

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870021

研究課題名（和文） 新規非侵襲的イメージング法による受精における卵子微絨毛とCD9分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of CD9 molecule and oocyte microvilli in fertilization by novel non-invasive imaging method.

研究代表者

佐藤 裕公 (SATOUH YUHKOH)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：40545571

研究成果の概要（和文）：本研究では、卵子微絨毛とCD9分子に注目し、(1)微絨毛欠損卵子の受精能解析、と(2)非侵襲的イメージング法による微絨毛の可視化を目指した。

結果、(1)微絨毛関連遺伝子群を欠損したマウスを作りその卵子が不妊になる可能性を証明した。

(2)受精ライブセルイメージング系の開発に成功し微絨毛の可視化を実現した。また、この応用から、受精必須因子を通して精子と卵子の融合過程を可視化することに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focus on the function of CD9 molecule and egg microvilli in mammalian fertilization. For that, I set two goals as 1) Analysis of fertilization ability of microvilli less mutant egg, and 2) Visualization of egg microvilli by using novel non-invasive imaging method. As a result until 2011, 1) I have obtained the data which strongly suggesting that the eggs without two of essential genes for constructing microvilli don't have fertilizing ability in vivo. And 2) I have established the imaging system which enable us to visualize egg microvilli in living form. By using the imaging system, I additively succeeded in visualizing the process of sperm-egg fusion in real-time scale for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

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：遺伝子操作動物、実験動物、受精、微絨毛、膜融合

1. 研究開始当初の背景

受精は、すべての個体が一度精子／卵子という半数体の1細胞に帰して次世代に遺伝子を伝達するという、生物にとって極めて重要な

過程である。しかし、その重要性にも関わらず受精に関する分子生物学的な機構についてはいまだに未知の部分が多い。われわれ哺乳類は体内受精を行うため、成熟した精子と

卵子の受精が体内で起こることや、体外受精を行う際の条件が比較的デリケートで、観察によって受精が起こらなくなってしまうなどの点が解析を難しくしてきた。

それに対し、2000年には卵子微絨毛(microvilli)上に存在するCD9が卵子側の、2005年にはIzumoが精子側の精子-卵子膜融合必須因子としてそれぞれ同定された。どちらも遺伝子ノックアウトマウスは融合不全による不妊を示すことから、分子生物学的な解析の貴重な手掛かりとなった。

そしてさらに近年、CD9のノックアウトマウス卵子はmicrovilliの形態に異常があることが指摘された。また、CD9は小胞状の顆粒に含まれて卵子の外に分泌され、これらが精子頭部に付着することによって精子に融合能を与えるという可能性も示唆された。これらの新事実から、CD9と精子との相互作用のほかに、microvilliという構造そのものは受精にとって何らかの役割を持つのか、そしてCD9の機能にとって必要なのか、という点について急速に注目が集まっている状況であった。

2. 研究の目的

受精は、次世代に遺伝子を伝達する生物にとって極めて重要な過程だが、分子生物学的な機構について未知の部分が多い。本研究では、卵子微絨毛上に存在し、受精に必須なCD9分子の機能に注目し、

(1) 遺伝子改変により微絨毛欠損卵子を作製しその受精能を解析することで、卵子微絨毛が受精において果たす役割を明らかにする。

(2) 非侵襲的イメージング法を使ったアプローチによって、受精における微絨毛やCD9分子の挙動を可視化する。

以上のような2つの視点で解析を行い、これらを統括することで、卵子微絨毛とその上のCD9が受精時に果たす役割を解明するのが目的である。

3. 研究の方法

上記目的の欄に挙げた(1)、(2)に沿って研究の方法を分ける。哺乳類の受精研究であるため、すべて実験材料はマウスを用いた。

(1)については、他器官で微絨毛を形成するのに重要とされる遺伝子を欠損したマウスを作出し、その卵子の受精能を解析することとした。欠損させるターゲットは、これまでに微絨毛の構築に重要とされてきたI-Plastin遺伝子を第一候補、同じくEzrinを第2候補として作出を開始した。また、同時に薬剤処理等で微絨毛の役割を抑えた実験系も検討した。

(2)については、これまで可視化が進まなかった要因として、受精を行う際の条件が比較的デリケートであることが問題であった。そ

こで、侵襲性の極めて低い観察系を用いて実験系の構築を進め、まずは微絨毛上のCD9分子を可視化し、その動態・性質を解明することを目標とし、さらにその応用として、もう一つの受精必須因子であるIZUMO1分子の挙動も解析して、これら必須因子が受精時に“どこで、どのように”役割を果たしているのかを明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1)のKOマウスの研究では、I-Plastinの遺伝子欠損マウスにおいても微絨毛は完全に消失せず、受精能力にも影響を与えないことがほかのグループによって証明された。そこで、Ezrin遺伝子欠損マウスがすでにほかのグループによって作出済みであったことから、そのグループよりマウスを譲り受け、ダブルKOマウスの作出を行った。その雌マウスの交配結果から、このマウスの卵子が不妊になる可能性を強く示唆することができた。

(2)については、初期胚のライブセルイメージングで導入された非侵襲性イメージングシステムを応用して、微絨毛・受精ライブセルイメージングの実験系の構築に成功した(図1)。この実験系でCD9-GFP導入マウスを解析したところ、初めて卵子上の微絨毛のダイナミクスを可視化することができた(図2)。生きた卵子上のCD9-GFPの挙動は予想よりも活発であり、受精する前の精子の状態に応じて選択的に結合する可能性を示唆することができた。また、精子側の受精必須因子であるIZUMO1が蛍光ラベルされた精子が開発された(図3)ことを受けて、このイメージング技術を応用し、IZUMO1が先体膜の崩壊時に精子頭部外面に移動する仕組みと、卵子との融合時にその融合特異部分で最初に失われていく状態を可視化することができた(図4)。

これまで受精現象を解析する際には常に、個々の精子・卵子の性状に揺らぎがあることが問題となっており、特に精子・卵子を多く集めた実験では再現性の乏しさを招いてきた。本研究の中で、特に微絨毛と受精のライブイメージング化に成功したことは、“個々の精子・卵子における受精に関する情報を集積する”ということを実現した。これにより、受精のメカニズムに関する理解が急激に進むものと期待される。

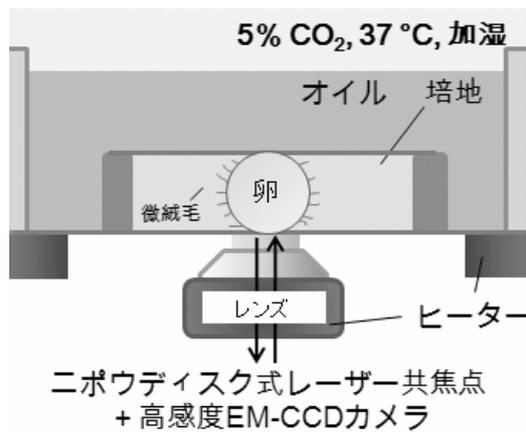


図1. 初期胚の観察用だった非侵襲性ライブイメージングシステムを応用し、卵微絨毛・受精ライブイメージングの実験系構築に成功した。

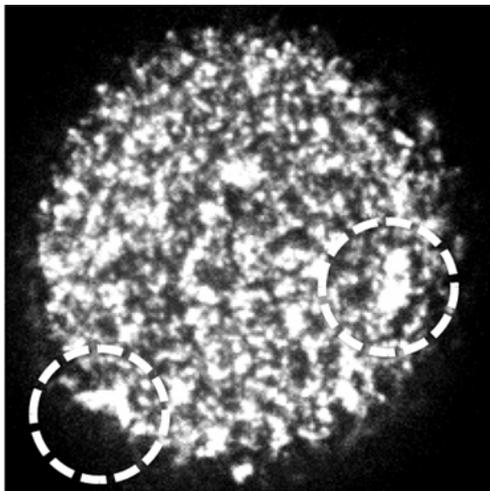


図2. 卵微絨毛は活発に動きまわり、ときに集合(丸)する動的構造だった。見えているのは蛍光標識された微絨毛上のCD9。

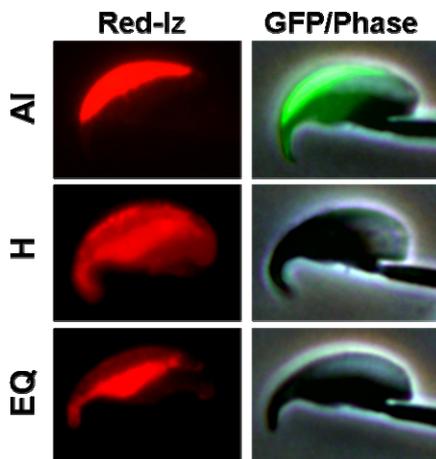


図3. 遺伝子組み換え操作によって蛍光標識されたIZUMO1(Red-Iz)。IZUMO1は精子の頭部先端先体胞(緑)が崩壊すると、HやEQのような特異的な分散のパターンを示す。

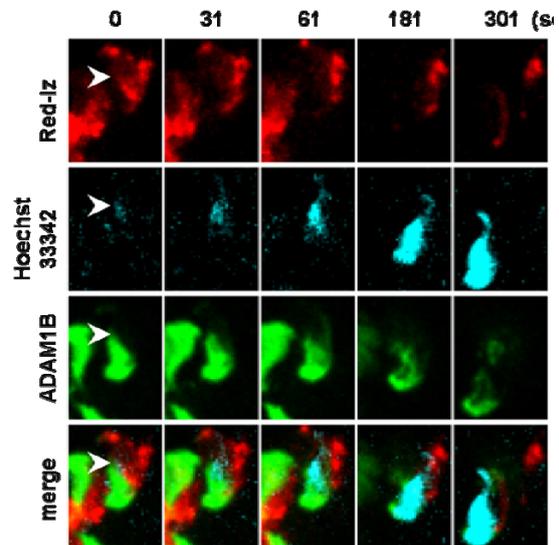


図4. 卵子に融合していく精子頭部のライブイメージング。IZUMO1(Red-Iz)は、融合特異点(矢頭)に存在し、水色が示す融合の進展とともに失われていく。頭部後半部にある分子(緑)はなかなか失われない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y. *et al.*, "Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization.", Proc. Natl. Acad. 誌, 査読有, 108(12)巻, (2011), 4892-4896.
- ② Ikawa, M., Tokuhira, K., Yamaguchi, R., Benham, A. M., Tamura, T., Wada, I., Satouh, Y. *et al.*, "Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility", Journal of Biological Chemistry 誌, 査読有, 286(7)巻, (2011), 5639-5646.
- ③ Fujihara, Y., Murakami, M., Inoue, N.,

Satouh, Y. *et al.*,” Sperm equatorial segment protein 1, SPES1, is required for fully fertile sperm in mouse.”, *Journal of Cell Science*誌, 査読有, 123巻, (2010), 1531-1536.

- ④ Satouh Y, Inaba K., “Proteomic characterization of sperm radial spokes identifies a novel spoke protein with an ubiquitin domain.”, *FEBS Letter*誌, 査読有, 583(13)巻, (2009), 2201-2207.

[その他]

ホームページ等

<http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/members/satouh/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 裕公 (SATOUE YUHKOH)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：40545571

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：