慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes.
Sub Title	マウス卵子における開口放出関連蛋白質symaxinの発現について
Author	岩橋, 和裕
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.4 (2003. 12) ,p.21-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20031202-0021

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes.

（マウス卵子における開口放出関連蛋白質syntaxinの発現について）

岩　橋　　和　裕

内容の要旨

受精過程の中でおこる表層反応は、表層顆粒に含まれる加水分解酵素により透明帯外層の硬化と精子受容体に対するリガンドの不活化を引き起こす。その結果、透明帯での多精子受精の防御が完成すると考えられている。この表層反応は開口放出現象の一種であることより、近年、神経細胞にて確認されている開口放出関連蛋白質（SNARE蛋白質）が表層反応にも関与していることを示唆する報告が散見される。本研究では、SNARE蛋白質のひとつであるsyntaxinに着目し、マウス卵子でのその発現を確認することを目的とした。

ICR雌マウスを過排卵処理し、hCG投与後に回収したMetaphase II（MII）期卵とhCG投与後にICR雄マウスと交配させ回収した前核期卵を検体として使用した。マウス卵巣およびMII期卵からの抽出蛋白質を抗syntaxinポリクロナル抗体によるウェスタンブロットに供した。MII期卵を検体としてRT-PCRを施行し、卵子に発現しているsyntaxinのアイソフォームを確認した。MII期卵と前核期卵に対して抗syntaxin抗体による免疫組織化学染色を施行、同時にFITC結合LCAにて表層顆粒を染色し、共焦点蛍光顕微鏡下に観察した。さらに、MII期卵内におけるsyntaxinの局在を確認するために、抗syntaxin抗体を用いpreembedの金コロイド法にて染色後電子顕微鏡下に観察した。

マウス卵巣および卵子の抽出蛋白質において、抗syntaxin抗体に反応した35kDaのシングルバンドを認めた。MII期卵で施行したRT-PCRではsyntaxin 4に対応するPCR産物が得られ、マウス卵子に存在するsyntaxinはtype 4のアイソフォームであることが確認された。また、MII期卵においてはsyntaxinに対する蛍光は卵細胞膜と卵表層域に認められ、表層顆粒のない部分（cortical granule free domain）に一致した非染色領域を有するなど、表層顆粒の分布によく一致していた。受精後、すなわち表層反応後の前核期卵では、syntaxinに対する蛍光が卵表層域で減弱した。免疫電顕によるMII期卵内局在の検討では、syntaxinの存在をしめす金コロイドが表層顆粒膜上と卵細胞膜上に確認された。

本研究により、マウス卵子には開口放出関連蛋白質であるsyntaxinが存在し、そのアイソフォームはsyntaxinのtype 4であることが明らかになった。また、syntaxinは表層顆粒膜上と卵細胞膜上に存在することが示唆された。これらのことより、マウス卵子の表層反応においてもSNAREのひとつであるsyntaxinが、その開口放出過程に関与している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

表層反応は受精後に認められる最初の生理現象であり、多精子受精の防御機構として作用する。この表層反応は、神経シナプスにおける神経伝達物質の放出と同様に、開口放出の形式をとると考えられている。近年、神経細胞にて機能している開口放出関連蛋白質（SNARE蛋白質）が内分泌細胞での開口放出にも関与しているとの報告が散見される。本研究では、SNARE蛋白質の中でも、組織特異性のあるsyntaxinに着目し、マウス卵子での発現および生理作用について検討した。抗syntaxin抗体を用いたウェスタンブロットとRT-PCRの結果から、マウス卵子でのsyntaxin 4の発現が確認された。免疫染色の結果、未受精卵ではsyntaxinに対する蛍光は卵表層域に認められ、表層顆粒の分布によく一致し、受精後には卵表層域で減弱した。免疫電顕での局在の検討により、syntaxinが表層顆粒膜上と卵細胞膜上の両方に確認された。これらより、マウス卵子表層反応におけるsyntaxinの開口放出過程への関与が示唆された。

審査では、まず、本研究で用いたポリクロナル抗体の特異性に関して、抗原残基の検討や吸収試験の有用性などの助言があった。表層顆粒の染色の際、lens-culinaris-agglutinin（LCA）を使用する理由について質問がなされ、一般にレクチンは表層顆粒中の多糖類と結合することが知られており、なかでもLCAの特異性が高いとの回答があった。また、表層顆粒の意義を質問され、多精子受精の機序を含めた説明がなされた。SNARE蛋白質やG蛋白質など、膜融合に関連する種々の蛋白質について卵子での発現や機能を検討することで、表層反応の機序解明につながるとの助言があり、今後の課題であることが確認された。次に、今回の免疫染色の結果でsyntaxinが卵細胞膜上に存在すると判断できるかの問題提起があった。これに対し、免疫染色の実験では膜上に蛍光があるかどうかの明確な判断は困難であるが、再実験の結果での染色の傾向と免疫電顕での結果をあわせ、卵細胞膜上にも存在する判断をしたと回答された。また、受精後のsyntaxinの染色像で、蛍光が消失したのか、その分布が変化したのかの確認がなされ、受精卵でのmRNAや蛋白質の発現についても検討することの必要性が指摘された。免疫電顕の結果について、syntaxinが表層顆粒膜上に存在するか顆粒内に存在するかの議論があり、免疫電顕の試料作製方法によっても染色性に差が出ることなどの指摘がなされた。最後に、表層顆粒内容としてのどのような酵素があるかの質問に対し、ovoperoxidaseなど卵子に特異的な酵素が含まれているとの回答があった。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題は残しているものの、マウス卵子においてSNARE蛋白質syntaxin 4の発現を明らかにし、受精過程における表層反応の機構を解明する上で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　吉村　泰典
　　産婦人科学　野澤　志朗　　小児科学　高橋　孝雄
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：北島　政樹、野澤　志朗
　審査委員長：野澤　志朗

試問日：平成15年10月7日