

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0155

研究課題名（和文）脊椎動物モデルに共通する受精の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanisms of fertilization common to vertebrate animal models

研究代表者

藤原 祥高（FUJIHARA, YOSHITAKA）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：70578848

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、受精の中でも精子の卵子透明帯通過と卵子細胞膜融合に関与する SPACA4/Bouncer と DCST1-2 などの精子膜タンパク質に着目して機能解析を行った。解析対象の遺伝子は脊椎動物間で広く保存されていることから、研究代表者ら日本チームが哺乳類を、国際共同研究先が魚類を実験モデル動物として協働で研究を実施した。国際共同研究を通して、生殖細胞に発現する精子膜タンパク質（GPI アンカータンパク質など）が果たす受精機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本国際共同研究により、脊椎動物間で保存される遺伝子の機能解析を通して、脈々と受け継がれてきた生物の「進化」と「生殖」に着目し、生命誕生の一端を明らかにした。特に、精子の卵子透明帯通過と卵子細胞膜融合に必須な遺伝子 SPACA4、DCST1-2 を発見した。本研究成果より生まれる実用面は、ヒトを含む脊椎動物種で広く利用できる精子受精能力の（遺伝子やタンパク質を対象とした）検査・診断マーカーや機能阻害による可逆的避妊薬の可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the function of sperm membrane proteins, such as SPACA4/Bouncer and DCST1-2, which play crucial roles in sperm passage through the oocyte's zona pellucida and fusion with the oocyte membrane during fertilization. Because the genes analyzed are widely conserved among vertebrates, the Japanese team, including the principal investigator, used mammals as experimental models, while the international collaborating research partner used fish. Through this international collaborative research, we elucidated that part of the molecular mechanism of fertilization involving sperm membrane proteins (GPI-anchored proteins, etc.) are expressed in germ cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：受精 精子膜タンパク質 透明帯通過 受精膜融合 進化

1. 研究開始当初の背景

受精は生命誕生の瞬間であり、古くから研究されてきた領域のひとつである。その中でも、特に精子と卵子の膜融合に関しては、精子側 **IZUMO1** と卵子側 **CD9**, **JUNO** の合わせて 3 因子が報告されていた (**Science 2000; Nature 2005, 2014**)。このような状況下で、オーストリア・ウィーンバイオセンターの **Andrea Pauli** 博士らのグループが実験モデル魚類を用いて、卵子に発現する膜タンパク質の一種 **GPI アンカータンパク質 Bouncer** が受精膜融合に必須、かつ異種間受精を制御する働きを持つことを発見した (**Herberg et al. Science 2018**)。この発見により、脊椎動物においても種特異性を制御する因子の存在を証明した。さらに興味深いことに、**Bouncer** は哺乳類では卵子ではなく精子に発現する **SPACA4** として保存され、進化過程で役割が転移したと考えられる。一方、研究代表者らはマウスを用いて、受精膜融合に必須な膜タンパク質 4 種類 (**FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95**) の同定に近年成功し必須因子が揃いつつあるが、まだ課題は残されていた (**Fujihara et al., Noda et al. PNAS. 2020#1, 2**)。

2. 研究の目的

本研究では、**Bouncer/Spaca4** や脊椎動物間で広く保存されている **Dcst1-2** に着目して、脊椎動物間で広く保存される受精膜融合の分子メカニズムの解明を目指して、若手研究者 2 名を含む研究代表者ら日本チームが **Pauli** 博士のグループと以下 3 つのテーマで国際共同研究を実施した。

- (1) **Bouncer/Spaca4 KO** マウスの機能解析
- (2) **Dcst1-2 KO** マウスおよびゼブラフィッシュの開発と機能解析
- (3) 配偶子特異的 **GPI** アンカータンパク質の機能解析

3. 研究の方法

(1) **Bouncer/Spaca4 KO** マウスの機能解析

開発した **Spaca4** ノックアウト (**KO**) マウスの生殖能力を調べるために、交配試験、体外受精、精巣重量、精子の形態観察、そして精子運動性解析を行った。**SPACA4** の局在を調べるために、抗体作製を行い精巣や精子を用いた免疫蛍光染色観察を行った。**KO** 精子の詳細な表現型を検証する目的で、体外受精に 3 つの卵子条件 (①通常条件: 卵丘細胞あり・透明帯あり、②裸化卵子: 卵丘細胞なし・透明帯あり、③透明帯除去卵子: 卵丘細胞なし・透明帯なし) で検討した。精子形成や精子の先体反応の有無を確認するために、以前開発された精子先体が緑色蛍光、精子中片部が赤色蛍光を持つトランスジェニック (**TG**) マウスを **KO** マウスと掛け合わせて実験に使用した。以上の表現型解析全般を実施した後に、関連タンパク質の動態を調べるために各種関連抗体を用いてウェスタンブロットや免疫沈降などを行ってタンパク質間相互作用を検証した。

(2) **Dcst1-2 KO** マウスおよびゼブラフィッシュの開発と機能解析

開発した **Dcst1-2 KO** マウスとゼブラフィッシュを上記と同様の実験方法で一連の表現型解析とタンパク質間相互作用の検討を行った。日本チームがマウス、国際共同研究先がゼブラフィッシュの解析を担当した。**KO** マウス精子の卵子細胞膜への融合能力を検証するために、通常条件の排卵卵子の入った体外受精培地へコラゲナーゼを添加して透明帯除去卵子を回収してヘキスト染色液で前処理した。ヘキスト染色卵子へ媒精後 30 分で固定液を処理して、融合精子の頭部に卵子由来のヘキストが移行していることを指標に卵子ごとの融合精子数を計測した。前培養により受精能力を獲得 (キャパシテーション) させたマウス精子の大半は膜融合に必要な先体反応以前のため、先体反応前精子は卵子細胞膜へ接着・結合する。野生型精子でも数匹程度融合する条件下で **KO** 精子の融合能力を検証した。

(3) 配偶子特異的な **GPI** アンカータンパク質の機能解析

研究代表者が発見した精巣特異的な発現を示す **GPI** アンカータンパク質 **X** (未発表データ) に着目して **KO** マウス開発から上記一連の表現型解析とタンパク質間相互作用の検討を行った。その他に、**KO** 精子の透明帯結合能力を調べるために、通常条件の排卵卵子の入った体外受精培地へヒアルロニダーゼを添加して②裸化卵子を調整した。媒精後 30 分で固定液処理して、卵子透明帯に結合している精子を卵子ごとに計測した。

4. 研究成果

(1) **Bouncer/Spaca4 KO** マウスの機能解析

抗マウス **SPACA4** 抗体と野生型マウス精子を用いて調べた結果、**SPACA4** は精子頭部の赤道面に局在し、受精可能な先体反応後に露出されることが分かった (図 1: 新鮮精子を用いた免疫蛍光染色観察)。交配試験の結果、**KO** マウスの多くは雄性不妊で、マウス系統の違い (**B6** とハイブリッド系統) によりその程度に違いが見られた。次に、雄性不妊の

原因を探るために体外受精試験を行ったところ、①通常条件や②裸化卵子では KO 精子はほとんど受精できなかったが、③透明帯除去卵子では野生型精子と同程度の受精率を示すことが明らかになった (図 2: 3 つの卵子条件での体外受精試験)。一般的に、精子の透明帯通過には精子の推進力を生み出す尾部の運動性と透明帯へ接触する先体反応後精子の頭部形態が重要であると考えられている。そこで、精子運動性と先体反応率、そして精子頭部の形態観察を行ったが、野生型精子との有意な差異は見つからなかった。その他に、KO 精子の透明帯結合や卵子膜融合やそれらに関連するタンパク質の発現解析を行ったが、野生型精子との違いは見られなかった。

以上の結果より、マウス SPACA4 は受精の必須ステップのひとつである精子の透明帯通過に機能することを発見した (Fujihara, Herberg et al. PNAS. 2021)。

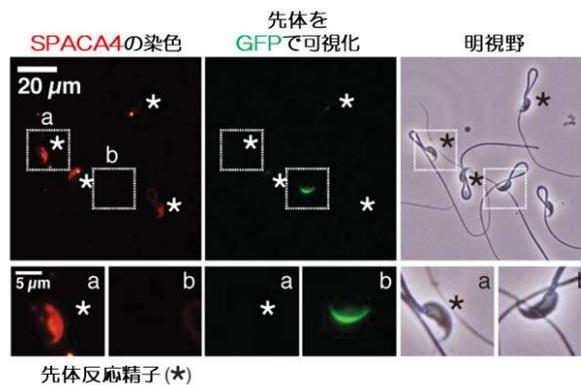


図 1. 新鮮精子を用いた SPACA4 の局在観察
SPACA4 (赤色) は先体反応後 (緑色消失) の精子でしか検出されなかったことから、受精可能な精子の赤道面に局在することが観察された。(Fujihara et al. PNAS. 2021)

(2) Dcst1-2 KO マウスおよびゼブラフィッシュの開発と機能解析

マウス DCST1-2 に対する抗体の作製を何度か試みたが、残念ながら各種解析に利用できる反応性を持つ抗体は得られなかった。Dcst1-2 の KO マウスを CRISPR/Cas9 を介して作出して交配試験に供したところ、どちらの KO 雄マウスも不妊であることが確認できた。次に、①通常条件で体外受精試験を行うと KO 精子は卵子の透明帯を通過して、透明帯と細胞膜との間 (卵卵腔) に滞留していることが観察された (KO 精子は透明帯を通過できなかったことから、精子の運動性と形態に異常がないことが証明された)。さらに、精子の融合能力を調べるために、③透明帯除去卵子を用いて体外受精を行った結果、KO 精子は卵子細胞膜に接着・結合できるが融合できないことが明らかになった。ウエスタンブロットの結果、KO 精子には IZUMO1 が存在したことから、研究代表者らが以前発見した 4 因子 (FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95) と同様の結果が得られた。国際共同研究先で実施された KO ゼブラフィッシュの表現型解析でも、DCST1-2 は精子の受精能力に必須であることが確認された。

以上より、DCST1-2 はゼブラフィッシュ (魚類) からマウス (哺乳類) まで遺伝子だけでなく雄性生殖機能まで広く保存される非常にユニークな遺伝子であることを発見した (Noda, Blaha, Fujihara et al. Commun Biol. 2022)。

(3) 配偶子特異的な GPI アンカータンパク質の機能解析

研究代表者と Pauli 博士は、これまで脊椎動物 (哺乳類と魚類) で発現する GPI アンカータンパク質に着目して研究を進めてきた (Fujihara et al. PNAS. 2013; Pauli et al. Science 2014; Fujihara et al. BOR. 2014; Chew et al. Nat Commun. 2016; Fujihara et al. PNAS. 2019)。互いの情報を共有して、哺乳類配偶子で発現する遺伝子 X (未発表) に着目して解析を行った。X-KO 雄マウスは不妊の表現型を呈し、上記一連の表現型解析の結果、KO 精子は卵子の透明帯への結合不全であることが体外受精試験より明らかになった。関連タンパク質のウエスタンブロットの結果、KO 精子から透明帯結合に重要な精子膜タンパク質 ADAM3 が消失していることが分かった。

現在も、その詳細な分子メカニズムの解明を目指して、引き続き国際共同研究を進めている。

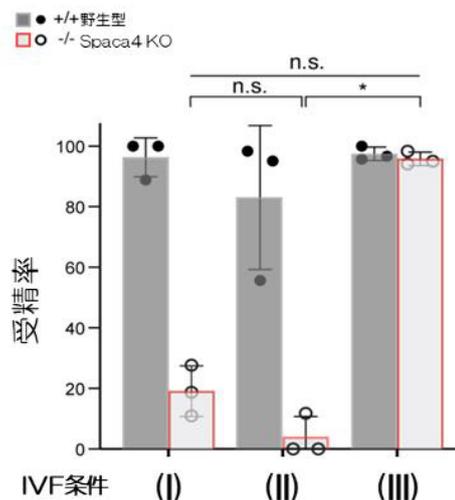


図 2. SPACA4-KO 精子の体外受精試験

未受精卵を 3 つの条件で調整して、体外受精を行った。その結果、①通常条件と②裸化卵子では、KO 精子はほとんど受精できなかった。その一方で、透明帯除去卵子では野生型と同程度の受精率を示した。これらの結果から、精子 SPACA4 が透明帯通過に機能することが示唆された。(Fujihara et al. PNAS. 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Fujihara Y, Miyata H, Abbasi F, Larasati T, Nozawa K, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM.	4. 巻 3
2. 論文標題 Tex46 knockout male mice are sterile secondary to sperm head malformations and failure to penetrate through the zona pellucida	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgae108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgae108	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 Morohoshi A, Miyata H, Tokuhiko K, Iida-Norita R, Noda T, Fujihara Y, Ikawa M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca ²⁺ -activated acrosome reaction and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ade7607	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 Ye Q, Belabed H, Wang Y, Yu Z, Palaniappan M, Li JY, Kalovidouris SA, MacKenzie KR, Teng M, Young DW, Fujihara Y, Matzuk MM.	4. 巻 11
2. 論文標題 Advancing ASMS with LC MS/MS for the discovery of novel PDCL2 ligands from DNA encoded chemical library selections	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 808-815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13309	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, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM.	4. 巻 11
2. 論文標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 789-798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13329	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, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, Oura S, Panser K, Lu Y, Berent S, Kodani M, Cabrera-Quio LE, Pauli A, Ikawa M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03289-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 該当する

1. 著者名 Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, Ikawa M.	4. 巻 21
2. 論文標題 TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12467	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 Nozawa K, Fujihara Y, Devlin DJ, Deras RE, Kent K, Larina IV, Umezu K, Yu Z, Sutton CM, Ye Q, Dean LK, Emori C, Ikawa M, Garcia TX, Matzuk MM.	4. 巻 20
2. 論文標題 The testis-specific E3 ubiquitin ligase RNF133 is required for fecundity in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01368-2	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 該当する

1. 著者名 Sakurai N, Fujihara Y, Kobayashi K, Ikawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated disruption of lipocalins, Ly6g5b, and Ly6g5c causes male subfertility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Andrology	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) 10.1111/andr.13350	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 Miyata H, Oyama Y, Shimada K, Fujihara Y, Tokuhiko K, Garcia TX, Matzuk MM, Ikawa M.	4. 巻 24
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 266-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/aja.aja_63_21	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, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, Ikawa M, Pauli A.	4. 巻 118
2. 論文標題 The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2108777118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108777118	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 Robertson MJ, Kent K, Tharp N, Nozawa K, Dean L, Mathew M, Grimm SL, Yu Z, Legare C, Fujihara Y, Ikawa M, Sullivan R, Coarfa C, Matzuk MM, Garcia TX.	4. 巻 18
2. 論文標題 Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-020-00826-z	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 MM, Ikawa M.	4. 巻 103
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 254-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa060	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 Park S, Shimada K, Fujihara Y, Xu Z, Shimada K, Larasati T, Pratiwi P, Matzuk RM, Devlin DJ, Yu Z, Garcia TX, Matzuk MM, Ikawa M.	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome-edited mice reveal 10 testis-enriched genes are dispensable for male fecundity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 195-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa084	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 藤原祥高	4. 巻 41
2. 論文標題 遺伝子改変技術を用いた疾患モデル動物開発法の進歩と循環器病研究への貢献	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 循環器病研究の進歩	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 藤原祥高	4. 巻 1
2. 論文標題 ゲノム編集技術を応用した精子受精能力の制御メカニズムの解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ゲノム編集技術を応用した製品開発とその実用化	6. 最初と最後の頁 489-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Screening male contraceptive targets using CRISPR/Cas9-mediated KO mice
3. 学会等名 2023 National Contraception Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Molecular mechanism of mammalian fertilization revealed by genome-edited mice
3. 学会等名 The Fibrobesity Visitor Program and Kontinkangas Campus Seminar Series 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Molecular mechanisms of mammalian spermatogenesis and fertilization revealed by genome-edited mice
3. 学会等名 The Fifth Annual David H. Yawn Commemorative Lecture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 The 22nd European Testis Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haga S, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM, and Fujihara Y.
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原祥高、Yonggang Lu、野田大地、大字亜沙美、Tamara Larasati、北加奈子、Zhifeng Yu、Ryan M. Matzuk、Martin M. Matzuk、伊川正人
2. 発表標題 遺伝子改変マウスを用いた精子膜タンパク質FIMPの機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/Yoshitaka_Fujihara/?lang=japanese 国立研究開発法人国立循環器病研究センター先端医療技術開発部HP https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/amt/ 大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野HP https://egr.biken.osaka-u.ac.jp/

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
研究分担者	伊川 正人 (Ikawa Masahito) (20304066)	大阪大学・微生物病研究所・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	江森 千紘 (Emori Chihiro) (10868136)	大阪大学・微生物病研究所・助教 (14401)	
研究分担者	櫻井 伸行 (Sakurai Nobuyuki) (10808281)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特別 研究員 (84404)	
研究分担者	吉田 恵一 (Yoshida Keiichi) (90365437)	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 (84409)	

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			
オーストリア	ウィーンバイオセンター			
米国	ベイラー医科大学			
フィンランド	オウル大学			