

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16850

研究課題名(和文) 卵子エクソソームを介する配偶子膜融合(受精)メカニズムの解析と生殖医療への応用

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of gamete membrane fusion (fertilization) mediated by the oocyte exosome

研究代表者

吉田 恵一 (Yoshida, Keiichi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・次世代がん医療開発センター 副センター長

研究者番号：90365437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究期間中に所属機関の異動、COVID-19の影響による業務体制の制限等の影響もあり、計画当初予定どおりの研究計画進行は難しかった。特に、所属機関の異動によって大幅に業務内容が変更になり研究に避ける時間が大幅に減少したことが原因の一つである。さらに動物の飼育環境を含む実験環境の整備にも時間を要し、前所属で確立したマウス卵子エクソソームを大量入手方法の立ち上げ(再現)に時間を要した。一方、そういった環境の中でも、可能な限り研究を進め、卵子エクソソーム中には、卵子側の膜融合因子が存在することを明らかにし、本研究に関連した配偶子膜融合に関わる研究について論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵子エクソソーム内に卵子側の膜融合因子が存在することを示すことができた。また、本研究に関わる配偶子膜融合に関わる研究として、いくつかの報告ができた。このことは未だ明らかとなっていない受精メカニズムの解明の一助になることが期待されるものである。このような基礎的な知見を積み重ねていくことにより、不妊症の原因解明や治療法の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：It was difficult to proceed with the original research plan due to the influence of the change of affiliation and the restriction of the research system under the COVID-19 crisis during the research period. In particular, it affected worst was that the time available for research reduced greatly due to the drastic change in work content caused by the change in the institution to which I belonged. In addition, it took time to improve the environment, including the animal breeding environment, and it took time to start up (reproduce) the method for obtaining large quantities of mouse oocyte exosomes that had been established at my previous institution. In spite of this environment, I did as much research as I could and revealed the presence of oocyte-side membrane fusion factors in the oocyte exosome. I published a paper related to this research as a co-author.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 エクソソーム 膜融合

1. 研究開始当初の背景

精子は、卵子との融合に至るまでの過程で様々なステップを乗り越えなければならず、すべてのステップを無事に通過した精子のみが初めて受精可能になる。これまでの受精研究における膜融合過程では、両配偶子の細胞膜同士の相互作用を中心に解析が進められてきたが、どのような分子が関与して膜融合を生じるのかは不明である。代表者はこれを解く鍵となる制御因子として、細胞膜外成分である卵子エキソソームの精子に対する作用の重要性を示した。しかし、卵子エキソソームがなぜ精子だけに作用するかは不明であり、その説明は受精における膜融合を知る上でも重要である。

2. 研究の目的

受精研究における膜融合過程は両配偶子の細胞膜分子を中心に解析が進められてきた。代表者は受精、特に膜融合に関わる制御因子として、卵子エキソソームが必要不可欠であることを示し [研究業績 11:PNAS,2008(筆頭著者)]、これが先体反応後の精子と反応(接着・付着)することを明らかにしている(論文未発表)。本研究では、このプロセスを解明するために先体反応後に精子頭部に露出され、受精過程(特に精子と卵子の相互作用)に関連すると推察されている分子(Izumo タンパク質、Equatorin タンパク質など)との関連を探り、精子 - 卵子エキソソーム - 卵子の相互作用を解析する。最終的には生殖医療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究は卵子エキソソームの精子への作用機序の解明に焦点をあて計画した。初年度は[卵子エキソソームの構成成分解析]を中心に行う。その結果に基づき、次年度以降は[卵子エキソソームの精子への作用機序の解析]、[培養細胞を利用した人工エキソソームの開発]の二つを中心に研究を進める。具体的には、卵子エキソソームの精子への作用機序を分子生物学的手法や動物実験により明らかにするとともに、培養細胞を用いて人工的な受精促進エキソソームを合成し、受精能促進の評価を行う。

4. 研究成果

本研究は、研究期間中に異動による所属機関の変更、COVID-19の影響による研究体制の制限等の影響もあり、計画当初予定どおりの研究計画進行は難しかった。特に、所属機関の変更によって大幅に業務内容が変更になり研究に割ける時間が大幅に減少したことが原因の一つである。さらに動物の飼育環境を含む実験環境の整備にも時間を要し、前所属で確立したマウス卵子エキソソームを大量入手方法の立ち上げ(再現)に時間を要した。一方、そういった環境の中でも、卵子エキソソーム中には、卵子側の膜融合因子である Juno が存在することを明らかにできた。また、膜融合に係る周辺研究については以下に示すとおり成果を上げることができた。(研究代表者は太字で表記した)

1) Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion.

Ito C, Yamatoya K, **Yoshida K**, Fujimura L, Sugiyama H, Suganami A, Tamura Y, Hatano M, Miyado

K, Toshimori K. *Reproduction*. 2018 Dec;156(6):579-590.

Eqtn 分子(先体反応の過程で露出される精子側膜融合関連分子)のノックアウトマウスを作成し、機能解析を行い、Eqtn-KO(Eqtn-/-)のオスでは、精子先体タンパク質 SPESP1 分子の挙動の異常が認められ、その結果として精子と卵子の接着力が低下することを明らかにした。さらに、精子と卵子の接着に関連する SPESP1 分子と Eqtn 分子のダブルノックアウトマウス(Eqtn-/-, SPESP1 -/-)では、Eqtn KO マウスより受精能がより一層低下することを明らかにした。このことは、受精の膜融合は精子頭部の正常な構造変化の重要性を示している。

- 2) Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice.

Iwai M, Harada Y, Miyabayashi R, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Miyamoto Y, Yamada M, Hamatani T, Miyado M, **Yoshida K**, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, Miyado K. *Heliyon*. 2018 Nov 16;4(11):e00944.

卵子ミトコンドリアが受精時に生じる Ca²⁺オシレーションは、精子の融合が発端となり生じることを、ライブイメージング技術を用いて明らかにするとともに、卵子内ミトコンドリアが融合した精子へ集まってくる現象(走化性)が観察された。ミトコンドリアの集合の現象は精子抽出液では認められなかったことから、精子内の核物質と卵子内ミトコンドリアの相互作用によって生じ両配偶子の核が接合する可能性を示している。

- 3) Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg.

Yoshida K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, Miyado K, Umezawa A. *Reprod Toxicol*. 2018 Mar;76:71-77.

ユビキチンプロテアソームシステムの受精過程においてどのような機能を役割を担うか、ユビキチン活性化酵素 E-1(UBE1)の阻害剤(PYR-1)を用いた解析を行った。その結果、ユビキチンプロテアソームシステムの阻害は、受精直後に生じる卵子の減数分裂完了を阻害し、その結果、2細胞期への発生が抑制された。また、PYR41 はユビキチンプロテアソームの標的タンパク質として知られている カテニンの卵子内における局在の異常を示した。それに加え、カテニン欠損卵子は PYR41 による 2細胞期への発生阻害は認められなかった。これらのことからユビキチンプロテアソームシステムの阻害は、カテニンを介した胚の発生(受精後の精子頭部の肥大化)を阻害する可能性が考えられる。

- 4) Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice.

Ito C, Akutsu H, Yao R, **Yoshida K**, Yamatoya K, Mutoh T, Makino T, Aoyama K, Ishikawa H, Kunimoto K, Tsukita S, Noda T, Kikkawa M, Toshimori K. *Sci Rep*. 2019 Oct 3;9(1):14249.

精子の鞭毛タンパク質である ODF2 のノックアウトマウスを作成したところ、新しいタイプの精子頭
部離断(DDS) (ヒトにおける不妊症の原因の 1 つ) の表現型を示すことを明らかにした。

5) Suppression of Non-Random Fertilization by MHC Class I Antigens.

Kamiya J, Kang W, Yoshida K, Takagi R, Kanai S, Hanai M, Nakamura A, Yamada M, Miyamoto
Y, Miyado M, Kuroki Y, Hayashi Y, Umezawa A, Kawano N, Miyado K. Int J Mol Sci. 2020 Nov
19;21(22):8731.

精子と卵子の認識システムに議論がなされているところである。この問題を解決するために H2-
Kb-/H2-Db-/- 2-ミクログロブリン(2M) -/-トリプルノックアウト(T-KO)雄マウスを用いて
MHC クラス 1 抗原の役割を検討した。野生型(WT)の卵子を用いた IVF によって受精過程の解
析を行い、T-KO の精子は野生型卵子の卵胞腔への侵入が増加すること、多精子受精の割合が
増加することを明らかにした。このことは、WT 卵子は T-KO 精子に対して多精子受精のブロック機
構が弱まっていることが示唆された。また、T-KO 雄マウスと WT 雌マウスと交配すると産仔の性別
に偏り(雌の割合が増加)が生じる。これにより哺乳類では優先的(非ランダム)な受精が示唆され
た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 Ito Chizuru, Akutsu Hidenori, Yao Ryoji, Yoshida Keiichi, Yamatoya Kenji, Mutoh Tohru, Makino Tsukasa, Aoyama Kazuhiro, Ishikawa Hiroaki, Kunimoto Koshi, Tsukita Sachiko, Noda Tetsuo, Kikkawa Masahide, Toshimori Kiyotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Odf2 haploinsufficiency causes a new type of decapitated and decaudated spermatozoa, Odf2-DDS, in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-50516-2	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 Iwai Maki, Harada Yuichirou, Miyabayashi Rinako, Kang Woojin, Nakamura Akihiro, Kawano Natsuko, Miyamoto Yoshitaka, Yamada Mitsutoshi, Hamatani Toshio, Miyado Mami, Yoshida Keiichi, Saito Hidekazu, Tanaka Mamoru, Umezawa Akihiro, Miyado Kenji	4. 巻 4
2. 論文標題 Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00944 ~ e00944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00944	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 Ito Chizuru, Yamatoya Kenji, Yoshida Keiichi, Fujimura Lisa, Sugiyama Hajime, Suganami Akiko, Tamura Yutaka, Hatano Masahiko, Miyado Kenji, Toshimori Kiyotaka	4. 巻 156
2. 論文標題 Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 579 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-18-0394	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 Keiichi Yoshida, Woojin Kang, Akihiro Nakamura, Natsuko Kawano, Maito Hanai, Mami Miyado, Yoshitaka Miyamoto, Maki Iwai, Toshio Hamatani, Hidekazu Saito, Kenji Miyado, Akihiro Umezawa	4. 巻 76
2. 論文標題 Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Toxicology	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reprotox.2018.01.001	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 Kamiya Junki, Kang Woojin, Yoshida Keiichi, Takagi Ryota, Kanai Seiya, Hanai Maito, Nakamura Akihiro, Yamada Mitsutoshi, Miyamoto Yoshitaka, Miyado Mami, Kuroki Yoko, Hayashi Yoshiki, Umezawa Akihiro, Kawano Natsuko, Miyado Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 Suppression of Non-Random Fertilization by MHC Class I Antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8731 ~ 8731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228731	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0件

〔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
---------	---------