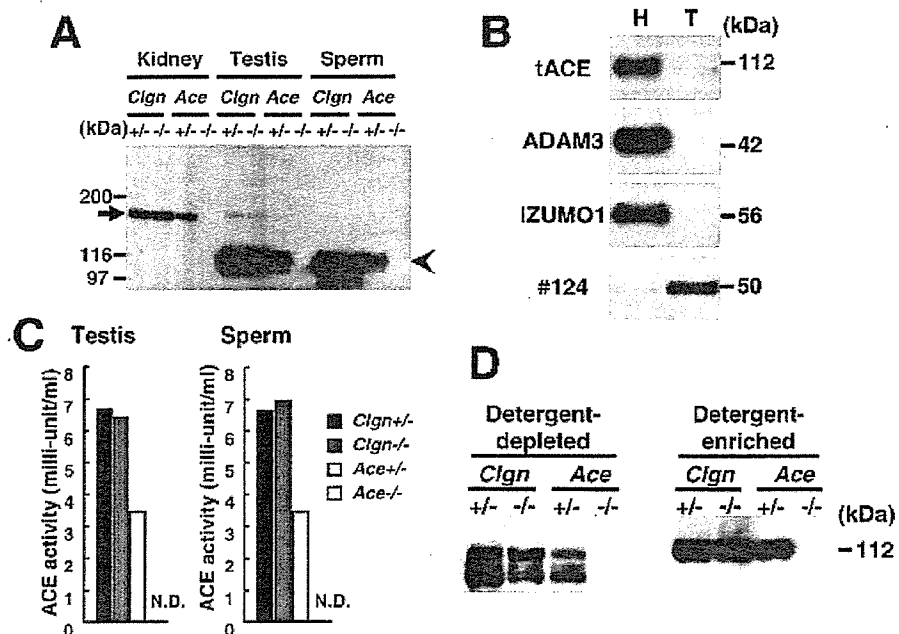


FIG. 2. The presence of ACE in the testes and sperm of *Clgn*^{-/-} mice. A) The anti-ACE antibody recognized both somatic and testicular ACE. Kidney (100 μ g), testis (50 μ g), and sperm (20 μ g) proteins from *Clgn* and *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} animals were separated by electrophoresis and subjected to immunoblot analysis using the anti-ACE monoclonal antibody (1D5). Somatic ACE (arrow) and testicular ACE (arrowhead) are denoted. B) ACE is present in the sperm head. Sperm heads (H) and tails (T) were prepared and subjected to immunoblot analysis using antibodies to ACE, ADAM3, IZUMO1, and a tail-specific antigen (#124). C) ACE activities in testis and sperm homogenates from *Clgn* and *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} animals. N.D., not detected. D) Testicular ACE is present in the detergent-enriched phase of the sperm. Sperm proteins were partitioned into detergent-depleted and detergent-enriched phases by extraction with 1% Triton X-114, and subjected to immunoblot analysis using the anti-ACE antibody.



Immunoprecipitation

Testes were collected and homogenized in lysis buffer using the Potter-Elvehjem homogenizer with 10 strokes at 1000 rpm. The homogenates were placed on ice for 1 h with occasionally vortexing, and then centrifuged at $15\,700 \times g$ for 5 min at 4°C. The supernatants were collected and precleared by the addition of protein A-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences) overnight at 4°C. After centrifugation, antibodies were added to the supernatants, and the solutions were incubated with rocking for 3 h at 4°C. Protein A-Sepharose was then added to each tube, and incubation was allowed to continue for 2 h at 4°C. After washing four times with lysis buffer, the final pellet was resuspended in 8 M urea and SDS-PAGE loading buffer, boiled for 3 min, and the proteins were separated by SDS-PAGE under reducing conditions.

Measurement of ACE Activity

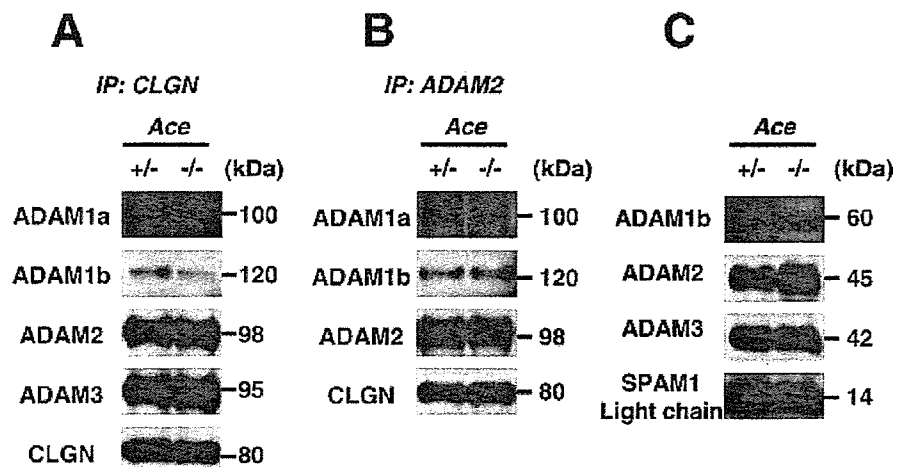
Testis and sperm homogenates were prepared as described above. The protein concentration of each homogenate was adjusted to 0.2 mg/ml with lysis buffer, and 100 μ l of each sample was applied to a MicroSpin™ G-25 column

(GE Healthcare Bio-Sciences), to remove residual salt. The activity of ACE in each homogenate was measured using the Angiotensin-I Converting Enzyme Activity Assay Kit (Yagai Research Center, Yamagata, Japan) according to the manufacturers protocol.

Sperm-ZP Binding Assay

The *in vitro* assays for sperm binding to zona pellucida were performed with eggs from which the cumulus cells had been removed by treatment with bovine testicular hyaluronidase (175 U/ml; Sigma) for 5 min. In brief, cumulus-free eggs from female B6D2F1 mice (>2 months old; Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) were placed in a 200- μ l drop of modified Krebs-Ringer bicarbonate solution (TYH medium) that contained glucose, sodium pyruvate, bovine serum albumin, and antibiotics [22]. An aliquot of capacitated sperm (2×10^5 sperm/ml) from *Clgn*^{-/-} or *Ace*^{-/-} males and their wild-type littermates was inseminated and the mixture were incubated for 30 min at 37°C under 5% CO₂ in air. Eggs were fixed and the bound sperm were observed with an IX-70 fluorescent microscope (Olympus) after Hoechst 33258 staining.

FIG. 3. The presence of ADAMs in the testes and sperm of *Ace*^{-/-} mice. Proteins from *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} testes and sperm were subjected to immunoprecipitation and immunoblot analysis. A) Association of CLGN with ADAMs. Testicular proteins from animals of each genotype were immunoprecipitated with the anti-CLGN antibody. The precipitants were subjected to immunoblot analysis using antibodies to ADAM1a, ADAM1b, ADAM2, ADAM3, and CLGN. B) Heterodimerization of ADAM2/1a and ADAM2/1b. Testicular proteins from animals of each genotype were immunoprecipitated by the anti-ADAM2 polyclonal antibody, followed by immunoblot analysis using antibodies to ADAM1a, ADAM1b, and ADAM2. C) Detection of ADAMs in sperm. Sperm proteins from animals of each genotype were separated by electrophoresis and subjected to immunoblot analysis using antibodies to ADAM1b, ADAM2, and ADAM3. As a control, the light chain of SPAM1 is detected with anti-SPAM1 antiserum in both the *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} sperm.



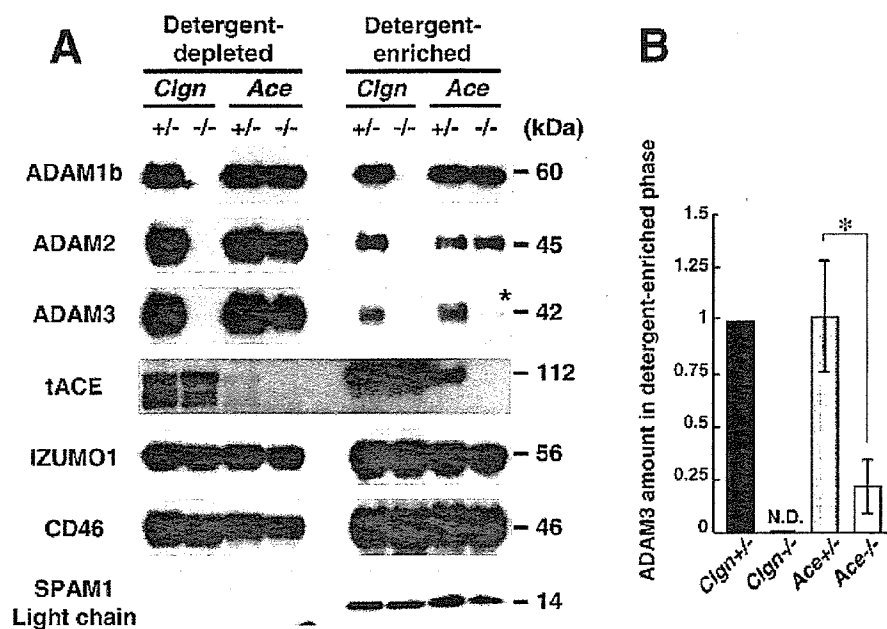


FIG. 4. ADAM3 is not localized correctly in *Ace*^{-/-} sperm. A) Sperm proteins from *Clgn* and *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} animals were extracted with 1% Triton X-114. The detergent-depleted and detergent-enriched phases were separated by electrophoresis and subjected to immunoblot analysis using antibodies to ADAM1b, ADAM2, ADAM3, ACE, IZUMO1, CD46, and SPAM1. B) The amounts of sperm ADAM3 in the detergent-enriched fractions of these mice were estimated using the Scion Image software. The intensities of the signals were measured and normalized to the *Clgn*^{+/-} value. Error bars represent mean \pm SD from five independent experiments. **P* < 0.01 (Student *t*-test).

RESULTS

ADAMs Are Present in *Clgn*-Deficient Mouse Testes But Not in Sperm

Since disruption of the genes that encode *Adam1a*, *Adam2*, and *Adam3* results in a male sterility phenotype that is similar to that seen for *Clgn*^{-/-} animals [7, 8, 10, 11], we analyzed whether these ADAMs are present in the testis and sperm of CLGN-null mice. When a testicular extract from *Clgn*^{+/-} mice was immunoprecipitated with anti-CLGN antibody and the resulting precipitate was subjected to immunoblot analysis using antibodies to ADAM1a, ADAM1b, ADAM2, and ADAM3, all of the ADAMs were detected (Fig. 1A). These results indicate that CLGN interacts with ADAMs in the testis.

As expected, the ADAMs in the testes of *Clgn*^{-/-} mice were not immunoprecipitated by the anti-CLGN antibody. Even though the ADAMs were present in *Clgn*^{-/-} males (data not shown), the ADAM1a/ADAM2 and ADAM1b/ADAM2 heterodimers were absent after the testicular extract was immunoprecipitated with the anti-ADAM2 antibody and the precipitate was probed with the various ADAM antibodies, which indicates that CLGN is involved in the formation of these heterodimers (Fig. 1B). In contrast, these heterodimers were observed in the *Clgn*^{+/-} mice. We also examined the effect of CLGN disruption on ADAM3, as it has been previously reported that the absence of the ADAM1a/ADAM2 heterodimer due to ADAM1a disruption leads to the disappearance of sperm ADAM3 [10, 23]. ADAM3, as well as

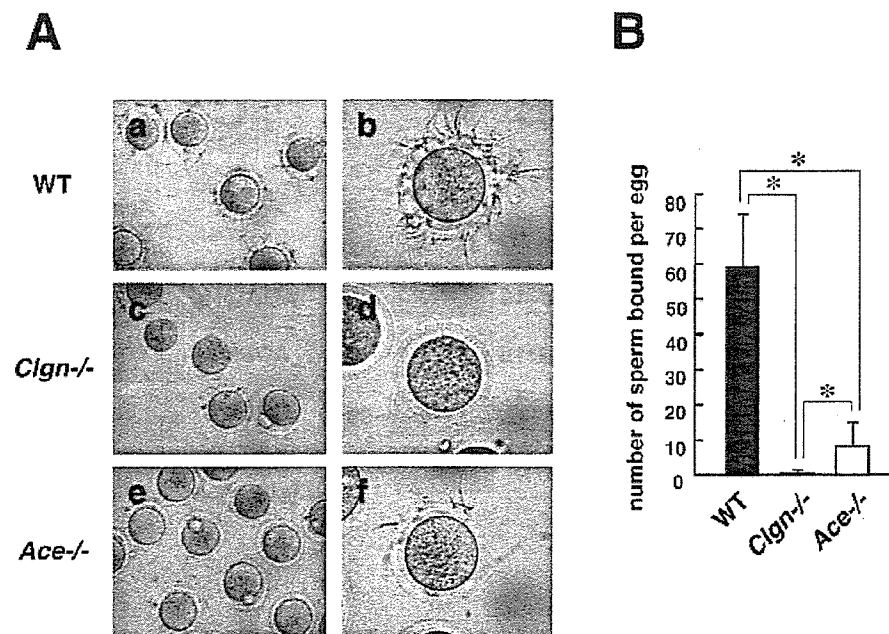
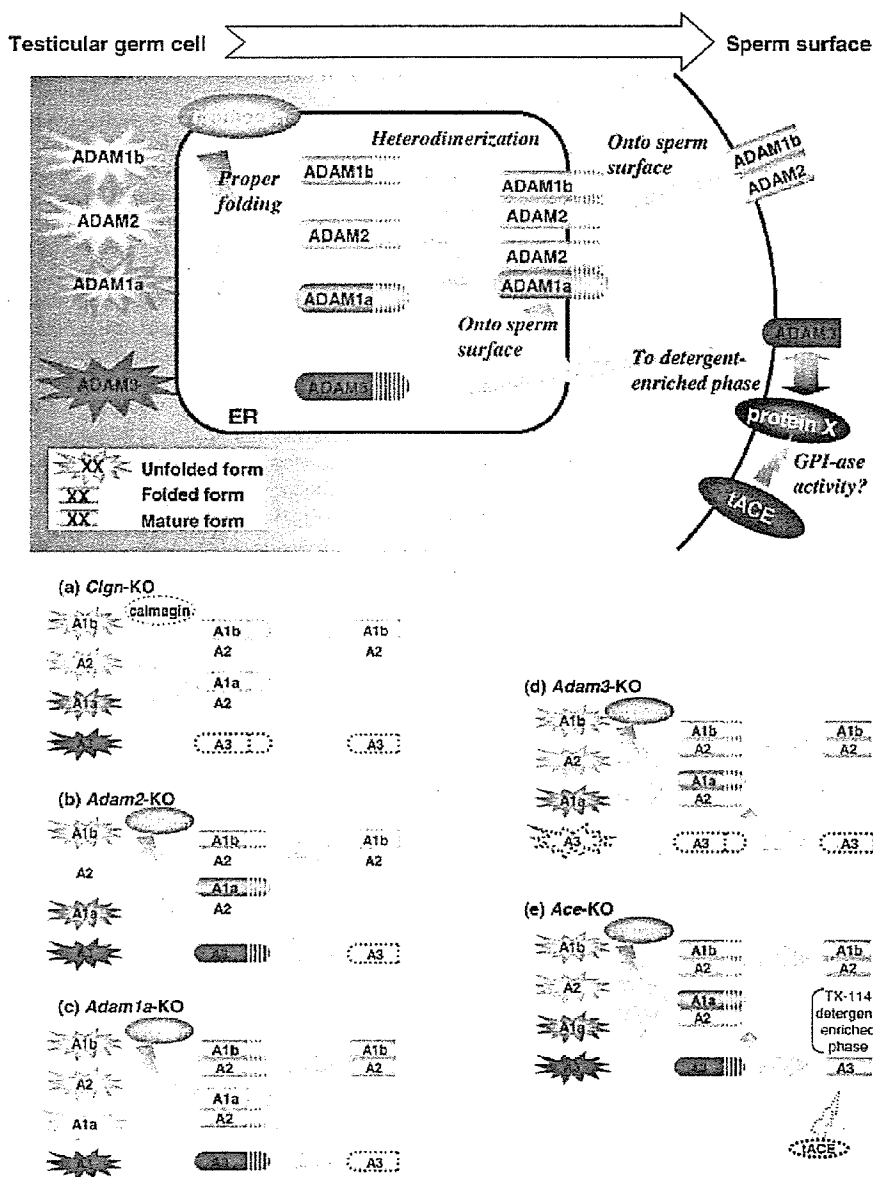


FIG. 5. Sperm from *Clgn*^{-/-} and *Ace*^{-/-} mice do not bind to the zona pellucida. A) Sperm from wild-type (a and b), *Clgn*^{-/-} (c and d) or *Ace*^{-/-} (e and f) mice were capacitated for 1 h and incubated with cumulus-free eggs. After 1 h, the eggs were fixed and the sperm bound to the zona pellucida were counted. Original magnification 200 (a, c, e) and \times 400 (b, d, f). B) Error bars indicate the means \pm SD from three independent experiments. **P* < 0.001 (Student *t*-test).

FIG. 6. Schematic model for ADAMs and their roles in sperm function. The disruption of the genes that encode *Adam1a*, *Adam2*, and *Adam3* results in impaired sperm-ZP binding. CLGN is required for the folding of ADAM1a, ADAM1b, and ADAM2 and the subsequent dimerization of these proteins. The ADAM1a/ADAM2 heterodimer is reported to be necessary for localizing ADAM3 to the sperm surface [10]. In *Clgn*^{-/-} (a) and *Adam2*^{-/-} (b) sperm, the disappearance of the ADAM1a/ADAM2 and ADAM1b/ADAM2 heterodimers results in the loss of ADAM1b, ADAM2, and ADAM3 from the sperm. ADAM1a is a testis-specific protein that is not found in sperm [13]. When ADAM1a is eliminated (c), the ADAM1a/ADAM2 heterodimer disappears from the testis, whereas the expression of ADAM1b/ADAM2 is not affected. However, these sperm lack ADAM3 [10]. The disruption of ADAM3 (d) is reported to have no significant effect on ADAM1a, ADAM1b or ADAM2 [27]. These findings suggest that ADAM3 is located downstream of these other ADAM proteins. In the present paper, we show that the disruption of tACE leads to the aberrant localization of ADAM3 (e), most likely due to a different pathway from the one hypothesized for CLGN/ADAMs. These results indicate the importance of ADAM3 in sperm-ZP interaction and explain why disruption of the individual *Ace*, *Clgn*, *Adam1a*, *Adam2*, and *Adam3* genes produces similar phenotypes.



ADAM1b and ADAM2, were not present in *Clgn*^{-/-} sperm, which suggests that infertility is due to the disappearance of the ADAMs in this sperm population (Fig. 1C).

ACE Is Present and Localizes Normally in Clgn^{-/-} Sperm

Since the sperm from *Clgn*^{-/-} and *Ace*^{-/-} mice show impaired migration into the oviduct and ZP-binding ability, we tested whether CLGN controls tertiary folding of the ACE protein, as it does for the ADAMs. To generate antibodies specific for ACE, we immunized *Ace*^{-/-} female mice with the recombinant N-terminal region of the mouse tACE protein. All of the monoclonal antibodies obtained recognized both sACE and tACE and worked well for immunoblotting (but not for immunostaining). Immunoblot analysis of kidney proteins with the anti-ACE antibody detected a band with M_r ~158 000, which is consistent with the molecular mass of sACE (Fig. 2A). In testicular and sperm extracts, a band with M_r ~112 000

was detected, which is similar to the size calculated for tACE. Both bands disappeared in *Ace*^{-/-} mice, which indicates that these bands are sACE and tACE, respectively.

After fractionation of the sperm heads and tails, tACE was found only in the head fraction of wild-type sperm (Fig. 2B). As expected, ADAM3 and IZUMO1 were also found exclusively in sperm heads, while an antigen that was recognized by the anti-sperm tail-specific Mab (#124) was found only in the tails. The *Clgn*^{-/-} sperm had normal levels of tACE, which indicates that the lack of CLGN has no effect on the appearance of tACE (Fig. 2A). This result is supported by the finding that ACE was not immunoprecipitated from the *Clgn*^{+/-} testicular extract by the anti-CLGN antibody (data not shown). When tACE peptidase activity was measured, tACE was found to be biologically active in *Clgn*^{-/-} testis and sperm at levels comparable to those seen in *Clgn*^{+/-} mice (Fig. 2C). After phase separation of sperm with Triton X-114, the band

with $M_r \sim 112\ 000$ was detected only in the detergent-enriched phases of the *Ace*^{+/-} and *Clgn*^{+/-} sperm (Fig. 2D). The smaller bands in the detergent-depleted phase most likely reflect processed and solubilized forms of tACE. A similar fractionation pattern was found for the tACE of *Clgn*^{-/-} sperm, which suggests that tACE is not directly involved in sperm-ZP interactions.

ADAMs are Present in the Ace^{-/-} *Testis and Sperm*

We examined the possibility of aberrant expression of ADAM proteins in *Ace*^{-/-} mouse sperm, as was noted for *Clgn*^{-/-} sperm (shown in Fig. 1C) [12]. When the protein extract from *Ace*^{-/-} testis was immunoprecipitated with the anti-CLGN antibody and the immunoprecipitate was subjected to immunoblot analysis using antibodies to ADAM1a, ADAM1b, ADAM2, and ADAM3, all of these ADAMs were detected (Fig. 3A). The *Ace*^{-/-} testicular extract was also immunoprecipitated with the anti-ADAM2 antibody, and the precipitants were subjected to immunoblot analysis with the various anti-ADAM antibodies. Both ADAM1a and ADAM1b were detected in this immunoprecipitate, which suggests the formation of ADAM1a/ADAM2 and ADAM1b/ADAM2 heterodimers in the testis (Fig. 3B). Finally, the ADAMs were processed normally in *Ace*^{-/-} sperm, which is similar to the situation observed in heterozygous sperm (Fig. 3C).

Aberrant Distribution of ADAM3 after Phase Separation of Ace^{-/-} *Sperm*

Our results (Fig. 3) indicate that the ADAMs were present and processed normally in *Ace*^{-/-} testes and sperm. The Triton X-114 phase separation method concentrates proteins into either a detergent-depleted or detergent-enriched phase, depending on the conformation of the protein [24]. When the proteins from *Ace*^{-/-} sperm were fractionated into detergent-enriched and detergent-depleted phases with Triton X-114, most of the ADAM3 content ($\sim 80\%$) disappeared from the detergent-enriched phase, compared to the ADAM3 content of *Ace*^{+/-} sperm (Fig. 4, A and B). In contrast, both the ADAM1b and ADAM2 levels remained the same in the detergent-enriched phases of the *Ace*^{+/-} and *Ace*^{-/-} sperm. We analyzed other sperm membrane proteins using this Triton X-114 phase separation system. Proteins that contain a transmembrane domain, e.g., IZUMO1 and CD46, were distributed in both phases, while the GPI-anchored SPAM1 (PH-20) protein was distributed exclusively in the detergent-enriched phase (Fig. 4A). Of the sperm proteins examined, only ADAM3 decreased in amount in the detergent-enriched phase of the *Ace*^{-/-} sperm.

Comparison of Zona Pellucida-Binding Abilities for Clgn and Ace-Null Mouse Sperm

While aberrant subcellular distribution of ADAM3 was observed in both *Clgn*^{-/-} and *Ace*^{-/-} sperm, the altered localization was less severe in *Ace*^{-/-} sperm (Fig. 4). To examine whether the sperm from these null animals differ in their zona pellucida-binding activities, the numbers of sperm bound per cumulus-free egg were determined. Both *Clgn*^{-/-} and *Ace*^{-/-} sperm bound eggs poorly, as compared to the wild-type sperm (Fig. 5B). Furthermore, eggs bound significantly lower numbers of *Clgn*^{-/-} sperm than *Ace*^{-/-} sperm ($P < 0.001$). These effects were not caused by differences in sperm motility, which remained normal in both knockout mouse lines [8, 16].

DISCUSSION

Although a number of proteins have been hypothesized to be essential for various events of fertilization, their actual roles when a particular gene was ablated were not clear [2–6]. The ADAM1b/ADAM2 dimer (fertilin) was initially thought to be involved in sperm-egg fusion [25] but was later postulated to be involved in the sperm-ZP interaction [7, 26]. More recently, ADAM1a/ADAM2 has been hypothesized to have a chaperone activity, serving to direct ADAM3 to the sperm membrane [10, 23]. Given that ablation of the *Adam3* gene impairs sperm-ZP binding [11], our findings suggest that ADAM3 acts downstream of the ADAMs network in sperm assembly and functions in sperm-zona pellucida binding.

In studying the aberrant zona pellucida-binding activity of *Ace*^{-/-} sperm, we examined the integrity of ADAMs on these sperm compared with the *Clgn*^{-/-} sperm [8]. We have previously reported the disappearance of ADAM2 from *Clgn*^{-/-} sperm, and in the present study, we found that ADAM3 was also absent in *Clgn*^{-/-} sperm (Fig. 1C). This loss of ADAM3 was more complete than that reported for *Adam2*^{-/-} sperm, in which the ADAM3 level decreased to $\sim 11\%$ of the wild-type level [27]. In any case, if the loss of ADAM3 is caused by disruption of ADAM2, it was reasonable to assume that the ablation of both *Adam2* and *Adam3* would lead to a similar phenotype. In the same context, the impaired zona pellucida-binding activity of *Clgn*^{-/-} sperm could be explained by an initial failure to form the ADAM1a/ADAM2 dimer, which led, as a secondary effect, to the disappearance of ADAM3 from the sperm surface. This scheme may explain why the four different gene knockout mouse lines (*Clgn*, *Adam1a*, *Adam2*, and *Adam3*) share a similar fertilization phenotype.

The impaired zona pellucida-binding activity of *Ace*^{-/-} sperm cannot be explained by a similar mechanism, which raises the question as to how the disruption of *Ace* leads to a failure of sperm binding to the zona pellucida (Fig. 6). Although rodent tACE has been reported to localize to the midpiece of the sperm flagellum and then disappear from mature sperm during passage through the epididymis [28], we show that tACE is localized exclusively to the head of the sperm from the cauda epididymis, which suggests that tACE is involved in sperm-zona pellucida interactions. Recently, the GPIase activity of ACE has been reported to be necessary for the sperm to acquire ZP-binding activity [29]. Kondoh et al. have postulated that some GPI-anchored proteins on the sperm surface play roles in ZP interaction after cleavage or that tACE exposes a ZP-binding factor by shedding GPI-anchored proteins that block binding.

The appearance and localization of ACE was not affected in *Clgn*^{-/-} sperm, which suggests that tACE is not a direct mediator of sperm-zona pellucida binding. Rather, we postulate that tACE is involved in distributing ADAM3 to a location in which it can participate in sperm-ZP binding. When ACE was missing, a portion of the ADAM3 content was not distributed in the detergent-enriched fraction of the *Ace*-deficient sperm (Fig. 6). All of the sperm ADAM3 is located on the plasma membrane [30, 31]. These reports and our findings indicate that some of the membranous ADAM3 content is distributed in the detergent-depleted fraction. Although the amount of ADAM3 in the detergent-enriched phase is small compared to the total amount, the lack of ADAM3 in this phase may have a detrimental effect on sperm function. The manner in which ACE affects ADAM3 distribution in sperm remains unknown, although the appropriate subcellular distribution of ADAM3 appears to be critical for the sperm to develop the ability to bind to the zona pellucida. Our experiments also suggest one

possible mechanism for the similar phenotypes observed when the genes for *Ace*, *Ctgn*, *Adam1a*, *Adam2*, and *Adam3* were ablated, i.e., the disruption of zona pellucida-binding ability in these mouse lines is mediated entirely through the aberrant distribution of ADAM3. Recently, it has been reported that ADAM3 has zona-binding activity, while ADAM2 and SPAM1 do not have this activity [32]. This report reinforces the idea that ADAM3 is the furthest downstream factor in sperm-zona pellucida binding. Further study is needed to clarify whether ADAM3 participates in a direct or indirect manner in this process.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Hitoshi Nishimura and Dr. Tadashi Baba (University of Tsukuba) for providing antibodies against SPAM1, ADAM1a, and ADAM1b and for helpful comments. We also thank Dr. Paul Primakoff (University of California, Davis) for providing the antibody against SPAM1.

REFERENCES

- Nichols J, Gardner RL. Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod* 1989; 4:180-187.
- Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269:31845-31849.
- Lu Q, Hasty P, Shur BD. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Dev Biol* 1997; 181:257-267.
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 2002; 277:30310-30314.
- Ensslin MA, Shur BD. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 2003; 114:405-417.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol* 2003; 23:2614-2622.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; 281:1857-1859.
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature* 1997; 387:607-611.
- Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgins JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995; 375:146-148.
- Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem* 2004; 279:34957-34962.
- Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* 1999; 61:1445-1451.
- Ikawa M, Nakanishi T, Yamada S, Wada I, Kominami K, Tanaka H, Nozaki M, Nishimune Y, Okabe M. Calmeglin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 2001; 240:254-261.
- Kim E, Nishimura H, Baba T. Differential localization of ADAM1a and ADAM1b in the endoplasmic reticulum of testicular germ cells and on the surface of epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:313-319.
- Nishimura H, Kim E, Fujimori T, Kashiwabara S, Kuroiwa A, Matsuda Y, Baba T. The ADAM1a and ADAM1b genes, instead of the ADAM1 (fertilin alpha) gene, are localized on mouse chromosome 5. *Gene* 2002; 291:67-76.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266:15377-15383.
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:2552-2557.
- Kessler SP, Rowe TM, Gomos JB, Kessler PM, Sen GC. Physiological non-equivalence of the two isoforms of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 2000; 275:26259-26264.
- Ramaraj P, Kessler SP, Colmenares C, Sen GC. Selective restoration of male fertility in mice lacking angiotensin-converting enzymes by sperm-specific expression of the testicular isozyme. *J Clin Invest* 1998; 102:371-378.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 1994; 125:1157-1163.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434:234-238.
- Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 1981; 256:1604-1607.
- Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse egg in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 1971; 16:147-151.
- Stein KK, Go JC, Primakoff P, Myles DG. Defects in secretory pathway trafficking during sperm development in adam2 knockout mice. *Biol Reprod* 2005; 73:1032-1038.
- Florke RR, Schnaith K, Passlack W, Wichert M, Kuehn L, Fabry M, Federwisch M, Reinauer H. Hormone-triggered conformational changes within the insulin-receptor ectodomain: requirement for transmembrane anchors. *Biochem J* 2001; 360:189-198.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992; 356:248-252.
- Yamagata K, Nakanishi T, Ikawa M, Yamaguchi R, Moss SB, Okabe M. Sperm from the calmeglin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev Biol* 2002; 250:348-357.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 2001; 233:204-213.
- Metayer S, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. Germinal angiotensin I-converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* 2002; 67:1763-1767.
- Kondoh G, Tojo H, Nakatani Y, Komazawa N, Murata C, Yamagata K, Maeda Y, Kinoshita T, Okabe M, Taguchi R, Takeda J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med* 2005; 11:160-166.
- Kim E, Nishimura H, Iwase S, Yamagata K, Kashiwabara S, Baba T. Synthesis, processing, and subcellular localization of mouse ADAM3 during spermatogenesis and epididymal sperm transport. *J Reprod Dev* 2004; 50:571-578.
- Kim T, Oh J, Woo JM, Choi E, Im SH, Yoo YJ, Kim do H, Nishimura H, Cho C. Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse. *Biol Reprod* 2006; 74:744-750.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:18028-18033.

産科と婦人科 別刷

Vol. 73 No. 6 (2006年6月1日発行)

発行所 株式会社 診断と治療社



配偶子形成から受精まで

6. 受精のメカニズム

—イズモを中心に卵子と精子の結合に必要な因子とその異常に関連した受精異常について—

井上直和*・伊川正人*・岡部 勝*
大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター。

Key Words/ノックアウトマウス, 受精, 膜融合

要旨

ほ乳類の受精に重要な因子が遺伝子ノックアウトにより次々と同定されてきている。ノックアウトマウスを用いた解析の特徴は、その表現型から、受精に必要な分子かどうかの判定が明確にくだされることである。長い受精研究の歴史のなかで重要であるとされた因子であっても、実は不要であると判明することがあれば、逆にまったく想像されていなかった分子が重要な場合もある。本稿では、遺伝子ノックアウトから得られた解析結果を中心に、受精の各現象と、それに寄与する分子について解説する。

はじめに

これまでのほ乳類の受精現象についての研究は、形態学的な観察や生理学的な解析が中心となって発展してきたが、近年、遺伝子組換えマウスを用いた研究が可能になったことで、これまでの解析により明らかにされてきた情報をもとに、ノックアウトマウスを作製し、分子生物学的な解析がなされるようになった。その結果、さまざまな不妊モデルマウスが作製され、それらの精子、卵子の動態を観察することで受精の各ステップにかかわる重要な因子が浮き彫りになってきている。これら因子のなかには、以前

には知られなかった「意外な」因子も報告され、新しい展開もある。本稿では、混沌の中からおぼろげに現れようとしている新しい受精の分子メカニズムを紹介したい。

受精とは？

受精は、射出された多くの精子（ヒトの場合1～3億匹）のなかで、最終的にたった一匹の精子が卵子と融合し、遺伝情報を受け渡す過程である。射出された精子には受精に至るまでにさまざまな障害が立ちはだかり、優れた精子が選択を受けているようにもみえる。本稿では卵

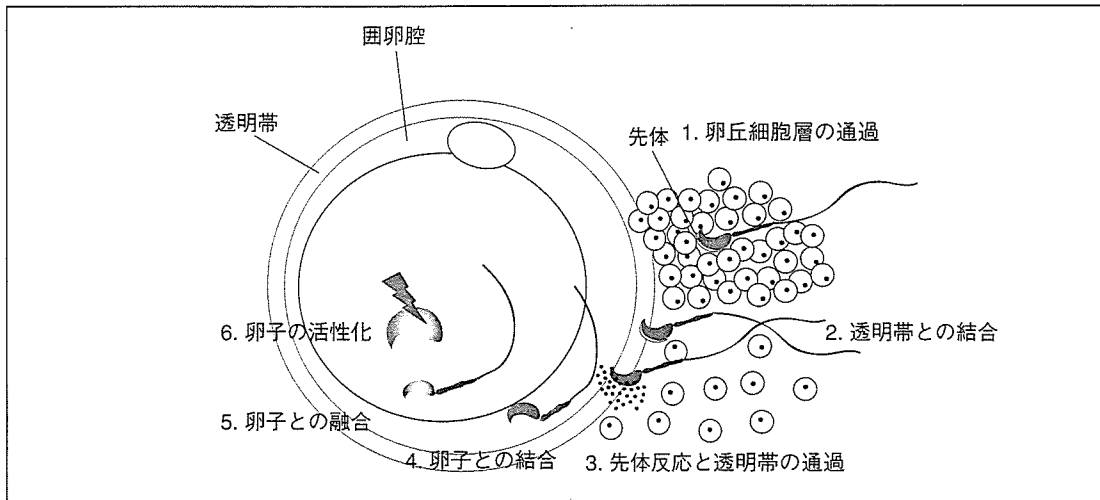


図1 マウスにおける受精メカニズム

マウスの精子は輸卵管に移行後、1. 卵丘細胞層の通過、2. 透明帯との結合、3. 先体反応と透明帯の通過、4. 精子との結合、5. 卵子との融合、6. 卵子の活性化を経て受精が完了する。

管膨大部に到達した精子が卵丘細胞を通過し、卵子と融合するまでの分子機構を紹介したい。また、受精のメカニズムは種によって少しずつ異なっているので、ここではマウスをモデルとして話を進める。

図1に示すように、受精に至るまでのステップはいくつかに分けることができる。卵管内を上昇してきた精子は卵管膨大部において卵子を取り囲んでいる卵丘細胞層と出会う。精子はヒアルロン酸で架橋された卵丘細胞間の間隙を通り抜け、卵子の周りを取り囲んでいる糖蛋白質の層である透明帯に結合し、透明帯からの刺激により先体反応と呼ばれる形態的变化を起こす。さらに、精子は先体内の加水分解酵素により透明帯を分解しながら通過した後、卵細胞膜と結合し、融合する。こうして精子は、染色体を卵子に送り込むと同時に卵子を活性化してはじめて受精が成立する。

卵丘細胞層の通過

卵丘細胞層は卵丘細胞同士がヒアルロン酸を

主とするマトリックスで弱く結合しており、精子はヒアルロン酸分解酵素を用いながらこの層を通過すると考えられている。精子に存在するPH-20は、ハチ毒に含まれるヒアルロニダーゼと類似するため精子の卵丘細胞の通過に必要な因子と考えられてきた。しかし、この分子をノックアウトしても精子はマトリックスを通過し受精することができるうえに、精子にはHyal5と呼ばれる新たなヒアルロニダーゼも存在していた¹²⁾。PH20の機能をHyal5が補う可能性も考えられるため、Hyal5のみならずPH20とのダブルノックアウトマウスの解析結果が待たれる。

透明帯への結合

1. 透明帯の形成因子

卵子は透明帯と呼ばれる細胞外マトリックスにより覆われているが、透明帯はおもにZPA, ZPB, ZPCの三種類の糖蛋白質から成っている。マウスの場合、精子との相互作用には少なくとも2段階あり、先体反応を起こす前の精子

細胞膜と結合する最初のレセプターが ZPC (ZP3) であり、先体反応後の先体内膜に結合するセカンドレセプターが ZPA (ZP2) であると考えられている。また、ZP3 の O 結合型糖鎖が精子との相互作用に重要である。ZP3 のノックアウトマウスの卵子は透明帯を形成できないために脆弱で受精能がないが、ヒト ZP3 分子を発現させることにより透明帯が再構築し、受精能が回復する³⁾。さらに、ZP2 をヒト型に置換した場合でもマウス精子が透明帯に結合、通過できる。しかし、これらの透明帯とヒト精子は相互作用を示さないことから、透明帯因子の糖鎖の構造が種特異性を決定していると推測される。

2. 透明帯結合に関わる雄側の因子

精子が透明帯に結合できなくなるようなノックアウトマウスはいくつか報告されているが、どの分子も直接の透明帯結合因子とはいいがたく、混沌とした状況にある。

1) カルメジン

カルメジンは精細胞の分化時期に特異的に発現し、体細胞の小胞体に存在するカルネキシン

によく似た因子で、レクチン型の分子シャペロンである。カルメジンノックアウトの雌はまったく正常であるが、雄は見かけ上は正常であり、交尾して射精に至るにもかかわらず不妊であった。さらに、その精子は形態や運動性に異常は見つからなかったが、透明帯にまったく結合できないことが判明した⁴⁾(図 2-a)。カルメジンは精巣内でのみ発現し、成熟精子上からは消失する蛋白質であることから、精子上で透明帯との結合に直接作用しているとは考えにくく、カルメジンによって折りたたまれる精子上の因子が透明帯との結合に関与していることが予想される。

2) ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリー

受精の相互作用に関する膜型蛋白質として、ファーティリン (ADAM1b と ADAM2 のヘテロダイマー) やシリテストイン (ADAM3) などの ADAM ファミリーが見い出された。精細胞では ADAM1a, ADAM1b, ADAM2, ADAM3 が発現し、ADAM1a と ADAM2,

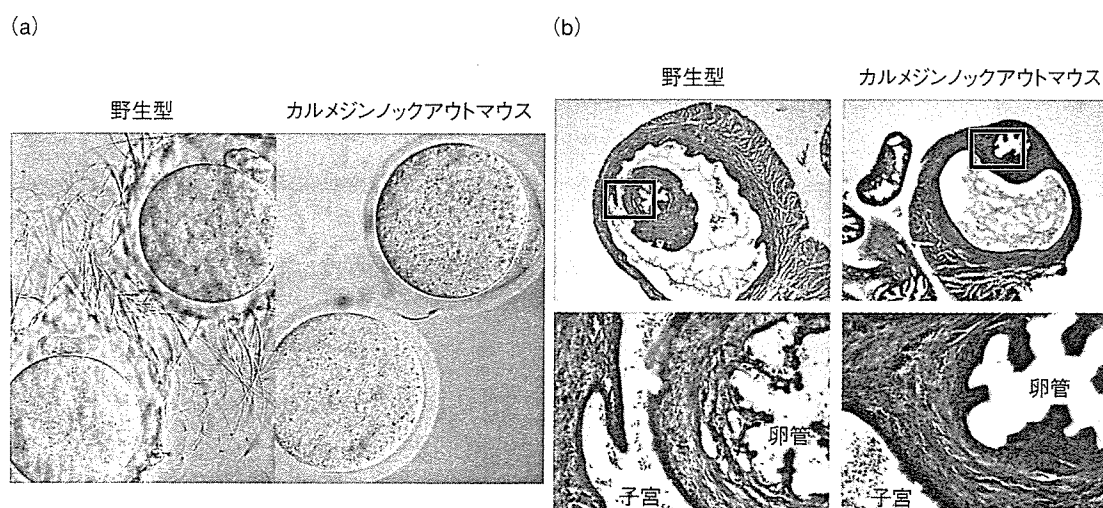


図2 カルメジンノックアウトマウスの精子は透明帯への結合と輸卵管への移行が損なわれる

(a) カルメジンノックアウトの精子はまったく透明帯に結合することができないため、不妊になる。(b) 射精後、カルメジンノックアウトの精子は卵管内に全く観察されず、子宮-卵管接合部まで到達できないことが分かる。(文献4, 9より改変・転載)

表1 カルメジンおよび ADAM ファミリーのノックアウトマウスの表現型

genotype	Testicular molecules		Sperm molecules			zona binding	UTJ migration
	Calmegin	ADAM1a	ADAM1b	ADAM2	ADAM3		
Calmegin-KO	×	n.d.	×	×	×	impaired	impaired
ADAM1a-KO	○	×	○	○	△	impaired	impaired
ADAM1b-KO	○	○	×	○	○	normal	normal
ADAM2-KO	n.d.	○	×	×	△	impaired	impaired
ADAM3-KO	n.d.	○	○	○	×	impaired	normal

○: present, ×: absent, △: reduced n.d.: no data

ADAM1b と ADAM2 はヘテロダイマーを形成する。ADAM ファミリー蛋白質は、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、EGF 様リピートドメインなど、多様なドメイン構造をもつ。とくに ADAM1b は、ウイルスの融合ペプチドと相同性のある配列を有しているため、卵子との融合に重要な蛋白質であると最初は考えられていたが、ADAM1b ノックアウトマウスの雄が不妊にならないことからこの仮説は覆された⁶⁾。ところが、ADAM1a, ADAM2, ADAM3 ノックアウトマウスの雄は不妊になり、その精子は共通に透明帯への結合能が損なわれることが示された^{6)~8)}。さらに、ADAM1a, ADAM2 をそれぞれノックアウトすると、精子上の ADAM3 が減少することが判明した。このため、これらの分子はお互いに非常に密接な関係にある(表1)。

さらに興味深いことに、カルメジンノックアウトマウスの精子ではファーティリンや ADAM3 が精子からなくなっていた⁹⁾。

3) アンジオテンシン変換酵素 (ACE)

ACE は、血液中のアンジオテンシン I やブラジキニンといったペプチドの C 末端の 2 アミノ酸を遊離させる酵素活性を有し、血圧の調節に関与する分子であるが、イントロン 12 に存在する精巣特異的なプロモーターによって、分子量の小さい精巣型 ACE も産生される。ACE をノックアウトすると、血圧低下が起こると同時に、その精子が透明帯と結合できなくなり、不

妊となる¹⁰⁾。体細胞型の ACE だけを欠損した精子が受精能を有していることや、精巣型 ACE をノックアウトマウスに発現させると受精能が回復することから、透明帯の結合には精巣型 ACE が深く関与している。精巣型 ACE が直接のレセプターとして透明帯に相互作用するのか、あるいは、その酵素作用が精子上の因子を修飾して透明帯結合に作用するのかについては不明であったが、最近、ACE にはジペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性の他に GPI アンカー型蛋白質を切断する活性があることが報告された¹¹⁾。さらに、ACE のペプチダーゼ活性中心のアミノ酸を変異させたりコンビナント蛋白質を、*in vitro* で ACE ノックアウト精子に加えても透明帯への結合能力が回復したことから、ACE の GPI アーゼ活性が透明帯との結合に重要な働きをしており、そのターゲットとなる GPI アンカー型蛋白質が透明帯への結合に深く関与していることが推測される。今後の研究の進展によっては、透明帯への結合の詳細な分子メカニズムの解明に繋がるであろう。

今回はノックアウトによって証明された透明帯結合因子を紹介したが、このほかにも Sp56, zonadhesin など、未だノックアウトされていない分子を含めると候補分子はその数を増やしているが、現時点ではお互いの関連性は十分に分かっていない。また、カルメジン、ACE、ADAM1a, ADAM2 のノックアウトでは輸卵管内に精子が昇っていかないという別の表現型が

共通に存在することも知られており(図2-b)、今後は、透明帯への結合と輸卵管内への移行がなぜ相関しているのかを明らかにするとともに、これらのノックアウトマウスにおそらく共通して機能が損なわれている真の透明帯結合因子を同定する必要がある。

先体反応

一般に、受精能を獲得した精子は透明帯に結合した後、透明帯の刺激により先体反応を起こし透明帯を通過する、といわれている。先体反応は、精子先体部分の膜構造がなくなり、先体

内の蛋白質を放出する精子の構造変化を伴う反応である。先体反応を起こしていない精子は融合できないことから、先体反応は受精にとって必須な現象である。精子を活性化する透明帯の活性成分としてはZP3が有名であるが、その他の物質による先体反応の誘導についても多くの報告がある。しかし、いずれのメカニズムを経るにせよ先体反応には精子細胞外からの Ca^{2+} の流入が必要である。

精子内への Ca^{2+} の流入に伴い、惹起される先体反応には、細胞膜上のイノシトール1,4,5-トリスリン酸(PI_3)のシグナルが必要と思われていたが、その実体は明らかではなかった。そのようななかで、精巢特異的に発現するPLC δ

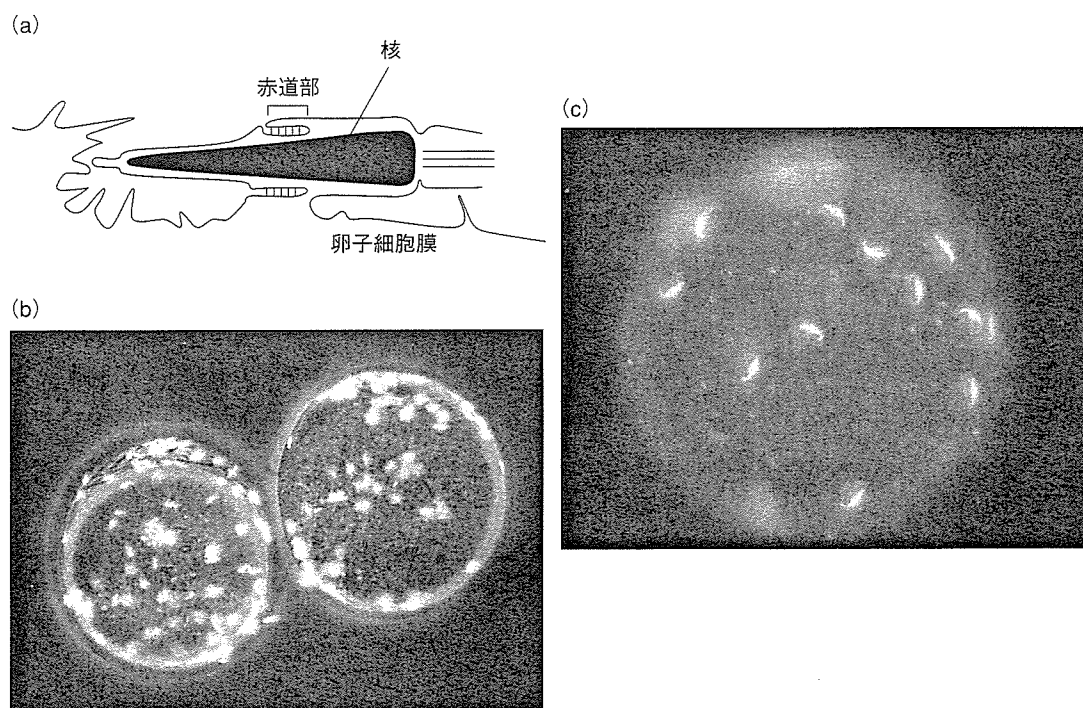


図3 融合能欠損を示すCD9ノックアウト卵子とIzumoノックアウト精子

(a) 精子/卵子の膜融合は精子側の赤道部から始まる。(b) CD9ノックアウト卵子に対して精子を加えヘキスト33342で精子の核を染色すると、精子は正常に透明帯を通過するが、融合できないため囲卵腔に蓄積されている様子が観察される。(c) Izumoノックアウト精子は先体反応を引き起こし、透明帯を通過することができるが、融合がまったく起こらないため囲卵腔に精子が多数存在する。なお、先体反応の有無は、先体反応後の精子に特異的に反応する抗体MN9(千葉大学の年森清隆教授よりご供与いただいた)を用いて染色し評価した。

4 (Phospholipase C δ 4) のノックアウトマウスが作製され、その精子は可溶化した透明帯にさらしてもほとんど先体反応を起こさないことから、PLC δ 4 を介した PI₃ のシグナルが先体反応にとって重要な働きをすることが明らかになった¹²⁾。

卵子との融合

先体反応を終えた精子は、速やかに卵子の細胞膜と結合し融合を開始する。ヒトを含む真獣類では先体赤道部の細胞膜で融合し始める (図 3-a)。この部分は精子が先体反応を起こす前から表面に露出しているが、不思議なことに先体反応前に精子が卵子と融合することはない。

これまでに、生化学的な解析から精子のファティリンや卵子のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が、融合因子と考えられていた時期があったが、これらの分子をノックアウトしても融合能に大きな変化が認められないことから、これら因子の重要性は疑問視されている。

1. 卵子上の融合因子

1) テトラスパニン

4 回膜貫通型のファミリー分子 (テトラスパニン) である CD9 をノックアウトすると雌マウスは不妊になるが、その原因は透明帯通過後の精子が卵子と融合できないためである (図 3-b)。CD9 ノックアウト卵子でも顕微授精により精子を細胞質内に直接注入すると、正常に産仔が得られることから、この分子が融合のステップに特異的に関与していることが証明された¹³⁾。さらに、最近になって同じテトラスパニンの CD81 のノックアウトの雌も妊孕性が低下し、その卵子もほとんど融合できなくなることが報告された¹⁴⁾。この論文のなかで合わせて、CD9 は融合時に卵子細胞膜から精子の頭部に移動する像が観察された。この現象が真実であるなら

ば、CD9 はいつ、どのように精子頭部に移動し、融合に対してはどのような意味があるのか非常に興味を持たれるところである。

2) GPI アンカー型蛋白質

GPI アンカーの生合成系に重要な Pig-a を、卵子特異的な ZP3 プロモーターを用いた Cre-LoxP システムによりコンディショナルノックアウトすると、その卵子は、精子と結合できるものの融合能がほとんど失われた¹⁵⁾。このことから、卵子上の GPI アンカー型蛋白質が融合に関与することが考えられるが、卵子上のすべての GPI アンカー型蛋白質を欠失させたことによる膜構造変化など 2 次的要因に起因する可能性も否めない。融合に寄与する特定の GPI アンカー型蛋白質を同定することを含め、今後、詳細な解析が必要とされる。

2. 精子上の融合因子

1) Izumo

卵子との融合を阻害する抗精子抗体 (OBF13) の抗原として同定された Izumo 蛋白質は、縁結びの神様が住む出雲大社に因んで名付けられた。Izumo は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外に免疫グロブリン様ドメインをひとつだけもつ I 型の膜貫通型蛋白質である。Izumo は射精直後の精子膜表面ではなく、先体反応を起こした精子において、はじめて膜表面に露出し、赤道部を含む頭部全体に分布する。

Izumo をノックアウトすると、雌は正常であるが雄マウスは交配しても妊孕性を示さず、その精子は、卵子と融合する能力を完全に欠失していることがわかった (図 3-c)。Izumo が融合の過程に特異的に作用する分子であることは、Izumo ノックアウト精子が透明帯を正常に通過し、卵子細胞膜と結合能を保持することのほか、顕微授精法で融合ステップをバイパスさせるとノックアウト精子からも産仔を得ることができることで示された。また、特異的抗体を用いた受精阻害実験から、ヒト Izumo も卵子との

融合に機能することが明らかにされた¹⁰⁾。

このように、精子と卵子の融合メカニズムは、未知の部分が多く役者が揃い始めたばかりである。今後、CD9, CD81 や GPI アンカー型蛋白質および Izumo の相互関係の解析から研究の進展が期待される。

おわりに

これまでに受精のメカニズムにかかわるさまざまな因子が同定されてきた。しかし、ノックアウトの審判により受精に必須ではないと判定されたものも少なくない。言い換えれば、厳しいノックアウトの審判をクリアしたわずかな因子は受精にとって非常に重要な因子である。しかし、ノックアウトマウス解析も万能なツールではない。たとえば本稿で紹介した透明帯への結合のように、このステップに関与する分子が複数存在する場合、単一遺伝子のノックアウトの解析だけではその解明が不可能である。また、ノックアウトマウスを用いた解析は、表現型によりそのステップに必須分子かどうかを明確にすることができるが、ほとんどの場合、その先にあるメカニズム解析に至ることは難しい。これがノックアウト技術の限界である。

これからの受精研究は、個々の分子の性質を解析すると同時にノックアウトマウスから得られる個体レベルでのデータと見比べてゆくことが必要である。また、その分子がなくなったことによる直接的な影響なのか、あるいは二次的な影響を見ているのかを精査することも重要である。いずれにせよ、まずノックアウトマウスの結果をもとに個々の因子の機能を推定し、生化学的解析により個々の相互関係を理解していくことが最良の手段であると筆者らは考えている。

ノックアウトの解析を中心に受精の各ステップに重要な因子が解明されたとき、受精の分子

メカニズムにとって、次世代の新展開が現れるものと考えられる。そこに到達したときには、すばらしい受精の分子メカニズム解明へのステージが待っていると信じている。

- 1) Baba D, et al.: Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 277:30310-30314, 2002.
- 2) Kim E, et al.: Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18028-18033, 2005.
- 3) Rankin TL, et al.: Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125:2415-2424, 1998.
- 4) Ikawa M, et al.: Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 240:254-261, 2001.
- 5) Kim E, et al.: Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 281:5634-5639, 2006.
- 6) Cho C, et al.: Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281:1857-1859, 1998.
- 7) Nishimura H, et al.: Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233:204-213, 2001.
- 8) Nishimura H, et al.: Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem* 279:34957-34962, 2004.
- 9) Ikawa M, et al.: Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 240:254-261, 2001.
- 10) Hagaman JR, et al.: Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2552-2557, 1998.

- 11) Kondoh G, et al.: Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. Nat Med 11:160-166, 2005.
- 12) Fukami K, et al.: Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. Science 292:920-923, 2001.
- 13) Miyado K, et al.: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science 287:321-324, 2000.
- 14) Rubinstein E, et al.: Reduced fertility of female mice lacking CD81. Dev Biol 290:351-358, 2006.
- 15) Alfieri JA, et al.: Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. J Cell Sci 116:2149-2155, 2003.
- 16) Inoue N, et al.: The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature 434:234-238, 2005.

著者連絡先

(〒565-0871)
 大阪府吹田市山田丘 3-1
 大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター
 井上直和

■ 産科と婦人科バックナンバー特集一覧 ■ (価格は税5%込)

第65巻(平成10年)
 <増刊号> 鑑別診断のための画像の読み方8925

第66巻(平成11年)
 <増刊号> 子宮体部悪性腫瘍の診断と治療8925

第11号<特大号> 婦人科がん化学療法5250

第67巻(平成12年)
 <増刊号> 避妊—女性の well-being をめざして7875

第11号<特大号> 産婦人科感染症のすべて6300

第68巻(平成13年)
 <増刊号> 産婦人科ホルモン療法マニュアル6720

第11号<特大号> 産婦人科オフィス診療6300

第69巻(平成14年)
 第1号 外陰疾患2520
 第2号 肥満とやせ2520
 第3号 帝王切開—QOLの向上を考える—2520
 第4号 機能性子宮出血の診断と治療2520

<増刊号> 妊婦・新生児スクリーニング検査7350

第5号 婦人科癌化学療法のEBMと新たな展開2520

第6号 生殖補助医療をどう考えるか2520

第7号 多胎妊娠—予後の改善をめざして—2520

第8号 産婦人科領域における
 血液製剤の使用法2520

第9号 婦人科癌の予防と検診2520

第10号 受精のメカニズムをさぐる2520

第11号<特大号> 産婦人科診療における超音波診断のポイント6195

第12号 妊娠中毒症2520

第70巻(平成15年)
 第1号 血管新生と婦人科悪性腫瘍2520

第2号 生殖医療よりみた多胎妊娠2520

第3号 内科疾患合併妊娠の管理2520

第4号 産婦人科医に必要な麻酔の知識2520

<増刊号> 産婦人科手術療法マニュアル7575

第5号 子宮頸癌治療の CONTROVERSY2520

第6号 難治性不妊症をどう扱うか2520

第7号 難産を考える2520

第8号 女性ホルモン補充療法(HRT)の再評価2520

第9号 がんと性を科学する2520

第10号 着床不全の改善をめざして2520

第11号<特大号> 産婦人科診療—症候から診断・治療へ—6195

第12号 早産・切迫早産を考える2520

第71巻(平成16年)
 第1号 内視鏡下手術の適応と限界2520

第2号 子宮体癌治療の CONTROVERSY2520

第3号 GnRH アンタゴニストの臨床応用2520

第4号 妊産婦死亡を防ぐ2520

<増刊号> 検査値をどう読むか6825

第5号 婦人科がんのリスクファクター2520

第6号 多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を考える2520

第7号 妊娠中に行う手術の適応と問題点2520

第8号 産科医療におけるパラダイムシフト2520

第9号 卵巣がん治療の CONTROVERSY2520

第10号 生殖免疫を考える2520

第11号<特大号> 女性内科疾患—外来プライマリ・ケア—7245

第12号 胎児 well-being の評価2520

第72巻(平成17年)
 第1号 乳がんの診断と治療2625

第2号 抗悪性腫瘍薬の臨床薬理学2625

第3号 子宮内膜症をどう扱うか2625

第4号 骨盤位妊娠を考える2625

第5号 卵巣明細胞癌を考える2625

第6号 生殖補助医療と双胎妊娠2625

第7号 性感染症の診断・治療と予防2625

第8号 周産期のウイルス感染症2625

第9号 婦人科がん多施設共同研究の現状と将来像2625

第10号 不妊治療と新しい多様な家族のすがた2625

第11号<特大号> 産科診療マニュアル
 —産科異常への対応—5775

第12号 周産期医療の倫理を考える2625

第73巻(平成18年)
 第1号 卒後20年生のスーパーローテイト2625

第2号 子宮頸癌発生の予防に向けての戦略2625

第3号 静脈血栓症2625

第4号 成育医療における胎児診療2625

第5号 卵巣癌薬物療法の新展開2625

☆お問い合わせ、ご注文は下記へ

〒100-0014 東京都千代田区永田町 2-14-2 山王グランドビル TEL 03-3580-2770 (営業) FAX 03-3580-2776
 振替 00170-9-30203 (株) 診断と治療社・営業部
 営業部 E-mail: eigyobu @ shindan.co.jp

受精の膜融合における 必須分子Izumoの同定

Identification of "Izumo" Which is Involved in Sperm-egg Fusion

井上 直和・岡部 勝

大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター

Key Words

sperm, egg, fertilization,
membrane fusion,
knockout mice

■ Abstract ■

長い受精研究の歴史のなかで、膜融合のメカニズムとそこにかかわる因子の同定は多くの研究者の興味を集めてきたが、ほとんど分かっていなかった。しかし、最近の解析から卵子側の融合因子としてテトラスパニンのCD9が同定され、融合のメカニズム解明の最初の手がかりが得られた。一方、著者らは、融合を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いた遺伝子クローニングにより精子側の因子としてIzumoを同定し、遺伝子ノックアウトによりこの遺伝子が融合に必須な因子であることを見出した。

■ はじめに

受精は、射出された多くの精子（ヒトの場合1～3億匹）のなかで、最終的にたった1匹の精子が卵子と融合し、遺伝子情報を受け渡す過程である。射出された精子には受精能がないため生体内（雌性生殖路内）で、受精能を獲得（capacitation）し、様々な障害を乗り越えて卵子に辿り着かなければならない。このように厳しい生存競争を勝ち抜いた精子は卵子と確実に「融合」しなければならない。この過程は次世代へ種を保存するために非常に重要な現象であり、正確性や確実性を確保するために種を超えて精巧な仕組みが存在するのではないかと考えられる。しかし、「融合」のメカニズムについて分子生物学的な解析はほとんど進んでいないのが現状である。今回我々は、世界で初めて哺乳類の精子膜上で融合に深く関与するタンパク質を同定することができたので紹介したい。

Naokazu Inoue, Masaru Okabe
Genome Information Research Center, Reserch Institute
for Microbial Diseases, Osaka University

■ 1. 融合に関与する因子群

これまでノックアウトマウスを用いた受精研究から、4回膜貫通型のファミリー分子であるCD9をノックアウトするとその雌から作られる卵子は、精子と融合できないことが明らかになった（図A）。しかし顕微授精法により精子を細胞質内に直接注入することで融合のステップをバイパスすると正常に産仔が得られることから、CD9は融合のステップに特異的に関与していることが証明された¹⁾。

このほかに、GPIアンカー型タンパク質の生合成系に必須な酵素であるPig-aをZP3プロモーターで卵子特異的にCreを発現させることより卵子のみでノックアウトすると、GPIアンカー型タンパク質をもたない卵子ができ、それは精子と結合できるものの融合能がほとんど失われることも報告されている²⁾。しかし、この方法では卵子上のGPIアンカー型タンパク質が欠失することによる卵子の膜構造変化などの二次的な要因である可能性も否めない。今後、融合に寄与するGPIアンカー型タンパク質の同定が強く望まれる。

■ 2. Izumoの同定

このように、融合に関わる卵子側の因子はおぼろげながら姿を現し始めている。しかし精子側の因子は、長年探し求められてきたにもかかわらず決定的な証拠があるものは報告されていない。著者らは約20年前にすでに融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体（OBF13）を

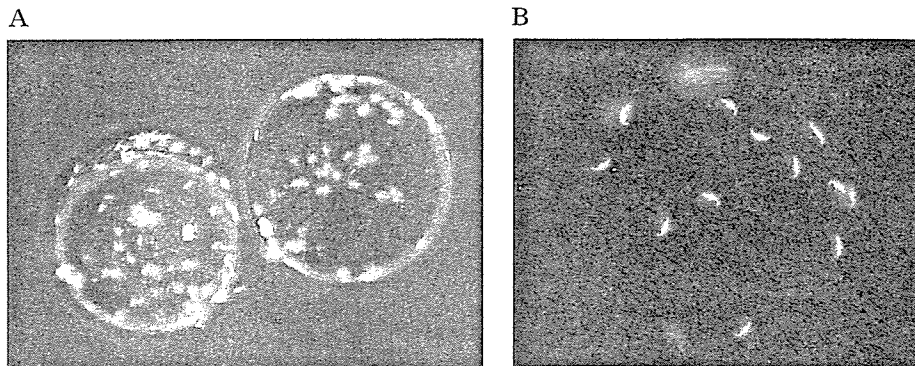


図 融合能欠損を示すCD9ノックアウト卵子とIzumoノックアウト精子

- A: CD9ノックアウト卵子に対して精子を加えヘキストで精子の核を染色すると、精子は正常に透明帯を通過するが、融合できないため卵卵腔に蓄積されている様子が観察される。
- B: Izumoノックアウト精子は先体反応を引き起こし、透明帯を通過することができるが、融合が全く起こらないため卵卵腔に精子が多数存在する。なお先体反応の有無は、先体反応後の精子に特異的に反応する抗体MN9（千葉大学の年森清隆教授より御供与頂いた）を用いて染色し、評価した。

見出していた³⁾。しかし、この抗体のサブクラスがIgMということもあって抗原の探索が困難で、長らくお蔵入りであったが抗原の抽出法や検出法の進歩もあり、最近になってやっとウエスタンブロット解析から2次元泳動後のゲル上で抗原のスポットを同定し、そのアミノ酸配列を解明することができた。我々はこの遺伝子を縁結びの神様のいる出雲大社に因んで「Izumo」と命名した。Izumoは細胞外に免疫グロブリン様ドメインを1つだけでも、I型の膜貫通型糖タンパク質であった。

■ 3. Izumoノックアウトマウスの作製と解析

Izumoは精子に特異的に存在するタンパク質であったので、我々は迷うことなくストレートノックアウトマウスを定法にしたがって作製した。ノックアウトマウスは外見上健康であったが予想どおり雄マウスは不妊であり、ノックアウトマウスからの精子を用いた体外受精を行っても受精卵を得ることはできなかった。さらに詳細に調べると、この精子は正常に先体反応を引き起こし透明帯を通過していることが確認できた(図B)。つまり、このステップまでノックアウト精子に何ら問題はないことは明らかであった。次に精子の融合能力を検討したところ、ノックアウト精子は、卵子と

融合する能力を完全に欠失していることが分かった。この因子が融合の過程にのみ必要な分子であることは、ノックアウト精子が卵子細胞膜との結合能を有することや、融合のステップを顕微授精法でバイパスさせるとノックアウト精子からも産仔を得られることで示された。またヒト精子にもIzumoが存在し、特異的抗体を用いると体外受精が阻害されることから、ヒトにおいてもIzumoは卵子との結合または融合に機能するタンパク質であるということが明らかになった⁴⁾。

■ おわりに

今回の発見により、長年探し求められていた精子側の融合因子を同定することに成功した。またこの研究成果は、精子と卵子の融合メカニズムの解明に貢献することが期待されるほか、避妊ワクチンや不妊の診断などの社会的要求が大きい臨床分野においても応用できる可能性を秘めている。

文献

- 1) Miyado K, *et al.*: Science. 287: 321-324, 2000.
- 2) Alfieri J A, *et al.*: J Cell Sci. 116: 2149-2155, 2003.
- 3) Okabe M, *et al.*: J Reprod Immunol. 11: 91-100, 1987.
- 4) Inoue N, *et al.*: Nature. 434: 234-238, 2005.

遺伝子操作マウスを用いて見る卵子と精子の相互作用

岡 部 勝

わが国では約10組に1組のカップルが不妊に悩まされているといわれている。多くの人が不妊クリニックを訪れて、統計によると2004年にわが国で生まれた子供の65人に1人は体外受精児であったという。このような努力にもかかわらず、わが国では少子化に歯止めがかからず人口は減少に向かい始めている。「受精の生物学」は重要性を増しているが、少子化問題に資するどころか、これまでに蓄積されてきた受精のスキームがほぼ壊滅しようとしている。しかし遺伝子操作動物を用いた実験により、これまで知られていなかった受精の必須因子が次々と明らかになりつつあるので、本稿では、そのあたりをかいつまんで総説した。

生き物は音の存在を知るよしもないときに耳を発生させ、光の存在を知るよしもない状態であったにも関わらず、目を発生させ、物理学の知識を持たないにも関わらず、レンズを「発明」し網膜に像を結ばせることに成功した。さらにはレンズの厚みを変化させることで焦点を変更するなどの複雑なシステムを構築することにも成功してきた。これらは生命が成し遂げてきたすばらしい成功例のほんの一部にしか過ぎない。遺伝子を持ち寄り共有するという有性生殖システムの採用も生命にとって画期的な「発明」で、その発明以来、減数分裂と融合の過程は多くの進化を遂げてきたに違いない。現代の哺乳類において、このシステムは、雄が準備する小さいけれども活発に動き回る大量の精子と、雌が準備する大きい1個ないし数個しかない卵子との間で繰り広げられる「受精」現象として捕らえることができる。有性生殖はあまりにも根源的な発明であったために、受精のときには、目や耳などすべての獲得発明物をいったん放棄して、太古の世界に起こった細胞同士

の単純な融合を真似たかたちを再現しなければならない。すなわち、アフリカゾウのように何トンという体重を持つ強大な生き物であっても、受精のステップに至るには50-60マイクロメートルの鞭毛¹⁾を持つピコグラム単位²⁾の半数体単細胞である精子、もしくは、それよりは大きい透明帯と呼ばれる薄い糖タンパク質の膜に守られただけで脆弱な直径100マイクロメートル程度³⁾の20から40ナノグラム²⁾の卵子に変身しなければならない。成熟したアフリカゾウがいかに無敵といえども、受精の瞬間には、けしつぶ以下の脆弱な存在に戻らなければならない。これが有性生殖システムを採用した哺乳類の宿命である。

生命の大発明でもあり、宿命でもある受精のメカニズム(精子と卵子がどのようにお互いを見つけ、どのように接触し、融合に至るのか?)はどこまで明らかにされているのであろうか? この総説ではこれまでの受精研究の流れについて、マウスを中心に、いろいろと寄り道をしながら独断的な検証を試みてみた。

1. 卵 子

受精の立役者はなんとといってもその存在感からいって卵子といえるであろう。最近、卵巣組織の辺縁部に卵子の幹細胞が存在するという驚くべき報告がNatureに掲載された⁴⁾。また、さらに追い討ちをかけるような衝撃的な報告としてこの幹細胞は骨髓細胞に由来し、血中をめぐり卵巣に達することが同じ著者らによりCellに掲載された⁵⁾。ハ

大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター
(〒565-0871 吹田市山田丘3-1)

Observation of sperm-egg interaction through gene manipulated animals

Masaru Okabe (Genome Information Research Center, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamadaoka 3-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

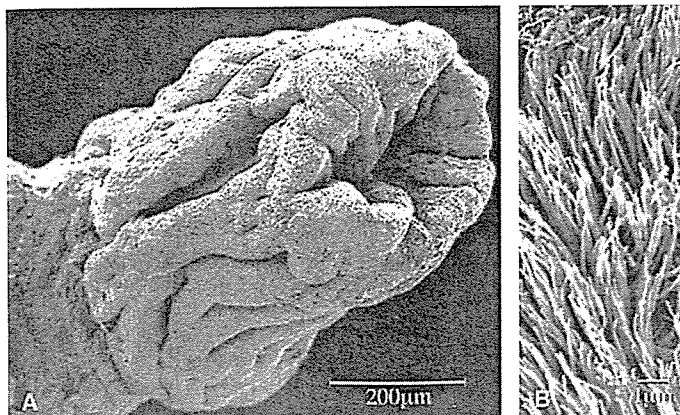


図1 卵管采の様子とその表面にある繊毛⁹⁾

論文のサイトから卵子が卵管内に吸い込まれてゆく動画がダウンロードできる。

ーバード大学医学部の研究室が一流の雑誌に掲載した報告であるが、後者の論文はサイエンスの領域からSF物語の領域に突入してしまった感がある。NatureやCellの論文の信憑性に疑念を呈している論文⁹⁾のほうに分があるように思える。しかし、ブタの胎児皮膚から卵子が分化してくるという報告⁷⁾もあり、どこになにの幹細胞が存在するのかについてはいましばらく混沌とした状態が続きそうである。

さて、以上は余談であるが卵巣から排卵された卵子は輸卵管内に吸引される。この様子はハムスターを使って見事な動画に収められている⁸⁾。この映像は必見で文字通り卵子が掃除機のホースの先に引っかかりながらもスポンと「吸引」されて入ってゆく様子が面白い。ただしこの吸引というのは液の流れによる吸引ではなく、卵子の周りに存在する卵丘細胞が卵管にある繊毛と次々と接着と離脱を繰り返しながら一定方向に運ばれてゆくことによる。ちょうど運動会でやる玉運びのような感じで、見ていて飽きないものがある。卵子は卵管采(図1)から吸い込まれた後に輸卵管の膨大部に移動し、ここで精子と出会い受精が起こる。卵子がどういう仕組みで膨大部にとどまるのかについての報告はないが、とどまっている間の卵子は卵丘細胞に包まれている。卵丘細胞は受精を終えると卵子から離脱する。透明帯がむき出しとなった卵子は再び輸卵管内を下降して子宮内へ移り、そこで着床することになる。LIFなどのノックアウトマウスでは着床が阻害されることが知られて久しい⁹⁾が、卵子と子宮壁の相互作用の生化学についてはあまり解明されていない。このあたりにも面白い仕組みがたくさんあるに違いない。

2. 精 子

卵子は排卵後、子宮に向かって輸卵管を下ってくるのに対し、精子は子宮を経て、輸卵管に上昇してくる必要がある。これにはもちろん精子の運動性が大いに関係しているのであるが、雌性生殖路内は試験管の中のような空洞には

なっておらず、むしろ精子にとっては入り組んだ迷路のように見えているはずである。眼や耳を持たない精子が迷路を潜り抜けて、どのように卵子を見出しているのだろうか。ホヤではステロイド性のケモアトラクタントが同定され精子の走化性に働いていることが明らかにされた¹⁰⁾。哺乳類の精子も走化性があることを示唆する報告が出ている。ヒト¹¹⁾やマウス¹²⁾の精子は進むべき方向を匂いで決めているのかもしれないが、雌性生殖路、あるいは卵子自身の発する何が精子に走化性をもたらすのかは不明である。

精子はマッチ箱の中に入っているマッチのようなものである。精巣内でたくさん産生されるが、それが精巣上体に移されてそこで不活性な状態のまま必要になるまで蓄えられている。射精されると雌性生殖路内に入ったという何らかの信号が伝わりマッチの頭の温度が発火点に近づくように精子も活性化される。これは昔から受精能獲得現象(capacitation)と呼ばれている反応であるが生化学的にも、精子膜表面からのコレステロールやその他の物質の放出やそれにとともなう呼吸・解糖能の上昇などいろいろな変化が精子に起こることが知られている。しかし何がcapacitationにとってもっとも重要な変化であるのかは解明されていない。capacitationの研究が難しい一因として、精子は必ずしも均一な集団ではないことが挙げられる。射精されるたくさんの精子の中で受精に関わるものは極めて限られており、大半はただ存在しているだけのようにも見える。一見同じに見える精子もそれぞれがかなり異なった生理機能を持っている。それでありながら、精子のバイオロジーを研究する時はほとんどの場合、精子全体をひとつの集団として扱わざるを得ない。これが精子を研究する上で大きなネックになっている。

受精能を獲得した精子は頭部の先端部に存在するリソソーム系の酵素が詰まっている先体(acrosome)と呼ばれる袋状組織の先体外膜とその外側にある細胞膜が融合して先体反応(acrosome reaction)と呼ばれる反応を起こす

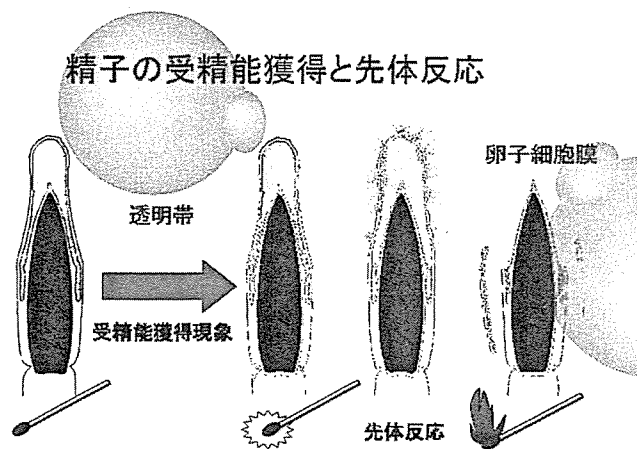


図2 精子の先体反応と卵子との相互作用

精巣上に蓄えられている精子は代謝能は低く抑えられており頭部には先体と呼ばれる細胞小器官が存在する。雌性生殖路内に入ると活発に運動をはじめ先体部分を消失することによって受精可能となるが、活性化された状態は長くは続かないと考えられている。

(図2)。この反応により、マッチが発火するように精子の先体部分から先体に含まれる酵素であるヒアルロニダーゼを放出しヒアルロン酸に囲まれた卵丘細胞の層を通過し、また先体からタンパク質分解酵素であるアクロシンを放出し、それが糖タンパク質からできている透明帯を溶かして進入し、精子が卵子と出会うというのが定説であった。しかし、後に述べるように現在の図式は異なってきている。

モルモットなどは非常に大きな先体部分を持っているので先体反応の様子を観察することができるがマウスやヒトの精子の先体部分は小さいために先体反応を起こしたのかどうかを光学顕微鏡で区別することは難しい。我々はオワンクラゲ由来のGFP蛍光タンパク質を先体部分で発現させるようなトランスジーンを持つトランスジェニックマウスを作製している。この精子を使うと、先体反応を起こす前の精子では先体部分がきれいな蛍光を発するので精子の先体の様子を生きたままで観察することができる。このようなマウスは研究用動物資源として理化学研究所のバイオリソースセンターや熊本大学のCARDからB6; C3 Tg(acro3-EGFP)01Osb, またはC57BL/6-Tg(CAG/Acr-EGFP)C3-N01-FJ002Osbという名前で頒布されている^{脚注)}。このようなマウスからの精子はセルソーターで分析することで先体反応精子の割合を容易に算定することができ、先体反応が起こる様子をリアルタイムで観察することも可能である¹³⁾。先体反応が起こるとGFPは3秒以内に拡散してなくなってしまうことが確認されたが、同じ先体内に存在する物質でも、時間がたたないと拡

散していかないものもあり、先体反応の仕組みは単純なall or noneの状態ではなく、中間型のものが存在することが示唆されている。卵子との相互作用はこのような遷移型先体反応精子を考慮に入れなければならないのかもしれない¹⁴⁾。

3. 卵子と精子の相互作用—旧セオリーの破綻

精子が卵子とどのような相互作用をするのかについてはこれまでに多くの報告がなされている。たとえば、精子の持つガラクトシルトランスフェラーゼが酵素としてではなく、接着因子として卵子の透明帯や卵子の細胞膜への接着をつかさどっているという説が唱えられていた。この説は抗体の添加やリガンドあるいは酵素活性阻害剤の添加などによる状況証拠により積み上げられてきたものである。1997年にShurらのグループにより、ガラクトシルトランスフェラーゼ(beta 1,4-galactosyltransferase)欠損マウスが報告された¹⁵⁾。精子に若干の受精能の低下が認められるとはいうものの、ガラクトシルトランスフェラーゼを欠損した雄は不妊にはならなかった。しかし、Shurらは精子の膜上にはガラクトシルトランスフェラーゼ以外にSED1というタンパク質も存在しており、これが透明帯との結合に働いていると報告し¹⁶⁾、ついでSED1欠損マウスを報告した¹⁷⁾。しかしながらSED1欠損マウスの雄も若干の受精能の低下が認められたものの、必須の因子であるとは言えなかった。

それを数年さかのぼった1994年に馬場らは、精子が透明帯を通過するのに必要であると考えられていた精子先体内の酵素、アクロシンを欠損させたマウスを作製したところ、若干の遅れは見られるものの、精子はアクロシンの助けを借りずに透明帯を通過できることが発見された¹⁸⁾。このことはAdhamらによっても再確認されている¹⁹⁾。馬場らはアクロシンノックアウトマウスの精子にもなお残存するタンパク質分解酵素があることを見出し、マウス精子にはアクロシン以外にも精巣特異的なセリンプロテアーゼであるTESP1からTESP5²⁰⁾を報告している。これらの酵素群が存在するのでアクロシンを欠損しても別の酵素がこれを補うのであろうと考えられているが、これらの酵素のうち、主役がいるのか?あるいはこれらを総合した酵素活性があればよいのかなどについては現在分かっていない。

一方、Mylesらはモルモット精子の膜上に存在するPH-20が受精の前で精子上の存在部位を変化させたり、PH-20と反応するモノクローン抗体3種のうちの2種が精子の透明帯への結合を阻害したりすることからPH-20が透明帯結合因子であることを報告していた²¹⁾。1993年には、ヘビ毒を研究していたグループがPH-20はヒアルロニダーゼであることを発見した²²⁾。その後、サルではアクロシンではなくPH-20が透明帯を通過する役割を担っ

脚注) (<http://www.brc.riken.jp/lab/animal/en/>)

ている²³⁾との論文が発表された。そこで、馬場らはPH-20を欠損させたマウスを作製したが、雄の妊孕性にはほとんど影響が見られなかった²⁴⁾。

受精に必要な因子ではないかと思われた遺伝子をノックアウトしてもほとんど何も起こらないという物語はまだ存在する。たとえばファティリンはもともとPH-30と呼ばれるモルモット精子に対するモノクローン抗体と反応する抗原で、PH-30抗体は精子と卵子の融合を強く阻害する働きがある。その後、抗原の遺伝子がクローニングされ、配列中にはウイルスの融合ペプチドに似た配列や、インテグリン結合配列があることなどを状況証拠として精子の融合タンパク質ファティリンと命名されNatureに報告された²⁵⁾。1998年になり、同じグループはファティリンを形成するADAM1/ADAM2ヘテロダイマーのうちのAdam2遺伝子を欠損したマウスを作製したが、このマウスは不妊になるものの、その重要な作用点は融合の段階ではなく、それよりも前の精子が透明帯に結合する部分がうまく機能しないため、透明帯を通過できないことが明らかにされた²⁶⁾。

これまでの受精研究において大切な役割を持つと提唱されてきたさまざまな因子は、どれも抗体やリガンド、あるいは酵素阻害剤などの添加により受精阻害作用を示すという証拠により同定されてきたものばかりである。そのうちの代表選手のほとんどがノックアウトマウスの解析により存在しなくても受精にたいした影響がでないことや、予想されていたフェノタイプとは全く異なる役割を持っていることがわかったことになる。これまでの研究のいきさつを捨てて、この結果を冷静に受け止めると、まだノックアウトされていない他の因子の重要性についても、同様に赤信号がともされたことになる。受精のメカニズムの図式からノックアウトマウスを使用して受精への関与が明らかにな

ったものだけを残すことにすると、これまで報告されている因子群はほぼ全滅ということになり、かくして旧セオリーの崩壊が起こった。

4. 卵子と精子の相互作用—新セオリーの台頭

1) 精子と透明帯の相互作用

まともに見える精子がありながら、受精に問題がある精子ができるという例は、1997年に我々が発表したカルメジンノックアウトマウスが最初である。カルメジンをノックアウトしたマウスは正常な運動性を持つ精子を正常量産するが、雄は不妊である。なぜ不妊になるのかを知るために体外受精を行ったところ、カルメジンをノックアウトしたマウスからの精子は透明帯に結合できずに、透明帯に当たっても跳ね返されている様子が観察された(図3)。これでは体外受精がうまくいかないのは当然である。では、カルメジンが精子と透明帯との結合を直接担っているのであろうか? 答えは否である。カルメジンは全身の組織で発現している分子シャペロンであるカルネキシンとよく似た構造を持っており、精巣の中でのみ発現される精巣特異的シャペロンと考えられる。カルメジンはカルネキシンと同様に膜結合型の分子シャペロンであり、その存在部位はER膜上に限定される。精子が成熟してゆく過程でさまざまな遺伝子がシャットダウンされ、タンパク質合成能もなくなってゆき、ついには精子からERは消失してしまう。このときカルメジンも同時に消失する。従って、野生型の精子であろうともカルメジンは精子膜上には存在していない。従って、カルメジンが直接、透明帯との結合に関わっている可能性はない。カルメジンをノックアウトすることにより、精子から受精能力が消失するのは、精子の細胞膜上で透明帯との反応に関わるタンパク質が、うまく折り畳まれないことが原因となり、精子上に提示されないた

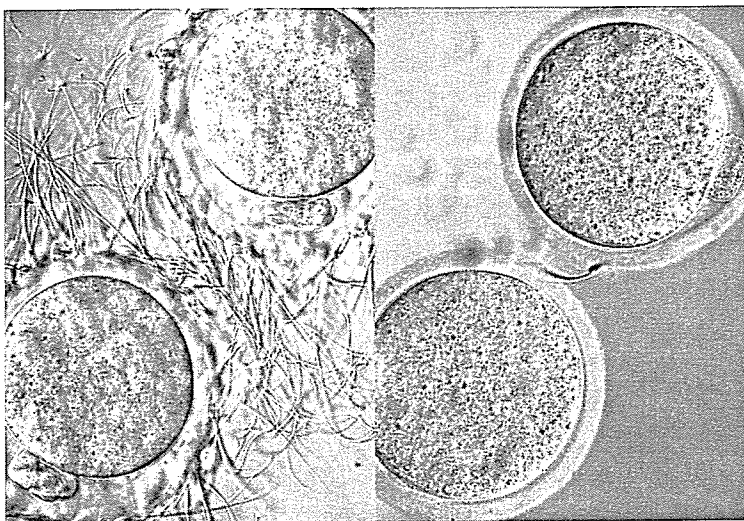


図3 カルメジンをノックアウトすると雄は不妊になる

左は野生型の精子で体外受精した様子である。透明帯にたくさんの精子が結合しているのがわかる。右はカルメジンをノックアウトしたマウスからの精子を媒精した場合である。このマウスからの精子は活発に運動しており、野生型と同数を加えたにもかかわらず透明帯に結合する精子はほとんど見当たらない。