

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）

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: 1466-1473)。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 508:483-487)。

[1-2] 研究の方法・経過

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 および APEX2 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。

昨年度は、TurboID を利用したタンパク質同定

を試みたが、想定されるような分子は同定できなかった。今年度は表層顆粒局在タンパク質である mouse OVASTACIN のアミノ酸配列とより反応距離の短い Apex2 を融合させた mRNA を GV 卵子に injection することにより、表層顆粒内のタンパク質の同定を試みた。Apex2 を利用する場合、過酸化水素を用いたラジカル反応を APEX2 で触媒することでタンパク質をビオチン化標識する必要がある、細胞毒性の問題が浮上する。我々は、比較的細胞毒性が少ない処理条件を検討して、Ovastacin-Apex2 を発現する GV 卵子内でビオチン標識を行い質量分析法により局在分子の同定を試みた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

過酸化水素水内での処理は、卵子には非常に毒性が高く、細胞膜や細胞骨格に局在するような分子の場合は比較的容易であるが、今回のように細胞内小器官や細胞質に局在するような分子を標的とする場合には条件検討が非常に難しかった。過酸化水素水内での処理条件の検討に時間がかかったため、質量分析結果に関しては今後精査する予定である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後は、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く。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

mRNA injection の場合、卵子ごとに発現量が異なるため実験間でのブレが多くなる。安定的な結果を得るためには、Knock in マウスを作製し、その卵子を使用する方法も検討する必要があるかもしれない。今回、マウス卵子を使用する場合にも毒性の低い標識処理の条件を検討することができたので、これを今後の研究に生かしたい。