

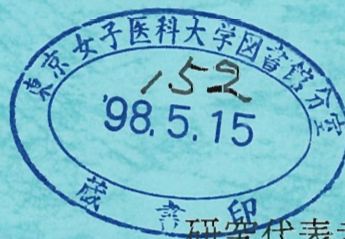
哺乳動物受精時の精子由来卵活性化因子の
同定と卵細胞内Ca²⁺増加の分子機構の解明

(課題番号 08457016)

平成8年度～平成9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10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卵活性化因子の
同定と卵細胞内Ca²⁺増加の分子機構の解明

(課題番号 08457016)

平成8年度～平成9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10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

受精のメカニズムは1世紀以上にもおよぶ歴史をもつ生物学上重要な研究課題であるにも拘わらず、未だ本質的な解明に至っていない。これまでに調べられた全ての動物種の受精に共通して、卵細胞内カルシウムイオン（以下 Ca）濃度の劇的な上昇が起こり、この Ca 増加反応が卵活性化の引き金の役割を果たすと考えられている。研究代表者らは10数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振動（Ca oscillation）を形成して数時間も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振動はマウス、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒトに至るまで哺乳動物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、即時的な機能として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振動は、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振動がイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP₃) 受容体/Caチャンネルを介する小胞体からのCa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 (Science 1992)。また、細胞外からのCa流入が活性化され、小胞体にCaを補給して反復性のCa遊離を可能にするところを見だし (Cell Calcium, 1989)、IP₄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IP₃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-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。

次の課題は、精子の如何なる物質がどのような機構で卵にCa増加反応を誘発し卵を活性化するかという、受精の本質的な問題の解明である。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てきたが、未だ証拠が得られていない。他方、精子細胞内に卵活性化蛋白質 (Egg Activating Protein, EAP) が存在し、精子・卵融合により卵内に核と共に移入するという説が提唱されている。ハムスター精子の抽出物を卵内に注入すると受精時に類似したCa振動が起こることがSwannによって示され、その蛋白質が精製されたという報告がなされた。しかし、この蛋白質に関しては追試報告が無く、疑義が出されている。現在の最大の課題は、確実なEAPを同定し、それが受精時に実際機能していることを実証し、

またその作用機序を解明することであると考えられる。

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。ICSIに際して卵細胞内Ca増加がどのようにおこるかを解析することは、EAPとの関連において興味深く、かつ重要な課題である。またICSIをさらに発展させて、未成熟精子を卵内に注入する方法が採用されようとしているが、その基礎的動物実験を行うことが必須である。

以上のような背景のもとに、本研究は、受精時のCa増加反応に至る卵活性化の分子機構を解明するステップとして位置づけ、実施された。

- 1) まず現象論として、精子が最初に卵に引き起こす電気現象およびCa増加反応を分離して捉えることを目的として、精子-卵融合が一過性にしかおこらない条件を融合阻害剤ジャスピシン存在下で設定し、膜電流とCa画像の同時記録をウニ卵を用いて行った。これにより、精子結合部位直下の卵細胞内で局所的におこるCa増加を分離して記録することに成功し、その時・空間的特性を解析した。（Development, 1998）
- 2) マウス成熟卵を用いて細胞内への精子注入を行い、Ca画像解析装置および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞内Ca増加反応の時・空間的解析を行い、基礎になる実験結果を得、論文に発表した。（Molecular Human Reproduction, 1997）

- 3) マウス未成熟精子（円形精子細胞）の卵内注入を行った。円形精子細胞のみではCa増加反応は誘発できず、卵活性化もおこらない。IP₃受容体の強力なアゴニストであるアデノホスチンを円形精子細胞と同時に注入して人為的にCa振動を誘発し、受精させることに成功した。さらに2細胞期に入った胚を宿主母体に移植し、正常な産仔を得た（Biology of Reproduction, 印刷中）。
- 4) 本研究のメインテーマであるEAPの精製に関しては、卵内注入によってCa振動を誘発する活性をもつ蛋白質をハムスター、ホヤ精子から抽出した。この抽出物をハムスター、マウス、ホヤ卵の表層および中心部にそれぞれ微量注入してCa増加反応をレーザー顕微鏡で詳細に画像解析し、卵表層部がこの精子因子に感受性が強いことを明らかにした。今後さらに精製を進める予定である。

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，研究経費

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）

白川英樹（同 助手）

白石浩一（同 助手）平成 8 年度

淡路健雄（同 助手）平成 9 年度

研究経費

平成 8 年度 3, 6 0 0 千円

平成 9 年度 3, 3 0 0 千円

計 6, 9 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。

桑原慶紀氏（順天堂大学医学部産婦人科学教授）

三橋直樹氏（同 助教授）

竹内裕之氏（同 学講師）

中野義宏氏（同 大学院生）

佐藤雄一氏（同 大学院生）

桜井明弘氏（同 大学院生）

御子柴克彦氏（東京大学医科学研究所化学部教授）

池上晋氏（広島大学生物生産学部細胞生理化学教授）

毛利達磨氏（生理学研究所細胞内代謝部門助手）

出口竜作氏（同 日本学術振興会特別研究員）

経塚啓一郎氏（東北大学理学部浅虫臨海実験所助手）

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) Nakano, Y., Shirakawa, H., Mitsushashi, N., Kuwabara, Y. and Miyazaki, S.:
Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol. Human Reprod.*, 3: 1087-1093, 1997.
- 2) Mohri, T., Miyazaki, S., Shirakawa, H. and Ikegami, S.:
Sperm-induced local $[Ca^{2+}]_i$ rise separated from the Ca^{2+} wave in sea urchin eggs in the presence of a gamete fusion inhibitor, jaspisin. *Development*, 125:293-300, 1998.
- 3) Sato, Y., Miyazaki, S., Shikano, T., Mitsushashi, N., Takeuchi, Y., Mikoshiba, Y. and Kuwabara, Y.:
Adenophostin, a potent agonist of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, is useful for fertilization of mouse eggs injected with round spermatids leading to normal offspring. *Biol. Reprod.*, in press, 1998.
- 4) Shirakawa, H. and Miyazaki, S.:
Spatiotemporal analysis of intracellular calcium increases in hamster sperm induced by solubilized zona pellucida. *Jpn. J. Physiol.*, 47, Suppl. 2: S62, 1997.
- 5) Sato, Y., Shirakawa, H. and Miyazaki, S.:
The use of an agonist of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, adenophostin, for activation of mouse eggs injected with round spermatids. *Jpn. J. Physiol.*, 47, Suppl. 2: S61, 1997.
- 6) Mohri, T., Ikegami, S. and Miyazaki, S.:
Analysis of sperm-induced Ca^{2+} response and membrane current in sea urchin eggs in the presence of jaspisin. *Cell Struct. Func.* 22: 782, 1997.
- 7) Kyojuka, K., Degichi, R., Mohri, T. and Miyazaki, S.:
Intracellular calcium oscillations and meiosis resumption from metaphase I induced by injection of the sperm extract in the acidian *Ciona savignyi*. *Zool. Sci.*, in press, 1998.

2. 解説等

1) 宮崎俊一：

精子-卵結合の信号伝達における Ca^{2+} ウェーブと Ca^{2+} オシレーション
『細胞内カルシウムオシレーションとウェーブ』
医学のあゆみ, 176巻 6号, 381-384, 医歯薬出版, 1996.

2) 宮崎俊一：

受精と卵細胞内情報伝達機構.
日本受精着床学会雑誌, 14巻, 15-18, 1997.

3) 尾田正二, 宮崎俊一：

受精とカルシウム
『カルシウムと細胞内情報伝達』
細胞工学, 16巻1号, 87-93, 1997.

4) 佐藤雄一, 宮崎俊一：

受精のシグナル伝達とICSI：基礎研究と臨床との接点
『今日の話題』, 産婦人科の実際, 46巻1号, 81-88, 1997.

5) 宮崎俊一：

Ca^{2+} により誘導される受精時の卵活性化現象
Circulatory Regulating Factor, 2巻, 7-8, 1997.

II. 口頭発表

1. 学会発表

1) 中野義宏, 佐藤雄一, 豊成由佳, 淡路正則, 竹内裕之, 三橋直樹, 桑原慶紀, 白川英樹, 宮崎俊一：

マウス卵細胞質内精子注入法における卵細胞内カルシウムイオン画像解析
日本産婦人科学会雑誌 48 : s-443, 1996.
第48回日本産婦人科学会学術講演会, 横浜市, 横浜市立大, 1996, 4月.
日本産婦人科学会雑誌 48 : s-443, 1996.

2) 中野義宏, 佐藤雄一, 豊成由佳, 淡路正則, 竹内裕之, 三橋直樹, 桑原慶紀, 白川英樹, 宮崎俊一：

マウスICSI卵におけるカルシウム画像解析
第14回日本受精着床学会学術講演会, 郡山市, 福島県立医大,
1996, 7月.
日本受精着床学会雑誌, 14巻, 247, 1997.

- 3) 中野義宏, 佐藤雄一, 竹内裕之, 三橋直樹, 桑原慶紀, 宮崎俊一 :
マウス卵ICSIにおける細胞内カルシウムイオンの役割.
第41回日本不妊学会学術講演会, 徳島市, 徳島大, 1996, 11月
日本不妊学会雑誌, 41: p. 448, 1996.
- 4) Shirakawa, S and Miyazaki, S. :
Sources of nuclear calcium in hamster oocytes. 12th Internatl. Symp. of
Biol. Reprod., Hayama, Japan, November, 1996.
- 5) 白川英樹, 宮崎俊一 :
先体反応誘発刺激に対するハムスター精子内Ca上昇様式の解析
第74回日本生理学会大会, 浜松市, 浜松医大, 1997, 3月.
- 6) 佐藤雄一, 白川英樹, 宮崎俊一 :
非分解性IP₃アナログの円形精子細胞注入マウス卵の活性化への利用
第74回日本生理学会大会, 浜松市, 浜松医大, 1997, 3月.
- 7) 佐藤雄一, 中野義宏, 豊成由佳, 淡路正則, 竹内裕之, 三橋直樹,
桑原慶紀, 白川英樹, 宮崎俊一 :
円形精子細胞注入マウス卵の活性化法: 非分解性IP₃アナログの利用
第49回日本産婦人科学会学術講演会, 東京, 1997, 4月.
日本産婦人科学会雑誌, 49: Suppl. S421, 1997.
- 8) 中野義宏, 佐藤雄一, 豊成由佳, 淡路正則, 竹内裕之, 三橋直樹,
桑原慶紀, 白川英樹, 宮崎俊一 :
マウス卵細胞内精子注入法における卵細胞内カルシウムイオン画像
解析
第49回日本産婦人科学会学術講演会, 東京, 1997, 4月.
日本産婦人科学会雑誌, 49: Suppl. S421, 1997.
- 9) 白川英樹, 宮崎俊一 :
哺乳類精子先体反応におけるカルシウム動態の解析
第30回日本発生生物学会, 筑波大, 1997, 5月.
- 10) Miyazaki, S. and Shirakawa H. :
Spatiotemporal analysis of calcium dynamics in hamster spermatozoa during
acrosomereaction observed with confocal microscopy. 33rd Internl. Congr.
of Physiol. Sci., St. Petersburg, Russia, June, 1997.

- 11) 毛利達磨, 池上晋, 宮崎俊一 :
ウニ卵受精時の増加反応と膜電流
第48回日本細胞生物学会大会, 横浜, 1997.9月
- 10) 経塚啓一郎, 出口竜作, 毛利達磨, 宮崎俊一 :
精子抽出物の卵内注入によるホヤ卵減数分裂の再開と卵内カルシウムイオン濃度変化
日本動物学会第68回大会, 奈良, 1997.10月:
- 11) 毛利達磨, 池上晋, 宮崎俊一 :
精子融合直後に誘発されるウニ卵細胞内局所性Ca²⁺増加
第75回日本生理学会大会, 金沢市, 金沢大, 1998, 3月発表予定.
- 12) 出口竜作, 経塚啓一郎, 毛利達磨, 宮崎俊一 :
精子因子注入によるホヤ卵Ca²⁺波と減数分裂対応性Ca²⁺オシレーション
第75回日本生理学会大会, 金沢市, 金沢大, 1998, 3月発表予定.
- 13) 尾田正二, 毛利達磨, 出口竜作, 鹿野朝秀, 宮崎俊一 :
精子因子のマウス卵細胞内Ca²⁺遊離誘発部位の時空間的解析
第75回日本生理学会大会, 金沢市, 金沢大, 1998, 3月発表予定.

2. シンポジウム発表

- 1) 宮崎俊一 :
受精と細胞内情報伝達機構
第14回日本受精着床学会教育講演『配偶子の成熟から着床をめぐる新知見』
福島県郡山市, 1996.7月.
- 2) 細胞内シグナルとしてのカルシウムイオンのはたらき
生理学研究所一般公開講演 岡崎市, 1996.10月.
- 3) 宮崎俊一 :
受精とカルシウム
千里ライフサイエンスセミナー『細胞内カルシウム動態とシグナル伝達』, 豊中市, 1997.2月.

4) 宮崎俊一：

卵細胞

カルシウムイメージング講習会，東京，1997.5月.

III. 著書

1) 白川英樹，宮崎俊一：

卵細胞内カルシウム：ハムスター

『細胞内カルシウム実験プロトコール』工藤佳久編，

pp. 159-168, 羊土社，1996.

研 究 成 果

I . 精子による最初の卵細胞内局所的Ca増加反応の分離記録

精子付着後最初に卵細胞に起こる現象は、「受精電位」とよばれる膜電位変化と、「Ca波」である。精子がどのように卵を活性化するかを解明するためには、これらの現象のおこりはじめをとらえて解析することが重要な手掛りとなる。受精電位に関しては、Chambers^{1,2)}のグループがウニ卵での受精電流（膜電位固定法によって電圧でなく電流を記録）の詳細な解析を発表してきている。それによると、精子の付着直後にステップ状の小さい内向き電流 (I_{on}) がおこり、それから受精電位に対応する大きな内向き受精電流が発達する。この受精電流はCa波に対応し、細胞内Caによって活性化される陽イオンチャネルを介するものである。 I_{on} が起こるときには、精子-卵間で電氣的な接続が起こっていることから、 I_{on} は精子-卵融合がおこる時点を示す現象であろうと解釈された³⁾。さらに Chambers らは、膜電位をマイナス数十mV以上に固定すると、精子の卵内への侵入が阻止されることを見い出した^{1,2)}。このとき一度卵に融合した精子はすぐに卵から離れてしまい、 I_{on} のうち受精電流が発達せずに電流はカットオフされてしまう (I_{off})。このように初期の精子-卵融合によって誘発される電氣的变化が分離記録された。一方、細胞内Ca濃度変化に関してはこのような記録はなされていない。

我々はウニの精子-卵融合を阻害するジャスピシン（海綿から精製された物質で metallo-endoproteinaseの活性を阻害する作用を

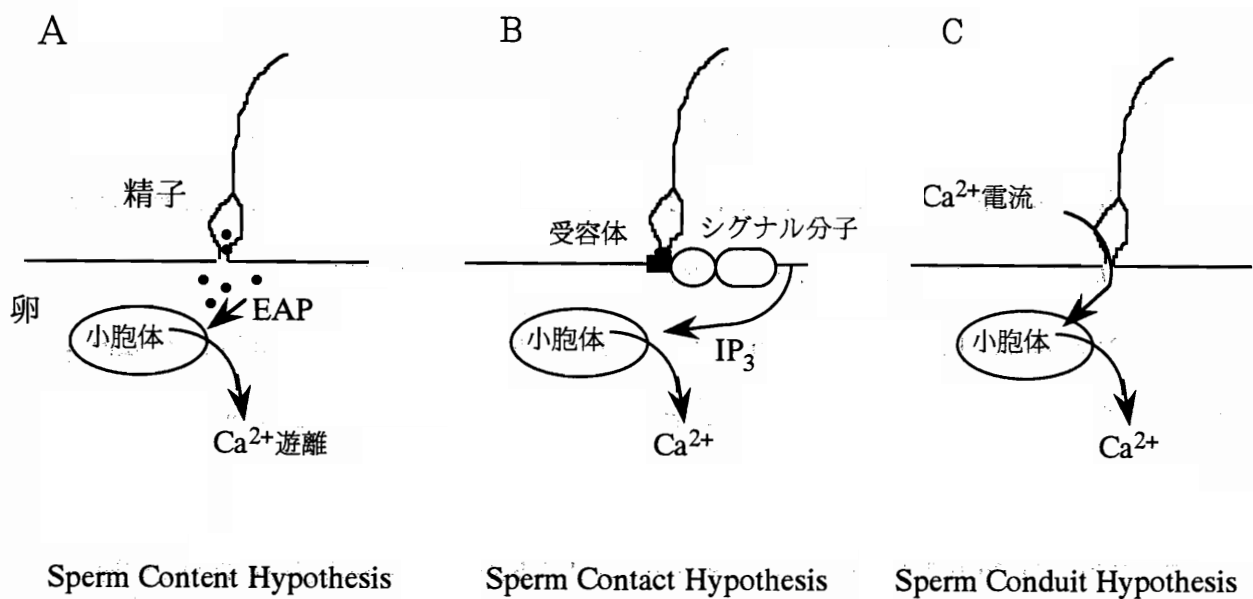
もつ⁴⁾) 存在下で、精子-卵融合が一過性にしか起こらない条件を設定し、バフンウニを用いて受精時の卵細胞膜電流記録、共焦点レーザー顕微鏡下での精子付着面での卵細胞内Ca画像解析、さらに明視野像の画像ビデオ記録を全て同時記録した。電流記録には単一電極を卵内に刺入して膜電位固定法を行った。Ca画像解析にはCa結合性蛍光色素Calcium Greenを予め卵内に注入し、488nmのアルゴンレーザー光で励起した。明視野像はCa指示薬の励起光および蛍光と干渉しないように、赤外光を照射して透過画像をビデオカメラで捉えた。

材料にはバフンウニ (*Hemicentrotus pulchellinus*) を用いたが、正常な受精電位およびCa波はChambersらの他種のウニ (*Lytechinus variegatus*) と本質的に同様であった。ジャスピシン高濃度投与では受精は全く阻止され、膜電流にもCa濃度にも全く変化をおこさなかった。中程度のジャスピシン濃度では、精子が付着して5~15秒で I_{on} をおこしたが、 I_{on} の後9~15秒で I_{off} に引き継がれ、精子は卵から解離した。即ち一過性の精子-卵融合しか起こらない条件が設定された。このとき細胞内Caは、 I_{on} から6~10秒後に精子結合部位直下の卵細胞質で起こり始め、 I_{off} の1~3秒後にピークに達してから減少し、25~35秒で元のレベルに戻った。このCa濃度上昇は精子結合部位から15ミクロン以内の範囲に限局された部位でのみ起こり、Ca波には至らなかった。2, 3の例では、 I_{on} - I_{off} ののち一度減少しかけたCaは再び上昇してCa波を発生させるとともに、受精電流を誘発した。このとき正常な受精の場合と同様に受精膜が形成され、卵活性化が起こった。

以上の結果から，精子が卵と一時的に結合・融合することによって，たとえその精子が卵から解離しても，卵細胞内に局所的にCa増加反応をおこすことが示され，この反応が分離記録された．このCa増加が細胞外からのCa流入によるものか，細胞内Ca貯蔵期間である小胞体からの細胞質へのCa遊離であるかを同定することが次の課題である．

精子によるCa増加反応の誘発機序に関しては，現在3つの仮説が提唱されている．第一の仮説は，精子細胞質因子が精子-卵融合によって卵細胞質に移行するという説で（図1 A），本実験結果では， I_{on} に指示される精子-卵融合に際する細い細胞質間交流を介してこの物質が移行し，それが不十分で精子が解離してしまった場合は局所的Ca増加しかおこらず，充分であればCa波を形成するに至るという解釈が可能である⁵⁾． I_{on} からCa増加開始までの数秒の遅れも，物質移行の時間と解釈される．

図 1



第二の仮説は，卵細胞膜表面の精子受容体を介する経膜的信号伝達である．一般に受容体の活性化→GTP結合蛋白質などのシグナル分子の活性化→ホスホリパーゼCの活性化→イノシトール3リン酸（IP₃）の産生→小胞体膜上のIP₃受容体の活性化→Ca遊離という機構（図1B）も否定できない⁶⁾．第三の仮説は，精子細胞膜上のCaチャンネルを介して流入したCaが，精子-卵細胞質交流を介して卵細胞内に流入し，そのCaが小胞体の中に取り込まれ，小胞体が過剰に負荷されてCa遊離が起こるといふものである（図1C）⁷⁾．この説では細胞外からのCa流入を証明する必要がある．今回の実験記録法を基盤にして，さらに解析することが必要である．

本研究はDevelopment, 125巻, 1998に発表された（Mohri T. et al; 別紙原稿参照）．

参考文献

- 1) Chambers, E. L. (1989). Fertilization in voltage clamped sea urchin eggs. In *Mechanisms of Egg Activation*. (ed. R. Nuccitelli, G. N. Cherr and W. H. Clark Jr), pp. 1-18. New York: Plenum Press.
- 2) Lynn, J. W., McCulloh, D. H. and Chambers, E. L. (1988). Voltage clamp studies of fertilization in sea urchin eggs. II. Current patterns in relation to sperm entry, monospermy, nonespermy, and activation. Dev. Biol. 128, 305-323.
- 3) McCulloh, D. H. and Chambers, E. L. (1992). Fusion of membranes during fertilization. Increases of the sea urchin egg's membrane capacitance and membrane conductance at the site of contact of sperm. J. Gen. Physiol. 99, 137-175.
- 4) Ikegami, S., Kobayashi, H., Myotoishi, Y., Ohta, S. and Kato, K. H. (1994). Selective inhibition of exoplasmic membrane fusion in echinoderm gametes with jaspisin, a

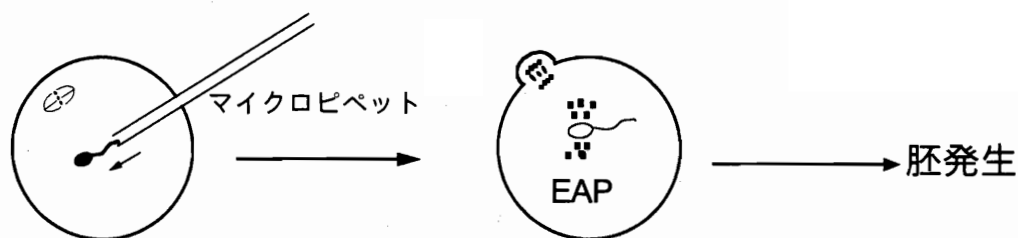
novel antihatching substance isolated from marine sponge. *J. Biol. Chem.* 269, 23262-23267.

- 5) Whitaker, M. and Swann, K. (1993). Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117, 1-12.
- 6) Jaffe, L. A. (1996). Egg membranes during fertilization. In *Molecular Biology of Membrane Transport Disorders*. (ed. S. G. Schultz et al.), pp. 367-378, New York: Prentice Hall Press.
- 7) Créton, R. and Jaffe, L. F. (1995). Role of calcium influx during the latent period in sea urchin fertilization. *Develop. Growth Differ.* 37, 703-709.

II. マウス精子の卵内注入に際する細胞内Ca増加反応の時・空間的解析

卵内への精子注入 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) によって体外授精し母体にもどして出生させる方法は、1992年のPalermo¹⁾らの最初の報告以来著しく進歩し、近年の男性不妊の有効な治療法として採用されている。ICSIに際する細胞内Ca増加反応は、ヒトでTesarikら²⁾により初めて記録された。それによると、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）がおこるといふ。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、近年注目されている卵内注入によってCa振動を誘発する精子細胞質内蛋白 (EAP) 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 (図2)。上記のヒトICSIの場合、注入された精子の細胞膜が壊れてEAP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。本研究では、不動化したマウス精子を卵内注入した際におこる初期のCa増加反応の時・空間的变化を解析した。

図2 Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)



ホフマン型照明を装着した顕微鏡（レンズを当科学研究費平成8年度分で購入）下でマウス精子1個をガラスマイクロピペットに吸い込み，吸い付けピペットで固定した卵細胞内に注入した．基本的にはKimura and Yanagimachi³⁾の手法をとり入れた．このICSIの手法は，マウスでは精子のサイズに合わせてピペット先端の径が約5ミクロンと太いため卵を破壊しやすく，非常に難しい．卵の傷害を最小限にするため，標本を顕微鏡用冷却装置（当科学研究費平成8年度分で購入）にセットして18-20℃に保った．マイクロピペットをピエゾマイクロマニピュレーターでスピードをつけて駆動してまず卵周囲の透明帯を突き破り，それから卵細胞内に刺入した．手動式の加圧マイクロインジェクターで精子を注入した．

卵には予めCa感受性蛍光色素Fura-2をとりこませた．精子注入後，Ca画像解析装置を用いて細胞内Ca濃度変化を経時的に記録した．蛍光記録と同時に，赤色光を光源として明視野像をビデオで記録するため，蛍光明視野同時記録装置（当科学研究費平成9年度分で購入）を用いた．

ICSI後15 - 30分で最初の一過性のCa増加反応（Ca transient）が記録された．その後10分ほどの間隔でより持続が短いCa増加反応（Ca spike）が反復して起こった．1例で，このCa振動が6時間以上持続することを記録した．ICSIを行った卵で雌及び雄前核が形成され，受精が成立していることが確認された．ICSIに際するCa増加反応パターンは，通常の体外受精（In Vitro Fertilization, IVF）の場合とよく類似していた．精子注入後Ca増加反応の開始はヒトの報告例より非常に短いのは，我々の場合注入精子を予めピペッティングにより不動化（べん毛運動を停止させる）

しているが，そのとき精子細胞膜が多少傷害され，卵内に注入されて間もなく精子細胞質因子が漏出してCa増加反応（おそらくIP₃受容体/Ca遊離チャネルを介する小胞体からのCa遊離による）を誘発すると考えられる．この研究では，精子を卵内に注入した場合でも，精子-卵融合にもとづく受精の場合と同様なCa増加反応で卵活性化が起こることを示した．

ICSI後のCa増加が卵内のどこから起こり始め，どのように広がるかは興味ある問題である．最初の1，2回目のCa増加反応につき，共焦点レーザー走査顕微鏡（東京女子医科大学総合研究所共同利用設備）を用い，卵中央部に注入された精子頭が位置する断層面でのCa濃度変化を記録した．図2のようにEAPが注入精子から漏出して作用するとすれば，精子頭付近からCa増加がおこることが予想される．実験結果では，Ca濃度は卵全体で徐々に上昇し，ある濃度レベルに達すると卵全体で急激な上昇を示した．中央部からの伝播性のCa波は見られなかった．今回の解析では時間解像度が2秒であったので，より高速のレーザー走査顕微鏡を用いて解析することが必要である．しかし今回少なくとも卵全体で同期的に近い形でCa増加がおこることが示された．論文にまとめてMolecular Human Reproduction（Nakano, Y. et al., 1997）に発表した（論文コピー参照）．

参考文献

- 1) Palermo, G.D., Avrech, O.M., Colombero, L.T., Wu, H., Wolny, Y.M., Fissor, R.A. and Rosenwaks, Z. (1997). Human sperm cytosolic factor triggers Ca²⁺ oscillations and overcome activation failure of mammalian oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 3, 364-374.

- 2) Tesarik, J., Sousa, M. and Testart, J. (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.*, **9**, 511-518.
- 3) Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, **52**, 709-720.

Ⅲ. マウス円形精子細胞注入卵内の活性化に対するIP₃

アゴニスト、アデノホスチンの利用

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 Yanagimachi¹⁾によってマウスで示されている。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¹⁾。哺乳動物卵の通常の受精では、一過性のCa増加反応は反復して長時間持続する²⁾。Ca振動は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³⁾。反復性のCa増加反応は、主にIP₃受容体を介する小胞体からのCa遊離による²⁾。

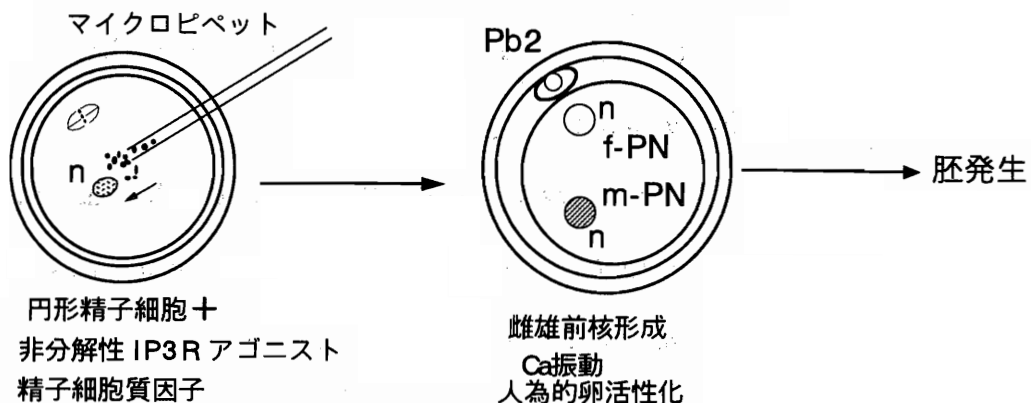
IP₃受容体のアゴニストとしてアデノホスチンがある。アデノホスチンは、カビ *Penicillium brevicompactum* の代謝産物から単離された物質で、イノシトール4,5ニリン酸（IP₂）とアデノシン（2の位置にPをもつ）とが結合したもので、非分解性であり、強力なIP₃アゴニストであることが明らかにされている⁴⁾。我々はマウス卵でアデノホスチンがCa振動を誘発するかどうか、おこすとなれば円形精子細胞と同時注入して卵活性化を助けることによって、円形精子細胞からの受精、胚発生を得る試みを行った。

アデノホスチンをピペット内濃度 2 μM, 5 μM, 10 μMで卵細胞容積の3～4%量を卵内に注入すると、Ca振動が発生した。最初のCa増加反応は大きく、持続時間も6～8分と長い、2回目以

降の反応はやや小さく，持続時間も1分程度であった．これは受精時のパターンに類似していた．アデノホスチンの濃度依存性はCa振動の持続時間に最もよく顕れ，10 μ Mの注入では少なくとも3時間以上持続した．アデノホスチンのCa増加誘発は，IP₃受容体の単クローン抗体18A10を予め注入しておくでブロックされるので，IP₃受容体タイプ1を介する小胞体からのCa遊離によると結論された．

円形精子細胞のみの注入ではCa増加反応は全く起こらなかった．そこで10 μ Mアデノホスチンを同時注入し，5～7時間後に受精の成否を判定した（図3）．受精は第二極体の形成と，雌雄前核の形成をもって判定した．392個の卵のうち199個（55%）で受精が成立した．これはKimura and Tanagimachiの報告¹⁾（27%）に比べよい成績であった．受精卵は殆どが卵割して2細胞になった．2細胞期の胚を妊娠マウス（ICR白色マウス；卵細胞は黒色B6D2F1マウスから得た）の卵管に移植した．5匹の宿主母体に28個の胚を移植して7匹（25%）の産仔（黒色で判別）を得た．いずれも正常であり，染色体の数や形態に異常はなかった．これらの新生児は正常に発育し，第二世代を繁殖した．

図3 円形精子細胞注入法
Round Spermatid Injection (ROSI)



この実験により、アデノホスチンは人為的にCa振動を誘発し、受精時に類似したCa遊離により卵を活性化すること証明され、単為受精のよい道具として利用できることが明らかになった。これを利用して、未熟な円形精子細胞の注入時の卵活性化を助けることによって受精、胚発生、出生を得ることができた。この方法は、畜産領域のバイオテクノロジーにおいて、核移植卵の活性化に有効であろうと考えられる。また産婦人科領域では、精子形成不全の症例に対する人工授精に応用できる可能性がある。この研究はBiology of Reproduction (1998; Sato, Y. et al.) に発表した。

アデノホスチンの代わりに、より生理的物質として精子抽出物を円形精子細胞と同時注入する実験を行っている。

参考文献

- 1) Kimura, Y. and Yanagimachi R. (1995). Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. Development 121: 2397-2405.
- 2) Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. and Honda, Y. (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. Dev. Biol. 58: 62-78.
- 3) Swann, K. and Ozil, J-P. (1994). Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. Intnatl. Rev. Cytol. 152: 183-222.
- 4) Takahashi, M., Tanzawa, K. and Takahashi S. (1994). Adenophostins, newly discovered metabolites of *Penicillium brevicompactum*, act as potent agonists of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. J. Biol. Chem. 269: 369-372.

・ 精子細胞質の卵活性化蛋白質の精製と作用機序の解析

Swann¹⁾ はハムスター精子の精子抽出物をハムスター，マウス卵に注入するとCa振動を誘発し，卵活性化をおこすことを見いだした．さらにParringtonら²⁾ はCa振動を誘発する蛋白質を精製し，オシリン (oscillin) と命名した．彼らはオシリンのcDNAをクローニングし，またオシリンの単クローン抗体を作成して，免疫組織化学的にハムスター，ヒト，ブタ精子頭部の赤道部位付近にオシリンが存在することを示した²⁾．我々も以前より精子細胞質の卵活性化蛋白質 (Egg Activating Protein, EAP) の精製を行ってきたが，先を越されることになった．しかしオシリンが実際に受精時に機能していることの実証と，作用部位，作用機序の解明が残されている．そこで我々はParringtonらの精製法に従ってハムスター精子からEAPの精製を試みた．

1) 精子抽出物の精製

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，遠心して上清を回収した．精子抽出物を限外濾過装置 (MWCO=30K) により10倍に濃縮し (濃縮精子抽出物)，以下のステップを順次行った．

ステップ1 : Cibacron Blue FG3Aカラムに吸着する画分を 1M KClによって溶出

ステップ2：陰イオン交換クロマトグラフィー（Resource Qカラム）にかけ200-400 mM KClで溶出される画分を回収

ステップ3：ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー（Econo CHT-II カートリッジ）にかけ、0-50 mM K-phosphateの濃度勾配によって溶出される画分を回収

各ステップで直ちに透析してイオン強度を下げ、限外濾過で濃縮し、マウス（BDF1）、ハムスター卵に微量注入してCaオシレーション誘発活性の有無を、Fura-2を指示薬としてCa画像解析した（浜松ホトニクス社，ARGUS-200）。

10倍濃縮精子抽出物の注入では一過性のCa増加反応のみで有効でなく、ステップ1及び1，2の段階の分画でCa振動が誘発された。さらにステップ3まで進めると、単一バンドまでは精製できないが、34kDのオシリンと思われるバンドが認められた。このバンドにつきアミノ酸配列分析でN末端から12残基を決定した結果、報告されているオシリンの配列に一致した。しかしながらこの画分は卵注入時にCa振動誘発活性はなかった。全ての画分（11画分）を混合して活性を検討し直したところ、Ca振動を誘発活性は再び現れた。

現在までのところ、我々の実験ではCa振動誘発活性をもつオシリンは精製されていない。オシリンはオリゴマーで機能することが示唆されており、精製を進めて単独の分子にすると活性を示さないのかも知れない。また、活性に必要な補助分子が存在するのかも知れない。もう一つの問題は、精子抽出物を極めて高度（100倍）に濃縮しないと活性が現れないことである。オシリンは精子が卵と結合する赤道部に局在することが示されており²⁾、局所的に高濃度

になっているはずである。従って高濃度でないと活性を示さないのかも知れない。

他方，Parringtonらが報告したオシリンが本当にEAPであるかという疑念もある。これまでにオシリンに関する追試報告はなく，またcDNAを作成してオシリン蛋白質を合成したものを卵内に注入してCa振動をおこしたという報告もない。我々は元に戻って，独自の精製法でEAPを精製すべく，実験を進めている。精子抽出物は種を越えてCa振動を誘発し，神経細胞や肝細胞にもCa振動を誘発するので^{3,4)}，Ca動態に関わる普遍的に重要な分子である可能性があり，今後もさらに研究を進める必要がある。

参考文献

- 1) Swann, K. (1990). A cytosolic factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110: 1295-1302.
- 2) Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sessay, A.K. and Lai, F.A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379 : 364-368.
- 3) Swann, K. and Ozil, J-P. (1994). Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.* 152 : 183-222.
- 4) Berrie, C.P., Cuthbertson R.K.S., Parrington, J. et al (1996). A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 313 : 369-372.

2) 精子因子による卵細胞内Ca増加の時・空間的解析

EAPの精製は未だ成功していないが，その作用部位，作用機序を知る手掛りを得るために，ハムスター精子抽出物を粗精製した分

画（以下「精子因子」と呼ぶ）をハムスター，マウス卵に微量注入して，Ca増加の空間的，時間的解析を詳細に行った．

前記の粗精製の精子抽出物の蛋白質をサイアニン蛍光色素Cy3.5（赤色）でラベルした．卵には予め蛍光Ca指示薬Calcium Green Dextran（CGD；緑色）を注入した．精子因子を卵細胞質中心部および周辺部に0.2 pI（卵容積の1000分の1量）を微量注入し，その拡散をCy3.5の蛍光の広がりモニターした．Caの増加はCGDの蛍光強度の増加でモニターした．画像解析には高速共焦点レーザー走査顕微鏡（ニコンRCM8000，生理学研究所細胞内代謝部門に設置されてある装置）を用い，蛍光を緑（CGD），赤（Cy3.5）の2チャンネルに分離してそれぞれ画像に収録した．

精子因子をマウス細胞質周辺部（卵皮質）に注入すると，Caはその部位から増加し，Ca波となって卵全体に波及するパターンとなった．中心部に注入した場合は，注入後数十秒の遅れをもって卵全体でほぼ同期的か，あるいは注入部位よりも細胞質周辺部が先行してCaが増加しはじめた．精子因子を段階的に希釈して注入すると，卵皮質は中心部に比べより低い濃度でCa増加反応を起こした．このことから，精子因子は卵細胞内のどの部位でもCa遊離をおこすが，卵皮質での感受性がより強いことが示された．受精時に精子は卵表面に結合し，細胞質因子をまず卵皮質に送りこむとすれば，この部位で局所的なCa増加とそれに続くCa波を起こしやすいということは目的にかなっている．なお，精子因子によって誘発されるCa増加反応は， IP_3 受容体に対する単クローン抗体18A10で阻害されることから，最終的には IP_3 受容体を介する小胞体からのCa遊離に関連していることが明らかにされた．精子因子は， IP_3 受容体に

直接作用すると考えられる（分子的には間接的であるかも知れない）。精子抽出物はCaによるCa遊離機構（Ca-induced Ca release）を起こしやすくすることが報告されているので¹⁾、IP₃受容体のCaに対する感受性を高めることが作用機構であるかも知れない。

この実験結果は現在論文作成中であり、また1998年3月の生理学会で発表予定である（尾田正二，毛利達磨，出口竜作，鹿野朝秀，宮崎俊一：精子因子のマウス卵細胞内Ca²⁺遊離誘発部位の時空間的解析）。

参考文献

- 1) Swann, K. (1994). Ca²⁺ oscillations and sensitization of Ca²⁺ release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium*, 15 : 331-339.

付：ホヤ精子抽出物の卵内注入によって誘発されるCa振動

受精時のCa振動は、哺乳動物卵の他に原索動物ホヤ卵でもおこる。ヒト精子抽出物のホヤ卵への注入によってCa振動がおこることが報告され¹⁾、やはりホヤでも精子因子が注目される。そこでホヤ受精の研究を行ってきた経塚（東北大理学部浅虫臨海実験所）らと共同実験により、ユウレイホヤ精子抽出物を同種ホヤ卵に注入してCa波、Ca振動を画像記録した。

ホヤ未受精卵は第一減数分裂の中期に停止している。卵受精時には、まず比較的大きく長い第一のCa増加反応がおこり、続いてより小さく短いCa spike が繰り返しおこる。このCa振動は十数分後に第一極体が出るころに一旦停止し、数分してまた第二のCa振動が起こり始め、第二極体が出るころに再び停止する。このよう

に、ホヤ卵のCa振動は細胞周期に関連して出現、停止すると考えられる。精子抽出物を未受精卵に注入すると、パターンと時間経過が受精時のCa振動と極めて類似したCa増加反応が起こった。従って精子因子は受精時に機能している可能性が強い。抽出物を熱処理すると活性が見られないことから、蛋白質であると推測される。また限外濾過によって分離して活性を調べた結果、分子量は3万から10万の間であることが分かった。

初めのCa増加反応の空間分布を、高速共焦点レーザー走査顕微鏡で画像解析した。精子抽出物を卵周辺部に注入すると、その部位でCa濃度が上昇し、Ca波となって卵全体に波及した。一方卵中心部に注入すると、20秒ほどの遅れをもって、任意の周辺部からCa濃度が上昇し、Ca波を形成した。やはり卵周辺部において、精子因子に対する感受性が高いことが示された。

Ca振動を誘発する精子因子の種特異性は興味深い点であり、ホヤマウスの交叉試験を行っている。またホヤ精子因子の精製を進めている。

参考文献

- 1) Wilding, M., Kyojuka, K., Russo, G.L., Tosti, E. and Dale, B. (1997). A soluble extract from human spermatozoa activates ascidian oocytes. *Develop. Growth Diff.*, 39, 329-336.