

# 3-イソブチル-1-メチルキサンチン処置したマウス卵母細胞の成熟と20 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性

新村末雄<sup>1\*</sup>・斎藤千智<sup>1</sup>

(平成15年3月20日受付)

**要約** cAMPの分解酵素であるホスホジエステラーゼの活性を阻害する作用を有する3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) で処置したマウス卵母細胞について、核の成熟状態を観察するとともに、20 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (20 $\alpha$ -HSD) の活性を調べ、卵母細胞の核の成熟と細胞質での20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との関係の有無を検討した。

成熟分裂を再開した卵母細胞の割合は、50 $\mu$ Mの濃度のIBMXで処置したものは3.0%であり、IBMX処置していない対照の卵母細胞の100%に比べ、有意に低かった。

一方、20 $\alpha$ -HSD活性は、IBMX処置した卵母細胞と対照の無処置卵母細胞のすべてに認められ、両者の間で活性に相違はみられなかった。

以上の結果から、マウス卵母細胞の核の成熟と細胞質での20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との間には関係のないことが確認された。

**キーワード** : マウス卵母細胞, 成熟分裂, 20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝, 3-イソブチル-1-メチルキサンチン, 組織化学

## 緒 言

哺乳動物において、卵母細胞の成熟にはステロイドが関与していることが知られている。すなわち、ウシ<sup>1)</sup>とヒト<sup>2)</sup>ではエストラジオール-17 $\beta$ とプロゲステロンが、ヒツジ<sup>3)</sup>ではエストラジオール-17 $\beta$ が、アカゲザル<sup>4)</sup>ではプロゲステロンが、それぞれ卵母細胞の成熟を誘起する物質であることが調べられている。

一方、卵母細胞の核の成熟に伴って、細胞質でのステロイド代謝に変化のみられることが報告されている。すなわち、PMSGとhCGを注射したラットから採取した卵母細胞において、プロゲステロン合成に関与している $\Delta^5$ -3 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 ( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD) の活性は、排卵に向けて有意に上昇し、排卵直後にピークに達することが生化学的に確かめられている<sup>5)</sup>。また、培養したブタ卵母細胞において、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD (基質としてDHA使用)、17 $\beta$ -HSD (テストステロン) および20 $\beta$ -HSD (20 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロン) の活性は、培養時間の経過に伴う変化を示さなかったが、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD (プレグネロン、17 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネロン)、17 $\beta$ -HSD (エストラジオール-17 $\beta$ )、20 $\alpha$ -HSD (20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン) および20 $\beta$ -HSD (17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン) の活性は、培養時間の経過に伴って低下し、培養後44時間ではほとんどの卵母細胞でみられなくなることが組織化学的に確かめられている<sup>6)</sup>。また、培養時間の経過に伴って低下したHSDの活性は、卵母細胞をオロモウシンで処置して核の成熟分裂再開を抑制すると、変化しなかったことから、ブタ卵母細胞では核の成熟と細胞質でのプロゲステロン、17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、17 $\alpha$ 、20 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロン、20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンおよびエストロゲンの代謝とは密接な関係のあることが示唆されている<sup>6)</sup>。さらに、マウス卵母細胞では、 $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD (DHA、プレグネロン、17 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネロン)、17 $\beta$ -HSD (エストラジオール-17 $\beta$ 、テストステロン)、20 $\beta$ -HSD (17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、20 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロン) の活性は、成熟に伴う変化を示さなかったが、20 $\alpha$ -HSD (20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン) の活性は、成熟に伴って出現するとともに、高くなることが調べられている<sup>7)</sup>。なお、マウス卵母細胞の20 $\alpha$ -HSD活性は、オロモウシンで処置して核の成熟分裂を抑制しても、対照のオロモウシン処置していない卵母細胞のものと同様に認められることから、マウス卵母細胞では核の成熟と細胞質での20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との間には関係のないことが推察されている<sup>7)</sup>。

<sup>1</sup>新潟大学農学部

\*代表著者: niumura@agr.niigata-u.ac.jp

上述のように、卵母細胞の核成熟と細胞質成熟との関係を調べるためにオロモウシンが使用されている。オロモウシンは、卵母細胞の成熟促進因子(MPF:Maturation-promoting factor)のサイクリン依存キナーゼであるp34<sup>cdc2</sup>/cyclinB kinaseの活性を抑制して核の成熟分裂再開を阻害する作用を有するサイトカイニンの類縁物質であることが知られている<sup>8,9)</sup>。一方、3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX)は、cAMPを5'-AMPに分解する酵素であるホスホジエステラーゼの活性を阻害する物質で、卵母細胞内のcAMPレベルを高く保つことで卵核胞の崩壊を抑制すると考えられている<sup>10,12)</sup>。既述のように、マウス卵母細胞の核の成熟と細胞質での20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との関係を確認するために、核の成熟分裂を阻害する物質としてオロモウシンが使用されているが<sup>7)</sup>、IBMXを用いて核の成熟分裂再開を抑制した場合の20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝は調べられていない。

本研究は、核の成熟と細胞質での20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との関係をより明確にするために、成熟分裂の再開を阻害する作用を有することが知られているIBMX<sup>10,12)</sup>で処置したマウス卵母細胞について、核の成熟状態と細胞質における20 $\alpha$ -HSD活性を観察し、無処置卵母細胞のそれらと比較したものである。

## 材料および方法

### 1. 動物

供試動物として、PMSG(セトロピン、帝国臓器)5単位を腹腔内注射したICR系の成熟雌マウスを用いた。マウスの飼育は24°Cに調節した室内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。

### 2. 卵母細胞の核の成熟に及ぼすIBMXの影響

核の成熟に及ぼすIBMXの影響を調べるために、PMSG注射後48時間に胞状卵胞から採取した卵母細胞を、5、10、50あるいは100 $\mu$ MのIBMX(Sigma Chemical Co., USA)を含むTYH液<sup>13)</sup>で、37°CでCO<sub>2</sub>5%、空気95%の気相下で8時間培養した。なお、IBMXを含まないTYH液で8時間培養した卵母細胞を対照として用いた。IBMXは、100mMの濃度になるようにDMSO(和光純薬株式会社)で溶解し、培養液でさらに希釈して上述の濃度に調整した。なお、培養液中のDMSOの濃度は0.1%とした。

核の成熟状態を観察するために、各種濃度のIBMXで処置した卵母細胞および対照の無処置卵母細胞を、酢酸・エタノール(1:3)に、4°Cで24時間固定した。固定後、卵母細胞を1.0%アセトラクモイド液で染色し、光学顕微鏡下で観察した。なお、卵母細胞の固定および染色の操作は、スライドガラス上でカバーガラスをかぶせた状態で行った。

### 3. IBMX 処置した卵母細胞の生存性

50 $\mu$ Mの濃度のIBMXを含む培養液で培養した卵母細胞の生存性を確認するために、IBMX処置した卵母細胞を、IBMXを添加していないTYH液に移し、37°CでCO<sub>2</sub>5%、空気95%の気相下で培養した。培養後7および14時間後に、これらの卵母細胞を上述の方法に従って処置し、核の状態を光学顕微鏡下で観察した。

### 4. 20 $\alpha$ -HSD 活性の検出

IBMX処置した卵母細胞および対照の無処置卵母細胞における20 $\alpha$ -HSD活性を観察するために、これらの卵母細胞をNIIMURAとISHIDAが使用した処方<sup>14)</sup>に準じて作成した基質液に、37°Cで20分間浸漬した。基質液の組成は、20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン(Sigma Chemical Co.)1.8mg、NADP(Sigma Chemical Co.)4.0mg、ニトロブルーテトラゾリウム(Sigma Chemical Co.)2.0mgおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)10mlである。なお、基質を含まない液に浸漬した卵母細胞を陰性対照として用いた。

また、20 $\alpha$ -HSDの組織化学的反応は、NADPH<sub>2</sub>脱水素酵素(NADPH<sub>2</sub>-DH)に依存している<sup>15)</sup>、この酵素の検出をBARKAとANDERSONの方法<sup>16)</sup>に従って行った。

### 5. 統計処理

得られた数値の統計処理には $\chi^2$ 検定法を用いた。

## 結 果

### 1. 核の成熟

IBMX処置したマウス卵母細胞の核の状態について得られた成績は表1に示した通りである。すなわち、

Table 1. Nuclear maturation of mouse oocytes cultured with IBMX

Concentrations of IBMX ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	No. and (%) of oocytes at the stage of					
		Germinal vesicle	Diakinesis	Metaphase I	Anaphase I	Telophase I	Metaphase II
0	53	0(0)	0(0)	36(68)	5(9)	12(23)	0(0)
5	56	1(2)	0(0)	42(75)	6(11)	7(13)	0(0)
10	54	6(11)	0(0)	47(87)	0(0)	1(2)	0(0)
50	33	32(97)	1(3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
100	39	38(97)	0(0)	1(3)	0(0)	0(0)	0(0)

The oocytes were observed after 8 hrs of culture.

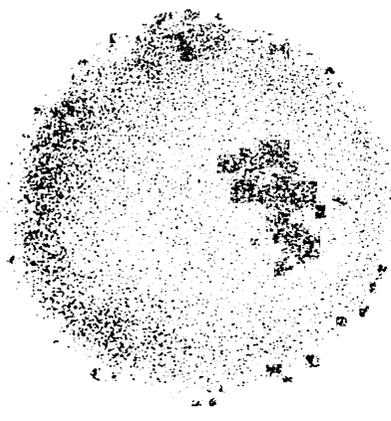


Fig. 1. A mouse oocyte cultured for 8 hrs without IBMX and stained with aceto-lacmoid. The nucleus shows the metaphase I stage.

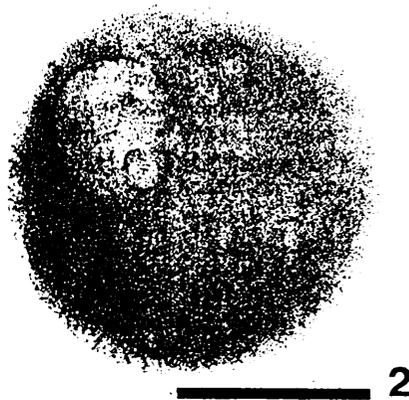


Fig. 2. A mouse oocyte cultured for 8 hrs with IBMX and stained with aceto-lacmoid. The nucleus shows the germinal vesicle stage. Scale indicates 50  $\mu$ m.

IBMX を含まない培養液で培養した対照の卵母細胞では、卵核胞期のものはみられず、すべてが成熟分裂を再開していた。なお、多くの卵母細胞で、核は第一成熟分裂中期に達していた (68%, 図1)。一方、IBMX 処置したマウス卵母細胞では、成熟分裂を再開しているものの割合は、5 $\mu$ M の濃度では対照の無処置卵母細胞のものと相違なかったが、10、50および100 $\mu$ M の濃度では対照の卵母細胞のものに比べ、いずれも有意に低かった。なお、IBMX 処置した卵母細胞において、成熟分裂を再開したものの割合は、10 $\mu$ M の濃度では89%であったが、50および100 $\mu$ M の濃度では有意に低く、いずれも3%であり、残りはすべて卵核胞期(図2)にあった。このことから、ほとんどの卵母細胞の成熟分裂の再開を抑制する IBMX の最低の濃度は、50 $\mu$ M であることが確かめられた。

## 2. 卵母細胞の生存性

50 $\mu$ M の濃度の IBMX で処置したマウス卵母細胞を、IBMX を含まない培養液で培養したところ、培養7時間後では54%の卵母細胞で、14時間後では94%の卵母細胞で、核はそれぞれ第二成熟分裂中期に達していた。従って、IBMX 処置した卵母細胞の生存性は損なわれていないことが確認された。

## 3. 20 $\alpha$ -HSD 活性

20 $\alpha$ -HSD 活性検出のために、50 $\mu$ M の濃度の IBMX で処置した卵母細胞および対照の無処置卵母細胞を、NIMURA と ISHIDA の方法<sup>10</sup>に従って作成した基質液に浸漬すると、細胞質に青色のジホルマザン顆粒の沈着が

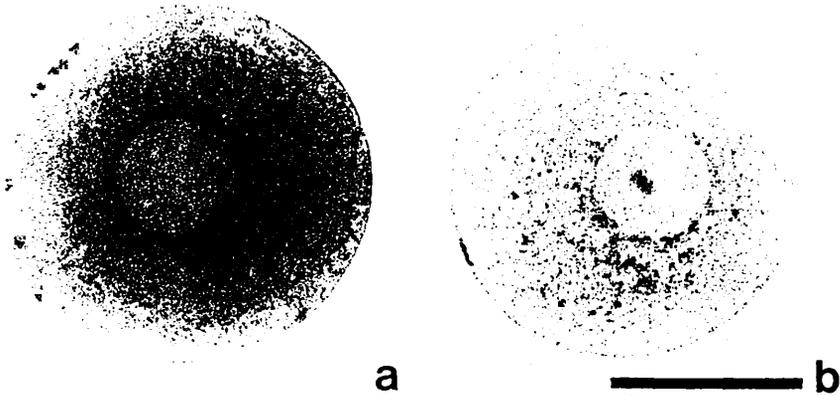


Fig. 3. Mouse oocytes cultured for 8 hrs with IBMX and treated by the method of NIIMURA and ISHIDA. Scale indicates 50  $\mu$ m. Diformazan granules showing the presence of the activity of 20 $\alpha$ -HSD are deposited in the cytoplasm of an oocyte (a), but not in the cytoplasm of a negative control oocyte, which was incubated in a substrate-free solution (b).

Table 2. 20 $\alpha$ -HSD activity in mouse oocytes cultured with IBMX

Concentrations of IBMX ( $\mu$ M)	No. of oocytes examined	20 $\alpha$ -HSD	
		20 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone <sup>1)</sup>	
		+	-
0	30	30(100) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>
50	38	38(100) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>

The oocytes were observed after 8 hrs of culture.

<sup>1)</sup> Substrate for enzyme-histochemistry.

<sup>2)</sup> + Positive, - negative.

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

みられた(図3a)。この顆粒は、基質を含まない液に浸漬した卵母細胞には出現しなかった(図3b)。ジホルマザン顆粒が20 $\alpha$ -HSD活性を示していることが確かめられた。IBMX処置したマウス卵母細胞の20 $\alpha$ -HSD活性について得られた成績は表2に示した通りである。すなわち、20 $\alpha$ -HSD活性は、IBMX処置した卵母細胞とIBMX処置していない対照の卵母細胞のすべてに認められ、両者間で活性に相違はみられなかった。

#### 4. NADPH<sub>2</sub>-DH 活性

BARKAとANDERSONの方法<sup>16)</sup>に従って作成した基質液にマウス卵母細胞を浸漬すると、すべての卵母細胞にNADPH<sub>2</sub>-DHの活性を示すジホルマザン顆粒の沈着が認められた(図4a)。なお、基質を含まない液に浸漬した卵母細胞にはジホルマザン顆粒の沈着は認められなかった(図4b)。

## 考 察

既述のように、マウス卵母細胞では、成熟に伴ってプロゲステロン、17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、17 $\alpha$ 、20 $\beta$ -ジヒドロキシプロゲステロン、20 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロン、エストロゲンおよびアンドロゲンの代謝は変化しないが、20 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝は出現して高まることが確かめられている<sup>7)</sup>。なお、成熟に伴って変化した20 $\alpha$ -HSD活性は、オロモウシン処置して核の成熟分裂再開を抑制した卵母細胞においても、対照のオロモウシン処置していない卵母細胞のものと同様に認められたことから、マウス卵母細胞の核

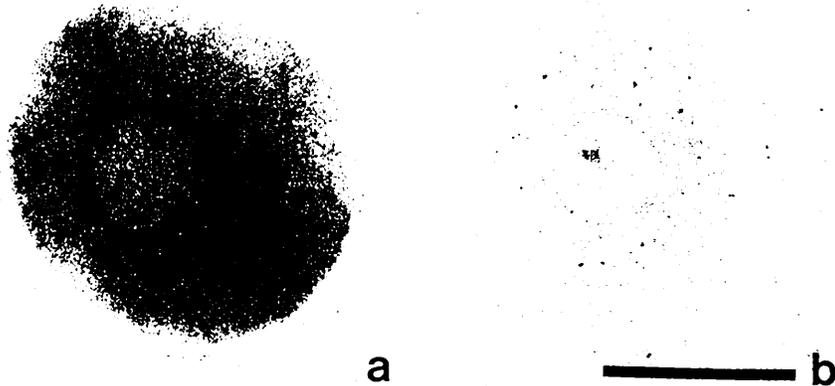


Fig. 4. Mouse oocytes cultured for 8 hrs with IBMX and treated by the method of BARKA and ANDERSON. Scale indicates 50  $\mu$ m.

Diformazan granules showing the presence of the activity of NADPH<sub>2</sub>-DH are deposited in the cytoplasm of an oocyte (a), but not in the cytoplasm of a negative control oocyte, which was incubated in a substrate-free solution (b).

の成熟と細胞質での $20\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との間には関係のないことが推察されている<sup>7)</sup>。一方、ブタ卵母細胞では、成熟に伴って $20\beta$ -ヒドロキシプロゲステロンとアンドロゲンの代謝は変化しないが、プロゲステロン、 $17\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、 $17\alpha$ 、 $20\beta$ -ジヒドロキシプロゲステロン、 $20\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンおよびエストロゲンの代謝は低下することが考えられている<sup>6)</sup>。なお、ブタ卵母細胞では、成熟に伴って低下した各種ステロイドの代謝は、オロモウシン処置して核の成熟分裂再開を抑制すると、変化しなかったため、ブタ卵母細胞の核の成熟とプロゲステロンのいくつかおよびエストロゲンの代謝との間には密接な関係のあることが示唆されている<sup>6)</sup>。このように、卵母細胞の成熟に伴うステロイド代謝は、動物種によって異なるとともに、核の成熟とステロイド代謝との間に関係のある動物種と関係のない動物種のあることが明らかにされている。

MPFは、細胞周期調節因子として、1971年にMASUIとMARKERT<sup>17)</sup>によって発見されたもので、MPFの卵母細胞の成熟分裂再開に及ぼす作用は動物種に限定されない普遍的なものであるとともに、MPFはあらゆる真核細胞生物におけるM期促進因子であると考えられている<sup>18)</sup>。また、MPFは、触媒サブユニットであるサイクリン依存性キナーゼI (cdkIあるいはp34<sup>cdc2</sup>)と調節サブユニットであるサイクリンBからなるタンパク質複合体であることが知られている<sup>19,20)</sup>。卵核胞期の卵母細胞において、MPFは、プロテインキナーゼA (PKA)のはたらきによりリン酸化が抑制されているとともに、アデノシン-リン酸活性化型プロテインキナーゼ (AMPK)が活性を持たない状態で保たれているため、不活性化型として存在している<sup>21)</sup>。LHの分泌刺激によって、卵母細胞内ではcAMP濃度が低下し、PKAの不活化とAMPKの活性化が起こり、結果として、MPFは、PKAの作用から解除されるとともに、AMPKの作用によってリン酸化されて活性化する。この活性化したMPFが、卵母細胞の核に作用して卵核胞崩壊を引き起こすと同時に、第二成熟分裂中期まで核分裂を進行させるといわれている<sup>21)</sup>。IBMXは、細胞質でのPKAの不活化とAMPKの活性化に必要なcAMPレベルの低下を引き起こすホスホジエステラーゼの活性を抑制することによって、卵核胞の崩壊を阻止する作用を有するものであることが知られている<sup>10,12,22)</sup>。一方、サイトカイニンの類縁体であるオロモウシンは、MPFのサイクリン依存キナーゼであるp34<sup>cdc2</sup>/cyclinB kinaseの活性を抑制することによって、卵核胞の崩壊を阻止することが知られている<sup>8,9)</sup>。このように、IBMXとオロモウシンの卵核胞崩壊を阻止する作用は異なっている。

マウス卵母細胞を用いた本研究において、核の成熟と細胞質でのステロイド代謝との関係を確認するために、従来用いられているオロモウシンとは異なった作用機序で成熟分裂の再開を抑制するIBMXで処置した場

合に、成熟に伴って変化することが報告されている $20\alpha$ -HSDの活性がどのように変化するかを調べ、核の成熟と細胞質での $20\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝との関係の有無を検討した。その結果、 $20\alpha$ -HSD活性は、IBMXで処置して成熟分裂再開を抑制した卵母細胞と成熟分裂を再開している対照の卵母細胞のすべてで認められた。従って、オロモウシンを用いたNIIMURAとKAWAKAMIの結果<sup>7)</sup>およびIBMXを用いた本研究の結果は一致していたので、マウス卵母細胞では、核の成熟と細胞質での $20\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン代謝とは関係のないことが確認された。

## 引用文献

1. VON WESTERGAARD, L., H. CALLENSSEN, P. HYTTEL, T. GREVE and A. G. BYSKOV. 1985. Meiosis inducing substance (MIS) in bovine preovulatory follicles. *Zuchthyg*, **20**:217-221.
2. REINTHALLER, A., J. DEUTINGER, P. RISS, E. MULLER-TYL, F. FISCHL, C. BIEGLMAYER and H. JANISCH. 1987. Relationship between the steroid and prolactin concentration in follicular fluid and the maturation and fertilization of human oocytes. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*, **4**:228-231.
3. MOOR, R. M. and A. O. TROUNSON. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.*, **49**:101-109.
4. GOULD, K. G. and C. E. GRAHAM. 1976. Maturation in vitro of oocytes recovered from prepubertal rhesus monkeys. *J. Reprod. Fert.*, **46**:269-270.
5. 堤 治・佐藤和雄・坂元正一. 1982. 卵母細胞のステロイド代謝動態に関する研究. *日内分泌会誌*, **58**:1321-1332.
6. TAKANO, H. and S. NIIMURA. 2002. Changes in the activities of hydroxysteroid dehydrogenases in porcine oocytes during meiotic maturation *in vitro*. *J. Reprod.Dev.*, **48**:303-308.
7. NIIMURA, S. and S. KAWAKAMI. 2002. Changes of steroid metabolism in mouse oocytes during meiotic maturation. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, **55**:27-33.
8. ABRAHAM, R. T., M. ACQUARONE, A. ANDERSEN, A. ASENSI, R. BELLE, F. BERGER, C. BERGOUNIOUX, G. BRUNN, C. BUQUET-FAGOT, D. FAGOT, N. GLAB, H. GOUDEAU, M. GOUDEAU, P. GUERRIER, P. HOUGHTON, H. HENDRIKS, B. KLOAREG, M. LIPPAI, D. MARIE, B. MARO, L. MEIJER, J. MESTER, O. MULNER-LORILLON, S. A. POULET, E. SCHIERENBERG, B. SCHUTTE, D. VAULOT and M. H. VERLHAC. 1995. Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol. Cell.*, **83**:105-120.
9. VESELY, J., L. HAVLICEK, M. STRNAD, J. J. BLOW, A. DONELLA-DEANA, L. PINNA, D. S. LETHAM, J. KATO, L. DETIVAUD, S. LECLERC and L. MEIJER. 1994. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.*, **224**:771-786.
10. TÖRNELL, J. and T. HILLENSJÖ. 1993. Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex. *Hum. Reprod.*, **8**:737-739.
11. SUN, Q. Y., Q. LU, H. BREITBERT and D. Y. CHEN. 1999. cAMP inhibits mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and resumption of meiosis, but exerts no effect after spontaneous germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reprod. Fert. Dev.*, **11**:81-86.
12. SHIMADA, M. and T. TERADA. 2002. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34<sup>cdc2</sup> kinase activity during meiotic progression especially beyond the M I stage. *Mol. Reprod. Dev.*, **62**:124-131.
13. 豊田 裕・横山峰介・星冬四郎. 1971. マウス卵子の体外受精に関する研究. I. 精巢上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌*, **16**:147-151.
14. NIIMURA, S. and K. ISHIDA. 1976. Histochemical studies of  $\Delta^5-3\beta$ -,  $20\alpha$ - and  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and possible progestagen production in hamster eggs. *J. Reprod. Fert.*, **48**:275-278.
15. BAILLIE, A. H., M. M. FERGUSON and D. McK. HART. 1966. *Developments in Steroid Histochemistry*. Academic Press, London and New York, pp. 1-26.
16. BARKA, T. and P. J. ANDERSON. 1965. *Histochemistry*. Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers

- Inc., New York, Evanston and London, pp. 296-333.
17. MASUI, Y. and C. L. MARKERT. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, **177**: 129-146.
  18. KISIMOTO, T. 1988. Regulation of metaphase by a maturation-promoting factor. *Dev. Growth Diff.*, **30**:105-115.
  19. LEE, M. G. and P. NURSE. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**:31-35.
  20. DUNPHY, W. G. and J. W. NEWPORT. 1988. Unraveling of mitotic control mechanisms. *Cell*, **55**:925-928.
  21. DOWNS, S. M. 2002. The biochemistry of oocyte maturation. In: EPPIG, J., C. HEGELE-HARTUNG and M. LESSL (eds.), *The Future of The Oocyte, Basic and Clinical Aspects*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 81-99.
  22. DEKEL, N. and W. H. BEERS. 1980. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.*, **75**:247-254.
  23. EPPIG, J. J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev. Biol.*, **89**:268-272.
  24. SHULTZ, R. M., R. R. MONTGOMERY and J. R. BELANOFF. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, **97**:264-273.
  25. VIVARELLI, E., M. CONTI, M. DE FELICI and G. SIRACUSA. 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Diff.*, **12**:271-276.
  26. DEKEL, N., D. GALIANI and I. SHERIZLY. 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell. Endocr.*, **56**:115-121.
  27. DOWNS, S. M. 1993. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. *Mol. Reprod. Dev.*, **35**:82-94.

## Nuclear Maturation and $20\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Mouse Oocytes Treated with 3-Isobutyl-1-Methylxanthine

Sueo NIIMURA<sup>1\*</sup> and Chisato SAITO<sup>1</sup>

(Received March 20, 2003)

### Summary

The state of nuclear maturation and the activity of  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $20\alpha$ -HSD) were observed in mouse oocytes treated with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), an inhibitor of 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, and the relationship between nuclear maturation and  $20\alpha$ -hydroxyprogesterone metabolism in the cytoplasm was examined.

Nuclei of the oocytes cultured with  $50\mu\text{M}$  IBMX for 8 hrs were almost in the germinal vesicle stage (97%), while those of control oocytes cultured without IBMX were in the metaphase I to telophase I stages, mostly metaphase I stage (68%). The percentage of oocytes in the germinal vesicle stage was significantly higher in the IBMX-treated group than in control group. On the other hand, the activity of  $20\alpha$ -HSD was demonstrated in all oocytes of both IBMX-treated and non-treated groups.

From the present findings, it was confirmed in mouse oocytes that the  $20\alpha$ -hydroxyprogesterone metabolism in the cytoplasm is not related to nuclear maturation.

**Key words**: mouse oocyte, meiotic maturation,  $20\alpha$ -hydroxyprogesterone metabolism, 3-isobutyl-1-methylxanthine, histochemistry

---

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Niigata University

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