

## 哺乳類の配偶子膜融合メカニズムの解明

福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所細胞科学研究部門  
井上 直和

### 1. 研究の目的・背景

連続と続く生命の営みは、2種類の配偶子、精子と卵子によって支えられている。精子は精巣で産生されたのちに、精巣上体、雌性生殖路に移動することで徐々に受精能を獲得し、卵子に近接すると、卵丘細胞層の通過、先体反応、透明帯への結合と通過を経て、最終的に卵子と融合し受精が完了する。精子の選別は非常に厳しく、大量の精子（ヒトの場合：1~3億匹）の中からわずか1匹だけが卵子との受精にあずかる。このような様々な篩にかけられた、たった1匹の精子が受精することを許されるため、特に最終ステップである膜融合には極めて精巧な制御システムが存在すると予想される。

受精のクライマックスである精子と卵子の膜融合機構は、我々が同定した精子側の IZUM01<sup>1</sup> と、そのレセプターである卵子側の JUNO の発見<sup>2</sup>により、一応の決着が付いたように思えた。しかし、IZUM01 のセカンドレセプターを示唆するデータや<sup>3</sup>、IZUM01-JUNO の制御系とは異なる、CD9 や SPACA6 のノックアウトマウスの配偶子が融合不全であることから<sup>4, 5</sup>、配偶子膜融合は、一瞬の反応のために複数のステップで、より確実に精巧な分子メカニズムが存在すると考えられる。本研究では、IZUM01 の精密構造解析や分子ダイナミクスなどの解析に基づき、受精の膜融合の分子機構の解明を目指す。

### 2. 研究の内容・方法

これまでの研究成果から我々は、精子側の IZUM01 と卵子側のレセプターである JUNO の精密立体構造の解明に成功した<sup>6</sup>。しかし、IZUM01 発現培養細胞を用いた実験系において、IZUM01 のみの発現系では卵子への接着はするものの、膜融合が生じないことや<sup>7</sup>、膜融合制御系が作動するために必要不可欠な分子メカニズム、つまり、IZUM01 のセカンドレセプターの存在が示唆されることから<sup>3</sup>、IZUM01-JUNO は、ごく初期に起こる配偶子間の「認識」に機能していると考えられ、実際の膜融合には、その後起こる更なる制御系が存在すると考えられる。本研究では、この研究成果を踏まえて次の研究計画を遂行する。

#### 1) IZUM01 セカンドレセプターの同定と作用機序の解明

IZUM01 発現細胞-卵子の接着において、その接着面で IZUM01 は2量体化し、卵子上の JUNO が消失する。このことから IZUM01 に対するセカンドレセプターの存在が強く示唆される。この仮説に基づき、分泌型 IZUM01 リコンビナントタンパク質を用いて、卵子の可溶化物を用いた免疫沈降法や、マウス未受精卵由来の発現 cDNA ライブラリーを用いた発現クローニング法により、卵子側の IZUM01 セカンドレセプターを同定する。同定された分子は CRISPR/Cas9 法により直ちにノックアウトマウスを作製し、それが生理的に受精にとって必須かどうかを調べる。最終的には、培養細胞やリポソームを用いた再構成系で膜融合が再現されるのかを検証する。さらに、IZUM01 との詳細な結合様式を調べるために、その複合体の結晶構造解析に着手する。

## 2) 活性型 IZUM1 の生細胞モニタリング

IZUM1 は、2量体化によって活性型に変換されると考えられ、膜融合にとっても重要な働きがあると考えられる。我々は、継時的、局在特異的なオリゴマー化を生細胞で観察するために、活性型 IZUM1 を可視化する BiFC (Biomolecular Fluorescence Complementation) プローブを付加した融合タンパク質を精子特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。さらに、未発表のものも含めて、IZUM1 以外の膜融合に必要な因子群に関しても、すべてのノックアウトマウスを作製済みである。これら系統のマウスを組み合わせることで、種々の膜融合不全マウスの精子における活性型、潜在型 IZUM1 の受精時の挙動変化を動的に観察する。

### 3. 研究の結果・成果

これまで IZUM1 発現培養細胞とマウス卵子の接着によるアッセイ系をモデルに、IZUM1 の継時的、局在特異的な構造変化、特にオリゴマー化に着目した解析を行った。その結果、IZUM1 の融合コア領域を起点とした 2 量体化が、IZUM1 の活性化の制御に重要なことを見出した<sup>3</sup>。興味深いことに、2 量体化した IZUM1 は、卵子側のパートナーレセプターである JUNO との親和性を急激に失い、もはやその接着面には JUNO が存在しなくなることが明らかになった。つまり、IZUM1 のセカンドレセプターの存在が示唆された。

さらに、X 線結晶構造解析による IZUM1-JUNO 複合体の細密立体構造を原子レベルで解明した<sup>6</sup>。その結果、IZUM1-JUNO の相互作用に重要な分子構造をアミノ酸レベルで同定することに成功した。これらの解析から、IZUM1 は、JUNO による認識後、2 量体化を伴う分子構造のダイナミックな変化によりパートナーレセプターを変え、細胞膜同士の距離を物理的に近づけることにより、脂質二重膜の斥力を崩壊させる働きがあると考えられた<sup>3</sup>。しかし IZUM1 のみの発現系では膜融合は生じないことから<sup>7</sup>、これには他の分子が機能する新たな分子メカニズムが存在するものと考えられる。

さらに最近、IZUM1 の 2 量体化が実際の生きた精子上で、いつ、いかにして惹起されるのかを解明するために、BiFC 法と非侵襲的な顕微鏡観察を用いて、精子の先体反応前後での 2 量体 IZUM1 の挙動を観察した。この結果、興味深いことに 2 量体 IZUM1 は先体反応前からすでに先体部に存在し、先体反応後、透明帯を通過し終える間に融合する場所である精子頭部のエクトリアルセグメントに集合し、来たる卵子との膜融合に備えていることが明らかになった (図参照)。なおこの研究結果は、貴研究資金による成果の一部であり、すでに査読付き国際学術誌に報告している<sup>8</sup>。

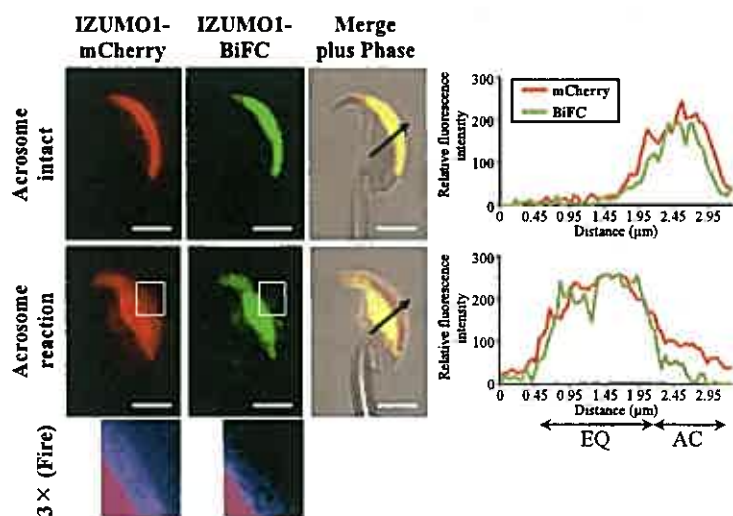


図 BiFCプローブを用いた 2 量体 IZUM1 の可視化

BiFC の原理は、蛍光タンパク質 Venus の N 末端と C 末端をそれぞれ付加した IZUM1 が 2 量体になることで、フルオロフォアの再構成により蛍光するようになる。mCherry と BiFC をそれぞれ付加した IZUM1-TG 精子を用いることで、全 IZUM1 から 2 量体 IZUM1 を生細胞で特異的に追跡できる。その結果、これまで検出できなかった 2 量体 IZUM1 が、融合に先立って、卵子と融合する場所であるエクトリアルセグメントに特異的に局在することが分かった。

EQ: equatorial segment

AC: acrosomal cap region

#### 4. 今後の研究計画

本研究は、IZUM01 のセカンドレセプターの同定や精密構造解析、さらに遺伝子改変マウスを用いた生理学的解析など複雑で長期的な研究計画であるため単年度での達成が難しい。今後も継続して上記研究内容を遂行する予定である。

#### 5. 引用文献

1. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005;434(7030):234-238. DOI:10.1038/nature03362.
2. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014;508(7497):483-487. DOI:10.1038/nature13203.
3. Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUM01 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat Commun* 2015;6:8858. DOI:10.1038/ncomms9858.
4. Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000;287(5451):321-324.
5. Lorenzetti D, Poirier C, Zhao M, Overbeek PK, Harrison W, Bishop CE. A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mamm Genome* 2014;25(3-4):141-148. DOI:10.1007/s00335-013-9491-x.
6. Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUM01-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* 2016;534(7608):566-569. DOI:10.1038/nature18596.
7. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, Hirata K, Kataoka M, Yamamoto M, Ikawa M, Okabe M, Hagihara Y. Molecular dissection of IZUM01, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013;140(15):3221-3229. DOI:10.1242/dev.094854.
8. Inoue N, Wada I. Monitoring dimeric status of IZUM01 during the acrosome reaction in living spermatozoon. *Cell Cycle* 2018;17(11):1279-1285. DOI:10.1080/15384101.2018.1489181.

#### 6. 謝辞

最後に本研究にご支援賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝致します。