

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間： 2007～2008

課題番号：19687015

研究課題名 (和文) ほ乳類の受精の新規膜因子群の分子機構

研究課題名 (英文) The molecular mechanism of sperm-egg fusion in mammal

研究代表者 井上 直和

(INOUE NAOKAZU)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50379096

研究成果の概要：

Izumo はほ乳類の受精時に精子側で機能する膜融合因子である。Izumo の免疫グロブリン様ドメイン内に存在する N 結合型糖鎖の機能を明らかにするために、非糖鎖型のミュータント Izumo を発現するマウスを作製した (N204QIzumo)。その結果、N204QIzumo の精子がほとんど精子-卵子の膜融合をしていないことが分かった。この原因は、精子の成熟過程で機能型 Izumo が分解され、減少していることであった。このことから、Izumo の N 結合型糖鎖はタンパク質の安定性に機能していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,100,000	5,430,000	23,530,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：受精・膜融合・精子・卵子

### 1. 研究開始当初の背景

受精は生命現象の始まりという極めて重要な現象にも関わらず、分子生物学的な機構については未知の部分が多い。特に精子と卵子の融合機構については卵子上の融合因子

として CD9 が最近報告されたのみで精子側の必須因子は同定されていなかった。これまでの結果として我々は、融合を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いて、世界で始めて精子側の融合因子 Izumo を発見した (Nature, Inoue N et al, 2005)。Izumo ノックアウト

ト精子は融合の準備段階である先体反応まで正常に進行するが、その後の卵子との融合が完全に阻害される。さらに融合を顕微授精法でバイパスすると正常に発生することから、Izumo はまさに精子と卵子の融合にだけ機能する世界で始めて発見された精子側の融合因子であった。

## 2. 研究の目的

Izumo の免疫グロブリン様ドメイン内には、広範囲の動物種間で高度に保存されている N 結合型糖鎖付加配列が存在する。本研究課題では、遺伝子操作動物を用いたアプローチから Izumo の N 結合型糖鎖の役割を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

N 結合型糖鎖を欠失させるために、まず Izumo の 204 番目のアスパラギンをグルタミンに変異させたタンパク質を精巢特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。その後、これらマウスを Izumo ノックアウトバックグラウンドに置き換えることで、精子上に存在する Izumo の N 結合型糖鎖を完全に欠失させた。非糖鎖型の Izumo (N204QIzumo) をもつ精子の受精能および融合能を検討し、N 結合型糖鎖の役割を解析した。

## 4. 研究成果

N204QIzumo の雄からの妊孕性は野性型の約 30%であった。この原因を探るために精子-卵子の融合解析を行うと、N204QIzumo の精子はほとんど融合が成立していないことが分かった (図 1)。しかし、Izumo 抗体を用いて免疫染色を行うと、N204QIzumo は先体反応前には先体部に局在するが、先体反応後に

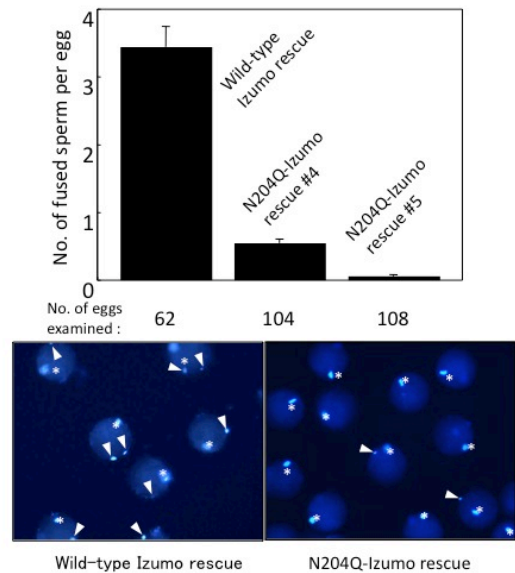


図1 融合アッセイ

は精子頭部表面に存在する野性型 Izumo と同様な局在変化を示すことが分かった。Izumo のタンパク質量を調べるためにモノクローナル抗体を作製し、N204QIzumo の精子のウエスタンブロット解析を行うと、野性型に比べ有意にタンパク質量が減少した非糖鎖型の 50 kDa のバンドに加え、30 kDa と 35 kDa のフラグメント化したバンドが検出された (図 2)。

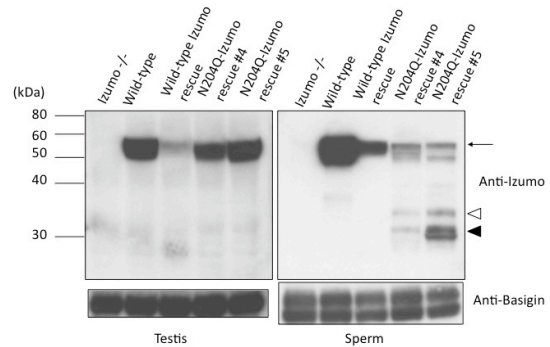


図2 Izumo抗体を用いたウエスタンブロット解析

しかし興味深いことに、精巢の N204QIzumo は非糖鎖型のバンドのみが野性型と同程度検出された。またこのようなフラグメント化は精巢上部尾部で起こり、少なくとも一カ所の切断部位が存在することが明らかになった (図 3)。このことから、N204QIzumo 精子は精巢から精巢上部に移行する際に何らかのメカニズムにより分解され、タンパク質量

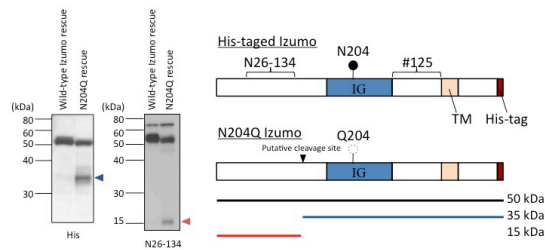


図3 切断部位の同定

や分子量が減少したと考えられる。これらの結果から、N204QIzumo の精子の受精能や融合能の低下は、機能型 Izumo のタンパク質量が減少したことが原因であり、Izumo の N 結合型糖鎖が膜融合機構に直接関与しているわけではないことが分かった。むしろ N 結合型糖鎖は精子が精巣から精巣上体に移行する際に Izumo をプロテアーゼ等から保護し、安定化する役割をもつことが明らかになった。

#### 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 6 件)

1. Inoue, N. and Okabe, M. Sperm-egg fusion assay in mammals. *Methods Mol Biol* 475, 335-45 (2008). 査読なし
2. Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 910-4 (2008). 査読あり
3. Ikawa, M., Inoue, N. and Okabe, M. Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals. *Int J Dev Biol* 52, 657-64 (2008). 査読あり
4. 伊川正人、井上直和、岡部勝、目で見えるリプロダクションの基礎、HORMON

E FRONTIER IN GYNECOLOGY, 9, 1 82-185 (2008). 査読なし

5. Inoue, N., Yamaguchi, R., Ikawa, M. and Okabe, M. Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 363-71 (2007). 査読あり
6. Hayasaka, S., Terada, Y., Inoue, N., Okabe, M., Yaegashi, N. and Okamura, K. Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertil Steril* 88, 214-6 (2007). 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. 井上直和、ほ乳類の受精の膜融合における分子メカニズム、第 53 回日本生殖医学会、2008 年 (シンポジウム：招待)
2. 井上直和、岡部勝、受精の膜融合因子 Izumo の N 結合型糖鎖の役割、第 27 回日本アンドロロジー学会、2008 年 (口頭発表)
3. 井上直和、岡部勝、The role of N-glycan of sperm-egg fusion protein Izumo、第 30 回日本分子生物学会、2007 年 (ポスター発表)
4. 井上直和、受精の膜融合における免疫グロブリンスーパーファミリー-Izumo の役割、第 78 回日本動物学会、2007 年 (シンポジウム：招待)
5. 井上直和、萩原義久、岡部勝、受精の膜融合における免疫グロブリンスーパー

ファミリーIzumo の役割、第 7 回日本蛋白質科学会、2007 年 (ワークショップ)

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

なし

○ 取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/members/inoue/Site/About%20Me.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 井上 直和

(INOUE NAOKAZU)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50379096