

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02453

研究課題名(和文)受精の配偶子融合マシナリーの包括的解明

研究課題名(英文)Comprehensive elucidation of the gamete fusion mechanism in fertilization

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：受精のクライマックスである精子と卵子の融合は、精子側のIZUM01と、卵子側のJUNOの相互作用により活性化されたのち、卵子上のIZUM01セカンドレセプターを含めた複数の因子群からなる分子間相互反応の結果、成立することが推測される。本研究では、無脊椎動物で受精必須因子として存在するDCST1とDCST2をマウスやヒトで同定することに成功した。Dcst1/2欠損マウスは、線虫やハエと同様に配偶子融合不全が原因で完全な雄性不妊になる。約10億年に渡って保存されてきたDCST1/2分子が機能する詳細な分子メカニズムの解析を通して、今後の受精研究が大きく前進するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国では5.5組に1組のカップルが不妊症に悩まされており、2019年の出生児のうち14人に1人が体外受精児である。さらに2022年度より不妊治療が保険適応されたように、受精研究の社会的関心は非常に高く、晩婚化が進む中、不妊症は増加傾向にあるため、受精の分子メカニズムの解明が早急に求められている。本研究では、受精の核となる配偶子融合の必須因子を新たに同定することに成功した。この研究成果は、学術的意義のみならず、社会的意義に対する波及効果が大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The gamete fusion, which is the climax of fertilization, is presumably activated by the interaction between IZUM01 on the sperm side and JUNO on the oocyte side, followed by an intermolecular reaction consisting of multiple factors, including the IZUM01 second receptor on the oocyte. In this study, we newly identified the sperm factors DCST1 and DCST2, which are conserved as essential fertilization factors in invertebrates, in mice and humans, and found that Dcst1/2-deficient mice are completely male sterile due to gamete fusion failure, as in nematodes and flies. The analysis of the detailed molecular mechanisms involved in the DCST1/2 molecule, which has been conserved over nearly one billion years of evolution, is expected to greatly advance the study of fertilization.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 精子 卵子 配偶子融合 膜融合 DCST1/2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

連綿と続く生命の営みは、2種類の配偶子、精子と卵子によって支えられている。精子は精巣で産生されたのちに、精巣上体、雌性生殖路に移動することで徐々に受精能を獲得し、卵子に近接すると、卵丘細胞層の通過、先体反応、透明帯への結合と通過を経て、最終的に卵子と融合し受精が完了する。精子の選別は非常に厳しく、大量の精子(ヒトの場合:1~3億匹)の中からわずか1匹だけが卵子との受精にあずかる。このような様々な篩にかけられてたった1匹の精子が受精することを許されるため、これには厳密に制御された分子機構が存在することは容易に予想される。しかし、受精のクライマックスである配偶子融合の分子メカニズムは、完全に解明されたとは言い難い。そのようななか我々が見出したIZUMO1は、哺乳類の精子-卵子の膜融合に必須な因子として、世界で初めて見出された精子膜タンパク質であり¹、この機構の解明の突破口になると期待される。

本研究課題では、受精の分子メカニズムのなかで最大の謎である、配偶子融合にフォーカスし、これまでの研究成果を踏襲しつつ、より詳細かつ包括的な解析により配偶子融合機構の全容解明に挑む。

2. 研究の目的

受精を成立させる精子と卵子の融合は、正に生命の誕生という極めて重要な現象であるにも関わらず、その仕組みは解明されていない。我々は世界に先駆けて精子と卵子の融合に必要な精子側の因子IZUMO1を同定し¹、その卵子側のレセプターであるJUNOとの結合様式を原子レベルの解像度で明らかにした²。さらにIZUMO1のコア領域を起点とした2量体化が、IZUMO1の活性化の制御に重要なことを見出した³。しかしIZUMO1発現培養細胞は、卵子細胞膜に接着能を有し、その接着面で2量体化するものの、双方の膜の融合は成立しない⁴。このことからIZUMO1-JUNO制御系の他に膜融合を制御する新たな因子群や、更なるIZUMO1を活性化させる制御機構があると考えられる。本研究では、精密構造解析や分子ダイナミクスなどの解析に基づき、受精の膜融合の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵子上のCD9複合体を構成する因子群の同定と解析

精子が卵子細胞膜に接着すると融合に先立って、CD9やJUNOが精子の接着面に集合する現象が見られる。CD9は、テトラスパニンWebと呼ばれる分子複合体を形成するが、卵子上でのそれら構成因子群(分子プロファイリング)は同定されていない。もし精子を受容する何らかのセンサー分子が存在すると、それはCD9を中心とした分子複合体中にあり、その分子を起点とした分子マシナリーの発動が示唆される。そこで、抗体による立体構造障害を考慮して、CRISPR/Cas9法によりCD9遺伝子に8xHisを付加するノックインマウスを作製し、その卵子からCD9-Hisを精製し、共精製されるタンパク質群を質量解析により同定する。同定されたタンパク質群は、CRISPR/Cas9法により速やかにノックアウトマウスを作製し、その卵子での機能を解析する。

(2) SPACA6ペアレセプターとIZUMO1セカンドレセプターの同定と解析

SPACA6はその一次構造から、IZUMO1と同じ免疫グロブリン様ドメインを持つ、明らかなI型の膜貫通型タンパク質である。レセプター型であるSPACA6は、卵子側のペアレセプターを認識し、膜融合に機能すると考えられるので、その同定を試みる。これには、マウス未受精卵子

由来の発現 cDNA ライブラリーを COS-7 細胞に発現させる発現クローニングにより行う。リガンドは、膜貫通領域を除いた細胞外領域のみから構成される分泌型 SPACA6 にマウス IgG の FC 領域を融合させた発現ベクターを培養細胞に発現させ、それに特異的に結合する Protein A カラムで精製し、準備する。分泌型 SPACA6 との相互作用を目印にレセプター分子を発現する細胞を選別し、その塩基配列を明らかにする。

IZUMO1 セカンドレセプターについても、IZUMO1 の細胞外領域と FC 領域の融合タンパク質を用いて、同様の方法でスクリーニングを行う。実際に、この方法で IZUMO1 をリガンドとしたスクリーニングから、IZUMO1 レセプターの JUNO を単離できることは確認済みであり、この実験系はすでに確立されている。

同定された分子は直ちにそのノックアウトマウスを作製し、それが生理的に受精にとって必須かどうかを調べる。またそれぞれの複合体の結合様式を調べるために、これまでに実績のある細密立体構造解析に着手する²。これら新規因子群と IZUMO1、SPACA6、DCST1/2 との関連性にもフォーカスし、配偶子融合における詳細な解析を行う。

(3) 活性型 IZUMO1 や融合因子群の生細胞モニタリング

SPACA6 や DCST1/2 は IZUMO1 と協調作用して膜融合に機能すると推測される。これまでの解析から、単量体の IZUMO1 と JUNO の相互作用がトリガーとなり、IZUMO1 が 2 量化され (活性型 IZUMO1)、活性型 IZUMO1 は、JUNO と速やかに解離し、セカンドレセプターと相互作用することが示唆された³。これを動的に観察するためにすでに作製済みの活性型 IZUMO1 を可視化する BiFC (Biomolecular Fluorescence Complementation) プローブを付加した融合タンパク質を精子特異的に発現するトランスジェニックマウスを利用して⁵、SPACA6 や DCST1/2 欠損精子における活性型、潜在型 IZUMO1 の挙動変化を観察する。

(4) 受精の膜融合の *in vitro* 再構成系の作製に向けた研究

受精における膜融合の機構を完全に理解するには、必須因子だけからなる 2 つの膜系の再構成が最終的に必要となる。そこで、第一段階として、(1)~(3) の成果に基づき、培養細胞-卵子間の膜融合に進める。ついで活性型 IZUMO1 を誘起するための最小因子群あるいは活性型 IZUMO1 そのものをリポソームに埋め込み、卵子との融合を調べる。もしこれが起きない場合には「活性型」の構造が正しく形成されているかを調べ、条件検討を詳細に行う。融合が観測されれば、(2) での IZUMO1 レセプター欠損マウスでの卵子を用いて、これら分子への依存性を確認する。この時点で、最終ゴールである完全 *in vitro* 再構成までできなくても、これまで不可能であった受精の膜融合のより詳細な解析が可能となり、遺伝子の授受のための基本的な作用機序が明らかになるものと期待される。

4. 研究成果

本研究において、線虫やハエで受精必須因子として存在する DCST1 と DCST2 をマウスやヒトで同定することに成功した。DCST1/2 欠損マウスは、線虫やハエと同様に配偶子融合不全が原因で完全な雄性不妊になる (図)。約 10 億年に渡って保存されてきた DCST1/2 分子が機能する詳細な分子メカニズムの解析を通して、今後の受精研究が大きく前進するものと考えられる⁶。これに関連し、哺乳類の精子と卵子の膜融合を解析する *in vitro* アッセイ法をまとめた論文も発表した⁷。

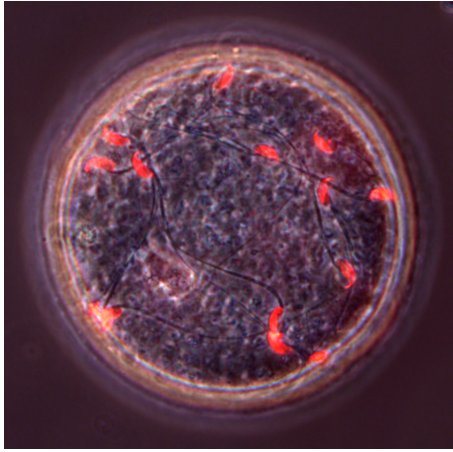


図 DCST1/2 欠損マウスは配偶子融合不全のため雄性不妊になる。

写真では、DCST1/2 欠損マウス由来の精子が、精子の形態変化である先体反応を終えているが (赤 : IZUMO1)、受精できないため、多数、透明帯と卵子の間の囲卵腔内に存在する。

TMEM95 欠損雄マウスは完全な不妊症ではなく、低妊孕性になることを明らかにした。これは、2020 年に発表された 2 つの既報論文と背反する結果である。さらに配偶子融合必須因子である精子の SPACA6 が、妊孕性のある TMEM95 や FIMP 欠損雄マウスの成熟精子上から完全に消失することから、SPACA6 は精子表面上の receptor-ligand 相互作用には機能していないことが分かった。これらの結果から、哺乳類の精子と卵子の相互作用に本質的に必要な因子群が浮き彫りになった⁸。

また IZUMO ファミリー分子である IZUMO3 が、マウスの精子の先体形成において重要な働きがあることや⁹、IZUMO1 遺伝子の選択的スプライシングによる受精のフェイルセーフシステムが存在することを明らかにした^{10, 11}。さらに卵子 CD9 の新規生理機能として、卵子表面における GPI アンカー型タンパク質の分子区画化機構を明らかにした¹²。

これらの研究成果は、生殖生物学への学術的意義のみならず、不妊治療法への応用など社会的意義に対する波及効果が大きいものと考えられる。

<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. Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* 2016; 534(7608):566-569. DOI: 10.1038/nature18596.
3. Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat Commun* 2015; 6:8858. DOI: 10.1038/ncomms9858.
4. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013; 140(15):3221-3229. DOI: 10.1242/dev.094854.
5. Inoue N, Wada I. Monitoring dimeric status of IZUMO1 during the acrosome reaction in living spermatozoon. *Cell Cycle* 2018; 17(11):1279-1285. DOI: 10.1080/15384101.2018.1489181.
6. Inoue N, Hagihara Y, Wada I. Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion. *eLife* 2021; 10:e66313. DOI: 10.7554/eLife.66313.

7. Inoue N. Gamete Fusion Assay in Mice. *Bio Protoc* 2021; 11:e4233. DOI: 10.21769/BioProtoc.4233.
8. Inoue N, Wada I. Deletion of the initial methionine codon of the Tmem95 gene causes subfertility, but not complete infertility, in male mice. *Biol Reprod* 2022; 106(3):378-381. DOI: 10.1093/biolre/ioab246.
9. Inoue N, Satouh Y, Wada I. IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation. *Mol Reprod Dev* 2021; 88(7):479-481. DOI: 10.1002/mrd.23520.
10. Saito T, Wada I, Inoue N. Alternative splicing of the Izumo1 gene ensures triggering gamete fusion in mice. *Sci Rep* 2019; 9(1):3151. DOI: 10.1038/s41598-019-40130-7.
11. Saito T, Wada I, Inoue N. Sperm IZUMO1-Dependent Gamete Fusion Influences Male Fertility in Mice. *Int J Mol Sci* 2019; 20(19):4809. DOI: 10.3390/ijms20194809.
12. Inoue N, Saito T, Wada I. Unveiling a novel function of CD9 in surface compartmentalization of oocytes. *Development* 2020; 147(15):dev189985. DOI: 10.1242/dev.189985.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Inoue Naokazu, Wada Ikuo	4. 巻 106
2. 論文標題 Deletion of the initial methionine codon of the <i>Tmem95</i> gene causes subfertility, but not complete infertility, in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 378 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioab246	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 Inoue Naokazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Gamete Fusion Assay in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e4233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4233	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 Inoue Naokazu, Satouh Yuhkoh, Wada Ikuo	4. 巻 88
2. 論文標題 IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 479 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23520	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 Inoue Naokazu, Hagihara Yoshihisa, Wada Ikuo	4. 巻 10
2. 論文標題 Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e66313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.66313	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 Ono Ryoichi, Masuya Masahiro, Inoue Naokazu, Shinmei Makoto, Ishii Satomi, Maegawa Yuri, Maharjan Bishnu Devi, Katayama Naoyuki, Nosaka Tetsuya	4. 巻 16
2. 論文標題 Tet1 is not required for myeloid leukemogenesis by MLL-ENL in novel mouse models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248425	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 Inoue Naokazu, Saito Takako, Wada Ikuo	4. 巻 147
2. 論文標題 Unveiling a novel function of CD9 in surface compartmentalization of oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev189985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.189985	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 Saito Takako, Wada Ikuo, Inoue Naokazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Sperm IZUM01-Dependent Gamete Fusion Influences Male Fertility in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4809 ~ 4809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194809	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 Saito Takako, Wada Ikuo, Inoue Naokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Alternative splicing of the Izumo1 gene ensures triggering gamete fusion in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40130-7	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 Inoue Naokazu, Wada Ikuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Monitoring dimeric status of IZUM01 during the acrosome reaction in living spermatozoon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 1279 ~ 1285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2018.1489181	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 Ikezawa Maiko, Tajika Yuki, Ueno Hitoshi, Murakami Tohru, Inoue Naokazu, Yorifuji Hiroshi	4. 巻 247
2. 論文標題 Loss of VAMP5 in mice results in duplication of the ureter and insufficient expansion of the lung	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 754 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.24618	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 井上 直和
2. 発表標題 配偶子融合に至る分子メカニズム
3. 学会等名 第92回日本動物学会米子大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 直和
2. 発表標題 精子と卵子が会うために必要な分子メカニズム
3. 学会等名 第32回細胞生物学ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 直和
2. 発表標題 精子と卵子が会うために必要な分子メカニズム
3. 学会等名 令和元年度 内分泌・代謝学共同利用・共同研究拠点ワークショップ 受精・発生最前線～受精の仕組みと初期発生を支える代謝メカニズム～（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 直和
2. 発表標題 配偶子融合因子IZUMO1の2量体化を生細胞で可視化する試み
3. 学会等名 日本動物学会・平成30年度東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naokazu Inoue
2. 発表標題 Molecular machinery of sperm-egg fusion in mice
3. 学会等名 The 2018 EMBO Workshop “Membrane fusion in health and disease”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上 直和	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2021年8月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容に関するWebページ
<http://www.fmu.ac.jp/home/cellsci/saibou-top.htm>

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
連携研究者	和田 郁夫 (Wada Ikuo) (40182969)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
連携研究者	大戸 梅治 (Ohto Umeharu) (90451856)	東京大学・薬学部・准教授 (12601)	
連携研究者	齋藤 貴子 (Saito Takako) (10778038)	静岡大学・農学部・助教 (13801)	

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