahashi ら, 2008)、DHEA 処置した COC の卵母細胞では、G6PDH 活性が抑制されていたために NADPH の産生が減少し、卵母細胞が培養中に酸化ストレスに暴露されたために、結果として成熟分裂の再開が抑制されたことも考えられた。なお、DHEA で処置した後、DHEA を含まない培養液で培養した卵母細胞では、核は正常に成熟するとともに、G6PDH 活性も維持されていたので、本研究で観察に用いた卵母細胞は DHEA 処置によって生存性が損なわれていないとともに、DHEA の作用は可逆的であることが確かめられた。

また本研究において、DHEA 処置した COC における卵丘細胞の G6PDH 活性も調べた。その結果、DHEA 処置した COC における卵丘細胞では G6PDH 活性が抑制されていることが確かめられた。上述の DHEA 処置した COC における卵母細胞の G6PDH 活性と核成熟に関する結果、および DHEA 処置した COC における卵丘細胞の G6PDH 活性の結果から考えると、卵母細胞の核の成熟には、卵母細胞の周囲に付着している卵丘細胞の G6PDH 活性が関係していることが示唆された。すなわち、本研究の DHEA 処置した COC の卵丘細胞では、G6PDH 活性が抑制されたために NADPH の産生も抑制されていることが考えられる。黄体などのステロイドを生合成している組織において、G6PDH 活性によって産生される NADPH はプロゲステロンの生合成を促進することが知られているので (Savard ら, 1963)、DHEA 処置した COC の卵丘細胞では、NADPH の産生が抑制されたために、卵母細胞の MIS としての作用を有するステロイドホルモンの生合成も抑制されていることが推察される。従って、DHEA 処置した COC では、卵丘細胞から卵母細胞に MIS が持ち込まれず、結果として卵母細胞の核成熟の再開が抑制されたものと考えられた。

そこで最後に、COC を DHEA とともにブタ卵母細胞の MIS であることが示唆されているコレステロールあるいはプロゲステロン (Niimura ら, 2004) とともに培養し、卵母細胞の核の成熟状態を観察した。その結果、コレステロールおよびプロゲステロンで処置した COC の卵母細胞では、DHEA のみで処置した対照のものに比べ、成熟分裂を再開したものの割合が有意に高くなることが確かめられた。従って、本研究の結果から考えると、コレステロールおよびプロゲステロンはブタ卵母細胞の MIS としての作用を有していることが強く考えられた。

本研究の結果から、卵母細胞の核成熟には、卵丘細胞の G6PDH 活性によって産生される NADPH が産生を促すステロイドが密接に関係しており、コレステロールとプロゲステロンはブタ卵母細胞の MIS としての作用を有していることが推察された。

引用文献

- Downs, S. M., P. G. Humpherson and H. J. Leese. 1998. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol. Reprod.*, **58**:1084-1094.
- Dulbecco, R. and M. Vogt. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**:167-182.
- Ferrandi, B., F. Cremonesti, R. Geiger, A. L. Consiglio, A. Carnevali and F. Porcelli. 1993. Quantitative cytochemical study of some enzymatic activities in preovulatory bovine oocytes after in vitro maturation. *Acta Histochem.*, **95**:89-96.
- Funahashi, H., T. Koike and R. Sakai. 2008. Effect of glucose and pyruvate on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes in a chemically defined medium. *Theriogenology*, **70**:1041-1047.
- Mangia, F. and C. J. Epstein. 1975. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev. Biol.*, **45**:211-220.
- Niimura, S., Y. Yoshihisa and H. Takano. 2004. Effects of steroids on maturation of denuded porcine oocytes. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, **57**:95-102.
- Petters, R. M. and K. D. Wells. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **48**:61-73.
- Rudolph, G. and H. J. Klein. 1964. Histochemical demonstration and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal rat organs. *Histochemie*, **4**:238-251.
- Savard, K., J. M. Marsh and D. S. Howell. 1963. Progesterone biosynthesis in luteal tissue: role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and NADP-linked dehydrogenase. *Endocrinology*, **73**:554-563.
- Schwartz, A. G. and L. L. Pashko. 2004. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Age. Res. Rev.*, **3**:171-187.
- Tsutsumi, O., K. Sato, Y. Taketani and T. Kato. 1992. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, **33**:333-337.

Relationship between the Activities of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Porcine Cumulus-oocyte Complexes and Nuclear Maturation in Oocytes

Ryo SUZUKI¹ and Sueo NIIMURA^{2*}

(Received July 4, 2011)

Summary

Using cultured porcine cumulus-oocyte complexes (COCs), the changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activities in those and meiotic maturation in oocytes were observed, in order to examine the relationship between G6PDH activity in COCs and nuclear maturation in oocytes.

The strong G6PDH activities were observed in 75.0 to 89.3 % of oocytes in COCs cultured for 0, 8 and 22 hrs. The percentages of oocytes showing the strong activity of G6PDH significantly decreased and reached 36.2 and 18.3 % after 32 and 44 hrs of culture, respectively. The changes in G6PDH activity occurred with progression of nuclear maturation in oocytes. The nuclei of oocytes in COCs cultured for 32 and 44 hrs were at the stages of Metaphase I to Metaphase II.

When COCs were cultured for 22 hrs in the medium containing DHEA, an inhibitor of G6PDH activity, resumption of maturation division in oocytes was inhibited and G6PDH activities in both cumulus cells and oocytes were also suppressed. On the other hand, when COCs were cultured for 22 hrs in the medium containing DHEA and cholesterol or progesterone, the percentages of oocytes with nuclei resumed meiotic division were 70.0 and 60.0 %, which were significantly higher than 18.3 and 20.4 % of those cultured with only DHEA.

From the present findings, it was suggested that G6PDH activity in COCs is closely related to nuclear maturation of porcine oocytes. It was also suggested that cholesterol and progesterone, which are synthesized in cumulus cells by NADPH produced as a result of G6PDH activity, play roles as maturation inducing substances in porcine oocytes.

Bull. Facul. Agric. Niigata Univ., 64(1): 1 - 6, 2011

Key words : porcine oocyte, meiotic maturation, G6PDH activity, maturation inducing substance

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University

² Faculty of Agriculture, Niigata University

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