

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011 年度

課題番号：21687018

研究課題名（和文） 受精の膜融合における活性化メカニズム

研究課題名（英文） Elucidation of membrane fusion machinery in fertilization

研究代表者

井上 直和（INOUE NAOKAZU）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50379096

研究成果の概要（和文）：

受精の膜融合の分子メカニズムは、未知の部分が多く詳細な解明に至っていない。本研究課題では、膜融合の解明に向けて研究を推進し、以下のような研究成果を得た。

精子側の融合因子である IZUM01 と精子上で相互作用する精巣特異的な分子 ACE3 を同定し、ノックアウトマウスを作製し、その解析を行った。その結果、ACE3 ノックアウトマウスは不妊ではなかったが、その精子は IZUM01 の局在に影響があることが明らかになった。

また IZUM01 ノックアウト精子を利用して、精子は透明帯により先体反応が誘起され、先体内の消化酵素を用いて透明帯を通過できるようになるという定説を覆す新知見を発表した。

研究成果の概要（英文）：

Despite the biological importance of sperm-egg fusion in fertilization, the molecular mechanisms underlying this step remain largely unknown. We focused on elucidating the molecular mechanisms of sperm-egg fusion by using genetically manipulated mice. In this application, we reached to obtain two aspects about mammalian fertilization as follows. We identified an IZUM01-interacting protein in spermatozoon. We produced an Ace3 disrupted mouse line, and found the localization of IZUM01 spread in a little wider area on spermatozoa, but the elimination of ACE3 did not result in a loss of sperm fertilizing ability. Utilizing Izum01-deficient spermatozoa, we found that the spermatozoa had the ability to pass through the ZP at least twice. Apparently, some spermatozoa that had undergone the acrosome reaction long before contact with the ZP remained capable of crossing the ZP and fertilizing eggs. The concept that acrosome-reacted spermatozoa are unable to bind to the ZP and have lost their fertilizing capacity must be reconsidered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
総計	20,300,000	6,090,000	26,390,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：受精、膜融合、精子、卵子

### 1. 研究開始当初の背景

受精は生命現象の始まりという極めて重要な現象にも関わらず、分子生物学的な機構については未知の部分が多い。特に膜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。我々は、融合を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いて、世界で始めて精子側の融合因子 IZUM01 を発見し (*Nature*, Inoue N et al, 2005)、種間でよく保存された N 結合型糖鎖が IZUM01 タンパク質を分解から保護していること (BBRC, Inoue N et al, 2008) を明らかにしてきた。また未発表データながら IZUM01 を介する膜融合機構を解明するうえで重要な位置を占める、IZUM01 の一次構造上の融合機能ドメインを明らかにした。このドメインは種間でよく保存され、かつ IZUM01 に特異的な配列である、N-末端領域 (融合ドメイン) であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) IZUM01 に特異的な融合ドメインから機能部位を明らかにする研究、(2) 融合ドメインと相互作用する卵子側の因子の機能解析の 2 本柱となる研究課題を推進する。

### 3. 研究の方法

#### (1) IZUM01 に特異的な融合ドメインから機能部位を明らかにする研究

①この領域を免疫原として数種類のモノクローナル抗体を作製し、融合阻害の効果があるものとならないものに分類する。②融合ドメインを 10 種類以上の部位にわけ、そのデリベーションミュータントを作製し、細胞に発現させたリコンビナントタンパク質のウエスタ

ンブロットや FACS 等の解析からこれらモノクローナル抗体のエピトープを同定する。同定された融合に機能する領域は、X 線結晶構造解析やアミノ酸の変異のトランスジェニックレスキューにより、in vivo での機能について解析する。

#### (2) 融合ドメインと相互作用する卵子側の因子の機能解析

我々はすでに、IZUM01 と相互作用する IZUM01 結合分子 (IZUM01-BP) の候補分子を同定している。IZUM01-BP が生体内でどのように機能するのか調べるために、ノックアウトマウスを作製する。IZUM01-BP は卵子だけではなく様々な組織で発現するため、コンディショナルノックアウト法を用いる。

### 4. 研究成果

融合ドメインに対する複数のモノクローナル抗体を作製することに成功した。これら抗体のなかで、機能阻害作用のあるものについてのエピトープ解析から融合に機能するコア領域を絞り込みことに成功した。現在は、この部位に変異をもつトランスジェニックマウスを用いて in vivo での機能について解析を進めている。

精子上の IZUM01 の作用機序を解明するために、免疫沈降法により IZUM01 と相互作用している精子膜上のタンパク質の同定を試みた。その結果、血圧の調節に機能する ACE (Angiotensin-converting enzyme) に類似する精巢特異的な ACE3 が同定された。ACE3 のノックアウトマウスを作製したが、精子の受精能には何ら影響を与えなかった。しかし、IZUM01 の局在に影響を及ぼす分子であること

が明らかになった (図 1)。

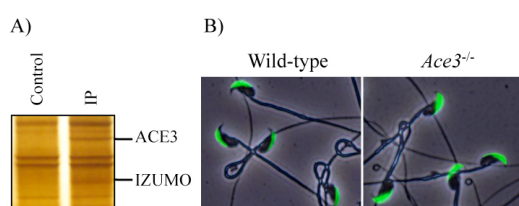


図 1 IZUM1 に相互作用する分子として、ACE3 が同定された (A)。ACE3 ノックアウトマウスの精子では IZUM1 の局在が先体部の広範囲に変化する (B)。

IZUM1-BP のノックアウトマウスを作製し、その妊孕性について解析したが、雌雄ともに不妊ではなかった。この結果から IZUM1 のカウンターレセプターとなる卵子側の分子は他に存在すると推測された。

この他、融合できない IZUM1 ノックアウト精子を利用して、これまで考えられてきた精子が卵子の透明帯に接触することにより先体反応が引き起こされ、精子の頭部にある先体部から酵素を放出しながら透明帯を通過するという定説を覆す新知見を発表した。つまり、囲卵腔内の先体反応を完全に終えた精子を回収し、新しい卵子に加えたところ、精子は透明帯を再度通過できるばかりではなく、正常に受精できることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. 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; 108:20008-20011. DOI:10.1073/pnas.1116965108, 査読有り

2. Ikawa M, Tokuhiko K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Caldesperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem* 2011; 286:5639-5646. DOI:10.1074/jbc.M110.140152, 査読有り
3. Inoue N, Ikawa M, Okabe M. The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUM1 in fusion. *Asian J Androl* 2011; 13:81-87. DOI:10.1038/aja.2010.70, 査読有り
4. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* 2010; 8:496-509. DOI:10.1016/j.chom.2010.11.008, 査読有り
5. 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:e10301. 査読有り
6. Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci* 2010; 123:1531-1536. DOI:10.1242/jcs.067363, 査読有り
7. Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 2010; 120:984-994.

[学会発表] (計7件)

1. **Inoue N.** The mechanism of sperm-egg fusion in mouse and the involvement of IZUM01 and a novel factor. Gordon Research Conferences “Cell-Cell Fusion”, 2011.8.9. USA.
2. **井上直和**「ほ乳類の融合関連因子IZUM01の構造と局在解析」, 第33回日本分子生物学会年会、ワークショップ, 2010.12.7. 神戸市.
3. **井上直和**「受精の膜融合における活性化メカニズム」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー 疾患と膜動態の蛋白質科学, 2010.9.17. 吹田市.
4. **Inoue N.** Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. International Symposium for Immunology of Reproduction joint meeting in conjunction with The 25<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society for Immunology of Reproduction, 2010.8.28. Suita-city.
5. **Inoue N.** A helix bundle involved in cell-cell fusion as shown by molecular dissection of sperm protein IZUM01. 11<sup>th</sup> International Symposium on Spermatology, 2010.6.27. Nago-city.
6. **井上直和**「受精の膜融合因子IZUM01の膜融合活性化領域の同定とその構造解析」, 第57回日本実験動物学会, 2010.5.12. 京都市.
7. **井上直和**「受精の膜融合因子IZUM01の膜融合活性化領域の同定とその構造解析」, 第32回日本分子生物学会年会,

[その他]  
ホームページ等

ホームページ  
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/index.php>

報道関係

MSN 産経ニュース  
<http://sankei.jp.msn.com/science/news/120320/scn12032013550000-n1.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 直和 (INOUE NAOKAZU)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号：50379096

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：