

機関番号 : 32701

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21780253

研究課題名 (和文) 受精時のカルシウム放出に必要なイノシトール 3 リン酸受容体の局在に関する研究

研究課題名 (英文) Localization of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type1 (IP₃R1), the channel responsible for Ca²⁺ release and oscillations during fertilization in mammals

研究代表者

伊藤 潤哉 (ITO JUNYA)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号 : 30454143

研究成果の概要 (和文) :

哺乳類の受精時には Ca²⁺ オシレーションが誘起され、その結果卵は活性化され減数分裂を再開する。現在までに我々は、マウス卵を用いてイノシトール 3 リン酸受容体タイプ 1 (IP₃R1) が減数分裂の進行に伴いリン酸化されること、卵活性化後に急激に脱リン酸化されることを明らかにした (Lee et al., 2006 Development; Ito et al., 2008 Dev. Biol.)。しかし他動物種、特に卵細胞質内精子注入を行った際、卵活性化の誘起が困難なブタにおける Ca²⁺ オシレーション誘起に関する機構は全く明らかにされていない。はじめに卵の減数分裂時に起こる IP₃R1 の動態に関して、ブタ卵を用いて検討を行った。その結果、ブタ卵のリン酸化 IP₃R1 量は培養開始 24 時間後に急激に増加し、36 時間後には最大値に到達した。また、この時期には p34^{cdc2} kinase および mitogen-activated protein kinase 活性の上昇も認められた。一方成熟卵を MAPK 抑制剤 U0126 で処理しても、リン酸化 IP₃R1 量は変化しなかったが、p34^{cdc2} kinase 抑制剤 roscovitine で処理するとリン酸化 IP₃R1 量は著しく減少した。以上のことから、ブタ卵においても IP₃R1 のリン酸化が起こることが明らかにされた。またそのリン酸化には p34^{cdc2} kinase 活性が関与している可能性が示唆された。

さらに、ブタ卵を体外で成熟培養を行い、培養 0 時間、11 時間、22 時間、33 時間および 44 時間でそれぞれ卵を回収し、免疫蛍光染色に供した。その結果、培養 0 時間の卵では細胞質全体に不均一な IP₃R1 の発現が認められ、減数分裂の進行に伴って細胞質に均一な IP₃R1 の分布が認められるようになった。さらに培養 44 時間の卵では、細胞膜にクラスター様の IP₃R1 の蓄積が認められた。体内由来の MII 卵においても、同様の傾向が認められた。以上のことから、ブタ卵において卵の成熟(減数分裂の進行)にともなって IP₃R1 の局在は変化することが明らかとなった。また各 kinase 抑制剤処理により IP₃R1 の局在は変化したことから、IP₃R1 の局在は kinase により制御されていると考えられた。

研究成果の概要 (英文) :

In mammals, a sperm-induced intracellular Ca²⁺ signal ([Ca²⁺]_i) mediates both exit of meiosis and oocyte activation during fertilization. Recently, it was demonstrated in mouse oocytes that the phosphorylation levels of inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type1 (IP₃R1), the channel responsible for Ca²⁺ release and oscillations during fertilization, changed during maturation and fertilization (Ito *et al.*,

2008, Dev. Biol). However, kinetics of IP₃R1 is not well understood in other species, especially domestic species which have low developmental ability of oocytes when intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) are applied. Therefore, we examined the expression, phosphorylation and localization of IP₃R1 during *in vitro* maturation of pig oocytes. Here, our present study shows that expression of IP₃R1 protein did not change during maturation, although the phosphorylation status of the receptor was dramatically upregulated beyond germinal vesicle breakdown (GVBD). At the GV stage, IP₃R1 was observed throughout the cytoplasm. Following oocyte maturation, concentration of IP₃R1 protein at the cortex of the oocyte was confirmed. In matured oocytes, large clusters of IP₃R1 were formed in the cortex of the oocyte except in a ring-shaped band of cortex adjacent to the spindle. Taken together, our results show that IP₃R1 undergoes dynamic phosphorylation and localization during maturation and this might underlie the generation of oscillations at fertilization. Our findings will contribute to improve the efficiency of ICSI and SCNT in domestic species.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生殖生物学・発生工学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：卵，受精，イノシトール3リン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

ほとんどすべての動物種において、受精時には卵内のCa²⁺イオンの上昇が起こり、特に哺乳動物ではCa²⁺の反復上昇(Ca²⁺オシレーション)が誘起される(図1)。受精により精子が卵内に侵入すると、精子内の卵活性化因子(Sperm Factor; SF)が卵細胞質内に放出される。SFはphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate(PIP₂)の加水分解を介しinositol 1,4,5-triphosphate(IP₃)を生産し、IP₃は小胞体(ER)上に存在するイノシトール3リン酸受容体タイプ1(IP₃R1)に結合して細胞内にCa²⁺を放出させる。放出されたCa²⁺は別のIP₃R1を刺激し、結果としてCa²⁺オシレーションが誘起される。このCa²⁺オシレーションにより、第二減数分裂中期で停止していた卵は減数分裂を再開し、体細胞分裂へ移行していくと考えられており、これら一連の機構は「卵の活性化」と呼ばれている。近年このCa²⁺

振動は卵の活性化に必要なだけでなく、「母性 mRNA の分解」や「胚性遺伝子の発現」といった、哺乳類の初期胚発生に必要な現象にも関与していることが報告されている。一方、実験動物および家畜において円形精子細胞を用いた顕微授精や体細胞核移植によるクローン作製時に、作製したそれらの胚を発生させるためには、上述の受精機構を模倣した人為的活性化処理を行う必要がある。現在、家畜卵の活性化には様々な方法が用いられているが、個体への発生率は通常受精時に比べて著しく低く、さらに体細胞クローンに関しては死産、流産あるいは過大児といった**発生過程における異常**が報告されている。このことから、家畜において顕微授精や体細胞核移植により効率的に産仔を作出するためには、自然の受精時に近い人為的活性化法を確立する必要があり、そのためにはCa²⁺オシレーションの制御機構を明かにする必要がある。現在

までにCa²⁺オシレーション制御機構について、卵細胞質内へのCa²⁺放出を制御するIP₃R1は未成熟卵(GV卵)で既に発現しており、その発現量は減数分裂期を通して変化しないこと、しかしGV卵に精子を注入してもCa²⁺オシレーションは誘起されないこと等が明らかにされてきた。これらのことから、卵は減数分裂過程においてCa²⁺オシレーション誘起能を獲得していると考えられているが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

現在、多くの哺乳類において体細胞クローン、トランスジェニック動物等が作製可能であるが、家畜において顕微操作を行った場合、産仔への発生率は極めて低い。その原因の一つとして、顕微操作した胚の発生には、受精時の現象(卵内Ca²⁺オシレーション)を模倣とした人為的処置が必要になるが、現在の処置では一過性のCa²⁺上昇しか誘起されず、受精時の現象を模倣していないことがあげられる。さらに哺乳類の受精時にのみ認められるCa²⁺オシレーションという現象が、哺乳類の発生にどのような役割を果たしているのかほとんど明らかになっていないこともあげられる。本研究では、受精メカニズムの解明を目的とし、受精時に卵細胞質内へとCa²⁺を放出するIP₃R1に焦点をあて、特にIP₃R1の局在を制御する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

はじめに、ブタ卵における総IP₃R1量およびリン酸化IP₃R1量の検出を行った。また、卵内におけるIP₃R1の局在について報告されているのはマウスのみであることから、特に卵活性化率(Ca²⁺オシレーション誘起率)が低いブタ卵を用いる。ブタ未成熟卵を体外成熟培養し、培養各時間でサンプルを回収して免疫蛍光染色を行い、その局在の変化を経時的に観察する。免疫蛍光染色には、IP₃R1特異的抗体であるCT-1抗体(Wojcikiewicz博士より分与)を用いる。また代表者らが現在までに行ってきたMPM-2抗体やRbt03抗体(Parys博士より分与)を用いることにより、リン酸化IP₃R1、総IP₃R1のwestern blottingによる検出も行い、マウス卵とブタ卵とで局在・発現量の変化に違いがあるかどうかを検討する。

4. 研究成果

実験結果から、ブタ卵においてIP₃R1は卵の減数分裂過程を通じて、常に同程度発現していること、しかしリン酸化IP₃R1量は卵成熟に伴って著しく増加し、卵活性化後急激に減少することが明らかにされた。そこで、IP₃Rの局在についてマウスおよびブタ卵を用いて検討した。初めにブタ卵におけるIP₃Rの局在を檢

出する目的で2種類の抗IP₃R1抗体(Rbt03およびCT-1)のどちらが至適であるかについて、免疫蛍光染色を行い検討した。その結果、CT-1を用いた免疫染色のほうが、ブタ卵のIP₃R1の検出に至適であることが明らかとなった。

そこで、CT-1抗体を用いて、ブタ卵を体外で成熟培養を行い、培養0時間(Germinal Vesicle, GV期)、11時間、22時間(GVBD)、33時間(MI期)および44時間(MII期)でそれぞれ卵を回収し、免疫蛍光染色に供した。その結果、GV期の卵では細胞質全体に不均一なIP₃R1の発現が認められ、減数分裂の進行に伴って細胞質に均一なIP₃R1の分布が認められるようになった。さらにMII期卵では、細胞膜にクラスター様のIP₃R1の蓄積が認められた。体内由来のMII卵においても、同様の傾向が認められた。一方、マウス卵においては、GV期で核付近に存在していたIP₃R1が減数分裂の進行に伴って、卵細胞質全体に均一に局在し、MII期の卵においては細胞膜付近にクラスター様のIP₃R1の蓄積が認められた。

以上のことから、マウス・ブタ卵の両方において卵の成熟(減数分裂の進行)にともなってIP₃Rの局在は変化することが明らかとなった。また各kinase抑制剤処理によりIP₃Rの局在は変化したことから、IP₃Rの局在はkinaseにより制御されていると考えられた。

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10件)

Nakai M, Ito J, *et al.* Pre-Treatment of sperm reduces success of intracytoplasmic sperm injection in the pig. *Reproduction*, (accepted), 査読有

Nakai M, Kashiwazaki N, Ito J, *et al.* Factors affecting fertilization and embryonic development during intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Journal of Reproduction and Development*, (accepted), 査読有

Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, *et al.* Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. *Journal*

of Reproduction and Development, 56;
169-175, (2010), 査読有

Ito J, et al. Phosphorylation of inositol
1,4,5-triphosphate receptor 1 during in vitro
maturation of porcine oocytes. Animal Science
Journal, 81; 34-41, (2010), 査読有

Ito J, et al. Possible involvement of
phosphatidylinositol 3-kinase in the
maintenance of metaphase II arrest in porcine
oocytes matured in vitro. Animal Science
Journal, 81; 42-47 (2010), 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

伊藤 潤哉, 他、実験動物における卵の超低
温保存、第 28 回日本受精着床学会総会・学
術講演会、(2010)

〔図書〕(計 1 件)

伊藤 潤哉, 他、養賢堂、動物応用科学の展
開、2011、p13-18

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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◇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

伊藤 潤哉 (ITO JUNYA)
麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：30454143

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：