

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15103

研究課題名（和文）Deciphering the cellular and molecular mechanisms underlying mammalian sperm-egg fusion

研究課題名（英文）Deciphering the cellular and molecular mechanisms underlying mammalian sperm-egg fusion

研究代表者

Lu Yonggang (Lu, Yonggang)

大阪大学・ヒューマン・メタバース疾患研究拠点 ・特任准教授（常勤）

研究者番号：00817033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：このプロジェクトにより、哺乳類の受精と生殖のメカニズムの解明が大きく前進しました。2022年4月から2024年3月までに、筆頭著者5本、共著者3本の論文を国際的な査読付き学術誌に発表しました。これらの論文を通じて、哺乳類の精子と卵子の融合に関する詳細なメカニズム解明と、融合に必要な膜タンパク質の分子機能を研究する新しい戦略を提供しました。受精に關与する精子タンパク質の生合成を支える新しいタンパク質生合成経路を発見しました。また、国際的な研究者との共同研究により、多精子化における透明帯ブロックの基盤となる詳細な構造的・分子的メカニズムを解明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

This work has significant relevance to the advancement of our knowledge of human reproduction and origin. It also provides profound implications for diagnosis and treatment of idiopathic male infertility and development of contraceptive measures involving molecular perturbations in fertilization.

研究成果の概要（英文）：During this project, I have made substantial progress in understanding the mechanism of mammalian fertilization and reproduction. From April 2022 to March 2024, I have published 5 first authored papers and 3 co-authored papers in international peer reviewed journals. These publications have (1) provided detailed mechanistic insights into mammalian sperm-egg fusion and novel strategies to study the molecular functions of fusion-required membrane proteins (Tang\*, Lu\* et al. 2022 PNAS), (2) marked the discovery of a novel protein biosynthesis pathway underpinning the biosynthesis of sperm proteins involved in fertilization (Lu et al. 2023 PNAS), and (3) deciphered the detailed structural and molecular mechanisms underlying zona pellucida block to polyspermy (Nishio et al. 2024 Cell).

研究分野：Sperm-egg fusion

キーワード：Fertilization Sperm-egg fusion Fusogen Protein interaction Spermatology Spermiogenesis Male infertility Genome editing

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

In mammalian species, sperm are ejaculated during coitus, migrate along the female reproductive tract, and approach the eggs in the fallopian tube, where fertilization occurs. Fertilization is a complicated series of events involving the union of a haploid sperm and a haploid egg to produce a diploid zygote. This process is a fundamental but obligatory prerequisite for successful propagation of the parental genomes to the next generation. Fertilization generally encompasses five distinct phases: A) the sperm undergoes acrosome reaction in female reproductive tract to expose hydrolytic and proteolytic enzymes and the inner acrosomal membrane proteins; B&C) the acrosome-reacted sperm passes through the cumulus cell layer of the egg, binds to and penetrates the zona pellucida, a translucent matrix of glycoproteins surrounding the egg; D) the sperm adheres to and fuses with the egg plasma membrane; E) the sperm nucleus decondenses and forms the male pronucleus, and merges with the female pronucleus to form a zygotic nucleus.

In contrast to somatic cell-cell fusion processes (e.g., osteoclast fusion in bones and myoblast fusion in muscles), the sperm-egg fusion is an extraordinarily unusual fusion event, in which cells from two individual organisms recognize and merge with each other. This intriguing biological process has attracted attention from researchers for centuries, yet its detailed mechanisms remain mysterious, owing to its spatiotemporally dynamic nature. The lack of culture systems supporting production of fully functional sperm and eggs further impedes researchers from recapitulating or manipulating the gamete fusion process *in vitro*.

### 2. 研究の目的

This research project was primarily focusing on deciphering the cellular and molecular mechanisms of the sperm-egg fusion in mammals, with an ultimate objective of identifying the bona fide fusogens mediating this biological process.

### 3. 研究の方法

The study was subdivided into three major sections: 1) large-scale screening of molecules implicated in the sperm-egg fusion using the CRISPR/Cas9-based knockout strategy in mice; 2) in-depth functional analyses of the gamete fusion-required proteins using genetics, proteomics, and cell biology techniques; 3) detailed investigation of the gamete fusion machinery from different perspectives, such as species-specific recognition at sperm-egg fusion and the plasma membrane block to polyspermy.

By employing innovative multidisciplinary technologies, such as human sperm-hamster egg fusion assay (also known as sperm penetration assay), X-ray crystallography, antibody and recombinant protein engineering, this study comprehensively revealed how each key factor contributes to the process of sperm-egg fusion.

### 4. 研究成果

During this project, I have made substantial progress in understanding the mechanism of mammalian fertilization and reproduction. From April 2022 to March 2024, I have published 5 first authored papers and 3 co-authored papers in international peer reviewed journals. Among these publications, I would like to highlight 3 discoveries that are very important to the field of sperm-egg fusion.

First, in collaboration with Stanford University, we elucidated the molecular function of TMEM95 in human fertilization (Tang\*, Lu\* et al. 2022 PNAS). Using innovative *in vitro* assays (such as sperm penetration assay, bilayer interferometry analysis, antibody inhibitory assay), we found that unlike IZUMO1, TMEM95 plays a critical role after sperm-egg binding and that sperm TMEM95 has a putative receptor on the egg plasma

membrane.

Second, I discovered a testis-specific, type-II transmembrane protein, 1700029I15Rik, that regulates the biosynthesis of acrosomal membrane glycoproteins involved in sperm-egg fusion (e.g., IZUM01, SPACA6, EQTN; Lu et al. 2023 PNAS). This finding marks the discovery of a novel protein biosynthesis pathway underpinning the correct assembly of fertilization machinery during sperm development.

Third, in collaboration with Karolinska Institutet, we deciphered the detailed structural and molecular mechanisms underlying zona pellucida block to polyspermy (Nishio et al. 2024 Cell), which was a long-stand mystery in the field of fertilization.

(\* Equal first authors)

## 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 8件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Lu Yonggang, Shimada Kentaro, Tang Shaogeng, Zhang Jingjing, Ogawa Yo, Noda Taichi, Shibuya Hiroki, Ikawa Masahito	4. 巻 120
2. 論文標題 1700029115Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm?egg interaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2207263120	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 Yonggang, Nagamori Ippei, Kobayashi Hisato, Kojima Kita Kanako, Shirane Kenjiro, Chang Hsin Yi, Nishimura Toru, Koyano Takayuki, Yu Zhifeng, Castaneda Julio M., Matsuyama Makoto, Kuramochi Miyagawa Satomi, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 11
2. 論文標題 ADAD2 functions in spermiogenesis and piRNA biogenesis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 698 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13400	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 Ogawa Yo, Lu Yonggang, Kiyozumi Daiji, Chang Hsin Yi, Ikawa Masahito	4. 巻 なし
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing reveals seven testis enriched transmembrane glycoproteins dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13564	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 Shimada Keisuke, Lu Yonggang, Ikawa Masahito	4. 巻 73
2. 論文標題 Disruption of testis-enriched cytochrome c oxidase subunit COX6B2 but not COX8C leads to subfertility	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.23-0055	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 Nishio Shunsuke, Emori Chihiro, Wiseman Benjamin, Fahrenkamp Dirk, Dioguardi Elisa, Zamora-Caballero Sara, Bokhove Marcel, Han Ling, Stsiapanava Alena, Algarra Blanca, Lu Yonggang, Kodani Mayo, Ikawa Masahito, Jovine Luca	4. 巻 187
2. 論文標題 ZP2 cleavage blocks polyspermy by modulating the architecture of the egg coat	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1459.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2024.02.013	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 Yonggang, Nagamori Ippei, Kobayashi Hisato, Kojima Kita Kanako, Shirane Kenjiro, Chang Hsin Yi, Nishimura Toru, Koyano Takayuki, Yu Zhifeng, Castaneda Julio M., Matsuyama Makoto, Kuramochi Miyagawa Satomi, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 11
2. 論文標題 ADAD2 functions in spermiogenesis and piRNA biogenesis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 698 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13400	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 Yonggang, Shimada Kentaro, Tang Shaogeng, Zhang Jingjing, Ogawa Yo, Noda Taichi, Shibuya Hiroki, Ikawa Masahito	4. 巻 120
2. 論文標題 1700029I15Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction	5. 発行年 2023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.2207263120	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 Yonggang, Ikawa Masahito	4. 巻 135
2. 論文標題 Eukaryotic fertilization and gamete fusion at a glance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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) 10.1242/jcs.260296	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 該当する

1. 著者名 Tang Shaogeng, Lu Yonggang, Skinner Will M., Sanyal Mrinmoy, Lishko Polina V., Ikawa Masahito, Kim Peter S.	4. 巻 119
2. 論文標題 Human sperm TMEM95 binds eggs and facilitates membrane fusion	5. 発行年 2022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.2207805119	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 Taichi, Blaha Andreas, Fujihara Yoshitaka, Gert Krista R., Emori Chihiro, Deneke Victoria E., Oura Seiya, Panser Karin, Lu Yonggang, Berent Sara, Kodani Mayo, Cabrera-Quio Luis Enrique, Pauli Andrea, Ikawa Masahito	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 -
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

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Lu Yonggang, Nagamori Ippei, Kobayashi Hisato, Kojima Kita Kanako, Shirane Kenjiro, Chang Hsin Yi, Nishimura Toru, Koyano Takayuki, Yu Zhifeng, Castaneda Julio M., Matsuyama Makoto, Kuramochi Miyagawa Satomi, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito
2. 発表標題 ADAD2 functions in spermiogenesis and piRNA biogenesis in mice
3. 学会等名 The 1st Asian Congress for Reproductive Immunology (ACRI) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lu Yonggang, Shimada Kentaro, Tang Shaogeng, Zhang Jingjing, Ogawa Yo, Noda Taichi, Shibuya Hiroki, Ikawa Masahito
2. 発表標題 1700029115Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (SSR) 56th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Deneke Victoria E., Lu Yonggang, Phan Clara, Draper Jonne, Vance Tyler, Blaha Andreas, Panser Karin, Stejskal Karel, Schleiffer Alexander, Kamoshita Maki, Lee Jeffrey, Ikawa Masahito, Pauli Andrea
2. 発表標題 Identification of a sperm trimeric complex essential for vertebrate fertilization
3. 学会等名 The 24th Gordon Research Conference (GRC) on Fertilization and Activation of Development (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chang Hsin-Yi, Lu Yonggang, Ikawa Masahito
2. 発表標題 ERP2 is required for sperm motility and male fertility in male mice
3. 学会等名 The 1st Asian Congress for Reproductive Immunology (ACRI) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lu Yonggang
2. 発表標題 ADAD2 functions in spermiogenesis and piRNA biogenesis in mice
3. 学会等名 The 1st Asian Congress for Reproductive Immunology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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			
米国	Yale University	Stanford University	University of California, Berkeley	他2機関
スウェーデン	Karolinska Institutet	Karolinska Institutet	Uppsala University	
オーストリア	IMP			