哺乳動物卵受精時の細胞内 Ca^{2+} イオンの 周期的増加と膜電位変化

自治医科大学第一生理学教室 宮崎 俊一

fertilization / hamster egg / hyperpolarizing response / cytoplasmic Ca^{2+} / periodic Ca^{2+} transients

受精現象は一般に二つの段階に分けられる。第一は精子と卵の融合過程と余分な精子の排除過程である。第二段階は卵の代謝的賦活過程であり、DNA複製と細胞分裂への引金になる。受精は、最も研究がなされた棘皮動物ウニでの知見を基本として考えることができるが、動物種によって様々な variation があって面白い。ここでは哺乳動物卵の受精について、特にゴールデンハムスター卵での細胞内 Ca^{2+} 増加機構を中心に解説する。受精現象としてだけでなく、非筋細胞での Ca^{2+} 動態の 1 モデルとしてとらえていただければ幸いである。

1. 受精電位と多精拒否機構

精子が卵表面に付着して初めに卵におこる現象は、「受精電位」という膜電位変化と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加である。ウニ卵の受精電位 (図 1 A) は、 $-60 \sim -80 \text{ mV}$ の静止電位から活動電位 (図の ap) をもって急速に立上り、0 電位を越して約 40 秒後にピークに達した後、ゆっくりと下る。膜電位がプラスの間は次の精子の融合は抑えられ、この間に受精膜が形成される (図の fm)。ウニ卵では受精電位は一時的なやい多精拒否の役割を果たし^{1),2)}、次いで受精膜による永久的な多精拒否機構に引き継がれる。

哺乳動物卵は透明帯という厚い構造で囲まれ、これを trypsin で除去すると複数の精子が侵入する。ハムスター卵 (直径約 $70 \mu\text{m}$) の受精電位は、 $-20 \sim -30 \text{ mV}$ の静止電位から下向きにおこる過分極反応 (hyperpolarizing response, HR) で、而も繰返しおこる³⁾ (図 1 C)。個々の HR の持続は 15 秒前後、HR の間隔は $40 \sim 120$ 秒である。最初の HR は最初に卵に付着した精子の鞭毛運動が止まる時点 (図 1 C の 1 st,

おそらく膜融合がおこった時点) にほぼ一致しておこる。その後の HR は必ずしも 2 個目以降の精子の融合に一致せず、もはや精子が付着しなくても周期的に続く。また精子 1 個だけでも周期的な HR を誘発しうる。ハムスター卵には膜電位依存性の精子侵入阻止機構は存在せず、従って電気的なやい多精拒否機構は存在しない⁴⁾。

2. 細胞内 Ca^{2+} 遊離

受精時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は種々の卵に共通な現象である。その直接的な機能は、卵内の表層にある顆粒の開口分泌を誘発し、ウニ卵では受精膜を形成させ、ハムスター卵では分泌物が透明帯に作用して精子の侵入を阻止する (帯反応)⁵⁾。即ちおそい多精拒否の引金になる。ウニ卵では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $0.15 \mu\text{M}$ から急速に増加して十数秒で $2 \sim 2.5 \mu\text{M}$ のピークに達し、5 分位でゆっくり元に戻る⁶⁾ (図 1 B)。 Ca^{2+} 増加は精子付着後直ちに Ca -free 海水にしてもおこるので、細胞内 Ca store からの Ca 遊離によると考えられる⁷⁾。

ハムスター卵受精時の過分極反応 (HR) は、細胞内 Ca^{2+} によって活性化される細胞膜 K^+ 透過性の上昇、即ち Ca -activated K channel による⁴⁾。図 1 D は、 Ca^{2+} 感受性微小電極 (ガラス微小電極の先端に、liquid neutral Ca^{2+} exchanger ETH1001⁸⁾ を充てんしたもの) を卵内に刺入して直接 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した記録である。他に 2 本の 3M-KCl 電極を同時に刺入し、膜電位固定を行っている。即ち Ca^{2+} 電極から膜電位分を差し引き、且つ膜電位変化を阻止して Ca^{2+} による電位のみが記録される⁹⁾。 K^+ の外向き電流に 1 : 1 に対応して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加している。初めの 2 ~ 3 回は、 $1 \sim 1.5 \mu\text{M}$ に達し、その後の増加は $0.6 \sim 0.7 \mu\text{M}$ である⁹⁾。 Ca^{2+} 電極は先端に接する部分の Ca^{2+} を感受することになるが、卵の深部でも Ca^{2+} が増加し、ピーク値は表層と統計的に有意の差がない。図 1 D からみると、HR は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を反映する恰好のモニターとなることがわかる。

Periodic Increase in Cytoplasmic Ca^{2+} and Membrane Potential Change at Fertilization of Mammalian Eggs

Shun-ichi MIYAZAKI

Department of Physiology, Jichi Medical School

図1. A: ウニ卵の受精電位。矢印 ar: 精子が卵の附近に到達した時点, ap: 活動電位, fm: 受精膜形成時期。(長内, 経塚, 宮崎らの実験による)。B: ウニ卵受精時の $[Ca^{2+}]_i$ 増加を, Ca^{2+} 結合性蛍光試料 Fura-2 で記録したもの (Poenie et al.⁶⁾)。C: ハムスター卵の受精電位。一定の電流パルスを与えて膜抵抗の変化をモニターしている。1 ~ 6 at: 卵への各精子の付着時点, 1 st: 最初の精子の鞭毛運動の停止時点 (宮崎, 井草)。D: Ca 電極による $[Ca^{2+}]_i$ 測定。Vca: Ca^{2+} 電位, スケールは $pCa = -\log [Ca^{2+}]_i$ で表わしている。Im: K^+ の外向き電流。(Igusa and Miyazaki⁹⁾)。

3. Ca^{2+} wave

$[Ca^{2+}]_i$ 増加はまた, 発光性 Ca^{2+} 結合蛋白 aequorin を予め未受精卵に注入してから媒精しても確認できる。近年, 二次元光子計数管を備えた超高感度テレビカメラが開発され (浜松ホトニクス VIM), 顕微鏡下の単一細胞でフォトンレベルの微弱光をテレビ画面に spot 群としてとらえることが可能になった (photon counting imaging)^{10), 11)}。ビデオに収録した raw image を image processor で処理して, $[Ca^{2+}]_i$ 増加の時間的及び空間的分布を解析できる。図2, 3は, aequorin を注入したハムスター卵の上辺に1個だけ精子が付着した例で, 第1回目の Ca^{2+} 増加について, 光の spot を連続的に全部累積したものを0.5秒毎にストップし

て写真にとったもの (図2) 及び spot を0.5秒ずつ区切って集積したもの (図3) である¹²⁾。 Ca^{2+} 増加は精子付着部位付近から始まり, 伝播性に拡がって約6秒 (他の数例では4~7秒) で卵全体に波及している。伝導速度は, 表層を伝わると仮定して計算した場合16~28 μm /秒である。受精時の Ca^{2+} wave は, 大きなメダカ卵で初めて示され¹³⁾, 最近ウニ卵や^{14), 15)} *Xenopus* 卵¹⁶⁾でも記録された。卵に対して1個の精子はほんの1点刺激であるので, 細胞内の伝播性の情報伝達機構が必要なのであろう。なおハムスター卵では, $[Ca^{2+}]_i$ の減衰は卵全体で一様におこるようである (図3 m-u)。

面白い事に Ca^{2+} wave は2, 3回目のCa増加でも精子付着部位付近から繰り返しおこる¹²⁾ (図4 a)。伝

図2及び3. aequorin 注入ハムスター卵媒精時の第1回目の Ca^{2+} 増加の分布. 上辺に精子が1個だけ付着している. スケールは50 μm . 説明は本文参照 (Miyazaki et al.¹²⁾).

図4. 図2, 3と同一の卵での, 第2回目 (a) 3回目 (b) 5回目 (c) の Ca^{2+} 増加の分布. テレビ画面上の光の spot を持続的に累積している. 最初の spot の出現をゼロ時間とし (各左端の写真), 順次右へ0.25秒, 0.5秒, 0.75秒, 1秒, 1.5秒, 2秒後に画面を停止して写真にとっている (Miyazaki et al.¹²⁾).

導はより速くなり (約2秒), 3~4回目以降の Ca^{2+} 増加では, 1秒程度で卵全体で一様に同期しておこるようになる (図4 b, c). このように, 初めの2~3回は精子によって trigger されるが, それ以降は, 媒精された卵自体の Ca^{2+} 動態特性で周期性を確立するようにみえる.

4. Ca^{2+} 遊離機構

さて, 精子の卵への付着はどのような機序で Ca^{2+} 増加をおこすのだろうか? 細胞膜受容体の細胞内への情報伝達系として, 膜の GTP 結合蛋白を介して活性化

された phospholipase C (PL-C) が phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate (PIP_2) を分解して inositol 1, 4, 5 trisphosphate (IP_3) と diacylglycerol (DG) を産生し, IP_3 が小胞体から Ca^{2+} を遊離させる系がある^{17), 18)}. 卵細胞膜上の精子受容体は同定されていないが, 何らかの機序でこの伝達系を作動させるようである. ウニ卵では, 媒精により phosphatidylinositol の分解が亢進すること¹⁹⁾, IP_3 の微量注入により, (おそらく Ca^{2+} 遊離をおこして) 受精膜が形成されることが^{20), 21)} 報告されている. ハムスターの未受精卵内に, 80nM の濃度の IP_3 をガラス微小電極から約5 pI 注入

図5. A: ハムスター未受精卵に Ca^{2+} を電気泳動的に注入した際の all-or-none 的極分極反応の誘発. 下のトレースは Ca^{2+} 注入電流 (上向き) 及び膜抵抗モニター用の短いパルス (下向き). B: 媒精した卵で Ca^{2+} 注入を挿入した時の不応期. 直前におこった HR (R_1) と Ca^{2+} 注入による過分極 (R_2) の面積の比をとり, R_1 - R_2 の interval の関数で表わしている. C: 媒精した卵の周期的 HR (黒丸) の間に, Ca^{2+} 注入を挿入 (矢印 1~6) している (いずれも Igusa and Miyazaki²³⁾ より).

すると (卵の体積約 200pl, もし IP_3 が一様に分布すると 2 nM と計算される), 直ちに卵全体で Ca^{2+} 遊離が 1 回だけおこる²²⁾. また, 水解耐性の GTP アナログ, GTP γ S を注入 (計算値 13~50 μM) すると, 40~200 秒おくらせて Ca 遊離をおこす. 50 μM 以上であると, ちょうど媒精した場合と同様な周期的な Ca^{2+} 増加をおこす点が興味深い²¹⁾. 注入された GTP γ S が細胞膜に到達して G 蛋白と結合し, 水解されずに PL-C を介して持続的に IP_3 を産生するのも知れない. GDP β S を予め注入しておくと, GTP γ S による Ca^{2+} 増加も, 精子による Ca^{2+} 増加もともに抑えられる²²⁾. 精子-卵情報伝達系に於ける G 蛋白の関与が示唆されるわけであるが, ウニ卵でも既に報告がある²¹⁾.

初めの 2~3 回の Ca^{2+} 増加にみられる Ca^{2+} wave はなぜおこるのだろうか? ハムスターの未受精卵に, 0.5M - CaCl_2 をつめた電極から 2 秒間の電流パルスで Ca^{2+} を注入すると, ある注入電流で all-or-none 的に大きな過分極反応がおこる²³⁾ (図 5 A). これは Ca-free 溶液中でもおこる. Ca^{2+} 自体が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を増強することから, 筋小胞体で観察された Ca-induced Ca release²⁴⁾ 機構の存在が示唆される. この機構を想定すると, 精子付着部位付近で IP_3 により局所

的に増加した Ca^{2+} が刺激になって, 次々に伝播性の Ca^{2+} 遊離をおこし得るであろう. 表層では Ca^{2+} 増加がさらに IP_3 の産生を促進する可能性がある²⁰⁾.

5. 周期的な Ca^{2+} 増加

3~4 回目以降の Ca^{2+} 増加は, 卵全体で同期しておこり, 且つ受精卵の特性で周期性が確立されるらしい (前述). 媒精後周期的におこっている Ca^{2+} 増加 (図 5 C, 黒丸で示した HR で観察) の間に人為的な Ca^{2+} 注入を挿入すると (矢印 1~6), all-or-none 的に extra HR が誘発される²³⁾ (矢印 3). その閾注入電流は, 未受精卵の場合の約 1/10 である. 即ち受精卵では一寸した Ca^{2+} 増加が Ca^{2+} 遊離をおこせる状態にあるらしい. では周期性は何故おこるのだろうか? 一度増加した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が元にもどる (図 1 D) ということは, Ca^{2+} が直接的か或は細胞内 Ca^{2+} 緩衝系を介して間接的にか, 再び store に取込まれるか, 細胞外へ排出されるか, 又は両者によるであろう. 周期的な Ca^{2+} 増加は, 恐らく Ca store が release-reloading-release を繰返すものと思われるが, release の誘発因子は何か, interval を決定するものは何か? この問に答えることは困難であるが, 以下のような所見がある.

1) 図 5 C のように周期的な HR の間に Ca^{2+} 注入を挿入した場合、直前の HR 終了から 20 秒間は Ca^{2+} 注入による extra HR は誘発できず、不応期がある²¹⁾ (図 5 B)。20~35 秒の間は相対不応期であり、37 秒後に Ca^{2+} を注入した場合はフルサイズの extra HR が誘発される。この完全回復時間は、HR の最小間隔 40 秒にはほぼ一致する。extra HR が起こった時は次の HR は 40 秒待ってから発生する (図 5 C)。つまりリズムは挿入した extra HR によってリセットされるわけである。2) HR が周期的に発生している途中で細胞外 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ を上げると、HR 間の interval は短くなり、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ を下げるか、 Co^{2+} または Mn^{2+} を加えると interval は長くなる²¹⁾。しかしいずれの場合も個々の HR の大きさ (正確にはピークでの K conductance の増加度) は殆ど変わらない。即ち個々の Ca^{2+} transient は細胞内の現象—おそらく Ca^{2+} 遊離—であろうが、発生間隔は $[\text{Ca}^{2+}]_o$ —おそらく Ca^{2+} 流入—に依存すると考えられるのである。3) 媒精すると細胞膜の Ca^{2+} 透過性が上昇し²¹⁾ basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がわずかに高くなる⁹⁾。持続的な Ca^{2+} 流入があるのではないかと考えられる。4) 小さい短い電流パルスで持続的に Ca^{2+} を卵内に注入すると、周期的な HR を形成する。注入電流を増すとこの HR の間隔が短くなる²¹⁾。

以上の所見から想定されるモデルの一つは、Ca store の reloading が 40 秒程かかり、その際、細胞外から持続的に流入する Ca^{2+} が store の reloading に関与するというものである²¹⁾。Ca store が reload されて次の Ca 遊離の準備ができたときに、何が次の Ca 遊離を誘発するのか? basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がやや高まった条件下で overload によって自然に遊離してしまうのか、或は GTP γ S 投与時の周期的 Ca^{2+} 増加でみるように、 IP_3 のような誘発因子が作用するのか、今後の課題である。

6. 卵賦活, 細胞増殖

受精の本質からみて、第二段階の代謝的賦活は重要な過程である。未受精卵で静止していた代謝活性が受精によって解除され、蛋白, RNA, DNA 合成が再開し、核融合、細胞分裂・増殖へと一気に進行するわけである。このカスケードの誘発機序は未だ解明されていない。古くより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加が卵賦活の誘因であるとする Ca 仮説が提唱されてきた。実際、ウニ卵に Ca ionophore を投与して人為的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させると、受精膜が形成され、卵賦活もおこる²⁵⁾。ハムスター卵でも Ca ionophore によって卵賦活がおこるし、

媒精時の周期的な Ca^{2+} 増加は卵賦活に関連している²⁶⁾。他方、ウニ卵の受精時に、 Ca^{2+} 増加に続いて細胞内 pH の上昇 (H^+ 濃度の低下) がおこり、また精子なしで 10 mM 程度のアンモニアを投与して細胞内 pH を上昇させると、受精第一段階をバイパスして卵賦活をおこし得る²⁷⁾。現在のところ、 Ca^{2+} 増加は、卵の酸素消費量の増加、NAD kinase の活性化を誘発するものの、卵賦活に対しては間接的な因子であり、pH 上昇がより直接因子に近いと考えられている²⁵⁾。イノシトールリン脂質代謝を介する情報伝達系に於て、 IP_3 とともに生産される DG が、 Ca^{2+} とともに C キナーゼを活性化する²⁸⁾。DG はウニ卵で $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交換輸送を活性化する²⁹⁾ ので、これにより細胞内 pH が上昇するものと思われる。これから先のストーリーは、今後の研究から作られるであろう。

以上、哺乳動物卵受精時の細胞内 Ca^{2+} の変動を紹介したが、 Ca^{2+} 動態の一モデルとして、自発的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を示す平滑筋等に何らかの関連があるかも知れない。さらに、その初期に Ca^{2+} が関与する卵賦活の研究は、細胞増殖因子の作用機序や、発がんの問題とも関連して、重要な研究テーマであろうと思われる。

本稿に記述された研究の多くは、自治医大第一生理井草幸夫博士、 Ca^{2+} 分布の実験は基生研細胞増殖部門吉本康明博士、平本幸男教授 (* 東工大理学部生物)、同生殖部門橋本有弘氏 (* 東大理学部動物大学院)、岸本健雄博士との共同研究によるものである (所属は当時、* は基生研と兼任又は国内留学)

文 献

- 1) Jaffe, L. A. (1976) *Nature*, **261**, 68-71.
- 2) 宮崎俊一 (1980) 科学, **50**, 355-362.
- 3) Miyazaki, S. & Igusa, Y. (1981) *Nature*, **290**, 702-704.
- 4) Miyazaki, S. & Igusa, Y. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 931-935.
- 5) Yanagimachi, R. (1977) *Immunobiology of Gametes* (Edidin, M., Johnson, M. H., eds) pp 255-289. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 6) Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R. Y. & Steinhardt, R. A. (1985) *Nature*, **315**, 147-149.
- 7) Steinhardt, R. A., Zucker, R. & Schatten, G. (1977) *Devel. Biol.*, **58**, 185-196.
- 8) Simon, W., Ammann, D., Oehme, M. & Morf, W. E. (1978) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **307**, 52-70.
- 9) Igusa, Y. & Miyazaki, S. (1986) *J. Physiol. (Lond.)*

- 377, 193-205.
- 10) 早川毅 (1984) 生物物理, **24**, 9-14.
 - 11) 平野憲一, 平本幸男 (1986) バリテイ, **1**, 24-32.
 - 12) Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y. & Hiramoto, Y. (1986) *Devel. Biol.*, **118**, 259-267.
 - 13) Gilkey, J. C., Jaffe, L. F., Ridgway, E. B. & Reynolds, G. T. (1978) *J. Cell Biol.*, **76**, 448-466.
 - 14) Eisen, A., Kiehart, D. P., Wieland, S. J. & Reynolds, G. T. (1984) *J. Cell Biol.*, **99**, 1647-1654.
 - 15) Yoshimoto, Y., Iwamatsu, Y., Hirano, K. & Hiramoto, Y. (1986) *Devel. Growth Differ.*, **28**, 601-614.
 - 16) Kubota, H. Y., Yoshimoto, Y., Yoneda, M. & Hiramoto, Y. (1987) *Devel. Biol.*, **119**, 129-136.
 - 17) Berridge, M. J. & Irvine, R. F. (1984) *Nature*, **312**, 315-321.
 - 18) 竹縄忠臣 (1985) 受容体と情報伝達, 現代化学増刊 **4**, 48-66.
 - 19) Turner, P. R., Sheetz, M. P. & Jaffe, L. A. (1984) *Nature*, **310**, 414-415.
 - 20) Whitaker, M. & Irvine, R. F. (1984) *Nature*, **312**, 636-639.
 - 21) Turner, P. R., Jaffe, L. A. & Fein, A. (1986) *J. Cell Biol.*, **102**, 70-76.
 - 22) Miyazaki, S. (1987) *J. Physiol. Soc. Japan*, in press.
 - 23) Igusa, Y. & Miyazaki, S. (1983) *J. Physiol. (Lond.)*, **340**, 611-632.
 - 24) Endo, M. (1977) *Physiol. Rev.*, **57**, 71-108.
 - 25) Epel, D. (1978) *Curr. Top. Devel. Biol.*, **12**, 185-246.
 - 26) Igusa, Y., Miyazaki, S. & Yamashita, N. (1983) *J. Physiol. (Lond.)*, **340**, 633-647.
 - 27) Epel, D., Steinhardt, R., Humphreys, T. & Mazia, D. (1974) *Devel. Biol.*, **40**, 245-255.
 - 28) Nishizuka, Y. (1984) *Nature*, **308**, 693-698.
 - 29) Lau, A. F., Rayson, T. C. & Humphreys, T. (1986) *Exp. Cell Res.*, **166**, 23-30.

みやざき しゅんいち

昭和41年東京大学医学部卒業。48年同脳研究施設生理部門で学位取得。48～52年 Stanford 大学医学部生理学教室 (Prof. J. G. Nicholls) 及び UCLA 医学部生理学教室 (Prof. S. Hagiwara) に留学。53年自治医大第一生理助教授, 現在に到る。生理学会, 生物物理学会, 発生生物学会に所属。三者の中間領域にあり, いろいろな分野の人の話を聞けるのが楽しみ。好きなものは野球 (今は見る方になってしまったが) と旅行と写真と推理小説。

☎0285-44-2111 内線 3131