

52. 受精の膜融合活性化メカニズムの解明

井上 直和

Key words : 受精, 精子, 卵子, 膜融合, IZUMO1

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

緒言

連綿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てたった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。

受精の分子メカニズムの解明は日本からの貢献が大きい。なかでも最大の謎である受精の膜融合において、精子側と卵子側の必須因子が、日本人研究者によって同定されている^{1,2)}。実際にこれら分子のノックアウトマウスは、精子と卵子の融合不全が原因で不妊になる。その後の解析で、卵子側では共同研究者の宮戸らにより、テトラスパニンファミリーに属するCD9が未受精卵の表層から小胞（エキソソーム）として分泌され、精子に付着することで融合能を付与することが見出された³⁾。精子では、免疫グロブリン・スーパーファミリーのIZUMO1の卵接着活性が膜融合にとって重要であることを我々が明らかにした⁴⁾。さらに最近、IZUMO1に対する卵子側のレセプターとされる分子、JUNOが同定され、IZUMO1に対応する卵子側の膜融合装置の存在が明らかになろうとしている⁵⁾。しかし、これら因子が如何にして膜融合を成し遂げるのか、また他の必須因子の解明も含めて、その全貌は明らかではない。本研究では、受精の膜融合の瞬間に生じるIZUMO1の構造変化とそれに伴う卵子上のレセプターの変換機構を明らかにした。

方法および結果

1. IZUMO1の融合コア領域に対するモノクローナル抗体の作製とその性質

我々は、精子-卵子膜融合因子IZUMO1に着目し、融合活性に不可欠なコア領域を見いだした⁴⁾。この領域は α -ヘリックス含量が高く、2量体化を引き起こす。さらにIZUMO1を発現することで培養細胞を卵子細胞膜に接着させることに成功し、これには融合コア領域が必須なことを見出した。しかしこの系では双方の膜の融合は成立しない。このことから接着の先にある何らかの分子メカニズムが存在すると考えられる。

融合コア領域の詳細な解析を行うために、この領域(Asp5-Leu113)のペプチド配列を抗原として、新規のモノクローナル抗体2種類(Mab17, 18)を作製した。マウスの体外受精において、これらの抗体を添加するとMab17は阻害的に作用するのに対して、Mab18は非阻害抗体であった。これらの抗体の詳細なエピトープをペプチドフラグメント化した組換え体のIZUMO1を用いてBiacoreにより解析すると、Mab17は融合コア領域のC末端側、Mab18はN末端側のHis26-Val46の間をエピトープとすることが分かった。ヘリックスブレイカーで知られるProlineを α -ヘリックスの配列内に導入すると、Mab17のエピトープが消失することから、Mab17は特に α -ヘリックス構造を認識することが分かった。

抗体の反応性を確認するために、COS-7細胞に一過的にIZUMO1を発現させると、Mab17, 18どちらもIZUMO1発現細胞とのみ反応し、Asp5-Leu113欠損体(DEL5-113)ではPro234-Arg298をエピトープとする非阻害抗体、Mab125以外反応しなかった(図1a)。またIZUMO1を発現するCOS-7と卵子の結合活性もDEL5-113では働かず、体外受精

同様に Mab17 を加えると阻害的に働いた。このことから、Asp5-Leu113 の領域の α -ヘリックス構造は、卵子接着活性に必要であると考えられた (図 1a)。

次にこれらの抗体を用いて、卵子接着細胞における IZUMO1 の局在解析を試みた。我々が発表した以前の報告のように非阻害抗体 Mab125 を用いると、IZUMO1 発現 COS-7 と卵子の接着面に IZUMO1 が集合することが観察されたが、新しく作製した抗体を用いると、驚いたことに接着面以外の場所が染色された (図 1b)。

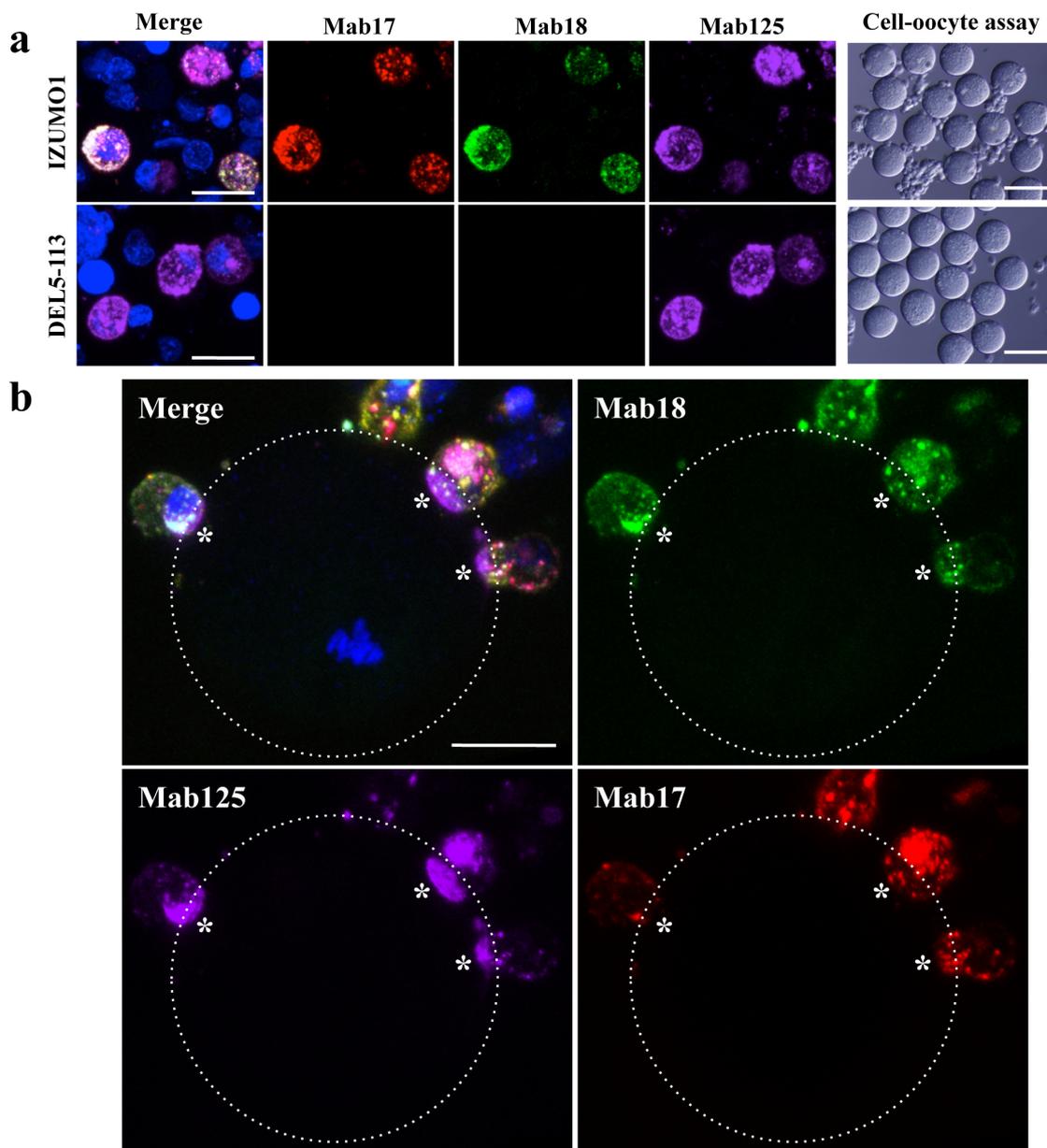


図 1. IZUMO1 発現細胞-卵子結合解析におけるモノクローナル抗体の反応性の差異。

a) 融合コア領域 (Asp5-Leu113) に対する抗体の反応性。新しく作製した 2 種類のモノクローナル抗体 (Mab17, 18) は、一過的に IZUMO1 を発現する COS-7 細胞のみに反応するが、この領域の欠損体 (DEL5-113) では、全く反応しない。また DEL5-113 は卵子接着活性も見られない。左図, Scale bar: 20 μ m. 右図, Scale bar: 100 μ m.

b) IZUMO1 発現細胞-卵子の結合解析。Mab17, 18 と非阻害抗体 Mab125 により染色すると、Mab17 (赤), 18 (緑) は共通に接着面以外が染色されるのに対して、Mab125 (紫) は特に接着面を染色する (Asterisks). 核の染色は青で示す。Scale bar: 20 μ m.

2. IZUMO1 の 2 量体化は接着面で選択的に起こる

我々は以前、融合コア領域 (Asp5-Leu113) の α -ヘリックス構造が起点となり、IZUMO1 の 2 量体化が起こることを報告した⁴⁾。そのため細胞-卵子の接着面で起こる IZUMO1 の立体構造の変化、特に多量体化に着目して解析を行った。細胞上の IZUMO1 の 2 量体化を局所特異的に可視化するために、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法により試みた。BiFC は、単独では蛍光を発しない蛍光タンパク質 Venus の N 末端 (Val1-Ala154) と C 末端 (Asp155-Lys238) がオリゴマーを形成する程度分子間の距離が近接した場合、再構成され、緑色蛍光を発するようになることを利用した解析法である。今回は、IZUMO1 の C 末端に各フラグメント、VN155 と VC155 を配置し、それが複合体を作る時にのみ緑色蛍光を発するように設計した (図 2a)。図 2b のように、DEL5-113 の融合コア領域欠失体でも IZUMO1 は細胞内小器官内で 2 量体化するが、細胞膜においては蛍光を発しない。つまり単量体で存在する。一方、IZUMO1 の完全体では、細胞の接着面に偏局在し、細胞膜上で 2 量体化が起っていることが分かった (図 2b, 矢印)。

さらに、細胞-卵子の結合解析を組み合わせることで、卵子上に接着した COS-7 細胞の接着面では、IZUMO1 が 2 量体になっていることが分かった (図 2c)。Venus を付加した IZUMO1 でも IZUMO1 が接着面に集合するが、接着面のみならず残りの膜表面にも存在する。しかし BiFC における細胞膜上の IZUMO1 の局在は主に接着面に限られた (図 2c, asterisk)。このとき Mab18 は、細胞の接着面には反応できなかった。このことから、Mab17 や Mab18 は、単量体の IZUMO1 を認識し、単量体 IZUMO1 は卵子との接着後、速やかにその接着面から消失すると推測された。

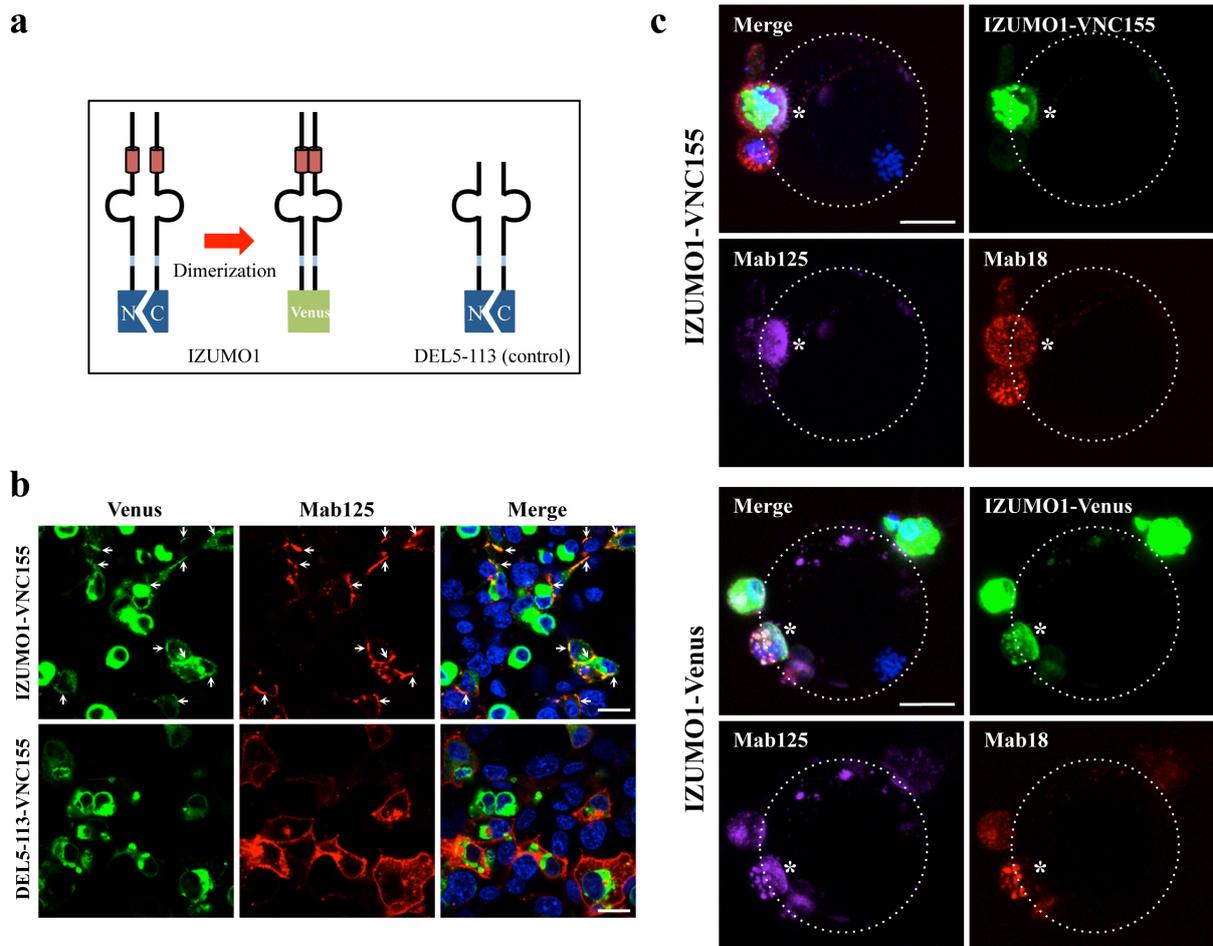


図2. BiFCによるIZUMO1の構造変化解析.

a) BiFCの原理. b) COS-7細胞膜上で2量体を形成するIZUMO1. IZUMO1をCOS-7細胞で一過的に発現させると、その細胞膜上でBiFCによる蛍光が検出される(緑, 矢印). 一方、融合コア領域の欠損体(DEL5-113)では細胞膜上にIZUMO1が存在することは確認されるが(赤), BiFCによる蛍光は見られない. c) IZUMO1は接着面で2量体化する. IZUMO1発現細胞-卵子におけるBiFCを観察すると、Mab125が染色されるような接着面(紫, asterisk)に蛍光が見られるようになる(緑). それに対して、Mab18は、接着面では反応できない(赤). またVenus融合IZUMO1では、接着面以外の細胞表面のIZUMO1を観察される(下図). 核の染色は青で示す. Scale bar: 20 μm.

3. JUNOは単量体のIZUMO1を認識する

IZUMO1は、縁結びで有名な出雲大社に因んで名付けられたタンパク質であるが²⁾、最近、IZUMO1の卵子側の受容体として、ローマ神話の結婚や出産を司る女神から名付けられたJUNOが同定された⁵⁾. JUNOとIZUMO1の相互作用を確認するために、JUNOと免疫グロブリンのFC領域との融合組換えタンパク質(JUNO-FC)を293T細胞で発現させ精製し、IZUMO1発現細胞との接着性により検討した. 図3aに示すように、この組換え体は、IZUMO1発現細胞にのみ相互作用し、DEL5-113では全く結合しなかった. このことからJUNOは確かにIZUMO1と特異的に結合し、これには融合コア領域が必要であることが確認された. さらに卵子上のIZUMO1発現COS-7細胞を観察すると、驚いたことに、Mab18の染色と類似する接着面以外のIZUMO1選択的にJUNOは結合することが分かった(図3b). 精子上のIZUMO1とのJUNOの結合性を調べると、先体反応後の精子でのみ結合し、IZUMO1と同じ局在を示すことが分かった(図3c). さらにIZUMO1欠損精子ではJUNOは全く結合しないことも確認された(図3c).

これらの結果から、IZUMO1は卵子と接着するまでの間、JUNOにより認識されるために単量体で存在することが考えられたため、我々が以前作製した精子特異的にIZUMO1-mCherryを発現するトランスジェニックマウスとPhoton

Counting Histogram (PCH) 法を用いて、精子先体内の IZUMO1 の蛍光強度を測定し、IZUMO1 の重合数を測定した。その結果、先体反応前の精子では、ほとんどの IZUMO1 は単量体で存在していることが明らかになった (図 3d)。さらに膜透過処理を施した精子を用いて JUNO-FC との接着性を調べると、IZUMO1 と共局在するように JUNO が結合することが分かった。このことから JUNO は単量体 IZUMO1 を選択的に認識すると推測された。

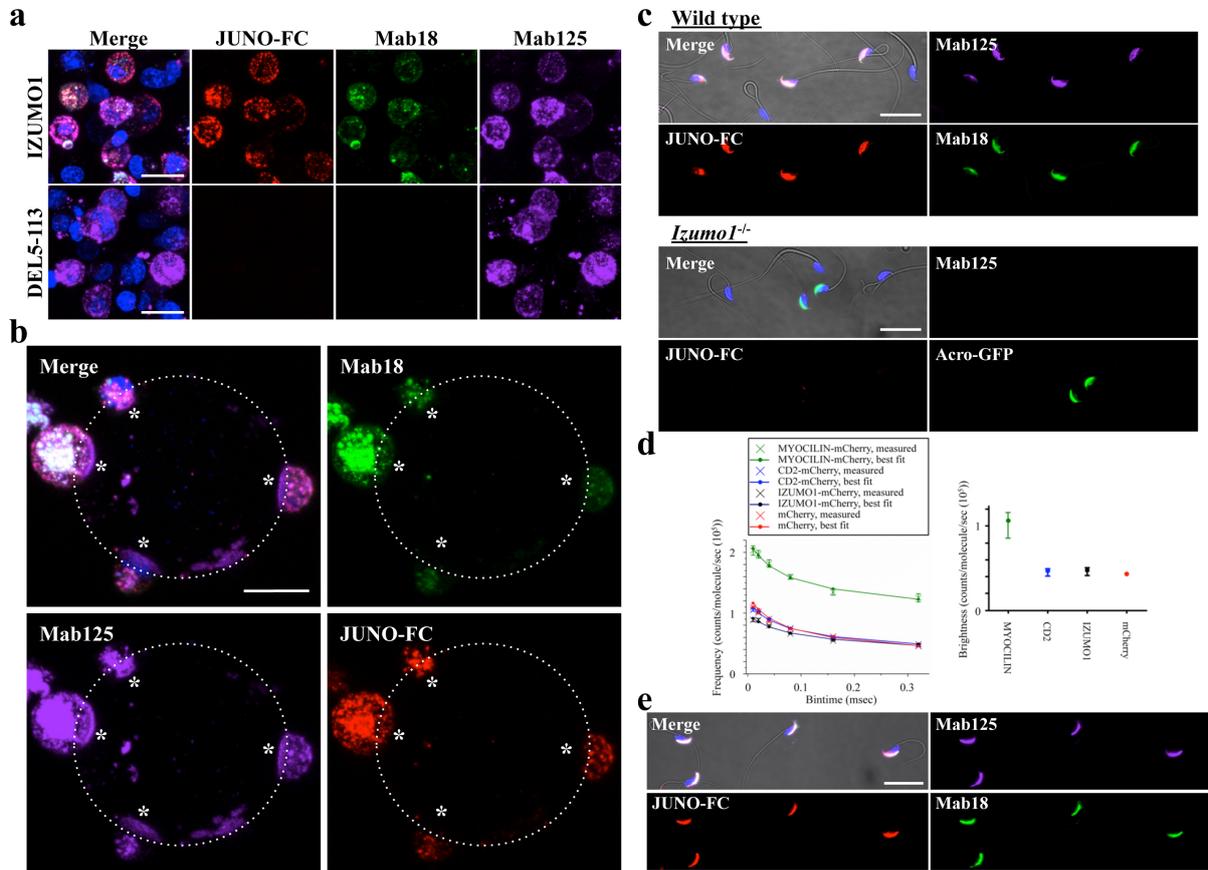


図 3. JUNO は単量体の IZUMO1 を認識する。

a) IZUMO1 レセプター JUNO は、IZUMO1 に特異的に相互作用する。JUNO-FC は、IZUMO1 を一過的に発現させた COS-7 細胞 (Mab18 による染色, 緑, Mab125 による染色, 紫) にのみ選択的に結合する (赤)。DEL5-113 でこの反応は見られないことから、この結合は、融合コア領域が中心的に機能する。b) JUNO は、IZUMO1 発現細胞-卵子の接着面に結合できない。IZUMO1 発現細胞-卵子結合解析では、その接着面で IZUMO1 が集合している像が得られるが (Mab125 による染色, 紫)、JUNO-FC (赤) は Mab18 (緑) と同様に接着面 (Asterisks) と相互作用することができない。c) JUNO は、先体反応後の精子上の IZUMO1 と相互作用する。IZUMO1 抗体は細胞膜透過処理を行わない場合には、先体反応前には検出できないため先体反応後の精子のみ特異的に染色する (Mab18 による染色, 緑, Mab125 による染色, 紫)。この条件下で、JUNO-FC は IZUMO1 と同様の局在に染色される (赤)。また IZUMO1 欠損精子を用いるとその反応性が消失する (下図)。d) 精子 IZUMO1 は単量体で存在する。IZUMO1-mCherry を発現するトランスジェニックマウスを用いて、その蛍光強度から重合数を Photon Counting Histogram (PCH) 法により測定した (黒)。単量体のコントロールとして、mCherry (赤) と CD2-mCherry (青) を、2 量体のコントロールとして MYOCILIN (緑) を用いた。IZUMO1-mCherry は MYOCILIN に比べ、約 1/2 の蛍光強度であった。つまり単量体で存在する。e) JUNO は単量体の IZUMO1 を選択的に認識する。JUNO-FC は、細胞膜透過処理により先体内の単量体 IZUMO1 (Mab18 による染色, 緑, Mab125 による染色, 紫) と結合し、2 量体 IZUMO1 が存在する接着面では結合できないことから、単量体の IZUMO1 に選択的に結合する (赤)。核の染色は青で示す。Scale bar: 20 μ m.

4. 2量体のIZUMO1は卵子上の未同定レセプターと結合する

IZUMO1が発現するCOS-7細胞が接着した卵子上でのJUNOやCD9の局在を調べると、驚いたことに、その接着面ではIZUMO1が存在する場所にはもはやJUNOやCD9が存在しないことが分かった(図4a, Asterisks). さらにBiFCを組み合わせて解析を行うと、接着面に集まる2量体IZUMO1とJUNOは、その像が重なり合わないことから、2量体IZUMO1は速やかにJUNOとの親和性を消失し、JUNO以外のレセプターにパートナー分子が変換されることが示唆された(図4b).

これらの結果を考え合わせると、はじめ単量体であるIZUMO1は、JUNOに認識され、接着が開始する。その後、融合の引き金を引くための強固な接着は、2量体となったIZUMO1が担い、この反応には未同定の卵子側のIZUMO1レセプターが関与していることが強く示唆された。

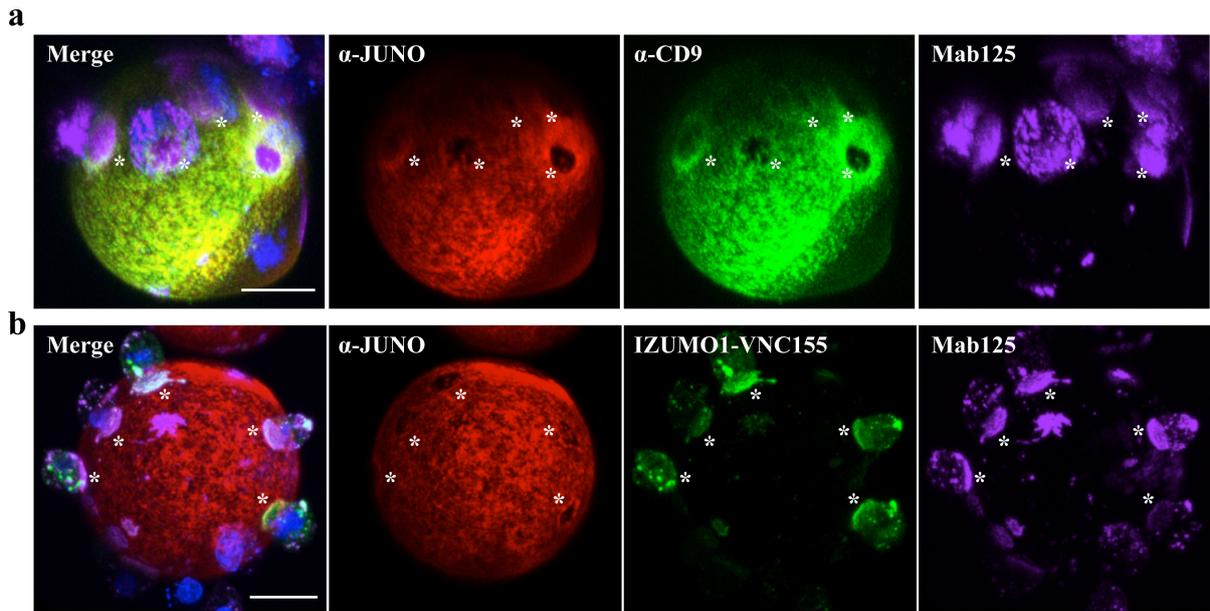


図4. 2量体IZUMO1は未同定のレセプターと結合する.

a) IZUMO1発現細胞-卵子の接着面では、卵子上のJUNOが消失する。IZUMO1発現細胞-卵子結合解析における卵子上のJUNO(赤)やCD9(緑)の局在変化を解析すると、明らかにその接着面(Asterisks)からこれらのタンパク質が排除される。紫はMab125での染色を示す。b) 2量体IZUMO1とJUNOの親和性は、速やかに消失する。BiFCにより2量体IZUMO1(緑)を可視化すると、もはやその結合面(Asterisks)にJUNOは存在しない(赤)。紫はMab125での染色を示す。核の染色は青で示す。Scale bar: 20 μ m.

考 察

本研究結果から、精子側の受精の融合因子IZUMO1は、単に卵子側のレセプターであるJUNOにより認識されるためだけに存在するのではなく、2量体化を伴う分子構造のダイナミックな変化により、新たな卵子側のレセプターと相互作用し、細胞膜同士の距離を物理的に近づけ、脂質二重膜の斥力を崩壊させる働きがあると考えられる。しかしIZUMO1のみの発現系では、卵子との強力な接着は生じるものの膜融合は生じないことから、これにはSPACA6などの他の因子⁹⁾の関与が必要であると思われる。一般的な脂質二重膜の融合は、脂質二重膜の繫留、隣接する一重膜部分のみの半融合、完全な融合と孔形成の順で生じると考えられる。精子-卵子の膜融合も同じような順序を経て膜融合が完了するのは、配偶子におけるその反応が素早すぎて観察できなかったが、少なくともIZUMO1発現細胞-卵子の結合解析では、初期段階の脂質二重膜の繫留で反応が止まるため、この段階の詳細な解析が可能となり、IZUMO1が関与する融合マシナリーだけでも少なくとも単量体、2量体が関与する2段階の活性化が必要であることが明らかになった。今後は、未だ明らかにされていない卵子側IZUMO1レセプターの同定や、他の融合因子の解析から、受精の膜

融合分子メカニズムの全容解明が達成され、将来的にはその分子メカニズムを基とした不妊治療法の開発、あるいは避妊ワクチンなどの臨床的な応用の一助として貢献できればと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所健康工学研究部門の萩原義久、国立生育医療センター生殖・細胞医療研究部の宮戸健二、福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所の和田郁夫である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) 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*, **287** : 321-324, 2000.
- 2) Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. & Okabe, M. : The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, **434** : 234-238, 2005.
- 3) Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., Ban, T., Ito, C., Toshimori, K., Nakamura, A., Ito, M., Miyado, M., Mekada, E. & Umezawa, A. : The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105** : 12921-12926, 2008.
- 4) Inoue, N., Hamada, D., Kamikubo, H., Hirata, K., Kataoka, M., Yamamoto, M., Ikawa, M., Okabe, M. & Hagihara, Y. : Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development*, **140** : 3221-3229, 2013.
- 5) Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G. J. : Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, **508** : 483-487, 2014.
- 6) Lorenzetti, D., Poirier, C., Zhao, M., Overbeek, P. A., Harrison, W. & Bishop, C. E. : A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mamm. Genome*, **25** : 141-148, 2014.