

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590229

研究課題名（和文） 受精卵 Ca オシレーションにおける Ca 流入と Ca 遊離の機能的共役機構

研究課題名（英文） Functional coupling between Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release during Ca²⁺ oscillations in fertilized mammalian eggs

研究代表者

白川 英樹（SHIRAKAWA HIDEKI）

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授

研究者番号：40241070

研究成果の概要（和文）：哺乳類受精時の卵活性化に関わる細胞内 Ca²⁺濃度の制御機構、特に細胞外からの Ca²⁺流入の実体とその調節機構の解明を目指し、マウス受精卵における Ca²⁺オシレーションにおける TRPC、Orai および STIM タンパク質の機能的関与を想定して実験を行った。種々のペプチドを用いた阻害実験では、これらのタンパク質のいずれも受精時の Ca²⁺流入には関与していないことを示す結果となった。一方で STIM1 は Ca²⁺流入の活性化以外の機能を示すことが新たに示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the regulatory mechanism for Ca²⁺ influx pathway in fertilized mammalian eggs, we conducted a series of molecular and physiological experiments to interfere the interactions between Ca²⁺ influx channels on the plasma membrane, TRPC and Orai, and proteins on the ER membrane, STIM. The results suggested that, although none of these proteins participate functionally in the maintenance of the Ca²⁺ oscillations by activating Ca²⁺ influx, STIM1 may have a novel role other than as an activator of store-operated Ca²⁺ entry.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：受精・カルシウムシグナリング・カルシウム流入

1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵の受精時には、長時間にわたる周期的な細胞内 Ca²⁺濃度の増減（Ca²⁺オシレーション）がおり、初期発生開始のトリガーとして働く。受精卵内の Ca²⁺上昇は IP₃R/Ca²⁺チャネルを介した細胞内 Ca²⁺ストア（小胞体）からの Ca²⁺遊離であるが、細胞外の Ca²⁺を除去すると Ca²⁺オシレーション

はすぐに停止することから、Ca²⁺オシレーションの維持には細胞外からの Ca²⁺流入も必須である。しかし流入経路の実体や制御機構は不明である。

多くの細胞種で、細胞内 Ca²⁺ストアの充填・枯渇の状態により制御される Ca²⁺流入、いわゆる容量性 Ca²⁺流入（capacitative Ca²⁺ entry；以下 CCE）が存在する。マウス卵で

も CCE が存在することは確認されており、受精時の Ca^{2+} オシレーションに關与している可能性が高いと考えている。近年、体細胞での CCE を担うストア作動性チャネル (store-operated channel ; 以下 SOC) として、TRP チャネルファミリーの TRP や、Orai タンパクの關与が報告されている。CCE 活性化の過程については、細胞膜直下の小胞体膜上のタンパクと SOC タンパクとの直接的な相互作用によるとする説が有力である。

2. 研究の目的

本研究ではマウス卵を対象に、(a) TRPC、STIM、および Orai のマウス卵での発現の有無を明らかにすること、(b) 発現している TRPC、STIM、Orai が、受精時の Ca^{2+} オシレーションに實際に關与しているかを明らかにすること、さらには(c) Ca^{2+} オシレーションの発生・パターン形成における、TRPC、Orai と IP_3R 、STIM の間の相互調節の寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TRPC、STIM、Orai の発現の確認

TRPC (TRPC1~C7)、STIM (STIM1、STIM2)、および Orai (Orai1~3) の mRNA について、各サブタイプに特異的なプライマーを用いた RT-PCR によりマウス卵細胞での発現を確認した。さらに STIM と Orai については、特異的な抗体を用いた Western ブロットによりタンパク質レベルでの発現確認を行った。さらに、以降の実験に用いるため、卵巣 RNA から RT-PCR によりそれぞれの cDNA をクローニングした。

(2) 相互結合部位ペプチドおよび欠失変異体の強制発現の効果

TRPC/Orai/STIM の相互結合部位のペプチドやその部位の欠失変異体 (図 1) の各種 cDNA コンストラクトを作成した。in vitro で合成した RNA をマウス未成熟卵または成熟卵に注入して培養してこれらを発現させ、静止時の Ca^{2+} レベルや、受精や $PLC\zeta$ (精子由来の IP_3 産生酵素) によって誘発した Ca^{2+} オシレーションに対する影響などを調べた。

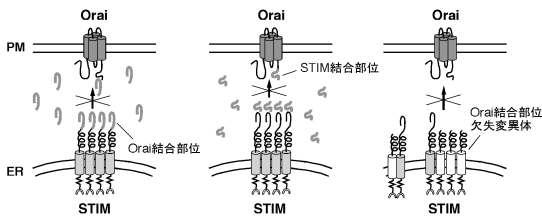


図 1 STIM/Orai 相互作用の阻害実験

4. 研究成果

(1) TRPC、STIM、Orai の発現の確認

マウス未成熟卵に対して、特異的なプライ-

マーを用いた RT-PCR を行った結果、TRPC1~C7、STIM1 と STIM2、Orai1~Orai3 の全てのサブタイプの mRNA が存在していることが確認された (図 2)。また、TrpC4 については、2 種類の splicing variant が存在していることも確認された。また STIM と Orai に対する特異的な抗体を用いた Western blot によりタンパク質の発現確認を行った結果、STIM1 と STIM2 は検出されたが、Orai1 については検出されなかった。

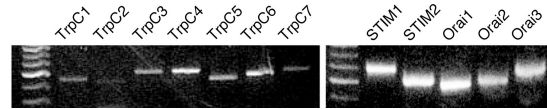


図 2 TrpC/STIM/Orai の mRNA の発現

(2) 相互結合部位ペプチドおよび欠失変異体の強制発現の効果

① TRPC-C末端細胞質ドメイン

TRPC4はC末端側の細胞質ドメインで IP_3R と相互作用するという報告がある。TRPC1およびTRPC4の2つのsplicing variantのそれぞれのC末端細胞質ドメインに相当するペプチド (TRPC1-CT、TRPC4 α -CT、TRPC4 β -CT) を発現させた卵では、静止時の Ca^{2+} 濃度レベルに有意な変化は見られなかった。PLC ζ によって誘発した Ca^{2+} オシレーションは、その頻度がわずかながら減少する傾向があったが、精子によって誘発した受精時の Ca^{2+} オシレーションに関しては、いずれのペプチドも有意な抑制効果を示さなかった (図 3)。

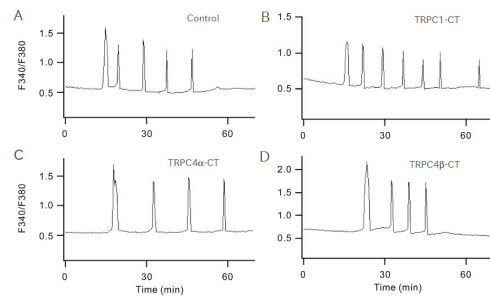


図 3 受精時の Ca^{2+} オシレーションに対する TRPC-N末端細胞質ドメインの効果

② Orai1-N末端細胞質ドメイン

Orai1はN末端側の細胞質ドメインでSTIMと相互作用することが知られている。Orai1のN末端細胞質ドメインに相当するペプチド (Orai1-NT) を発現させた卵では、静止時の Ca^{2+} 濃度レベルに有意な変化は見られなかった。また、受精時の Ca^{2+} オシレーションにおいても、Orai1-NTによる有意な抑制は見られなかった。

③ STIM1、STIM2細胞質ドメイン欠損変異体

STIMは細胞質側ドメインでOraiと直接相互作用すると考えられている。STIM1とSTIM2のC

末端側細胞質ドメインを欠損させた変異体 (STIM1- Δ CT、STIM2- Δ CT) を発現させた卵では、静止時のCa²⁺濃度レベルに有意な変化は見られなかった。また、受精時のCa²⁺オシレーションに対しても、抑制効果は示さなかった。

④ STIM1, STIM2細胞質ドメイン

STIM1およびSTIM2のC末端細胞質ドメイン全域に相当するペプチド (STIM1-CT、STIM2-CT) を発現させた卵では、静止時のCa²⁺濃度レベルに有意な変化は見られなかった (図4)。またこれらのペプチドは、PLC ζ や精子によって誘発したCa²⁺オシレーションの何れに対しても有意な抑制効果は示さなかった。

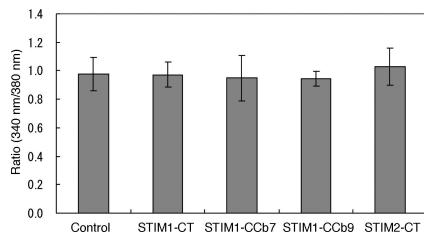


図4 静止時の卵内Ca²⁺濃度に対するSTIM/Orai由来各種ペプチドの効果

これに対し、STIM1の細胞質ドメインに含まれるcoiled coil領域周辺のみ相当する短いペプチド (STIM1-CCb7、STIM1- Δ CCb7) を発現させると、PLC ζ および精子によって誘発したCa²⁺オシレーションの何れに対しても、容量依存的に促進効果を示し、オシレーションの頻度は顕著に増加することが確認された (図5C、図6)。

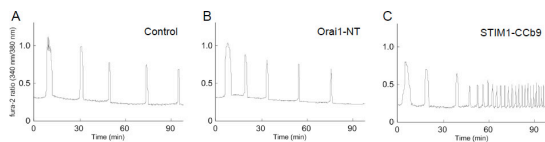


図5 受精時のCa²⁺オシレーションに対するOrai-N末端細胞質ドメインおよびSTIM1細胞質ドメインペプチドの効果

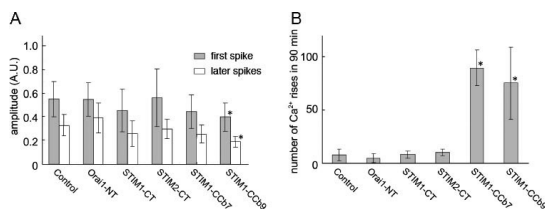


図6 受精時のCa²⁺オシレーションの振幅 (A) と頻度 (B) に対するSTIM/Orai由来各種ペプチドの効果

これまでの実験で、受精時のCa²⁺オシレーション中には何らかのCa²⁺流入経路が活性化されていること、またCa²⁺流入速度は個々の

Ca²⁺上昇と同期して周期的に変動してくることを確認している。また外液中のCa²⁺濃度を変えることによってCa²⁺流入速度を増減させた場合、Ca²⁺オシレーションの振幅は変わらずに頻度が増減する。本研究で行った一連の実験において、用いたTRPC/Orai/STIMの細胞質ドメインペプチドや欠損変異体はいずれもCa²⁺オシレーションに対して有意な抑制効果 (オシレーション頻度の減少) は示さなかった。また、上述の以外にもTRPC1やTRPC4、STIM1やSTIM2、Orai1の野生型を卵に過剰発現させる実験を行ったが、いずれも静止時のCa²⁺濃度や受精時のCa²⁺オシレーションに有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果は、マウス卵においてはTRPCやSTIM/Oraiは発現はしているものの、受精時のCa²⁺オシレーションの維持に関わるCa²⁺流入経路としては機能していないことを示唆している。

培養細胞の系では、STIM1のcoiled coil領域周辺の短いペプチドがOrai1を介したCa²⁺流入を活性化するという報告がある。STIM1-Ccb7およびSTIM1-Ccb9が受精時のCa²⁺オシレーションに対して顕著な促進効果を示したという結果は、マウス卵でも内在性のOrai1がSTIM1によって活性化され得ることを示唆している。しかしながら、これらのペプチドを発現させた卵において二価イオンの流入速度を計測したところ、コントロールに対し大きくは増加しておらず、従って、これらのペプチドのCa²⁺オシレーションに対する効果はOrai1を介したCa²⁺流入の活性化だけでは説明できない。現在、STIM1-Ccb7/-Ccb9が細胞内Ca²⁺ストアへのCa²⁺取り込みを促進する可能性を想定し、さらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計14件)

- 高橋徹、木所佑介、白川英樹、On the role of SIM/Orai pathway in Ca²⁺ entry during Ca²⁺ oscillations in fertilized mouse eggs. 第89回日本生理学会、松本、J Physiol Sci 62 Suppl 1., S146, 2012年3月30日
- 田中理子、高橋徹、白川英樹、Visualization of intracellular IP4 dynamics using a novel fluorescent probe. 第89回日本生理学会、松本、J Physiol Sci 62 Suppl 1., S140, 2012年3月30日
- 熊倉裕紀、白川英樹、ユートロフィンを用いたマウス卵受精時の細胞内F-アクチンの経時的観察および解析、日本動物学会第82回大会、予稿集、2011年9月21日、旭川

4. 田中理子、高橋徹、白川英樹、細胞内イノシトール四リン酸動態可視化のための蛍光プローブの開発、日本動物学会第82回大会、予稿集、2011年9月21日、旭川
5. Takahashi, T. and Shirakawa, H., Characterization of store-operated Ca^{2+} entry in mouse eggs. 6th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2011, Nagoya, Comp Physiol Biochem, 28 Suppl, 158, 2011年6月1日
6. 木所佑介、白川英樹、On the functional role of STIM/Orai proteins in the regulation of intracellular Ca^{2+} in mouse eggs. 第88回日本生理学会、J Physiol Sci 61 Suppl 1, S275, 2011年3月(誌上開催)
7. 熊倉裕紀、真鍋祥、白川英樹、Time-lapse observation of cytoplasmic actin filament in mouse eggs during fertilization. 第88回日本生理学会、J Physiol Sci 61 Suppl 1, S270, 2011年3月(誌上開催)
8. 高橋徹、白川英樹、Pharmacological characterization of store-operated Ca^{2+} entry in mouse eggs. 第88回日本生理学会、J Physiol Sci 61 Suppl 1, S122, 2011年3月(誌上開催)
9. 白川英樹、木所佑介、畑中貴之、高橋徹、Evaluation and application of novel method for expression of extrinsic proteins in mouse oocytes using RNA with oligo(A) repeats. 第87回日本生理学会大会、岩手、J Physiol Sci 60 Suppl. 1, S177, 2010年5月19日
10. 高橋徹、畑中貴之、原悠輔、白川英樹、マウス受精卵における Ca^{2+} オシレーション発生時の Ca^{2+} 流入の解析、日本動物学会第80回大会、予稿集、p126、2009年9月18日、静岡
11. 木所佑介、日高裕華、白川英樹、マウス卵における STIM/Orai タンパク質による細胞内 Ca^{2+} 濃度調節、日本動物学会第80回大会、予稿集、p82、2009年9月17日、静岡
12. 今井修、宮川薫、熊倉裕紀、白川英樹、哺乳類卵受精時の細胞内 Ca^{2+} 振動の発生・維持に対するミトコンドリアの関与、日本動物学会第80回大会、予稿集、p86、2009年9月17日、静岡
13. Kidokoro, Y, Takahashi, A, and Shirakawa, H., Functional role of CRAC channels in the generation and maintenance of Ca^{2+} oscillations in mammalian eggs. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, J Physiol Sci 59 Suppl 1, 244, 2009年7月29日
14. Takahashi, T., and Shirakawa, H., Characterization of Ca^{2+} influx pathway activated during Ca^{2+} oscillations in mouse eggs. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, J Physiol Sci 59 Suppl 1, 244, 2009年7月29日

[その他]

ホームページ等

<http://rainbow.pc.uec.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 英樹 (SHIRAKAWA HIDEKI)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・
准教授

研究者番号：40241070

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし