

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21112006

研究課題名(和文)哺乳類における配偶子融合の分子認証機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of gamete fusion in mammals

研究代表者

宮戸 健二(MIYADO, KENJI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 99,200,000円、(間接経費) 29,760,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵側融合因子である膜タンパク質CD9が融合前の卵細胞膜の反転に中心的な役割を果たしており、卵細胞膜が反転した結果として通常は細胞膜の裏打ちに存在するホスファチジルエタノールアミン(PE)の特定の分子種がCD9によって卵細胞膜から遊離し、卵由来エキソソームとなり、精子頭部に特異的に取り込まれ、一連のメカニズムの結果として精子と卵の膜融合が誘導されることを明らかにした。一方、IZUMO1についても結晶構造解析が進み、機能ドメインを明らかにした。加えて、精漿タンパク質SVS2の解析から、子宮内には殺精子作用がある物質が存在し、SVS2が殺精子因子から精子を保護していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mice, two membrane proteins, CD9 and IZUMO1, are required for sperm-egg fusion. Moreover, CD9-containing vesicles, termed egg exosomes, are released from eggs and transferred to the sperm, and then facilitate sperm fusion with the egg. Here we investigated that the egg exosomes play a role in conferring the nature of apoptotic cells on the sperm membrane by transferring inside-out CD9. Our results provide an insight into fertilization, proposing the sperm-egg fusion is controlled by a mechanism shared with phagocytosis of apoptotic cells. Moreover, we dissected IZUMO1 protein to determine the domains that were required for the function of sperm-egg fusion. We found that a fragment of the N terminus (Asp5 to Leu113) interacts with fertilization inhibitory antibodies. It also binds to the egg surface and effectively inhibits fusion in vitro. These findings suggest that the formation of a helical dimer at the N-terminal region of IZUMO1 is required for its function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：膜融合 哺乳類 CD9 IZUMO1 エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

受精は、新しい生命の起源となる1個の細胞を作るために、すべての生物が取り入れているメカニズムで、細菌でも受精に類似した接合現象が知られている。多様な生物種に共通したメカニズムがあるからこそ、現在のように多種多様な生物種が地球上に広がったと考えられる。しかしながら、ヒトを含めた生物全般において、その中核となる原理原則は不明である。種特異的なメカニズムの裏にある共通原理を見出すことが必要である。

一見すると全く異なる生殖戦略を採用しているように見える動物・植物でも、配偶子間の相互作用、特に配偶子融合では、類似した挙動が観察されている。更に、哺乳類の卵側融合因子としては CD9 が (Miyado et al. *Science*, 2000)、精子側の融合因子としては IZUMO1 (Inoue et al. *Nature*, 2005) が発見され、その後、植物の雄性配偶子側の融合因子として GSC1 が発見された (Mori et al. *Nature Cell Biol.*, 2006)。以上の発見から、配偶子融合を研究を進める状況が整ってきた。そこで、新学術領域研究を通じて、配偶子融合をより深く理解するための取り組みが始まった。

応用面について、生殖に関わる問題は、我々にとっても不妊、人口増加として、身近な問題であり、現在の動植物に共通した問題でもある。そのため、本研究の成果は、基礎研究への貢献だけでなく、生殖関連領域への応用面での貢献も大きいと考えられた。

2. 研究の目的

雌雄の生殖細胞による相互認識機構(アロ認証)は、雌雄同体の植物や海産動物において、同種異個体間での配偶子融合を促進し、自家和合を排除する仕組みである。当然のことながら、哺乳類は雌雄異体であるため、アロの関係にある個体由来の配偶子間相互作用に続いて、配偶子融合が起こると考えられる。本研究では、雌雄同体である植物と、雌雄異体である哺乳類の配偶子融合機構の研究を組み合わせることで、配偶子融合に関わる分子認証の仕組みの解明に取り組んだ。

『配偶子膜融合』に必須な精子膜タンパク質 GCS1 は、その高度な保存性から動植物の共通祖先が確立した原始的な雄側配偶子融合因子と考えられているが、ほ乳類では GCS1 に相同なアミノ酸配列をもったタンパク質が未だ同定されていない。更に、鳥類では GCS1、ほ乳類の有性配偶子融合因子である IZUMO1 共に同定されていない。一方、ほ乳類の雌側配偶子融合因子である CD9 に類似したテトラスパニン、動植物界に広く存在する。そこで、GCS1、IZUMO1 による膜融合機構の更なる解明と、テトラスパニンがコアとなる膜融合システムの共通原理を解明する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作製

CD9 および IZUMO1 欠損マウスは、常法に従って既に作製済みであった。それぞれのマウスの配偶子融合異常をレスキューするためのトランスジェニックマウス(TGマウス)も作製済みであった。

配偶子融合に加えて、精子の子宮内での受精能における精漿タンパク質の役割を解明するため、Seminal vesicle secretion 2 (SVS2) 遺伝子欠損マウスを東京大学の吉田学博士、桐蔭横浜大学の吉田薫博士と共同で作製した。更に、異常をレスキューするための TG マウスを作製した。

受精後の卵活性化機構を解明するため、ホスホリパーゼ C ζ (PLC ζ) 欠損マウスを浜松医科大学の伊藤昌彦博士と共同で作製、更に、精子特異的に発現するクエン酸合成酵素 (CSL) 遺伝子欠損マウスを東京医大の原田裕一郎博士、山口大学の岩尾康宏教授と共同で作製した。

β -カテニン欠損マウスは、米国ジャクソン研究所より購入し、卵特異的クレリコンピナーゼ発現マウス(Zp3-Cre TGマウス)との交配によって β -カテニン欠損卵を作製した。

野生型マウスとして、8~12週齢の C57BL/6N 雌マウス (SLC社) を用いた。

(2) 免疫染色および生化学的解析

ウエスタンブロット解析、免疫沈降、免疫染色のために、抗マウス CD9 抗体 (KMC8、BD Bioscience 社)、抗 IZUMO1 抗体 (大阪大学、伊川教授より供与)、抗 β -カテニン抗体 (15B8、シグマアルドリッチ社)、抗 E-カドヘリン抗体 (ECCD-2、タカラバイオ社) を用いた。また、パラフィン切片でも染色が可能な抗 CD9 抗体 (KMC8.8、サンタクルズ社) も用いた。

(3) 脂質成分の解析

卵側融合因子を解析する過程で、子宮由来の CD9 を含むエキソソームの脂質成分を解析した。スメアテストによって発情期のマウスを判別した後、子宮内よるピペットにより子宮内液(約 50 μ l/匹)を採取し、合計で 500 μ l まで集めた。その後、S-1000HR カラムで CD9 を含むフラクションを分離した。次に、C18 カラムで脂質成分を回収した。その後、TLC、2次元TLC、TLCプロット解析を行い、脂質の分子量、コントロールとして用いた脂質の混合液と比較検討した。回収した子宮内液は、NH₂ カラムでも回収し、3つの成分に分けて解析を行った。脂質はブリムリン染色試薬、リン脂質は Dittmer-Lester 染色試薬で染色した。

続いて、TLC プレート を PVDF 膜 に 転写 して、試料とマトリックスを混合して MADI-TOF-MS/MS 解析を行った。

更に、2,430 個のマウス卵を用いて、LC/MS/MS 解析を行った。

(4) 電子顕微鏡によるエキソソームの解析

卵および子宮内膜上皮細胞より放出される CD9 を含むエキソソームを透過型電子顕微

鏡で観察するため、千葉大学の年森清隆教授と共同研究を行った。

(5) 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行った。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

4. 研究成果

(1) 配偶子融合に先立つ細胞接着因子の解析

細胞膜の接着については、細胞接着因子である E-カドヘリン/ β -カテニン複合体について検討した結果、E-カドヘリン/ β -カテニン複合体は接着前の精子と卵細胞膜に存在し、 β -カテニン欠損卵では、精子との結合能が低下すること、E-カドヘリン/ β -カテニン複合体は、卵では α -カテニンに裏打ちされず、直接、アクチン繊維と結合していること、更に、精子が卵細胞膜に結合した直後、速やかに β -カテニンが卵細胞膜から離れ、分解されることが融合への移行に関わっていることを明らかにした。

(2) 配偶子融合における卵側からのアプローチ

配偶子融合については、公募班員の年森との共同研究から、CD9 を含む膜構造体である卵子エクソソームの構成成分を解析した結果、卵子エクソソームは卵細胞膜上での細胞膜の反転 (flip-flop) の結果として細胞膜成分の内側が露出する過程で形成されることを明らかにした(図1)。更に、卵子エクソソームの膜融合促進活性を担う因子として、タンパク質成分ではなく、ホスファチジルエタノールアミンの分子種が関与しており、飽和脂肪酸の18個の炭素鎖が融合促進活性に重要であることが明らかになった(図2)。

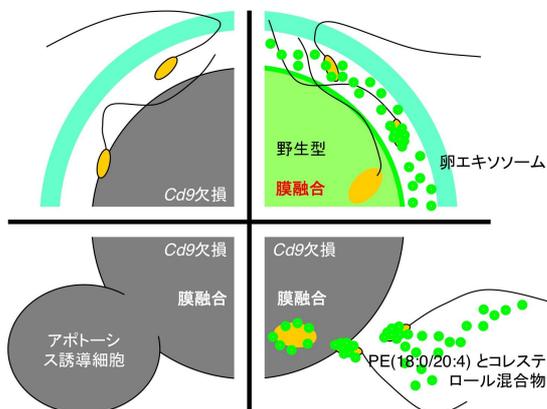


図1 卵エクソソームを介した配偶子融合

更に、CD9 と同様の構造をもったテトラスパニンの1つで卵に発現している CD81 は CD9 とは異なる構造体の成分として卵の細

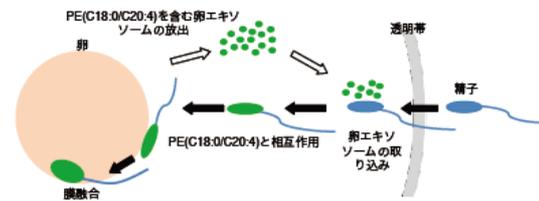


図2 卵エクソソームを介した配偶子融合

胞外に放出され、CD9 の機能を補佐する役割があることを明らかにした。

(3) 配偶子融合における精子側からのアプローチ

融合を阻害する IZUMO1 に対する複数のモノクローナル抗体のエピトープ解析から、種間でよく保存され、かつ IZUMO1 に特異的な配列である、N 末端領域の融合コア領域を明らかにした。種々の物性解析の結果、この領域は α ヘリックス含量が非常に高く、2 量体化を引き起こすことが明らかになった。さらに IZUMO1 を発現することで培養細胞を卵子細胞膜に接着させることに成功した。しかしこの系では双方の膜の融合は成立しない。このことから IZUMO1 を活性化型へと転換する何らかの機構が融合を誘起するために必要であると考えられた(図3)。

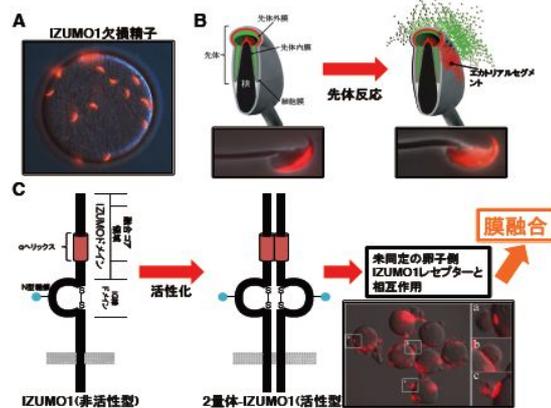


図3 IZUMO1を介した配偶子融合

(4) 精子由来の卵活性化因子の解析

配偶子融合後には、精子側から卵内に入る因子(精子ファクター)によって卵細胞質でのカルシウム波 (Ca^{2+} オシレーション) が誘導されるが、現在、2 つの因子が有力な候補と考えられている。しかし、遺伝子欠損による最終的な証明には至っていなかった。そこで、遺伝子改変マウスを作製し、解析を行った。

ホスフォリパーゼ $C\zeta$ は精子ファクターの最も有力な候補因子である。遺伝子改変マウスを作製したところ、ヘテロ欠損マウスで既に雄性不妊を発症した。しかし、解析を進めると、精子形成、特に減数分裂期へ移行が

障害されており、コントロールマウスに比べて、20分の1程度の数の成熟した形態をもった精子が作られるものの、卵管へ移行する能力がなく、体外受精によっても2細胞期胚を作ることができなかった。精子ファクターであることは否定できないものの、精子形成における役割が新たに見出された。

クエン酸合成酵素は、山口大学の岩尾教授、東京医科大学の原田博士らによって精子ファクターとして同定された因子である。マウスでは、精子特異的な CSL 遺伝子が存在することから CSL 遺伝子改変マウスを作製して、解析を行った。その結果、ホモ欠損個体でも雄性不妊には至らなかったが、全身の毛色が変化した。現在、更に解析を行っている。

以上のことから、精子ファクターについては検証することができなかった。

(5) 子宮内における精子防御機構の解明

公募班員の吉田との共同研究により、子宮には精子を殺す因子があり、精液中にはその因子から精子を保護するタンパク質として SVS2 が機能することを明らかにした(図4)。不妊の原因究明および新たな治療法の開発につながると思われる。

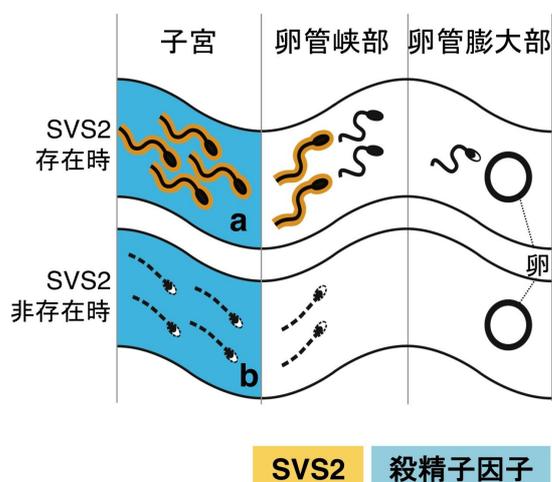


図4 SVS2による精子保護作用

(6) 考察

配偶子融合における分子メカニズムについて、一定の成果を出すことができ、共通原理の解明にも繋がったと考えられる。融合後の精子ファクターについては、まだ混沌とした状況であるため、新たな因子が見つかる可能性がある。精漿タンパク質の役割については、当初推測していた機能とは異なり、子宮内に存在する殺精子因子から精子を保護する役割が明らかになった。哺乳類の子宮内では、精子はキャパシテーションと呼ばれる活性化を経て、卵との融合能を獲得すると長い間考えられてきたが、精子の生存または死、で説明できる可能性がある。ただし、キャパシテーションが卵に近接した卵管内で起こっている可能性は考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 30 件)

Kawano N, Miyado K, Yoshii N, Kanai S, Saito H, Miyado M, Inagaki N, Odawara Y, Hamatani T, Umezawa A. Absence of CD9 reduces endometrial VEGF secretion and impairs uterine repair after parturition. *Sci Rep.* 2014 Apr 16;4:4701. doi: 10.1038/srep04701.

井上直和、宮戸健二 精子と卵子の膜融合・受精メカニズム新論争・細胞工学 Vol. 33. No.4, 2014.

Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamiyo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep.* 2014 Apr 8;4:4599. doi: 10.1038/srep04599.

Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11):4145-50. doi: 10.1073/pnas.1320715111.

Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Nov 21;11:108. doi: 10.1186/1477-7827-11-108.

Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development.* 2013 Aug;140(15):3221-9. doi: 10.1242/dev.094854.

Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One.* 2013 May 14;8(5):e63265. doi: 10.1371/journal.pone.0063265.

Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2013 Jun;352(3):739-50. doi: 10.1007/s00441-013-1605-y.

Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res.* 2013 Feb;22(1):195-200. doi: 10.1007/s11248-012-9635-x.

宮戸健二 テトラスパニンによる受精の膜融合制御 医学のあゆみ Vol.244, No.2,

181, 2013.

Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development*. 2012 Oct;139(19):3583-9. doi: 10.1242/dev.081778.

Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci*. 2012 Nov 1;125(Pt 21):4985-90. doi: 10.1242/jcs.100867. Epub 2012 Sep 3.

Inoue N, Nishikawa T, Ikawa M, Okabe M. Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):465-70. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.029.

Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open*. 2012 Jul 15;1(7):640-7. doi: 10.1242/bio.2012.1420.

Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T. Mamld1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology*. 2012 Dec;153(12):6033-40. doi: 10.1210/en.2012-1324.

Tsunoda S, Kawano N, Miyado K, Kimura N, Fujii J. Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during in vitro fertilization. *Biol Reprod*. 2012 Nov 29;87(5):121. doi: 10.1095/biolreprod.112.102129.

宮戸健二 卵由来エキソソームによる細胞融合の促進機構 医学のあゆみ Vol.241, No.11, 861-862, 2012.

Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 13;108(50):20008-11. doi: 10.1073/pnas.1116965108.

Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Sci Rep*. 2011;1:68. doi: 10.1038/srep00068.

Ito M, Imai M, Muraki M, Miyado K, Qin J, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: possible association with mitochondrial activity. *Aging (Albany NY)*. 2011

Dec;3(12):1213-23.

²¹ Kawano N, Yoshida K, Miyado K, Yoshida M. Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J Lipids*. 2011;2011:264706. doi: 10.1155/2011/264706.

²² Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011 Apr 14;11:22. doi: 10.1186/1471-213X-11-22.

²³ Ikawa M, Tokuhiko K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem*. 2011 Feb 18;286(7):5639-46. doi: 10.1074/jbc.M110.140152.

²⁴ Inoue N, Kasahara T, Ikawa M, Okabe M. Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PLoS One*. 2010 Apr 22;5(4):e10301. doi: 10.1371/journal.pone.0010301.

²⁵ Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci*. 2010 May 1;123(Pt 9):1531-6. doi: 10.1242/jcs.067363.

²⁶ Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):984-94. doi: 10.1172/JCI41585.

²⁷ Ito M, Miyado K, Nakagawa K, Muraki M, Imai M, Yamakawa N, Qin J, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. Age-associated changes in the subcellular localization of phosphorylated p38 MAPK in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 2010 Dec;16(12):928-37. doi: 10.1093/molehr/gaq076.

²⁸ Kawano N, Kang W, Yamashita M, Koga Y, Yamazaki T, Hata T, Miyado K, Baba T. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod*. 2010 Sep;83(3):359-69. doi: 10.1095/biolreprod.109.083089.

²⁹ Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res*. 2010 Jun;340(3):583-94. doi: 10.1007/s00441-010-0967-7.

³⁰ Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Toshimori K. Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse. *Biol*

Reprod. 2009 Nov;81(5):889-97. doi: 10.1095/biolreprod.109.077438.

該当なし

〔学会発表〕(計 4 件)

宮戸健二 テトラスパニンを介した細胞融合の分子メカニズム、ワークショップ「4回膜貫通蛋白質の構造と機能解析の進展」、第36回日本分子生物学会年会、2013.

宮戸健二 受精の膜融合における CD9 およびエキソソームの役割、シンポジウム「バイオイメージングにより明らかにされた動・植物の有性生殖メカニズム」、日本顕微鏡学会第68回学術講演会、2012

Inoue, N. 「The mechanism of sperm-egg fusion in mouse and the involvement of IZUMO1 and a novel factor」 Gordon Research Conferences “Cell-Cell Fusion In Sex, Life, Development and Disease”, University of New England (Biddeford, U. S. A.), 2011 年 8 月 9 日

Miyado, K. 「CD9 action in the egg and on the sperm of mice」 Cell-Cell Fusion, Gordon Research Conferences, Colby-Sawyer College (New London, U.S.A.), 2009 年 7 月 20 日

〔図書〕(計 3 件)

Sexual Reproduction in Animals and Plants, edited by Sawada H, Inoue N, Iwano M, Springer, 2014.

動植物の受精学 – 共通性と多様性 – 澤田均 編, 化学同人, 2014 年

Kawano N, Harada Y, Yoshida K, Miyado K. Role of CD9 in sperm-egg fusion and its general role in fusion phenomena. Cell Fusions, edited by Lars-Inge Larsson, Springer, 2011.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncchd.go.jp/research/nch/reproduction/staff_miyado.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

(1)研究代表者

宮戸 健二 (Miyado, Kenji)

国立成育医療研究センター・再生医療センター・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

(2)研究分担者

井上 直和 (Inoue, Naokazu)

福島県立医科大学・医学部附属生体情報伝達研究所・細胞科学研究部門・准教授

研究者番号：50379096

(3)連携研究者