

多精子受精阻害機構関連因子の網羅的同定

関西医科大学附属生命医学研究所ゲノム編集部門 学長特命准教授 徳弘 圭造

要約

我々は、透明帯を介した多精子受精阻害機構の研究を行い、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(1)。さらにその分子メカニズムとして受精直後に大量のZn²⁺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 マウスを作製し、現在このマウスを用いて解析を進めている。質量分析法により卵巣顆粒に局在する分子の同定を進め、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きたい。

緒言

近年、不妊症で悩むカップルの割合は6組に1組と言われており、深刻な社会問題となっている。人工授精や顕微授精の技術が進歩したことにより、不妊治療により子供を授かる場合が増加しており、一見すると不妊の問題は解消されつつあるように見える。しかしながら、これらの方法は根本的な治療法にはなっておらず、次世代に不妊の問題が先送りにされる可能性がある。このような問題を解決するためにも、受精現象の分子機構を明らかにすることは重要である。

1つの卵子に2つ以上の精子が受精する多精子受精が起こると胚発生が停止してしまうために、多精子受精阻害機構により受精前後の精子と卵子の相互作用が厳密に制御されている。この機構のうち最も分子機構が明らかとなっているのは透明帯結合阻害機構である。受精の際に、精子は透明帯構成タンパク質であるZP2のN末端領域に結合するが、受精後は精子の透明帯結合を阻害するために卵子の表層顆粒よりOvastacinという酵素が放出される。これによって、ZP2のN末端領域が切断され、受精卵の透明帯への精子結合が阻害が起こる(2)。これまで、遺伝子改変マウスによって多精子受精阻害機構に重要な役割を果たすことが明らかになっているタンパ

ク質は表層顆粒特異的分子であるOvastacinだけである。表層顆粒放出は多精子受精阻害機構に重要な役割を果たしていることが報告されており、Ovastacin以外にも多精子受精阻害機構に重要な役割を果たしている分子が含まれていると考えられる。しかしながら、哺乳類の卵子はサンプル量を十分に集めることが難しく、卵子の微小な構造体である表層顆粒の研究は思うように進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、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、受精前後における正常な胚発生を誘導するメカニズムに必須の分子を同定し、その機能解析へと繋げるものである。これにより、多精子受精阻害機構の一端を解明し、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きたい。また、ヒトの人工授精においては多精子受精卵が多く得られるため、その原因を解明できれば貴重な卵子を有効に使用することが可能となる。

方法

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ビオチン化酵素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同定する。

Ovastacinの構造解析からN末端64アミノ酸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(3)。そこで、このアミノ酸配列に新たに開発されたビオチン化酵素の変異体であり、これまで報告されているBioIDやBioID2などより短時間で高効率にタンパク質のビオチン化を誘導することのできる性質により、これまで実績のなかったショウジョウバエや線虫のin vivoでのビオチン化を可能にしたTurboIDあるいはminiTurboを融合させたタンパク質を利用する(4)。これによって新規ビオチン化酵素を表層顆粒特異的に局在させ、網羅的なタンパク質の同定を目指す。

まずは、設計したコンストラクトが機能するかを確認するために、Ovastacin¹⁻⁸⁹-TurboID-mCherryあるいはOvastacin¹⁻⁸⁹-miniTurbo-mCherryのplasmidを構築後、HEK293細胞にtransfectionし、細胞内での局在及びビオチン酵素の活性を確認する。さらに、in vitro transcriptionによりmRNAを作成して、マウスの卵巣から回収したGV卵子にインジェクションしたのち15時間培養することにより、GV卵子内でのタンパク質の局在を確認する。これらの解析によって、表層顆粒内への局在やビオチン化酵素活性が確認できれば、Gdf9 promoter制御による卵子特異的発現を誘導するTransgenic (TG)マウスを作製する。作製したマウスの卵子を用いてImmunoblotと免疫染色により表層顆粒特異的な染色パターンとビオチン化タンパク質が多く得られる最適条件(ビオチン濃度、処理時間など)を検討する。本研究で行われた研究は、関西医科大学動物実験委員会によって承認された計画に基づいて行った(承認番号: 19-002, 研究課題名: 不妊症関連因子の遺伝子機能解析)。

結果

まずは、体細胞であるHEK293細胞に卵子で発現させるタンパク質を発現させることによって、細胞内での局在やビオチン化酵素の活性に問題がないか確認した。CMV promoter下にビオチン化酵素であるTurboID-mCherry及びminiTurbo-mCherryを発現させると、mCherryのシグナルが細胞質内で確認された。そこで、TurboID及びminiTurboのN末端にOvastacinのsignal peptide及びprodomainを含んだ1-89アミノ酸を融合させた。この融合タンパク質は細胞質ではなく顆粒状の局在やゴルジ体への局

在を示すようになった(図1A)。また、それぞれの発現細胞に対してビオチン化処理(500 μM biotinを含んだ培地中で 0, 1, 6 時間)を行い、Ovastacin¹⁻⁸⁹を融合させたビオチン化酵素の活性を確認したところ、融合させないコンストラクトと比較して発現量が低下したことによりビオチン化タンパク質の量は減少するが、ビオチン化は起こっていることが確認できた(図1B)。

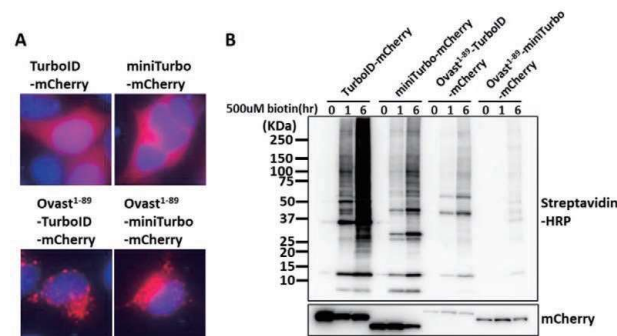


図1.

(A)HEK293細胞内でのTurboID-mCherry, miniTurbo-mCherry, Ovastacin1-89-TurboID-mCherry, Ovastacin1-89-miniTurbo-mCherryの局在 (B) 各タンパク質を強制発現させたのちに、培地中にビオチン溶液を加えて0, 1, 6時間、培養して、可溶化後にStreptavidin-HRPによりビオチン化タンパク質を検出した。

さらに、マウスの卵巣から回収したGV卵子にmRNAをマイクロインジェクションすることによって、それぞれのタンパク質の局在を確認したところ、TurboID-mCherryのタンパク質はmCherryのみ発現した卵子と同様に細胞質内への局在が確認された(図2)。一方で、Ovastacin¹⁻⁸⁹を融合させたmRNAをインジェクションすると、Ovastacin¹⁻⁸⁹-TurboID-mCherryのタンパク質は表層顆粒に

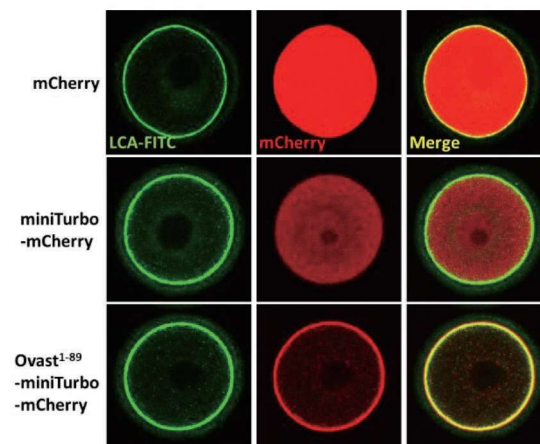


図2.

卵巣から回収したGV卵子にmCherry, miniTurbo-mCherry, Ovastacin1-89- miniTurbo-mCherryのmRNAをマイクロインジェクションして15時間培養後、パラフォルムアルデヒド固定して局在を観察した。LCA-FITC:表層顆粒マーカーとして使用した。

局在することが観察された。これらのことから、Ovastacin1-89を融合させることにより、ビオチン化酵素を表層顆粒に局在させることが可能であることが明らかになった。

次に、TGマウスを作製して、TG由来のタンパク質がどのような局在を示すのか免疫染色により確認した。C末端にV5 tagを挿入して、抗V5 Tag抗体を使用してタンパク質の局在を確認したところ、TurboID TG及びminiTurbo TGマウスの卵子において表層顆粒マーカーとして使用されるレクチンの一種であるLCAのシグナルと共局在を示した。しかしながら、すべての表層顆粒で共局在がみられるわけではなく、また表層顆粒が凝集することによってできたシグナルのようなものが確認された(図3)。

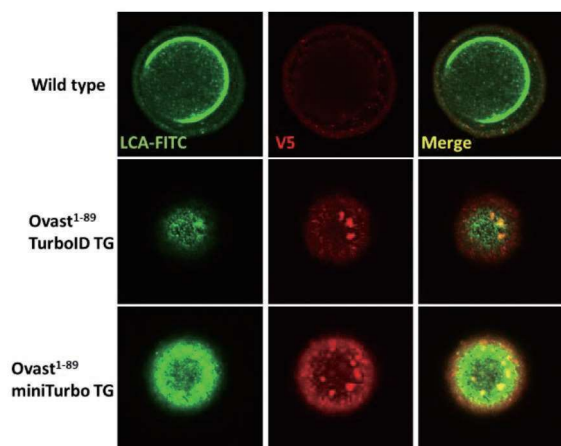


図3.

Wild type, Ovastacin1-89-TurboID TG, Ovastacin1-89-miniTurbo TGのマウスを過排卵処理して、回収したMII卵子を用いて抗V5 tag抗体によってTG由来のタンパク質の局在を観察した。

Immunoblotによってタンパク質の発現を確認したところ、いずれのTG卵子でもタンパク質の発現は確認できたもののシグナルは弱く、免疫染色の結果と同様にOvastacin¹⁻⁸⁹-miniTurboの発現量の方が多ことが分かった(図4A)。また、TurboID TGの卵子内でビオチン化を誘導することで、タンパク質のビオチン化を確認したところTG卵子でビオチン化タンパク質が確認できた(図4B)。

考 察

今回の結果から、Ovastacin¹⁻⁸⁹を融合させることで、ビオチン化酵素を生体内で表層顆粒特異的に発現させることが可能であることが分かった。しかしながら、表層顆粒内での発現は予想されたよりも弱く、表層顆粒の凝集が起こっていることが確認され

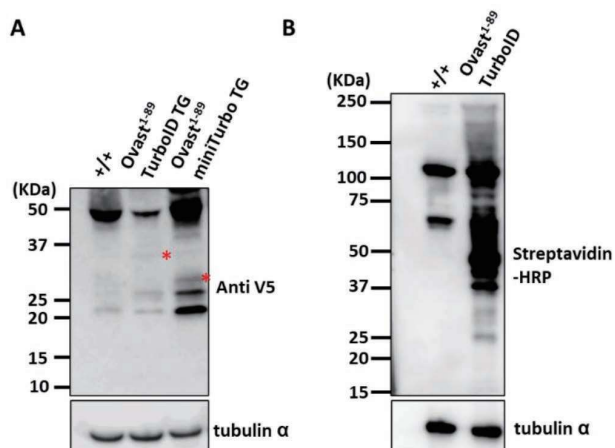


図4.

A) Wild type, Ovastacin1-89-TurboID TG, Ovastacin1-89-miniTurbo TGのマウスの卵巣からGV卵子を回収して、抗V5 tag抗体によってTG由来のタンパク質の発現を確認した。*:TG由来のタンパク質のシグナル (B) Wild type, Ovastacin1-89-TurboID TGのマウスの卵巣からGV卵子を回収して、ビオチン溶液を含んだ培地中で15時間培養してビオチン化を誘導後にStreptavidin-HRPによりビオチン化タンパク質を検出した。

た。この傾向はminiTurbo TGよりTurboID TGの方が強いことが確認された。これらのビオチン化酵素が報告された論文でもTurboIDがより酵素活性が強く、生体内で毒性が強いことが確認されており、その性質が卵子内での発現量や表層顆粒の凝集に影響を与えている可能性が考えられる。Immunoblotによる解析ではTurboID TG卵子内でビオチン化を誘導することにより、多くのビオチン化タンパク質が検出できており、これらのサンプルを質量分析にかけることによって表層顆粒に局在する新たな分子の同定を行い、不妊症に関連する分子機構の解明を進めていく。

参考文献

1. Tokuhiko K and Dean J , Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Dev Cell* 2018 46(5):627-640
2. Burkart AD, Xiong B, Baibakov B et al., Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol.* 2012 197(1):37-44,
3. Xiong B, Zhao Y, Beall S, Sadosky AB et al., A Unique Egg Cortical Granule Localization Motif Is Required for Ovastacin Sequestration to Prevent Premature ZP2 Cleavage and Ensure Female Fertility in Mice. *PLoS Genet.* 2017 13(1):e1006580
4. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD et al., Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol.* 2018 36(9):880-887

Abstract

We had previously reported that a novel polyspermy block system by transient sperm penetration block independent of ZP2 cleavage (Tokuhiro K et al., Dev Cell 2018 46(5):627-40). We also discovered that one of the molecular mechanisms of transient block is zinc sparks that is the release of massive Zn²⁺ immediately following fertilization. However, zinc sparks occur periodically for few hours after fertilization, the transient block exists for 8 hours. These data indicate other mechanisms of inhibiting sperm penetration through zona pellucida may exist in mammalian eggs. In this study, we tried to identify the proteins localized in cortical granules that is believed to contain essential proteins for polyspermy block mechanisms and to study the function of these proteins. We established transgenic mice lines that expressed a novel biotin ligase fused with the cortical granule localization signal under the promoter that induces oocyte-specific expression and are proceeding to analysis of these mice. We will perform MS analysis to identify the proteins that localized in cortical granules and analyze the phenotype of Knockout mice produced by CRISPR/Cas9 system. These data will help to uncover the mechanism of polyspermy block and identify the genes that cause female infertility.