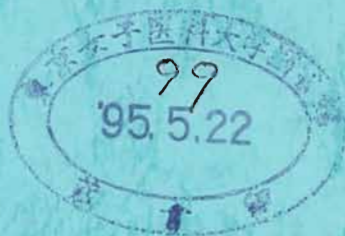


# 哺乳動物受精卵に於けるCa波とCa振動 のメカニズムに関する生理学的研究

(課題番号 05454141)

平成6年度科学研究費補助金(一般研究B)  
研究成果報告書



平成7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)

# 哺乳動物受精卵に於けるCa波とCa振動 のメカニズムに関する生理学的研究

(課題番号 05454141)

平成6年度科学研究費補助金(一般研究B)  
研究成果報告書

平成7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(Ca)は種々の重要な細胞機能を制御する。受精時に種々の卵細胞に共通して、Ca濃度が劇的に一過性に上昇し、受精の引き金になることは周知の事実である。即ちこのCa増加は卵表層顆粒の開口分泌を誘発し、次の精子の侵入を阻止する多精拒否機構の原因になるとともに、脊椎動物卵に於いては、第二減数分裂の中期に停止していた未受精卵に抑制解除をもたらし、減数分裂を再開させるいわゆる卵賦活を誘発すると考えられている。

我々は永年に亘って哺乳動物卵受精時のCa増加反応の記録・解析及び精子・卵結合からCa増加に至る細胞内情報伝達機構の解明に従事してきた。我々はハムスター卵受精に於いて、精子付着部位から発して細胞全体に及ぶ伝播性のCa波(Ca wave)と、一過性のCa増加をくり返しおこすCa振動(Ca oscillation)をCa画像解析によって明らかにした。さらに、種々の細胞で重要な役割を果たす二次メッセンジャーであるイノシトール 1,4,5 三リン酸(IP<sub>3</sub>)の卵内に注入によって、細胞内Ca貯蔵器官である(小胞体, endoplasmic reticulum, ER)からのCa遊離(IP<sub>3</sub>-induced Ca release, IICR)を誘発すること、IP<sub>3</sub>レセプターに対するモノクローナル抗体(mAb)の一つが、IICRを抑制することを見出し、このmAbを利用してIICRが受精時に実際に機能することを初めて直接証明した。

次の重要な課題は、精子の如何なる因子が刺激となり、如何なる信号伝達系を経てフォスホリパーゼC(PL-C)を活性化し、IP<sub>3</sub>産生に至るかを解明することである。本研究では、①精子因子の刺激が卵細胞膜上に想定されるレセプターを介するものか、細胞融合によって卵細胞質に送りこまれるのか、②PC-Lの活性化はGTP結合蛋白(G蛋白)によるのか、チロシンキナーゼ(PTC)によるのかを調べた。

他方Ca波とCa振動は、種々の細胞が生体活性物質に反応する際のCaシグナルの一般的な空間的及び時間的パターンとされ、その成因は普遍的に重要な研究課題であり、ハムスター卵はその実験モデル系としての重要性をもつ。抗IP<sub>3</sub>レセプター抗体を用いた我々の実験によれば、個々の一過性のCa増加はIICRによるものであり、伝播性且つ反復性のCa遊離は、Caによって増強されるIICR(Ca-sensitized IICR)に基づくことが明らかとなった。しかしCa振動の持続には細胞外Caが必須であり、細胞外から

のCa流入と細胞内Ca遊離の連結機構の存在が示唆される。本研究では、イノシトールリン酸 (IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub>)によって活性化される細胞膜上のCaチャネルを想定し、③その同定と特性の解析、④Ca流入 (細胞膜上のCaチャネル)とCa遊離 (ER膜上のIP<sub>3</sub>レセプター/チャネル)との連結機序を解析した。さらに、⑤Ca波とCa振動を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (CLSM)を用いて詳細に画像解析した。また、⑥細胞内Ca貯蔵器官とされるERを蛍光色素で染色し、生きた卵細胞でCLSMを用いて小胞体の分布を観察し、卵成熟過程に於ける変化を調べた。

実験にあたって、中田健氏 (元東京女子医科大学助手、現酪農学園大学助手)、本多祥子氏 (東京女子医科大学基礎医学系大学院生)の協力を得た。また共同研究に於て、森庸厚氏 (東京大学医科学研究所免疫学研究部助教授)、水野仁二氏 (株式会社ミック研究所主任研究員)、遠藤健治氏 (同所長)、岡田詔子氏 (東邦大学医学部第二解剖学助教授)、中西節子氏 (JT医薬基礎研究所研究員)、御子柴克彦氏 (東京大学医科学研究所化学研究部教授)の諸氏の協力を得た。関連研究として、毛利秀雄氏 (放送大学教授)、浜口幸久氏 (東京工業大学理学部生物学教授)、浜口みやこ氏 (同講師)、佐野清氏 (北海道大学理学部附属厚岸臨海実験所助教授)との共同研究に参加させていただいた。ここに、感謝の意を表したい。

## 研究組織

研究代表者：宮崎俊一 (東京女子医科大学教授)

研究分担者：白川英樹 (東京女子医科大学助手)

白石浩一 (東京女子医科大学助手)

尾田正二 (東京女子医科大学助手)

## 研究経費

平成5年度 6,600 千円

平成6年度 1,400 千円

---

計 8,000 千円

# 研究発表

## I. 発表論文

### 1. 学会誌等

- 1) Miyazaki, S. and Shirakawa, S. :  
Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release mediated by the IP<sub>3</sub> receptor is responsible for Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs.  
Biomed. Res., 14, Suppl. 2, 35-38, (1993).
- 2) Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. and Honda, Y. :  
Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs.  
Dev. Biol., 158: 62-78, (1993).
- 3) Miyazaki, S. :  
IP<sub>3</sub>-mediated spatial and temporal Ca<sup>2+</sup> signaling in the cell.  
Japn. J. Physiol., 43: 409-434, (1993).
- 4) Shirakawa, S., Honda, Y., Nakada, K. and Miyazaki, S. :  
Activation of calcium influx pathway by inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in hamster eggs.  
Japn. J. Physiol. 43, Suppl. 2, S41, (1993).
- 5) Nakada, K., Fujiwara, T., Shirakawa, H. and Miyazaki, S. :  
Increase in sensitivity of the inositol trisphosphate receptor during maturation of hamster oocytes.  
Japn. J. Physiol. 43, Suppl. 2, S57, (1993).
- 6) Mohri, H., Hamaguchi, Y., Hamaguchi, M., Sano, K., Shirakawa, H., Nakada, K. and Miyazaki, S. :  
Sperm-egg fusion in the sea urchin is blocked in Mg<sup>2+</sup>-free sea water.  
Zygote, 2: 149-157, (1994).

- 7) Shiraishi, K., Shirakawa, H., Honnda, Y., and Miyazaki, S.:  
Analysis of  $Ca^{2+}$  wave in hamster eggs using confocal microscopy.  
Japn. J. Physiol., 44: Suppl. 1, S47, (1994).
- 8) Shirakawa, H. and Miyazaki, S.:  
Evidence for inositol tetrakisphosphate-activated  $Ca^{2+}$  influx  
pathway refilling inositol trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  stores  
in hamster eggs.  
Cell Calcium, 17: 1-13, (1995).
- 9) Nakada, K., Mizuno, J., Shiraishi, K., Endo, K. and Miyasaki, S.  
Initiation, persistence, and cessation of the series of intra-  
cellular  $Ca^{2+}$  responses during fertilization of bovine eggs.  
J. Reprod. Dev., in press, (1995).
- 10) Miyazaki, S.:  
InsP<sub>3</sub> receptor-mediated spatiotemporal  $Ca^{2+}$  signalling.  
Current Opinion in Cell Biol. in press, (1995).

## 2. 解説等

- 1) 宮崎俊一：  
 $Ca^{2+}$ 動員、 $Ca^{2+}$ 波、 $Ca^{2+}$ 振動とIP<sub>3</sub>受容体  
『情報伝達研究の新しい流れ』 実験医学, 11: 2078-2084, (1993).
- 2) 宮崎俊一：  
受精における $Ca^{2+}$ の動態  
『トピックス』 細胞 25: 485-491 (1993).
- 3) 宮崎俊一：  
受精のメカニズムはどこまでわかったか  
特集『不妊症はどこまで治せるか』 臨床婦人科産科, 48: 145-147,  
(1994).
- 4) 宮崎俊一, 白川英樹：  
精子-卵相互作用のシグナル伝達メカニズム  
『解説』 生体の科学, 45: 79-90, (1994).

- 5) 宮崎俊一：  
受精と細胞内カルシウム  
『注目の領域』 医学のあゆみ, 171: 907-909, (1994).

## II. 口頭発表

### 1. 学会発表

- 1) Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y. and Miyazaki, S.:  
Regulation of calcium influx pathway by inositol 1,3,4,5-tetra  
kispophosphate in hamster eggs.  
The 32nd International Congress of Physiological Sciences,  
Glasgow, UK, Aug. 1993.
- 2) Shirakawa, H., Shiraishi, K. and Miyazaki, S.:  
Confocal  $Ca^{2+}$  images of hamster oocytes following fertiliza-  
tion or  $IP_3$  injection.  
Gordon Research Conferences,  
Plymouth, New Hampshire, USA, Aug. 1993.
- 3) 白石浩一, 白川英樹, 本多祥子, 宮崎俊一：  
共焦点レーザー顕微鏡によるハムスター卵 $Ca^{2+}$ 伝播様式の解析  
第71回日本生理学会大会, 高松市, 1994年3月
- 4) 岡田詔子, 猪俣賢一朗, 白石浩一, 宮崎俊一：  
ハムスターの卵母細胞の成熟過程におけるERの動態  
第39回日本不妊学会, 福井市, 1994年10月
- 5) 白石浩一, 白川英樹, 本多祥子, 岡田詔子, 中西節子, 宮崎俊一：  
ハムスター卵母細胞の成熟過程における小胞体、 $IP_3$ 受容体の分布変化  
第72回日本生理学会大会, 名古屋市 1995年3月発表予定
- 6) 白川英樹、白石浩一、宮崎俊一：  
共焦点顕微鏡によるハムスター卵細胞内 $IP_3$ 依存性Ca遊離の空間分布の  
解析 第72回日本生理学会大会, 名古屋市, 1995年3月発表予定

## 2. シンポジウム発表

- 1) 宮崎俊一：  
受精時の卵賦活とIP<sub>3</sub>レセプター/Ca<sup>2+</sup>チャネル  
群馬大学内分泌研究所創立30周年記念シンポジウム  
「21世紀の内分泌学」 前橋市, 1993年6月24日
- 2) Miyazaki, S. :  
Central role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in  
calcium signals at fertilization of hamster eggs.  
The 32nd International Congress of Physiological Sciences,  
Workshop "Mechanism of Egg Activation: Maturation, Fertiliza-  
tion and Cell Division". Glasgow, UK, August 5, 1993.
- 3) Miyazaki, S. :  
Essential role of the IP<sub>3</sub> receptor in Ca<sup>2+</sup> release at fertili-  
zation.  
Gordon Research Conferences, "Fertilization and Activation of  
Development".  
Plymouth, New Hampshire, USA, August 16-20, 1993.
- 4) 宮崎俊一, 白川英樹, 白石浩一, 本多祥子：  
イノシトール3リン酸レセプターとCa<sup>2+</sup>振動  
生理研研究会「Ca<sup>2+</sup>シグナリングと細胞機能制機構」  
岡崎市, 1993年9月29-30日
- 5) 宮崎俊一：  
受精のシグナル伝達と細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離機構  
北海道大学文部省高度化推進特別経費によるシンポジウム  
「Ca<sup>2+</sup>シグナルと細胞情報伝達系」 札幌市, 1994年2月5日
- 6) Miyazaki, S. :  
Calcium signalling during mammalian fertilization.  
Ciba Foundation Symposia No.188, "Calcium Waves, Gradients and  
Oscillations",  
London, UK, April 26-28, 1994.
- 7) 白川英樹, 白石浩一, 宮崎俊一：



卵細胞内Ca<sup>2+</sup>の画像解析と共焦点レーザー顕微鏡  
哺乳動物卵子学会ワークショップ「卵子研究における新技術」  
東京、1994年4月27-28日

- 8) Miyazaki, S. :  
Spatioemporal calcium signals in fertilized mammalian eggs.  
Open Meeting by The Ciba Foundation and The Wellcome Centre for  
Medical Sciences "Spatiotemporal Aspects of Calcium Signalling",  
London, UK, April 29, 1994.
- 9) 宮崎俊一 :  
精子-卵融合のシグナル伝達とCa<sup>2+</sup>遊離機構  
日本膜学会16年会シンポジウム, 東京, 1994年5月17日
- 10) 宮崎俊一 :  
細胞内Ca<sup>2+</sup>を見る  
日本電子顕微鏡学会第5回電子顕微鏡サマースクール  
「物質のナノ局在解析」 栃木県鹿沼市, 1994年8月5日
- 11) Miyazaki, S. :  
InsP<sub>3</sub> receptor and spatiotemporal Ca<sup>2+</sup> signalling.  
Plenary Lecture in the Third Congress of Federation of Asian and  
Oceanian Physiology Society.  
Shanghai, China, November 8, 1994.

### III. 図書

- 1) 宮崎俊一 :  
精子-卵結合のシグナル伝達とCa<sup>2+</sup>遊離機構  
『Annual Review 細胞生物学1993』  
矢原一郎, 御子柴克彦, 月田承一郎編  
pp. 199-212, 中外医学社 (1993).
- 2) 宮崎俊一 :  
受精とカルシウムイオン波  
『カルシウムのシグナル伝達機構』 Bioscience Series  
小島至編 pp. 87-97, 中外医学社 (1993).

- 3) 宮崎俊一, 本多祥子:  
受精とイオンチャネル  
『イオンチャネル・2』  
東田陽博編 pp. 60-73 メジカルレビュー社 (1993).
- 4) 白川英樹、宮崎俊一:  
細胞内Ca<sup>2+</sup>を見る  
『電子顕微鏡基礎技術と応用1994～物質のナノ局在解析～』  
第5回電顕サマースクール実行委員会編,  
pp. 190-199, 学際企画 (1994).
- 5) Miyazaki, S. :  
Calcium signalling during mammalian fertilization.  
In Ca<sup>2+</sup> Waves, Gradients, and Oscillations.  
Ciba Foundation Symposium, John Wiley & Sons Ltd., in press,  
(1995).

# 研究成果

## I. 精子による卵活性化の信号伝達機構

はしがきに述べたように、精子の如何なる因子が刺激となり、如何なる信号伝達系を経てフォスホリパーゼC (PLC)を活性化し、IP<sub>3</sub>産生に至るかを明かにすることが、現時点に於ける受精のメカニズム解明の重要な課題である。本研究では、①精子因子の刺激が卵細胞膜上に想定されるレセプターを介するものか、細胞融合によって卵細胞質に刺激物質が送りこまれるのか、②PLCの活性化はGTP結合蛋白 (G蛋白)によるのか、チロシンキナーゼによるのかを調べた (図1 参照)。

### 1. 精子・卵結合を担う分子は信号伝達を行うか?

ウニでは、精子由来のバインディンという蛋白質が精子・卵結合を担うことが以前から知られていたが、近年、卵側のバインディンレセプターとして350kDの糖蛋白が同定された<sup>1)</sup>。この精子レセプター蛋白 (図1中のR) は、精子先体突起に特異的に結合し、その細胞外部分に対する抗体の Fab断片を投与すると、一部の卵細胞で受精膜を形成する。レセプター蛋白がCa増加に至るシグナル伝達に関わっている可能性が示唆される。しかし細胞内ドメインには、既知のシグナル伝達に関わる構造を有していないという<sup>2)</sup>。他の蛋白と細胞内で会合して機能する可能性はある。

哺乳動物では、モルモット精子頭部に、精子・卵結合に関係する PH-30という蛋白が存在し、その $\alpha$ サブユニットはウイルスの膜融合蛋白にみられる”融合ペプチド”に相同の部位を持ち、 $\beta$ サブユニットは、細胞接着因子 (図1 CAM, cell adhesion molecule)として知られるインテグリンの結合相手であるディスインテグリン様の構造を持つ<sup>3)</sup>。これに対応して、マウス卵表面にインテグリン様の蛋白が存在することが報告されている<sup>4)</sup>。そして、インテグリン・ディスインテグリン結合を阻害するペプチドが、精子・卵結合を阻害することが報告されている<sup>5)</sup>。なお、インテグリンはディスインテグリンとの結合によって、細胞内信号伝達を行いうることが体細胞で示されている<sup>6, 7)</sup>。

細胞-細胞間相互作用の一典型としてよく知られている重要な細胞系に、抗原提示細胞-Tリンパ球相互作用がある。興味深いことに、マウ

ス精子表面には抗原提示細胞と同じく主要組織適合複合体 MHCクラス II が存在し、一方卵表面にはヘルパー T 細胞の補助分子で MHCクラス II と結合する CD4 に類似した蛋白が存在することが見出されている<sup>9)</sup>。この CD4 様蛋白はチロシンキナーゼ活性を持つ p56<sup>lck</sup> と会合している可能性がある<sup>9)</sup>。

以上の様な背景から、我々は以下の実験を行った。

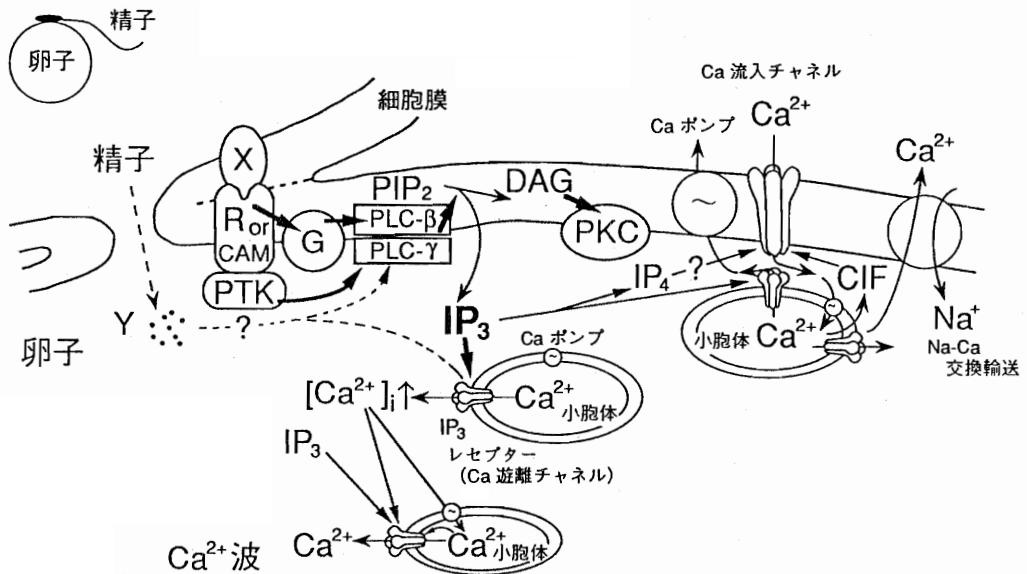


図 1. 精子による卵活性化のメカニズムの想定模式図

矢じり矢印はその物質が由来する経路を示し、三角矢印はその物質の活性化作用を示す。X: 精子細胞膜上の卵結合蛋白質; Y: 精子-卵融合によって精子細胞質から卵細胞質に送りこまれる物質; R: 受容体; CAM: 細胞接着分子; G: GTP結合蛋白; PTK: プロテインチロシンキナーゼ; PLC: ホスホリパーゼC; PIP<sub>2</sub>: ホスファティディルイノシトール二リン酸; IP<sub>3</sub>: イノシトール1,4,5三リン酸; IP<sub>4</sub>: イノシトール1,3,4,5四リン酸; DAG: ジアシルグリセロール; PTK: プロテインキナーゼC; CIF: カルシウム流入因子

## 1) 精子・卵結合分子を阻害することができるか？

ディスインテグリンは、インテグリンとの結合部位としてRGD (Arg-Gly-Asp)配列を有するので、予め RGDを投与すると、透明帯を除去したハムスター卵の受精は(恐らくインテグリンへの結合で競合して)阻害されるという報告がある<sup>6)</sup>。我々は同様の実験を行い、ハムスター卵での細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ )増加反応を膜電位変化で調べた(ハムスター卵では $[Ca^{2+}]_i$ 増加によって $K^+$ 透過性が上昇し、過分極反応がおこる<sup>10)</sup>)。RGDを前投与して媒精したハムスター卵では過分極反応が繰り返し起こり、受精時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加に至る信号伝達は阻害されなかった。

Tリンパ球では、補助分子CD4に対する抗体の投与によってCD4を介する活性化が起こり、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応がおこることを確かめた<sup>11)</sup>。抗マウスCD4抗体をマウス卵、ハムスター卵に投与し、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加は卵にCa結合性蛍光色素fura-2を取り込ませ、Ca画像解析によって記録した。しかしながら、抗体投与によって $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は誘発されず、さらに抗体を抗IgG抗体で架橋しても同様に $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応は起こらなかった。また、抗CD4抗体で前処理した卵を媒精した場合、抗体がCD4と結合して受精が阻害されることを期待したが、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を伴う受精は阻害されなかった。CD4は精子・卵結合に一部関与することは否定できないが、細胞内信号伝達には関与していないのではないかという結論に達した。(森庸厚氏(東京大学医科学研究所免疫学研究部助教授)との共同研究による)

## 2) $Mg^{2+}$ 除去による受精阻害

ウニ卵の受精は $Mg^{2+}$ 除去によって阻害されることが知られている<sup>12)</sup>。 $Mg^{2+}$ を除去した人工海水中で媒精させ、膜電位変化、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応の有無を調べた。この条件で精子先体突起は卵細胞膜に結合するが、膜電位変化も $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応もおこらず、 $Mg^{2+}$ を添加すると起こった。また、卵に予め注入した蛍光色素は、 $Mg^{2+}$ 除去液中では結合した精子に移行しないことから、精子・卵の融合が阻害されていると結論された。 $Mg^{2+}$ は卵の精子レセプターを修飾することによって、精子・卵の不可逆的な融合がおこることを妨げるのではないかと推論される。(毛利秀雄氏(放送大学教授)らとの共同研究による。Zygote 2: 149-157, 1994 に発表)

### 3) 精子細胞質因子の解析

精子の刺激は細胞外からでなく、細胞質の交流ができてから、精子細胞質から送りこまれる物質(図1中のY)が刺激となるという考えが古くからある。ハムスター精子の抽出物を卵内に注入すると、受精時に似たCa増加反応が起こることが報告されている<sup>13)</sup>。有効物質は高分子(恐らく蛋白質)であり、種を越えてマウス、カエル、ウニ卵でもCa増加反応を起こすという。我々もハムスター精子細胞質画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけ、各画分を卵内に注入してCa増加反応を起こすことを確認し、精子細胞質中の卵活性化因子の精製を行いつつある。

### 2. プロテインチロシンキナーゼは信号伝達に關与するか?

精子・卵結合の信号伝達機構は未だ不明であるが、幾つかの仮説が考えられている。第一に、広範囲の細胞種に存在する、レセプター/G蛋白/PLC $\beta_1$ /PIP $_2$ の分解/IP $_3$ とジアシルグリセロール(DAG)の産生という経路である(図1)。我々は非分解性のGTPアナログGTP $\gamma$ Sの注入によってG蛋白を活性化すると、ハムスター卵でCa増加反応が起こり、受精時のCa増加反応がGDP $\beta$ Sの前注入で用量依存性に抑制されることを発表した<sup>14)</sup>。しかしこれらの反応に關わるG蛋白は百日咳毒素非感受性であり、良いブロッカーがないため、受精におけるG蛋白の機能的関与を確定することが難しい。他方、G蛋白でなくプロテインチロシンキナーゼ(PTK)を介する経路があることが他の細胞系で知られている(図1)。PTKはPL-C $\gamma_1$ を活性化してIP $_3$ を産生させることができる。

我々は、ハムスター卵受精のCa増加反応に至る信号伝達にPTKが關与しているかを、PTKインヒビターを用いて調べた。PTKインヒビターとしてgenistein(1~100 $\mu$ M)で卵を25分間前処理、あるいはherbimycin Aを卵内に前注入し(卵内濃度100 $\mu$ M)、媒精して[Ca $^{2+}$ ] $_i$ 増加反応の有無をCa画像解析によって調べた。結果は、これらのPTKインヒビターの前処理では[Ca $^{2+}$ ] $_i$ 増加反応を阻害できず、PTKが關与するという証拠は得られなかった。

以上の結果、精子レセプター或は細胞接着分子を介する信号伝達の存在を示す証拠が得られず、現時点では、精子細胞質中の卵活性化因子の検索の方が有望ではなかろうかという結論に至った。

[参考文献]

- 1) Foltz KR & Lennarz WJ: J Cell Biol., 116:647-658, 1992.
- 2) Foltz KR, Partin JS & Lennarz WJ: Science, 259:1421-1425, 1993.
- 3) Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW et al: Nature, 356:248-252, 1992.
- 4) Boldt J, Gunter LE & Howe AM: Gamete Res, 23:91-101, 1989.
- 5) Bronson RA & Fusi F: Biol Reprod, 43:1019-1025, 1990.
- 6) Kornberg LJ, Earp HS, Turner CE et al.: Proc Natl Acad Sci U SA, 88:8392-8396, 1991.
- 7) Jaconi MEE, Theler JM, Appel RD et al: J Cell Biol, 112:1249-1257, 1991.
- 8) Mori T, Guo MW, Mori E et al: Am J Reprod Immunol, 24:9-14, 1990.
- 9) Mori T, Guo MW & Mori E: Am J Reprod Immunol, 26:97-103, 1991.
- 10) Miyazaki S & Igusa Y: Proc Natl Acad Sci USA, 79:931-935, 1982.
- 11) Katayama Y, Miyazaki S, Oshimi, Y, & Oshimi K: J Immunol Methods, 166:145-153, 1993.
- 12) Sano K, Usui N, Ueki K et al: Dev Growth Differ, 22:531-541, 1980.
- 13) Swann K: Development, 110:1295-1302, 1990.
- 14) Miyazaki S: J Cell Biol, 106:345-353, 1988.

## II. 細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離と連結する細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入経路の同定

Ca振動は細胞内Ca遊離が繰り返し起こる現象であるが、細胞外のCaを除去すると消失することから、我々は細胞外からのCa流入が細胞内Ca貯蔵器官ERにCaを補充するという考えを提唱し<sup>1)</sup>、その後他のいろいろな細胞でも同様であることが明かにされた。このCa流入は、IP<sub>3</sub>によって誘発されるCa遊離と機能的に連結していなければならない、その流入経路の同定は普遍的な重要性を持つ。これまで提唱されている主な経路は、第一にイノシトール1,4,5三リン酸(IP<sub>3</sub>) 或はイノシトール1,3,4,5四リン酸(IP<sub>4</sub>)によって活性化されるCa流入経路であり、特にIP<sub>3</sub>のリン酸化の結果産生されるIP<sub>4</sub>によって活性化される細胞膜上のCaチャンネルと、近接するER膜上のIP<sub>3</sub>レセプター/Ca遊離チャンネルが連動して機能するという考えである<sup>2)</sup> (図1)。第二はERからCaが遊離された結果ERが空になることによって活性化されるCa流入経路 (capacitative Ca entry)<sup>3)</sup> であり、恐らくCaとともに遊離されて細胞膜のCaチャンネルを活性化する小分子 (CIF, calcium influx factor)が同定されている<sup>4)</sup> (図1)。現在種々の細胞で後者の経路が報告されているが、我々はハムスター卵においてIP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入経路を同定した。

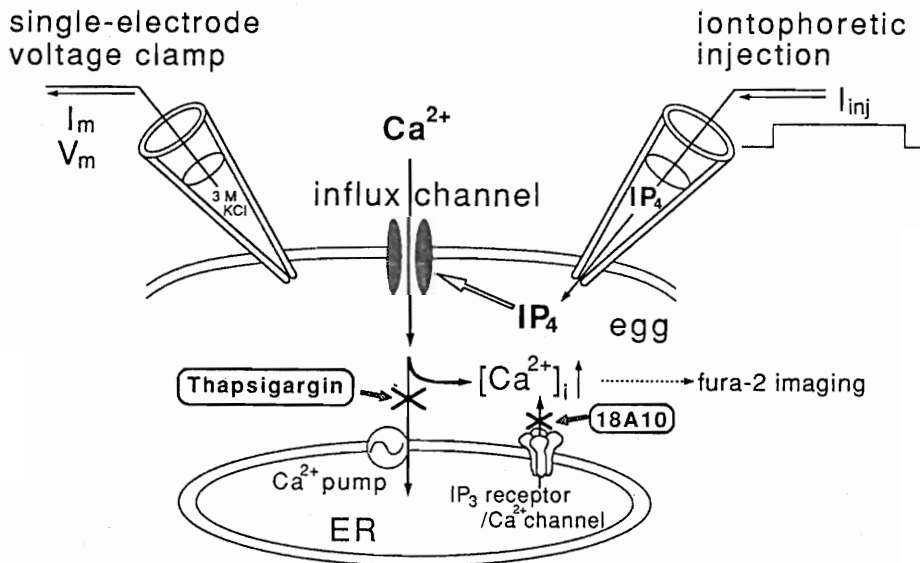


図2. IP<sub>4</sub>注入によって活性化されるCa流入を[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇によって観察する実験の模式図



## 1. IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入経路の同定

IP<sub>3</sub>あるいはIP<sub>4</sub>をガラス微小ピペットにつめ、ピペットをハムスター未受精卵内に刺入し、直流電流を与えて、IP<sub>3</sub>あるいはIP<sub>4</sub>を電気泳動的に持続的に注入した (electrophoretic injection, 図2)。卵は予めCa指示性色素fura-2を取り込ませておき、波長340 nmの紫外線を照射してfura-2の蛍光強度の変化から[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を持続的に記録した。細胞外から流入するCaによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加を見ることが目的であるから、IP<sub>3</sub>受容体(IP<sub>3</sub>R)抗体18A10を予め卵内に注入して細胞内ERからのCa遊離(IICR)を抑制しておく(図2)。また、流入したCaが直ちにERに取り込まれてしまうと[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が捉えられないことがあるため、ERのCaポンプの抑制剤であるthapsigarginを投与してERへのCa取り込みを抑えておく(図2)。さらに、IP<sub>3</sub>あるいはIP<sub>4</sub>を注入する電流により細胞膜電位が変化してCa流入に影響を与えないように、もう一本の電極を刺入して膜電位固定(voltage clamp)を行い、膜電位を常に静止電位(-20mV)に固定した(図2)。

IP<sub>4</sub>持続注入によって時間経過の遅い[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇がおこり、一定に達して持続した。この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇がCa流入によることは、細胞外Caを除いた溶液中ではおこらないこと、細胞外Ca濃度を増すと[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が増強すること、膜電位をマイナス側に移動させて(過分極)Ca流入の電氣的駆動力を大きくするとやはり[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が増強することから証明された。一方IP<sub>3</sub>注入によっては、やはり[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が起こったが、細胞外のCaを除去した場合でも消失しないことから、抗体18A10で抑えきれないCa遊離のためであると考えられた。

結論として、IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入系が存在することが同定された。また、IP<sub>3</sub>はCa流入を起こさないことが明かとなった。

(Cell Calcium, 17: 1-13, 1995に発表)

## 2. IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入と小胞体のCa取り込みとの連関

IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入はERへのCa再取り込みに役割をはたしているかを調べた。ハムスター未受精卵にガラス微小ピペットを3本刺入した(1本は膜電位固定用、あと2本はそれぞれIP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>注入用)。IP<sub>3</sub>を2秒の電流パルスで100秒の間隔をおいて注入すると、IICRによるCa遊離が毎回おこるが、回を追って漸減する([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の測定によって観察)。これはERのCa貯蔵量が減少するためと考えられる。IP<sub>3</sub>注入の合間に40秒間IP<sub>4</sub>を注入すると、IP<sub>3</sub>注入による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加反応は減少せず、

始めと同じ一定の大きさを示した。

このことから、IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入は、ERにCaを補給して繰り返し同じCa遊離反応を可能にすることが結論され、Ca振動の維持に重要な役割を果たすことが説明された。しかしながら生理的現象、即ち受精時のCa振動に於てこの機構が実際に作動しているかは未だ証明されておらず、今後の課題である。

最近の研究により、IP<sub>4</sub>によって活性化されるCa流入系は、心筋における進展による収縮増強や<sup>6)</sup>、脳海馬における虚血による神経細胞死に関与する<sup>6)</sup>ことが示唆されている。

#### [参考文献]

- 1) Miyazaki S & Igusa Y: J Physiol, 340:611-632, 1983.
- 2) Irvine RF: In Inositol Phosphate and Calcium Signalling. ed Putney JW Jr, Raven Press, NY, pp 161-185, 1992.
- 3) Putney JW Jr & Bird GS: Endocr Rev 14:610-631, 1993.
- 4) Randriamampita C & Tsien RY: Nature, 364:809-814, 1993.
- 5) Dassouli A, Sulpice J-C, Roux S, et al: J Mol Cell Cardiol, 25:973-982, 1993.
- 6) Tsubokawa H, Oguro K, Robinson HPC et al: Neurosci, 59:291-297, 1994.

### Ⅲ. 共焦点レーザー走査顕微鏡によるCa波と小胞体の分布の観察

共焦点レーザー走査顕微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) により、光学的に細胞のある断面を断層写真のように捉えることができる<sup>1)</sup>。最近のCLSMの進歩により、生きた細胞で細胞内小器官の観察や、局所的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇( $Ca^{2+}$  マイクロドメイン)などが捉えられるようになった。東京女子医科大学では、共同利用機器としてCLSMが導入されたので、これを用いてCa波とERの分布を調べた。

#### 1. 細胞内深部と核での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の観察

ハムスター未受精卵にCa結合性蛍光色素カルシウムグリーンを注入し、受精時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の空間的パターンを観察した。 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は精子付着部位から始まり、伝播性に卵全体に波及するいわゆるCa波を形成した。このとき、Ca波は卵表層のみを伝播するのではなく、細胞質深部に伝わるのがわかった。

技術的な問題点として、カルシウムグリーンは細胞内に完全には均一に分布せず、受精前に蛍光強度が均一でない。これを補正するために、受精後の一つ一つの画像を、受精前の一つの画像で割り算することで標準化を行った(pixel-to-pixel ratio imaging)。これにより不均一な蛍光はかなり改善された。さらに、蛍光波長の異なる二種類のCa指示性色素、カルシウムグリーンとフラレッドを注入し、両者の画像を割り算する方法を行った。これにより、蛍光の不均一はさらに改善された。しかしながら実際の $[Ca^{2+}]_i$ の正確な値をえるためには、さらに改善が必要であることが分った。

ハムスター未成熟卵では、卵核胞という大きな核があり、観察が容易であるので、受精時の核の中のCa濃度 ( $[Ca^{2+}]_n$ ) の変化を調べた。細胞質のCa濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の上昇とともに $[Ca^{2+}]_n$ が上昇することが分った。しかし受精前に核の蛍光が細胞質よりも強く、受精時にもより増強するので、上記のratio imagingによって標準化してみると、 $[Ca^{2+}]_n$ はほぼ $[Ca^{2+}]_i$ と同程度に上昇することが示された。これはウニ卵で最近報告された所見と一致する<sup>2)</sup>。

核をとり囲む核膜は内膜と外膜から成り、ERと類似してCa貯蔵器官としての機能を有すると考えられている。外膜上には $IP_3$ レセプターが存在することが分っている<sup>3)</sup>。従って核膜から細胞質に向かったのCa遊離が起こることが推測される。一方、核膜から核内へ向かったのCa遊離の証拠は今のところ無い。これらの問題を明かにするために、核内あるい

は核周辺の細胞質に $IP_3$ をマイクロピペットから微量注入し、 $[Ca^{2+}]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_n$ の上昇をCLSMを用いて詳細に観察した。何れの場合も $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は $[Ca^{2+}]_n$ の上昇に僅かに先行した。従って $[Ca^{2+}]_n$ 上昇に対して最も考え得るメカニズムは、ERおよび核膜から核周辺の細胞質に遊離されたCaが、比較的大きな核膜孔を通して核内に流入することであろうと考えられる。(第72回日本生理学会大会発表予定)

## 2. 小胞体の分布と卵成熟過程における変化

脂溶性の蛍光色素を卵内に注入すると、できた油滴に接している細胞内小器官の膜に移行して拡散する。これによって小胞体(ER)の細胞内全体におよぶ分布を生きた細胞で観察することが可能になり、ウニやヒトデ卵で示された<sup>4, 5)</sup>。我々は脂溶性の蛍光色素として1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetra-methylindocarbocyanate (DiIc(3)、略してDiI)を用い、大豆油に溶解したものをハムスター卵に注入してCLSMで観察した。成熟卵では、ERは細胞全体におよぶ様なネットワークを構成しており、特に細胞膜直下の表層に密に存在していた。また、深部ではネットを連結するようなかたちで、やや密な部分がある。

我々は以前の実験で、 $IP_3$ 誘発性Ca遊離機構が、卵成熟過程で発達し、成熟卵で初めて正常な受精を可能にする $[Ca^{2+}]_i$ 増加反応を起こすようになることを明かにした<sup>6)</sup>。この実験は $IP_3$ 注入に対するCa遊離の程度を $[Ca^{2+}]_i$ の上昇で見たもので、卵成熟過程で $IP_3$ 感受性が発達すると結論された。一方、ERの形態的な発達或は分布が卵成熟過程で変化することも考えられる。そこで上記の方法でERの分布を調べた。未成熟卵(妊娠馬血清ゴナドトロピン(PMSG)をハムスターに注射し、48時間後に成熟した卵巣卵胞から採取した卵母細胞で、卵核胞がはっきりみえる時期)では、DiIの蛍光の分布は成熟卵と全く異なり、卵表層に数個のパッチ状に偏在し、深部は細かいネットワークを見るのみであった。各々のパッチは数ミクロン以上にも及んでいる。また、卵核胞の周囲、特に細胞表層に面した側にも、DiI 蛍光がパッチを形成していた。一方、卵核胞内には DiI 蛍光は全く観察されない。電子顕微鏡観察によって、滑面小胞体が群れをなして存在することを見出し、上記の DiIによる蛍光の分布はERの分布を示していることを確認した。そこで我々は、 $IP_3$ レセプターに対する抗血清を用いて免疫組織化学を行なったところ、 $IP_3$ レセプターはこのERの分布に一致してパッチ状に偏在することが明かとなった。さらにCa遊離の空間的パターンを見るために、未成熟卵内に caged  $IP_3$

に予め caged  $IP_3$  を注入し（これ自体は不活性で、紫外線照射によって光分解して活性をもつ  $IP_3$  となる）を注入し、紫外線を照射して卵内一様に同時に  $IP_3$  を投与した状態とすると、核周辺の領域から  $[Ca^{2+}]_i$  上昇がおこることが分った。また、卵にヒト血清を投与すると Ca 振動がおこるが<sup>6,7)</sup>、このとき未成熟卵では表層の局所的に Ca 遊離が起こることを見出した。未成熟卵を受精させると Ca 波が明確でない。これは Ca 遊離部位である ER の不均一な分布によるものと説明づけられた。

PMSG 注射後 48 時間でヒト絨毛性ゴナドトロピンを動物に注射し、4, 5, 8, 12 時間後にそれぞれ成熟中の卵を採取して ER の分布を調べた。4, 5 時間（一次減数分裂前中期）の卵では、さらにパッチの数と大きさが増していた。8 時間後（一次減数分裂の中期）になると、表層の大きな ER パッチは激減し、ずっと小さな集落となって、卵表層全域および深部へと分散していた。12 時間（二次減数分裂前中期）になるとほぼ成熟卵（二次減数分裂中期）で見るような卵全体に一様なネットワークを形成していた。これに付随して、 $IP_3$  レセプターも細胞内に一様に分布していた。また電子顕微鏡による観察では、表層の ER は細胞膜の直下に移動し、表層顆粒の周囲に位置していた。これらの ER および  $IP_3$  レセプターの分布変化は、成熟卵において明確な Ca 波を形成させ、Ca 依存性の開口分泌を遂行させる成熟過程の一つであることが明かにされた。

なお、電子顕微鏡観察は東邦大学の岡田詔子氏、 $IP_3$  レセプターの免疫組織化学は東京大学医科学研究所の御子柴克彦氏の研究室で作成された抗血清を用いて、JT 医薬基礎研究所の中西節子氏が行った。

（第 72 回日本生理学会大会発表予定、Developmental Biology に投稿中）

#### [参考文献]

- 1) 藤田哲也：科学 63:45-54, 1993.
- 2) Gallot I & Whitaker M: Cell Calcium 16:269-278, 1994.
- 3) Otsu H, Yamamoto A, Maeda N, Mikoshiba K & Tashiro Y: Cell Str Funct 15:163-173, 1990.
- 4) Terasaki M & Jaffe LA: J Cell Biol 114:929-940, 1991.
- 5) Faffe LA & Terasaki M: Dev Biol 164:579-587, 1994.
- 6) Fujiwara T, Nakada K, Shirakawa H & Miyazaki S: Dev Biol 156: 69-79, 1993.
- 7) Miyazaki S, Katayama Y & Swann K: J Physiol 426:209-227, 1990.

#### IV. ウシ卵受精時の細胞内Ca<sup>2+</sup>反応の記録

研究代表者は、ハムスター卵の受精時のCa反応は、一過性のCa増加が繰り返し起こるいわゆるCa振動であることを明かにした<sup>1)</sup>。これは哺乳動物で初めての報告である。その後、他の哺乳動物でも記録され、マウス、ウサギ、ブタ、ウシでもやはりCa振動が受精時のCa反応であることが明かにされてきている<sup>2)</sup>。さらに最近ではヒトの卵の体外受精時においても同様であることが報告された<sup>3)</sup>。産婦人科領域では、不妊症の対策としての体外受精において、最近最も有効な方法の一つは、精子を直接卵子内に注入することであるとされる。また畜産領域においては、クローン牛を数多く得るためなどに、核移植を行った卵を人為的に活性化する方法(parthenogenetic activation)が実用面で重要とされている。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇には、卵に高電場パルスを与えて細胞膜の透過性を一瞬上昇させ、細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入を起こさせる方法が取られている。このとき、一過性の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を繰り返し起こさせ、且つ電場パルスの強度と頻度を適当に選ぶと、卵の活性化、着床度、その後の胚の発達がよいことがウサギの実験で報告された<sup>4)</sup>。よりよい人為的活性化を得るためには、正常な受精時のCa反応に模式して刺激パルスを加えればよいであろうと思われる。それにはその動物種での正常な受精時のCa反応を知ることが先決である。ウシ卵の受精時のCa反応を記録した報告は1つあるが<sup>5)</sup>、受精させた数時間後に途中からCa反応を記録しており、記録が断片的である。そこで我々は受精直後のCa反応から、雌雄前核が融合するあたりでCa反応が消失するまでの記録を行った。

成熟卵は、屠殺したウシの卵巣の発達した卵胞から卵母細胞を取りだし、これを20時間培養した(in vitro maturation)。また、ゴナドトロピンを注射し卵胞を成熟させてから、経腔的に卵巣から吸引して成熟卵を得た(in vivo maturation)。精子はCaイオノホアまたはカフェイン+ヘパリンで受精能を獲得させた。成熟卵周囲の透明帯をプロナーゼで処理して除去し、卵にfura-2を取り込ませ、精子が卵に付着した直後からCa画像解析を開始した。1回目のCa増加反応は1分以内に起こり始め、平均560 nMのピークに達し、持続は約6分であった。この後のCa反応は18~20分の間隔で規則的におこり、ピークは平均365 nMで持続は約2分であった。即ち、1回目のCa反応のみ大きく且つ持続時間が長く、2回目以降のCa反応はほぼ一定である。Ca増加反応は減衰せずに少なくとも9時間は持続し、前核移動、核膜の消失の間に次第に減少し、2細胞期では起こらなかった。恐らく雌雄前核が一つの核になるあたりで消失し

たものと思われる。Ca増加のメカニズムを知るため、抗IP<sub>3</sub>レセプター抗体18A10を注入し、これがIP<sub>3</sub>注入によるCa遊離を抑制することを確認した後、受精時のCa反応を抑制するかを調べた。残念ながらはっきりした抑制した例が少なく、結論を出すには至らなかった。

この実験で、ウシ卵受精時の初めのCa増加反応が初めて記録され、周期的なCa反応が持続し、核融合の起こる時点で消失することが明かにされた。卵を人為的に活性化する場合の指標として有用なデータを与えたと考えられる。なお、ウシ卵の採取と精子の活性化は、ミック研究所の水野仁二氏によってなされ、同遠藤健治の協力を得た。

(Journal of Reproduction and Development, 印刷中)

#### [参考文献]

- 1) Miyazaki S & Igusa Y: Nature 290:702-704, 1991.
- 2) Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K & Honda Y: Dev Biol 158:62-78, 1993.
- 3) Taylor CT, Lawrence YM, Kingsland CR et al: Hum. Reprod 8: 2174-2179, 1993.
- 4) Ozil J-P: Development 109:117-127, 1990.
- 5) Fissor RA, Dobrinsky JR, Balise JJ et al: Biol Reprod 47:960-969, 1992.

## V. まとめと今後の課題

以上のような成果の他に、これまでの我々の研究結果を基盤として、関連する研究領域に関する英文および邦文の解説、総説などを、学会誌や雑誌に発表した。また、国内および国際学会のシンポジウム、Gordon Conference(USA)、Ciba Foundation Symposium (UK)、特別講演、技術講習会講演なども行った。これらは主に1)哺乳動物卵受精時のCa動態とシグナル伝達機構に関するもの、2)細胞内Caの空間的・時間的シグナリングに関するものである。1は受精という生物学的側面からみた研究のオーバービューであり、2はより普遍的な側面から一つの重要なテーマとしてCaの動態を論じたものである。これらは発生生物学、生理学、細胞生物学の分野に於て有用な参考資料を提供したと考えられる。従ってこれらの総説あるいは口頭発表も、今回の研究の成果であると考え、前項の研究発表に加えた。

当該研究に於ては、精子による卵活性化の信号伝達に関する研究に多くの時間を費やしたが、現在知られている精子あるいは卵細胞表面の蛋白分子を介するシグナル伝達を示唆する結果は得られなかった。未だ細胞表面の蛋白分子に関する知見が不足していると考えられ、さらに研究を進める必要がある。一方、精子細胞質から卵に送り込まれる卵活性化因子は重要と思われ、今後その物質の精製と同定を進める予定である。

Caシグナリングに関しては、 $IP_3$ によって活性化されるCa流入経路の存在を証明した点で成果を得た。この経路が実際に受精時に作動しているのかどうかを実証することが今後の課題である。

共焦点レーザー走査顕微鏡による小胞体の分布の観察は、予想以上に成果を得た。更に受精時、受精後の変化を追跡することが興味深い。また、細胞内Caマイクロドメインの解析は、今後さらに活発に行われるであろうと予想される。特に核内のCa動態は重要である。

精子-卵結合によって誘発される細胞内Caの上昇は、哺乳動物に於ては、卵細胞表層顆粒の開口分泌を誘発し、分泌物が透明帯のZP蛋白質に作用して分子を修飾し、次の精子の結合を阻止することによって多精拒否機構を成立させる。一方、Ca上昇は、二次減数分裂の中期に停止していた未受精成熟卵を先に進める(減数分裂の再開)引き金になると考えられているが、その機構は今後の本質的な重要研究課題である。さらに哺乳動物受精卵において長時間に亘って起こる一過性のCa上昇(Ca振動)は初期発生においてどのような生物学的意義をもつかを解明することも、今後の重要な研究課題である。



## V. まとめと今後の課題

以上のような成果の他に、これまでの我々の研究結果を基盤として、関連する研究領域に関する英文および邦文の解説、総説などを、学会誌や雑誌に発表した。また、国内および国際学会のシンポジウム、Gordon Conference(USA)、Ciba Foundation Symposium (UK)、特別講演、技術講習会講演なども行った。これらは主に1)哺乳動物卵受精時のCa動態とシグナル伝達機構に関するもの、2)細胞内Caの空間的・時間的シグナリングに関するものである。1は受精という生物学的側面からみた研究のオーバービューであり、2はより普遍的な側面から一つの重要なテーマとしてCaの動態を論じたものである。これらは発生生物学、生理学、細胞生物学の分野に於て有用な参考資料を提供したと考えられる。従ってこれらの総説あるいは口頭発表も、今回の研究の成果であると考え、前項の研究発表に加えた。

当該研究に於ては、精子による卵活性化の信号伝達に関する研究に多くの時間を費やしたが、現在知られている精子あるいは卵細胞表面の蛋白分子を介するシグナル伝達を示唆する結果は得られなかった。未だ細胞表面の蛋白分子に関する知見が不足していると考えられ、さらに研究を進める必要がある。一方、精子細胞質から卵に送り込まれる卵活性化因子は重要と思われ、今後その物質の精製と同定を進める予定である。

Caシグナリングに関しては、 $IP_4$ によって活性化されるCa流入経路の存在を証明した点で成果を得た。この経路が実際に受精時に作動しているのかどうかを実証することが今後の課題である。

共焦点レーザー走査顕微鏡による小胞体の分布の観察は、予想以上に成果を得た。更に受精時、受精後の変化を追跡することが興味深い。また、細胞内Caマイクロドメインの解析は、今後さらに活発に行われるであろうと予想される。特に核内のCa動態は重要である。

精子-卵結合によって誘発される細胞内Caのが上昇は、哺乳動物に於ては、卵細胞表層顆粒の開口分泌を誘発し、分泌物が透明帯のZP蛋白質に作用して分子を修飾し、次の精子の結合を阻止することによって多精拒否機構を成立させる。一方、Ca上昇は、二次減数分裂の中期に停止していた未受精成熟卵を先に進める(減数分裂の再開)引き金になると考えられているが、その機構は今後の本質的な重要研究課題である。さらに哺乳動物受精卵において長時間に亘って起こる一過性のCa上昇(Ca振動)は初期発生においてどのような生物学的意義をもつかを解明することも、今後の重要な研究課題である。

- 1. 研究機関番号 3 2 6 5 3
- 2. 研究機関名 東京女子医科大学
- 3. 研究種目 一般研究(B)
- 4. 研究期間 平成5年度 ~ 平成6年度
- 5. 課題番号 0 5 4 5 4 1 4 1
- 6. 研究課題 哺乳動物受精卵におけるCa波とCa振動のメカニズムに関する生理学的研究

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属機関・部局名	職名
8.00.1.00.8.1	加 ミヤガキ マシイ 宮村, 俊一	東京女子医科大学・医学部	教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属機関・部局名	職名
40.2.4.1.0.7.0	加 シラカワ ヒロキ 白川, 英樹		助手
50.2.5.6.4.7.6	加 シライ ジョウイチ 白石, 浩一		助手
50.2.6.6.7.1.4	加 オノ マサユキ 尾田, 正二		助手
	加		
	加		

9. 研究経費

平成5年度	6,600	千円
平成6年度	1,400	千円
平成 年度		千円
平成 年度		千円
平成 年度		千円
計	8,000	千円

10. 研究経過

受精の引き金になる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度(Ca)上昇につき、哺乳動物卵に特徴的なCa波とCa振動の成因を解析した。

1. 精子-卵接着結合からCa増加反応に至る信号伝達につき、細胞膜上の蛋白分子のリガンドや抗体による刺激でCa増加反応は誘発できず、細胞内信号伝達としてチロシンキナーゼのインヒビターは受精時のCa反応の発生を抑制しないことから、細胞表面分子でのシグナル発生よりも、精子細胞質から卵内に送りこまれる物質が重要ではないかという結論に達した。
2. ハムスター卵でイノシトール四リン酸(IP<sub>4</sub>)で活性化される(細胞外からの) Ca流入経路を同定し、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)によるCa遊離を起こした小胞体を再充填するCaを供給することによって、Ca遊離を繰り返し発生させるといふ、Ca振動の成因を支持する結果を得た。
3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、受精時のCa波は細胞質深部に伝播し、核内でも細胞質と同様のCa増加が起こることを確認した。また、脂溶性蛍光色素を卵内に注入し、小胞体が細胞全体に及ぶ網目構造を形成していることを観察した。未成熟卵では小胞体は表層及び核周辺に偏在し、これに対応してIP<sub>3</sub>受容体も偏在し、Ca遊離も局在することを見出した。卵成熟過程における小胞体とIP<sub>3</sub>受容体の細胞全体への分散が、成熟卵における正常な受精時のCa波形成に必要なであることを明かにした。

11. 研究成果報告書として取りまとめられない理由

12. 研究成果の取りまとめ時期(予定) : 平成 年 月 日頃