

研究成果報告書

研究テーマ (和文)	マウス卵子表層顆粒局在分子の網羅的同定、およびその機能解析		
研究テーマ (英文)	Exhaustive identification of cortical granule proteins in mouse eggs and functional analysis of these proteins		
研究期間	2019年～2022年	研究機関名 関西医科大学	
研究代表者	氏名	(漢字)	徳弘 圭造
		(カタカナ)	トクヒロ ケイゾウ
		(英文)	Keizo Tokuhiro
	所属機関・職名	関西医科大学・学長特命准教授	
共同研究者 (1名をこえる場合は、別紙追加用紙へ)	氏名	(漢字)	福田 尚代
		(カタカナ)	フクダ ヒサヨ
		(英文)	Hisayo Fukuda
	所属機関・職名	関西医科大学・助教	

概要 (600字～800字程度にまとめてください。)

我々は、透明帯を介した多精子受精阻害機構の分子メカニズムの研究を行い、すでに解明されていた卵子表層顆粒に局在する OVASTACIN による ZP2 の切断とは異なる新規の透明帯通過阻害メカニズムが存在することを報告した(Tokuhiro K et al., Dev Cell 2018 46(5):627-40)。さらにその分子メカニズムとして受精直後に大量の Zn^{2+} が放出される現象である zinc sparks の新たな機能を報告した。しかしながら、zinc sparks は受精後 1 時間ほど周期的に起こるものの、透明帯通過阻害は受精後 8 時間程度存在することが確認されており、zinc sparks 以外の透明帯と精子の相互作用を阻害するメカニズムが存在すると予想される。そこで本研究では、近位依存性ビオチン標識法を用いて多精子受精阻害機構に重要な分子が存在する卵子表層顆粒に局在するタンパク質を網羅的に同定することにより、正常な受精現象に必須な分子の解明へと繋げるものである。卵子特異的な発現を誘導する Gdf9 promoter の制御下に卵子表層顆粒局在シグナルを融合させたビオチン化酵素を発現する Transgenic (TG) マウスを作製した。卵子内でのタンパク質の発現やビオチン化誘導によるタンパク質のビオチン化は確認できたものの、免疫染色による局在を確認すると表層顆粒の凝集したような構造体への局在が確認された。TG マウスより回収した卵子可溶化物を使用して、ビオチン化タンパク質の精製後に質量分析法によりタンパク質の同定を進めた。質量分析の結果、卵子表層に局在すると思われるタンパク質 (FILIA, FLOPED, PADI6 など) は同定されるものの、表層顆粒マーカーである OVASTACIN が同定できなかった。免疫染色による解析などから、今回のコンストラクトで発現するタンパク質の安定性に問題があり、網羅的な同定を行うには困難であると思われる。しかしながら、いくつか興味深いタンパク質の同定ができたので、CRISPR/Cas9 system を用いて作製した遺伝子欠損マウスの表現型を解析することにより、多精子受精阻害機構の分子メカニズムを解明し、不妊症の原因遺伝子の同定、診断法や治療法の開発へと繋げていく。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）					
雑誌	論文課題				
	著者名		雑誌名		
	ページ	～	発行年		巻号
雑誌	論文課題				
	著者名		雑誌名		
	ページ	～	発行年		巻号
雑誌	論文課題				
	著者名		雑誌名		
	ページ	～	発行年		巻号
図書	書名				
	著者名				
	出版社		発行年		総ページ
図書	書名				
	著者名				
	出版社		発行年		総ページ

英文抄録（100語～200語程度にまとめてください。）

We had investigated the molecular mechanism of polyspermy block via the zona pellucida and reported the existence of a novel mechanism of zona pellucida passage inhibition that is distinct from the mechanism of ZP2 cleavage by OVASTACIN localized in cortical granules of eggs. Furthermore, we had reported a novel function of zinc sparks, a phenomenon in which a large amount of Zn^{2+} is released immediately after fertilization. Although zinc sparks occur periodically for 1-2 hours after fertilization, zona pellucida passage inhibition was observed for about 8 hours after fertilization, suggesting the existence of unknown mechanisms that inhibits the interaction between the zona pellucida and sperm. In this study, we used proximal-dependent biotin labeling to comprehensively identify proteins localized in cortical granules, where molecules important for the mechanism of polyspermy block are located. We established new Transgenic (TG) mice that expressed biotin ligase fused with the cortical granule localization signal under the control of the *Gdf9* promoter. By Mass spectrometry analysis, we identified proteins (FILIA, FLOPED, PADI6, etc.) that are thought to localize to the oocyte surface, but failed to identify OVASTACIN, a cortical granule marker. Based on the immunostaining analysis, it seems that the stability of the proteins expressed in this construct is problematic, and it would be difficult to perform a comprehensive identification. However, we identified several interesting proteins and have been analyzing the phenotype of gene-deficient mice generated using the CRISPR/Cas9 system.