

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 4 年 4 月 1 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 公立大学法人福島県立医科大学
職 名 准教授
研究代表者 井上 直和

下記のとおり令和3年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:19014)

| | | | | |
|-----------------------------|--|------|----------------------|------|
| 1. 共同研究課題名 | 哺乳類の配偶子融合における顆粒分泌と膜タンパク質代謝メカニズムの解析 | | | |
| 2. 共同研究目的 | 我々は、精子のオルガネラ崩壊（先体反応）によって局在が変化する膜タンパク質（IZUMO1）と、卵子側の受容体（JUNO）の相互作用が配偶子融合に必須であることや、その活性化の仕組みを分子レベルで明らかにしてきた。本研究では、受精の前後でダイナミックに変化する配偶子の詳細な解析を通して、受精の包括的な分子機構を明らかにする。本研究成果は、受精の新たなドグマを提唱するだけでなく、オルガネラや顆粒の分泌によって膜上の因子を代謝・制御する新たな分子制御機構の発見に繋がる可能性がある。 | | | |
| 3. 共同研究期間 | 令和3年 4月 1日 ~ 令和4年 3月31日 | | | |
| 4. 共同研究組織 | | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役 割 分 担 | |
| (研究代表者) 井上 直和 | 医学部附属生体情報伝達 研究所細胞科学研究部門 | 准教授 | 研究の総括 ・遺伝子改変動物の作製 | |
| (分担研究者) 佐藤 裕公 | 生体調節研究所 細胞構造分野 | 准教授 | 解析・観察 | |
| 5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員 | 分野名 | 細胞構造 | 氏 名 | 佐藤 健 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

- ① IZUMO1/JUNO や CD9、さらにこれらの因子と共作用する分子群 (本研究により同定予定) に蛍光タンパク質をラベルし、配偶子上に発現させることで、受精前後における各分子の動態を生細胞イメージングにより解析する。さらに蛍光 JUNO を発現する TG マウスを材料に、佐藤研究室で行われている細胞内膜動態のイメージング技術と連携して、研究を加速させる。
- ② 哺乳類の卵子の表層顆粒は、受精の後に起こる細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化によって分泌されて卵を囲む透明帯の性質を変化させる。一方、JUNO は受精後直ちに卵子の表面から消失することで多精子受精を防いでいる。本研究では分泌顆粒をほとんど持たない KO マウス利用して、このマウスと上記①の蛍光 CD9/JUNO を発現するマウスとの交配ののち、共同研究中に開発した低侵襲かつ高解像度イメージング系で受精前後の CD9/JUNO の動態を観察し、顆粒分泌と受精必須因子との関連性を明らかにする。

7. 共同研究の成果

本共同研究によって、IZUMOファミリー分子であるIZUMO3が、マウスの精子の先体形成において重要な働きがあることを明らかにした (Inoue N et al., *Mol Reprod Dev* 2021)。また解析過程で、ハエや線虫で受精必須因子として存在するDCST1/2をマウスやヒトで同定することに成功した。DCST1/2欠損マウスは、ハエや線虫と同様に配偶子融合不全が原因で完全な雄性不妊になる。10億年に渡って保存されてきたDCST1/2分子が機能する詳細な分子メカニズムの解析を通して、今後の受精研究が大きく前進するものと考えられる (Inoue N et al., *eLife* 2021)。これに関連し、哺乳類の精子と卵子の膜融合を解析する *in vitro* アッセイ法をまとめた論文を発表した (Inoue N. *Bio Protoc* 2021)。

TMEM95欠損雄マウスは完全な不妊症ではなく、低妊孕性になることを明らかにした。これは、2020年に発表された論文と背反する結果である。さらに配偶子融合必須因子である精子のSPACA6が、妊孕性のあるTMEM95やFIMP欠損雄マウスの成熟精子上から完全に消失することから、SPACA6は精子表面上のreceptor-ligand相互作用には機能していないことが分かった。これらの結果から、哺乳類の精子と卵子の相互作用に本質的に必要な因子群が浮き彫りになった (Inoue N et al., *Biol Reprod* 2022)。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

1. Inoue N, Satouh Y, Wada I. IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation. *Mol Reprod Dev* 2021;88(7):479-481.

② この共同研究に基づくとの記載のある論文

1. Inoue N, Wada I. Deletion of the initial methionine codon of the *Tmem95* gene causes subfertility, but not complete infertility, in male mice. *Biol Reprod* 2022;106(3):378-381.
2. Inoue N. Gamete Fusion Assay in Mice. *Bio Protoc* 2021;11(22):e4233.
3. Inoue N, Satouh Y, Wada I. IZUMO family member 3, IZUMO3, is involved in male fertility through the acrosome formation. *Mol Reprod Dev* 2021;88(7):479-481.
4. Inoue N, Hagihara Y, Wada I. Evolutionarily conserved sperm factors, DCST1 and DCST2, are required for gamete fusion. *eLife* 2021;10:e66313.

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

1. 井上直和「配偶子融合に至る分子メカニズム」, 第92回日本動物学会米子大会(シンポジウム), 2021年9月2日.

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- ・電子メールや電話による研究打ち合わせ(数十回)を行った。
- ・蛍光JUNOを発現する遺伝子組換えマウスと組換え遺伝子(発現ベクター)を共有した。
- ・学会シンポジウムを共同オーガナイズし、研究成果を社会に発信した。
- ・次期関連学会シンポジウムの開催を企画した。
- ・共同責任著者で国際学術論文に総説を執筆した。