

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15128

研究課題名(和文) IZUM01-JUNOで制御される配偶子間膜融合

研究課題名(英文) Regulation of IZUM01-JUNO in mammalian gamete fusion

研究代表者

齋藤 貴子 (Saito, Takako)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：10778038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の配偶子融合は精子細胞膜上のIZUM01とそのレセプターである卵子細胞膜上のJUNOの相互作用を介して引き起こされる。本研究では、IZUM01の発現量が異なる遺伝子改変マウスやJUNOへの結合領域に変異を挿入したマウスをCRISPR/Cas9システムを用いて作製した。遺伝子改変マウスの表現型解析から、受精率は精子上のIZUM01の量に多大な影響を受けていることが判明した。このことから、精子上のIZUM01タンパク質の量を調査することで、繁殖能力の予測や男性不妊症の検査への応用の可能性が示された。また、IZUM01-JUNOの相互作用が配偶子融合開始に必要な不可欠であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精における膜融合は、同種異個体の細胞同士が融合するという他では例のない現象である。有性生殖の最大の利点である遺伝子の多様性を造り出すためにも、精子と卵子の融合は生物にとって最も重要な機構の一つである。IZUM01-JUNOによって厳密に制御されている配偶子膜融合の解明を足がかりに、個体発生分化で起こる細胞間認識と融合の機構についても理解が広まると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sperm-egg fusion is accomplished through interaction of a specific set of membrane proteins in each gamete: sperm IZUM01 and oocyte JUNO. In this study, we produced mouse lines having different levels of IZUM01 expression and point mutations in IZUM01 for JUNO binding site by the CRISPR/Cas9 system. We observed that the mouse fertilization rate is highly affected by the density of IZUM01 protein in sperm using gene modified mouse lines. These results suggest that evaluating IZUM01 protein levels is useful for predicting fecundity, and suitable as a test for male fertility. Also we revealed that IZUM01-JUNO interaction is essential for the beginning of gamete fusion.

研究分野：生殖生物学、発生生物学、細胞生物学

キーワード：受精 精子 卵子 膜融合 IZUM01 JUNO

1. 研究開始当初の背景

受精は生命の始まりであり、精子と卵子は複雑な過程を経て受精を成立させる。特に、最終過程である配偶子融合は、非常に厳密な分子機構が存在すると考えられている。受精の機構は古くから研究されてきた分野の一つであるにも関わらず、現段階ではその仕組みの一端しか解明されていない。近年、目覚ましい発展を遂げている生殖補助医療技術を考えてみても、特にその安全性を担保するためには根底にある受精の分子機構の解明が急務となっている。

配偶子融合に必須である精子膜タンパク質は 2005 年に世界で初めて発見された (Inoue N et al, Nature 2005)。この遺伝子を欠損した雄マウスは形態的に正常な精子を産生するにも関わらず、完全な雄性不妊を示す。このように、この因子は受精にとって重要なタンパク質であることから、縁結びの神様として知られる出雲大社にちなんで **IZUMO** (イズモ) 1 と名付けられた。

精子と卵子の膜融合に必須である精子側の因子 **IZUMO1** は細胞外に免疫グロブリン様ドメインを持つ I 型の膜タンパク質で、先体反応と呼ばれるエキソサイトーシスによって先体から精子頭部の細胞膜上に局在するようになる (Satouh Y et al, J Cell Sci 2012)。**IZUMO1** ノックアウトマウスは配偶子間融合不全により雄性不妊となり (Inoue N et al, Nature 2005)、**IZUMO1** の N 末端のコア領域を介した二量体化が膜融合に必須であることが示唆されている (Inoue N et al, Development 2013)。さらに 2014 年には卵子の細胞膜上に存在する GPI アンカー型膜タンパク質である **JUNO** が **IZUMO1** の受容体として発見された (Bianchi E et al, Nature 2014)。**JUNO** 欠損マウスの雌は正常な形態の卵子を産生するが、**JUNO** を欠損した卵子は精子との融合能を持たない。2015 年には、**IZUMO1** 発現細胞が卵子表面に接着する現象を利用して、単量体の **IZUMO1** と **JUNO** の相互作用がトリガーとなり (図 1. a, b)、**IZUMO1** は構造変化を伴って二量体化されることが報告された (図 1. c, d)。二量体化した **IZUMO1** は、**JUNO** と速やかに解離することから (図 1. d)、精子と卵子の強い結合を維持する因子の存在が強く示唆されている (Inoue N et al, Nat Commun 2015)。配偶子の膜融合には、**JUNO** と **IZUMO1** の相互作用と **IZUMO1** の二量体型へのダイナミックな構造変化 (図 1. c, d)、そして **IZUMO1** の構造変化を特異的に認識する卵子側の分子機構が不可欠と考えられる (図 1. d)。さらに、**JUNO** と **IZUMO1** の単独及び複合体の立体構造が解き明かされ (Ohto U et al, Nature 2016, Aydin H et al, Nature 2016)、**IZUMO1** と **JUNO** を基盤とした受精の膜融合研究が大きく前進している。

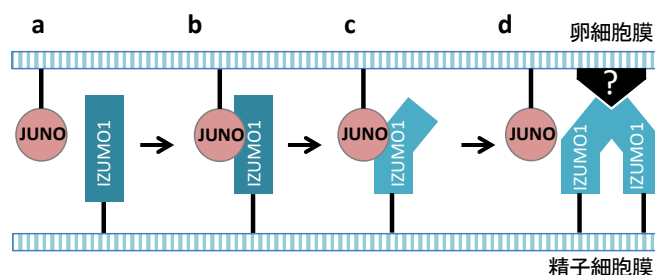


図 1. 膜融合の模式図

2. 研究の目的

精子細胞膜上の **IZUMO1** と卵子細胞膜上の **JUNO** が、精子と卵子の膜融合を引き起こす中心的役割を担っていることが示されたが、これらの相互作用が直接的に作用しているのか、どのように膜融合を開始させるのか、他の分子が相互作用には必要であるのか、未だ明らかになっていない。本研究では配偶子間膜融合における **IZUMO1**-**JUNO** 融合制御系を足がかりに、生化学的解析、分子生物学的解析、さらには遺伝子改変動物実験を駆使して、どのように配偶子が正しく融合するのかを分子レベルで解き明かすことを目的にしている。

3. 研究の方法

IZUMO1-JUNO 複合体の立体構造から、IZUMO1 と JUNO の相互作用に直接作用するアミノ酸残基が明らかになっている (Ohto U et al, Nature 2016, Aydin H et al, Nature 2016)。本研究では、IZUMO1-JUNO 相互作用に必須なアミノ酸残基にミューテーションを挿入した変異型 IZUMO1 と変異型 JUNO のリコンビナントタンパク質を、哺乳類細胞に発現させ、その機能解析を行った。次に、実際に配偶子上で発現する変異体の挙動解析を行うために、変異型 IZUMO1 と変異型 JUNO を持つマウスを作製し、これらの遺伝子改変マウスの表現型解析を遂行した。

4. 研究成果

(1) IZUMO1 の alternative splicing で生まれる IZUMO1_v2 の発現および機能解析

ヒトなど真核生物のゲノム DNA 上の遺伝子は、一次メッセンジャーRNA (mRNA) として転写され、イントロンを除いてエクソン配列のみを連結させるスプライシングによって編集されて成熟 mRNA となり、タンパク質に翻訳される。この厳密なセントラルドグマにおいて、特にスプライシングでは曖昧さがあることが知られている。その結果、異なるエクソンを生む“選択的 (alternative) スプライシング”によって一つの遺伝子から異なる配列を持つ mRNA が生じ、複数のタンパク質が産生される。

IZUMO1 の機能解析を行っている過程で、一つの IZUMO1 遺伝子からオリジナルの IZUMO1 (IZUMO1_v1) の他に、選択的スプライシングによって第二の IZUMO1 (IZUMO1_v2) が産出されていることを見出した。IZUMO1_v2 は、IZUMO1_v1 と異なる第 1 エクソン b から翻訳される 52 アミノ酸残基の長いシグナル配列を有している (図 2a)。Izumo1_v2 の mRNA レベルでの発現量は非常に低いが、成熟タンパク質の配列は IZUMO1_v1 と同じであること、IZUMO1_v2 を発現させた培養細胞は IZUMO1_v1 と同様に卵細胞に接着することから、IZUMO1_v2 はオリジナルである IZUMO1_v1 のバックアップとして機能していることが示唆された。

新たに発見された IZUMO1_v2 が生理的に機能しているのかを明らかにするため、オリジナルの IZUMO1_v1 を特異的に欠損させたゲノム編集マウス (v1KO) を作製した (図 2. b)。その結果、IZUMO1_v2 は非常に微量 (オリジナルの約 1/20 量) しか精子に存在しないことが判明した。しかし、このマウスを野生型のメスマウスと交配させると、産まれてくる仔マウスの数は有意に減少するものの、受精自体は正常に成立することが明らかになった (図 2. c)。このことから、我々は *Izumo1* 遺伝子の損傷など、何らかの理由で IZUMO1 が産生できない非常事態に陥ったとしても、IZUMO1_v2 が子孫を残すための安全装置として働くと結論付けた。

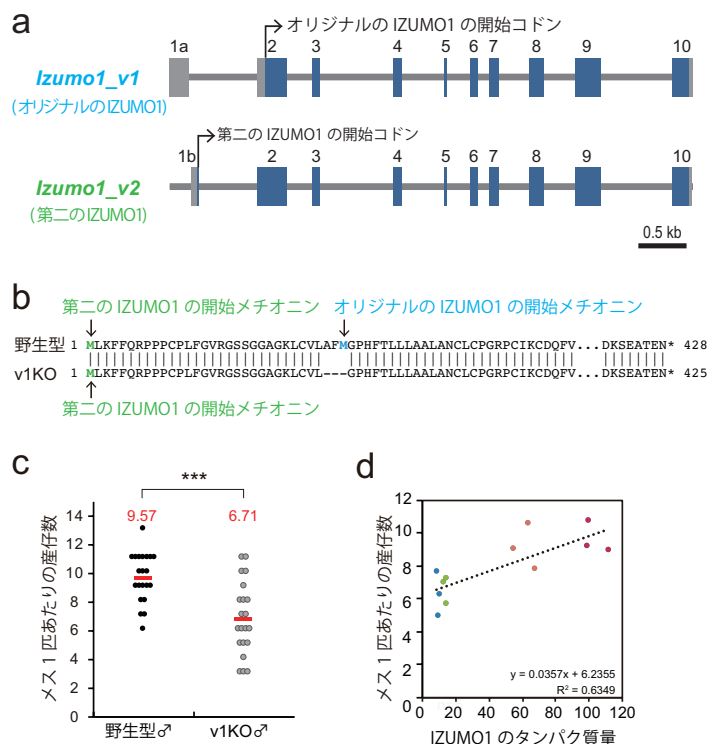


図 2. Alternative splicing で産生される IZUMO1_v1 と IZUMO1_v2、および IZUMO1 タンパク質量と産子数の関係

(2) IZUMO1 のタンパク質量と妊孕性の関係

さらに我々は、種々の遺伝子改変マウスを駆使して精子上の IZUMO1 タンパク質の量を変動させ、そのタンパク質量と産仔数が相関関係にあることも明らかにした。すなわち、IZUMO1 タンパク質の量が減少すると受精の成功率も減少する (図 2. d)。以上の結果から、IZUMO1 タンパク質を指標として精子の「質」を評価することが可能であり、生殖補助医療の成功率を上昇させる可能性も示唆された。このようなことから、何らかの方法で IZUMO1 タンパク質の発現量を制御することができれば、新たな避妊薬や不妊治療の開発などに活用できると期待される。

(3) 変異型 IZUMO1 を用いた IZUMO1-JUNO 融合制御系の解析

IZUMO1-JUNO 制御系の機構解明に向けて、IZUMO1-JUNO 複合体の立体構造から明らかになった“相互作用に必須なアミノ酸残基”に変異を挿入したりコンビナントタンパク質を、哺乳類細胞発現系を用いて作製した。相互作用部位の一塩基置換は、それぞれのタンパク質のフォールディングに影響を与えず、野生型と変わらず細胞膜上に局在することを確認した。変異型 IZUMO1 と変異型 JUNO はそれぞれの相手となる配偶子への結合能を消失したため、標的アミノ酸が IZUMO1-JUNO の相互作用を担っていることを明らかにした (図 3. a, b)。

次に、変異型 IZUMO1 マウスと変異型 JUNO マウスを作製した。これらの遺伝子改変マウスの表現型解析から、IZUMO1 と JUNO それぞれのアミノ酸残基を 1 残基置換するだけで、IZUMO1-JUNO の相互作用が失われ、これらの遺伝子改変マウスは受精能がなく (図 3. c)、不妊を示すことを突き止めた。

作製した遺伝子改変マウスは、変異型 IZUMO1 あるいは変異型 JUNO を持つため、IZUMO1 や JUNO を欠損させたことで他分子が影響を受けてしまい本来の表現型を観察できないという懸念を払拭する。これらの遺伝子改変マウスは IZUMO1-JUNO の相互作用のみを欠如するため、IZUMO1-JUNO 制御機構のさらなる表現型解析が可能となった。配偶子融合の能力を検証するための融合アッセイにより、IZUMO1-JUNO の相互作用が配偶子融合開始に必要な不可欠であることが示された。この結果は、配偶子の膜融合は IZUMO1-JUNO の相互作用に依存しており、IZUMO1-JUNO の相互作用を起点として融合が始まることを示唆している。

精子と卵子の融合は一瞬で完了してしまうため、融合前後の分子動態を観察することは困難であった。しかし、これらの遺伝子改変マウスを利用することで、膜融合直前までの精子と卵子の動態を観察することが可能になった。そこで、精子と卵子の結合の瞬間をライブイメージングで捉え、IZUMO1 と JUNO がどのように膜融合を引き起こすのか、その分子動態の解明に取り掛かった。変異型 IZUMO1 と変異型 JUNO を持つ遺伝子改変マウスを用いた受精のライブイ

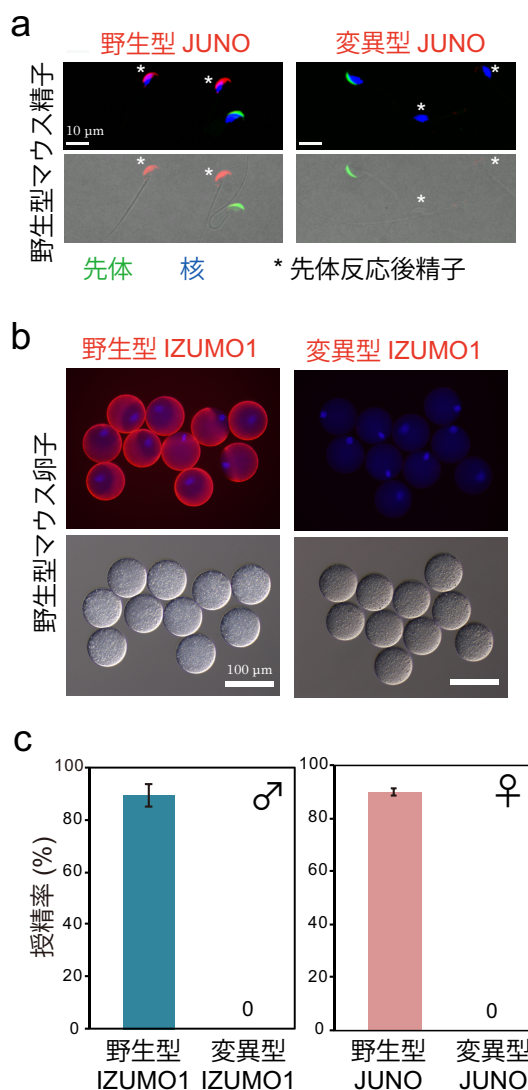


図 3. 変異型 IZUMO1 と変異型 JUNO の解析

メーキングから、精子と卵子の接着は **IZUMO1** と **JUNO** の相互作用に依存していることが明らかになった。これまで **IZUMO1** と **JUNO** は膜融合に機能していると考えられてきたが、融合の前段階である配偶子間の接着に大きく関与していることが示された。

一方、**IZUMO1** に複数変異を導入すると、複数変異 **IZUMO1** は精巣においてタンパク質として発現しているにも関わらず、精子細胞膜上には局在しないことが明らかになった。このことは、**IZUMO1** が他分子によって精巣から精子先体内膜（先体反応後の卵子との融合部位）へ輸送されることを示唆しており、変異の導入によって輸送を担う分子が **IZUMO1** へ作用できず **IZUMO1** の輸送が機能しなくなったことが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saito Takako, Wada Ikuo, Inoue Naokazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Sperm IZUM01-Dependent Gamete Fusion Influences Male Fertility in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4809 ~ 4809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takako Saito, Ikuo Wada, Naokazu Inoue	4. 巻 9
2. 論文標題 Alternative splicing of the Izumo1 gene ensures triggering gamete fusion in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40130-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Naokazu, Saito Takako, Wada Ikuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Unveiling a novel function of CD9 in surface compartmentalization of oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.189985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kang Woojin, Suzuki Miki, Saito Takako, Miyado Kenji	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Role of TCA Cycle-Related Enzymes in Human Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13057 ~ 13057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222313057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Takako, Sawada Hitoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Fertilization of Ascidians: Gamete Interaction, Self/Nonself Recognition and Sperm Penetration of Egg Coat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.827214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 齋藤貴子	4. 巻 49
2. 論文標題 選択的スプライシングが子孫を残すための安全装置として働く	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光が丘	6. 最初と最後の頁 56~58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Saito Takako, Wada Ikuo, Inoue Naokazu
2. 発表標題 Sperm IZUM01 dependent gamete fusion influences male fertility in mice
3. 学会等名 Gordon Research Conferences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤貴子、和田郁夫、井上直和
2. 発表標題 Izum01遺伝子の選択的スプライシングによってマウスの配偶子融合は保証される
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤貴子、和田郁夫、井上直和
2. 発表標題 Alternative splicing of the Izumo1 gene ensures triggering gamete fusion in mice
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関