



2019年3月19日

理化学研究所
慶應義塾大学医学部

受精卵の活性化を促すカルシウム振動を維持する新しい仕組みを解明

理化学研究所脳神経科学研究センター発生神経生物研究チームの松浦徹研究員（現在、関西医科大学医学部実験病理学講座講師）と理化学研究所脳神経科学研究センター発生神経生物研究チーム、チームリーダー 兼 慶應義塾大学医学部薬理学教室客員教授の御子柴克彦の研究チームは、マウスの受精の際に受精卵内で放出されたカルシウムイオンが、ポジティブフィードバックにより、さらにカルシウムイオンを放出させることで、数時間もの間カルシウムイオン濃度の振動（カルシウム振動）を維持する新しい仕組みが存在することを明らかにしました。

ヒトを含むほとんどの哺乳動物種において、排卵された卵子は減数第二分裂中期で減数分裂を停止しているが、精子との受精により活性化し、発生を開始します。この卵子の活性化を引き起こすのが、カルシウム振動です。

受精によって卵の中のカルシウムイオン濃度は上昇・下降を繰り返し、これによって卵子の表層顆粒の放出、細胞分裂抑制因子の不活性化、第二極体放出、そして前核形成という卵活性化が引き起こされていきます。カルシウム振動は数時間にわたって維持され、カルシウム振動の持続時間と胚の発生には関係があることが知られており、カルシウム振動を維持することは胚の正常な発生に重要です。

研究チームは、まず卵内のカルシウムイオン濃度を上昇させる物質であるイノシトール3リン酸（ IP_3 ）とカルシウムイオンを可視化するための遺伝子導入可能な新しいセンサーを開発しました。

新しい IP_3 センサーはこれまでのものと比較して10倍の感度を持ち、受精卵内の微小な IP_3 濃度変化を世界で初めて捉えることに成功しました。またこの IP_3 センサーと共に用いることのできるカルシウムセンサーも開発しています。

研究チームはこれらのセンサーを用いて受精卵内の IP_3 とカルシウムイオン濃度変化の測定を行い、カルシウムイオン濃度上昇によって IP_3 を産生するホスホリパーゼC酵素が活性化し、さらに IP_3 の産生を起こすことを明らかにしました。つまり、このカルシウム—ホスホリパーゼC— IP_3 によるポジティブフィードバックによって、受精後の卵内に IP_3 が蓄積し、長時間のカルシウム振動を維持し、正常な胚の発生を促すことが分かりました（図1）。

本研究結果は2019年3月18日（月）（英国時間）に、英科学誌「Scientific Reports」（オンライン版）に掲載されました。

ポイント

- ・受精卵内のカルシウムイオン濃度をコントロールするイノシトール 3 リン酸 (IP_3) とカルシウムイオンに対する新しい遺伝子導入型センサーを開発。
- ・受精卵の IP_3 によりカルシウムイオン濃度が上昇し、それによってさらに IP_3 が産生されるポジティブフィードバックによって、受精卵内の周期的なカルシウムイオン濃度上昇（カルシウム振動）が数時間維持され、胚の正常な発生を促す。

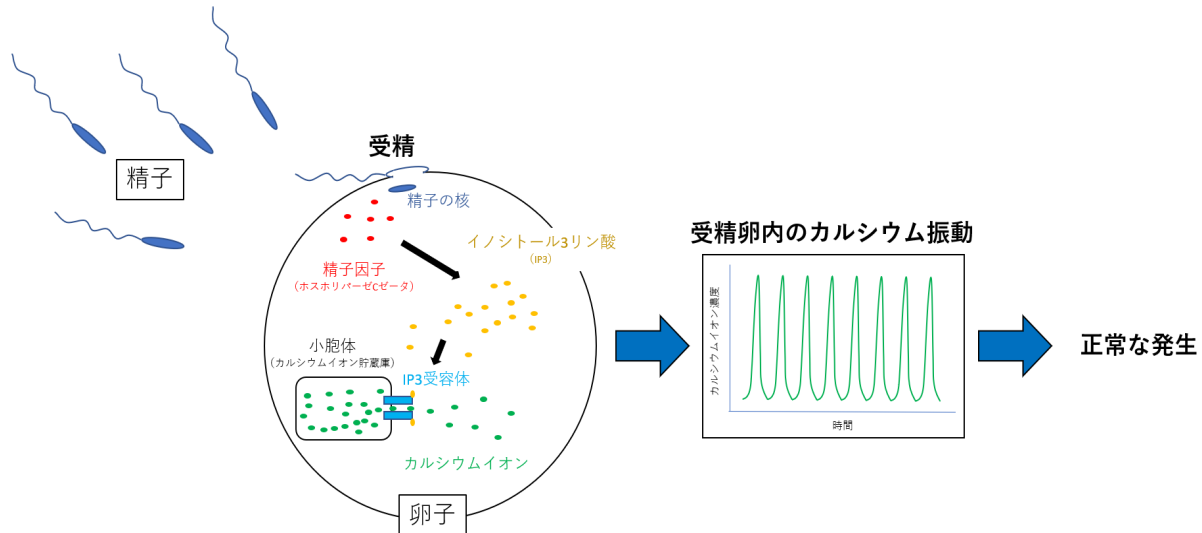


図 1. 受精によるカルシウム振動の誘発。精子と卵子が受精により融合すると、精子からは父親からの遺伝子を運ぶ精子の核に加えて、精子因子としてホスホリパーゼ C ゼータが、卵子の中に侵入する。ホスホリパーゼ C ゼータはイノシトール 3 リン酸 (IP_3) を産生し、 IP_3 受容体に作用する。 IP_3 受容体は卵内のカルシウムイオン貯蔵庫である小胞体から、カルシウムイオンを放出する。この一連の反応により、受精卵内では数時間にわたって、カルシウムイオン濃度が上昇下降を繰り返すカルシウム振動が起こり、卵子の活性化、正常な胚の発生を促す。

【背景】

カルシウムは、私たちの骨格を構成する主要元素であるとともに、細胞内において情報を伝達する物質として重要な働きをしています。細胞内には極微量のカルシウムイオンしかなく、カルシウムイオン濃度は通常、細胞外の 10,000 分の 1 程度に保たれています。しかしながら、細胞外から刺激が加わると、細胞中にある小胞体に蓄積されていたカルシウムイオンが放出され、細胞内のカルシウムイオン濃度は 1,000~10,000 倍にも増加します。

細胞外から刺激を受け取った細胞を詳しく観察すると、刺激に伴い細胞内のカルシウムイオン濃度が急激に上昇した後、緩やかに元の濃度に戻るスパイク状の時間変化（カルシウムスパイク）を引き起こします。また多くの細胞では、このカルシウムイオン濃度の変化が周期的に繰り返し引き起こされる現象が見られます。これらの現象は、カルシウム振動と呼ばれ、生命現象の始まりである受精後の卵子の活性化を引き起こすとともに、神経活動、ホルモンや消化酵素の放出や、免疫、遺伝子発現など広範な生理機能に関わっていると考えられています。

卵子が受精すると精子から卵子の中に精子の中にだけ存在する精子因子である酵素ホスホリパーゼ C ゼータが侵入し、イノシトール 3 リン酸 (IP_3) を産生します。この IP_3 が小胞体の表面に存在し、 Ca^{2+} の放出を調整するカルシウムチャネルである IP_3 受容体に作用（結合）することにより、受精卵内のカルシウムイオン濃度の振動を引き起こすことが提唱されており、これを精子因子仮説と

います。卵子は減数第二分裂中期で減数分裂を停止していますが、精子との受精により活性化し、発生を開始します。

受精卵内のカルシウムイオン濃度は上昇と下降を繰り返すカルシウム振動を起こします。カルシウム振動の仕組みとして2つの仮説が立てられています。①カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こす IP_3 の濃度が周期的に変化することによって、カルシウム振動が引き起こされるという仮説。② IP_3 受容体の活性がカルシウムイオン濃度変化によっても制御されることから、周期的な IP_3 のスパイクがなくとも IP_3 受容体がカルシウム振動を作り出すことができるという仮説です。研究チームは2006年に遺伝子導入型の蛍光 IP_3 センサー、IRIS-1を開発し、それを用いた観察により、体細胞では2番目の仮説である、周期的な IP_3 のスパイクがなくとも IP_3 受容体がカルシウム振動を作り出すことができることを示すことができましたが (Matsu-ura et al. J CELL BIOL. 2006)、受精卵でのカルシウム振動の仕組みは明らかになっていませんでした。また体細胞でのカルシウム振動と比べて、受精卵でのカルシウム振動は長く続きますが、どのような仕組みで数時間もの間カルシウム振動が維持されるのかは明らかになっていませんでした。

【研究手法と成果】

(1) 新しい IP_3 センサーとカルシウムセンサーの開発

受精卵内の IP_3 濃度を測定しようという試みはこれまでにもなされていましたが、十分な感度がなく、明確な結果が得られていませんでした。研究チームは2006年に遺伝子導入型の蛍光 IP_3 センサー、IRIS-1を開発していましたが、これを今回改良した IRIS-2.3 では、最大変化量を2倍、感度を10倍に増大させることに成功しました。IRIS-2.3は IP_3 を感知することで、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と赤色蛍光色素 (HaloTag TMR) との間の蛍光エネルギー移動 (FRET) の効率の変化が起こり、発する光の色が変化する仕組みになっています (図 2a)。また研究チームでは IRIS-2.3 と一緒に用いることのできる青色カルシウムセンサーDYC3.60の開発も行いました。DYC3.60はカルシウムイオンを感知することで、青色蛍光タンパク質 (ECFP) の発する光を蛍光のクエンチャー (cp173V-Y145W) が消光することで、発する光の強さが変化する仕組みになっています (図 2b)。

これらの新しい蛍光センサーを用いることにより世界で初めてマウスの受精卵で起こる IP_3 とカルシウムイオン濃度の変化を同時に、そして長時間にわたって観察することが可能となりました。

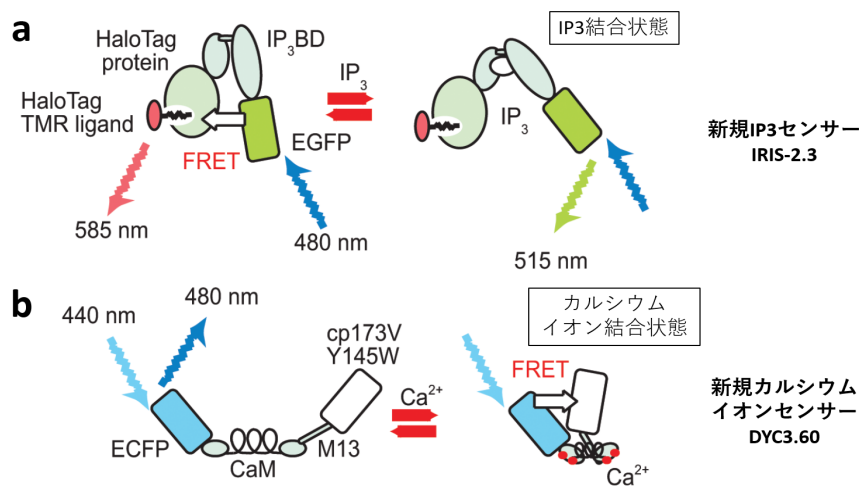


図 2. 遺伝子導入可能な新規 IP_3 センサーと新規カルシウムイオンセンサーの開発。(a) IP_3 センサーは、受精卵内の IP_3 濃度が上がると、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) から赤色蛍光色素 (HaloTag TMR) への蛍光エネルギー移動 (FRET) 効率が下がり、赤い光の強度が弱くなる。(b) カルシウムイオンセンサーはカルシウムイオンと結合すると、青色蛍光タンパク質 (ECFP) から蛍光のクエンチャー (cp173V Y145W) への蛍光エネルギー移動 (FRET) 効率が上がり、青い光の強度が弱くなる。

(2) 受精直後の IP_3 濃度変化

精子因子仮説では、卵子が精子と出会うと精子から精子因子としてホスホリパーゼCゼータが侵入し、卵子内で IP_3 を産生、さらに IP_3 受容体からのカルシウムイオン放出を引き起こし、カルシウム振動が始まると推定されています。研究チームが新しい IP_3 センサー、IRIS-2.3 による観察を行ったところ、平均で 2.7 分カルシウムイオン濃度の上昇に先立って IP_3 濃度上昇が起こることが確認されました（図 3a）。

研究チームによるこの成果は精子因子仮説を証明するための最後の欠けていたパーツを補うものであり、精子因子仮説の正しさを示すことができました。またカルシウムイオン濃度の上昇によりホスホリパーゼCゼータを含むホスホリパーゼC酵素群が活性化し、さらなる IP_3 産生が促進される現象も観察されました（図 3a、c）。

(3) 受精後のカルシウム振動の仕組み

一度上昇した IP_3 濃度は、カルシウム振動中一定の濃度以上に保たれます（図 3b）。またカルシウム振動でカルシウムスパイクが起こると、それに遅れて IP_3 濃度が小さく上昇下降を繰り返す様子も観察されました（図 3b）。最初にカルシウム振動を引き起こすときには IP_3 濃度上昇が先になりますが、その後は常に IP_3 濃度変化はカルシウムイオン濃度変化を追いかける形で推移することから、カルシウム振動の維持には IP_3 濃度が一定以上に保たれることが重要と考えられます。このことから受精卵内で観察されるカルシウム振動も、体細胞のカルシウム振動と同じく、周期的な IP_3 のスパイクがなくとも IP_3 受容体がカルシウム振動を作り出すことができるということが分かりました。加えてカルシウムスパイクが起こるごとにカルシウムイオン濃度の上昇によりホスホリパーゼCが活性化し、さらなる IP_3 産生が促進されることから、カルシウム—ホスホリパーゼC— IP_3 によるポジティブフィードバックによって、受精後の卵内に IP_3 が蓄積することが、長時間のカルシウム振動を維持することに繋がっていることが示唆されました（図 3c）。受精後のカルシウム振動の持続時間と胚の発生には密接なつながりがあることが分かっており、今回発見したカルシウム振動を持続させる仕組みは、胚の正常な発生に大きく貢献していると考えられます。

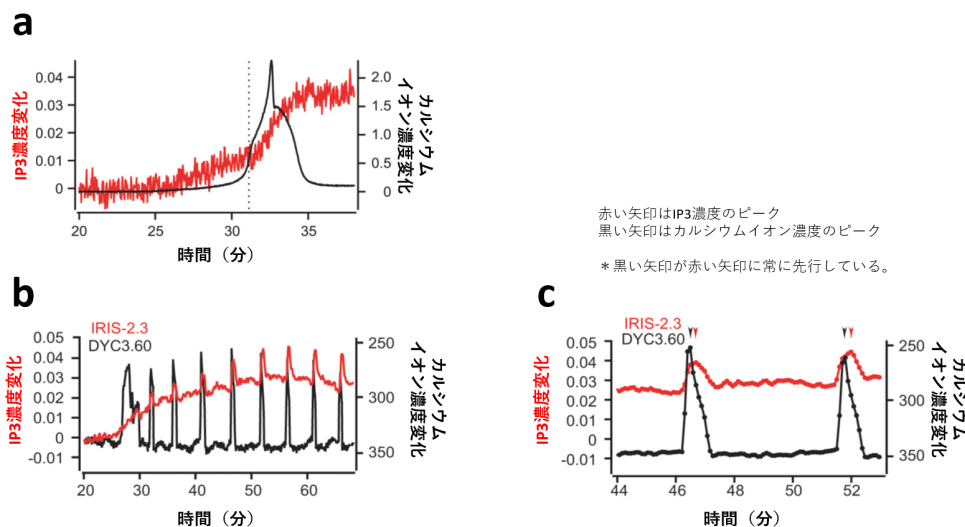


図 3. 受精卵での IP_3 とカルシウムイオンの変化。(a)受精直後に先に IP_3 濃度が上昇し、それによってカルシウムイオン濃度が上昇する。点線以降（カルシウムイオン濃度上昇以降） IP_3 濃度上昇速度が速まる。(b)カルシウム振動中は IP_3 濃度が高いまま維持される。またカルシウム振動スパイクごとに微小な IP_3 濃度上昇下降が観察される。(c)微小な IP_3 濃度変化はカルシウムイオン濃度の変化を追いかけるように起こる。これらはカルシウムイオン濃度上昇によって IP_3 を産生する酵素ホスホリパーゼCの活性が変化するためであることが示唆された。

【今後の期待】

今回開発した感度の高い IP₃ センサー、IRIS-2.3 により、世界で初めて受精卵内の IP₃ 濃度変化を観察することができました。このことから、今回の受精卵のように、ヒトの体の中ではこれまで考えられていたよりも低い濃度で IP₃ 濃度変化が起こり、それによりカルシウムイオン濃度変化が誘発されていることが示唆されました。カルシウムイオン濃度変化はさまざまな細胞の機能発現に重要な役割を担っており、IRIS-2.3 を用いた観察により、これまでわからなかったカルシウムイオン濃度の制御の仕組みを神経細胞等の他の重要な細胞でも解き明かしていくことが期待されます。

また研究チームが開発した DY3.60 は IRIS-2.3 と同時に遺伝子導入することにより、細胞や生物個体内での長時間の観察を行うことのできる技術として活用されていくことが期待できます。

論文情報

タイトル : Dual-FRET imaging of IP₃ and Ca²⁺ revealed Ca²⁺-induced IP₃ production maintains long lasting Ca²⁺ oscillations in fertilized mouse eggs

著者名 : 松浦徹¹, 白川英樹², 鈴木健一³, 宮本章歳⁴, 杉浦琴美⁵, 道川貴章⁶, 楠見明弘⁷, 御子柴克彦^{1,8,9} (¹理化学研究所脳神経科学研究センター, ²電気通信大学, ³岐阜大学, ⁴京都大学, ⁵東京大学医科学研究所, ⁶理化学研究所光量子工学研究センター, ⁷沖縄科学技術大学院大学, ⁸慶應義塾大学医学部, ⁹上海科技大学)

雑誌名 : Scientific Reports (オンライン版)

(お問い合わせ先)

<研究内容について>

理化学研究所脳神経科学研究センター発生神経生物研究チーム、チームリーダー

慶應義塾大学医学部薬理学教室 客員教授

御子柴 克彦 (みこしば かつひこ)

TEL : 048-467-9745; FAX : 048-467-9744 E-mail : mikosiba@brain.riken.jp

<報道について>

理化学研究所 広報室 報道担当

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

TEL : 048-467-9272; FAX : 048-462-4715 E-mail : ex-press@riken.jp

慶應義塾大学信濃町キャンパス 総務課

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

TEL : 03-5363-3611; FAX : 03-5363-3612 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp