HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ueber Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. : IV. Vorlaufiges Experiment in Betreff des Calciumproblems (Mit 1 Textabbildung)
Author(s)	KANOH, Yasuhiko
Citation	北海道大學理學部紀要, 12(3), 259-263
Issue Date	1956-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/27156
Type	bulletin (article)
File Information	12(3)_P259-263.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ueber Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. IV. Vorläufiges Experiment in Betreff des Calciumproblems[1),2)]

Von

Yasuhiko Kanoh

(Zool. Institut, Naturwiss. Fakultät, Hokkaido Univ.)

(*Mit 1 Textabbildung*)

I

Die Rolle von Calcium in den Vorgängen der Befruchtung oder Ei-Aktivierung ist schon seit langer Zeit von manchen Autoren betont worden, und noch jetzt lenkt diese Frage das Interesse auf sich.

Beim Seeigelei ist es wohl bekannt, dass, wenn Calciumionen im äusseren Milieu nicht enthalten sind, keine Befruchtung vorkommt (Loeb '15), und noch dazu ist es auf der anderen Seite in den letzten Jahren erkannt geworden, dass ein Freiwerden von Calcium bei der Befruchtung erfolgt (Mazia '37), und zwar findet dieses Freiwerden nicht nur im Ei-Inneren statt, sondern Calcium scheidet sich dabei vom Ei nach aussen aus (Örström & Örström '42, Monroy '46).

Bezüglich der Fischeier hat Yamamoto ('44) vom *Oryzias*-Ei berichtet, dass Calciumionen für die Befruchtung notwendig seien, folglich ohne Calciumionen im Milieu keine Befruchtung vorkomme. Ferner hat er neuerdings beschrieben, dass freie Calciumionen vom Kortikalplasma bei der Erregung mit Anstich entlassen werde (Yamamoto '54). Beim Heringsei sind auch die Calciumionen, wie beim *Oryzias*-Ei, für Befruchtung notwendig, und dabei ist weiter ermittelt worden, dass ohne Calciumionen im Milieu die positive Bewegung der Spermien nach der Mikropyle des Eies, die bei normaler Befruchtung bestimmt erfolgt, nicht beobachtet werden kann, trotzdem die Spermien dabei sich verhältnismässig lebhaft bewegen (Yanagimachi & Kanoh '53). Dies geschieht auch beim *Oncorhynchus*-Ei in gleicher Weise. An diesem Ei ist ausserdem gefunden worden, dass beim Eintauchen in isotonische $CaCl_2$-Lösung die Keimscheibe ohne Zerfallen der Kortikalalveoli parthenogenetisch allmählich sich zu bilden beginnen kann, worüber eine kurze Mitteilung veröffentlichen worden ist (Kanoh '52a).

---

1) Contribution No. 344 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

2) Ein Hauptinhalt von dieser Mitteilung wurde berichtet in der XXII. jährlichen Versammlung der Zoologischen Gesellschaft von Japan, in Hiroshima, am 12. Oktober 1951.

Daraus lässt sich an die Möglichkeit denken, dass Calciumionen auch bei Fischeiern im Befruchtungs- oder Ei-Aktivierungsprozess eine gross Rolle spielen, und hierauf ist das vorliegende Experiment angestellt worden, welches hier beschrieben werden soll.

Alle in dieser Arbeit behandelten Eier wurden, wie in den vorhergehenden Mitteilungen, direkt durch Bauchschnitt vom frischen reifen Lachs, *Oncorhynchus keta*, gesammelt.

Die Aribeit wurde von dem wissenschaftlichen Fond des Unterrichtsministeriums finanziell unterstützt, dafür möchte der Verfasser seinen Dank ausdrücken.

II

Wenn das *Oncorhynchus*-Ei in frisches Wasser eingetaucht und aktiviert wird, kommt zuerst Zerfall der Kortikalalveoli vor, dann wird Wasser aufgesaugt, und ein Perivitellinraum tritt in die Erscheinung. Solche parthenogenetische Ei-Aktivierung geht nicht in isotonischer Salzlösung (M/6,5 p. ä. S.[3]) vor sich, vielmehr bleibt das Ei in dieser Lösung lange Zeit unverändert, aber wenn das Ei vorher nur kurze Zeit lang mit destilliertem Wasser behandelt worden ist, wird es aktiviert und nimmt selbst in isotonischer p. ä. S. nachher Wasser auf, wodurch ein Perivitellinraum zur Erscheinung kommt (Kanoh '50, '51, '52b). Ferner sind für diese Ei-Aktivierung Calciumionen im äusseren Milieu entbehrlich. Nämlich, wenn auch das Ei mit M/10 Natriumoxalat-Lösung oder M/6,5 Ca-freier p. ä. S. sorgfältig gewaschen worden war, wurde es durch kurze Berührung mit destilliertem Wasser parthenogenetisch aktiviert und nahm noch in isotonischer Ca-freier p.ä. S. (M/6,5) Wasser auf, folglich wurde ein Perivitellinraum gebildet.

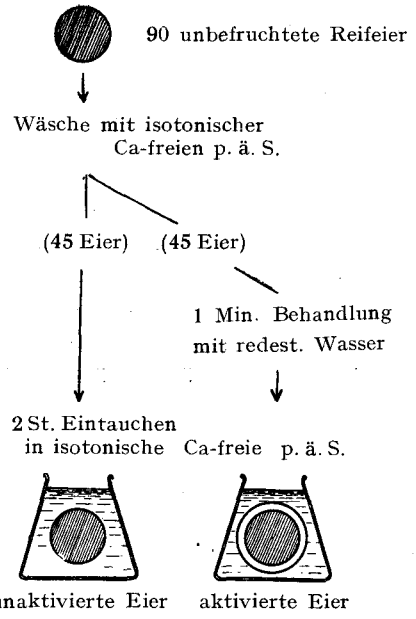

Abb. 1. Schematische Darstellung der Verfahrungsweise des Experiments Erklärung im Text.

Also, wenn Calcium dabei, d. h. bei der Ei-Aktivierung, aus dem Ei-Inneren, wie beim Seeigelei, entlassen wurde, musste es sich in den Perivitellinraum ausscheiden, dann im äusseren Milieu (Ca-freie p. ä. S.) sich diffundieren und nachgewiesen werden, denn die Eimembran ist nicht nur für Wasser, sondern auch für Krystalloide

3) p. ä. S. Die physiologisch äquilibrierte Salzlösung. s. Iste Mitteilung.

permeabel (Kanoh '52).

Um diese Voraussicht festzustellen, wurden daher die folgenden Experimente gemacht.

Wie das Verfahren in der Abbildung (Abb. 1) schematisch dargestellt ist, wurden zuerst 90 Eier mit M/6,5 Ca-freier p. ä. S. sorgfältig mehrmals gewaschen (ungefähr 50 Minuten lang mit totalem Volum 500 ml), dann wurden 45 Eier von ihnen kurz (lediglich 1 Minute lang) mit redestilliertem Wasser behandelt und danach in 15 ml M/6,5 Ca-freie p. ä. S. 2 Stunden lang eingetaucht (I). Die übrigen 45 Eier wurden direkt, d. h. ohne Behandlung mit redest. Wasser, in 15 ml M/6,5 Ca-freie p. ä. S. auch 2 Stunden lang eingetaucht (II).

Die Folge davon war, dass die ersteren 45 Eier wegen der Berührung mit redest. Wasser aktivierten, infolgedessen nach 2 stündigem Eintauchen in Ca-freie p. ä. S. Wasser genug aufsaugten und bei ihnen Perivitellinräume deutlich wahrgenommen wurden, aber die letzteren 45 Eier nicht aktivierten und nach 2 Stunden noch keine Veränderung zeigten[4].

Hierauf wurden beide äusseren Milieus (I u. II) zur Prüfung auf das Vorhandensein von Calcium gebraucht.

III

Erstens wurden je 5 ml von den zu prüfenden Lösungen durch Hinzufügung einiger Mengen von 0,1 N $NaHCO_3$-Lösung schwach alkalisch gemacht, und danach 0,3 ml von 0,5 % Alizarinrot S-Lösung hinzugefügt. Dann wurde bemerkt, dass eine rote flockige Fällung in der Lösung von I ungefähr nach 3 Stunden zu entstehen anfing, aber nicht so in der II, d. h. in dieser trat keine deutlicher Fällung auf. Da die rote Fällung vermutlich Calciumalizarinat sein muß, war zu erwarten, daß freie Calciumionen in der Lösung von I enthalten waren.

Darauf wurden die quantitativen Bestimmungen der Calciumionen ausgeführt[5], wodurch die folgende Ergebnisse erreicht wurden.

Die Konzentration der Calciumionen in der Lösung von II stimmte mit der der zuletzt gebrauchten Waschflüssigkeit fast überein und lag innerhalb der Grenzen des Messungsfehlers, folglich war sie ohne Bedeutung. Dagegen zeigte die Konzentration der Calciumionen in der Lösung von I bedeutenden Wert, nämlich sie betrug durchschnittlich 0,00245 mg pro Ei (141, 7 mg). Mit anderen Worten, nur in der Lösung von I bemerkte man Mengenvermehrung von Calcium.

Aus diesen Ergebnisse wird deshalb angenommen, dass das nachgewiesene Calcium in der Lösung von I das aus den aktivierten Eiern entlassene sein muss, denn diese Läsung (I), abweichend von der die unaktivierten Eier enthaltenden Lösung (II), ist diejenige Flüssigkeit, welche die aktivierten Eier enthält.

---

4) Nach solcher Behandlung waren sie noch nicht beschädigt, sondern hatten normale Befruchtungsfähigkeit behalten.

5) Die Methode der Bestimmungen war wie folgt : Ca wurde zuerst als Oxalat ausgefällt, mit verdünnter Schwefelsäure wieder aufgelöst, und überschüssige Kaliumpermanganatlösung hinzugefügt, dann der Ueberschuss von $KMnO_4$ jodmetrisch bestimmt.

IV

Für Elektrolyten ist die Eimembran des Salmonideneies permeabel, dagegen scheint im allgemeinen die Plasmaoberfläche hohe Impermeabilität für Elektrolyten zu haben (Grey '32, Aoki '39, Kanoh '51 u. '52b). Doch, streng genommen, ist diese Impermeabilität nicht vollkommen, sondern ein Austausch der Kationen durch die Plasmaoberfläche mag stattfinden (Pumphrey '31, Oikawa '52). Obgleich dies geschieht, handelt es sich nach den bis jetzt veröffentlichen Data nur um geringe Mengen sowohl beim unaktivierten als auch beim aktivierten Ei. Also kommt socher Ionenaustausch beim vorliegenden Experiment nicht in Betracht.

Andrerseits haben Hayes et al. ('46) nach der direkten Analyse an Eiern von *Salmo salar* berichtet, dass ein Verlust der Calciumionen bei der Befruchtung vorkomme, und weiter hat Yamamoto ('54) am *Oryzias*-Ei mit Verwendung einer Reaktion in Alizarin S-Ringerlösung bewiesen, dass freie Calciumionen zur Zeit der Reizung mit Anstich aus dem Exsudat des Kortikalplasmas entlassen werden.

In Erwägung dieser Tatsache lässt sich an die Möglichkeit denken, dass das im vorliegenden Experiment nachgewisene Calcium in der Lösung von I dasjenige sein muss, was bei der Ei-Aktivierung aus dem Ei-Inneren entlassen wurde, sich in den Perivitellinraum ausschied und dann durch die Eimembran ins äussere Milieu sich diffundierte. Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse geradezu, dass bei der Ei-Aktivierung Calcium aus dem Ei-Innere entlassen werden mag. Natürlich ist das quantitativ hier bestimmte Calcium ein Teil des aus dem Ei-Innere entlassenen.

Heilbrunn ('52) hat bahaupten, dass gewisse kolloidale Veränderungen, welche bei der Erregung der Zelle erfolgen, zuerst auf dem Freiwerden von Calcium aus dem Zellkortex beruhen ; und darauf hin hat er eine Kolloidchemische Theorie von Reizung (colloid chemical theory of stimulation) aufgestellt. Seiner Ansicht nach mag die Ei-Aktivierung, z. B. die bei Seeigel, auf Grung dieser Theorie erklärt werden. Die oben erwähnten Ergebnisse bei den *Oncorhynchus* - Eiern erinnern auch an diese Theorie, doch muss es noch einer weiteren Untersuchung überlassen bleiben, welche kolloidchemischen Veränderungen bei der Aktivierung des Fischeies im Ei-Inneren praktisch stattfinden.

Zusammenfassung

Die obigen Experimente wurden an reifen *Oncorhynchus*-Eiern gemacht. Für die Aktivierung dieser Eier waren Calciumionen im äusseren Milieu entbehrlich.

Die Eier wurden erstens mit isotonischer Ca-freier p. ä. S. (physiologisch äquilibrierte Salzlösung) mehrmals sorgfältig gewaschen, dann wurde die Hälfte von ihnen nach kurzer Berührung mit redest. Wasser in isotonische Ca - freie p. ä. S. 2 Stunden lang eingetaucht, doch die andere Hälfte wurde direkt, d. h. ohne Behandlung mit redest. Wasser, in isotonische Ca-freie p. ä. S. von demselben Volum auch 2 Stunden lang eingetaucht. Die Folge davon war, dass die Eier von der ersteren Hälfte wegen der Berührung mit redest. Wasser aktivierten,

aber die von der letzteren nicht aktivierten und keine Veränderung zeigten.

Hierauf wurden der Nachweis und die Bestimmung des Calciums in beiden äusseren Milieus qualitativ und quantitativ unternommen, und es wurde festgestellt, dass nur das erstere, d. h. die aktivierten Eier enthaltende Milieu einen bedeutenden Wert von Calciumkonzentration zeigte.

Nach einigen Ueberlegungen ist der Verfasser zu dem folgenden Schluss gekommen : diese Ergebnisse zeigen geradezu, dass bei der Ei-Aktivierung Calcium aus dem Ei-Inneren entlassen wird.

Literaturverzeichnis

Aoki, K. 1939. Ueber die Wasseraufnahme der Lachseier. I. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI (Zool.), 7, 27.

Grey, J. 1932. The osmotic properties of the eggs of the trout (*Salmo fario*). J. Exp. Biol., 9, 277.

Hayes, F. R., Darcy, D. A. et C. M. Sallivan, 1946. Changes in the inorganic constituents of developing salmon eggs. J. Biol. Chem., 163, 621.

Heilbrunn, L. V. 1952. An outline of general physiology. 3rded. Philadelphia et London.

Kanoh, Y. 1950. Ueber Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. I. Annot. Zool. Jap., 24, 13.

————. 1951. Do. II. Die Wirkung der hypertonischen Salzlösung. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI (Zool.), 10, 260.

————. 1952a. Ueber die Beziehung zwischen dem Zerfallen der Kortikalalveoli und der Entwicklung bei Fischeiern. (auf Japanisch mit deutschem Résumé). Jap. J. Ichthyol., 2, 99.

————. 1952b. Ueber Wasseraufnahme und Aktivierung der Lachseier. III. Die Permeabilität der Eioberfläche. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI (Zool.), 11, 95.

Loeb, J. 1915. On the nature of conditions which determine or prevent the entrance of the spermatozoön into the egg. Amer. Nat., 49, 257.

Mazia, D. 1937. The release of calcium in *Arbacia* eggs on fertilization J. Cell. and Comp. Physiol., 10, 291.

Monroy Oddo, A. 1946. Variations in Ca and Mg contents in *Arbacia* eggs as a result of fertilization. Experientia, 11, 371.

Oikawa, I. 1952. Membrane potential of the salmon egg. (in Japanese with English résumé). Bull. Res. Inst. Appl. Elect., Hokkaido Univ., 4, 122.

Örström, A. et M. Örström 1942. Ueber die Bindung von Kalzium in Ei und Larve von *Paracentrotus lividus*. Protoplasma, 36, 475.

Pumphrey, R. J. 1931. The potential difference across the surface bounding the unfertilised egg of the brown trout. Proc. Roy. Soc. B., 188, 511.

Yamamoto, T. 1944. Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. I. Response of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* to insemination and to artificial stimulation. Annot. Zool. Jap., 22, 109.

————. 1954. Do. V. The rôle of calcium ions in activation of *Oryzias* eggs. Exptl. Cell. Res., 6, 56.

Yanagimachi, R. et Y. Kanoh 1953. Manner of sperm entry in herring egg, with special reference to the rôle of calcium ions in fertilization. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI (Zool.), 11, 487.