

平成30年 8月30日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291052

研究課題名(和文)配偶子膜融合活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism involved in mammalian gamete fusion

研究代表者

井上 直和 (Inoue, Naokazu)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50379096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：受精のクライマックスは、精子と卵子の融合である。本研究では配偶子融合の制御因子であるIZUMO1を発現する培養細胞とマウス卵子の接着によるアッセイ系をモデルに、IZUMO1の継時的、局在特異的な構造変化、特にオリゴマー化に着目した解析を行った。その結果、IZUMO1の融合コア領域を起点とした2量体化が、IZUMO1の活性化に重要なことを見出した。さらに興味深いことに、この過程ではIZUMO1受容体であるJUNO以外の二次受容体の存在が示唆された。この解析では、IZUMO1のみの発現系で膜融合が生じないことから、さらに未知の分子メカニズムが存在するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：When a spermatozoon fertilizes an oocyte in mammals, there must be an extremely precise regulation system for successful gamete fusion to occur, which is the final step of fertilization. Sperm-egg fusion is considered to consist of multiple steps. As a reason for that using gene-modified animals, IZUMO1 and SPACA6 on the sperm side and IZUMO1-receptor JUNO and CD9 on the ovum side have been unveiled as indispensable factors for triggering gamete fusion, however, the functional relationships among each factor are still unclear. Furthermore, we have also established an in vitro cell-oocyte binding system, in which cultured cells expressing the Izumo1 gene, such as COS-7 cells, become adhesion-competent towards oocytes. However, because COS-7 cells solely expressing the Izumo1 gene never acquire membrane fusion activity with oocytes, the detailed molecular mechanisms leading to gamete membrane fusion also remain elusive.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 精子 卵子 膜融合 IZUMO1 JUNO

1. 研究開始当初の背景

受精の分子メカニズムは未知の部分が多い。特に融合機構に関する研究は世界的に見ても詳細な解明に至っていない。これまで我々は、配偶子融合に関する研究を精力的に進めてきた。融合を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いて、精子側の融合因子 IZUM1 を発見し¹、IZUM1 の種間でよく保存された N 結合型糖鎖が IZUM1 タンパク質を分解から保護していることや²、IZUM1 と相互作用する精子側の因子 ACE3 を明らかにしてきた³。IZUM1 はもともと精子先体内に存在する分子であるが、先体反応後には精子細胞膜表面のエカトリアルセグメントに集合して、その部位で膜融合を成立させることを生細胞イメージングにより示した⁴。さらに卵子側での膜融合に関わるとされてきた因子の解析も行った⁵。また IZUM1 ノックアウトマウスを用いた解析から、精子の先体反応のメカニズムの定説を覆す新知見を発表した⁶。

最近、我々は融合を阻害する IZUM1 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 IZUM1 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⁷。この領域の性質は α ヘリックス含量が高く、2 量体化を引き起こす。さらに IZUM1 を発現することで汎用培養細胞を卵子細胞膜に接着させることに成功した⁷。しかしこの系では双方の膜の融合は成立しない。さらに、卵子側に存在する IZUM1 のパートナーとなる受容体の存在も未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、IZUM1 の精密構造解析や分子ダイナミクスなどの解析に基づき、*in vitro* と *in vivo* の研究を統合して、受精の膜融合活性化メカニズムの解明を目指す。精子と卵子の膜の融合機構を解明するためには、この過程で最も重要であることが示されている

IZUM1 を中心として、(1) IZUM1 活性化の作用機序の解明、(2) 卵子細胞膜における IZUM1 パートナーレセプターの同定を行う。

3. 研究の方法

(1) IZUM1 活性化の作用機序の解明

これまでの知見から、IZUM1 は先体反応の瞬間まで不活性化型で存在し、卵子細胞膜と融合するためには活性化型に転換される必要があると考えられる。先に、IZUM1 は先体反応の直後に劇的な局在変化を起こして精子頭部細胞膜のエカトリアルセグメントに集合し、卵子との膜融合を起こすことを示した⁴。この過程で IZUM1 の分子環境が大きく変化し、これが立体構造変化に影響し、IZUM1 を活性化型に転換すると考えられる。IZUM1 の機能発現には、2 量体化し、融合コア領域が膜上で正しく配向することが必要と予想される。以下の戦略でこの仮説を検証した。

1) 精密構造解析 — 同定された融合コア領域は、IZUM1 が融合に関わる際に最も重要な領域であると考えられる。IZUM1 がどのように卵子に作用するのかを知るためには、この領域の精密立体構造解析が必須である。融合コア領域単独での結晶化は困難であったが、IZUM1 の中和抗体の Fab フラグメントと融合コア領域との共結晶化によって大きな結晶体の作製に成功し、融合コア領域の結晶化条件が整った。

2) 分子集合性解析 — IZUM1 を発現させた COS-7 細胞が卵子細胞膜と接着した場合に、その接着面に IZUM1 が集合するという現象が見られた⁷。BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法により、この過程における IZUM1 のオリゴマー化を作用部位特異的に可視化した。またその際、研究期間中に同定された卵子側の IZUM1 受容体、JUN⁸ や融合制御因子 CD9⁹ の動態にも着目した。

(2) 卵子細胞膜における IZUM1 パートナー

レセプターの同定

可溶性 IZUM01 をベイトとして、pull down 法などの生化学的な解析によりその同定を試みた。また未受精卵の遺伝子ライブラリーと蛍光ラベルした可溶性 IZUM01 を用いた発現スクリーニング解析も同時に試みた。

4. 研究成果

IZUM01 による配偶子膜融合の制御メカニズムを解明するために、IZUM01 発現培養細胞とマウス卵子の接着によるアッセイ系をモデルに、IZUM01 の継時的、局在特異的な構造変化、特にオリゴマー化に着目した解析を行った。その結果、IZUM01 の融合コア領域を起点とした 2 量体化が、IZUM01 の活性化の制御に重要なことを見出した¹⁰。興味深いことに、2 量体化した IZUM01 は、卵子側のパートナーレセプターである JUNO との親和性を急激に失い、もはやその接着面には JUNO が存在しなくなることが明らかになった。つまり、IZUM01 の二次受容体の存在が示唆された。

さらに、X 線結晶構造解析による IZUM01-JUNO 複合体の細密立体構造を原子レベルで解明した(図 1)¹¹。その結果、IZUM01-JUNO の相互作用に重要な分子構造をアミノ酸レベルで同定することに成功した。

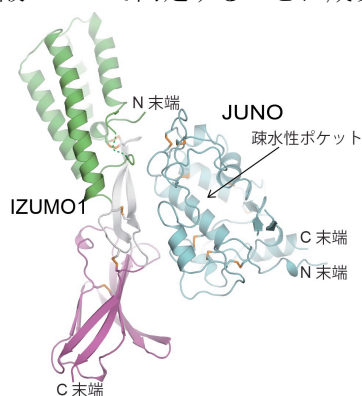


図 1 IZUM01-JUNO 複合体の細密立体構造

これらの解析から、IZUM01 は、JUNO による認識後、2 量体化を伴う分子構造のダイナミックな変化によりパートナーレセプターを変え、細胞膜同士の距離を物理的に近づけることにより、脂質二重膜の斥力を崩壊させ

る働きがあると考えられた(図 2)¹⁰。しかし IZUM01 のみの発現系では膜融合は生じないことから⁷、これには他の分子が機能する新たな分子メカニズムが存在するものと考えられる。

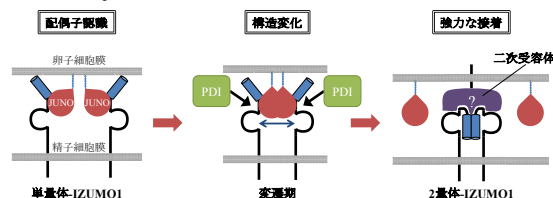


図 2 想定される IZUM01 を起点とした配偶子融合分子メカニズム

<引用文献>

1. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005;434(7030):234-238. DOI:10.1038/nature03362.
2. Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(3):910-914. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.10.073.
3. Inoue N, Kasahara T, Ikawa M, Okabe M. Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PLoS One* 2010;5(4):e10301. DOI:10.1371/journal.pone.0010301.
4. Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUM01. *J Cell Sci* 2012;125(Pt21):4985-4990. DOI:10.1242/jcs.100867.
5. Inoue N, Nishikawa T, Ikawa M, Okabe M. Tetraspanin-interacting protein IGSF8 is dispensable for mouse fertility. *Fertil Steril* 2012;98(2):465-470.

- DOI:10.1016/j.fertnstert.2012.04.029
.
6. 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 USA* 2011;108(50):20008-20011.
DOI:10.1073/pnas.1116965108.
 7. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUM01, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013;140(15):3221-3229.
DOI:10.1242/dev.094854.
 8. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014;508(7497):483-487.
DOI:10.1038/nature13203.
 9. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000;287(5451):321-324.
 10. Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUM01 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat Commun* 2015;6:8858. DOI:10.1038/ncomms9858.
 11. Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUM01-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* 2016;534(7608):566-569.
DOI:10.1038/nature18596.
5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 8 件)
1. Ikezawa M, Tajika Y, Ueno H, Murakami T, Inoue N, Yorifuji H. Loss of VAMP5 in mice results in duplication of the ureter and insufficient expansion of the lung. *Dev Dyn* 2018;247(5):754-762.
DOI:10.1002/dvdy.24618. 査読あり
 2. Inoue N. Novel insights into the molecular mechanism of sperm-egg fusion via IZUM01. *J Plant Res* 2017;130(3):475-478.
DOI:10.1007/s10265-016-0895-z. 査読あり
 3. Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Morishita Y, Ota M, Yamanaka F, Xu M, Ikawa M, Inoue N, Kawano F, Nakai N, Murakami T, Miura S, Hatazawa Y, Kamei Y, Shimomura Y. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. *Sci Rep* 2017;7:39825.
DOI:10.1038/srep39825. 査読あり
 4. Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUM01-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* 2016;534(7608):566-569.
DOI:10.1038/nature18596. 査読あり
 5. Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUM01 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat Commun* 2015;6:8858. DOI:10.1038/ncomms9858.
査読あり
 6. Miyazaki N, Kiyose N, Akazawa Y, Takashima M, Hagihara Y, Inoue N, Matsuda T, Ogawa R, Inoue S, Ito Y.

Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by high-throughput sequencing. *J Biochem* 2015;158(3):205-215. DOI:10.1093/jb/mvv038. 査読あり

7. Matsuo T, Hattori T, Asaba A, Inoue N, Kanomata N, Kikusui T, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(3):E311-320. DOI:10.1073/pnas.1416723112. 査読あり
8. 井上直和、宮戸健二 精子と卵子の膜融合 *細胞工学* 2014;33:386-392. 査読なし

[学会発表] (計 6件)

1. Inoue N. Novel insights into the molecular mechanism of sperm-egg fusion via IZUM01. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演). 2017. 東京
2. 井上直和. 受精の膜融合因子 IZUM01 の活性化機構. 日本アンドロロジー学会第35回学術大会 (招待講演). 2016. 前橋市
3. 井上直和. 融合因子 IZUM01 の構造変化による新規膜融合モデル. 第12回日本解剖学会 (招待講演). 2016. 郡山市
4. 井上直和、萩原義久、Danelle Wright、鈴木貴久、和田郁夫. 融合因子 IZUM01 の構造変化による新規膜融合モデル. 第38回日本分子生物学会 (招待講演). 2015年. 神戸市
5. 井上直和. 融合因子 IZUM01 の構造変化

による新規膜融合モデル. 日本動物学会第86回 (招待講演). 2015. 新潟市

6. Inoue N. Novel insights into the molecular mechanism of sperm-egg fusion via IZUM01. Proceeding of the 79th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan (招待講演). 2015. 新潟市

[図書] (計 2件)

1. 伊藤千鶴、伊藤昌彦、井上直和、年森清隆、宮戸健二. 化学同人. 動植物の受精学. 2014.
2. Inoue N. Springer. Sexual Reproduction in Animals and Plants. 2014.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/cellsci/saibou-top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 直和 (INOUE, Naokazu)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50379096

(2) 連携研究者

和田 郁夫 (WADA, Ikuo)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40182969

宮戸 健二 (MIYADO, Kenji)
独立行政法人国立生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

萩原 義久 (HAGIHARA, Yoshihisa)
独立行政法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・副研究部門長
研究者番号: 50357761