



Title	SNAP-25 is essential for cortical granule exocytosis in mouse eggs
Author(s)	池淵, 佳秀
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41208">https://hdl.handle.net/11094/41208</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いけ 淵 佳 秀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 0 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	SNAP-25 is essential for cortical granule exocytosis in mouse eggs (膜融合蛋白 SNAP-25のマウス卵表層顆粒エキソサイトーシスにおける役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村田 雄二 (副査) 教 授 高井 義美 教 授 奥山 明彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

哺乳動物では、受精時に多数の精子が卵子内へと侵入し正常な発生を妨げる多精子受精を防止する機構が発達している。現在そのメカニズムとしては、卵細胞膜レベルでの受精阻止と、卵を取りまく透明帯レベルでの受精阻止が知られている。特に後者のメカニズムは、受精時におこる卵表層顆粒のエキソサイトーシスにより分泌される顆粒内容が、透明帯の性質を変えて、後続の精子の透明帯通過を防止するものとされている。この卵表層顆粒のエキソサイトーシスは、精子による卵細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇がトリガーとなり顆粒膜と細胞膜が融合する反応であるが、その過程における分子機構はあまり知られていない。近年、神経細胞で分泌小胞と細胞膜の融合に関与する膜融合蛋白 SNARE (SNAP-receptor protein) が同定され、内分泌細胞でもその関与が検討されている。そこで今回私は、SNAREの一つである SNAP-25の卵における発現とエキソサイトーシスにおけるその役割を検討した。

#### [方法]

未受精のマウス前核期卵・metaphase II 期卵は、過排卵誘発したマウスより、前者は卵胞内から、後者は卵管采から採取した。受精後の分割卵は交配後のマウス卵管より採取し以下の実験を行なった。(1)マウス未受精卵 (metaphase II) における SNAP-25の mRNA と蛋白の発現を、それぞれ RT-PCR 法および Immunoblot 法で検討した。(2)未受精 (前核期) から受精後 (8 分割) までの各ステージにおける卵を抗 SNAP-25抗体で標識、FITC 間接蛍光抗体法にて染色し SNAP-25の発現と細胞内の分布を共焦点顕微鏡を使用し検討した。(3) SNAP-25を基質蛋白として特異的に分解するボツリヌス毒素 A型を未受精卵にマイクロインジェクションし、受精時の卵表層顆粒エキソサイトーシスへの影響を TMA-DPH 細胞膜蛍光標識法で検討した。その際、マイクロインジェクションの操作により卵表層顆粒の分布には変化がないことを、表層顆粒を特異的に染色する FITC-LCA (lens culinaris agglutinin) を使用して確認した。さらにボツリヌス毒素注入時に、Glutathion-S-transferase 融合蛋白として精製した SNAP-25を同時にマイクロインジェクションし、表層顆粒エキソサイトーシスに対するボツリヌス毒素の作用を検討した。

### [結果]

(1)マウス未受精卵 (metaphase II) には SNAP-25の発現が, mRNA と蛋白レベルでみられることを確認した。(2)免疫蛍光染色法による SNAP-25蛋白の蛍光は、未受精卵では表層顆粒の分布に一致して卵細胞膜上およびその直下に存在していた。また蛋白の発現は未受精卵から 8 分割卵まで認められた。(3)マイクロインジェクションの操作に対して卵表層顆粒の分布に変化はなかった。ボツリヌス毒素A型をマイクロインジェクションした卵でのエキソサイトーシスは、不活化毒素を注入した卵でのエキソサイトーシスに比較して有意に抑制された。また、ボツリヌス毒素注入時に精製した SNAP-25を同時に注入すると、ボツリヌス毒素によるエキソサイトーシスの抑制が有意に rescue されることを確認した。

### [結論]

今回の実験で、マウス未受精卵 (metaphase II) に SNAP-25の発現が mRNA および蛋白レベルで認められること、さらに受精時卵表層顆粒エキソサイトーシスにおいて膜融合蛋白 SNAP-25が重要な役割を演じていることを初めて明らかにした。これらの結果より、マウス卵の透明帯レベルでの多受精拒否の分子機構として膜融合蛋白 SNARE が関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、本研究で膜融合蛋白 SNAP-25がマウス成熟卵に mRNA レベル、蛋白レベルで存在することを初めて明らかにした。また蛍光色素によるエキソサイトーシス評価法とボツリヌス毒素A型やリコンビナント SNAP-25を卵にマイクロインジェクションする方法を組み合わせた独創的な手法で、卵表層顆粒エキソサイトーシスにおいて、SNAP-25が重要な役割を演じていることを明らかにした。

本研究の結果は、マウス卵の透明体レベルでの受精拒否メカニズムの分子機構を明らかにしていくうえで重要な知見であり、学位の授与に値すると考えられる。