

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03172

研究課題名（和文）融合因子SOFの機能解析を通じた精子-卵子の細胞膜融合機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of sperm-egg fusion using genetically modified mice

研究代表者

野田 大地（Noda, Taichi）

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：50712551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：精子は卵細胞膜と接着・融合して受精する。本研究では、どのように受精するのかその分子メカニズム解明を目指して、遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで解析を行った。具体的には、精巣で強発現するDcst1あるいはDcst2を欠損（KO）したマウスをCRISPR/Cas9を使って作製した。いずれのKO雄マウスと交尾した雌マウスからは、ほとんど産仔が得られなかった。そこで、KO精子を卵と共培養したところ、KO精子は卵を覆っている透明帯を通過して、卵と接着できるものの融合できなかった。以上からDCST1やDCST2は融合に必須な精子タンパク質であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者や共同研究者らは、精子受精能力に関わる因子の同定を目的として、精巣で強発現する遺伝子を中心にKOマウスを作製して表現型スクリーニングを行っている。その結果、今回の成果も含めて、6つの精巣タンパク質が精子と卵の融合に必要であることを同定できた。これらの成果は、男性不妊の新たな原因遺伝子として診断・検査の対象となり、治療薬や避妊薬の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Sperm bind to and fuse with eggs, leading to the fertilization. The objective of this study is to identify factors for the sperm-egg interaction using genetically modified mice. Specifically, I generated Dcst1 or Dcst2 knockout (KO) mice using CRISPR/Cas9. Female mice mated with these KO males hardly deliver the pups. When KO sperm were incubated with eggs, the KO sperm could pass through the zone pellucida and bind to eggs. However, these sperm hardly fused with eggs. These results indicate that DCST1 and DCST2, sperm proteins, are essential for sperm-egg fusion.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 精子 融合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

雌性生殖道内に射出された精子は、卵管膨大部に到達すると、精子先体胞からの酵素の放出(先体反応)や、飛び跳ねるような激しい運動(超活性化)を示して、卵丘細胞層や透明帯を通過したのち、卵細胞膜と接着して融合する。融合した精子は、父性染色体を卵に送り込むと同時に、卵を活性化して受精が成立する。本課題では、精子と卵の接着・融合に注目する。

現在までに、融合に関わる因子として、精子側では IZUM01 (Inoue et al., Nature, 2005) 卵側では CD9 (Miyado et al., PNAS, 2008) と JUNO (Bianchi et al., Nature, 2014) が報告されている。具体的には、CD9 は足場タンパク質としての機能を持ち、正常な卵微絨毛の形成や分布に必要である (Runge et al., Dev Biol, 2007)。IZUM01 は、先体反応前には精子先体膜に局在するが、先体反応すると精子頭部全体へと広がり、特に赤道節に局在する IZUM01 が卵との融合に重要である (Satouh et al., JCS, 2012)。さらに、IZUM01 のレセプターとして、卵細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質 JUNO が同定された。しかしその後、培養細胞を用いた実験により、IZUM01 は精子と卵の細胞膜融合ではなく、接着に関与することが示唆されており、配偶子の接着・融合に関わる分子メカニズムは混沌としている。

2. 研究の目的

精子と卵の細胞膜融合は、父性染色体を卵へと送り込み、卵を活性化させる(受精成功の)ために必須なステップであるが、その全容はよく分かっていない。本研究では、哺乳類配偶子の接着・融合メカニズムの解明を目標とする。

3. 研究の方法

【遺伝子欠損マウスの作製】

それぞれの遺伝子のタンパク質コード領域を欠損させるように guide RNA (gRNA) を設計して、受精卵や ES 細胞に gRNA/Cas9 を発現させた。F0 変異マウスを野生型マウスと交配させて、得られた F1 ヘテロ変異マウス同士の交配によって、ホモ変異 (KO) マウスを作出した。

【KO 雄マウスの妊孕性】

KO 雄マウスを野生型雌マウスと 1 か月以上同居させて、交尾当たりの産仔数を調べた。また、ホルモン処理 (PMSG や hCG を投与して過排卵を誘起) した野生型雌マウスと KO 雄マウスを交配させて、交配 6 時間後の卵管から卵を回収して、受精 (前核の有無や 2 細胞期胚への発生) の有無を調べた。

【KO マウス精子の特性解析】

ホルモン処理した雌マウスの卵管から卵を採取して、その一部はコラゲナーゼ処理により透明帯を除去した後、Hoechst33342 で染色した。精巢上体尾部から採取した精子を PBS で懸濁 (精子形態) あるいは TYH (精子の運動性や受精能力) で前培養した。前培養 2~3 時間後、一部の精子の運動性を精子運動解析システム Ceros により解析するとともに、スライドガラスに塗抹して、免疫染色に使用した。残った精子を泳がしている培地中に rat anti-mouse IZUM01 抗体を入れて、さらに 30 分間培養した。その後、その精子と透明帯除去卵を抗体 (rat anti-mouse IZUM01 抗体と goat anti-rat IgG Alexa 488 抗体) を入れた TYH 培地で共培養して、精子の卵への接着・融合能力を調べた。

4. 研究成果

初めに、IZUM01 が配偶子接着あるいは融合のどちらに必須な因子かを調べるため、精子の先体領域を緑色 (EGFP) 尾部を赤色 (DsRed) で標識したマウス *Izumo1* KO 精子と透明帯除去卵を共培養した。先行文献と同様に、*Izumo1* KO 精子は卵に接着したが、融合しなかった。そこで、接着している精子が先体反応をした (受精可能な) 精子なのか、先体反応をしていない (受精できない) 精子なのかを GFP 蛍光の有無により判別したところ、接着しているほとんどの精子が GFP 蛍光を持つ (受精できない) 精子だった。通常の受精において、精子は卵透明帯を通過するまでに先体反応を起こして、先体反応後の精子が卵細胞膜と相互作用する。しかし、精子の卵への接着・融合能力を調べるアッセイ系では、卵透明帯を除去した卵を用いるため、通常の受精では起こらない現象を観察していたと考えられる。さらにゲノム編集技術を使って *Izumo1* KO ラットの作製にも成功して、マウス同様にラット *Izumo1* KO 精子も卵細胞膜とほとんど接着できなかった。以上から、IZUM01 は配偶子の融合よりも接着に重要な役割を果たすことが分かった (Matsumura T, Noda T et al., Front Cell Dev Biol, 2022)。

配偶子融合に関与する因子を見つけるため、公開されている single cell RNA-seq データベースから、*Izumo1* と精巣生殖細胞での発現パターンが類似する 2 遺伝子 (*Dcst1* および *Dcst2*)

を選んで、CRISPR/Cas9 を使って KO マウスを作製した。得られた KO 雄マウスを野生型雌マウスと同居させたとこ、交尾した雌マウスからはほとんど産仔が得られなかった。これらの KO 雄マウスの精巣重量、精子形成、精巣上体尾部に蓄えられている精子の形態や運動性は、コントロール雄マウスとほぼ同じで正常だった。また、これらの KO 精子における IZUMO1 の存在量や局在も問題なかった。そこで、それぞれの KO 雄マウスと交尾 6 時間後の野生型雌マウスの卵管から卵を回収して観察すると、KO 精子は卵透明帯を通過しているものの前核は形成されておらず、囲卵腔（透明帯と卵の間のスペース）に溜まっていた（図 1）。そこで、それぞれの KO 精子を透明帯除去卵と共培養したところ、KO 精子は先体反応を起こして卵細胞膜に結合できるものの、融合できないことが分かった（図 2）(Noda T et al., Commun Biol, 2022)。以上から、精子タンパク質 DCST1 および DCST2 は配偶子融合に必須な因子であることが明らかになった。このような成果も含めて、現在では配偶子融合に関わる 6 つの精子タンパク質が同定されている。今後その分子メカニズム解明に迫っていききたい。

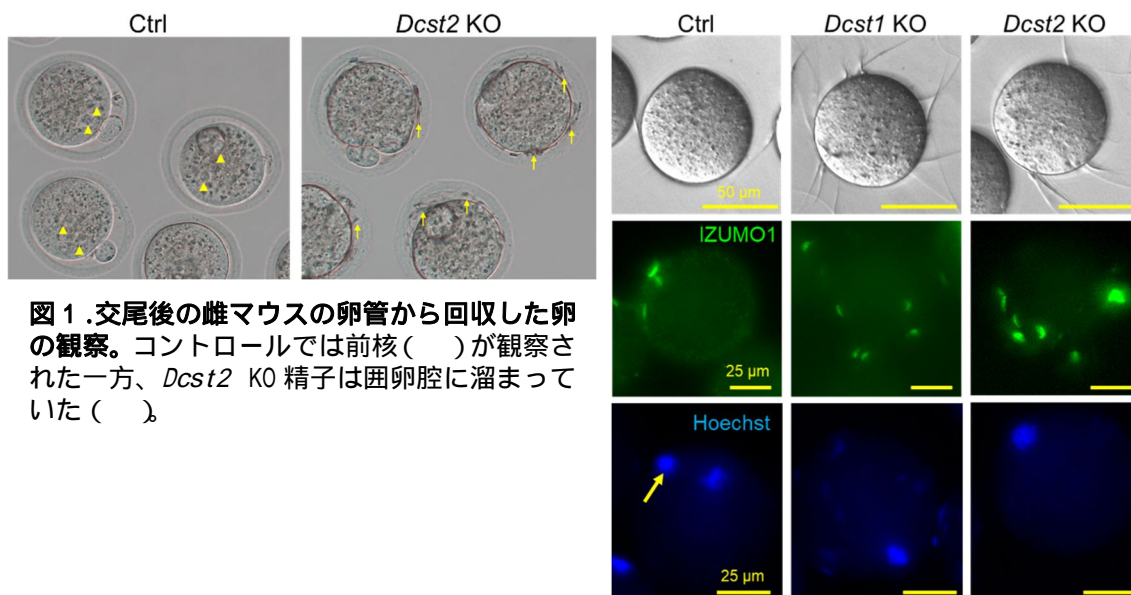


図 1. 交尾後の雌マウスの卵管から回収した卵の観察。コントロールでは前核()が観察された一方、*Dcst2* KO 精子は囲卵腔に溜まっていた()。

図 2 精子の卵への接着・融合能力の観察。*Dcst1* や *Dcst2* の KO 精子も卵に接着していて、そのいくつかは IZUMO1 で染まっていた(受精できる先体反応後の精子のみが IZUMO1 で染まる)。一方、Hoechst で染まっている *Dcst1* や *Dcst2* の KO 精子核()はほとんど観察できなかった(ヘキストを卵にあらかじめ取り込ませているので、精子が卵と融合すると、卵のヘキストが精子核へと移行して、精子核もヘキストで染色される)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Noda Taichi, Blaha Andreas, Fujihara Yoshitaka, Gert Krista R., Emori Chihiro, Deneke Victoria E., Oura Seiya, Panser Karin, Lu Yonggang, Berent Sara, Kodani Mayo, Cabrera-Quio Luis Enrique, Pauli Andrea, Ikawa Masahito	4. 巻 5
2. 論文標題 Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03289-w	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 該当する
1. 著者名 Oura Seiya, Hino Toshiaki, Satoh Takashi, Noda Taichi, Koyano Takayuki, Isotani Ayako, Matsuyama Makoto, Akira Shizuo, Ishiguro Kei-ichiro, Ikawa Masahito	4. 巻 18
2. 論文標題 Trim41 is required to regulate chromosome axis protein dynamics and meiosis in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010241	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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Tokuhiko Keizo, Iida-Norita Rie, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca ²⁺ -activated acrosome reaction and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ade7607	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 Lu Yonggang, Shimada Kentaro, Tang Shaogeng, Zhang Jingjing, Ogawa Yo, Noda Taichi, Shibuya Hiroki, Ikawa Masahito	4. 巻 120
2. 論文標題 1700029I15Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2207263120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2207263120	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 該当する

1. 著者名 Shimada Keisuke, Park Soojin, Oura Seiya, Noda Taichi, Morohoshi Akane, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 120
2. 論文標題 TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2221762120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221762120	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 該当する

1. 著者名 Matsumura Takafumi, Noda Taichi, Satouh Yuhkoh, Morohoshi Akane, Yuri Shunsuke, Ogawa Masaki, Lu Yonggang, Isotani Ayako, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Sperm IZUM01 Is Required for Binding Preceding Fusion With Oolemma in Mice and Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 810118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.810118	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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Oyama Yuki, Oura Seiya, Noda Taichi, Ikawa Masahito	4. 巻 148
2. 論文標題 FAM71F1 binds to RAB2A and RAB2B and is essential for acrosome formation and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199644	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 Zhang Xin, Sun Jiang, Lu Yonggang, Zhang Jintao, Shimada Keisuke, Noda Taichi, Zhao Shuqin, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto, Zhou Shushu, Wu Jiayan, Ikawa Masahito, Liu Mingxi	4. 巻 134
2. 論文標題 LRRC23 is a conserved component of the radial spoke that is necessary for sperm motility and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259381	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 Oura Seiya, Noda Taichi, Morimura Naoko, Hitoshi Seiji, Nishimasu Hiroshi, Nagai Yoshitaka, Nureki Osamu, Ikawa Masahito	4. 巻 4
2. 論文標題 Precise CAG repeat contraction in a Huntington's Disease mouse model is enabled by gene editing with SpCas9-NG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02304-w	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 Larasati Tamara, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Shimada Keisuke, Tobita Tomohiro, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 254 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa060	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 該当する

1. 著者名 Sun Jiang, Lu Yonggang, Nozawa Kaori, Xu Zoulan, Morohoshi Akane, Castaneda Julio M, Noda Taichi, Miyata Haruhiko, Abbasi Ferheen, Shawk Hossam H, Takahashi Satoru, Devlin Darius J, Yu Zhifeng, Matzuk Ryan M, Garcia Thomas X, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based genome editing in mice uncovers 13 testis- or epididymis-enriched genes individually dispensable for male reproduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 183 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa083	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 該当する

1. 著者名 Iida Norita Rie, Miyata Haruhiko, Kaneda Yuki, Emori Chihiro, Noda Taichi, Nakagawa Tatsuya, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of humanized LDHC knock in mice as a tool to assess human LDHC targeting contraceptive drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 840 ~ 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13359	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 該当する

1. 著者名 Noda Taichi, Taira Ayumu, Shinohara Hina, Araki Kimi	4. 巻 72
2. 論文標題 The testis-, epididymis-, or seminal vesicle-enriched genes Aldoart2, Serpina16, Aoc113, and Pate14 are not essential for male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 314 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.22-0158	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 Noda Taichi, Shinohara Hina, Kobayashi Sumire, Taira Ayumu, Oura Seiya, Tahara Duri, Tokuyasu Midori, Araki Kimi, Ikawa Masahito	4. 巻 110
2. 論文標題 Multiple genes in the Pate5-13 genomic region contribute to ADAM3 processing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 750 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaoe008	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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野田 大地
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた受精関連因子の機能解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第41回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野田 大地
2. 発表標題 遺伝子組換えマウスを用いた受精メカニズムの解明
3. 学会等名 新学術領域研究 (全能性プログラム、配偶子インテグリティ)、熊本大学発生医学研究所、大阪大学蛋白質研究所の共催、シンポジウム- "生殖細胞と減数分裂研究の過去、現在、未来" (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田 大地
2. 発表標題 マウスとゼブラフィッシュにおいて精子膜タンパク質DCST1/2は精子と卵の相互作用に関わる
3. 学会等名 令和3年度先端モデル動物支援 プラットホーム成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田 大地
2. 発表標題 精子 - 卵の融合に必須な精子タンパク質の同定
3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会、若手企画（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平 歩夢、篠原 日菜、荒木 喜美、野田 大地
2. 発表標題 精巣、精巣上体、あるいは精嚢腺で強発現する 4 遺伝子は雄マウスの妊孕性に必須ではない
3. 学会等名 第70回実験動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠原 日菜、荒木 喜美、伊川 正人、野田 大地
2. 発表標題 精巣上体で発現する複数のPateファミリー遺伝子が精子成熟のために協調して機能する
3. 学会等名 第95回日本遺伝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平 歩夢、荒木 喜美、野田 大地
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた精嚢腺分泌タンパク質AOC1L3とPATE14の機能解析
3. 学会等名 第95回日本遺伝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野田 大地
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを使った受精メカニズムの解明
3. 学会等名 第38回日本生殖免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 野田 大地、伊川 正人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 14
3. 書名 最新のゲノム編集技術と用途展開	

1. 著者名 野田 大地、伊川 正人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 11
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学 生命資源研究・支援センター 生殖機能学分野 ラボHP
<https://reproductive-biology-kuma-u.jimdofree.com/>

ORCID
<https://orcid.org/0000-0003-0260-7861>

Researchmap
https://researchmap.jp/taichi_noda/

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
研究分担者	原山 洋 (Harayama Hiroshi) (30281140)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	

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			
オーストリア	分子病理学研究所 (IMP)			
米国	Baylor College of Medicine			