

平成30年 5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18547

研究課題名(和文) 受精カルシウム波の伝播を担う新規チャネルの同定とカルシウム波の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidating the physiological significance of the fertilization calcium waves through the identification of novel channels

研究代表者

高山 順 (Takayama, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員

研究者番号：20574114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：受精カルシウム波は動植物界に保存された胚発生を開始させるシグナルである。受精カルシウム波の伝播は一般にIP3受容体によって担われていると考えられているが、線虫*C. elegans*においては、新規のチャネルが関与することが示唆されていた。そこで本研究では線虫の受精カルシウム波伝播を担うチャネルを同定することを目的とした。我々はまず、蛍光カルシウムインジケータであるGCaMP6sを生殖腺特異的に発現するトランスジェニック線虫系統を樹立した。feeding RNAi干渉法により網羅的にチャネルの機能阻害を行い候補遺伝子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：Fertilization calcium waves are a conserved signal that triggers both animal and plant embryonic development. The calcium waves are thought to be propagated by the action of the IP3 receptor calcium channels. However, in the nematode *C. elegans*, involvement of a novel channel is suggested. In this study, we aimed to identify calcium channels that are responsible for the propagation of the calcium waves. We generated a transgenic *C. elegans* strain that expresses the genetically-encoded calcium indicator GCaMP6s in the germline. By using this transgenic strain, we conducted a feeding RNA interference screen. We identified several candidate genes that might be involved in the calcium wave propagation.

研究分野：発生生物学

キーワード：受精カルシウム波 受精 カルシウム波 カルシウムチャネル 線虫

1. 研究開始当初の背景

受精カルシウム波は受精時に卵内に生じる細胞内カルシウム濃度変化の空間的な伝播現象である。受精カルシウム波は動物界・植物界に共通して見られ、胚発生を開始するためのシグナルであると考えられている。

これまで多数の生物種で受精カルシウム波の惹起機構およびカルシウム波の伝播機構が研究されてきた。しかし、そのほとんどが生化学的・薬理的解析手法に限られ、突然変異体やトランスジェニック体を用いた分子遺伝学的解析は乏しかった。そのため分子機構やその生理的意義には未解明の点が多かった。

申請者はそこで、分子遺伝学的解析が容易なモデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* に着目した。線虫は体が無色透明であるため、体内で受精が生じるものの、容易に蛍光顕微鏡観察をすることができる優れた実験動物である。

申請者はこれまでにライブイメージングが可能なスピニングディスク共焦点顕微鏡と蛍光カルシウム指示薬を用いて線虫の受精カルシウム波を観測する実験系を構築してきた。また得られたデータに画像処理法を施すことで、定量的に細胞内カルシウム濃度の時空間的变化を記述する手法を構築した。これらの手法を駆使することにより、線虫の受精カルシウム波は精子侵入直後に生じる局所的で素早い波と、それに引き続いて生じる大域的な遅い波の二相性を示すことがわかった。

申請者はこの観測手法を用いて、これまでの研究から他の生物種では共通して受精カルシウム波の伝播に必要と考えられている IP3 受容体カルシウムチャンネルが、線虫においては必要ないことを示唆する結果を得ていた。このことは新規の受精カルシウム波の伝播機構が存在することを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は受精カルシウム波の伝播を担う、新規なカルシウムチャンネルを同定することである。また、同定したカルシウムチャンネルの分子遺伝学的解析を通して、受精カルシウム波が胚発生にとって持つ生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

線虫のゲノムにはチャンネルをコードする遺伝子が 322 個存在する。これらを候補として個別に RNA 干渉法により機能阻害し、受精カルシウム波を観測する。受精カルシウム波のパターンを、画像処理法により定量化し、受精カルシウム波の伝播に関わるチャンネルを同定する。そのためにはハイスループットな実験系が必要であり、まずはその構築を行った。

(1) 観測系の改善

これまでは合成化合物性の蛍光カルシウム指示薬を線虫の生殖腺に顕微注入することで、指示薬を取り込んだ卵の蛍光観察を行っていた。しかし顕微注入を観測する個体ごとに行わなければならない煩雑であった。そこでタンパク質性のカルシウム指示薬である GCaMP6s の遺伝子を遺伝子導入した組換え線虫系統を構築することを企図した。

GCaMP6s 遺伝子を線虫のコドン出現頻度に最適化し、また人工イントロンを 3 つ挿入した遺伝子を合成した。これを生殖腺特異的に発現させるベクターに組み込み、MosSCI 法により染色体に導入した。

(2) RNA 干渉法

線虫のゲノムにコードされた 322 の遺伝子の RNA 干渉を行うためには、スループットが重要である。そのため種々の RNA 干渉法を比較し、feeding RNA 干渉法がもっとも適していると判断し、プロトコルを樹立した。

(3) 画像処理法

これまでの方法では、蛍光カルシウム指示薬の波長のみの一色の動画像を用いて、輝度値を元に卵母細胞の自動認識を行っていた。しかしこの手法では卵母細胞以外の領域も誤って選択してしまうという問題があった。この問題の解決のため、形質膜を mCherry で蛍光ラベルした線虫株を用い、形質膜をレベルセット法により自動認識 (セグメンテーション) し、定量化を行う画像処理パイプラインを構築した。

4. 研究成果

(1) 改善した観測系の評価

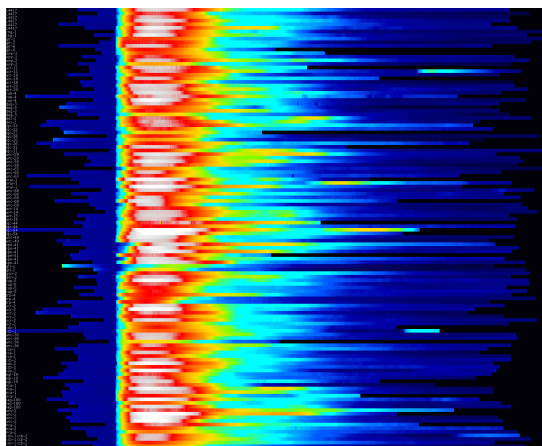
GCaMP6s を遺伝子導入した株において受精カルシウム波を観測したところ、それまで用いていた合成化合物性蛍光カルシウム指示薬 Calcium Green-1 dextran による観測と同様の二相性の波が生じた。しかし、応答時のカルシウム蛍光変化で比較すると、13 倍明るかった。また、蛍光色素の特性から長波長側への蛍光の漏出が少なかったため、2 色イメージングが可能であることがわかった。さらに GCaMP6s トランスジェニック線虫と野生型 N2 で産卵数に有意な差は見られなかった。また、合成化合物性蛍光カルシウム指示薬を用いて観察されていた *trp-3* 変異体における局所的で素早い波の欠失 (Takayama and Onami, 2016) が、GCaMP6s を用いた観察でも確認された。

これらの結果から本研究で樹立した GCaMP6s 発現系統は顕微注入の手間が省略できるだけでなく、蛍光強度の観点からも優れた実験系であることが示唆された。

(2) RNA 干渉スクリーニング

上記の GCaMP6s 株を用いて、遺伝子ファミリーおよび生殖腺での発現で選抜した 53 のチャンネルについて RNAi を行い、受精カルシ

ウム波を観察・定量した(下図)。その結果、*unc-68*, *gtl-1*, *nmr-2*遺伝子をノックダウンした線虫個体においてカルシウム波のパターンに異常が見られることがわかった。



図：受精カルシウム波に關与するチャネル遺伝子の RNA 干渉スクリーン結果の可視化。各行は RNA 干渉した各個体の観察結果を、横軸は時間を表す。色は卵母細胞全体の蛍光カルシウム強度比を擬似色で示したものである。

(3) 候補遺伝子の機能解析

(3a): *unc-68*

unc-68 遺伝子は線虫で唯一のリアノジン受容体をコードする。*unc-68(kh30)*変異体において減弱したカルシウム波が観察された。しかし発現・局在解析からは卵母細胞における発現が観察されなかった。このことから *unc-68* を機能阻害したことの間接的な影響により受精カルシウム波が減弱したのかもしれないと考えられた。

(3b): *gtl-1*

gtl-1 遺伝子は TRPM チャネルをコードする。*gtl-1(RNAi)* 個体においては極端に減弱したカルシウム応答が観察されたが、一方で、受精前の卵母細胞において、カルシウム蛍光が昂進していることも観察された。カルシウム透過性チャネルの機能阻害を行うと、細胞内カルシウム濃度の低下が予想されるが、予想に反した結果となったため、詳しく解析した。TRPM チャネルはカルシウムと共にマグネシウムも透過しうるチャネルである。また細胞内マグネシウムはカルシウムポンプ機能に必要であると考えられる。そこで *gtl-1* 機能阻害により細胞内マグネシウムが低下し、これが細胞内カルシウム濃度の昂進を引き起こしたのではないかと考えた。この仮説を検証するため、*gtl-1(RNAi)* 個体を高マグネシウム濃度培地で飼育した結果、カルシウム蛍光強度の昂進が見られなくなった。また、カルシウムポンプをコードする *sca-1* 遺伝子を機能阻害すると、*gtl-1(RNAi)* 個体と同等かそれ以上のカルシウム蛍光強度の昂進が見られた。

以上をまとめて、本研究により高効率に受精カルシウム波を観察・定量化する系の構築に成功し、この系を用いて、複数の候補遺伝子の同定に成功した。

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)

1 Jun Takayama, Masashi Fujita, Shuichi Onami,
In vivo live imaging of calcium waves and other cellular processes during fertilization in *Caenorhabditis elegans*, Bio-protocol, 査読有, Vol. 7, No. 7, e2205 (2017), DOI:10.21769/BioProtoc.2205

2 Jun Takayama, Shuichi Onami,
The sperm TRP-3 channel mediates the onset of a Ca^{2+} wave in the fertilized *C. elegans* oocyte, Cell Reports, 査読有, Vol. 15, p. 625-637 (2016), DOI:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.040

[学会発表](計8件)

1 Takayama J, Okada H, Onami S.,
The sperm-derived TRP family channel TRP-3 induces a calcium rise in the fertilized oocyte in *C. elegans*, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, Oral & Poster, San Francisco, USA, Dec 2016.

2 高山順, 大浪修一
線虫の精子 TRP-3 チャネルは「受精のタイムキーパー」である, 第 39 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 横浜, 2016 年 12 月.

3 高山順, 大浪修一
C. elegans の受精における二相性カルシウム波の分子基盤. 第 54 回日本生物物理学会年会, ポスター発表, つくば, 2016 年 11 月.

4 高山順, 大浪修一.
線虫 *C. elegans* において精子 TRP-3 チャネルが受精卵のカルシウム波を引き起こす. 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016, 口頭・ポスター発表, 三島, 2016 年 10 月.

5 Takayama J, Onami S.
The sperm TRP family channel TRP-3 induces a calcium wave in the fertilized oocyte of *C. elegans*, The Allied Genetics Conference 2016, Oral, Orlando, USA, Jul 2016.

6 Takayama J, Onami S.
Sperm TRP-3 channel mediates the timely onset of the fertilization calcium wave in

the nematode *C. elegans*, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2015, Oral & Poster, San Diego, USA, Dec 2015.

⁷ 高山順, 大浪修一.

線虫 *C. elegans* において精子 TRP-3 チャネルが受精卵内にカルシウム波を誘導する.
第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 口頭・ポスター発表, 神戸, 2015 年 12 月.

⁸ Takayama J, Onami S.

A sperm-derived ion channel TRP-3 induces a Ca²⁺ wave in the fertilized *C. elegans* oocyte, 20th International C. elegans Meeting, Poster, Los Angeles, USA, Jun 2015.

〔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

¹ 理化学研究所, 精子が卵子を活性化する新しい仕組みを解明 - 線虫において精子導管仮説を支持する分子実体を同定 -

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160408_1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 順 (TAKAYAMA, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所

革新知能統合研究センター・研究員

研究者番号 : 20574114

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()