

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570241

研究課題名(和文) 線虫卵子に存在する配偶子間融合関連因子の同定

研究課題名(英文) Identification of gamete fusion-related factors that are present on the oocyte surface

研究代表者

西村 仁(NISHIMURA, Hitoshi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：80241347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：最近、当研究室において、線虫のオス特異的遺伝子spe-45を同定した。この遺伝子は精子と卵子の融合に必須であることから、SPE-45タンパクと結合する精子因子または卵子因子の同定を試みた。まず、FLAGタグ(目印)を付けたSPE-45タンパクの遺伝子をspe-45変異体内で発現させた結果、変異体の不妊が約70%回復した。現在、このタグに対する抗体を用いてSPE-45と結合しているタンパク質を探索中である。

一方、卵子特異的な遺伝子の変異体も順次作製している。仮にその変異体が不妊であれば、破壊された遺伝子は配偶子間融合に関係している可能性が高い。今後も、変異体の作製を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：My laboratory has recently identified the *C. elegans* male-specific gene *spe-45* that is essential for gamete fusion. In order to identify sperm or oocyte factors that associate with SPE-45 protein, I constructed a transgene encoding SPE-45 in which a FLAG-tag is inserted into the cytoplasmic tail domain. As the transgene was expressed in *spe-45* mutants, self-fertility of the mutant worms was rescued to about 70% levels of wild-type worms. Currently, by using anti-FLAG antibody, I am trying to identify SPE-45-associating proteins.

I also tried to identify oocyte factors that are indispensable for gamete fusion by different ways. From the database, I selected oocyte-specific genes encoding transmembrane proteins. Then, I disrupted some of the selected genes by the CRISPR/Cas9 method. So far I have obtained five mutant strains, but neither of them were sterile at all. I'll continue to create mutants by the same way.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：精子 卵子 配偶子間融合 受精 線虫 免疫グロブリン様タンパク質 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

受精は、多くの動植物で行われている繁殖戦略である。配偶子間融合は受精の中心となる反応だが、そのメカニズムには不明な点が多い。例えばマウスの場合、精子上の免疫グロブリン (Ig) 様タンパク質 IZUM01 および卵子上の 4 回膜貫通型タンパク質 CD9 が配偶子間融合に必須である。しかし、IZUM01 や CD9 のアミノ酸配列より、これらの分子が膜融合を直接引き起こす fusogen (融合因子) とは考えづらく、配偶子間融合の全体像は明らかになっていない。

最近、当研究室において、線虫 (*C. elegans*) の雄性生殖細胞系列で特異的に発現している Celzumo 遺伝子 (現在は spe-45 と命名) が同定された。この遺伝子はマウス Izumo1 遺伝子と同様に免疫グロブリン様タンパク質をコードしていたが、興味深いことに、SPE-45 タンパクは膜貫通ドメインに加え、fusogen で見出される疎水性領域も持っていた。また、spe-45 が欠損すると、雌雄同体の自家受精が起こらずに不妊となった。spe-45 変異体のオスでは、精細胞形成や精子形成は正常だったが、オス精子の受精能は著しく低下していた。さらに、Ig 様ドメインをマウス IZUM01 と交換した SPE-45 タンパクをコードするトランス遺伝子を spe-45 変異体で発現させると、変異体の不妊が部分的にレスキューされた。これらの結果は、SPE-45 と IZUM01 における Ig 様ドメインの機能が部分的に同じである可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

精子や卵子上に存在する融合装置の全体像を明らかにする第一歩として、本研究では SPE-45 と結合する精子タンパク質や卵子タンパク質の同定を試みた。

一方、CRISPR/Cas9 法を使い、線虫の受精に必須な卵子特異的遺伝子の同定も行った。線虫の場合、卵子に透明帯のような卵外被が無く、卵子細胞膜が露出している。従って、「受精の異常=配偶子間融合の異常」となり、配偶子間融合の異常が容易に判別できる利点がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) FLAG タグ付き SPE-45 をコードしているトランス遺伝子の発現

SPE-45 と結合している精子タンパク質または卵子タンパク質を同定する上で抗 SPE-45 抗体は必須のツールだが、現在まで抗 SPE-45 抗体は得られていない。そこで、抗タグ抗体が市販されている FLAG タグを細胞質ドメイン内に持つ SPE-45 (SPE45-CTFLAG, 図 1A) のトランス遺伝子 (SPE45-CTFLAG TG) を作製し、spe-45 変異体ゲノムに 1 コピー挿入した。次に、トランス遺伝子が挿入された spe-45 変異体の自家受精による F1 の数をカウントし、FLAG タグの挿入が SPE-45 の機能や局在に影響があるかどうかを調べた。

#### (2) 抗 FLAG モノクローナル抗体を用いた免疫染色法およびウエスタンブロット法による SPE45-CTFLAG の検出

免疫染色法：野性型および (1) で作製したトランスジェニック体のオス線虫をカミソリで解剖して精細胞を放出させた。その後、パラホルムアルデヒド (PFA) またはメタノールで細胞を固定し、抗 FLAG タグモノクローナル抗体 (クローン M2, 一次抗体) および Alexa 488-抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (二次抗体) とインキュベーションした。最後に蛍光顕微鏡下で精細胞を観察し、FLAG 特異的なシグナルが観察されるかどうか調べた。

ウエスタンブロット法：野性型および (1) で作製したトランスジェニック体のオス線虫から全タンパク質画分を調製し、15% SDS-PAGE (還元条件下) で分離した後、PVDF 膜に転写した。その膜を M2 抗体 (一次抗体) およびペルオキシダーゼ-抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (二次抗体) とインキュベーションし、化学発光系試薬で M2 抗体特異的シグナルを検出した。さらに、上述の全タンパク質画分と M2 抗体ビーズをインキュベーションし、非特異的なタンパク質を緩衝液で洗い流した後、FLAG ペプチドでビーズに結合しているタンパク質を溶出した。その後、M2 抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、ビーズと結合した FLAG タグ含有タンパク質の検出を行った。

#### (3) 受精に必須な卵子特異的遺伝子の同定

線虫の雄性生殖細胞系列 (精子) および雌性生殖細胞系列 (卵子) 特異的な遺伝子は WormBase ([www.wormbase.org/](http://www.wormbase.org/)) および SPELL ([spell.caltech.edu:3000/](http://spell.caltech.edu:3000/)) を使って調べることが出来る。そこで、膜タンパク質をコードしている卵子特異的な遺伝子の内、機能がわかっていないものを選び、CRISPR/Cas9 法で順次変異体を作製した。さらに、得られた変異体の自家受精による F1 の数をカウントし、不妊であるかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) spe-45 変異体における SPE45-CT FLAG TG の発現

CRISPR/Cas9 法による遺伝子欠損と相同組換えによる遺伝子修復を組み合わせ、spe-45 変異体ゲノムの特定部位に SPE45-CT FLAG TG を 1 コピー挿入した。得られたトランスジェニック体の自家受精能を調べた所 (図 1B)、トランスジェニック体の自家受精能は野性型の ~70% レベルまでレスキューされ、FLAG タグの細胞質内への挿入は SPE-45 の機能・局在に大きく影響しないことが考えられた。

#### (2) 抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2 抗体) を用いた SPE45-CTFLAG の検出

M2抗体を用い、トランスジェニック体のオス精細胞に対して免疫染色を行ったが、対照の細胞と比較して、FLAG特異的シグナルは観察されなかった。

また、トランスジェニック体のオスから調製した全タンパク質画分に対するウエスタンブロット法や免疫沈降法でも同様にFLAGタグ特異的なシグナルは観察出来なかった。今後は、実験の条件を更に検討する予定である。

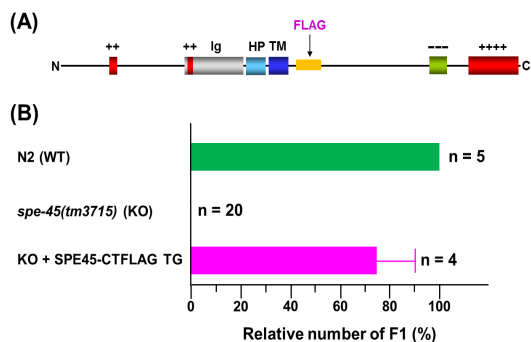


図1. SPE45-CTFLAG TGはspe-45変異体の自家受精能をレスキューする

(A) SPE45-CTFLAGの構造。膜貫通領域(TM)直下の細胞質ドメイン内にFLAGタグを挿入した。Ig:免疫グロブリンドメイン, HP:疎水性領域,+:酸性アミノ酸のクラスター,-:塩基性アミノ酸のクラスター。

(B) SPE45-CTFLAG TGによるspe-45変異体のレスキュー実験。SPE45-CTFLAGをspe-45変異体ゲノムに挿入した後、野生型(N2,WT),spe-45(tm3715)変異体(KO)および得られたトランスジェニック体の雌雄同体について、それぞれ自家受精能を調べた。横軸はWTを100%とした時のF1の相対数,nはカウントに用いた個体数,エラーバーは標準誤差を示している。

### (3) 線虫の受精に必須な卵子特異的膜タンパク質の同定

fem-3変異体(雌性生殖細胞系列特異的遺伝子の発現が欠損)およびfem-1変異体(雄性生殖細胞系列特異的遺伝子の発現が欠損)のDNAマイクロアレイのデータを比較して、卵子特異的と思われる遺伝子群をデータベースより抽出した。さらに、その中で膜貫通タンパク質をコードしているものを選び、卵子に対する特異性が高い遺伝子からCRISPR/Cas9法で変異体を作製した。

現在までに5種類の変異体を得られたが、いずれも不妊ではなく、目的の遺伝子ではないことが考えられた。今後も変異体作製を継続する予定である。

### 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1件)

(1) 西村 仁, 平井 秀憲, 宮田 敏行 (2012): 凝固 XI 因子の構造と機能. 血栓止血誌 23, 594-598 (査読あり)。

〔学会発表〕(計6件)

(1) 西村 仁, 高山 順, 田島 達也, 大浪 修一: 線虫の受精必須遺伝子 spe-45 の機能解析. 第8回領域会議(科学研究費補助金 新学術領域「動植物に共通するアロ認証機構の解明」), 名古屋大学(愛知県名古屋市), 2014年1月9日(招待講演)。

(2) Hitoshi Nishimura, Tatsuya Tajima, Skye Comstra, and Steven W. L'Hernault: Functional analysis of F28D1.8 (Celzumo), a male germline-specific, immunoglobulin-like gene that plays an essential role(s) during *C. elegans* fertilization. Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development, Holderness School (Holderness, NH, USA), July 17, 2013(ポスター発表)。

(3) 西村 仁, 田島 達也: 線虫のオス特異的免疫グロブリン様遺伝子 F28D1.8 (spe-45)の機能解析. 第7回領域会議(科学研究費補助金 新学術領域「動植物に共通するアロ認証機構の解明」), くにびきメッセ(島根県松江市)2013年6月2日(招待講演)。

(4) Hitoshi Nishimura, Skye Comstra, and Steven W. L'Hernault: The *C. elegans* gene F28D1.8 is male germline-specific and indispensable for fertilization like mouse Izumo1. The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, 名古屋ガーデンパレス(愛知県名古屋市)2012年11月14日(招待講演)。

(5) 西村 仁, 田島 達也: 線虫とマウスに共通する配偶子間融合機構の解析. 第83回日本動物学会大阪大会 関連集会「受精研究の現在とこれから」, 大阪大学(大阪府豊中市), 2012年9月13日(招待講演)。

(6) Hitoshi Nishimura, Skye Comstra, and Steven W. L'Hernault: The *C. elegans* male germline-specific gene F28D1.8, encoding an immunoglobulin-like protein, is essential for fertilization. 第5回領域会議(科学研究費補助金 新学術領域「動植物に共通するアロ認証機構の解明」), 下田東急ホテル(静岡県下田市), 2012年6月13日(招待講演)。

〔図書〕(計2件)

(1) 西村 仁: 線虫の受精. 動植物の受精

学(澤田 均 編), p121-137, 化学同人,  
2014年(著書)。

(2) Hitoshi Nishimura, Tatsuya Tajima,  
Skye Comstra, and Steven W. L'Hernault:  
Functional roles of spe genes in the male  
germline during reproduction of  
*Caenorhabditis elegans*. In Sexual  
Reproduction in Animals and Plants  
(edition by Hitoshi Sawada, Naokazu Inoue,  
and Megumi Iwano), p199-213, SpringerOpen,  
2014(著書)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~bio/labo/nishimura.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 仁 (NISHIMURA, Hitoshi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：80241347