

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791731

研究課題名(和文)新奇Ca²⁺+シグナル分子およびその作用機序の解明と不妊治療への展開研究課題名(英文)Elucidation of new Ca²⁺-releasing molecule and its mechanism for infertility treatment

研究代表者

原田 裕一郎(Harada, Yuichirou)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80570168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：受精は生命誕生に必須である。しかし不妊に悩む人々が多い。そこで、不妊治療の一助になることを目指して受精に関わる因子のメカニズムの解明した。結果として、ほ乳類モデル生物のマウスにおいて新規に受精に関わるCitrate Synthase-likeという分子を見出した。この分子は、受精時に精子から卵に導入されることで卵内でCa²⁺濃度上昇を引き起こし、卵の発生を開始させた。また、Citrate Synthase-likeの酵素活性または他の分子との相互作用によりCa²⁺濃度上昇が起こると考え、さらに研究を進めているところである。

研究成果の概要(英文)：Fertilization is essential event for development. However, there is a lot of person who suffer from infertility. And so, I elucidated the factor which concern with fertilization in order to assist for infertility. As a result, citrate synthase-like was found as the new factor in mouse, the mammal model. Citrate synthase-like triggered Ca²⁺ increase in egg cytoplasm on introducing into the egg, and then was began the development of zygote. Also, enzyme activity in citrate synthase-like or interaction between other molecules and citrate synthase-like seems to be concerned with Ca²⁺ increase in egg cytoplasm. Furthermore, I am intend to clarify functions and mechanism of citrate synthase-like in fertilization.

研究分野：発生生物学

キーワード：受精 Ca²⁺濃度上昇 Citrate Synthase-like

1. 研究開始当初の背景

受精は生命誕生の最初の一步である。しかし、排卵時、ヒトを含めた哺乳類卵は第二減数分裂中期；MII で停止しており、眠った状態（休止状態）である。したがって、卵は発生を開始するためこの休止状態から脱し、卵と精子それぞれの染色体からなる受精核を形成しなければならない。これら一連の過程を卵活性化と言い、精子により卵が活性化することで受精は成立する。この卵を活性化するために最も重要な鍵となる刺激が、卵内で起こる Ca^{2+} 濃度の上昇である。 Ca^{2+} 濃度上昇は精子の接着・融合した領域から卵全体へと広がる事が知られている。

この卵活性化に必須な Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすメカニズムの一つとして、卵と精子の互いの接着の後の膜融合によって精子細胞質の分子（精子ファクター）が卵内に導入されることでシグナルとなる精子ファクターモデルがある。この精子ファクターとして私はアカハライモリを用いた研究からイモリの精子ファクターを高度に精製し、精子由来のクエン酸合成酵素がイモリの精子ファクターの本体であることを世界で初めて精製によって明らかにした。さらに、イモリ精子クエン酸合成酵素によるイモリ卵子の活性化がクエン酸合成酵素の酵素活性を必要とすること、そして、その酵素活性によって産生されるアセチル CoA およびオキサロ酢酸によって Ca^{2+} 濃度が上昇することを示した。このクエン酸合成酵素による Ca^{2+} 濃度上昇誘起はこれまでに報告が無く、まったく新規の Ca^{2+} 放出メカニズムであると考えられた。

2. 研究の目的

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化によるシグナル伝達は、受精に限らず細胞の分裂周期制御や筋肉の運動調節など多くの機能調節において重要である。さらにその Ca^{2+} 源は小胞体 (ER) であることが多く ER からの Ca^{2+} 放出は PLC によって産生される IP_3 のリセプターを通して放出され、この $\text{PLC} \rightarrow \text{IP}_3 \rightarrow \text{ER}$ 経路は共通性が高い。しかし、PLC よりも上流の経路は動物種や細胞の種類によって極めて多様である。受精時の卵内 Ca^{2+} 濃度上昇についても不明な部分が多く、哺乳類のマウス卵において受精時と同様な Ca^{2+} 濃度上昇を再現するのに複数の精子ファクターが必要であることが示唆されている。そこで人を含めた哺乳動物の受精における精子ファクターによる卵活性化メカニズムについて解明するために、マウスの精子ファクターとしてのクエン酸合成酵素の働きとその卵内 Ca^{2+} 濃度上昇経路を明らかにする。

3. 研究の方法

この研究では哺乳類モデル生物であるマ

ウスを用いて受精時 Ca^{2+} 濃度上昇へのクエン酸合成酵素の働きについて解析をおこなう。

(1) 卵活性化に必要な分子；クエン酸合成酵素の機能と作用機序を明らかにするために、まずマウス精子のクエン酸合成酵素について検討する。まずマウス精子および精巣でのクエン酸合成酵素の存在、分布などを調べるために抗クエン酸合成酵素抗体を用いた免疫学的手法（ウエスタンブロット、免疫染色）を用いて解析する。さらにマウス卵での精子クエン酸合成酵素による卵活性化を検証するために、マウスクエン酸合成酵素のタンパク質また mRNA をマウス未受精卵に注入したとき活性化に必要な Ca^{2+} 上昇やその後の卵子の前核形成、初期細胞分裂などを観察する。さらにクエン酸合成酵素の卵活性化への必要性を検証するために、抗クエン酸合成酵素抗体を用いてクエン酸合成酵素を除去した精子抽出物を作製し、これによるマウス卵の活性化を観察する。これらの実験によりマウス精子のクエン酸合成酵素の卵活性化への機能について検討する。

一方、マウスのクエン酸合成酵素にはこれと相同性の非常に高い Citrate Synthase-like (CS1) という別のタンパク質が存在している。また、CS1 は主要な機能は解明されていないが、クエン酸合成酵素とのアミノ酸配列の比較からクエン酸合成酵素の酵素活性に必要なアミノ酸残基を全て持っていることから、クエン酸合成酵素と同様な酵素活性を持つと推測される。そこで、この相同な分子 (CS1) についてもマウス卵の活性化活性 (卵活性化、卵内 Ca^{2+} 濃度上昇、抗 CS1 抗体による活性の免疫除去) を検討し、これによって、マウス卵の活性化に CS1 が働いているのかどうかを明らかにする。

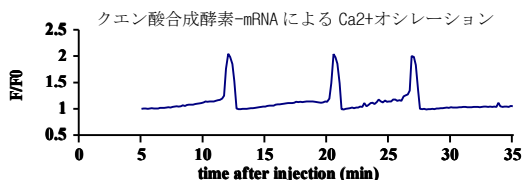
これらの結果から、クエン酸合成酵素または CS1 の卵活性化への働きが観察された場合にはこれらの欠損マウスを作成し、その機能解析をおこない、卵活性化への影響を検討する。

(2) クエン酸合成酵素 (および CS1) がマウス卵内でどのようなシグナル伝達によって卵内 Ca^{2+} 濃度を上昇させているかを明らかにし、クエン酸合成酵素による新奇 Ca^{2+} 放出メカニズムを構築することを目指す。まず、クエン酸合成酵素の酵素活性に着目し、この酵素活性を抑える阻害剤を用いて卵活性化が影響を受けるかを検討する。さらにクエン酸合成酵素の酵素活性によって生成される反応物であるクエン酸、オキサロ酢酸、アセチル CoA をマウス卵に注入した場合の卵活性化を観察する。これらの卵活性化の反応を確認することでクエン酸合成酵素の酵素活性がマウス卵の卵活性化に必要なかを検証する。一方で、抗クエン酸合成酵素抗体を用いた免疫共沈降法により、このタンパク質と結合する分子を解明する。卵内の Ca^{2+} 濃度変化と小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官を蛍光染色し、同時に観察することに

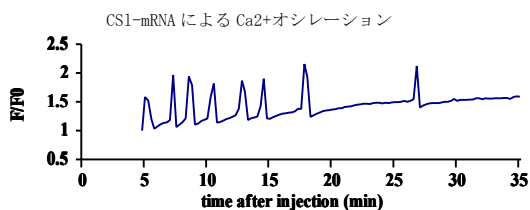
より、クエン酸合成酵素が卵内でどのようなCa貯蔵庫からCa²⁺放出させているかを明らかにする。また、卵内Ca²⁺放出径路を既存のシグナル経路阻害剤を用いて詳細に検討する。

4. 研究成果

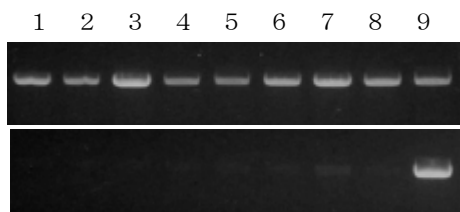
(1) クエン酸合成酵素および Citrate Synthase-like (CS1) の卵活性化能
クエン酸合成酵素による卵活性化について、クエン酸合成酵素 mRNA をマウス卵に注入す



ると、受精時とよく似た繰り返しのCa²⁺濃度上昇(Ca²⁺オシレーション)が観察された。一方で、クエン酸合成酵素(タンパク質)を注入した場合にも同様な反応が見られた。さらにCitrate Synthase-like (CS1) のmRNAをマウス卵に注入した場合もCa²⁺オシレーション様のCa²⁺濃度上昇が引き起こされた。



そこで、これらの分子のmRNAとタンパク質のマウス組織での発現を解析した。その結果、クエン酸合成酵素mRNAは検証した組織にほぼ均一に発現しているようであった。しかし、抗クエン酸合成酵素抗体を用いたクエン酸合成酵素タンパク質の検出ではマウス精子においてのみ、他の組織と異なるわずかに分子量の大きい分子が検出された。一方で、CS1はmRNA、タンパク質ともに精子および精巣にのみ特異的に発現していることが見出された。



mRNAの発現 上段:クエン酸合成酵素 下段:CS1

1:脳, 2:胚, 3:心臓, 4:肝臓, 5:脾臓, 6:腎臓,

7:骨格筋, 8:卵巣, 9:精巣



CS1タンパク質の発現(抗CS1抗体によるWB)

1:心臓, 2:骨格筋, 3:腎臓, 4:肝臓, 5:精

一方、クエン酸合成酵素とCS1の精子の分布では、クエン酸合成酵素がほとんど頭部には見られず尾部のみなのに対して、CS1は精子頭部を含む全体に分布していた。また、抗クエン酸合成酵素およびCS1を除去し、マウス卵を注入すると卵の活性化能は著しく減少した。以上の結果から、マウス精子において精子ファクターとしてCS1が優位に機能しているのではないかと考えられた。

さらに、CS1は精巣に強く発現が見られるが他の組織ではほとんど発現が見られないため、CS1によるマウス卵の活性化を検証するためCS1欠損マウスを解析することにした。その結果、CS1欠損マウスの精巣は正常なマウスの精巣と比較して有意に小さくなっていった。しかし、欠損マウス精子の運動能や受精能に問題はなかった。そこで、欠損精子による人工受精時の卵内Ca²⁺濃度上昇を観察した。するとCS1欠損マウス精子では正常精子に比べてCa²⁺オシレーション開始時間が大きく遅れる場合が見られた。このことからマウス精子のCS1はCa²⁺オシレーションの開始に重要な働きがあることが考えられる。

(2) クエン酸合成酵素およびCS1によるCa²⁺濃度上昇作用機序の解析

クエン酸合成酵素とCS1のアミノ酸配列の比較をおこなうと配列はほぼ一致しており、さらに酵素活性に必要とされるアミノ酸も同じであることからCS1はクエン酸合成酵素と同様なクエン酸合成活性を持つと推察された。そこで、このCS1によるCa²⁺濃度上昇がクエン酸合成活性によるものであるかを検証するため、クエン酸合成酵素の阻害剤(パルミトイルCoA)によって卵活性化能が減少するか検証した。その結果、パルミトイルCoAでは卵の活性化は抑えられなかった。一方で、クエン酸合成酵素が持つ酵素活性で生成される反応物(クエン酸、オキサロ酢酸、アセチルCoA)をマウス卵に注入することにより卵活性化が起こるか観察した。その結果、これらの反応生成物のいずれでも、十分に卵を活性化することはできなかった。これらの結果から、CS1によるマウス卵の活性化は酵素活性ではなく、マウス卵内の他の分子との結合などの相互作用によって引き起こされている可能性が考えられる。今後はこの仮説に基づいた研究を進めて行く予定である。

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)

[雑誌論文] (計 2件)

①Takuya Wakai, Yuichirou Harada, Kenji Miyado, Tomohiro Kono. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins define organelle positioning and movement during mouse oocyte maturation. Mol. Hum. Reprod. (2014) 20 (11): 1090-1100. 査読有
doi: 10.1093/molehr/gau064

②Tomoyo Ueno, Takehiro Ohgami, Yuichirou Harada, Shuichi Ueno, Yasuhiro Iwao. Egg activation in physiologically polyspermic newt eggs: involvement of IP3 receptor, PLC γ , and microtubules in calcium wave induction. Int. J. Dev. Biol. (2014) 58: 315 - 323. 査読有
doi: 10.1387/ijdb.130333yi

[学会発表] (計 1件)

①原田 裕一郎、岩尾 康広、宮戸 健二
マウス卵の受精におけるクエン酸合成酵素による卵活性化の可能性 日本動物学会第83回大会 2012年09月13日~2012年09月15日 大阪府豊中市大阪大学

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 裕一郎 (Harada Yuichirou)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80570168

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：