

哺乳動物受精時の精子由来の卵活性化蛋白質の同定

(課題番号 13470010)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))

研究成果報告書



平成16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)



哺乳動物受精時の精子由来の卵活性化蛋白質の同定

(課題番号 13470010)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))

研 究 成 果 報 告 書

平成16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

受精の本質は、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。この際に必須の現象は、減数分裂のある時期（動物種によって異なる）に停止していた卵子が受精によって細胞分裂を再開することであり、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重要課題であるが、しかし未だ解明されていない。

研究代表者らは20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、卵細胞内 Ca^{2+} の増加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+} 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、哺乳動物未受精卵は第二減数分裂の中期に停止しており、受精時のCa²⁺増加反応によって減数分裂を再開することである。さらに長時間持続するCa²⁺オシレーションは、前核形成、細胞周期に関与することが示唆されている。

研究代表者らは、Ca²⁺増加のメカニズムについてハムスター卵のCa²⁺波とCa²⁺オシレーションがイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP₃) 受容体/Ca²⁺チャネルを介する小胞体 (細胞内Ca²⁺貯蔵器官) からのCa²⁺遊離によることを、IP₃受容体に対する単クローン抗体の抑制作用を利用して実証した (J. Cell Biol. 1988; Science 1992)。また、細胞外から細胞内へのCa²⁺流入もおこり、小胞体にCa²⁺を補給して反復性のCa²⁺遊離を可能にすることを見いだしており (Cell Calcium, 1989)、IP₄によって活性化されるCa²⁺流入経路の存在を示唆する結果を得ている (Cell Calcium, 1995)。また、小胞体の分布およびIP₃誘発性Ca²⁺遊離機構が卵成熟の過程で発達して正常な受精を可能にすることを明らかにした (Dev. Biol. 1993; 1995)。細胞内情報伝達機構に関しては、GTP結合蛋白質-ホスホリパーゼC (PLC)の活性化-IP₃の産生経路を示唆する結果を得たが (J. Cell Biol. 1988)、確証には至っていない。

上述のとおり、現在最も重要なテーマは、精子どのような分子がどのような機構で卵内Ca²⁺増加を誘発するのかということである。仮説としては第一に、精子と卵子の細胞膜上の蛋白質が結合し、そのシグナルが卵細胞内に伝達されるという"精子受容体説"がある。我々も数年に亘ってこの分子を追及したが、未だ証拠が得られていない。他方、Swannがハムスター精子抽出物を卵内に注入するとCa²⁺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。これにより哺乳類精子あるいは精巣から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、1995年にはCOIPとして精子細胞質蛋白質"オシリン"が精製・クローニングされた。しかしながらオシリンは間違いであったことが判明した。我々の研究グループもEAPの精製に参画した。

重要なポイントは、COIPは即ち精子由来の卵活性化蛋白質 (Egg-activating protein; EAP) と考えられること、ハムスター精子抽出物が種を越えて他の哺乳動物卵に Ca^{2+} オシレーションを誘発するばかりでなく、神経細胞や肝細胞にも有効であり、 Ca^{2+} 動態に関わる普遍的物質である可能性が強いことである。 Ca^{2+} 波、 Ca^{2+} オシレーションは多くの体細胞で種々の刺激に対する一般的反応パターンとされている。これまでに、時空間的な Ca^{2+} 動態に関して、卵細胞での知見が先駆的な役割を果たしてきている。卵細胞は微量注入に適し、詳細な Ca^{2+} 画像解析が可能であるという利点がある。従ってEAPを同定することは、生物学的に重要な受精機構解明の本質的課題であると同時に、 Ca^{2+} 動態に関わる刺激あるいは制御因子として細胞生物学一般に意義あるものと考えられる。

他方、哺乳動物の受精のメカニズムに関する基礎的研究と体外受精の技法は、畜産領域のバイオテクノロジーや、産婦人科学領域の

不妊治療への応用という重要な側面をもつ。現在 ICSI は男性不妊の治療として盛んに行われている。さらに未熟精子の注入も試みられている。EAP はこれらの手法に応用できる可能性がある。

本研究は、ハムスター精子あるいはブタ精巣の抽出物から COIP 即ち EAP を分離し、卵内に注入して Ca^{2+} オシレーション誘発活性を画像解析を用いて検定しつつ精製し、COIP の cDNA をクローニングすることを目的とした。同時に、精子形成の段階で EAP がどの時期に発現するか、受精したのち EAP はどのような経過をたどるかを調べた。さらに卵表面蛋白質 CD9 の精子-卵の融合への関与、精子の卵内への取込みに関与する卵表層細胞質のアクチンフィラメントを制御する小分子 GTP 結合蛋白質についての実験を行い、結果を論文に発表した。実際には EAP の精製は極めて難しく、まだどの研究室でも成功していない。他方、 Ca^{2+} 増加は IP_3 受容体を介する小胞体からの Ca^{2+} 遊離であるから、 IP_3 を産生する酵素である PLC が EAP の候補であると予測しての実験が進められていた。2002 年、Saunders らは新しい PLC のサブタイプ、PLC ゼータ (PLC ζ) が COIP の有力候補であるという論文を発表し、研究の局面は PLC ζ が受精時の本当の EAP かを確認する方向に展開した。我々の研究グループも対象を PLC ζ に移し、PLC ζ が EAP の有力候補であることを支持する結果を得、論文に発表した。

以上の研究結果の要約は以下のとおりである。

- 1) 精子又は精巣の抽出物を各種クロマトグラフィーで順次分離し、各画分をマウス卵に注入して Ca^{2+} オシレーション誘起活性を記録しながら EAP の精製を進めた。精製の段階が進につれ EAP 活性は喪失し、相補性の 2 成分の存在が示唆された。

- 2) 卵表面蛋白CD9欠損卵では精子-卵融合が起らずCa²⁺オシレーションが起らない。CD9を強制発現するとこれらの機能が回復することを示し、CD9が精子-卵融合に必須であることを確認した。
- 3) マウス精子を卵内に注入しても卵活性化が起るが、未だべん毛が形成されていない円形精子細胞では起らず、EAPが円形精子細胞から精子に分化する際にEAPが発現することを示した。また受精卵でEAPはどこに分布するかを、受精卵の細胞質あるいは前核をピペットに吸い込み、これを未受精卵に注入して卵活性化が起るか否かを調べた。精子由来のEAP活性は受精卵の細胞質から前核に集積することを示した。
- 4) 精子-卵融合から精子の取込みにはアクチンフィタメントが関与し、その制御には小分子G蛋白質の中のRhoが関与していることを*Clostridium difficile* 毒素Bを用いて証明した。
- 5) PLC ζ と蛍光蛋白質を結合したRNAをマウス卵に注入して発現させるとCa²⁺オシレーションを誘発すること、前核に集積することを見いだした。
- 6) バキュロウイルス/Sf9細胞系でPLC ζ を合成し、マウス卵に注入してCa²⁺オシレーションを誘発できた。PLC ζ の酵素活性は非常に低いCa²⁺濃度で活性があることを明らかにした。

研究は東京女子医科大学医学部第二生理学教室に於て行われ、一部は理化学研究所・順天堂大学・東京工業大学・東京大学医科学研究所と共同実験の形態をとった。これにより後述の成果が得られた。本研究は今後の研究の発展に繋がる有用な実験データを提供したことで、成果をあげたと考える。

研究組織，研究經費

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：尾田正二（同 助手）

河内 全（同 助手）

淡路健雄（同 講師）

研究經費

平成13年度 6, 200 千円

平成14年度 4, 200 千円

平成15年度 3, 800 千円

計 14, 200 千円

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)

竹内裕之氏 (同 助教授)

熊切 順氏 (同 大学院生)

依田綾子氏 (同 大学院生)

御子柴克彦氏 (東京大学医科学研究所脳神経発生分化部門教授)

竹縄忠臣氏 (同 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)

工藤 明氏 (東京工業大学生命科学教授)

梶 圭介氏 (同 大学院生)

小倉敦郎氏 (理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター
遺伝工学基盤技術室長)

越後貫成美氏 (同 研究員)

白川英樹氏 (東京女子医科大学医学部第二生理学助手)

鹿野朝秀氏 (同 技官)

研究発表

I. 発表論文

1. 学会誌等

- 1) Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikano, T, Oda S, Miyazaki S and Ogura A:
Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkeys and its localization after oocyte activation. *Biology of Reproduction*, 65: 351-357, 2001.
- 2) Kaji K, Oda S, Miyazaki S and Kudo A:
Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Developmental Biology*, 247: 327-334, 2002.
- 3) Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K and Miyazaki S:
Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B. *Developmental Biology*, 260: 522-535, 2003.
- 4) 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*, in press, 2004.
- 5) 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*, in press, 2004.

II. 口頭・ポスター発表

1. 国内学会発表

- 1) Kouchi Z, Hirose K, Shirakawa H, Iino M and Miyazaki S:
Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in mouse eggs using GFP-PHD probe.
Japanese Journal of Physiology 52, Supplement: S50, 2002.
(GFP融合PHドメインによるマウス卵のイノシトールリン脂質動態の解析)
第79回日本生理学会大会 広島市, 広島大, 2002, 3月
- 2) 会田拓也, 武内裕之, 宮崎俊一, 木下勝之:
マウス未成熟卵における蛍光蛋白質を利用した蛋白発現法の検討
日本産婦人科学会雑誌: p. 546, 2002. 第54回日本産婦人科学会 東京,
日本医大, 2002, 4月
- 3) 梶圭介, 尾田正二, 宮崎俊一, 工藤明:
poly (A) mRNA injection によるCD9欠損卵の受精能回復
*日本発生生物学会第35回大会発表要旨集*p.147 横浜, 2002, 5月
- 4) Kumakiri J, Oda S and Miyazaki S:
Involvement of Rho small G proteins in mouse fertilization.
Zoological Sciences, 19: 1442, 2002.
マウス受精における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の関与
日本動物学会第73回大会 金沢市, 金沢大, 2002, 9月
- 5) Kumakiri J, Oda S, Shikano T, Kinoshita K and Miyazaki S :
Clostridium difficile toxin B inhibits mouse egg fertilization: evidence for
the participation of Rho family G protein in sperm incorporation.
Japanese Journal of Physiology 53, Supplement: S138, 2003.
(*Clostridium difficile* toxin B はマウスの受精を阻害する: Rho ファミリー
低分子量G蛋白質が精子取込みに関与する証拠)
第80回日本生理学会大会 福岡市, 福岡大, 2003, 3月
- 6) 熊切順, 尾田正二, 会田拓也, 武内裕之, 木下勝之, 宮崎俊一 :
マウス卵への精子取り込み過程に対するRhoファミリー低分子量G蛋白質
/アクチンフィラメント系の関与. *日本産婦人科学会誌*55: S-181, 2003.
第55回日本産婦人科学会, 福岡市 九州大, 2003, 4月

- 7) 熊切順, 尾田正二, 会田拓也, 武内裕之, 木下勝之, 宮崎俊一:
 マウス卵の精子-卵相互作用におけるRhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質/アクチンフィラメント系の関与 第20回日本受精着床学会学術講演会, 講演抄録集 p. 176, 東京, 東邦大, 2003, 10月
- 8) 尾田正二, 依田綾子, 淡路健雄, 河内全, 鹿野朝秀, 宮崎俊一:
 哺乳類卵における外来遺伝子発現および発現の定量化の試み
 Effective and quantitative expression of exogenous genes in mouse eggs. 第26回日本分子生物学会 講演要旨集 p.155, 神戸, 2003, 12月
- 9) 依田綾子, 武内裕之, 木下勝之, 宮崎俊一:
 卵活性化精子因子の有力候補PLC-zeta: マウス卵での発現実験による解析 日本産婦人科学会誌 56: S-497, 2004. 第56回日本産婦人科学会, 東京, 慶應義塾大, 2004, 4月発表予定
- 10) 依田綾子, 尾田正二, 鹿野朝秀, 河内全, 淡路健雄, 白川英樹, 木下勝之, 宮崎俊一:
 ホスホオリパーゼCゼータのCa²⁺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月発表予定
- 11) 河内全, 深見希代子, 鹿野朝秀, 尾田正二, 中村義和, 竹縄忠臣, 宮崎俊一:
 PLC-zetaは高いCa²⁺感受性と哺乳動物卵におけるCa²⁺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月発表予定

2. 国際学会発表

- 1) Oda S, Aida T, Awaji T and Miyazaki S:
 Efficient expression of an exogenous GFP variant in mouse oocytes.
 Gordon Research Conference on *Fertilization and Activation of Development*. Plymouth, New Hampshire, USA, 2001, 7月
- 2) Oda S, Kumakiri J, Shikano T, Kinoshita K and Miyazaki S:
 Evidences of involvement of Rho family small G proteins in sperm-egg interaction in mouse fertilization: *Clostridium difficile* toxin B inhibits sperm incorporation into mouse egg.
 Gordon Research Conference on *Fertilization and Activation of Development*. Plymouth, New Hampshire, USA, 2003, 7月

3. シンポジウム発表

1) Miyazaki S:

Physiological characterization of mammalian sperm factor.

Gordon Research Conference on "*Fertilization and Activation of Development*". Program p. 2, Plymouth, New Hampshire, USA, 2001, 7月

2) 宮崎俊一 :

卵活性化のメカニズム. Reproductive Biology Tokyo Symposium, 要旨集 p.24-25, 東京, 2003, 7月

3) Oda S, Kouchi Z, and Miyazaki S:

Mammalian egg-activating sperm factor.

International Symposium on "*The Biology of Sperm Cell —from basic to clinical aspects —*". Program p. 37-38, Tokyo, 2004, 1月

III. 解説等

1) 尾田正二, 宮崎俊一 :

卵子の活性化 特集『卵をめぐる最近の話題』

産科と婦人科, 69巻10号, 1303-1310, 2002.

2) 宮崎俊一 :

受精卵におけるカルシウム増加と卵活性化

生体の超微細構造の直接観察法と分子構造制御技術に関する基礎調査委託事業報告

農林水産技術情報協会 58-64, 2003.

研 究 成 果

1. 卵活性化蛋白質の精製

哺乳動物の受精卵は細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇を反復しておこす。これは Ca^{2+} オシレーションと呼ばれる。この Ca^{2+} オシレーションは卵活性化の引き金になる¹⁾。精子細胞質に存在すると考えられる Ca^{2+} オシレーション誘発蛋白質^{2,3)} (Ca^{2+} oscillation-inducing Protein; COIP) はすなわち卵活性化因子 (Egg-activating Protein; EAP) であり、その同定は受精のメカニズム解明のための本質的な研究課題である。本研究ではハムスター精子あるいはブタ精巢の抽出物から COIP を分離し、種々のクロマトグラフィーで得られた各画分をマウス卵内に微量注入して Ca^{2+} オシレーションを誘発するか否かを画像解析を用いて記録し、 Ca^{2+} オシレーション誘発活性を検定しつつ COIP を精製し、得られた COIP の cDNA をクローニングすることを目的として行われた。

1) 精製初期標本

ゴールデンハムスターのオス 8 匹または 16 匹の精巢上体から精子を試験管内に採取し、Tyrode 類似液に加えて泳ぎ出した精子を回収した。この精子をフレンチプレスによって破碎後、超遠心して (90,000 g, 90 min) 上清を回収した。これとは別に、ブタ精巢 1 匹分 (500 g) を用いダウンスホモジェナイザーで破碎後超遠心処理を行い、上清を回収した。これらを精製の開始サンプルとした。

2) ハムスター精子からの COIF の精製

(1) 硫安分画

Ca²⁺ オシレーション誘発活性は30~60%の硫安濃度の条件下で沈査に回収された。

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

COIF活性は300-400 mM KCl で溶出される画分にあり、150 mM KCl で溶出される画分にCa²⁺ オシレーションではなく一過的のCa²⁺ 濃度上昇を誘発する強い活性があった。

(3) 陽イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換クロマトグラフィーでの150 mM KCl 溶出画分を陽イオン交換クロマトで分離すると、活性は素通り画分(A)と200-250 mM KCl 溶出画分(B)とに分離された。両画分は夫々単独では活性を示さず、両者を混合して注入した場合にCa²⁺ オシレーションが誘発された。A, Bは陰イオン交換クロマトでの300-400 mM KCl 溶出画分を陽イオン交換クロマトで分離した場合の画分A, Bと互換性があった。

(4) ゲル濾過クロマトグラフィー

上記(3)の吸着画分をゲル濾過カラム (Sephacryl S-200) にかけると、活性は分子量 70kDa を中心に広い範囲に回収された。

(5) 疎水クロマトグラフィー

上記(3)での吸着画分をResorce Phenyl カラムにかけると、活性はほぼ100%回収された。

ハムスター精子からの COIF の精製において、ステップ2の陰イオン交換クロマトグラフィーおよびステップ3の陽イオン交換ク

ロマトグラフィーの結果から、単独では活性を示さない少なくとも2種類のタンパク質、Factor A, Factor B により構成されていることが示唆された。Factor A は一過性のCa²⁺ 濃度上昇を強力に誘発し、Factor B は持続的なCa²⁺ オシレーションを誘発するのに必要と推測され、これら2つのFactor の相乗作用によって受精時に見られるような数時間に及ぶCa²⁺ オシレーションが引き起こされているものと考えられる。それらの分子量はともに70 kDa 前後と推測され、phospholipase C zeta⁴⁾ (PLC ζ ; 後述) の分子量とよく一致するが、Factor A, B のどちらがPLC ζ であるかは明らかにするに至っていない。

上述のとおり、ハムスター副辜丸から得られる精子量が少ないためサンプル量が充分でなく、各種クロマトにかけていく段階で喪失してしまう。我々は初期サンプル量を圧倒的に多くして大スケールで精製するため、ブタ精巣から分離を始めた。

(1) 硫安分画

(2) 疎水クロマト：Butyl-Toyopearl カラムを用い、15-20%硫安濃度で溶出される COIP 活性がある画分を回収した。

(3) アフィニティークロマト：Red Sepharose カラムに吸着させて10mM KCl による素通り画分に COIP 活性を回収した。

(4) ゲル濾過：Sephacryl S300カラムにかけ、分子量40-60kDa の溶出位置に単一のピークとして COIF 活性が認められた。

(5) 陰イオン交換クロマト：Resource Q カラムにかけて350-400mM KCl で溶出される COIP 活性をもつ単一ピーク画分を回収した。

ブタ精巣からの精製でも以下の問題点があった。一つは Ca^{2+} オシレーション誘発活性のみで COIP 活性の強弱をアッセイしているため、目的の画分による Ca^{2+} 増加反応が単一の COIP に由来するか否かが不明な点にある。(1)-(3)の過程で精巣中に存在する複数の COIP 活性をもつ蛋白をほぼ単一にすることができると考えられ、この画分をさらに精製することが可能である。しかしながら、第二の問題は、アッセイにかなりの蛋白質濃度を必要とすることがある。500g 以上の精巣を用いても、5 までの精製過程で最終的に Ca^{2+} 増加反応を検出するためには 20 micro liter ほどに濃縮しなければならず、5 の手順を経てもバンドが複数あることを考えると、量的な制約はかなり大きく、精製を次のステップに進めることができなかった。

今後の指針：

哺乳動物精子由来の COIP あるいは EAP の実体解明のためには、PLC ζ に対する抗体を用いたウェスタンブロッティング法および免疫沈降法によって、Factor A, B のどちらが PLC ζ であるかを今後明らかにする必要がある。また PLC ζ ではない方の Factor の実体を明らかにすることも必須であり、そのためには本研究で確立したハムスター sperm factor 精製プロトコールが今後大きく役立つものと考えられる。

さらにリコンビナント PLC ζ を用いて、哺乳類 EAP と両生類イモリ、原索動物ホヤの EAP とを比較し、それらの相同性・相補性を確認することにより、受精の分子メカニズムの理解をさらに進め、また生物における受精機構の多様性がいかにして形成されてきたのかを明らかにすることにつながると考えられる。

参考文献

1. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphatereceptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158: 62-78, 1993
2. Whitaker M, Swann K. Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117: 1-12, 1993.
3. Swann K. Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. *Rev Reprod* 1: 33-39, 1996.
4. Saunders CM, Larman M., Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544, 2002.

II. 精子における卵活性化蛋白質の発現時期および受精卵 における同蛋白質の局在

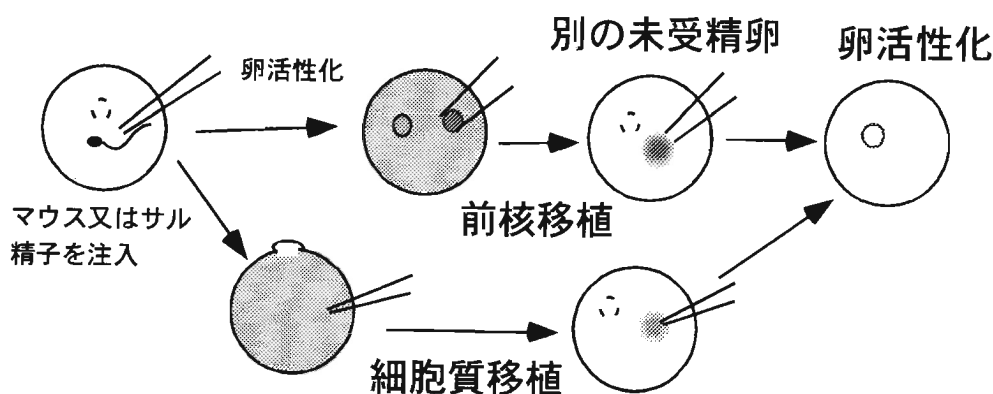
哺乳動物の1個を卵子内に注入すると (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI), ある遅れののち Ca^{2+} オシレーションがおり、卵活性化がおり、受精する¹⁻³⁾。このことは Ca^{2+} オシレーション誘発性蛋白質(Ca^{2+} oscillation-inducing protein; **COIP**)すなわち卵活性化蛋白質(Egg-activating Protein; **EAP**)が精子に存在することを強く示唆する。我々はEAPが精子形成のどの時期に発現するかを、霊長類のサル(マカクサル; *Macaca fascicularis*)とマウスの精子で調べた。具体的にはいろいろな精子形成段階の細胞をマウス卵内に注入し、 Ca^{2+} オシレーションの誘発の有無および卵活性化(第二極体の形成および雌雄前核の形成)の有無を調べた。

マウスでは、第二減数分裂は終了しているが未だべん毛が形成されていない精子細胞(円形精子細胞; **round spermatid**)はすでにDNAは完成しており、受精能を備えている⁴⁾。しかしながら円形精子細胞を卵子に注入した場合、 Ca^{2+} オシレーションがおこらず、卵活性化も起らなかった。従ってEAPは円形精子細胞から精子に分化する途中で発現すると考えられる。一方サルにおいては、円形精子細胞も、第一減数分裂に入る前の一次精母細胞(**primary spermatocyte**; DNAレベルでは受精能を備えていることがマウスで調べられている⁵⁾)の卵内注入でも約80%の卵で卵活性化が起った。一次精母細胞の早期の細胞を注入すると卵活性化率は24%に減少したので、EAPはこのあたりの時期に発現すると考えられる。マウス

に比べ早い時期に発現しているといえる。

卵内に注入する精子は、注入前にべん毛運動を停止させるため注入ピペットで押さえつける操作を行う（不動化）。このとき精子細胞膜の一部は損傷される。従って卵内に注入された精子からEAPが漏出してきて、卵細胞質にある小胞体から Ca^{2+} を遊離させると考えられる。マウス受精卵で細胞質あるいは前核をピペットに吸引し、新たな別の未受精卵にこれを注入すると（細胞質移植あるいは核移植）、前核を移植した場合に Ca^{2+} オシレーションを誘発することが示されている⁶⁾。受精卵の Ca^{2+} オシレーションは前核が形成されるころに消失することが知られており^{6, 7)}、EAPが細胞質から前核に移行するために Ca^{2+} オシレーションが停止するのであろうと推測されている^{6, 8, 9)}。マウスあるいはサルの精子を注入したマウス卵において、EAPがどこに局在しているかを、同様の移植実験で調べた（図1）。

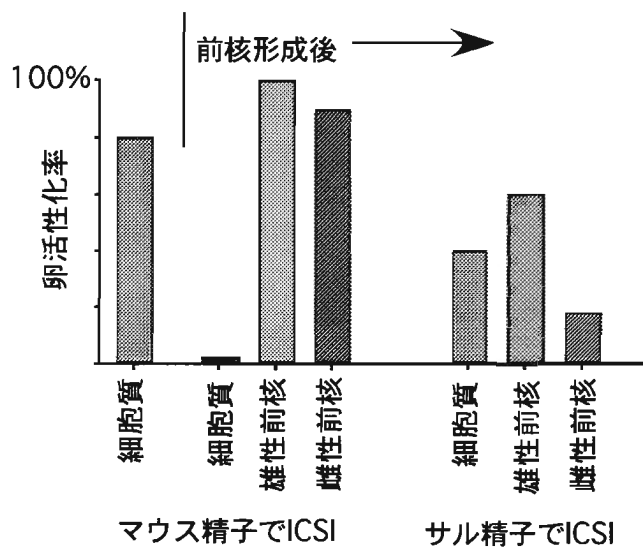
図1 ICSIした卵の細胞質・核移植



マウス精子を用いた ICSI によって活性化された卵が第二極体を形成する直前ころの細胞質を別の未受精卵に注入すると、80%の卵

で卵活性化を誘発した（図2）。つまりEAPは卵細胞質にある。前核が形成された時期では、雌雄前核とも移植により卵活性化能を有していたが、細胞質には既に卵活性化能をもたなかった（図2）。

図2 精子由来の卵活性化蛋白質の前核への移行



精子を用いずに人為的にCa²⁺オシレーションをおこして活性化した卵の（雌性）前核は、卵活性化能をもたなかった。従って精子由来のEAPは、ICSIののち卵細胞質にあり、そのあと形成された前核に移行することが確認された。サルの精子をマウス卵にICSIした場合は、雄性前核の移植で60%、雌性前核の移植で20%の卵活性が起った（図2）。マウス精子-マウス卵に比べサル精子-マウス卵の系ではEAPの核移行、特に雌（マウス）前核への移行が低下していることが分った。

これらの実験は国立感染症研究所（当時）の小倉氏らと共同して行い、これらの所見をまとめて論文に発表した¹⁰⁾。

参考文献

1. Sousa M, Mendoza C, Barros A, Tesarik J. Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Hum Reprod* 2: 853-857, 1996.
2. Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y, Miyazaki S. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod* 3: 1087-1093, 1997.
3. Sato MS, Yoshitomo M, Mohri T, Miyazaki S. Spatiotemporal analysis of $[Ca^{2+}]_i$ rises in mouse eggs after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 26: 49-58, 1999.
4. Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 121, 2397-2405, 1995.
5. Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 53: 855-862, 1995.
6. Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG. Nuclei from mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development* 121: 1123-1128, 1995.
7. Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T, Miyazaki S. Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev Biol* 218: 299-313, 2000.

8. Kono T, Jones KT, Bos-Mikich A, Whittingham DG, Carroll J. A cell cycle-associated changes in Ca^{2+} releasing activity leads to the generation of Ca^{2+} transients in mouse embryos during the first mitotic division. *J Cell Biol* 132: 915-923, 1996.
9. Marangos P, FitzHarris G, Carroll J. Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 130: 1461-1472, 2003.
10. Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikao T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A. Activity of sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkey and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod* 65: 351-357, 2000.

III. 精子-卵融合に関わる分子機構

マウス精子-卵融合に関与するCD9分子

哺乳動物では精子が卵表面の微絨毛に結合し、精子頭部の赤道領域付近の細胞膜と卵細胞膜が最初に融合する。融合した細胞膜が崩壊して精子-卵細胞質の交流ができ、精子核および細胞質は卵内に取り込まれる。精子-卵融合に関わる表面蛋白質として、精子細胞膜上に存在するファーティリン¹⁾、卵細胞膜上の細胞接着蛋白質インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ ²⁾などが知られている。東京工業大学生命科学の工藤明教授の研究室では、transmembrane-4スーパーファミリーに属する表面分子CD9の遺伝子ノックアウトマウスを作成した。CD9はインテグリンなどの膜蛋白と相互作用する分子であり、細胞運動や細胞接着に関与すると考えられている³⁻⁵⁾。工藤教授らはCD9欠損マウスが不妊であることに気づき、その原因を探るため我々との共同実験を行った。それによりCD9欠損卵では精子-卵の融合が起らないことを明らかにし、論文に発表した⁶⁾。

本研究では、CD9欠損マウス卵にCD9あるいは類似蛋白質を強制発現させて、受精能が回復するか否かを観察した。未受精卵では減数分裂に必要な蛋白質以外はRNAからの翻訳が抑制されており、体細胞のように強制発現できない。そこでマウス卵で任意の蛋白質を発現させる方法として、我々はすでにその蛋白質をコードするRNAに長いpoly(A)を連結し(200~250個)、これをマウス卵に注入する方法を確立した⁷⁾。この方法を用いてCD9欠損マウス卵にマウスCD9と蛍光蛋白質 **green fluorescent protein** (GFP)の変異体EGFPを連結したRNAを注入し、CD9を強制発

現した。発現した CD9 は連結した EGFP の蛍光で可視化されて確認された。

実際には未成熟卵に CD9 RNA を注入し、*in vitro* で成熟させ、成熟した卵の透明帯を除去してから媒精した。受精は第二極体の出現で確認した。CD9 ノックアウト卵は受精率ゼロ%であるが、CD9 を発現させた卵を媒精すると、受精率は80%に回復した。これにより、CD9 が精子-卵融合に必須であることが確認された。同様にヒト CD9 を強制発現すると、受精率は80%であった。ヒト CD9 はマウス CD9 と同様に卵表面の微絨毛に局在を示し、結合した精子頭部を取り囲むように分布していた。ヒト CD9 も精子-卵融合に必須の役割を果たしていることがわかった。関連分子でマウス CD81 を発現させた場合は受精率は40%であり、受精能の回復が半数近くの卵で認められた。CD81 は CD9 の代償的な役割を果たすと考えられる。

正常卵でも CD9 の抗体の存在下では受精が阻害される。正常卵にヒト CD9 あるいはマウス CD81 を過剰発現させると受精能は80%に上昇した。これらの結果からも、精子-卵融合に対するマウス CD9、ヒト CD9、マウス CD81 の役割が確認された。結果をまとめて論文に発表した⁸⁾。

なお、CD9 ノックアウト卵は精子-卵融合ができないわけであるが、これらの卵では Ca^{2+} 増加反応は全く起らなかった。このことは COIP が細胞質の交流を介して卵細胞質に移行し、最終的に小胞体からの Ca^{2+} 遊離を誘発することを強く支持するものである。

参考文献

1. Cho C et al. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 281: 1857-1859, 1998.
2. Almeida EAC et al. Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 81: 1095-1104, 1995.
3. Hadjiargyrou M, Patterson PH. An anti-CD9 monoclonal antibody promotes adhesion and induces proliferation of schwann cells *in vitro*. *J Neurosci* 15: 578-583, 1995.
4. Wright MD, Tamlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 15: 588-596, 1994.
5. Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1287: 67-71, 1996.
6. Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genet* 24: 279-282, 2000.
7. Aida T, Oda S, Awaji T, Yoshida K, Miyazaki S. Expression of a green fluorescent protein variant in mouse oocytes by injection of RNA with an added long poly(A) tail. *Mol. Hum Reprod* 7: 1039-1046, 2001.
8. Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 247: 327-334, 2002.

IV. 精子の卵への取込みに対するRhoファミリーG蛋白質を介するシグナリングの関与

精子因子は精子-卵融合によって卵細胞質にもたらされ、 Ca^{2+} オシレーションを誘起し、それによって卵活性化を誘発すると考えられる。受精時の精子-卵融合（細胞質間の交流の形成）と精子の卵内取込みの際に、卵細胞表面では細胞骨格（cytoskeleton）を介する活発な微細構造変化が起っているはずである。特にアクチンフィラメントが関与していることが、その重合阻害剤であるサイトカラシンBあるいはDの存在下で精子取込みのが阻害されるによってハムスター¹⁾、ブタ²⁾、ウシ³⁾で示されている。マウスではアクチンフィラメント阻害剤によって1個の卵に融合する精子数が減少するという報告⁴⁾と、精子-卵融合は阻害されないという報告⁵⁾があり、所見が一致していない。また、精子-卵の結合によって刺激を受けてから、卵細胞内骨格の変化に至るまでのシグナル伝達機構に関する知見は殆どない。

我々は小分子GTP蛋白質（G蛋白質）のひとつであるRhoファミリー蛋白質に焦点をあて、その関与を調べた。Rhoファミリー蛋白質はアクチンを基盤とする細胞骨格の構築の調節に関与することがよく知られているからである。その主要なメンバーは Rho, Rac, Cdc42 である。Rho は成長因子の刺激に際して局所的な接着やアクチンストレスファイバーの集積を調節し、Rac は細胞膜のラフリングや lamellipodia の形成を促し、Cdc42 はフィロポディアの形成を誘発する⁶⁾。卵細胞にRhoファミリー蛋白質が存在することを報告した論文は1つしかない。それによると Rho を阻害する

Clostridium botulinum C3 毒素によってADPリボシル化される蛋白がマウス卵に存在すること、この毒素によって受精後の第二極体の分裂と2細胞期への分裂が抑制されることを示している⁷⁾。

本研究では、Rho が精子の卵内への取込みに関与することを、Rhoの阻害剤である*Clostridium difficile* 毒素B⁸⁾による阻害で調べた。

透明帯を除去したマウス卵にCa²⁺結合性蛍光色素 fura-2 を取り込ませ、毒素Bを注入してから媒精し、Ca²⁺オシレーションを記録した。Ca²⁺オシレーションの発生によって精子-卵融合がおこった時点を知ることができる。媒精100分後にDNA染色色素を卵に注入し、それが精子に移行して精子核を染めるかどうかで、精子が卵に融合していることを確認した。また卵内に取り込まれた精子は、染まった染色体が脱凝縮(decondensation)をおこしていることで判定した。

Clostridium difficile 毒素Bを注入した卵はCa²⁺オシレーションをおこす例が有意に減少した。特に精子が卵内に取り込まれた例が著明に減少した。精子が融合した卵でも、卵1個あたりの融合精子数は毒素Bの用量依存性に減少し、取り込まれた精子数は著明に減少した。これを詳細に観察すると、卵と融合した精子がそのまま卵表面に留まっていて卵内に取り込まれない状態にあることがわかった。また一度卵と融合して細胞質間交流ができた精子が、融合からはずれ、細胞質間交流を失うことが示された。

精子が融合の状態で停止してしまった卵では、多くの場合、小さな一過性のCa²⁺オシレーションしか起こさなかった。他方、精子の卵内注入や精子抽出物の注入によって誘発されるCa²⁺オシレー

シオンは毒素 B で影響されず，正常の大きな Ca^{2+} スパイクから成る Ca^{2+} オシレーションを示した．従って小さな一過性の Ca^{2+} オシレーションは毒素 B によって融合が抑制された精子から精子細胞質因子が卵細胞質に充分移行しきれないからであると考えられる．また一過性の Ca^{2+} オシレーションしか起こさない卵では，一度融合した精子が卵からはずれる像も得られた．このような融合精子の減少や，取り込まれる精子の減少は，アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D によってもおこることが確認された．

Rho ファミリーに属する Rac1, RhoB, Cdc42 のどれがマウス卵に存在するかを，それぞれの抗体を用いて免疫染色を行って調べた．**Rac1** と **RhoB** が卵表層の細胞質に染まり，**Cdc42** は存在しなかった．さらにアクチンフィラメントを rhodamine phalloidin で染色すると，正常卵では卵表層細胞質に染まったが，サイトカラシン投与卵では，表層細胞質の他に中心部でも観察された．毒素 B を注入した卵では，アクチンフィラメントが表層細胞質には見られなくなり，深部細胞質にパッチ状に分布するようになった．

これらの結果から，毒素 B によって精子の卵への融合および卵内への取り込みが阻害され，それはアクチンフィラメントの構築を阻害することによると考えられた．このように Rho ファミリー，特に Rac1 と RhoB がアクチンフィラメントの上流にあってアクチンフィラメントの再構築に関与していることが初めて明らかにされ，論文に発表した⁹⁾（後に別刷添付）．

参考文献

1. Rogers BJ, Bastias C, Coulson RL, Russell LD. Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa. *J Androl* 10: 275-282, 1989.
2. Sun Q-Y, Lai L, Park K-W, Kühholzer B, Prather RS, Schatten H. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 64: 879-889, 2001.
3. Sutovsky P, Navara CS, Schatten G. Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol Reprod* 55:1195-1205, 1996.
4. McAvey BA, Wortzman GB, Williams CJ, Evans JP. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol Reprod* 67: 1342-1352, 2002.
5. Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, Flach G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morph* 81: 211-237, 1984.
6. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62, 1995.
7. Moore GD, Ayabe T, Visconti PE, Schultz RM, Kopf GS. Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* 120: 3313-3323, 1994.
8. Aktories K, Schmidt G, Just I. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 381: 421-426, 2000.

9. Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K, Miyazaki S. Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by *Clostridium difficile* toxin B. *Dev Biol* 260: 522-535, 2003.

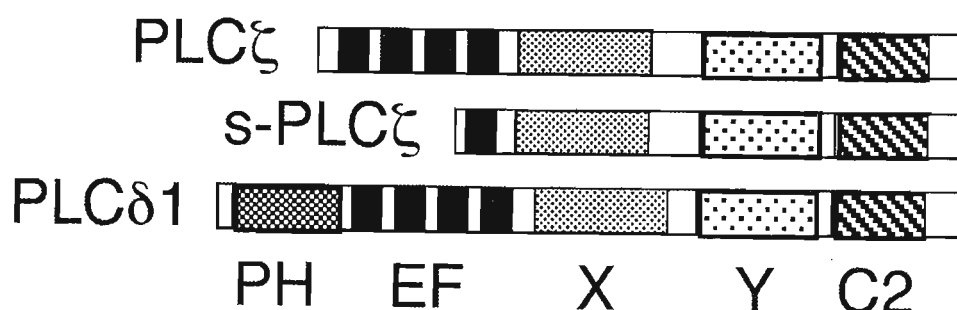
V. PLC ζ の RNA 注入によるマウス卵での発現： Ca²⁺オシレーション誘発と前核への移行

Saunders ら¹⁾は2002年に新しく発見した **phospholipase C zeta** (PLC ζ)がCOIP の有力候補であることを示す論文を発表した。PLC は膜のイノシトールリン脂質PIP₂を分解してイノシトール 3リン酸 (IP₃)とジアシルグリセロール (DAG) を産生する酵素である。マウス卵内にIP₃を持続的に与えると、IP₃ 受容体を介して小胞体から反復してCa²⁺遊離を起こすことが示されている²⁾。従ってPLCが持続的に少量のを産生すると、Ca²⁺オシレーションを起こすことができると考えられる。PLC ζ が COIP の有力候補であることの根拠となる所見は、1) PLC ζ はマウス精子に特異的に発現している、2) PLC ζ をコードしている RNA をマウス卵に注入して強制発現させると、受精時に起るCa²⁺オシレーションによく類似したCa²⁺オシレーションを誘発し、卵を活性化し、blastocyst までの発生を導く、3) Ca²⁺オシレーションを誘発する PLC ζ の卵内発現量 (4-75 fg) は、抗 PLC ζ 抗体を用いたイムノブロットのバンドから推算した精子1個に含まれる PLC ζ 量 (20-50 fg) と同じ範囲にある、4) 精子抽出物を抗 PLC ζ 抗体で吸収させてからマウス卵に注入すると、Ca²⁺オシレーション誘発活性を喪失している、という所見である。これにより COIP の同定は、PLC ζ が生理的条件下で本当に sperm factor として機能しているかを証明する方向に向かうことになった。

本研究ではPLC ζ と蛍光蛋白質(green fluorescencet protein; GFP)とを連結した DNA を作成し、これを RNA に変換してマウス卵に注

入して発現させ、発現量と分布を GFP の蛍光を指標にして観察する実験を行った。PLC ζ の cDNA はマウス精巢の mRNA 由来の cDNA ライブラリーからクローニングして得た。PLC ζ は既知の PLC イソフォームの中で最も短く、N末端のPHドメインを持っていない¹⁾ (図3)。他にN末端側の4つのEFハンドドメインのうち3つを欠く短い PLC ζ (sPLC ζ) も得た。また、PLC ζ に類似しているがPHドメインを有す PLC δ 1 (図3) の cDNA も作成した。

図3 PLC ζ , PLC δ 1 のドメイン構造の模式図



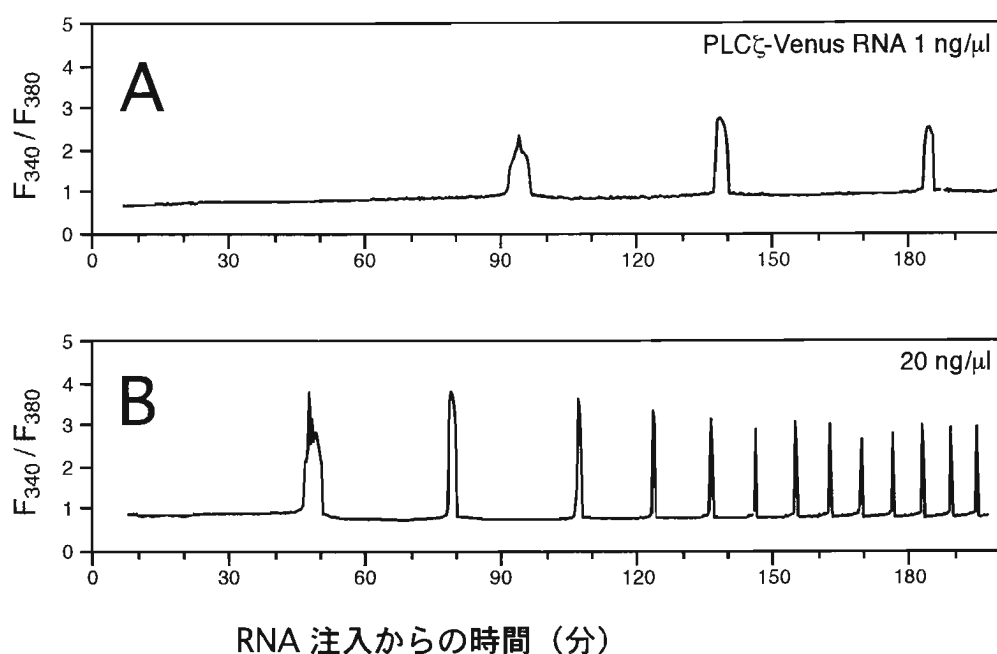
GFP は30℃ 以上で効率よく発色団が形成される Venus³⁾ を利用した。予め合成した Venus をマウス卵に注入し、注入量と蛍光強度 (F) との間の校正直線を得た。また PLC ζ -Venus の RNA 注入量と3時間後の F との間の直線性を得た。

Ca²⁺ オシレーション誘発能

マウス成熟未受精卵に PLC ζ -Venus RNA を注入すると、受精時に見られるような Ca²⁺ オシレーションを誘発した (図4)。誘発できる最低 RNA 濃度は0.5 ng/ μ l であった。1ng/ μ l の濃度の PLC ζ -Venus RNA を注入すると、約90分後に Ca²⁺ オシレーションが起り始めた (図4A)。Ca²⁺ オシレーション開始までの時間は

RNA 注入量が多ければ短くなり（図 4 B），最短 25 分位にまで短縮した．PLC ζ の発現が極めて速いことが明らかになった．また RNA 量が多いほど Ca $^{2+}$ オシレーションの個々の Ca $^{2+}$ 増加反応の頻度が増加し，振幅には影響がなかった（図 4）．

図 4 PLC ζ のマウス卵内 RNA 注入によって誘発される Ca $^{2+}$ オシレーション



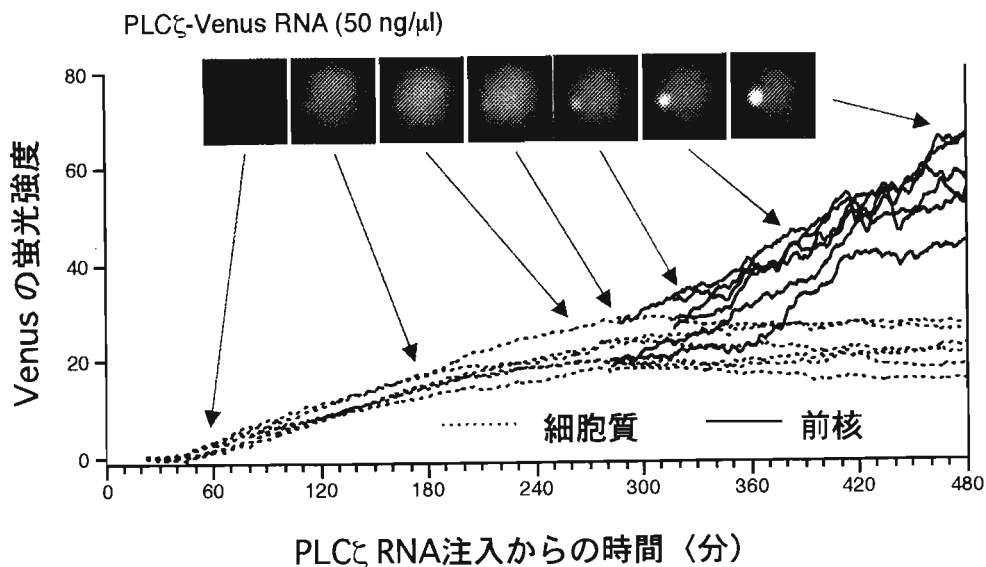
Ca $^{2+}$ オシレーションが開始するときの卵内濃度は，F の値から推算すると10-40 fg で，Saunders¹⁾ らの結果と一致した．3つのEFハンドドメインを欠く sPLC ζ -Venus の RNA を注入したときは，PLC ζ に比べ約100倍の濃度でCa $^{2+}$ オシレーションが起った．従ってCa $^{2+}$ オシレーション誘発能に対してEFハンドドメインが重要な役割を果たしていると考えられる．EFハンドはCa $^{2+}$ の結合部位とされているので，Ca $^{2+}$ がPLC ζ の活性化の重要因子であろうと推測される．同じく4個のEFハンドを持ち，さらにPLC ζ にはない

PH ドメインをもつ PLC δ 1 を発現させた場合には Ca²⁺ オシレーションを誘発できなかった。 PLC ζ を特に活性化しやすくする機構があるのかも知れない。

PLC ζ の核移行能

50 ng/ μ l の濃度の PLC ζ -Venus RNA を注入すると、注入後 40 分位で F の増加が認められ、それから 3 時間位までほぼ直線的に増加し、5 時間後には一定値に落ち着いた (図 5)。興味深いことに、発現した PLC ζ によって Ca²⁺ オシレーションが起る結果卵は活性化され前核を形成するが、PLC ζ -Venus の蛍光が前核に集積していくことが観察され、この集積を経時的に記録することが出来た (図 5)。前核形成後 3 時間でも PLC ζ の集積が持続していた。

図 5 発現した PLC ζ の前核への移行



一方、Venus を付加していない PLC ζ の RNA を注入して前核を形成させた卵に sPLC ζ -Venus や PLC δ 1-Venus を発現させた場合、sPLC ζ や PLC δ 1 の前核への集積はごく僅かであった。従って

PLC ζ は特異的に核移行能を備えていると考えられる。前記 II に記したとおり、マウス受精卵における卵活性化蛋白質は前核に集積することから^{4,5)}、PLC ζ が精子由来の卵活性化蛋白質の候補であることを支持する重要な結果である。

PLC ζ の核移行とCa²⁺オシレーション

fura-2 あるいは fura-dextran を用いたCa²⁺オシレーションの記録とPLC ζ -Venus の蛍光とを同時記録した。多くの卵ではPLC ζ が前核に移行する以前にCa²⁺オシレーションが停止したことから、PLC ζ の核移行はCa²⁺増加を必要としないことがわかった。また予めIP₃を注入して一過性のCa²⁺オシレーションを誘発して活性化し前核を形成させた卵に、PLC ζ の RNA と抗IP₃受容体抗体 18A10 を注入して完全にブロックした場合でも、PLC ζ は前核に移行した。

受精卵でCa²⁺オシレーションが前核形成の時期に消失するのは、COIP が細胞質から前核に取り込まれてしまうことによるのではないかという考えがある⁶⁾。今回の発現実験では PLC ζ は持続的に発現され、一部前核に移行しても大部分は細胞質に残っているので、受精の条件とは異なり、この実験に合わない。また実際には多くの卵で PLC ζ の核移行の前に Ca²⁺ オシレーションが停止してしまった。PLC ζ 活性で産生された DAG によって活性化されたプロテインキナーゼ C (PKC) が IP₃ の産生を抑制あるいは IP₃ 受容体を抑制して Ca²⁺ オシレーションを停止させてしまうのかも知れない。

いづれにせよ、RNA の注入によってマウス卵に強制発現させた PLC ζ は低濃度で Ca²⁺ オシレーションを誘発する能力をもち、また特異的に前核に移行することができることが明らかにされ、精子由来の COIP である可能性を支持した。これらを論文にまとめた⁷⁾。

参考文献

1. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA, PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544, 2002.
2. Jones KT, Nixon VL. Sperm-induced Ca²⁺ oscillations in mouse oocytes and eggs can be mimicked by photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate: evidence to support a continuous low level production of inositol 1,4,5-trisphosphate during mammalian fertilization. *Dev Biol* 225: 1-12, 2000.
3. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnol.* 20: 87-90, 2002.
4. Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG. Nuclei from mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development* 121: 1123- 1128, 1995.
5. Ogonuki N, Sankai T, Yagami K, Shikao T, Oda S, Miyazaki S, Ogura A. Activity of sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkey and its localization after oocyte activation. *Biol Reprod* 65: 351-357, 2000.
6. Kono T, Jones KT, Bos-Mikich A, Whittingham DG, Carroll J. A cell cycle-associated changes in Ca²⁺ releasing activity leads to the generation of Ca²⁺ transients in mouse embryos during the first mitotic division. *J Cell Biol* 132: 915-923, 1996.

7. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, Kinoshita K and Miyazaki S. Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Deve Biol* in press: 2004.

VI. PLC ζ の合成 : Ca²⁺オシレーション誘発能と PLC 活性の Ca²⁺感受性

前項で述べたとおり，現在 PLC ζ が精子由来の COIP の有力候補と考えられているが¹⁾，さらにその証拠を固めるためには，PLC ζ を合成して **recombinant PLC ζ** を得，それを卵内に注入したときに Ca²⁺オシレーションを誘発することを証明しなければならない．他方，哺乳動物精子には PLC β 1, γ 1, γ 2, δ 1, δ 4 が発現していることが報告されているが，これまでの研究では recombinant β 1, γ 1, γ 2, δ 1 は Ca²⁺遊離を誘発していない²⁾．PLC ζ は既知のイソフォームの中で最も短く，N末端の PH ドメインを持っていない¹⁾ (図3)．PLC ζ と PLC δ は，PLC β にある G 蛋白結合部位や，PLC γ にあるチロシンキナーゼによるリン酸化部位である SH ドメインのような調節部位をもっておらず (図3)，従って活性化機構が不明である．本研究では recombinant PLC ζ を作成し，これをマウス卵に注入して Ca²⁺オシレーション誘発能を観察するとともに，*in vitro* で PLC 酵素活性を測定し，特に酵素活性に対する Ca²⁺濃度の影響を詳細に観察した．

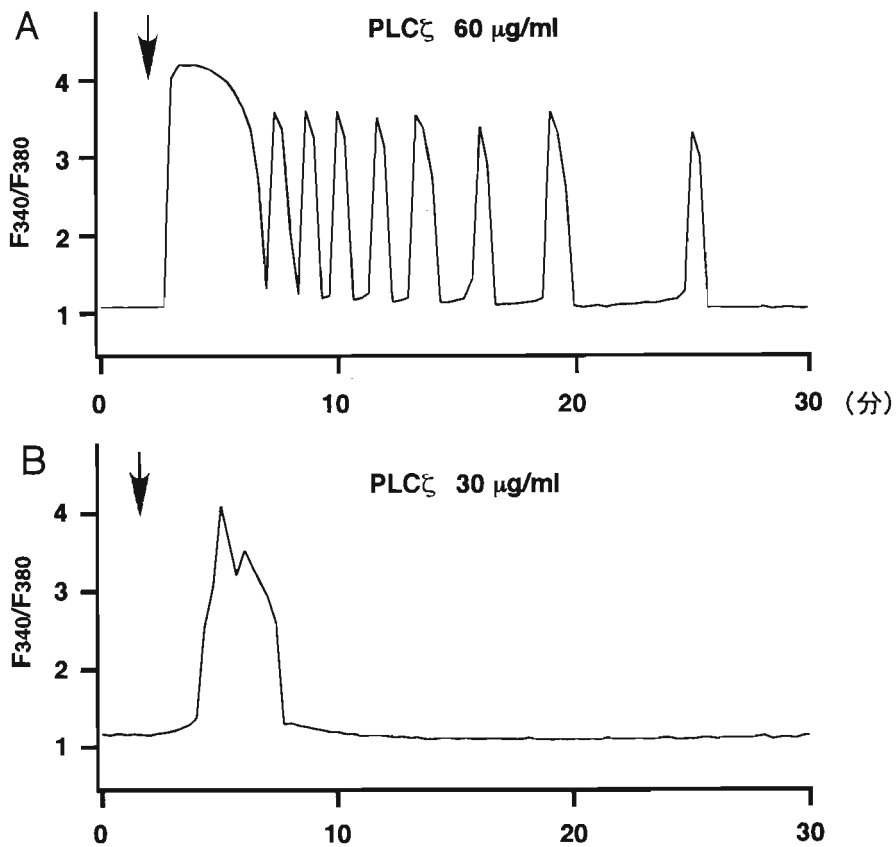
マウス精巢の mRNA 由来の cDNA ライブラリーから全長 PLC ζ をコードする cDNA を得，PCR で増幅し，ヴァキュロウイルスに組み込んだ．このウイルスで **Sf9 細胞** を感染させ，PLC ζ を合成させた．PLC ζ の N末端に His-tag が付加してあり，この His を指標に Ni キレートセファロースカラムにかけ，PLC ζ を精製した．同様に 3 つの EF ハンドドメインを欠く短い PLC ζ (**s-PLC ζ**) と，**PLC δ 1** を合成した (図3)．PLC 活性は PLC の基質である PIP₂

と一部 [^3H]PIP₂ を含むミセル溶液中で recombinant PLC を37℃で5分間反応させ、産生された [^3H]IP₃ をカウントした。

Ca²⁺ オシレーション誘発能

recombinant PLC ζ をマウス卵に注入すると、Ca²⁺ オシレーションを誘発した (図 6 A)。そのパターンは精子抽出物を注入した際の Ca²⁺ オシレーションのそれに類似していた。Ca²⁺ オシレーションを誘発する最小濃度は60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、卵内濃度 (計算値) は1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。卵あたりの総量は約300 fg であった。

図 6 recombinant PLC ζ のマウス卵内注入によって誘発されるCa²⁺ 増加反応



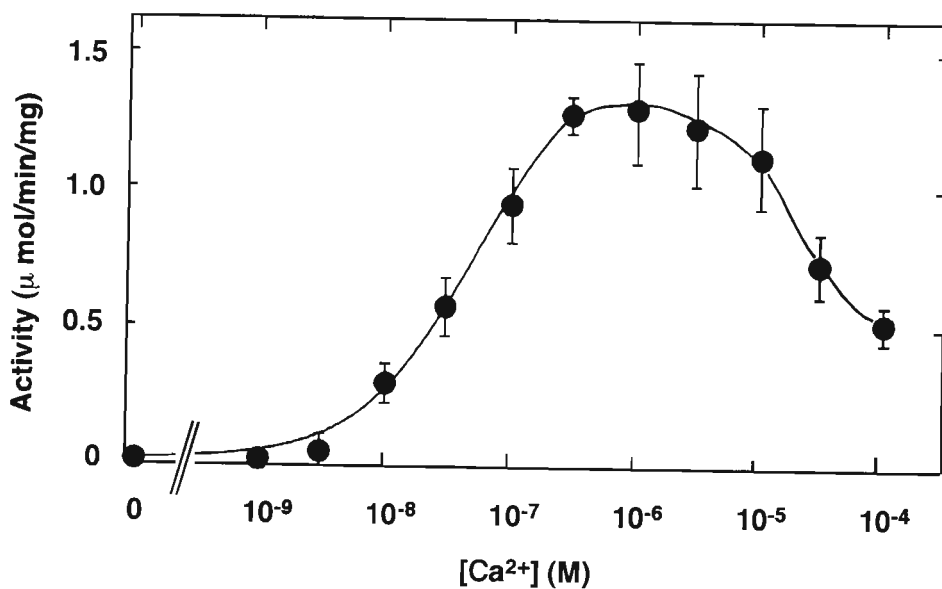
RNA の注入によって発現させた PLC ζ が Ca²⁺ オシレーションを誘発するときの量は 10~40 fg であった³⁾。一般に合成された機能蛋白の効率は、元々の細胞で合成された場合に比べて低くなる。合成された蛋白の多くが機能的な立体構造とっていない場合があるなどの理由が考えられる。注入する PLC ζ の濃度を少し下げると、1 回の比較的大きな Ca²⁺ 増加反応だけが起った (図 6 B)。N 末端側の 3 つの EF ハンドドメインを欠く s-PLC ζ は (図 3)、PLC ζ の 37 倍の濃度でも Ca²⁺ 遊離を誘起できなかった。やはり EF ハンドドメイン、恐らく Ca²⁺ の結合が PLC ζ の活性化に重要な役割を果たしていると考えられる。recombinant PLC δ 1 を注入した場合は、PLC ζ の約 20 倍の濃度で Ca²⁺ オシレーションを誘発した。PLC ζ は他の PLC イソフォームに比べて Ca²⁺ オシレーションを誘発能が高いことが示された。

PLC 活性の Ca²⁺ 感受性

PIP₂ 分解活性のアッセイに用いた量は、50 μ l の反応液中で recombinant PLC ζ が 50 ng, PLC δ 1 が 1 ng であり、夫々 1 μ g/ml, 0.02 μ g/ml である。この濃度はマウス卵で Ca²⁺ オシレーションを誘発する卵内濃度と同じ範囲である。反応液の Ca²⁺ 濃度を 1 nM から 100 μ M の範囲で変えて PLC 活性を測定した。PLC ζ の specific activity は Ca²⁺ が 1 μ M のところで 1.3 mmol/mg/min, PLC δ 1 は Ca²⁺ が 30 μ M のところで 65 mmol/mg/min であり、PLC δ 1 の方が 50 倍高い。それにもかかわらず PLC ζ は 20 倍低い濃度で Ca²⁺ オシレーションを誘発した。このことは PLC ζ が PLC δ 1 に比べ 1000 倍高い効率で Ca²⁺ オシレーションを誘発することを意味する。この特性を明らかにするため、PLC 活性の Ca²⁺

濃度依存性を調べた。PLC δ 1の活性は1 μ Mで認められ、1~30 μ Mで急峻に増強し、30 μ Mで一定値に達した。最大値の50%の活性を与えるCa $^{2+}$ 濃度 (EC $_{50}$)をHillの式に合わせて計算すると5.7 μ M (Hill係数, 1.7)であった。これに対してPLC ζ の活性は10 nMという低いCa $^{2+}$ 濃度で認められ、1 μ Mで最大に達し (図7)、1 μ M以上では減少した。EC $_{50}$ は52 nM (Hill係数, 0.9)であり、PLC δ 1に比べて100倍も低い。通常の静止時の細胞内Ca $^{2+}$ 濃度は約100 nM (10 $^{-8}$ M)であるが^{4, 5)}、この濃度でPLC ζ の活性は最大値の70%もあった。即ちPLC ζ は静止時の細胞でも活性化状態にありうるということを意味する。

図7 PLC ζ の酵素活性のCa $^{2+}$ 濃度依存性



このようなPLC ζ の特性はCOIPの備えるべき特性に適合すると考えられる。COIPは精子から精子-卵融合によって卵細胞質に導入され、最初に(未だ刺激を受けていない卵の)小胞体からのCa $^{2+}$

遊離を誘発し、 Ca^{2+} オシレーションの発生を維持するからである。ブタ精子抽出物は PLC 活性を示し、100 nM の Ca^{2+} 濃度では最大値の1/3の活性を示すことが報告されている⁶⁾。従って本研究の結果は、PLC ζ が COIP の有力候補であることを支持する。しかしながら PLC ζ が Ca^{2+} オシレーションを誘起する効率のよさは、高い Ca^{2+} 依存性だけでは説明できない。卵細胞内に PLC ζ を活性化する因子 (egg factor) が存在するとか、特殊な標的膜が存在するのかも知れない。他方、PLC ζ が静止時の細胞で活性化状態にあるとすれば、精子中ではこれを抑える抑制因子が存在しているのかも知れない。これらは今後明らかにすべき重要な課題である。

上記の結果を論文位書き⁷⁾、投稿した。

参考文献

1. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA, PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544, 2002.
2. Jones KT, Matsuda M, Parrington J, Katan M, Swann K. Different Ca^{2+} releasing abilities of sperm extracts compared with tissue extracts and phospholipase C isoforms in sea urchin egg homogenate and mouse eggs. *Biochem J* 346: 743-749, 2000.
3. Yoda A, Oda S, Shikano T, Kouchi Z, Awaji T, Shirakawa H, Kinoshita K and Miyazaki S. Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Deve Biol* in press: 2004.

4. Miyazaki S. IP₃-mediated spatial and temporal Ca²⁺ signaling in the cell. *Japn J Physiol* 43: 409-434, 1993.
5. Nakano Y, Shirakawa H, Mitsushashi N, Kuwabara Y, Miyazaki S. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod* 3: 1087-1093, 1997.
6. Rice A, Parrington J, Jones, KT, Swann K. Mammalian sperm contains a Ca²⁺-sensitive phospholipase C activity that can generate InsP₃ from PIP₂ associated with intracellular organelles. *Dev Biol* 228: 125-135, 2000.
7. 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. *J Biol Chem* in press: 2004.