

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14612

研究課題名(和文)精子と卵子の融合におけるSOF1の生理学的機能の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of SOF1 in sperm-oocyte fusion

研究代表者

野田 大地(Noda, Taichi)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50712551

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):精子ではIZUMO1、卵ではCD9とJUNOが融合に必要な因子として知られているが、融合メカニズムの解明には至っていない。申請者は、Sof1欠損(KO)マウスを作製したところ、融合不全のため、KO雄マウスは不妊になった。精子IZUMO1の局在、および卵に接着する精子数はcontrolとKOの間で差はなかった。SOF1は先体反応後の精子でも検出された。SOF1とIZUMO1を細胞に共発現させた時、SOF1はIZUMO1と相互作用した。この細胞を卵と培養したが、IZUMO1単独で発現させた場合と差が見られなかった。以上から、SOF1は未知の因子と共に融合に関与することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子IZUMO1が融合必須因子として同定されてから約15年間、融合に必要な精子側の因子は分かっていなかった。本課題において、申請者はSOF1が融合に関与する遺伝子として同定した。さらに最近、CRISPR/Cas9を用いたマウス個体レベルの表現型スクリーニングにより、申請者らはFIMP、SPACA6、TMEM95も融合に必要な因子であることを報告した。この結果は、精子と卵の融合は多くの分子が関与する複雑なメカニズムであることを示唆している。これらの成果は、男性不妊の新たな原因遺伝子として診断・検査の対象となり、治療薬や避妊薬の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文): So far, IZUMO1 on the sperm surface and CD9 and JUNO on the oocyte membrane have been identified as fusion-required factors. However, the molecular mechanism of sperm-oocyte fusion remains unclear. In this study, I focused on sperm oocyte-fusion required 1 (Sof1), which shows similar expression pattern with Izumo1. I revealed that Sof1 KO spermatozoa could not fertilize oocytes due to sperm-oocyte fusion defect, leading to male sterility. IZUMO1 showed the normal localization in KO spermatozoa, and KO spermatozoa could bind to the oocyte membrane. The immuno-blot analysis revealed that SOF1 remained after calcium ionophore "A23187"-induced acrosome reaction. SOF1 interacted with IZUMO1 when SOF1 and IZUMO1 were expressed in HEK293T cells. In addition, the expression of SOF1 did not affect the adhesion of IZUMO1-expressing HEK293T cells to the oocyte membrane. In conclusion, SOF1 may support sperm-oocyte membrane fusion in association with unknown factors.

研究分野：生殖生物学

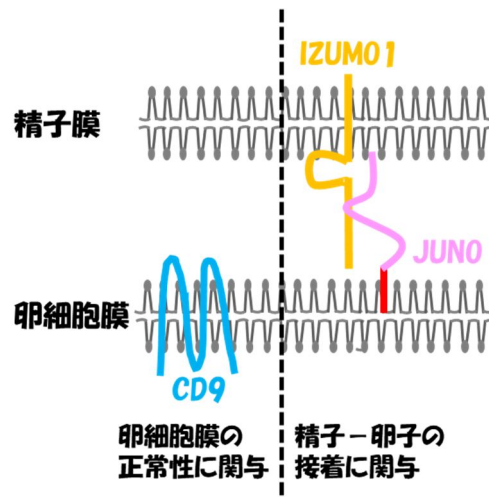
キーワード：受精 精子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

雌性生殖路内に射出された精子は、卵管膨大部に到達すると、精子先体胞からの酵素放出(先体反応)や、飛び跳ねるような激しい運動(超活性化)を示して、卵丘細胞層や透明帯を通過したのち、卵細胞膜と融合する。その後、父性染色体を卵に送り込むとともに、卵を活性化して受精が成立する。本課題では、精子と卵の融合に注目する。

現在までに、融合因子として、精子では IZUMO1 (Inoue et al., Nature, 2005)、卵では CD9 (Miyado et al., Science, 2000; Kaji et al., Nat Genet, 2000) と JUNO (Bianchi et al, Nature, 2014) が明らかにされている(図1)。具体的には、CD9 は足場タンパク質としての機能を持ち、正常な卵微絨毛の形成や分布に必要である。IZUMO1 は、先体反応すると精子頭部全体へと広がり、特に赤道節に局在する IZUMO1 が卵との融合に重要である。その後、IZUMO1 のレセプターとして、卵細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質 JUNO が同定された。IZUMO1 - JUNO は 1:1 の複合体を形成し、この複合体形成に重要なアミノ酸残基が明らかにされた。しかし、培養細胞を用いた実験により、IZUMO1 は融合ではなく、接着に関与することが示唆されている。このようにして、融合メカニズムに関してはよく分かっていない。



**図1 精子と卵の融合に関与する因子群**  
精子では IZUMO1、卵では CD9 と JUNO が融合因子として報告されているが、融合メカニズムの全容解明には至っていない。

申請者は、single-cell RNA sequencing により *Izumo1* とよく似た発現パターンを示す 1700034015Rik 遺伝子 [ 表現型から、sperm-oocyte fusion required 1 (*Sof1*) と命名した ] に注目し、CRISPR/Cas9 により KO マウスを作製した。KO 精子の形態や運動能力は正常だったが、KO 雄マウスと交尾した野生型 (WT) 雌マウスからは産仔を得られなかった。KO 雄マウスと交尾した雌マウスから卵を回収したところ、全て未受精卵で、KO 精子は困卵腔に溜まっていた。この結果から、SOF1 は融合に必須な因子であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

これまでの研究から、SOF1 は融合に必須な因子であると考えられるが、生理学的機能は分かっていない。本研究では、SOF1 の生理学的機能を個体レベルで解析し、融合における分子メカニズムの解明を試みる。

### 3. 研究の方法

#### 【精巣や精子における SOF1 の検出】

マウスの心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳、胃、腸、精巣、卵巣、子宮などを採取し、それぞれの組織から Total RNA を抽出した。得られた各組織由来の Total RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、*Sof1* を特異的に増幅するプライマーセットを用いて PCR を行った。

*Sof1* のコーディング領域を pET ベクターや pGEX ベクターに組み込み、大腸菌 (BL21

株)に導入して、SOF1 タンパク質を発現させた。精製 SOF1 タンパク質をラットに免疫して、腸骨リンパ節法によりモノクローナル抗体を作製した。精巣や精子からタンパク質を抽出し、得られた抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

#### 【KO 精子の特性解析】

精巣上体尾部から採取した精子を TYH 中で前培養した。ホルモン処理した雌マウスの卵管から卵を採取して、その一部はコラゲナーゼ処理により透明帯を除去した後、Hoechst33342 で染色した。前培養 2~3 時間後、精子を卵に振りかけて、体外受精能力を調べた。また、精子をスライドガラスに塗抹して、免疫染色に使用した。

#### 【トランスジーン (Tg) 挿入による KO 雄マウス表現型のレスキュー】

マウス *Sof1* のコーディング領域をカルメジンプロモーター直下に挿入して、制限酵素処理後、直鎖 DNA フラグメントを受精卵の前核に注入した。その後、Tg を持つマウスを *Sof1* 変異マウスと交配させて *Sof1* KO; Tg 雄マウスを作出した。*Sof1* KO; Tg 雄マウスの妊孕性を雌マウスとの交配試験により調べた。

## 4. 研究成果

### 【精巣や精子における SOF1 の検出】

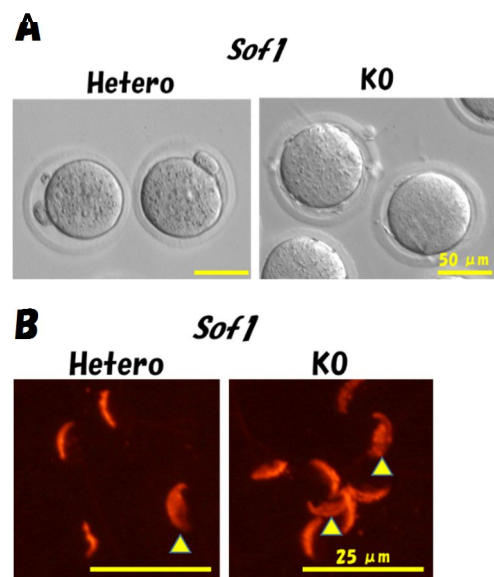
PCR により *Sof1* は精巣で強く検出された。また、生後 0、6、8、10、12、14、18、21、28、35 日齢の精巣 cDNA を用いた PCR では、28 日齢以降の精巣で *Sof1* が検出できた。以上から、*Sof1* は精子細胞で発現すると考えられる。

次に作製したモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、精巣だけでなく精子でも SOF1 が検出できた。また、カルシウムイオノフォア (A23187) で先体反応を誘起した精子由来のタンパク質抽出液でも SOF1 が検出できた。

### 【KO 精子の特性解析】

KO 精子を体外で卵に振りかけたところ、これらの精子は透明帯を通過できたものの、囲卵腔に溜まっていた (図 2A)。また、事前に Hoechst33342 で染色した透明帯除去卵に精子振りかけたところ、KO 精子は卵に接着できるものの、精子に移入する Hoechst のシグナルはほとんど観察できなかった。

さらに、KO 精子における IZUMO1 の局在を免疫染色により調べたところ、IZUMO1 は存在し、先体反応により赤道節全体に広がった (図 2B)。以上から、*Sof1* KO 精子は IZUMO1 の局在が正常であるにも関わらず、卵との融合能力が消失しているため KO オスは不妊になると考えられる。



**図 2 . *Sof1* KO 精子の特性解析**

A . 体外受精能力。KO 精子は透明帯を通過できたものの融合できないため、囲卵腔に溜まっていた。  
B . IZUMO1 の検出。KO 精子における IZUMO1 の局在は正常だった。

### 【Tg 挿入による KO 雄マウス表現型のレスキュー】

*Sof1* KO; Tg 雄マウスの妊孕性は、コントロールと同程度までにレスキューできた。以上から、SOF1 は融合に必要な因子であることが明らかになった。

## 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 6件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Oura S., Miyata H., Noda T., Shimada K., Matsumura T., Morohoshi A., Isotani A., Ikawa M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2-tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0071	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 Noda T., Fujihara Y., Matsumura T., Oura S., Kobayashi S., Ikawa M.	4. 巻 100
2. 論文標題 Seminal vesicle secretory protein 7, PATE4, is not required for sperm function but for copulatory plug formation to ensure fecundity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iory247	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 Tobita T., Kiyozumi D., Muto M., Noda T., Ikawa M.	4. 巻 65
2. 論文標題 Lvrn expression is not critical for mouse placentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 239 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-157	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 Noda T., Sakurai N., Nozawa K., Kobayashi S., Devlin D.J., Matzuk M.M., Ikawa M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Nine genes abundantly expressed in the epididymis are not essential for male fecundity in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 644 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.12621	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 該当する

1. 著者名 Lu Y., Oura S., Matsumura T., Oji A., Sakurai N., Fujihara Y., Shimada K., Miyata H., Tobita T., Noda T., Castaneda M.J., Kiyozumi D., Zhang Q., Larasati T., Young S.A.M, Kodani M., Huddleston C.A, Robertson M.J., Coarfa C., Isotani A., Aitken R.J., Okabe M., Matzuk M.M., Garcia T.X., Ikawa M.	4. 巻 101
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 501 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz103	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 該当する

1. 著者名 §Fujihara Y., §Noda T., §Kobayashi K., Oji A., Kobayashi S., Matsumura T., Larasati T., Oura S., Kojima-Kita K., Yu Z., Matzuk M.M., Ikawa M.	4. 巻 116
2. 論文標題 Identification of multiple male reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 18498 ~ 18506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1908736116	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 該当する

1. 著者名 §Matsumura T., §Noda T., Muratani M., Okada R., Yamane M., Isotani A., Kudo T., Takahashi S., Ikawa M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Male mice, caged in the International Space Station for 35 days, sire healthy offspring	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/s41598-019-50128-w	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 Fujihara Y., Lu Y., Noda T., Oji A., Larasati T., Kojima-Kita K., Yu Z., Matzuk R.M., Matzuk M.M., Ikawa M.	4. 巻 117
2. 論文標題 Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9393 ~ 9400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917060117	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 該当する

1. 著者名 Noda T., Lu Y., Fujihara Y., Oura S., Koyano T., Kobayashi S., Matzuk M.M., Ikawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.1922650117	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 該当する

1. 著者名 §Larasati T., §Noda T., Fujihara Y., Shimada K., Tobita T., Yu Z., Matzuk M.M., Ikawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	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) 10.1093/biolre/ioaa060	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野田大地
2. 発表標題 国際宇宙ステーションで飼育された雄マウスの精子受精能力の検討
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田大地
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子改変マウス作製の現状と落とし穴
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田大地
2. 発表標題 精巢上体で強く発現する9遺伝子は、オスの妊孕性に必須ではない
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taichi Noda
2. 発表標題 Male mice housed in the International Space Station sire healthy offspring
3. 学会等名 52th Annual meeting, Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野田 大地、大浦 聖矢、伊川 正人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 386
3. 書名 完全版 ゲノム編集実験スタンダード	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ORCID <a href="https://orcid.org/0000-0003-0260-7861">https://orcid.org/0000-0003-0260-7861</a> researchmap <a href="https://researchmap.jp/taichi_noda/">https://researchmap.jp/taichi_noda/</a> Scopus <a href="https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=36183583800">https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=36183583800</a> publons <a href="https://publons.com/researcher/1916340/taichi-noda/publications/">https://publons.com/researcher/1916340/taichi-noda/publications/</a>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----