

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770210

研究課題名(和文)受精ライブイメージングによる卵 精子融合と卵活性化メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of sperm-egg fusion and egg activation by live imaging of fertilization

研究代表者

佐藤 裕公 (Satouh, Yuhkoh)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40545571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子改変動物の作出とライブイメージングの技術を駆使して受精メカニズムの解明を目指した。卵 精子融合については、卵CD9と精子IZUMO1のライブイメージングに初めて成功し、受精時に卵が精子を取り込むエンドサイトーシス活性の重要性を示唆できた。また、卵活性化については、近年報告された活性化因子候補の遺伝子破壊マウスを作出し、示唆された機能や重要性がマウスでは存在しないことを証明できた。さらに、CRISPR/Cas9を用いた迅速な遺伝子改変動物作製法を開発し、卵 精子融合と卵活性化における重要因子について、多数の遺伝子の欠損個体/点変異モデルマウスの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at the understanding of mammalian fertilization, especially sperm-egg fusion and egg activation by visualizing these phenomena using gene manipulated animal and live imaging technique. First, it was succeeded to visualize the moment of sperm-egg fusion in live using fluorescence-tagged IZUMO1 and CD9, and the significance of endocytotic activity of egg was strongly implicated. And, by the generation of gene-manipulated mouse line which lacks a newly reported sperm-born egg activation factor, it was proven that the factor doesn't play any essential role in mouse egg activation. Additionally, we succeeded to develop a novel gene-editing method using CRISPR/Cas9 system for rapid generation of gene deleted or point mutant mice, which enabled us to generate the multiple lines of mutant mice for essential factor(s) in sperm-egg fusion or egg activation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：受精 ライブイメージング 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

わが国における少子化問題は存在感が大きくなる一方であり、世界的にも、先進国の間で不妊と認定されるカップルの比率は6組に1組まで増加するなど、受精と不妊に関する研究は要求度が増す一方である。

これに対し、顕微授精法が普及するなど技術開発については目覚ましい進展が認められてきた。しかしながら、まだ妊娠率の低さや安全面・倫理面での問題は多く残っているのが現状である。

こういった状況を打破するには、いまだ不明な点の多い受精のメカニズムに関して深い理解を得たうえで、“なぜ受精できないのか”を明確にすることが必要である。一方で、受精現象は、観察ストレスに弱いなど、個々の細胞を解析するには課題があった。これに対し申請者は、“受精の蛍光プローブ開発”と“低侵襲観察法”とを融合させる方法で、「精子先体が卵との接触以前に失われている」ことや、「体内で選択を受け卵にたどり着いた精子は長期間受精能を維持できる」ことなど、これまで知られてきた結果と異なる実験結果を得ていた。また、哺乳類の卵精子の膜融合の過程を初めて *in vitro* 蛍光ライブイメージングすることに成功した。

2. 研究の目的

不妊原因を探る際や、人工受精技術を発展させるために、避けうることができない障壁となっている、2つの現象に注目した。1つは、“卵 精子の融合”であり、もう1つは“卵活性化”(精子ファクターが卵に Ca^{2+} 振動を誘起し、卵染色体が雌性前核へ、精子核が雄性前核へと変わる反応)である。

申請者も明らかにしてきたように、ここまでの知見の真偽をはかり優先順位をつけるには、時間軸に沿ったライブイメージング観察が必要である。そこで、本研究は、受精を全く新しい視点から解析する試みとして、一つ一つの卵と精子の出会い(=受精)について、遺伝子改変動物の作出とともに、新規に開発した受精の可視化(ライブイメージング)技術を駆使することで、“卵 精子の融合”と“卵活性化”における重要因子の機能を解析し、受精過程の本質を明らかにすることが目的である。

このため、研究全体を(1)卵-精子の融合、と(2)卵活性化とに大別した。

3. 研究の方法

(1) 卵-精子の融合

両者が融合するメカニズムに関しては、卵の表面にある CD9 と、精子の頭部上にある IZUMO1 が、それぞれ融合必須因子だと明らかになっていた。しかし、どちらの分子も詳細な機能は不明で、特に CD9 は、卵表面の微絨毛の形成に必要なだという報告もあり、CD9 が直接融合に関与しているのかが争点となっていた。

そこで、ここでは主に融合時の CD9 の挙動を、CD9 遺伝子欠損マウスの卵に蛍光タンパク質融合型 CD9 を導入した卵と精子との融合ライブイメージング解析を行った。

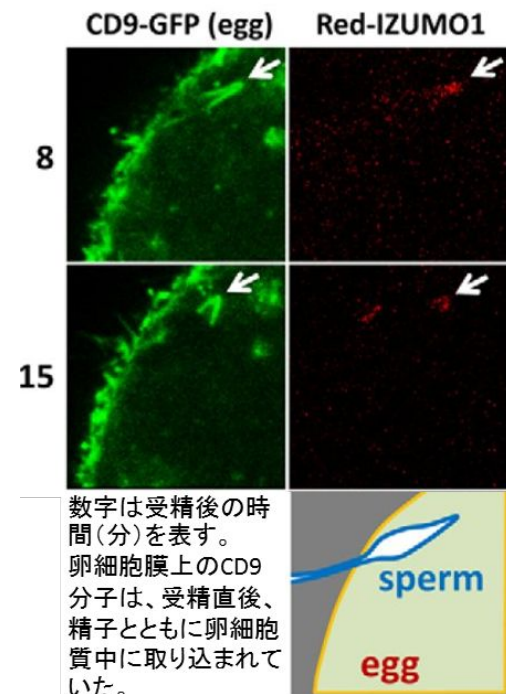
(2) 卵活性化

活性化時には、まず精子由来の活性化ファクターが卵細胞質に伝わり、 Ca^{2+} 振動を誘起することで、卵染色体が雌性前核へ、精子核が雄性前核へと変わる。この精子ファクターについて、これまで PLC- ζ 1 (Phospholipase C-zeta 1) が有力な候補として同定されていたが、一方で家畜を中心にいくつかのほかの分子にも同様の卵活性化作用があることが報告された。

このため、ここではそれらの真偽について遺伝子組換えマウスモデルを作出して機能を解析した。また、その機能を評価するためのイメージング解析系構築を目指した。

4. 研究成果

(1)では、CD9 遺伝子欠損マウスの卵に卵特異的発現プロモーターを用いた蛍光タンパク質融合型 CD9 を発現するトランスジーン(ZP3-CD9-EGFP)を導入した卵を作製することで、CD9 分子の融合時のライブイメージング観察に成功した。さらに、精子側の融合必須因子、IZUMO1 を蛍光標識したトランスジェニックマウスの精子を用いてこれらを同時観察した結果(下図)、IZUMO1 と CD9 とは必ずしも同じ挙動は示さないことが明ら



かになった一方で、強い CD9 のシグナルが、卵細胞質に取り込まれたあとの精子の表面にも見られることから、受精直後の精子は卵細胞膜成分に取り囲まれていることを明らかにすることができた。

このことは、受精の際に、卵がエンドサイトーシス様の活性を発揮して精子を取り込

んでいることを証明しており、また、融合と関連したこれらのイベントが非常に早い時点で起こっていることを示している(Satouh et al., J Cell Sci, 2012)。

(2)では、新しいタンパク質性の Ca^{2+} プロブを利用した、 Ca^{2+} の蛍光イメージングに挑戦した結果、これに成功した。この、新たな Ca^{2+} 卵観察手法は、従来の方法と異なり、長波長での観察を可能にするため、 Ca^{2+} 振動を侵襲性がきわめて低い状態で観察することに成功している(論文準備中)。

また、家畜精子から得られた新たな活性化因子の候補であった postacrosomal sheath WW domain-binding protein の遺伝子破壊マウスの作出に成功した。そして、これの妊孕性を解析した結果、示唆されていたような、精子形成能の不全や、受精能の低下などは一切見られないことを明らかにした。また、これについて、上述の新規の手法で Ca^{2+} を観察し、さらに、受精させた卵の発生能をライブイメージングによって詳細に比較した結果することで、野生型の精子とこの遺伝子破壊マウスの精子との間に、なんら機能的に違いがないことを証明することができた(Satouh et al., 論文投稿中)。

そのほか、従来の ES 細胞を用いた遺伝子ノックアウト法に加えて、新たに申請者らが開発した CRISPR/Cas9 プラスミド DNA インジェクション法による遺伝子改変動物作製法(Mashiko et al., Sci. Rep. 2013、および Mashiko et al., Dev. Growth. Differ. 2014)を用いることで、迅速に遺伝子欠損個体および点変異導入体を作製することに成功したため、これを用いて、卵精子融合については IZUMO1 や CD9、Juno といった分子、また、活性化においてもいくつかの卵活性化因子について、それぞれ複数の遺伝子の欠損個体/点変異モデルマウスの作製に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には2重下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Mashiko D., Young S. A., Muto M., Kato H., Nozawa K., Ogawa M., Noda T., Kim Y. J., Satouh Y., Fujihara Y., Ikawa M. “Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes.” Development, Growth and Differentiation 誌, 査読有, 56(1)巻, (2014), 122-129. doi: 10.1038/srep03355.

Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. “Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA.” Scientific Reports 誌, 査読有, 3 巻, (2013), 3355-3360. doi: 10.1111/dgd.12113.

Satouh Y., Inoue N., Ikawa M., Okabe M. “Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1.” Journal of Cell Science 誌, 査読有, 125 巻, (2012), 4985-4990. doi: 10.1242/jcs.100867.

Fujihara Y., Satouh Y., Inoue N., Isotani A., Ikawa M., Okabe M. “SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia.” Development 誌, 査読有, 139 巻, (2012), 3583-3589. doi: 10.1242/dev.081778.

[学会発表](計 13 件)

Yuhkoh Satouh, Masahito Ikawa “Live imaging of mammalian fertilization” International Symposium on multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular functions and molecular activities, 2015/01/26, 国立京都国際会館

Yuhkoh Satouh, Masahito Ikawa “Fluorescent imaging of IZUMO1 visualized the dynamics of mammalian fertilization.” The 12th International Symposium on Spermatology, 2014/08/12, Newcastle City Hall (Australia)

佐藤 裕公 “Visualization of dynamic behavior of IZUMO1 during sperm-egg fusion” 第9回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2014/06/19, 大阪大学銀杏会館

佐藤 裕公, 伊川正人, “哺乳類の受精と卵活性化に関するイメージング解析” 第66回日本細胞生物学会大会(招待講演), 2014/06/13, 東大寺総合文化センター

佐藤 裕公, 伊川正人, “ライブイメージングで見た哺乳類の受精と卵活性化” 第61回日本実験動物学会総会(招待講演), 2014/05/16, 札幌コンベンションセンター

Yuhkoh Satouh and Masahito Ikawa “Fluorescent live imaging of mammalian fertilization and related events.” 第36回日本分子生物学会年会(招待講演), 2013/12/03, 神戸国際会議場

佐藤 裕公, 井上直和, 伊川正人, 岡部勝 “融合必須因子 IZUMO1 を通してみた受精の瞬間” 第58回日本生殖医学会学術講演会(招待講演), 2013/11/15, 神戸ポートピアホテル

Yuhkoh Satouh, Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, and Masaru Okabe “Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic

behavior of membrane structures during fertilization processes revealed by fluorescent-tagged IZUMO1” International Society for Immunology of Reproduction (ISIR) 2013, 2013/05/31, Boston Park Plaza Hotel

佐藤 裕公、井上 直和、伊川 正人、岡部 勝 “受精のライブイメージングによって示された融合必須因子 IZUMO1 の挙動” 第 60 回日本実験動物学会総会, 2013/05/15, つくば国際会議場

佐藤 裕公、宮田 治彦、伊川 正人 “受精の蛍光ライブイメージングへの試み” 第 3 回 vivid workshop, 2013/02/22, 山代温泉 瑠璃光

佐藤 裕公、井上 直和、伊川 正人、岡部 勝 “ The behavior of IZUMO1, an essential factor for mammalian sperm-egg fusion, during fertilization processes is visualized in living spermatozoa ” 第 27 回日本生殖免疫学会 総会・学術集会, 2012/12/08, 大阪医科大学

Yuhkoh Satouh, Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, and Masaru Okabe, “Visualization of dynamic behavior of IZUMO1 in living sperm during acrosome reaction and spermegg fusion” 第 2 回アロ認証国際シンポジウム, 2012/11/15, ホテル名古屋ガーデンパレス

佐藤 裕公 ”IZUMO1 の移動と卵-精子融合の可視化” 第 5 回生殖研究若手の会, 2012/07/27, 東京大学三崎臨海実験所

〔図書〕(計 1 件)

監修：伊川 正人、執筆：伊川 正人、佐藤 裕公 他, 秀潤社, 細胞工学 4 月号 “受精メカニズム新論争 ドグマの再構築” vol.33, No. 4, 2014 年 3 月 22 発行, 全 476 頁 (393-399 頁)

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等

Yuhkoh Satouh HP
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/members/Satouh/index.html>

大阪大学 微生物病研究所 遺伝子機能解析分野 / 感染動物実験施設
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/contents.html>

大阪大学 研究者総覧
<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=2868&f1=08&sm=field&sl=ja&sp=1>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
佐藤 裕公 (SATOUH YUHKOH)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：40545571

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし