
哺乳類卵活性化精子蛋白質候補
ホスホリパーゼ C ゼータの検証と機能解析

16390055

平成 16 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書



平成 19 年 3 月

研究代表者 宮崎 俊一
東京女子医科大学医学部教授



は し が き

背景

受精現象の本質は、精子と卵子の細胞融合とそれに続く核の融合であり、新しい個体の形成にある。哺乳類を含め脊椎動物の未受精卵は、第二減数分裂の中期 (Metaphase II, MII) に停止しており、受精によって細胞分裂を再開する。これを卵活性化という。卵活性化は、動物種に普遍的に受精時におこる卵細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の劇的な上昇によって誘発される。精子ではなく人為的に卵細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させても卵活性化が誘発される。受精時に精子がどのような物質を介して、どのような機序で卵細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるかを解明することは、受精のメカニズムの本質的な中心課題である。しかしそのメカニズムは未だ解明されるに至っていない。

経緯

研究代表者らは 20 数年に亘って哺乳動物卵体外受精における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇あるいは Ca^{2+} 増加の動態と細胞内情報伝達機序に関する先駆的な生理学的研究を行ってきた。細胞内電位記録法、 Ca^{2+} 電極法および Ca^{2+} 画像解析法を用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は精子付着部位直下の細胞質から発生し卵全体に伝播性に波及する Ca^{2+} 波 (Ca^{2+} wave) を形成すること、また一過性の Ca^{2+} 増加反応が反復して発生し、いわゆる Ca^{2+} 振動 (Ca^{2+} オシレーション) を形成して数時間持続することをハムスター卵で初めて明らかにした (Nature, 1981; J. Physiol. 1986; Dev. Biol. 1986)。その後の報告により、 Ca^{2+} 波・ Ca^{2+} オシレーションはマウス、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒトに至るまで哺乳動物卵に普遍的な現象であることが明らかになった。 Ca^{2+} の増加は、即時的には卵細胞表層の開口分泌を誘発し、分泌物が卵周囲の透明帯蛋白質に作用して、次の精子の侵入を阻止することにより「多精拒否機構」を成立させる。より本質的には、哺乳動物では、MII からの解除により減数分裂を再開することである。さらに長時間持続する Ca^{2+} オシレーションは、前核形成および細胞周期に関与する。

解析

研究代表者らは、 Ca^{2+} 増加のメカニズムについて、ハムスターおよびマウス卵の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) 受容体/ Ca^{2+} チャンネルを介する小胞体 (細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官) からの Ca^{2+} 遊離によることを、 IP_3 受容体に対する単クローン抗体 18A10 の抑制作用を利用して実証した (J. Cell Biol. 1988; Science 1992)。最も重要なテーマは、精子のどのような分子がどのような機構で $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を誘発するのかということである。精子と卵子の細胞膜上の蛋白質が結合し、そのシグナルが IP_3 を産生させるという“精子受容体説”が考え易いが、これを示唆する実験結果が得られていない。他方、Swann がハムスター精子抽出物を卵内に注入すると Ca^{2+} オシレーションを誘発することを発表し (1990; 1991)、さらに Tesarik ら (1994) がヒトの精子 1 個を卵細胞内に注入すると (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) やはり Ca^{2+} オシレーションが起ることを示した。これらの知見から、精子内に Ca^{2+} オシレーション誘発物質 (Ca^{2+} oscillation-inducing protein; COIP) が存在し、受精時の精子-卵融

合に際して卵細胞内に移行して小胞体からの Ca^{2+} 遊離を誘発するという“精子細胞質因子説”が有力になった。COIP は即ち精子由来の卵活性化蛋白質 (Egg-activating protein; EAP) であり、極めて重要である。これにより哺乳類精子あるいは精巢から COIP を分離・精製する研究が世界の幾つかの研究室が開始された。10年あまりの間にいろいろなEAP候補が挙げられたが、未だ実証に至っていない。他方、COIP は IP_3 産生酵素であるホスホリパーゼ C (PLC) ではないかと思当づけて実証を試みた研究グループもいたが、既知の PLC アイソザイムはいずれも卵に Ca^{2+} オシレーションを起こさないか、起こしても極めて高濃度を要したので、この考えは否定的であった。

新知見

しかし2002年、Saundersらは、マウス精子に特異的に発現している新しい PLC のサブタイプ、PLC ゼータ (PLC ζ) を見いだした。彼らは、PLC ζ をコードする RNA をマウス卵に注入すると、非常に低い発現量で、受精時に類似する Ca^{2+} オシレーションが起こること、PLC ζ の抗体で吸着処理した精子抽出物は Ca^{2+} オシレーション誘発能を喪失することを示し、PLC ζ が EAP の有力候補であると発表した。

目的・方法

本研究は PLC ζ の特性と機能を詳細に検証し、PLC ζ が EAP のあるかどうかを調べることを目的として企画・実施された。

方法は、1) 合成 PLC ζ 蛋白質を作成し、マウス成熟未受精卵に注入して Ca^{2+} オシレーション誘起能を調べる、2) 合成 PLC ζ 蛋白質の酵素活性を *in vitro* でアッセイし Ca^{2+} 濃度依存性を調べる、3) PLC ζ と蛍光蛋白 Venus とを結合した蛋白質をコードする RNA を作成し、マウス成熟未受精卵に注入して Ca^{2+} オシレーション誘起能を調べる、4) PLC ζ と蛍光蛋白 Venus とを結合した蛋白質をコードする RNA をマウス成熟未受精卵および受精1細胞期胚に注入し、前核への移行・蓄積、細胞質/核の間の往復(シャトル)運動を調べる、5) PLC ζ のドメインを削除した変異体、アミノ酸置換変異体を合成し、マウス卵でのオシレーション誘起能、*in vitro* 酵素活性およびその Ca^{2+} 濃度依存性を調べる、6) PLC ζ の個々のアミノ酸置換変異体、ドメイン削除変異体をコードする RNA をマウス成熟未受精卵あるいは受精1細胞期胚に注入し、 Ca^{2+} オシレーション誘起能および核移行能を調べ、分子の構造と機能の関係を解析する、7) IP_3 の結合で蛍光強度が変化する指標蛋白質(プローブ)を作成し、受精時および PLC ζ RNA 注入時のオシレーションの最中の細胞内 IP_3 濃度変化を記録する、8) PLC ζ 遺伝子欠損マウスを作成し、その精子を用いて受精を行ったときに Ca^{2+} オシレーションが起こるか否か、卵活性化が起こるか否かを調べる。

研究組織

研究代表者：宮崎俊一（東京女子医科大学医学部 教授）

研究分担者：伊藤昌彦（同 助手）

淡路健雄（同 講師）

河内 全（同 助手） 留学のため初年度のみ

白川英樹（電気通信大学電気通信学部 助教授）

尾田正二（東京大学大学院新領域創成科学科 講師）

研究経費

平成16年度	6,300	千円
平成17年度	4,600	千円
平成18年度	3,800	千円
計	14,700	千円

謝辞

実験にあたって以下の方々の協力を得、共同実験を行った。

ここに感謝の意を表したい。

木下勝之氏（順天堂大学医学部産婦人科学 教授）

武内裕之氏（同 助教授）

依田綾子氏（同 大学院生）

曾根淑子氏（同 大学院生）

黒田恵司氏（同 大学院生）

竹縄忠臣氏（東京大学医科学研究所腫瘍分子医学 教授）

深見希代子氏（東京薬科大学生命科学部 教授）

中村良和氏（同 助手）

佐藤守俊氏（東京大学理学部化学 講師）

梅澤喜夫氏（同 教授）

鹿野朝秀氏（東京女子医科大学医学部 技官）

研究発表

I. 発表論文

1. 学会誌等

- 1) Yoda, A., Oda, S., Shikano, T., Kouchi, Z., Awaji, T., Shirakawa, H., Kinoshita, K. and Miyazaki, S.:
Ca²⁺ oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Developmental Biology*, 268: 245-257, 2004.
- 2) Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T. and Miyazaki, S.:
Recombinant phospholipase C-zeta has high Ca²⁺ sensitivity and induces Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 10408-10412, 2004.
- 3) Sone, Y., Ito, M., Shirakawa, H., Shikano, T., Takeuchi, H., Kinoshita, K., and Miyazaki, S.:
Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 330: 690-694, 2005.
- 4) Kouchi, Z., Shikano, T., Nakamura, Y., Shirakawa, S., Fukami, K. and Miyazaki, S.:
The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase C ζ . *Journal of Biological Chemistry*, 280: 21015-21021, 2005.
- 5) Shirakawa, H., Ito, M., Sato, M., Umezawa, Y. and Miyazaki, S.:
Measurement of intracellular IP₃ during Ca²⁺ oscillations in mouse Eggs with GTP-based FRET probe. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 345: 781-788, 2006.
- 6) Kuroda, K., Ito, M., Shikano, T., Awaji, T., Yoda, A., Takeuchi, H., Kinoshita, K. and Miyazaki, S.:
The role of X/Y linker region and N-terminal EF-hand domain in nuclear translocation and Ca²⁺ oscillation-inducing activities of phospholipase C ζ , a mammalian egg-activating factor. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 27794-27805, 2006.

II. 口頭・ポスター発表

1. 国内学会発表

- 1) Yoda, A., Oda, S., Shikano, T., Kouchi, Z., Awaji, T., Shirakawa, H., Kinoshita, K. and Miyazaki, S.:
Phospholipase C-zeta has the ability of Ca^{2+} oscillation induction and nuclear translocation in mouse eggs. *Japanese Journal of Physiology*, 54, Suppl.: S223, 2004.
(ホスホリパーゼCゼータの Ca^{2+} オシレーション誘発能と核移行能)
第81回日本生理学会 (札幌, 2004.6.2-4.)
- 2) Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T. and Miyazaki, S.:
High Ca^{2+} -sensitivity and Ca^{2+} oscillation-inducing activity of PLC-zeta
Japanese Journal of Physiology, 54, Suppl.: S70, 2004.
(PLC-zeta は高い Ca^{2+} 感受性と哺乳動物卵における Ca^{2+} オシレーション誘導能を保持している) 第81回日本生理学会 (札幌, 2004.6.2-4.)
- 3) 依田綾子, 武内裕之, 木下勝之, 宮崎俊一:
卵活性化因子の有力候補PLC-zeta: マウス卵での発現実験による解析
日本不妊学会雑誌 Vol. 49, p. 337. 第49回日本不妊学会 (2004.10.)
- 4) Kouchi, Z., Shikano, T., Shirakawa, H., Ito, M., Fukami, K. and Miyazaki, S.:
The role of EF-hand domains in the enzymatic activity and calcium oscillation-inducing ability of phospholipase C-zeta. *Japanese Journal of Physiology*, 55, Suppl.: S73, 2005.
(ホスホリパーゼCゼータの酵素活性およびカルシウムオシレーション誘発能におけるEFハンドドメインの役割) 第82回日本生理学会 (仙台, 2005.5.18-20.)
- 5) Sone, Y., Ito, M., Shirakawa, H., Shikano, T., Kinoshita, K. and Miyazaki, S.:
Nuclear translocation of phospholipase C-zeta during early embryonic development of the mouse. *Japanese Journal of Physiology* 55, Suppl.: S74, 2005.
(マウス胚初期発生におけるホスホリパーゼCゼータの核移行)
第82回日本生理学会 (仙台, 2005.5.18-20.)
- 6) 伊藤昌彦, 曾根淑恵, 白川英樹, 鹿野朝秀, 宮崎俊一:
卵活性化精子因子候補 PLC-zeta のマウス胚初期発生における核移行能の解析
日本発生生物学会第38会大会 発表要旨集 p.199,2005 (仙台, 2005.6.1-4.)
- 7) 曾根淑恵, 伊藤昌彦, 白川英樹, 鹿野朝秀, 武内裕之, 木下勝之, 宮崎俊一:
精子由来の卵活性化因子候補ホスホリパーゼCゼータのマウス胚初期発生における核移行能
日本不妊学会雑誌 Vol. 50, p. 369,2005. 第50回日本不妊学会 (2005.10.)
- 8) Shirakawa, H., Sato, M., Umezawa, Y., and Miyazaki, S. :
Analysis of IP_3 dynamics during the intracellular Ca^{2+} oscillations in mammalian eggs.
Journal of Physiological Sciences, 56, Suppl.: S109, 2006.
(哺乳類卵細胞内 Ca^{2+} 振動時の IP_3 動態の解析) 第83回日本生理学会 (前橋, 2006.3.28-30.)

- 9) Kuroda, K., Ito M., Shikano, T., Awaji, T., Takeuchi, H., Kinoshita, K. and Miyazaki, S. :
Molecular structure responsible for nuclear translocation of phospholipase C-zeta.
Journal of Physiological Sciences 56, Suppl.: S116, 2006.
(ホスホリパーゼCゼータの核移行における分子構造の役割) 第83回日本生理学会
(前橋, 2006.3.28-30.)
- 10) 曾根淑恵、熊切順、武内裕之、木下勝之、宮崎俊一 :
卵活性化精子因子候補 PLC-zeta のマウス胚初期発生における核移行能の解析
日本産婦人科学会雑誌 58: P1-361, 2006. 第58回日本産婦人科学会, (横浜, 新潟大
2006. 4.22-25)
- 11) 黒田恵司、武内裕之、木下勝之、宮崎俊一 :
卵活性化精子因子候補ホスホリパーゼ C ゼータの核移行能に関する分子構造
日本産婦人科学会雑誌 58: P1-379, 2006. 第58回日本産婦人科学会, (横浜, 新潟大,
2006. 4. 22-25)
- 12) 伊藤昌彦、黒田恵司、鹿野朝秀、淡路健雄、武内裕之、木下勝之、宮崎俊一 :
Nuclear localization signals in phospholipase C-zeta, a mammalian egg- activating factor.
第 39 回日本発生生物学会大会 発表要旨集 p.242 (広島、広島大、2006.5.31-6.4)
- 13) Ito M., Shikano, T. and Miyazaki, S. :
Role of pronuclear translocation of phospholipase C-zeta in the cessation of Ca^{2+}
oscillations. *Journal of Physiological Sciences*, 57, Suppl.: S175, 2007.
(カルシウムオシレーション停止におけるホスホリパーゼCゼータの前核移行の役割)
第84回日本生理学会 (大阪, 2007.3.20-22.)

2. 国際学会発表

- 1) Yoda, A., Oda, S., Shikano, T., Kouchi, Z., Awaji, T., Shirakawa, H. and Miyazaki, S.:
PLC ζ expressed in the mouse egg induces Ca^{2+} oscillations and is accumulated into the
pronucleus. *The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium on New
Aspect of Phospholipid Biology* 2004, p. 40, 2004 (2004.5.10-12, Kamakura, Japan)
- 2) Oda, S., Kouchi, Z., Yoda, A., Awaji, T., Shirakawa, H. and Miyazaki, S.:
Characterization of PLC-zeta: Ca^{2+} oscillation-inducing sperm factor. 4th international
symposium on "The Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-coats". Abstr. p.
152, 2004 (2004. 11. 8-13, Shima, Mie Pref., Japan)
- 3) Ito, M., Shikano, T. and Miyazaki, S.:
Precise temporal analysis of on the cessation of Ca^{2+} oscillations and nuclear
translocation of PLCz in mouse eggs. Symposium "Cell Signaling in Gamete
Activation: from Basic Research to ART. Abstract p. 108, 2006 (2006.11. 13-15, Tokyo,
Japan)

- 4) Shirakawa, H., Ito, M. and Miyazaki, S.:
Measurement of IP₃ in mouse eggs with FRET-based probe. Symposium "*Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART. Abstract*", p. 28-29, 2006 (2006. 11. 13-15, Tokyo, Japan)

3. シンポジウム発表

- 1) Miyazaki, S., Kouchi, Z., Oda, S., Yoda, A., Awaji, T., Shirakawa, H., and Shikano, T.:
Characteristics of PLC-zeta and induction of Ca²⁺ oscillations. *Symposium on "Current topic of Ca²⁺ dynamics and regulatory molecules"*. *Japanese Journal of Physiology*, 54: *Suppl.*, S38, 2004. ホスホオリパーゼCの特性とCa²⁺オシレーション誘発. 第81回日本生理学会大会, シンポジウム『カルシウムダイナミックスと制御分子の新知見』(札幌, 2004. 6.3.)
- 2) Miyazaki, S.:
Characteristics of phospholipase C zeta as an egg-activating sperm factor candidate. 4th international symposium on "*The Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-coats*". *Abstract* p. 152, 2004 (2004. 11. 8-13, Shima, Mie Pref., Japan)
- 3) Miyazaki, S.:
Recent advance in research on the mechanism of egg activation. The International Ovarian Conference 2005. *Abstract* p. 8-9 (2005. 6. 4, Tokyo, Japan)
- 4) Miyazaki, S.:
Ca²⁺ signaling and regulation of cell cycle in mammalian fertilization. Hagiwara Memorial Lecture. *Journal of Physiological Sciences*, 56, *Suppl.*: S4, 2006. (2006.3.28-28, Maebashi, Gunma Pref., Japan)
- 5) Miyazaki, S.:
Cell signaling in mammalian fertilization. International Symposium "*Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART. Abstract*" p. 28-29, 2006 (2006. 11. 13-15, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan)
- 6) Yoda, A. and Kuroda, K.:
Structure-function analysis of Ca²⁺ oscillation-inducing activity and nuclear translocation ability of PLC-zeta. International Symposium "*Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART. Abstract*" p. 40, 2006 (2006. 11. 13- 15, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan)
- 7) Oda, S.:
Characterization of mammalian sperm factor. International Symposium "*Cell Signaling in Gamete Activation: from Basic Research to ART. Abstract*" p. 36, 2006 (2006. 11. 13-15, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan)

78) 宮崎俊一：

Ca²⁺と卵活性化. 第30回に本学術会議薬理学研究連絡委員会シンポジウム「Caシグナル研究の進歩」抄録集 p.10-11, 2005 (東京大, 2005.9.30.)

9) 宮崎俊一：

カルシウムイオンと卵活性化 東京生殖医療懇話会 要旨集 p. 1, 2006 (東京, 2006.1.12.)

Ⅲ. 総説

1) Miyazaki, S.:

Thirty years of calcium signals at fertilization. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17: 233-243, 2006.

2) Miyazaki, S. and Ito, M.:

Calcium signals and egg activation in mammals. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100: 545-552, 2006.

Ⅳ. 解説等

1) 宮崎俊一：

受精の生化学的現象

『ART 必須マニュアル』 荒木康久, 佐藤和文編, pp. 263-269, 医歯薬出版, 2005

2) 宮崎俊一：

卵活性化に関する基礎的研究の動向

『体外受精 Progress』 鈴木秋悦編 pp. 364-367, メジカルビュー社, 2005.

3) 黒田恵司 宮崎俊一：

卵の活性化のメカニズムー卵活性化における精子ファクターとカルシウムの役割ー.

産科と婦人科, 73 巻 6 号, 743-749, 2006.

4) 宮崎俊一, 尾田正二：

精子による卵活性化機構

『新編精子学』 森沢正昭・星和彦・岡部勝編 pp. 174-193, 東京大学出版会, 2006.

研究 成 果

1. 強制発現させた PLC ζ による Ca²⁺オシレーション誘起能

PLC アイソザイムの共通のドメインは、N 末端の PH domain、4 つの EF-hand domain (EF1 - EF4)、X と Y の触媒ドメイン、C 末端の C2 domain である。PLC ζ は PH domain が無く、PLC ファミリーの中で一番短い(1)。PLC ζ をコードする RNA をマウス未受精卵に注入して PLC ζ を強制発現させて Ca²⁺オシレーション誘起能を調べた(2)。PLC ζ に蛍光蛋白質 Venus (3) を連結した蛋白の cRNA を作成し、さらに卵細胞で蛋白質を強制発現させやすくするために(4)、約 200 個の poly(A)を RNA の 3'側に連結した。マウス成熟卵(第二減数分裂中期、MII)に約 5 μ l の RNA を注入した。注入 RNA の濃度は 1-200 ng/ μ l であった。RNA 注入後 30 分くらいで PLC ζ の発現が Venus の蛍光で認められ、40-50 分後に Ca²⁺オシレーションが現れた。このときの PLC ζ 発現量は 10 - 40 $\times 10^{-15}$ g/egg であり、1 個のマウス精子に含まれる推定量の範囲にあった。PLC ζ の EF1-EF3 を欠く short PLC ζ (s-PLC ζ) が恐らく splicing variant としてマウス精巣に発現している(1)。s-PLC ζ は非常に高濃度の RNA を注入した時のみ、2 時間以上の遅れをもって Ca²⁺オシレーションを誘起した。従って EF1-EF3 が酵素活性に重要な構造である。PLC ζ に類似した PLC δ 1 は高濃度の RNA 注入でも Ca²⁺オシレーションを誘起することが出来なかった。PLC ζ が特異的にしかも精子 1 個分に相当するような低い発現量で Ca²⁺オシレーションを誘起するという Saunders らの知見(1)を確認した(2)。

2. 強制発現させた PLC ζ の前核への移行と蓄積

RNA 注入によって発現した PLC ζ は 3 時間くらいの間ほぼ直線的に増加し、5 時間くらいで一定値に達した(2)。細胞内の特別な分布を示すことなく、一様に分布していた。PLC ζ によって誘起される Ca²⁺オシレーションによってマウス卵は活性化され、第二減数分裂を再開し、RNA 注入後 5 時間くらいで(雌性)前核を形成する。この前核は大きく、微分干渉顕微鏡によってきれいに認められる。前核は大きな核小体を 1 個持っている。非常に面白いことに、PLC ζ は前核に移行し、持続的に蓄積することが Venus の蛍光から明らかになった。RNA を注入した直後に媒精して受精した卵で、雌雄両前核に移行・蓄積することが分った。前核に移行した PLC ζ は核小体には移行しなかった。s-PLC ζ は前核に移行しなかった。従って EF1-EF3 が核移行にも重要な構造であることが示された。PLC δ 1 も核に移行せず、細胞膜直下の細胞質に強く分布していた。このように PLC ζ 特異的に核移行能を有していることが明らかになった。

以前 Kono らは(5)、受精後 5 時間くらいで形成される前核を摘出して新しい未受精卵と融合させると、未受精卵に Ca²⁺オシレーションが起こることを示した。Ogonuki らも(6)、前核を未受精卵に注入すると卵活性化が起こるが、1 細胞期胚の細胞質の注入では起こらないことを示している。これらの所見は、オシレーション誘発能即ち Ca²⁺ oscillation-inducing protein (COIP) が前核に移行することを示

唆している。PLC ζ が前核に移行できるということは COIP 即ち Egg-activating protein (EAP) の候補としての特性を備えていることが示された。

受精時の Ca²⁺オシレーションは、前核が形成される頃に停止する(7)。精子由来の微量の COIP が前核に移行してしまうことによって Ca²⁺オシレーションが停止するという仮説が提示された(5, 8)。前核形成を阻害するレクチンで処理した卵は、受精後の Ca²⁺オシレーションが停止せずに 10 時間以上も持続することが示された。我々の RNA 注入によって発現した PLC ζ による Ca²⁺オシレーションは、RNA 濃度が低い場合は前核形成頃に停止するが、濃度を上げた場合は前核形成前に停止してしまっただけでなく、PLC ζ の作用あるいは IP₃ レセプターに対して、PLC ζ からジアシルグリセロール、プロテインキナーゼ C (PKC) を介するネガティブフィードバックが働いていることが示唆される。従って Ca²⁺オシレーションの停止は必ずしも COIP の前核移行によるだけではないと考えられる。また PLC ζ が前核において胚発生に何らかの作用を及ぼすことも考慮しておく必要があると結論された。

3. 合成 PLC ζ の Ca²⁺オシレーション誘起能

河内がバキュロウイルス/Sf-9 細胞の発現系で、PLC ζ 、s-PLC ζ 、PLC δ 1 の合成に成功した(9)。合成 PLC ζ をマウス卵に注入すると 1 個の精子に含まれる PLC ζ 推定量の数倍くらいの量で Ca²⁺オシレーションを誘起できた(9)。蛋白合成の実験ではこのくらいのロスは免れないので、reasonable な結果と考えられる。合成 s-PLC ζ の注入では Ca²⁺オシレーションを誘起できなかった。PLC δ 1 は Ca²⁺オシレーションを誘起できるが、PLC ζ の約 20 倍の濃度を要した。recombinant PLC ζ が特異的に Ca²⁺オシレーションを誘起することは PLC ζ が COIP の候補であることの有力な傍証となった。

4. 合成 PLC ζ の *in vitro* 酵素活性の Ca²⁺依存性

PLC ζ は PH ドメインを持っていないので、既知の PLC アイソザイムと異なり、その活性化機構が不明である。また PLC ζ と PLC δ 1 の Ca²⁺オシレーション誘発能の差はどこにあるのかも分からない。PLC の酵素活性は一般に Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]) に依存することが知られている。そこで河内は合成した PLC ζ および PLC δ 1 の酵素活性 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂ の加水分解活性) を *in vitro* で [Ca²⁺] をいろいろ変えて測定した。PLC ζ は [Ca²⁺] が 10 nM という低い濃度で有意の活性を示し、静止時の細胞内濃度 [Ca²⁺]_i 100 nM で 70% 最大活性、1000 nM (1 μ M) で 100% 活性を示す。EC₅₀ は 52 nM であった。一方 PLC δ 1 は [Ca²⁺] が 1–30 μ M で活性を示し、EC₅₀ は 5 μ M であった。このように PLC ζ は PLC δ 1 に比べ約 100 倍高い感受性を持ち、静止時で既に活性を有していることが分かった。精子因子 COIP は精子から卵に導入されて、[Ca²⁺]_i の上昇に依存することなく最初の刺激になって IP₃ を産生して Ca²⁺遊離を導くものとする、PLC ζ はそれに相応しい特性を持っていることになり、PLC ζ が COIP の有力候補であることを支持する。なお PLC ζ は精子にある時は活性が抑えられている必要があると考えられる。

5. PLC ζ の酵素活性制御における EF ハンドドメインと C2 ドメインの役割

上記4と同様の手法で、N末端側の4つのEFハンドドメイン(EF1-EF4)、C末端側のC2ドメインを削除したPLC ζ の変異体を合成し、*in vitro*での酵素活性を調べた(10)。FE1削除変異体(Δ EF1)の酵素活性は正常PLC ζ の22%に減少し、2つあるいは3つの削除(Δ EF1-2、 Δ EF1-3)は3-5%に減少し、4つ削除(Δ EF1-4)では活性が全く失われた。EF1、EF2が酵素活性に重要であることが分かった。 Δ EF1をコードするRNAをマウス卵に注入して強制発現させても、Ca²⁺オシレーションは3時間待っても起こらなかった。一方、酵素活性のCa²⁺感受性は、EC₅₀[Ca²⁺]が Δ EF1-3で12倍高い濃度にシフトした。即ちEF3が失われるとCa²⁺感受性が著しく低下することから、EF3がCa²⁺感受性に大きく関与していると考えられた。C2の削除変異体(Δ C2)は酵素活性を示さず、またRNAを注入した際にCa²⁺オシレーション誘起能を失っていた(10)。N端とC端が会合しているような立体構造を持つことが必要であると考えられた。

次にPLC ζ がどのようなメカニズムで膜のイノシトールリン脂質と結合するのかを明らかにするため、C2が関与することを想定し、C2とホスホイノシタイドに対する結合性を蛋白-脂質オーバーレイアッセイ法でスクリーニングして調べた。C2はホスファティディルイノシトール(3)リン酸PI(3)Pに対して親和性を持ち、より弱い程度でPI(5)Pと結合した。しかしながらPLC ζ の基質であるホスファティディルイノシトール(4,5)リン酸PI(4,5)P₂には親和性を持たなかった。PI(3)P、PI(5)PはPLC ζ の*in vitro*酵素活性に対して抑制作用を示した(10)。C2とPI(5)P相互作用はPLC ζ の酵素活性に対してネガティブな制御をしていることが示唆された。

6. PLC ζ の細胞質/核間のシャトル運動

PLC ζ -VenusをコードするRNAをマウス成熟卵(第二減数分裂中期, MII)に注入すると、約5時間後に形成される前核に集積していく。同一の卵をM2 medium中で蛍光画像を追跡すると、RNA注入後9時間くらいは前核中の蛍光が増加し、そのあとも徐々に上がり続けた(11)。一方、RNA注入卵をM16 medium中で培養し、9時間以降各時間で培養器から取り出して蛍光測定すると、前核の蛍光は減少していくことが分かった。良い培養環境ではPLC ζ は分解されていくものと思われる。

受精6時間後に前核が出来ている1細胞期胚にPLC ζ -Venus RNAを打ち込んで、(受精後)12時間で観察するとPLC ζ は前核に蓄積されており、16時間で第一卵割が起こったときにPLC ζ は細胞質に一様に拡散していた(11)。18時間後の2細胞期に入って形成された核にPLC ζ が再び蓄積することを同一の細胞で観察した。Konoらは第一卵割においてCa²⁺オシレーションが再び起こることを示している(12)。同様の動きは第二卵割でも観察された。さらに2細胞胚にRNAを注入すると、4細胞期、8細胞期の胚の核にPLC ζ の蓄積が認められ、8細胞期の胚に注入すると、のう胚期の核に蓄積が認められた(10)。このような細胞質-核間の往復(シャトル)運動は、初期胚において細胞周期に同期するCa²⁺オシレーションのon/offに関わるのかも知れない。

7. PLC ζ の核移行能と Ca²⁺オシレーション誘起能における X/Y 接続部と EF ハンドドメインの役割

PLC ζ 分子の特定領域の 1 個 1 個のアミノ酸を置換した変異体、EF ハンドドメイン C2 ドメインを削除した PLC ζ 変異体にそれぞれ蛍光蛋白 Venus を結合した蛋白質をコードする RNA をマウス成熟卵に注入して、それぞれの変異体を強制発現させ、核移行能と Ca²⁺オシレーション誘起能を調べた(13)。Ca²⁺オシレーション誘起能を持たない変異体の場合は、受精させて前核が形成された 1 細胞期胚に RNA を注入して核移行能を観察した。核移行能は、細胞質と前核における Venus の蛍光強度の比で判定した。Ca²⁺オシレーション能は RNA 注入後 Ca²⁺オシレーション開始までの時間を指標にした。X と Y の触媒ドメインの連結部に塩基性アミノ酸であるリジン(Lys³⁷⁷, Lys³⁷⁹, Lys³⁸¹)、アルギニン(Arg³⁷⁶, Arg³⁷⁸) が豊富に存在し、これらをグルタミン酸に置換すると、Ca²⁺オシレーション誘起能は有するが、核移行能が失われた。374-383 の短いアミノ酸配列は、培養細胞 COS-7 に発現させると核に移行し、ここに核移行シグナル(nuclear localization signal, NLS)が存在することが分かった。X ドメインの C 端側および EF1 の N 末端部位にもポイント置換で核移行能が失われるアミノ酸配列があるが、これらのみでは積極的な核移行を示さなかったため、本来の NLS ではなく、二次的制御部分と考えられた。X および EF1 の点置換変異体 PLC ζ は Ca²⁺オシレーション誘起能も失われた。

EF1-EF4 のどのドメインを削除しても、核移行能も Ca²⁺オシレーション誘起能も共に失われた。C2 ドメインの削除変異体も同様であった(13)。結晶構造解析によれば、PLC δ 1 は X/Y 連結部で折れ曲がって、N 末端と C 末端が近接した立体構造を構成している(14)。PLC ζ も同様と考えると、N 末端の EF と C 末端の C2 が会合している三次元構造が、酵素活性のみならず核移行能にも必須であると結論された。

8. マウス卵における Ca²⁺オシレーションに際する細胞内 IP₃ の測定

Ca²⁺オシレーションは、IP₃ レセプター/Ca²⁺チャネルを介する小胞体からの反復性の Ca²⁺遊離によるが、このとき Ca²⁺遊離を誘起する IP₃ は反復性に増加(オシレーション)しているのか、あるいは持続的に増加しているのかは、興味深い問題である。この実験では、cyan fluorescent protein (CFP) と yellow fluorescent protein (YFP) 間の fluorescence resonance energy transfer (FRET) を基にして細胞内 IP₃ 濃度 ([IP₃]_i) を測定した(15)。実際には CFP と YFP の間に IP₃ レセプターの IP₃ 結合部位を挿入して連結した蛋白質をプローブとした(16)。これに IP₃ が結合すると CFP から YFP への FRET が減少する。従って 450 nm の波長光で CFP を励起した場合、CFP 自身の 480 nm の蛍光 C と、CFP→YFP の FRET で生じた 535 nm の蛍光 Y の比 C/Y を記録すると、IP₃ 濃度上昇に際して C/Y が増加する。IP₃ に対する親和性が高いプローブ fretino-2 と、コントロールとして低いプローブ fretino-3 を作成した。マウス卵に、fretino をコードする RNA を注入して発現させ、IP₃ の注入で C/Y の増加を確認した。受精時の Ca²⁺オシレーションの最中に fretino-2 も fretino-3 も C/Y が持続的に減少してアーチファクトであったが、1 回目の増加を詳細に比較すると fretino-2 で C/Y が僅かに増加するのが分かった。受精ではなく、PLC ζ の RNA

注入で強制発現された PLC ζ によっておこる Ca²⁺オシレーションの最中でもアーチファクトが起こったが、2時間以上経つと個々の Ca²⁺増加に引き続いて C/Y の一過性の増加と、ベースレベルの C/Y の増加が認められた。Ca²⁺の増加によって PLC ζ の活性が上がり IP₃ の産生が一過性に高まるものと思われる。未受精卵で CaCl₂ を注入した際に、[IP₃]_i の上昇が認められた。また受精卵に CaCl₂ を注入した場合、[IP₃]_i の上昇は卵に入った精子数に依存して大きくなった。これらの結果から、PLC ζ が IP₃ を産生する経路を刺激する精子ファクターであり、[Ca²⁺]_i 上昇が PLC ζ の活性を上げて [IP₃]_i の上昇をもたらすことが、Ca²⁺オシレーションの維持に重要であると考えられる。

9. PLC ζ ノックアウトマウスの作成

受精時に PLC ζ が本当に COIP として機能しているかどうかの確証を得るためには、PLC ζ の遺伝子ノックアウトマウスを作成し、その精子を用いて受精させたときに、精子は卵内に入っても、Ca²⁺オシレーションが起らず、卵が活性化されないことを確認することが有効である。PLC ζ -Venus と s-PLC ζ -HcRed とを融合した蛋白質を発現する **targeting vector** を構築し、これを ES 細胞染色体上の PLC ζ 遺伝子のプロモータ下流に組み込んだ。目的とする組み換えが起きていることをサザン解析およびゲノミック PCR にて確認した。この ES 細胞を用いてキメラマウスを作出し、交配を行うことにより置換遺伝子を持つヘテロマウスを得た。また、ヘテロマウス同士の交配により遺伝子置換ホモマウスの作出に成功した。これらのマウスにおいて蛍光蛋白質を融合した PLC ζ が発現していることを RT-PCR により確認した。

上記の PLC ζ 遺伝子置換マウスの組み換え領域には LoxP 配列が挿入してある。したがって Cre リコンビナーゼを発現させることで、組織特異的な遺伝子欠損を誘導することができる。現在、 β -actin プロモータ誘導による全身性の PLC ζ 遺伝子欠損マウスと、protamine プロモータ誘導による精巣特異的な PLC ζ 遺伝子欠損マウスの作出した。今後これらのマウスを用いて、PLC ζ の精巣での発現時期および部位などの観察や、PLC ζ 遺伝子欠損精子の Ca²⁺オシレーション誘起能を検証する。また、PLC ζ 遺伝子トランスジェニックマウスを作出し、PLC ζ 遺伝子欠損による表現型が回復することを確かめる。