

# ニホンウナギ卵形成過程での総 SOD と亜鉛の変化

楠目 峻大\*・新 大樹\*\*・三浦 智恵美\*\*\*

(令和2年10月28日受付)

## Mechanisms underlying stress tolerance during oogenesis in Japanese eel.

Takahiro KUSUME, Daiki ATARASHI and Chiemi MIURA

(Received Oct. 28, 2020)

### Abstract

The presence of the antioxidant enzyme Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) and zinc in spermatogonia of Japanese eel has been shown to play an important role in the antioxidant system of germ cells. The purpose of this study was to clarify the mechanisms involved in the stress tolerance during oogenesis. The total SOD activity and the zinc levels, measured by a competitive inhibition assay with a tetrazolium salt, and zinc fluorescent probe, respectively, were found to decrease as the oocyte developed into more advanced stage. By employing an organ culture system, zinc deficiency induced by an intracellular zinc chelating agent (TPEN) was observed to cause atresia of follicle cells. Addition of zinc ions attenuates TPEN-induced atresia. These results imply a relationship between SOD and zinc, and suggests an involvement of zinc in stress tolerance of follicle cells.

**Key Words:** stress, superoxide dismutase, oogenesis, zinc, organ culture system

### 1 はじめに

生殖細胞と生殖腺は、生命の連続性を途切れさせないために様々な仕組みを有していると考えられる。その一つとして生殖細胞を外界からのストレスから守る仕組みが存在している。

細胞は外部からストレスが与えられると、細胞内で活性酸素 ( $O_2^-$ ) が発生する。活性酸素は核に酸化反応を起こし、癌などの疾患を引き起こす。しかし、活性酸素は細胞内に存在するストレス耐性物質である活性酸素除去酵素 (SOD) によって分解されるため細胞は正常な状態を保っている。SOD は活性中心に銅 (II) イオンと亜鉛 (II) イオン、またはマンガン (III) イオンや鉄 (III) イオンの

ように二価または三価の金属イオンを持ち主に細胞質気質やミトコンドリアに含まれている酵素である。

我々は、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 雄を用いた実験により、精原幹細胞中に亜鉛および亜鉛により活性化される銅亜鉛結合型 (Cu/Zn)-SOD が特異的に存在し、その結果として精原幹細胞が強い酸化ストレスに対する抵抗性を有することを明らかにした<sup>1,2)</sup>。また精巣では細胞内の亜鉛を除去することにより精原細胞の細胞死が誘導されることが示され、亜鉛が生殖細胞の維持に重要な役割を持つことも明らかにした<sup>1)</sup>。しかしながら、卵形成過程での抗酸化機構は未だ明らかではない。そこでウナギの卵形成過程の防御メカニズムを明らかにすることで雄での生殖腺の防御機構と比較検討し雌雄共通の生殖腺の防御メカニ

\* 広島工業大学大学院工学系研究科環境学専攻  
\*\* 広島工業大学環境学部地球環境学科 (平成 30 年度卒業)  
\*\*\* 広島工業大学環境学部地球環境学科

ムを解析することを目的として本実験を行った。

## 2 材料と方法

### 2.1 試験魚

本実験では、まずニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の稚魚 (シラスウナギ) をメス化した。メス化は、エストラジオール-17 $\beta$  を、20 mg/kg の割合でクロコ 100 (日清丸紅) に混合し飼料を作成し、この飼料をシラスウナギに経口投与することにより行った。メス化したウナギ 67 匹の体重および尾又長の計測を行った後、卵巣を摘出した。卵巣はリンガー液 (170 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 3.0 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5.0 mM HEPES, 5.0 mM D-glucose, pH 7.4) で体液等を洗浄後、成長段階の同定、総 SOD 量の計測、蛍光染色に使用する為に分けた。

### 2.2 卵細胞の成長段階の同定

サンプルは Davidson 溶液 (95 % エタノール 165 ml, 氷酢酸 58 ml, ホルマリン 110 ml, DW 168 ml) で固定し保存した。固定標本は常法によりパラフィン包埋し、6  $\mu$ m の組織切片を作成しヘマトキシリン-エオシン二重染色を施して卵細胞の成長段階の同定を行った<sup>3,4,5)</sup>。

### 2.3 総 SOD 量の測定

総 SOD 量の測定には -20°C で保存した卵巣を使用した。卵巣は 10 倍量の 0.25 M スクロースバッファーを加え氷上でホモジナイズし、遠心分離後 (10,000 rpm, 60 分, 4°C) の上清を総 SOD 量の測定サンプル液とした。サンプル溶液は 200 mM リン酸バッファー (pH 6.8) で等倍、1/5、1/25、1/125、1/625 に希釈し使用した。これらのサンプルはキサントキシターゼ (XOD) を反応させた。希釈したサンプル溶液 (サンプル、Blank2) もしくは蒸留水 (Blank1、Blank3) をマイクロプレートに 20  $\mu$ l 入れた後、サンプルと Blank1 には 50 mU/ml XOD を同時に入れ反応させた。Blank2 と Blank3 にはリン酸バッファーのみを入れた。それぞれのウェルにテトラゾリウム塩反応液を 200  $\mu$ l 混合し、XOD により生成した O<sub>2</sub><sup>-</sup> にテトラゾリウム塩 (WST-1) を結合させ、生じたホルマザン塩は iMark マイクロプレートリーダー (BioRad) を用いて 450 nm の吸光度を測定した<sup>6,7,8)</sup>。WST-1 反応溶液は、10 mM ヒポキサンチン 200  $\mu$ l, 10 mM EDTA 200  $\mu$ l, 5 mM WST-1 200  $\mu$ l, 2M カタラーゼ 100  $\mu$ l と 50 mM 炭酸バッファー (pH 10.2) 19.3 ml により作成した。

測定した吸光度から 1 ml あたりのユニット数 (U) を算出した。算出は各希釈液中でのホルマザン塩生反応の吸光度、ホルマザン塩生反応のみの吸光度 (Blank1)、各希釈液の吸光度 (Blank2)、WST-1 反応液の吸光度 (Blank3)

を同時に求め以下の(1)の数式によりホルマザン塩生反応の阻害率 (SOD 活性値) を算出し阻害曲線を作成した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\{(\text{Blank1}-\text{Blank3}) - (\text{サンプル溶液の吸光度}) - (\text{サンプル溶液と同じ濃度の吸光度})\}}{(\text{Blank1}-\text{Blank3})} \times 100 \quad (\text{式1})$$

さらに阻害率 50 % 時のサンプル溶液の濃度を FORECAST 関数を用いて求め、(2)の計算式により 1 ml あたりのユニット数を算出した。

$$\text{ユニット数 / ml} = 1 / \text{関数で求めた阻害率 50\% 時のサンプルの濃度} / 0.02 \times 10 \quad (\text{式2})$$

### 2.4 最高輝度の計測

卵巣中の亜鉛イオンを調べるために、亜鉛イオン検出蛍光試薬 ZnAF-2 DA (五稜化薬) で卵巣を染色した。卵巣は摘出直後にリンガー液で希釈した 5  $\mu$ M ZnAF-2 に、常温かつ遮光状態で 30 分浸漬した後、リンガー液で洗浄し、倒立型顕微鏡 IX71 (Olympus) を用いて波長 492 nm の蛍光強度を測定した。

輝度の計測には画像解析ソフト ImageJ を使用した<sup>9)</sup>。輝度 (V) は(3)より算出し、これらの値の最高輝度を使用した。

$$V = 0.299R + 0.587G + 0.114B \quad (\text{式3})$$

### 2.5 統計処理

本研究における統計処理は KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて行った。得られた測定値を一元分散分析に供した後、post-hoc テストとして Bonferroni 多重比較検定に供し、p < 0.05 を統計的有意差とした。

### 2.6 卵巣器官培養による亜鉛除去実験

卵黄胞期卵細胞を用いた器官培養により亜鉛除去実験を行った。培養方法は L15 培地 (Gibco) と L15 を浸透させた 1 % 寒天上に 3 × 3 mm に細切した卵巣片を乗せ 20 °C にて 14 日間行った<sup>10)</sup>。培地には 100  $\mu$ M 細胞内亜鉛キレート剤 (TPEN) を添加、および 100  $\mu$ M TPEN と 250  $\mu$ M 亜鉛イオン溶液 (ZnCl<sub>2</sub>) を添加した。培養終了後に卵巣片は Davidson 溶液で固定し、組織観察を行った。

## 3 結果と考察

### 3.1 ウナギの成長と卵細胞の関係

本研究では 卵原細胞から卵黄球期までの卵形成過程が確認された (図 1)。卵原細胞は体長が 17 ~ 21 cm の個体に

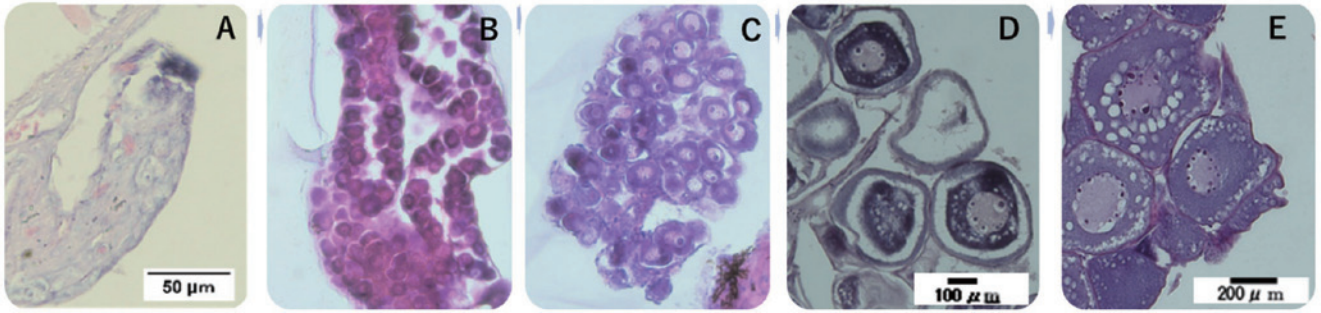


図1 ニホンウナギの卵形成過程

写真は A) 卵原細胞、B) 染色仁期の卵原細胞、C) 周辺仁期の卵原細胞、D) 卵黄胞期の卵原細胞、E) 卵黄球期の卵原細胞を示す。

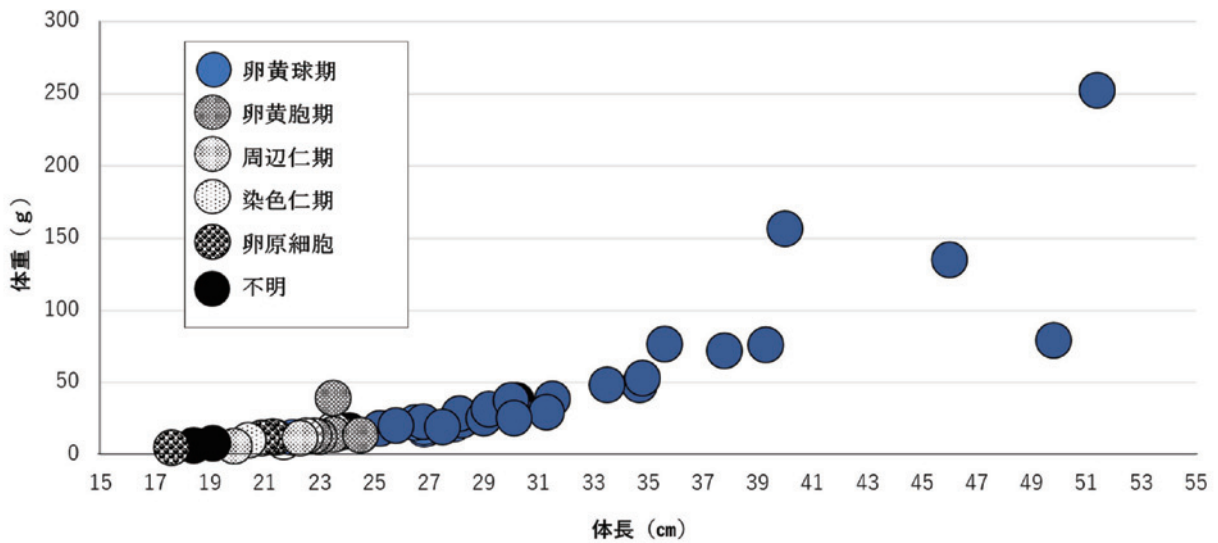


図2 ウナギの体長・体重と卵形成過程の関係

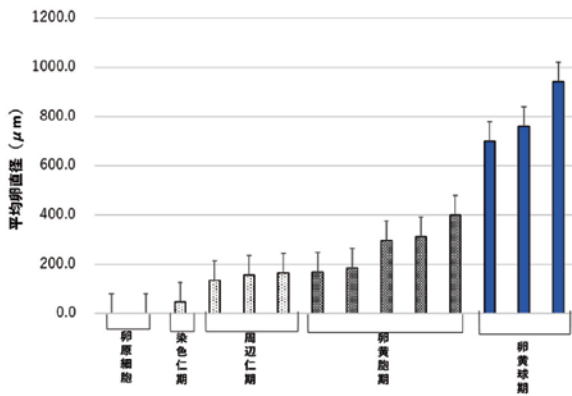


図3 卵形成過程における卵細胞の平均直径

見られた。22 cm～23.5 cmでは染色仁期と周辺仁期の双方の卵母細胞が存在していた。体長 23.5 cm 体重 39.28 g の個体と、体長 24.5 cm 体重 13.5 g の個体では卵黄胞期の卵母細胞が確認され、体長 25 cm以上の個体では全て卵黄球期が確認された。以上のことから体長 25 cmを境に卵細胞は卵黄胞期から卵黄球期に成長すると考えられた (図2)。卵細胞の平均直径は染色仁期から周辺仁期、卵黄球期から卵黄球期にかけて大きくなっていった (図3)。

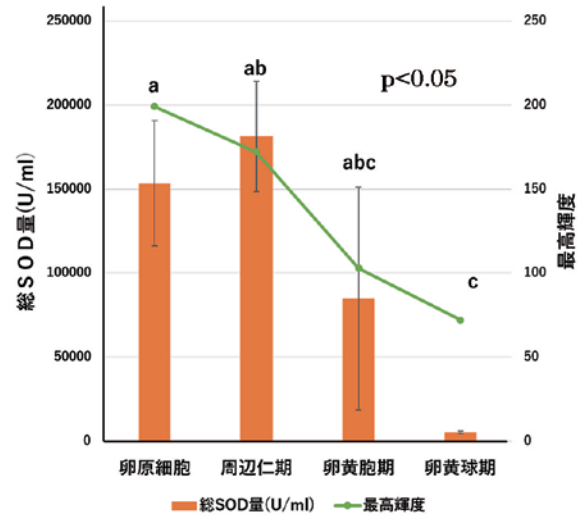


図4 卵形成過程での総 SOD 量と最高輝度の変化  
グラフに記載されたアルファベットは Bonferroni 法により示された関係性を示す。

### 3.2 卵形成過程での総SOD量

卵原細胞と周辺仁期、卵黄胞期、卵黄球期の卵母細胞の総 SOD 量を計測したところ、各成長段階で変化が見られた (図4)。総 SOD 量は卵原細胞と周辺仁期の卵母細胞に

比較して、卵黄胞期の卵母細胞では減少傾向にあり周辺仁期と卵黄球期を比較すると優位に減少していた。

### 3.3 卵形成過程での亜鉛の最高輝度

亜鉛プローブで卵巣を蛍光染色したところ、卵細胞内に蛍光反応が見られた (図5)。亜鉛の最高輝度は、卵原細胞から周辺仁期、卵黄胞期、卵黄球期の卵母細胞へ成長するに伴い減少していた (図4)。上記に述べた総SOD量の変化と亜鉛輝度の変化から、両者には何らかの相関関係があると考えられた。

### 3.4 亜鉛除去実験

卵母細胞に対する亜鉛の作用は、卵巣培養系を用いて、細胞内の亜鉛をTPEN (亜鉛阻害剤) により除去することで解析した。その結果、ControlではInitial controlと比較して同様な形態が観察されたが、100  $\mu$ M TPENではControlと比べて細胞質基質の減少と卵核ならびに核小体の消失が確認された。100  $\mu$ M TPENに250  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>を添加した場合、細胞質基質と卵核ならびに核小体を確認できた。このことから卵細胞に存在する亜鉛を除去した場合、細胞はダメージを受けるが、外部からの亜鉛イオン溶液の添加によって、受けた卵細胞のダメージはある程度回復できると考えられた (図6)。

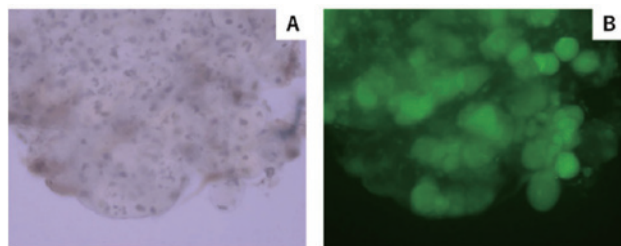


図5 亜鉛プローブで蛍光染色した卵細胞  
A: 明視野下 B: 暗視野下を示す。

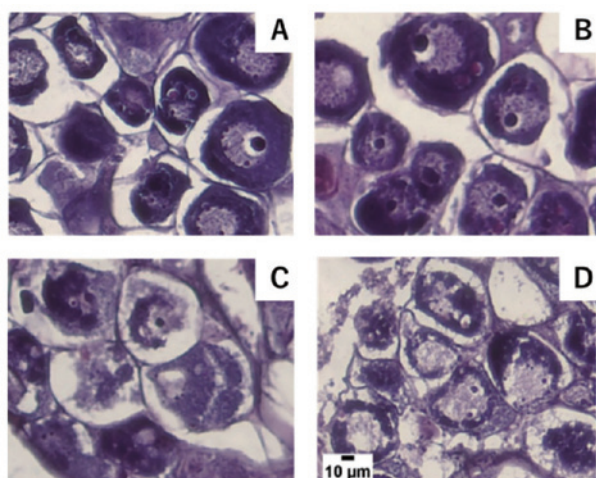


図6 亜鉛除去による卵細胞の組織学的変化  
A) Initial control B) Control C) 100  $\mu$ M TPENを添加  
D) 100  $\mu$ M TPENと250  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>を添加。

これらの実験結果からSODと亜鉛は共存関係にあり、亜鉛はストレス耐性において重要な物質であることが示唆された。

### 3.5 まとめ

ニホンウナギ雄では、A型精原細胞が酸化ストレスに対する強い抵抗性をもつことが示されている<sup>2)</sup>。このことは精子形成の過程で生殖細胞が酸化ストレスを受け、発達した生殖細胞がダメージを受けたとしても、ストレス耐性をもつA型精原細胞が生き残るために再び精子形成を開始できることを意味していると考えられる。本研究では、雌の生殖細胞に関しても、雄と同様の抗酸化機能が存在する可能性があることが示唆された。この抗酸化機構は、雄では減数分裂前のA型精原細胞に存在していることに比べ雌では、減数分裂前の卵原細胞のみならず周辺仁期や卵黄胞期にかけての卵母細胞の時期にも多く存在し、その後、卵形成の進行に連れて減少していくことが示された。卵形成では、精子形成に比べて減数分裂が発生の初期に起こり、その後、生殖細胞は卵母細胞として、体内に長く維持されることから、雌の抗酸化機構は、雄に比べて長く維持されているのではないかと考えられた。

今後は、さらに亜鉛の発現変化を定量・定性的に解析し、卵形成に対する亜鉛とCu/Zn-SODの相互作用を明らかにする予定である。上記の結果と雄の生殖腺の防御機構から、雌雄での配偶子の防御メカニズムの全体像を更に明らかにしたいと考える。

## 謝 辞

本研究の実施に当たり、愛媛大学の水族繁殖生理学研究室からシラスウナギを提供していただき、またハワイ大学のDr. Fritzie T. Celino-Bradyに英文校閲をしていただいたことをここに記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) S. Yamaguchi, C. Miura, K. Kikuchi, F. Celino, T. Agusa, S. Tanabe and T. Miura., Zinc is an essential trace element for spermatogenesis., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 10859-10864, (2009).
- 2) F.T. Celino, S. Yamaguchi, C. Miura, T. Ohta, Y. Tozawa, T. Iwai and T. Miura., Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase., PLoS ONE 6, e16938, (2011).
- 3) 榎田晋、落合明、産卵期前後における養成ブリの成熟について、魚類学雑誌、18巻4号、175-181、(1974).
- 4) 中坪俊之、川地将裕、間野伸宏、廣瀬一美、関東沿岸

- 域に回遊するマンボウ *Mola mola* の産卵期の推定水産、増殖 (Aquaculture Sci.) 55 (4), 613-618, (2007).
- 5) 北野忠、畠山類、秋山信彦、上野信平、駿河湾北部でのミミズハゼ雌の生殖年周期、Suisanzoshoku 51 (1), 41-48, (2003).
- 6) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura., Flow-Injection Assay of Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-Soluble Tetrazolium., Anal. Sci.,15, 353-357, (1999).
- 7) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura., Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on the Reduction of Highly Water-soluble Tetrazolium Salts by Xanthine-Xanthine Oxidase., Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 485-488, (1999).
- 8) H. Ukeda, T. Shimamura, M. Tsubouchi, Y. Harada, Y. Nakai and M. Sawamura., Spectrophotometric Assay of Superoxide Anion Formed in Maillard Reaction Based on Highly Water-soluble Tetrazolium Salt., Anal. Sci., 18, 1151-1154, (2002).
- 9) C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri., NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9, 671-675, (2012).
- 10) C. Miura, T. Higashino and T. Miura., A progestin and estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. Biology of Reproduction 77, 822-828, (2007).