

## 研究題目 卵子表層顆粒局在タンパク質の網羅的同定

### 研究組織

研究代表者：徳弘 圭造（関西医科大学附属生命医学研究所 ゲノム編集部門）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

一つの卵子に複数の精子が融合した多精子受精卵は、胚発生の段階で死んでしまう。そのため、受精卵への新たな精子の融合を阻止する厳密なメカニズムが存在する。卵子の表層顆粒には、多精子受精阻害機構に重要な役割を果たしているタンパク質が存在すると考えられているが、その全容は明らかとなっていない。現在までに、いくつかのタンパク質が表層顆粒に局在すると報告されているが、哺乳類の受精において重要な役割を果たしていることが遺伝子欠損マウスによって証明されているものは OVASTACIN と TRANSGLUTAMINASE 2 だけである (Burkart AD, et al., J Cell Biol. 2012 197:37-44, Cui Z et al., Cell Death Differ. 2022 29:1466-73)。また、最も重要な阻害機構と考えられている膜融合阻害に関しては、受精後 30-40 分後に卵子側の融合関連因子である Juno の切断が起こるとされているが、切断に関与する分子は同定されていない。さらに、受精後数秒で膜融合阻害が観察されることから、Juno の切断とは異なる未解明のメカニズムが存在すると考えられる (Bianchi E et al., Nature. 2014 508:483-7)。

本研究では、近年、相互作用タンパク質の同定法として注目を浴びている近位依存性ビオチン化酵素 TurboID を利用した手法を用いて表層顆粒に局在するタンパク質を網羅的に同定し、受精現象に重要な役割を果たす分子の解明を目指す。

#### [1-2]研究の方法・経過

表層顆粒局在タンパク質である mouse OVASTACIN のアミノ酸配列と蛍光タンパク質を融合させた mRNA をマウス卵子に発現させた実

験から、N末端が卵子の表層顆粒への輸送と局在に必須であることが解明されている (Xiong B et al., PLoS Genet. 2017 13:e1006580)。この知見をもとに、我々の研究室では、第一世代の遺伝子改変マウスとして卵細胞特異的な高発現を誘導する *Gdf9* promoter の制御下に、Ovastacin<sup>N-ter</sup>-TurboID-V5 tag を発現する Transgenic (TG) マウスを作製した。しかしながら、このコンストラクトでは TG 由来タンパク質の表層顆粒への局在が充分でないため、質量分析を行っても表層顆粒マーカーとなる OVASTACIN を検出できないという問題があった。そこで、第二世代の遺伝子改変マウスとして、Ovastacin の C 末端に TurboID-HA tag を挿入した Knock in (KI) マウスを作製した。このマウスは、第一世代の TG マウスと比較して、タンパク質の安定性が向上しているためか、蛍光標識 Streptavidin 染色によって卵子表層顆粒内でのビオチン化タンパク質の検出に成功した。このマウスを使用して *in vivo* で卵子表層顆粒内のタンパク質のビオチン化を誘導することにより表層顆粒に局在する分子を網羅的に同定する。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

第二世代の KI マウスの卵子を用いて、質量分析を行った結果、OVASTACIN および CALRETICULIN の表層顆粒に局在する分子を同定することができた。第一世代の TG マウスの卵子を使用した際には、OVASTACIN の検出はできなかったため、表層顆粒局在分子の同定という点においては改善できた。また、いくつかの興味深い遺伝子の同定に成功している。

#### [2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発

展性

現在、質量分析によって明らかになった分子に関して、遺伝子欠損マウスを作製して機能解析を進めている。表現型解析の結果、不妊あるいは産仔数減少が観察されたマウスが得られた場合は、さらに詳細に解析を進めていく予定である。

### 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

質量分析の結果、表層顆粒マーカである OVASTACIN を検出することはできたが、想定したほどの分子の同定はできなかった。さらに改良を行うために、より反応距離の短い APEX2 を利用した同定を試みる予定である。