

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 イトマキヒトデ卵におけるカルシウムシグナル伝達機構の解析

指導教官 御子柴 克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 岩崎 広英

(背景)

一般に、卵巣内に存在する未成熟卵に精子を添加しても受精は成立しない。未成熟卵が受精能を獲得する過程を卵成熟と呼ぶ。成熟した卵に精子を添加すると受精膜を形成して多精を回避すると共に卵の賦活化を引き起こし、卵割を開始するようになる。こうした受精時における受精膜形成および卵賦活化には卵細胞内における細胞内カルシウムイオン濃度の動的な変化が必須であることが知られている。

これまでほとんどの動物種では卵成熟を引き起こすホルモンは分子的に同定されておらず卵成熟の分子機構の解析は立ち遅れているが、棘皮動物に属するイトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*) は、卵成熟を誘起するホルモンが同定され、その構造が既に明らかにされている数少ない動物種の一つであり、卵成熟過程から受精、初期発生過程を連続的に顕微鏡下で観察できるという利点を持っている。

卵細胞内のカルシウムイオン濃度は平常時においては低く保たれており、受精などの刺激に応じて形質膜上のカルシウムチャネルを介した細胞外から流入するか、或いはイノシトール 1,4,5-トリスリン酸 (以下  $IP_3$ ) 受容体またはリアノジン受容体を介した細胞内カルシウムストアからカルシウムイオンが放出されることにより細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇する。受精時における細胞質へのカルシウムイオンの動員機構は動物種により大きく異なることが知られているが、イトマキヒトデ卵ではこれまで明らかにされていなかった。また、イトマキヒトデをはじめとする海産無脊椎動物は受精時における細胞内カルシウム動態の研究に広く用いられてきたにも関わらず、細胞内カルシウム動態に

関わる分子の分子的实际体はこれまでにいかなる知見も得られていなかった。

また、イトマキヒトデ卵では卵成熟過程において卵の  $IP_3$  に対する感受性が著しく亢進することが明らかとなっている。未成熟卵に精子を添加しても受精膜の形成や卵賦活化が起こらないことや細胞内カルシウムイオン濃度の動的な変化が受精膜形成や卵賦活化に必須であることから、卵成熟過程における  $IP_3$  感受性の増大はこれらの現象と密接に関わっている事が期待されるが、これまで  $IP_3$  感受性の増大の分子的なメカニズムは未だ解明されていない。

#### (目的)

本研究では、卵成熟および受精過程における  $IP_3$  受容体の役割について解析することを目的とした。

#### (方法)

まず卵成熟および受精過程における  $IP_3$  受容体の役割について明らかにするために、新規  $IP_3$  受容体阻害剤として最近開発された  $IP_3$  sponge を用いた。 $IP_3$  sponge は  $IP_3$  受容体の ligand binding domain (224~604; マウスタイプ 1  $IP_3$  受容体) を glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として大腸菌に大量発現させたものであり、このタンパク質は野生型のマウスタイプ 1  $IP_3$  受容体と比較して約 500~1000 倍もの  $IP_3$  結合能を有する。従って  $IP_3$  sponge を細胞に導入すると産生された  $IP_3$  は  $IP_3$  sponge に吸収されるため、内在性の  $IP_3$  受容体への  $IP_3$  の結合が拮抗的に阻害され、 $IP_3$ -induced calcium release が阻害される。さらに、 $IP_3$  sponge の配列に点突然変異を導入することにより  $IP_3$  結合活性が低い突然変異体 GST-m30 が得られており、GST-m30 や GST をコントロールに用いることにより、 $IP_3$  sponge の効果をより適正に評価することが可能である。

本研究では  $IP_3$  sponge をイトマキヒトデ卵に注入し、卵成熟および受精に対する影響について解析した。次に、卵成熟および受精過程における  $IP_3$  受容体に関するより詳細な解析を可能なものとするためにイトマキヒトデ卵巣より RT-PCR 法を用いてイトマキヒトデ  $IP_3$  受容体のクローン化を行い、塩基配列を決定した。さらに、イトマキヒトデ  $IP_3$  受容体の塩基配列の情報を元に抗体を作製してウエスタンブロッティングを行い、卵成熟過程における発現量の変化について解析した。さらに、卵成熟過程における  $IP_3$  受容体の卵内での局在の変化を、免疫組織化学染色により明らかにした。

#### (結果と考察)

## 1. 卵成熟・受精に対する IP<sub>3</sub> sponge の効果について

イトマキヒトデ卵にガラス針を用いて IP<sub>3</sub> sponge を注入し、卵成熟ホルモンや精子を添加することにより卵成熟・受精に対する影響について調べた。その結果、卵成熟誘起への影響に関しては、GST や GST-m30 の場合と同様に、IP<sub>3</sub> sponge を注入した卵においても正常に卵成熟が誘起された。これに対し受精においては、コントロールとなるタンパク質を注入された卵では正常に受精膜が形成されたが、IP<sub>3</sub> sponge を注入した卵では受精膜の形成が阻害された。コントロールの卵は受精後正常に卵割を行ったが、IP<sub>3</sub> sponge により受精膜形成が阻害された卵では卵割は起こらず、卵は死滅した。このことから、IP<sub>3</sub> sponge を注入した卵では卵賦活化も阻害されていることが明らかになった。

これらの効果が確かに IP<sub>3</sub> sponge によって IP<sub>3</sub>-induced calcium release が阻害されたためであることを確認するためにカルシウム感受性蛍光色素 fura-2 dextran を用いて受精時の卵におけるカルシウムイオン濃度の変化を調べた。その結果 IP<sub>3</sub> sponge を注入した卵では受精時のカルシウムイオン濃度の上昇が阻害されていた。さらに、IP<sub>3</sub> sponge を注入した卵に高濃度の IP<sub>3</sub> sponge を注入すると IP<sub>3</sub> sponge の効果が相殺されることが明らかになった。

これらの結果からイトマキヒトデ卵において IP<sub>3</sub> 受容体は受精時のカルシウムイオン濃度の上昇に重要な役割を担っており、受精膜形成や卵賦活化に深く関わっている事が明らかになった。一方、卵成熟においては IP<sub>3</sub> 受容体の働きは必須ではないことが明らかになった。

## 2. イトマキヒトデ IP<sub>3</sub> 受容体のクローン化

イトマキヒトデ卵巣より RT-PCR 法を用いて IP<sub>3</sub> 受容体のクローン化を行った。得られた PCR 増幅産物の塩基配列を解析した結果、イトマキヒトデ IP<sub>3</sub> 受容体の塩基配列は 9475 ヌクレオチドから成り、そのうちの 8094 ヌクレオチドが 2698 個のアミノ酸を指定していることが明らかになった。配列より推定されるタンパク質の分子量は 308 kD であった。

これまでの研究から、哺乳類では IP<sub>3</sub> 受容体には3つのタイプが存在することが知られているが、ヒト各タイプ IP<sub>3</sub> 受容体と比較するとイトマキヒトデ IP<sub>3</sub> 受容体はヒトタイプ 1 IP<sub>3</sub> 受容体と最も高い相同性を示し、ついでタイプ 2、タ

イプ 3 の順に高い相同性を示した。なお、本研究では各タイプで良く保存されている配列をプライマーとして RT-PCR を行ったが、増幅産物のシーケンスは全て同一であった。

他の動物種の  $IP_3$  受容体の解析から  $IP_3$  受容体は N 末端部に存在するリガンド結合領域と C 末端部に存在するチャネル形成領域と、それらの間には様々なタンパク質の認識配列が密集した調節領域からなることが知られている。イトマキヒトデ  $IP_3$  受容体のリガンド結合領域は、これまでにクローン化された  $IP_3$  受容体と比較して非常に良く保存されていた。特に、この領域において  $IP_3$  との結合に必須であることが知られている 3 つの塩基性アミノ酸は、本研究で明らかになったヒトデの配列においても全て保存されていた。チャネル形成領域には疎水性アミノ酸が連続して見られる配列が 6 カ所存在し、この部分で膜に貫通していると考えられる。また、調節領域には PKA や PKC、PKG などのリン酸化酵素による認識配列が存在し、FKBP12 の結合配列も存在することから、これらの分子によりイトマキヒトデ  $IP_3$  受容体の機能が制御されている可能性が推察される。

### 3. 卵成熟と $IP_3$ 受容体

卵成熟過程における卵のイトマキヒトデ  $IP_3$  に対する感受性の増大機構について解析するために、得られたイトマキヒトデ  $IP_3$  受容体の配列を元に抗体を作製し、卵成熟過程における  $IP_3$  受容体の発現量の変化を解析した。その結果、 $IP_3$  受容体のバンドの濃さは卵成熟過程において変化しなかった。このことからイトマキヒトデ  $IP_3$  受容体の発現量は卵成熟過程においては変化せず、卵成熟に伴う  $IP_3$  に対する感受性の増大は  $IP_3$  受容体の発現量の増大に基づくものではないことが明らかになった。

さらに、卵成熟過程における局在の変化について調べるために、未成熟卵および成熟卵の免疫組織化学染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡での観察から、未成熟卵では卵核胞の外側にシグナルが認められたのに対し、卵核胞崩壊を開始した卵では元々卵核胞のあった領域に強いびまん性のシグナルが認められた。また、卵核胞が完全に消失した成熟卵では再びシグナルが卵全域に分散するのが認められた。