

# Ca<sup>2+</sup>オシレーション誘発蛋白質の同定と作用機序の解析

(課題番号 10470011)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))

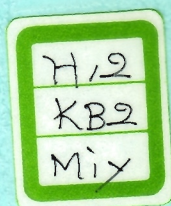
研究成果報告書



平成13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)





Ca<sup>2+</sup>オシレーション誘発蛋白質の同定と作用機序の解析

(課題番号 10470011)

平成10年度～平成12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13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

細胞内カルシウムイオン（以下Ca）は種々の重要な細胞機能を制御する。近年、画像解析法および共焦点レーザー走査顕微鏡によりCaの時空間的動態が詳細に解析され、分子生物学的手法と組み合わせ、Ca貯蔵器官である小胞体からのCa遊離機構が明らかにされてきている。特に空間的・時間的Caシグナルはそれぞれ伝播性のCa増加（Ca波）と反復性のCa増加（Caオシレーション）として捉えられ、その機構の解明が重要課題となっている。

Ca増加がカギになる現象に受精がある。これまでに調べられた全ての動物種に普遍的に受精時の卵で劇的なCa増加が起こり、卵活性化の引き金になると考えられている。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電極法およびCa画像解析法を用いて、卵細胞内Ca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波（Ca wave）を形成すること、また一過性のCa増加反応が反復して発生し、いわゆるCa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波・Ca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の増加は、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。また、第二減数分裂の中期に停止していた

成熟卵が，受精時のCa増加によって減数分裂を再開し，「卵活性化」をもたらすことが実証された．さらに長時間持続するCa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た．

Ca増加のメカニズムに関しては，研究代表者らはハムスター卵のCa波とCaオシレーションがイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体/Caチャネルを介する小胞体からのCa遊離によることを，IP<sub>3</sub>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，細胞外からのCa流入が活性化され，細胞内Ca貯蔵小器官である小胞体にCaを補給して反復性のCa遊離を可能にすることを見だし (Cell Calcium, 1989) , IP<sub>4</sub> によって活性化されるCa流入経路の存在を示唆する結果を得た (Cell Calcium, 1995) . また，小胞体の分布およびIP<sub>3</sub> 誘発性Ca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の活性化-IP<sub>3</sub>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．

現在この領域における最も重要なテーマは「精子の如何なる分子がどのような機構で卵Ca増加を誘発するのか？」という受精の本質的な課題である．我々は，卵細胞膜上に"精子受容体"を想定して数年に亘って追及したが，未だ証拠が得られていない．他方，Swann はハムスター精子抽出物が卵内注入によってCaオシレーションを誘発することを発表し (1990; 1991) 有効物質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 (1995) . しかしオシリンは間違いであったことが判明した．現在のところ，



精子因子はホスホリパーゼCあるいはそれを活性化する物質が候補に挙がっている。いづれにせよ、受精時の精子-卵融合により精子細胞質因子が卵細胞質に移行して刺激になり、Caオシレーションを誘発するという考えが有力である。

重要な点は、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波、Ca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画像解析が可能であるという利点がある。Ca波、Caオシレーションを誘発する精子因子の同定は、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。近年、精子の卵細胞内注入法（Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI）が男性不妊の新治療として行われている。さらに未熟精子の注入も試みられている。精子因子はこれらの手法に応用できる可能性がある。

これらの背景から、我々は精子抽出物からもう一度Caオシレーション誘発因子を精製・同定し、その作用部位・作用機序を明らかにすることが重要であると考えた。

本研究は、1) ハムスター精子抽出物からCaオシレーション誘発蛋白質 (Ca oscillation-inducing protein; COIP) を分離し、卵内に注入してCa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; 2) マウス卵を用いて、受精時の精子-卵融合に必要な条件を解析する; 3) 受精時、ICSI、精子抽出物の卵内注入に際するCaオシレーションをそれぞれ詳細に時空間的に画像解析して比較し、COIPの作用機序を、CaオシレーションとIP<sub>3</sub>受容体を介するCa遊離との関連において追跡する; ; 4) COIPを未成熟精子注入法に応用することを目的として行われた。

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、一部は順天堂大学・東京工業大学と共同実験の形態をとった。また、研究代表者が客員教授を務めている生理学研究所細胞内代謝部門においても実験が行われた。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）

淡路健雄（同 助手）

河内 全（同 助手）

毛利達磨（同生理学研究所細胞内代謝部門 助手）

### 研究經費

平成10年	5, 6 0 0	千円
平成11年度	2, 8 0 0	千円
平成12年度	3, 2 0 0	千円
計	1 1, 6 0 0	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。なお、桑原慶紀氏は共同研究期間中に  
逝去された。慎んで哀悼の意を表する。

- 桑原慶紀氏 (順天堂大学医学部産婦人科学教授) (故人)  
三橋直樹氏 (同 教授)  
竹内裕之氏 (同 学講師)  
桜井明弘氏 (同 助手)  
小堀宏之氏 (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)  
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)  
出口竜作氏 (宮城教育大学生物学教室講師)  
経塚啓一郎氏 (東北大学理学部浅虫臨海実験所助手)  
佐藤真則氏 (生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センター  
特別技術補助職員)  
中西節子氏 (JT 中央薬学研究施設研究員)  
吉友美樹氏 (生理学研究所細胞内代謝部門技官)  
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 (東京女子医科大学医学部第二生理学技官)



# 研 究 発 表

## I. 発表論文

### 1. 学会誌等

- 1) Kyojuka K, Deguchi R, Mohri T and Miyazaki S :  
Injection of sperm extract mimics spatiotemporal dynamics of  $Ca^{2+}$  responses and progression of meiosis at fertilization of ascidian oocytes. *Development* 125: 4099-4105, 1998.
- 2) Sakurai A, Oda S, Kuwabara Y and Miyazaki S :  
Fertilization, embryonic development, and offspring from mouse eggs injected with round spermatids combined with  $Ca^{2+}$  oscillation-inducing sperm factor. *Mol Human Reprod*, 5: 132-138, 1999.
- 3) Oda S, Deguchi R, Mohri T, Shikano T, Nakanishi S a Miyazaki S :  
Spatiotemporal dynamics of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise induced by microinjection of sperm extract into the mouse egg: preferential induction of a  $Ca^{2+}$  wave from the cortex. *Dev Biol*, 209: 172-185, 1999.
- 4) Sato MS, Yoshitomo M, Mohri T and Miyazaki S :  
Spatiotemporal analysis of  $[Ca^{2+}]_i$  rises in mouse eggs after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 26: 49-58, 1999.
- 5) Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T and 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.
- 6) Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S and Kudo A:  
The gamete fusion process is defective in eggs of *Cd9*-deficient mice. *Nature Genetics* 24: 279-282, 2000.
- 7) Kobori H, Miyazaki S and Kuwabara Y:  
Characterization of intracellular  $Ca^{2+}$  increase in response to progesterone and cyclic nucleotide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 63: 113-120, 2000.

- 8) Mohri T, Shirakawa H, Oda S, Sato MS, Mikoshiba K and Miyazaki S:  
Analysis of  $Mn^{2+}/Ca^{2+}$  influx and release during  $Ca^{2+}$  oscillations in  
mouse eggs injected with sperm extract. *Cell Calcium* in press, 2001.

## II. 口頭・ポスター発表

### 1. 国内学会発表

- 1) Deguchi R, Oda S, Mohri T and Miyazaki S:  
Relationship between the spatiotemporal pattern of  $Ca^{2+}$  waves and the  
site of the sperm nucleus during  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization of  
mouse eggs. *Jpn J Physiol* 49: *Suppl*, S50, 1999.  
(マウス卵受精時の $Ca^{2+}$ 波, $Ca^{2+}$ オシレーションおよび核の動態の解析)  
第76回日本生理学会大会 長崎市長崎大, 1999, 3月
- 2) Sato M, Yoshitomo M, Mohri T and Miyazaki S:  
Spatiotemporal aspects  $[Ca^{2+}]_i$  rise in mouse eggs subjected to intra-  
cytoplasmic sperm injection (ICSI). *Jpn J Physiol* 49: *Suppl*, S50,  
1999.  
(マウス卵細胞内精子注入(ICSI)による細胞内 $Ca^{2+}$ 増加の時・空  
間的解析) 第76回日本生理学会大会 長崎市, 長崎大, 1999, 3月
- 3) 桜井明弘, 小堀宏之, 佐藤雄一, 中野義宏, 武内裕之, 三橋直樹,  
桑原慶紀, 宮崎俊一:  
マウス卵における円形精子細胞と精子蛋白質同時注入による胚発生.  
*日本産科婦人科学会雑誌* 51: p. 229, 1999.  
第51回日本産科婦人科学会学術講演会 東京, 1999, 4月
- 4) Mohri T, Oda S, Sato . and Moyazaki S:  
Analysis of  $Ca^{2+}$  oscillations and  $Ca^{2+}$  influx in mouse eggs.  
*Jpn J Physiol* 50: *Suppl*, S , 2000.  
(マウス卵の $Ca^{2+}$ 振動と流入機構の解析)  
第77回日本生理学会大会 横浜市, 慶応義塾大, 2000, 3月
- 5) Kobori H, Kuwabara Y and Miyazaki S:  
 $Ca^{2+}$  responses induced by progesterone and cyclic nucleotides in  
mouse spermatozoa. *Jpn J Physiol* 50: *Suppl*, S , 2000.  
(Progesterone, Cyclic Nucleotideによるマウス精子細胞内 $Ca^{2+}$ 増加反応)  
第77回日本生理学会大会 横浜市, 慶応義塾大, 2000, 3月

- 6) 小堀宏之, 桜井明弘, 佐藤雄一, 中野義宏, 武内裕之, 桑原慶紀, 宮崎俊一 :  
Progesteroneおよびcyclic nucleotideによって誘起される精子細胞内Ca<sup>2+</sup>増加反応の解析  
日本産婦人科学会雑誌 52: p. 332, 2000. 第52回日本産婦人科学会徳島市, 2000, 4月
- 7) 毛利達磨, 白川英樹, 尾田正二, 佐藤真則, 御子柴克彦, 宮崎俊一 :  
精子抽出物顕微注入によるCa<sup>2+</sup>振動時のマウス卵のCa<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>ダイナミックス. 第53回日本細胞生物学 福岡市, 福岡大, 2000, 10月
- 8) 毛利達磨, 白川英樹, 尾田正二, 佐藤真則, 御子柴克彦, 宮崎俊一 :  
マウス卵Ca<sup>2+</sup>オシレーション時のCa<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>ダイナミックス  
第78回日本生理学会大会 京都市, 京都大, 2001, 3月

## 2. 国際学会発表

- 1) Sakurai A, Oda S, Sato Y, Nakano Y, Takeuchi H, Mitsunashi N, Kuwabara Y and Miyazaki S:  
Mouse eggs after round spermatid injection (ROSI) combined with hamster sperm factor are fertilized and develop into normal offspring.  
*11th World Congress on In Vitro Fertilization and Human Reproductive Genetics. Abs. p. 191, Sydney, Australia, 1999.5.*
- 2) Miyazaki S, Oda S, Shirakawa H, Mohri S, Sato M and Deguchi R:  
Sperm-induced signaling in mouse eggs. *The Susumu Hagiwara Memorial Symposium. Prog. 5, UCLA, Los Angeles, UCLA, 1999.10.*
- 3) Mohri T, Oda S, Sato M, Mikoshiba K and Miyazaki S:  
Ca<sup>2+</sup> oscillations Ca<sup>2+</sup> influx induced by sperm factor in mouse eggs.  
*11th Internatl. Symposium of Calcium-binding Protein and Calcium Function in Health and Disease. Abs. Pos. II-4, Kisarazu, Japan, 1999.10.*
- 4) Mohri T, Oda S, Sato M and Miyazaki S:  
Analysis of Ca<sup>2+</sup> oscillations and Ca<sup>2+</sup> influx induced in mouse eggs.  
*Internatl. Symposium on Alternative Reproductive Strategies. Abs. Hayama, Japan, 1999. 11.*



- 5) Mohri T, Shirakawa H, Oda S, Sato MS, Mikoshiba K and Miyazaki S:  
Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dynamics during Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs injected with sperm extract. *40th Annual Meeting of American Society for Cell Biology. Mol Biol Cell*, San Francisco, USA, 2000. 12.
- 6) Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T and Miyazaki S:  
Spatiotemporal analysis of Ca<sup>2+</sup> waves during Ca<sup>2+</sup> oscillations in fertilized mouse eggs. *SEIRIKEN Internatl. Symposium "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development"*. Abstr. p.78, Okazaki, Japan, 2000. 11.
- 7) Shirakawa H, Mohri T and Miyazaki S:  
Numerical simulation for Mn<sup>2+</sup> quenching of fura-2 during Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *SEIRIKEN Internatl. Symposium "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development"*. Abstr. p.72, Okazaki, Japan, 2000. 11.
- 8) Sato M, Yoshitomo M, Mohri T, Sakurai A and Miyazaki S:  
Ca<sup>2+</sup> dynamics in mouse eggs after ICSI. *SEIRIKEN Internatl. Symposium "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development"*. Abstr. p. 80, Okazaki, Japan, 2000.11.
- 9) 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. *SEIRIKEN Internatl. Symposium "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development"*. Abstr. p.82, Okazaki, Japan, 2000.11.
- 10) Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S and Kudo A:  
Cd9 on mouse egg microvilli participates in sperm-egg fusion. *SEIRIKEN Internatl. Symposium "Mechanisms of Cell Signaling in Early Development"*. Abstr. p. 86, Okazaki, Japan, 2000.11.

### 3. シンポジウム発表

1) 宮崎俊一 :

Ca<sup>2+</sup>と卵活性化. 第52回日本細胞生物学会大会, 要旨集p. 17, 東京, 東京大学, 1999, 8.

2) 宮崎俊一 :

Ca<sup>2+</sup>シグナルと卵活性化. 第77回日本生理学会大会, シンポジウム  
『Ca<sup>2+</sup>と細胞機能』, 予稿集, p. 156, 横浜市, 慶応大, 2000.  
3.

3) Miyazaki S:

Ca<sup>2+</sup> wave and Ca<sup>2+</sup> oscillations in fertilized mammalian eggs.  
*Internatl. Training Course on Molecular Aspect of Fertilization and Early Development. Abstr.*, Asamushi, Aomori, Japan, 1999, 10.

4) Miyazaki S:

Ca<sup>2+</sup> oscillations in early embryonic development after fertilization.  
*11th Internatl. Symposium on Calcium-binding Protein and Calcium Function in Health and Disease. Abs. Special Interest Group Lectures V-1*, Kisarazu, Chiba, Japan, 1999. 10.

5) Miyazaki S:

Cell signaling in early development. SEIRIKEN International Symposium on “*Mechanisms of Cell Signaling in Early Development*”.  
Abstr., p.6, Okazaki, Japan, 2000 11.

6) Oda S:

Physiological characterization of mammalian sperm factor.  
Symposium on “*Mechanisms of Cell Signaling in Early Development*”.  
Abstr., p.26, Okazaki, Japan, 2000 11.

7) Mohri T:

Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> influx and release during Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs.  
Symposium on “*Mechanisms of Cell Signaling in Early Development*”.  
Abstr., p.30, Okazaki, Japan, 2000 11.

### III. 解説等

- 1) 宮崎俊一：  
受精  
『カルシウムイオンとシグナル伝達』 御子柴克彦，遠藤實，  
宮本英七編，蛋白質核酸酵素，43巻，12号，294-300，1998.
- 2) 宮崎俊一：  
受精とカルシウム  
Hormone Frontier in Gynecology, 5巻，247-253，1998.
- 3) 宮崎俊一，桑原慶紀：  
受精 日本医師会雑誌，120巻，677-680，1998.
- 4) 中野義弘，武内裕之，桑原慶紀，宮崎俊一：  
卵の活性化物質 特集『卵をめぐる最近の話題』  
産科と婦人科，65巻12号，1749-1754，1998.-12-



# 研 究 成 果

## I. Caオシレーション誘発蛋白質の精製

哺乳動物卵受精時には反復性の細胞内Ca増加（Caオシレーション）がおこり，卵活性化の引き金になる<sup>1)</sup>。精子に存在すると考えられるCaオシレーション誘発蛋白質<sup>2,3)</sup>（Ca oscillation-inducing protein; COIP）はすなわち卵活性化因子であり，その同定は受精のメカニズム解明の本質的な課題である。本研究ではハムスター精子抽出物から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匹の精巣上体を摘出し，精子をできるだけ多く試験管内に採取し，Tyrode類似液を加えて泳ぎ出した精子を回収した。この精子を超音波処理によって破碎し，超遠心して（90,000 g, 90 min）上清を回収した。これを精製の開始サンプルとした。

### 2) オシリンがCOIPでないことの確認

ParringtonらはCOIPとして33 kDaの蛋白質オシリン(oscillin)を精製したと報告した<sup>4)</sup>。本研究ではまずこのoscillinが本当にCOIPであるかどうかを確認した。報告されたoscillin DNAの塩

基配列を参考にして、ハムスター精巣の mRNA から oscillin の cDNA を PCR 法にてクローニングし、in vitro translation 法によってリコンビナント oscillin を作成した。これをマウス卵に注入したが、活性はなかった。

別の確認方法として以下の実験を行った。精子抽出物を Cibacron Blue FG3A カラムに吸着させた後、oscillin のヒトホモログである glucosamine-6-phosphate deaminase の基質の N-acetylglucosamine-6-phosphate によって oscillin を特異的に溶出した（アミノ酸シーケンシングによって確認）。しかし oscillin を特異的に溶出した画分には COIP 活性は全くなく、カラムに吸着している蛋白質を 1M KCl によって溶出した画分に全活性が回収された。oscillin は COIP ではないことが確認された。これは他の報告と一致する<sup>5,6)</sup>。

### 3) COIP の精製の試み (その 1)

予備実験として、精子抽出物を以下のクロマトグラフィーおよび分画法により、各々の過程での COIP の挙動と精製への適用の可否を検討した。

#### 硫酸分画

飽和度 30% 以上 60% 以下の硫酸存在下で沈澱する COIP 活性をもつ蛋白質を高い回収率で分画回収することができた。硫酸沈澱の状態では活性は安定ではなく、徐々に失活することが分かった。

#### 陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換カラム (Resource S) にかけて KCl の濃度勾配で溶出した。活性蛋白質はカラムに吸着し、200-300 mM KCl で溶出され、適用できると結論された。また COIP 活性が pH 6.0-7.5 の範囲でほぼ安定であることを確認した。

### ゲル濾過クロマトグラフィー

ゲル濾過カラム (Sephacryl S-200) で分子量 70 kDa の蛋白質が溶出される分画に COIP 活性があった。従来 COIP は限外濾過法によって 100 kDa 以上とされているが、本実験で約70 kDaであることが推定された。活性の回収率は十分に高く、ゲル濾過は適用できると結論された。

### 疎水クロマトグラフィー

精子抽出物を硫酸分画した後、疎水クロマトカラム (Octyl sepharose) に吸着させ、硫酸の逆濃度勾配で溶出を行った。活性は素通り画分とカラムに吸着された後溶出された画分とに分離された。疎水クロマトの適用は慎重な検討を要す。

### 3) COIPの精製の試み(その2)

上記の硫酸分画、陽イオン交換、ゲル濾過の3法に加え、従来より COIP の精製に適用できることが知られている陰イオン交換クロマトおよび Cibacron Blue FG3A アフニティークロマトを組み合わせ、精子抽出物から以下の一連のステップを順次行った。

#### ステップ1：硫酸分画

硫酸分画によりCaオシレーション誘発活性は30~60%の飽和度の硫酸アンモニウム存在下で塩析されて沈査に回収された。

#### ステップ2：陰イオン交換クロマトグラフィー(1)

硫酸沈澱で分画された活性画分を陰イオン交換 (Resource Q カラム) にかけて300-400 mM KClで溶出される画分を回収した。

#### ステップ3：陽イオン交換クロマトグラフィー

次の陽イオン交換 (Resource S カラム) で COIP 活性は素通り画分 (A) にも200-250 mM KCl 溶出画分 (B) にも回収されず、Aと



Bを混合すると活性が得られた。これは、ステップ2を省いた場合はBにのみ回収されたことと異なっている。その理由は不明であるが、A,Bに含まれる2種類の分子の共同作用によってCOIP活性が発現すると想定し、Bに含まれる活性成分の同定を試みた。活性のアッセイは、各段階での画分をAと混合してマウス卵に注入した。

#### **ステップ4：ゲル濾過クロマトグラフィー**

B画分をゲル濾過にかけ、70 kDaの溶出画分とAの混合でCOIP活性が認められた。

ステップ3のBの画分およびステップ4の活性画分を電気泳動して蛋白染色（CBB染色）した際に認められる主なバンドは3本となった。うち1本はゲル濾過において活性のない別の画分に多量に存在したことから活性とは関係ないと判断し、残りの2本のバンドをアミノ酸シーケンシングによって同定した。配列からそれぞれcarnitine acetyltransferase, carbonyl reductaseと推定された。しかし市販のcarnitine acetyltransferaseはマウス卵でCOIP活性を示さなかった。carbonyl reductaseのcDNAをPCR法によってハムスター精巢のmRNAよりクローニングし、大腸菌にリコンビナント蛋白質を合成させた。しかし合成された蛋白はCaオシレーション誘発活性を示さなかった。

#### **ステップ5：Cibacron Blue FG3A アフニティークロマト**

ステップ4で得られた画分をCibacron Blue FG3Aカラムに吸着させて1M KClによって溶出した。

#### **ステップ6：陰イオン交換クロマトグラフィー（2）**

高速液体クロマトグラフィー装置（HPLC）を用いて陰イオン交換クロマト（DEAE-5PWカラム）を用い、高い分離能での分画をめざ

したが、活性は消失して回収できなかった。

現在までのところ、我々の実験ではCaオシレーション誘発活性をもつ COIP の精製には至っていない。COIPの存在は10年前に示唆されたにも拘わらず、世界のどの研究グループも未だ精製に成功していない。幾つかの困難な問題点が推論される。

1) COIPは失活しやすく、高濃度でないと活性を示さない可能性がある。2) COIPはオリゴマーで機能し、精製を進めて単独の分子になると活性を示さない可能性がある。3) 複数の成分によって活性を示す可能性がある。4) ハムスター副睾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。5) 活性の検定が卵内への注入によりCaオシレーションの発生の有無でなされており、検定としての感度が悪い。これらの問題を克服するため、我々はブタ精巣から分離を始め、初期サンプル量を圧倒的に多くして大スケールで精製を始めている。COIPの発見の生物学的意義は重大であり、さらに実験を進める価値が充分あると考える。

#### 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. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379: 364-368, 1996.
  5. Shevchenko V, Hogben M, Ekong R, Parrington J, Lai FA. The human glucosamine-6-phosphate deaminase gene: cDNA cloning and expression, genomic organization and chromosomal localization. *Gene* 216: 31-39, 1998.
  6. Wolosker V, Kline D, Bian Y, Blackshaw S, Cameron M, Fralich TJ, Schnaar RL, Snyder SH. Molecularly cloned mammalian glucosamine -6-phosphate deaminase localizes to transporting epithelium and lacks oscillin activity. *FASEB J* 12: 91-99, 1998.

## II. 精子-卵融合に関わる分子機構

受精は精子-卵融合によってもたらされる。精子由来のCOIPは、精子-卵融合に際して精子細胞質から卵細胞質に移行すると考えられている。この精子-卵に必要な条件につき、精子先体反応誘発機序および卵表面融合蛋白質に関する研究を行った。

### 1. マウス精子先体反応を誘発するプロゲステロンおよびサイクリックヌクレオチドに対するCa増加反応の解析

精子先体反応<sup>1-3)</sup>は、精子-卵細胞膜融合に必須な準備段階である。先体反応は先体顆粒の開口分泌過程であり、精子細胞内Ca増加によって引き起こされる。分泌とともに、新たに露出した細胞膜が卵細胞膜と融合可能である。哺乳動物の先体反応は、卵を取り囲む透明帯 (zona pellucida) に存在するZP3という糖蛋白質によって特異的に誘発される。他方、卵丘から分泌され卵巣の卵胞液に含まれるプロゲステロンも先体反応誘発能を持つことが知られている<sup>4,5)</sup>。ステロイドホルモンに属するプロゲステロンに対する受容体は通常細胞内に存在するが、この場合は細胞膜の受容体を介して刺激が入るとされている。さらにプロゲステロンは、細胞内二次メッセンジャーであるサイクリックヌクレオチド (cyclic nucleotide; CN) の濃度を上昇させることがヒト精子で示されており<sup>6)</sup>、膜透過性のCNが先体反応を誘発することも報告されている<sup>7,8)</sup>。我々はプロゲステロンおよびCNによって誘発される細胞内Ca増加を、単一のマウス精子においてCa画像解析により記録し、Ca増加機序を解析した (Biology of Reproduction に発表; 後のページ参照)。

マウス精子に予め蛍光Ca指示薬fura2を取り込ませ、Ca-fura2結合による蛍光強度の増加を指標にして細胞内Ca画像解析を行った。4-40  $\mu$ Mのプロゲステロン投与により、濃度依存性にマウス精子の先体後領域で細胞内Ca濃度の上昇が記録された。このCa増加反応は2つのタイプに分けられた。1) 平均振幅335nMで持続が1~1.5分の一過性タイプで、Ca増加反応を示した約6割の精子で記録された。2) 振幅730 nMで持続が3分以上の持続タイプで、約4割の精子で記録された。一過性タイプのCa増加反応に比べ持続タイプはより高濃度のプロゲステロンを要し、精子を2~4時間前培養することによってより著明に増強された。

膜透過性のCNである 8-bromo-cGMP, 8-bromo-cAMP はともに、Ca増加反応を誘発したが、前者より有効であった。0.3-3 mMの 8-bromo-cGMPによって誘発されるCa増加反応は、振幅220 nMで持続が1分以内の一過性タイプであり、精子の前培養によって増強されなかった。

プロゲステロン、8-bromo-cGMPによって誘発されるCa増加反応はともに、細胞外Caを除去した溶液中では殆ど起こらないことから、Ca増加は細胞外からのCa流入によって起こることが判明した。Caチャンネルブロッカーの1つである pimozide は持続タイプのCa増加反応を完全にブロックし、一過性タイプのCa増加反応を部分的に抑制した。これらの結果から、プロゲステロンは不活性化ダイナミクスの異なる2つのCa流入経路を活性化し、一部の細胞は両者を保有していることが示唆された。またプロゲステロンによって誘発されるCa増加反応には、サイクリックヌクレオチドを介する過程が含まれることが示唆された。

本研究は、1) プロゲステロン, cAMP, cGMPは重要な細胞活性化因子, 二次メッセンジャーであり, これらが精子先体反応を誘発する過程に含まれるCa増加反応を捉えたこと, 2) 精子は極めて小さい細胞でありCa画像解析が困難とされていたが, 我々は個々の精子におけるCa増加反応を記録したこと, が成果と考える。

#### 参考文献

1. Wassarman PM. Profile of mammalian sperm receptor. *Development*, 108:1-17, 1990.
2. Kopf GS, Gerton GL. The mammalian sperm acrosome and acrosome reaction. In: Wassarman PM (ed.), *Elements of Mammalian Fertilization*. Boston, MA: CRC Press; p.153-203, 1991.
3. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.; p. 189-317, 1994.
4. Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833, 1989.
5. Meizel S, Pillai MC, Diaz-Perez E, Thomas P. Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS (eds.), *Fertilization in Mammals*. Norwell, MA: Serono Symposia, USA; p. 205-222, 1990.
6. Parinaud J, Milhet P. Progesterone induces  $Ca^{2+}$ -dependent 3',5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J Clin*



Endocrinol Metab 81:1357-1360, 1996.

7. Bielfeld P, De Jonge CJ, Anderson RA, Zaneveld LJD, Mack SR. Are capacitation or calcium ion influx required for the human sperm acrosome reaction? Fertil Steril 62:1255-1261, 1994.
8. Ronit R, Zamir N, Keynan N, Barkan D, Breitbart H, Naor Z. Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis of human spermatozoa. Am J Physiol 274:E218-E233, 1998.

## 2. マウス精子-卵融合に関与するCd9分子：遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験

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、精子細胞膜上のファーターリン<sup>1)</sup>、卵細胞膜上のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ <sup>2)</sup>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、細胞運動や細胞接着に関与すると考えられている<sup>3-5)</sup>。Cd9を過剰発現させると、筋細胞の融合や細胞のウイルス感染を促進させる<sup>6,7)</sup>。工藤教授らはCd9欠損マウスが不妊であることに気づき、Cd9は精子-卵融合の関わるのではないかと推測し、我々との共同実験でこれを調べた（Nature Geneticsに発表；後のページ参照）。

交配実験で出生率を調べると、ホモのCd9欠損メスマウスは正常オスとの交配によっても出生せず、ヘテロのCd9欠損メスは正常オスでもホモCd9欠損オスでも出生した。このことから、Cd9欠損マウスは卵の方に欠陥があることが分かった。ホモCd9欠損メスから採取した卵を正常精子で媒精した場合、精子は卵表面に結合はするが、融合がおこらないことが分かった。融合の判定には、媒精して90分後の卵に核クロマチンを染める蛍光色素DAPIを注入し、精子が融合していれば細胞質交流を介して色素が精子内に移行して精子核を染めることを利用した。

哺乳動物卵の受精時にはCaオシレーションがおこり<sup>8)</sup>、受精の指標になる。上記の体外受精時に卵細胞内Ca濃度変化をfura-2を用いて画像解析した。ホモCd9欠損卵では殆どがCaオシレーションを起こさなかった。このことから、Caオシレーションは精子-卵融合が起こって初めて誘発されるものであり、精子のCOIPの卵内移行説が支持される。

Cd9の抗体を用いて免疫組織化学を正常卵に施行してCd9の分布を調べ、蛍光標識されたCd9は卵表面に存在することが確認した。微絨毛が欠損している減数分裂装置の上の表面、受精丘の領域では染まらないことから、Cd9は微絨毛に存在すると結論された。また、結合した精子の先端部分に相対する卵表面にCd9が密集していた。この境域は精子-卵融合が起こる部位と少し外れており、Cd9はインテグリンと相互作用して融合部位に移動させるような働きをしているのではないかと推論された。

本研究は、Cd9分子が精子-卵融合に関与することを、分子生物学的手法と生理学的解析によてきれいに示したことが成果である。

## 参考文献

1. Cho C et al. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin  $\beta$ . *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. Loffler S et al. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol* 71: 42-49, 1997.
7. Willett B, Hosie M, Shaw A, Neil J. Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol*. 78: 611-618, 1997.
8. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ $Ca^{2+}$  release channel in  $Ca^{2+}$  waves and  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158: 62-78, 1993.

### Ⅲ．IVF, ICSIに際するCaオシレーションの時空間的解析

COIP を機能的に同定するためには，それを卵細胞内に注入した際におこるCaオシレーションと，体外受精(in vitro fertilization; IVF)時，細胞内精子注入 (intracytoplasmic injection; ICSI) 時におこるCaオシレーションとを比較対照することが必要である．本研究では，マウス卵のIVFおよびICSIに際する反復性の細胞内Ca増加を画像解析により詳細に解析した．

#### 1．マウス卵受精時のCa増加反応の時空間的解析

透明帯を除去したマウス卵にCa指示蛍光色素 Calcium Green を注入し，少量の精子で媒精して1個の精子しか結合しなかった受精卵 (monospermy) で，Caオシレーションの1個1個のCa増加反応を高速Ca画像解析装置で記録した．特に伝播性のCa増加 (Ca波) の開始部位を，精子の侵入部位および動植物極軸との関連において詳細に観察した (Developmental Biology に発表；後のページ参照) ．

Caオシレーションは卵に付着した精子のべん毛運動の停止後1-4分で開始し，10数分の間隔で一過性のCa増加反応を繰り返して示し，雌雄前核の形成時 (~3時間後) に停止した．この間どのCa増加反応も，卵の1領域から始まり全域に伝播するCa波を示した．最初のCa増加反応はその後のCa増加反応より大きく持続も長い．最初のCa増加反応ではCa濃度上昇は，"肩" (shoulder) を伴って2段階に分かれ，2つの異なるCa遊離機構によって起こることが示唆された．第一段階は精子が融合した部位から始まり，

4-5秒で反対極に達する Ca 波を形成した（多くの例で伝播速度は約 20  $\mu\text{m}/\text{秒}$ ）。第二段階は shoulder からピークまでの12-15秒で、卵全体でほぼ同期してCa濃度が上昇した。Ca波の直後に、同方向に向かう卵の一過性の小さい動き（cytoplasmic movement）が観察された。Caオシレーションが進行するにつれてこれらの特性は次のように変化した。1）一過性のCa増加反応の持続時間が短縮した。2）shoulder の位置が高くなり、第一段階がCa上昇期の大部分を占めるようになる。3）Ca上昇速度が速くなり、これとともにCa波の伝播速度は80-100  $\mu\text{m}/\text{秒}$ にまで大きくなった。4）一過性のcytoplasmic movement はどのCa増加反応にも付随しておこり、その動きはしだいに小さくなった。5）Ca波の開始部位は精子融合部位から離れていき、最後は植物半球の卵表層細胞質から起こるよう変化した。

Caオシレーションの個々のCa波が植物極付近のペースメーカー部位からおこるようになることが原索動物ホヤ<sup>1,2)</sup>卵や紐形動物ヒモムシの卵<sup>3,4)</sup>で知られている。またホヤ卵ではCa波に伴って著明な収縮がおこり、受精卵の細胞質再分布をもたらすと考えられている。マウス卵でこれらに類似した現象が見られたことは、系統発生的に興味深い。本研究で得られた結果は、COIPを機能的に解析するための対照として有用である。

#### 参考文献

1. Speksnijder JE. The repetitive calcium waves in the fertilized ascidian egg are initiated near the vegetal pole by a cortical pacemaker. *Dev Biol* 153: 259-271, 1992

2. McDougall A, Sardet C. Function and characteristics of repetitive calcium waves associated with meiosis. *Curr Biol* 5: 318-328, 1995.
3. Stricker SA. Repetitive calcium waves induced by fertilization in the nemertean worm *Cerebratulus lacteus*. *Dev Biol* 176: 243-263, 1996.
4. Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* 211: 157-176, 1999.

## 2. ICSI に際するCa増加反応の時空間的解析

卵内への精子注入（ICSI）により体外授精し母体にもどして出生させる方法は、1992年のPalermo<sup>1)</sup>らの最初の報告以来著しく進歩し、近年の男性不妊の有力な治療法として採用されている。Tesarikら<sup>2)</sup>はICSIに際する細胞内Ca増加反応をヒト卵で初めて記録し、Ca増加反応は精子注入後4～10時間でおこり始め、それによって卵活性化（受精）がおこることを報告した。我々もマウス卵のICSIによるCaオシレーションを記録した<sup>3)</sup>。正常の受精の場合は、卵表面に結合した精子は直ちにその部位の直下の卵細胞質でCa増加を誘発する。ICSIは精子-卵結合をバイパスするわけであるが、COIPが注入精子から卵細胞質に漏出してCa増加反応をおこすと推論される。上記の場合、注入された精子の細胞膜が壊れてCOIPの漏出までに長時間かかると推論される。このように長時間後では、最初のCa増加反応を捉えることは難しい。また注入時の細胞損傷によってCa増加が起こるかも知れない。本研究では、不動化したマウス精子を卵内注入している最中および注入後におこるCa増加反応の時・空間的变化を、共焦点レーザー顕微鏡を



用いて詳細に解析した(Cell Calcium に発表；後のページ参照)。

マウス精子 1 個をガラスマイクロピペットで軽く培養皿の底に押し付けて不動化したのちピペットに吸い込み，マウス卵に注入した。卵には予め Ca 蛍光指示色素 Calcium Green を注入しておき，Ca 増加を高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて記録し，注入の状況を赤色光を照射して明視野で観察しビデオに収めた。

精子注入の過程で必ず Ca の増加が起こった。これがおさまったあとで最初の Ca 増加反応が 25-30 分で起こった。この場合ベースの Ca 濃度がゆっくりと徐々に上昇し，ある臨海濃度に達すると大きな Ca 増加反応が起こった。この Ca 増加は，注入した精子付近から起こるのではなく，卵全体で同調して起こった，40-70 秒でピークに達し，持続は 5-7 分であった。その後の Ca 増加反応は 20-30 秒の間隔で発生し，Ca 上昇がより速く，持続時間が短縮した。Ca 上昇は卵の一部の表層細胞質から起こり始め，卵を横断して全体に伝播する Ca 波を形成した。その速度は後の方の Ca 増加反応ほど速くなった。精子注入時のアーティファクトによる Ca 増加はその後の Ca 増加反応に影響を与える。大きなアーティファクトが起こった場合は，その後の最初の Ca 増加反応の上昇速度を速くし，Ca 波ではないが細胞質でやや不均一な上昇を示し，持続時間も短かった。二番目の Ca 増加反応に対しては振幅をやや小さくする影響があり，三番目以降の反応にたいしては殆ど影響しなかった。

本実験から，卵内に注入された精子から精子因子が漏出し，それが卵細胞質の広い範囲に拡散して，小胞体からの Ca 遊離チャネルを感作する結果，細胞質全体に亘って同期的に Ca 増加がおこることが示唆された。感作が昂進すると，精子因子に対してより感受性

の高い表層細胞質<sup>4)</sup>からCa遊離が始まり、遊離されたCaが近隣の  
小胞体のCa遊離チャネルからCaを遊離し、この過程によってCa  
波が形成されると考えられる。

#### 参考文献

1. Palermo GD, Avrech OM, Colombero LT, Wu H, Wolny YM, Fissor RA, Rosenwaks Z. Human sperm cytosolic factor triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and overcome activation failure of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod*, 3: 364-374, 1997.
2. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod*, 9: 511-518, 1994.
3. 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.
4. Oda S, Deguchi R, Mohri T, Shikano T, Nakanishi S, Miyazaki S. Spatiotemporal dynamics of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise induced by microinjection of sperm extract into mouse eggs: preferential induction of a wave from the cortex mediated by the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Dev Biol* 209: 172-185, 1999.

## VI. 精子抽出物の作用

COIP を同定した場合，その作用機序を解明することが必須である．未だ同定されていない現状で粗精製の精子因子の作用をしらべておくことは有用であると考え，生理学的な解析を行った．ハムスター精子を超音波で破碎し，抽出液物を Cibacron BlueR F3GA アフィニティークロマトグラフィーで精子因子を粗精製し，マウス卵内に注入して Ca 増加反応の時空間的な画像解析を行った．また精子因子により Ca 流入と Ca 遊離を生理学的実験により解析し，Ca 動態の計算によるシミュレーションを行った．

### 1. 精子因子の卵注入時の Ca 増加反応の時空間的解析

粗精製の精子因子を蛍光色素 Cy3.5 でラベルした．これを，予め Ca 指示蛍光色素 Calcium Green を注入したマウス卵にガラスマイクロピペットから微量注入し（0.2 pl; 卵体積の 1/1000），誘発される Ca オシレーションの初めの Ca 増加反応を Calcium Green の緑色蛍光で捉え，共焦点レーザー顕微鏡で詳細に画像解析した．注入された精子因子の部位および拡散を，Cy3.5 の赤色蛍光を指標にして別のチャンネルで捉え，Ca 増加の画像と同時記録した（Developmental Biology に発表；後のページ参照）．

精子抽出物の注入により，受精時に類似した Ca オシレーションが発生した．この Ca オシレーションは，イノシトール 3 リン酸（IP<sub>3</sub>）受容体に対する単クローン抗体（18A10<sup>11</sup>）の前注入によって完全に抑制されることから，IP<sub>3</sub> 受容体を介する小胞体からの Ca 遊離によることが示された．

精子因子を卵の表層細胞質に注入した際には、注入部位から常にCa波が発生した。この反応の開始には、注入から5～30秒の遅れがあり、注入蛋白濃度を下げると遅延時間は延長した。Ca波は精子因子の拡散に先行して伝播した。これは、精子因子が注入部位でCa遊離を局所的に誘発し、それからIP<sub>3</sub>R受容体の特性であるCa依存性Ca遊離機構によってCa波を形成すると考えられる。注入する精子抽出物を希釈していくと、Caは受精時に見られる<sup>2)</sup>のと同じように二段階で上昇した。このときの精子抽出物は1～2個の精子に相当する量であると計算された。精子抽出物を比較的高い濃度で卵中心部に注入すると、中心部から放射状のCa波が起こった。希釈した精子抽出物を注入すると、遅延時間は著明に延長し、Ca増加速度は遅くなり、卵全体で同期的に上昇するか、表層細胞質がやや先行して上昇を示した。Ca増加反応を誘発する臨界濃度は、表層部の方が中心部に比べて低かった。即ちCOIPに対する感受性は中心部に比べて表層で高いことが明らかにされた。IP<sub>3</sub>の微量注入に対しても表層細胞質の感度が高かった。

表層細胞質は機能的に特殊化したIP<sub>3</sub>受容体および小胞体構造を備えており<sup>3)</sup>、精子-卵融合部位から卵に導入されるCOIPがCa遊離を起こしやすくしていることが示唆された。

#### 参考文献

1. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K. Block of Ca<sup>2+</sup> wave and Ca<sup>2+</sup> oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 257: 251-255, 1992.

2. Deguchi R, Shirakawa H, Oda S, Mohri T, Miyazaki S. Spatiotemporal analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev Biol* 2000; 218: 299-313, 2000.
3. Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 170: 607-615, 1995.
4. Mehlmann LM, Mikoshiba K, Kline D. Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* 180: 489-498, 1996.

## 2. 精子因子によるCa流入・Ca遊離の解析

哺乳動物卵でのCaオシレーションの個々のCa増加反応は、細胞内Ca貯蔵小器官である小胞体からのCa遊離によるものであり、主に小胞体膜上の $\text{IP}_3$ 受容体を介する<sup>1)</sup>。研究代表者らは、反復性Ca増加反応の頻度が細胞外濃度を上げると増加し、下げると減少し、Caを除去するとCaオシレーションが消失することを報告している<sup>2)</sup>。即ち反復してCa遊離がおこるためには、細胞外からのCa流入が必要である。COIPがCa遊離とともにCa流入をも活性化するかどうかを調べることは重要である。本研究では、粗精製の精子因子をマウス卵に注入した際のCa流入とCa遊離をMn quenching法によって解析した。この方法は、細胞外に0.1 mMのMnを加えるとCa流入経路を介してMnが流入し、予め卵に取り込ませておいたfura-2にMnが結合して蛍光強度が減少することを利用した測定法である。細胞内Ca濃度は340 nmの

励起光に対する fura-2 の蛍光増加で記録し，Mn quenching は 360 nm の励起光に対する蛍光減少で記録した（Cell Calcium 印刷中；後のページ参照）。

静止状態（無刺激状態）でマウス卵には Mn 及び Ca (Mn/Ca) の流入が存在した。精子抽出物を卵内に注入すると，最初の大きな Ca 遊離とともに著明な Mn/Ca 流入がおこり，その後の Ca オシレーションの最中には Mn/Ca 流入が持続的に増強していた。持続的な Mn 流入より細胞内 Mn 濃度が増加するにつれ，反復性の一過性の Mn 増加反応が発生した。個々の Mn 増加反応は Ca 増加反応に一致して起こるが，時間経過は Ca 増加反応に比べより緩やかであった。この現象を，Ca と Mn が競合的に細胞膜および小胞体膜を出入りするという仮定を基盤として，計算によりシミュレーションしてみた。その結果は実験結果と非常に良く一致した。このことから，細胞外から流入した Mn がさらに小胞体に取り込まれ，そして小胞体から細胞質に遊離されることが強く示唆される。

別の実験で，卵を Ca 除去溶液中に置き，小胞体へ Ca を取り込む Ca ポンプのブロッカーである thapsigargin を投与し，さらに  $IP_3$  を反復注入して小胞体を空にしておき，細胞外液に Mn を加えると，著明な Mn 流入が起こった。このことから，小胞体の Ca 容量に依存する Ca 流入経路 (capacitative Ca entry<sup>3,4)</sup>) を介して Mn/Ca が流入することが結論された。また  $IP_3$  受容体の抗体 18A10 を予め卵に注入して Ca 遊離をブロックしておいて精子抽出物を注入した場合，有意の Mn/Ca 流入は起こらなかった。 $IP_3$  あるいは Ca の注入によっても同様であった。従って精子因子は直接的には Ca 流入を活性化する作用を持たないこと， $IP_3$  あるいは Ca もそれ自身



はCa流入を活性化しないことが明らかになった。

精子因子によって誘発されるCaオシレーションの最初のCa遊離に伴ってcapacitative Ca entryによってCa流入がおこり、コンスタントなCaオシレーションが起きている最中にcapacitative Ca entryがそのまま持続的に促進されていると結論された。持続的なMn流入によって反復性のMn遊離が起こるという所見から、COIPによって誘発されるCaオシレーションがおこっているときには持続的なCa流入が小胞体にCaを充填させ、それによって反復性のCa遊離即ちCaオシレーションを維持させるという結論が得られた。

#### 参考文献

1. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channel in  $\text{Ca}^{2+}$  waves and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158: 62-78, 1993.
2. Igusa Y, Miyazaki S. Effects of altered extracellular and intracellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. *J Physiol* 340: 611-632, 1983.
3. Putney JW Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 7: 611-624, 1990.
4. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930, 1997.

## V. 他の動物種での精子因子, COIPの応用

精子の Ca オシレーション誘発蛋白質による卵活性化のメカニズムが哺乳類以外の動物種での受精にいおても存在するかどうかを調べることは、精子因子の普遍性を意義づける点で重要である。本研究では、原索動物ホヤの精子抽出物をホヤ卵に注入して Ca 増加反応を記録し、受精時の Ca 増加反応および生物学的現象と比較した。また COIP を応用する試みとして、マウスの未完成精子とともに成熟精子から採取した抽出物を加えてマウス卵に注入し、受精・胚発生・出生をおこさせる実験を行った。

### 1. ホヤ卵における精子因子注入時のCa増加反応

ホヤ未受精卵は第一減数分裂の中期 (M II) に留まっており、受精によって減数分裂が再開して第一極体を形成する。続いて第二減数分裂に入り、第二極体を形成し、そして卵割に至る。減数分裂が完了するのにわずか30分しかかからないため、Ca オシレーションと細胞周期の関連を観察することが可能である。本研究では、ユウレイボヤ (*Ciona savini*) の精子抽出物をホヤ卵に注入し、卵細胞内 Ca 濃度変化を記録した。ホヤ 100 匹をホモジェナイズし、遠心して上清に精子抽出物を得た。これを予め Ca 指示蛍光色素 Calcium Green Dextran を注入したホヤ卵にガラスマイクロピペットで微量注入した (Development に発表; 後のページ参照)。

精子抽出物の注入により Ca オシレーションが発生した。この Ca オシレーションは受精時に起こるもの<sup>1)</sup>と極めてよく類似しており、受精時と同じ時間経過で減数分裂が再開・進行した。Ca オ

シレーションは第一，第二減数分裂の中期に相当する2つのセットからなり，第一極体が形成される時期に約5分間停止したのち2セット目のCaオシレーションがocこり，第二極体形成時に再び停止した．Caオシレーションを誘発する精子抽出物の臨界濃度は，精子約1個分に相当した．これらのことから，ホヤにおいても精子のCOIPが受精時に作動するシステムが存在しており，卵活性化を誘発することが結論された．

最初のCa増加反応を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に画像解析した．卵表層部に精子抽出物を注入すると，その部位からCa増加が始まり，伝播性に卵全対に波及するCa波が起こった．卵の中心部に注入した場合は，約30秒の遅延ののち，表層細胞質の任意の部位からCa波が発生した．やはり表層細胞質が精子因子に対する感受性が高く，注入された精子因子が拡散して表層からCa遊離を誘発すると考えられる．精子因子は熱によって失活し，メンブレインフィルターを用いて推測された分子量は3～10万の範囲であった．

本研究では，精子因子説が原索動物にも適用できることが明らかにされた．また誘発されるCaオシレーションが細胞周期に依存して停止したり再開したりするという興味深い所見が得られた．

#### 参考文献

1. Russo GL, Kyozyuka K, Antonazzo L, Tosti E, Dale B. Maturation promoting factor in ascidian oocytes is regulated by different intracellular signals at meiosis I and II. *Development* 122, 1995-2003, 1996.

## 2. 円形精子細胞 + 精子因子の注入による受精

精子前駆体である円形精子細胞（1n ハプロイド）や二次精母細胞（2n ハプロイド）は、べん毛が未だ形成されていないので通常の受精はできないが、成熟卵内に注入すると受精能および正常胚発生能を有していることが Kimura and Yanagimachi<sup>1)</sup>によってマウスで示されている（round spermatid injection; ROSI）。しかしこれらの未成熟精子の注入だけでは卵を活性化できないため、高圧電気パルスを一瞬かけて細胞内Caを一過性に1回だけ増加させることによって卵を活性化している<sup>1)</sup>。哺乳動物卵の通常の受精ではCaオシレーションがおり、前核の形成や初期発生に対して促進的なよい条件を与えることが報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、成熟精子の抽出物を円形精子細胞とともにマウス卵に注入し、受精・胚発生を得る試みを行った。

円形精子細胞と精子抽出物との同時投与により、受精時に類似したCaオシレーションが誘発され、少なくとも4時間以上持続した。そして92%の卵で活性化が起こった。75%の卵で雌雄前核が形成され、2細胞期に発達した。この胚を5日間培養した間に50%が囊胚期に発達した。精子抽出物のみの注入では囊胚は得られなかった。上記2細胞期の胚を疑似妊娠させた母体に移植して、正常な出生が得られた。その成功率は22%であった。新生児は正常な染色体を持った成人に発育した。

本実験で試された方法は、精子形成不全などの男性不妊に対して、精子前駆体ではあるがゲノムのインプリンティングを終えた円形精子細胞を用いたROSIに利用できることを示し、COIPの応用の可能性を示したことが成果である。

## 参考文献

1. Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 121: 2397-2405, 1995.
2. Swann K, Ozil J-P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Intnatl Rev Cytol* 152: 183-222, 1994.