

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790170

研究課題名（和文） ホスホリパーゼCゼータ遺伝子置換・欠損マウスの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of phospholipase C-zeta-deficient mouse

研究代表者

伊藤 昌彦 (ITO MASAHIKO)

山口大学・総合科学実験センター・助教

研究者番号：50385423

研究成果の概要（和文）：

受精後の胚発生の開始には、精子-卵融合後に起こるカルシウムオシレーションが必須である。このカルシウムオシレーションを誘導する因子として精子特異的に存在するホスホリパーゼCゼータ(PLCZ1)が最有力候補として考えられている。本研究で PLCZ1 のカルシウムオシレーションの制御機構を明らかにするとともに、PLCZ1 遺伝子改変マウスを用いて、卵活性化機構および配偶子形成における PLCZ1 の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In mammalian fertilization, Ca^{2+} oscillations are indispensable for egg activation. Sperm specific isotype of phospholipase C (PLCZ1) is a strong candidate for egg-activating sperm factor. In this study, regulation of Ca^{2+} oscillations by PLCZ1 was examined about nuclear localization ability and Ca^{2+} oscillation inducing activity. Moreover, PLCZ1 deficient mice were analyzed and it was shown that PLCZ1 has a pivotal role for spermatogenesis as well as an egg activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ホスホリパーゼCゼータ・卵活性化精子因子・カルシウムオシレーション・遺伝子欠損マウス・精子形成

1. 研究開始当初の背景

受精のメカニズムは生命科学の重要な研究課題であり、また医学・獣医学

の技術的進歩の基礎になる。

哺乳動物の成熟卵は第二減数分裂中期で細胞周期が停止しており、受精に

より減数分裂が再開し、極体の放出・雌雄前核の形成から卵割に至る。これを卵活性化という。動物種普遍的に、精子は卵細胞内カルシウムイオン（以下 Ca^{2+} ）濃度の反復性の上昇（ Ca^{2+} オシレーション）を誘発し、これが卵活性化の引き金になる（Miyazaki ら, *nature*, 1981）。この Ca^{2+} 増加はイノシトール3リン酸 (IP_3) 受容体を介する小胞体からの Ca^{2+} 遊離であることが知られているが（Miyazaki ら, *Science*, 1992）、これまで上流の IP_3 産生経路は不明であった。他方で、精子抽出物あるいは精子を卵内に注入することで同様の反応が起きることから、精子に Ca^{2+} オシレーション誘起物質が存在し、精子-卵の融合時に精子から卵に移行し、卵活性化蛋白質（egg-activating protein, EAP）として機能するとされている。近年、精子特異的に発現する IP_3 産生酵素ホスホリパーゼ C（phospholipase C; PLC）の新タイプ、ゼータ（PLCZ1）が EAP の最有力候補として浮上している（Saunders ら, *Dev Biol*, 2002）。我々は、これまで PLCZ1 のリコンビナントや RNA をマウス卵に注入することで Ca^{2+} オシレーションが誘発できること、また蛍光蛋白質との融合により、PLCZ1 は前核に蓄積することを示した（Kouchi ら, *JBC*, 2004, 2005; Yoda ら, *Dev Biol*, 2004）。このことは、受精卵で EAP が前核に蓄積するという既知の事実と一致する（Kono ら, *Development*, 1995）。また、PLCZ1 は核膜崩壊にともない細胞質に拡散するが、卵割後の 2 細胞期胚では核に再び集積する（Sone, Ito ら, *BBRC*, 2005）。 Ca^{2+} オシレーションは核膜崩壊後に再開することから、PLCZ1 の局在による Ca^{2+} オシレーションの調節機構が強く示唆された。PLCZ1 の核移行は触媒ドメインの間にある X/Y リンカー領域に

存在する核移行シグナルにより制御されており、同時に Ca^{2+} 結合部位である EF-hand domain やリン脂質結合部位である C2 domain などにより形成される立体構造が重要であることを明らかにした（Kuroda, Ito ら, *JBC*, 2006）。これまでの知見から、PLCZ1 は EAP としての特性を備えているが、最終的な証明はなされていない。

2. 研究の目的

さまざまな研究から、PLCZ1 が卵活性化因子の最有力候補となっているが、いまだ結論はでていない。そこで、本研究では、PLCZ1 が卵活性化因子としての特性を備えているかを、PLCZ1 によるカルシウムオシレーションの制御機構の観点から明らかにする。さらに、PLCZ1 遺伝子改変マウスを用いて、受精や生殖における PLCZ1 の機能を明らかにすることで、卵活性化機構および配偶子形成と受精のメカニズムを解明する。

哺乳類の卵活性化因子は受精の研究の中心課題のひとつであり、 Ca^{2+} 増加による卵活性化の機構は様々な動物種において普遍であり、その同定の意義は大きい。また、PLCZ1 を利用することにより人工授精率を高めること、あるいは高品質家畜クローンの生産効率を高めるなど、医療や畜産などへの幅広い応用が考えられる。さらには、新タイプである PLCZ1 の解析は生殖医療のみならず生化学一般においても有用な研究となる。

3. 研究の方法

- 1) PLCZ1 誘導のカルシウムオシレーション停止メカニズムの解明：
PLCZ1 の前核への移行によるコンパトメンタリゼーションに伴い、PLCZ1 誘導のカルシウムオシレーションが停止するかどうかを野生型および核移行能欠損体の

cRNA をマウス卵に微量注入し、Fura2 による細胞内カルシウム濃度の測定を行った。また、核膜形成時期と PLCZ1 の核への局在のタイミングを明らかにするために、ER-dsRed2 および DiI による小胞体の蛍光標識し、リアルタイムイメージングを行った。さらに、体外受精時のカルシウムオシレーションの停止時期が核膜形成時期と一致しているかを調べた。

- 2) 核移行能の普遍性の検討：
核移行によるカルシウムオシレーションの停止が動物種によらず共通のものであるかを明らかにするために、ヒト、ラット、メダカ PLCZ1 をクローニングし、Venus 融合タンパク質による核移行能の解析、およびカルシウムオシレーション誘発能の解析をマウス卵、ラット卵および培養細胞で行った。また、ラット体外受精時のカルシウムオシレーションの停止について調べた。
- 3) PLCZ1 高濃度発現時のカルシウムオシレーションの停止メカニズムの解明：
PIP₂ の分解による DAG の産生が PKC を活性化し、PLCZ1 のオシレーション誘発能をネガティブに制御している可能性を検討した。マウス未受精卵および受精胚に発現する PKC を RT-PCR による同定した。また、PLCZ1 の PKC によるリン酸化部位を予測し、すべての箇所に変異を導入し、マウス卵に微量注入、カルシウムオシレーションを調べた。
- 4) PLC Z1 の精子内分布の観察：
コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて、PLCZ1-Venus ノックインマウスの精子内分布を蛍光を指標にして調べた。これまで PLCZ1

は精子核外近傍領域 (peri-nuclear region) に存在すると考えられており、これと一致するかを確かめた。また、先体帽および核などを特異的マーカーで蛍光標識し、詳細な局在部位を明らかにした。さらに、Thapsigargin や A23187 を薬剤を用いて先体反応を誘導し、その後の精子内局在を調べた。

- 5) PLCZ1 欠損マウスの表現型解析：
PLCZ1 -Venus ノックインマウスは、Cre リコンビナーゼにより組織特異的に PLCZ1 を欠損できるように設計してある。全身に Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre マウスとの交配により得られた PLCZ1 欠損マウスの PLCZ1 の発現を精巣、精子において RT-PCR およびノザン解析、イムノブロッキングにより解析した。また、PLCZ1 欠損マウスの精子の解析を詳細に行った。さらに自然交配、体外受精による産仔数、受精率を調べた。
- 6) PLCZ1 欠損精子の Ca²⁺オシレーション誘発能の検証：
PLCZ1 欠損精子を用いて、正常卵を受精し、Ca²⁺オシレーション誘発能（受精能）が喪失するかを検証する予定であったが、PLCZ1 欠損マウスでは円形精子細胞で細胞周期が停止していた。そこで、PLCZ1 が精子由来卵活性化因子であるか否かを証明するために、体外培養系での精子成熟を試みた。
- 7) PLCZ1 発現制御機構の解明：
PLCZ1 の精子特異的な発現制御機構を解明するために、円形精子細胞由来の細胞株において、PLCZ1 プロモーター領域を用いた蛍光機能解析、ルシフェラーゼアッセイなどを試みた。

4. 研究成果

1) PLCZ1 前核移行によるカルシウムオシレーション停止：マウス PLCZ1 により誘導されたカルシウムオシレーションの停止を、様々の濃度の PLCZ1 cRNA と核移行能欠損体 (K377E cRNA) をマウス卵に注入することで調べた (図 1)。また、前核形成と PLCZ1 の核への移行をリアルタイムで観察した (図 2)。その結果、PLCZ1 誘導のカルシウムオシレーションは PLCZ1 の核移行により停止していることを明らかにした (Ito ら, Cell Calcium, 2008)。

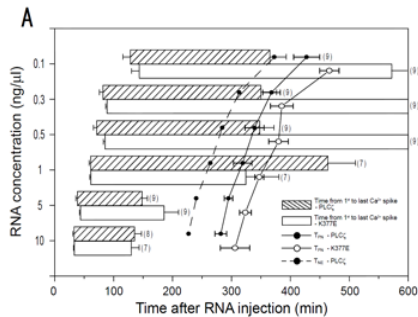


図 1. 前核形成とカルシウムオシレーションの持続時間

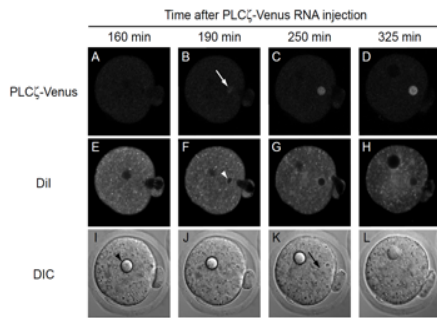


図 2. PLCZ1 の核移行と核膜の形成時期

2) PLCZ1 の前核移行によらないカルシウムオシレーション停止：他の動物種の PLCZ1 (ラット、ヒト、メダカ) の核移行能およびカルシウムオシレーション誘発能を調べた結果、ヒト PLCZ1 はやや核移行が認められたが、ラット、メダカ PLCZ1 は核への移行は起こらなかった (図 3)。

ラットやメダカ PLCZ1 においてもマウス PLCZ1 と対応する部位に核移行シグナルに典型的な塩基性アミノ酸の連続があるが、核移行能に寄与していないことが示された。しかしながら、ラットの体外受精時のカルシウムオシレーションは前核形成時に停止することから、PLCZ1 の核移行によらないカルシウムオシレーションの停止メカニズムがほかの動物種では存在することが示唆された (Ito ら, Biol Reprod, 2008)。

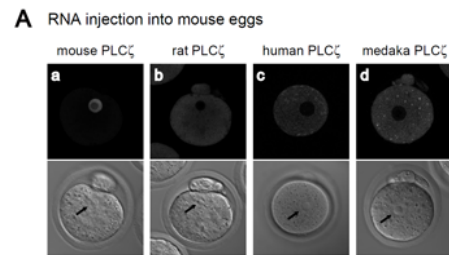


図 3. 動物種による核移行能の違い

3) PLCZ1 活性制御機構：

PLCZ1 によって誘導されるカルシウムオシレーションの停止時間は PLCZ1 の発現量に依存的である。これは、PIP₂ の加水分解により生じる DAG が PKC を活性化し、その結果 PLCZ1 をリン酸化することで起こると考えた。RT-PCR により成熟未受精卵には PKC α , δ , ϵ , η , λ , μ , ζ が存在していることを明らかにした。次に、リン酸化される可能性が高い 10 箇所のアミノ酸残基にそれぞれ点変異を導入した RNA を作成し、マウス卵に注入することでオシレーション持続能を調べた結果、リン酸化を受けない点変異体のすべてでカルシウムオシレーションは前核形成時に停止した (表 1)。このことから、過剰発現による Negative feedback には、PLCZ1 のリン酸化は関与しないことが示さ

れた。

	No. of eggs	1st Ca ²⁺ spike	2nd Ca ²⁺ spike	No. of spikes	Interval	2nd burst	NT ¹⁾
Wild	6	27±0.8	95±11.1	8.3±2.2	9.7±1.8	+	+
S128A	4	69±2.0	378±34.3	11.8±2.5	30.7±4.6	-	-
S176A	3	29±1.5	162±47.3	13.7±6.8	11.8±3.8	-	+
T180A	3	248±11	362±96.3	2.6±1.6	68.6±0.12	-	+
Y181F	5	38±2.7	187±26.9	13.4±3.2	12.3±2.0	-	+
T228A	4	58±2.1	241±11.6	10.5±2.7	20.5±6.0	±	+
T311A	5	31±1.7	192±19.0	7.2±2.3	12.1±1.8	±	+
T321A	5	27±1.3	117±17.0	11±3.0	9.27±1.2	+	+
S425A	4	33±1.7	93±19.7	5±1.8	15.5±2.2	±	+
S452A	9	79±3.6	377±67.8	9.7±1.4	34.7±4.7	-	+
T523A	4	34±1.5	141±17.0	14.8±5.5	8.5±2.5	-	+
S528A	7	30±3.1	180±57.2	19±12.6	9.9±3.5	-	+

表 1. リン酸化部位点変異体のカルシウムオシレーションパターン

4) PLCZ1 の精子内局在

PLCZ1-Venus ノックインマウス精子における PLCZ1 の局在をコンフォーカル顕微鏡において蛍光観察したところ、精子頭部に均一に局在していた。また先体反応後も局在変化は認められなかった。蛍光が非常に微弱であることから、その発現量により検出は難しいものと考えられた。

5) PLCZ1 欠損マウスの発現解析:

ゲノミック PCR 法により確認した PLCZ1 欠損ヘテロマウス、ホモマウスにおける精巣での PLCZ1 mRNA の発現を RT-PCR 法およびノザン解析により調べた。その結果ヘテロでは PLCZ1 の発現は激減し、ホモでは完全に発現が消失することを確認した。また、PLCZ1 タンパク質の発現をイムノプロテイングにより解析した結果、野性型マウスの精巣上体尾部精子でのみ PLCZ1 が検出された。これらのことより、PLCZ1 欠損マウスの作出に成功したことが確かめられた。また、野性型と欠損マウスでの形態的な表現型の違いとして有意な精巣重量の減少が認められた。体重などを含む他の表現型に相違は確認できなかった。精巣および精巣上体尾部の HE 染色を行ったところ、ホモでは管腔内に成熟精子が認められず、円形精子細胞様の細胞が多くあった。種々の精子形成ステージマーカーによる RT-PCR 法により、こ

の細胞が減数分裂を終了した円形精子細胞であることを明らかにした。尾部精子に 3 割程度の成熟精子が存在するヘテロマウスの受精能を自然交配および体外受精により検証した。その結果、産仔数は有意に減少し、体外受精においては 4 割程度の前核形成率であった。したがってヘテロマウスに見られる成熟精子は、カルシウムオシレーション誘発能が正常であると示唆された。(投稿準備中)

6) PLCZ1 の精子形成への関与: 円形精子細胞を成熟精子まで体外で分化誘導することのできる体外精子成熟系を用いて、PLCZ1 欠損マウス円形精子細胞が分化成熟しないこと、一方で PLCZ1 発現ベクターの遺伝子導入によりこの分化の停止をレスキューできることを確かめるために、体外精子成熟系の検討・構築を行った。今後、この系で成熟させた精子を用いて卵活性化能を調べる。

7) PLCZ1 発現制御機構の解明:

円形精子細胞由来の細胞株において、PLCZ1 プロモーターの解析を行うため、種々の長さのプロモーター領域を組み込んだコンストラクトを構築した (ルシフェラーゼアッセイ用ベクター、蛍光タンパク質発現用ベクターなどに導入)。今後、これを用いて精子特異的な発現制御機構の解析を試みる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Masahiko Ito, Tomohide Shikano, Keiji Kuroda, Shunichi Miyazaki. Relationship between Nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. Cell

Calcium, 査読有, 44, 2008, pp400-410.

2. Masahiko Ito, Tomohide Shikano, Shoji Oda, Takashi Horiguchi, Satomi Tanimoto, Takeo Awaji, Hiroshi Mitani, Shunichi Miyazaki. Difference in Ca²⁺ oscillation - inducing activity and nuclear translocation ability of PLCZ1, an egg - activating sperm factor candidate, among mouse, rat, human and medaka fish. Biol Reprod, 査読有, 78, 2008, pp1081-1090.

[学会発表] (計3件)

1. 伊藤昌彦、鹿野朝秀、村田智昭、宮崎俊一、Analysis of negative feedback mechanism of phospholipase C-zeta, a egg-activating sperm factor candidate, overexpression、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、横浜
2. 伊藤昌彦、鹿野朝秀、堀口崇、谷本さとみ、三谷啓志、尾田正二、淡路健雄、宮崎俊一、卵活性化精子因子候補ホスホリパーゼCゼータの核移行能の役割、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月9日、横浜
3. 伊藤昌彦、卵活性化精子因子候補ホスホリパーゼCゼータの核移行能の役割、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、ワークショップ(受精直後の分子生物学)、2007年12月9日、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 昌彦 (ITO MASAHIKO)

山口大学・総合科学実験センター・助教

研究者番号：50385423

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮崎 俊一 (MIYAZAKI SHUNICHI)

東京女子医科大学・学長

研究者番号：80010081

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)

国立成育医療研究センター研究所・生殖医療研究部・室長

研究者番号：60324844