

ライブイメージングを基盤とした細胞膜接着因子の  
新規解析法の開発と受精因子群の解析

令和3年度博士論文

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻  
機能調節学講座 生殖分子情報学グループ

中島 耕大

## 目次

1. 要旨.....	3
2. 序論.....	4
3. 材料と方法.....	8
(1) 培養細胞及びその培養条件.....	8
(2) BHK 細胞に導入するための DNA コンストラクト.....	8
(3) DNA 導入試薬 jet PRIME (polyPlus-transfection)を用いた DNA 導入.....	13
(4) 遺伝子の発現誘導.....	14
(5) 免疫蛍光染色.....	14
(6) pH パルス実験.....	15
(7) 顕微鏡観察及び撮影画像処理.....	15
(8) Chimera を用いたタンパク質の立体構造モデリング.....	15
(9) MEGAX を用いた IZUMO1 と JUNO の分子系統解析.....	16
(10) トランスクリプトームデータを用いた被子植物の受精関連因子の探索.....	16
(11) AVEXIS assay.....	17
4. 結果.....	18
(1) ライブイメージングによる細胞間接着の解析.....	18
(2) 接着因子の可視化による分子動態解析.....	19
(3) 変異体を用いた IZUMO1・JUNO の集積及び移行の解析.....	20
(4) LIAM assay を用いた IZUMO1-JUNO の種特異的な相互作用の解析.....	22
(5) 融合因子 GCS1/HAP2 の融合機構解析.....	24
(6) 接着因子及び融合因子の共導入による機能解析.....	26
(7) 新規配偶子接着因子の探索.....	27

5. 考察.....	30
5-1. LIAM assay を用いた接着因子の解析.....	30
5-2. 融合因子 GCS1/HAP2 及び CNIH の共導入実験 .....	32
5-3. 融合因子 GCS1/HAP2 の pH 変化に伴う融合機構の解析 .....	33
5-4. 接着因子及び融合因子の共導入による機能解析.....	33
5-5. 雌性配偶子における接着および融合に関わる新奇鍵分子の探索.....	35
6. 参考文献 .....	37
7. 謝辞.....	43
8. 図・表 .....	45

## 1. 要旨

雌雄配偶子の接着・融合は、受精の中心的な過程であるが、配偶子がどのような機序で接着・融合を遂げるのか未だ不明な点が多い。いくつかの種で接着因子や融合因子といった受精因子群は同定されはじめているが、それらのパートナー分子の存在や、どのような分子間相互作用を経て細胞膜の接着や融合が起こるのかは、ほとんど明らかとなっていない。そこでライブイメージングを基盤とした接着因子を解析する実験系 (Live Imaging-based Adhesion Molecule assay; LIAM assay)を開発した。まず、Valansiら (2017)が確立した、動物培養細胞への融合因子導入による細胞融合系に着目し、ライブイメージングによって、細胞融合を可視化した。そして、融合因子の代わりに、細胞間接着を調べるために、コントロールとして E-cadherin を導入したところ、接触面で分子の集積が見られた。次に、配偶子間接着因子ペアの IZUMO1・JUNO を導入したところ、接触面で一時的な分子の集積が検出された。また、集積した IZUMO1 及び JUNO は、隣接した細胞へと移行した。集積と移行は、IZUMO1 と JUNO の相互作用に重要なアミノ酸に依存することがわかった。さらに、LIAM assay を用いて、マウス、ヒト、ハムスター、ブタの IZUMO1・JUNO の種特異性を調べた。IZUMO1・JUNO の集積及び移行は、同種の組み合わせで観察され、異種でも特定の組み合わせで観察された。このことから、IZUMO1・JUNO は、種間で互換性がある場合があることが示唆された。本研究の「装置を細胞内で組み上げる構成的なアプローチ」は、あらゆる生物の受精因子の解析に応用可能であり、動植物を広く扱った研究を展開していくことが可能となる。このため、真核生物の雌雄の配偶子が受精においてどのような分子間の時空間的相互作用により接着・融合するのか解明が進み、基礎生命科学における重要な研究成果となることが期待される。

## 2. 序論

有性生殖を行う生物は共通して、性の異なる配偶子間の合一により次世代を残す。Ernst Mayr による「生物学的種概念」では、種とは相互に交配しあう自然集団の集合体であり、他のそのような集合体とは生殖的隔離されているものと定義されている (Mayr, 1942)。このような生殖的隔離は種特異的な生殖が行われているからであり、その生殖過程の一部である配偶子の認識および融合を理解することは、個体の誕生を理解して行く上で重要である。有性生殖の最終過程である受精は、配偶子で発現する受精因子による認識、接着、融合によって完了する。

例えば、哺乳類では、卵の透明帯を通過した精子は頭部に局在する IZUMO1 と卵膜に局在する JUNO の相互作用によって、受精に至ると提唱されている (図 1A; Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014; Inoue et al., 2015)。受精過程のなかでも膜融合に関する知見は乏しく、IZUMO1 と JUNO は精子と卵の接着を媒介する分子ペアである。IZUMO1 と JUNO は結晶構造が報告されており、相互作用面のアミノ酸配列の保存性に応じて、種特異的な結合をすると示唆された (Ohto et al., 2016; Aydin et al., 2016)。以上の知見から、これまでに IZUMO を中心とした精子・卵の細胞融合を説明する 3 つの仮説が提唱されている (Aydin et al., 2016)。1) IZUMO-JUNO の相互作用が細胞膜同士を近接させ融合に至る“ジッパー仮説”、2) 未知の卵側受容体が、JUNO との相互作用後に「二量体化し構造変化した IZUMO」と相互作用し融合に至る“未知受容体仮説”、3) IZUMO-JUNO 複合体が足場として未知の融合因子をリクルートする“足場仮説”。また、近年、精子で発現する SPACA4/6、TMEM95、SOF1、FIMP、DCST1/2 といった分子が哺乳類の受精において必要であることが報告されている (Fujihara et al., 2021; Barbaux et al., 2020; Noda et al., 2020; Fujihara et al., 2020; Lamas-Toranzo et al., 2020; Inoue et al., 2021)。

一方、被子植物では二つの精細胞が雌の配偶子である卵細胞および中央細胞と受精する (図 1B)。この受精様式を重複受精といい、Navashin (1898)、Guignard (1899)がユリ科の植物を用いて発見した。被子植物の受精過程では、花粉は胚珠に精細胞を提供するために花粉管を伸長させ、胚珠に到達した花粉管は胚珠内で花粉管の先端を破裂し、精細胞を放出する。放出された精細胞は接着因子である GEX2 (Gamete EXpressed 2)及び融合因子である GCS1/HAP2 (Generative Cell Specific 1, HAPLESS2; HAP2 とも呼ばれる)の作用により卵細胞及び中央細胞と受精する (Mori et al., 2006, 2014)。GEX2 は Ig-like domain である Filamin-like domain をコードしていて、GEX2 における Filamin-like domain の機能は依然としてわかっていないが、多くの顕花植物で保存されている (Mori et al., 2014)。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)には GEX2 のオーソログは存在しないが、Filamin-like domain を持つ FUS1 が plus-type cell に局在している (Misamore et al., 2003)。また、FUS1 は、minus-type cell に局在する MAR1 (Minus Adhesion Receptor 1) と相互作用することで、細胞間接着を引き起こしている (Pinello et al., 2021)。

GCS1/HAP2 は植物だけでなく、粘菌 (*Physarum polycephalum*)、マラリア (*Plasmodium falciparum*)、一部の無脊椎動物でも発見されている (Steele and Dana, 2009)。精細胞膜に局在した GCS1/HAP2 が卵細胞膜に存在する未知のパートナー分子と相互作用すると考えられていた (Bleckmann et al., 2014)。しかし GCS1/HAP2 は、クラミドモナスやマラリアでは、雄性配偶子でのみ働くが (Liu et al., 2008)、7 つの性があるテトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*)では融合する両方の配偶子に存在している (Cole et al., 2014; Pinello et al., 2017)。Valansi ら (2017)は、哺乳類の BHK (Baby Hamster Kidney)細胞に GCS1/HAP2 や、センチュウ (*Caenorhabditis elegans*)の体細胞融合因子 EFF-1 (Mohler et al., 2002)を発現させることで、細胞融合を促進する系を開発した。この系を用いて、融合する細胞の両者に GCS1/HAP2 あるいは EFF-1 が存在する場合に融合率が相乗的に高まることを示し、雌雄間における融合因子の相互作用を提唱した (Avinoam et al., 2011; Valansi et al., 2017)。さらに、Jennifer ら (2017)や Fédry ら (2017)も異なる手法および生

物を用いて、GCS1/HAP2 が配偶子融合に関わり、 Dengue・ジカ・西ナイル熱などのウイルスで見つかった Class II 融合タンパク質 (Klein et al., 2013; Podbilewicz, 2014) と構造が類似していることを示した。特に、domain II に含まれている疎水性の Loop region は膜融合において重要であると提唱された。様々な生物種で GCS1/HAP2 や GEX2 (および、それらと共通のドメインをもつ関連タンパク質) が存在することは、配偶子融合機構における動植物間での類似性や関連性を示唆しており、動植物の共通性に着目することで、動植物の有性生殖の基本原理が見えてくると考えられる。

受精因子における種特異的な相互作用を明らかにすることは、生殖的隔離を理解するために重要である。数十年前から哺乳類では、種特異性が調べられている。Yanagimachi らは、ゴールデンハムスターの zona pellucida が除去された卵母細胞が、さまざまな種の精子と受精できることを発見した (Yanagimachi et al., 1976)。雌雄間の相互作用に関わるタンパク質が、種特異的な相互作用に関わると考えられている。Zona pellucida グリコプロテイン ZP2 は、マウスとヒト間での種特異的な精子と卵の結合に必要である (Avella et al., 2014)。また、GPI アンカータンパク質の Bouncer は、メダカとゼブラフィッシュ間での受精に必要であることが示された (Herberg et al., 2018)。AVidity-based Extracellular Interaction Screening (AVEXIS) assay での、細胞外タンパク質相互作用によって、マウスでの IZUMO1 と JUNO の相互作用が調べられ、さらにハムスターの JUNO は、マウス、ヒト、ブタの IZUMO1 と相互作用することも示唆された (Bianchi et al., 2014; Bianchi and Wright, 2015)。この結果は、先行研究と一致していた (Yanagimachi, 1984)。

このように雌雄配偶子の接着および融合は、受精の中心的な過程であるが、配偶子がどのような機序で接着し、融合を遂げるのかは未だ不明な点が多い。遺伝学的手法を中心とした必須因子の同定及びその機能解析によって、いくつかの種で接着因子や融合因子といった受精因子群は同定され始めているが、それらのパートナー分子の存在や、どのような分子間の時空間的相互作用を経て細胞膜の接着や融合に至るのかは、ほとんど明らかとなっていない。受精の仕組みを理解するためには、さらなる受精因子の同定の

みならず、既に同定された分子の作動原理の解明も必要不可欠である。近年、構成的アプローチにより膜タンパク質の分子機能が調べられている。例えば、上述した Valansi らの実験に加え、筋肉特異的なタンパク質 Myomaker と Myomerger (Myomixer もしくは Minion と呼ばれる)を線維芽細胞に共導入すると、筋細胞の膜融合を引き起こされることがわかった (Quinn et al., 2017)。また、動物培養細胞内で、シロイヌナズナの CORNICHON HOMOLOG (CNIH)が、小胞体のグルタミン受容体様チャネルをソーティングするために重要であることが示された (Wudick et al., 2018)。受精因子群の機能を知る上で、このような人為的に創って理解する構成的なアプローチは、受精因子群が具体的にどのように作動しているのかを調べるために優れた方法であると考えられる。ライブイメージングを併用することにより、細胞膜の接着と融合における受精因子群の作動状態を、高い時空間分解能でリアルタイムに解析することができる。

そこで本研究では、接着や融合に関わる受精因子の挙動や機能を明らかにするために、培養細胞を用いたライブセルイメージングにより、発現させた受精因子群の機能をリアルタイムに解析する実験系を開発することを目的とした。Valansi らが開発した Fusion assay を改良し、被子植物の融合因子 GCS1/HAP2、接着因子 GEX2、哺乳動物の接着因子と考えられる IZUMO1-JUNO の分子ペアやセンチュウの体細胞融合因子 EFF-1 (GCS1/HAP2 に立体構造が類似)など、広く解析に用いた。インキュベーターを搭載したスピニングディスク式共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ライブイメージングすることで細胞融合や細胞接着を撮影した。そして、導入した接着因子を調べる実験系の Live Imaging-based Adhesion Molecule (LIAM) assay を開発した。LIAM assay は、配偶子間接着因子 IZUMO1 と JUNO の種特異的な相互作用を調べるために有用であることが示された。また Liam assay でのスクリーニングを視野に、未同定なシロイヌナズナの配偶子接着因子 GEX2 のパートナー分子の探索を進めた。



### 3. 材料と方法

#### (1) 培養細胞及びその培養条件

シリアンハムスターの腎由来細胞の BHK-21 細胞、ヒトの子宮頸癌細胞由来の HeLa 細胞、そして、アフリカミドリザルの腎由来細胞の COS-7 細胞を培養した。これらの細胞は D-MEM(+)を培養液として用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件下で静置して培養した。以下に、各培養液の組成を示す。

#### D-MEM (+)組成

10% FBS	50 ml
D-MEM (High glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (Wako)	500 ml

50 ml ずつ分注して 4°Cで保存

細胞の培養には Costar 6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plate (以下 6 ウェルディッシュと表記)を用い、細胞が 80%コンフルエントになった段階で継代した。付着細胞の場合、FBS を含まない D-MEM を 1 ウェルあたり 500  $\mu$ l 加え、トリプシン阻害物質を洗い流した。その後、0.05% Trypsin-EDTA をウェルあたり 500  $\mu$ l 加え、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件下で静置した。細胞がディッシュから剥がれたら、2 ml の D-MEM (+)を加えて、トリプシンを不活性化し、懸濁した。懸濁液から 250  $\mu$ l を D-MEM (+)2 ml に加え、継代した。

#### (2) BHK 細胞に導入するための DNA コンストラクト

Prime STAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa)を用いて、以下の反応溶液組成及び反応条件で増幅した。電気泳動法により、増幅した DNA 断片や制限酵素処理をした DNA

断片を分離し、ゲルを切り出し、それから DNA を抽出した。作製したプラスミド、プライマーを表 1~3 に示した。

#### PCR 反応溶液の組成

Prime STAR GXL DNA Polymerase	0.4 $\mu$ l
Prime STAR GXL DNA Buffer	4.0 $\mu$ l
dNTP mix	1.6 $\mu$ l
Forward Primer	0.6 $\mu$ l
Reverse Primer	0.6 $\mu$ l
Template DNA	0.5 $\mu$ l
D.W.	12.3 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

#### PCR 反応条件

98°C	2 分
98°C	10 秒
60°C	15 秒
68°C	1 分/kb
68°C	4 分
16°C	$\infty$

抽出したインサート及びベクターDNA断片を Gibson assembly によってつなげるため、以下の組成で混合し、15 分間、50°Cでライゲーションした。

#### Gibson assembly 組成

Insert	3.0 $\mu$ l
Vector	2.0 $\mu$ l
Gibson assembly Mixture	5.0 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

ただし、pKPN247、pKPN248、pKPN249、pKPN276、pKPN277、pKPN278、pKPN279、pKPN282、pKPN283、pKPN284、pKPN285、pKPN286、pKPN287、pKPN288、pKPN289、pKPN290、pKPN291、pKPN292、pKPN293、pKPN294、pKPN295、pKPN296、pKPN297、pKPN298、pKPN299 に関しては、DNA リガーゼによってつなげるため、以下の組成で混合し、一晩、16°Cでライゲーションした。

#### ライゲーション組成

Insert	2.0 $\mu$ l
Vector	1.0 $\mu$ l
Ligation Mixture	3.0 $\mu$ l
Total	6.0 $\mu$ l

また、IZUMO1 W148A-Venus、mCherry-JUNO W62A に関しては、セルフライゲーションによって、つなげるため、以下の組成で混合し、一晩 16°Cでライゲーションした。

#### セルフライゲーション組成

---

PCR 産物	8.0 $\mu$ l
T4 Ligase Buffer	1.0 $\mu$ l
T4 Ligase	0.5 $\mu$ l
T4 PNK	0.5 $\mu$ l

---

Total	10 $\mu$ l
-------	------------

コンピテントセル (Mach) 50  $\mu$ l にライゲーションした産物を 5  $\mu$ l 添加し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、45 秒、42°C でコンピテントセルをヒートショックし、再び氷上で 3 分間インキュベートした。900  $\mu$ l の LB を加えて、37°C でインキュベートした。4000rpm、2 分、室温で遠心し、上清を取り除いて 100  $\mu$ l だけ残した。懸濁して、抗生物質入り LB プレートに塗布し、一晚 37°C でインキュベートした。シングルコロニーから以下の反応溶液組成及び反応条件で増幅した。

#### コロニーPCR 反応溶液の組成

---

Go Taq Green Master Mix	7.5 $\mu$ l
Forward Primer	1.0 $\mu$ l
Reverse Primer	1.0 $\mu$ l
D.W.	5.5 $\mu$ l

---

Total	15 $\mu$ l
-------	------------

#### PCR 反応条件

---

94°C	2 分
94°C	30 秒
62°C	30 秒
72°C	45 秒
72°C	4 分
16°C	∞

---

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて、以下の反応溶液組成及び反応条件でシーケンス反応を行い、名古屋大学遺伝子実験施設のシーケンスサービスにて、プラスミドの塩基配列を確認した。

#### シーケンス反応溶液の組成

---

Big Dye	0.25 $\mu$ l
BigDye Terminator v3.1 Buffer	1.0 $\mu$ l
Primer	1.0 $\mu$ l
Plasmid	0.75 $\mu$ l
D.W.	2.0 $\mu$ l

---

Total	5.0 $\mu$ l
-------	-------------

#### PCR 反応条件

---

96°C	5 分
96°C	10 秒
50°C	5 秒
60°C	3 分
16°C	∞

---

### (3) DNA 導入試薬 jet PRIME (polyPlus-transfection) を用いた DNA 導入

DNA を導入する前日に、細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml の密度で Costar 24 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plate に播種した。24 時間後に、以下の DNA 導入溶液の組成で、混合した後、10 秒 Vortex し、10 分間室温でインキュベートした。インキュベート後、培地に DNA 導入溶液を添加した。インキュベート 4 時間後に、D-MEM を 1 ウェルあたり 500  $\mu$ l 加え、トリプシン阻害物質を洗い流した。その後、0.05% Trypsin-EDTA をウェルあたり 100  $\mu$ l 加え、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件下で静置した。細胞がディッシュから剥がれたら、500  $\mu$ l の D-MEM (+) を加えて、トリプシンを不活性化し、懸濁した。懸濁液から 200  $\mu$ l を、D-MEM (+) 200  $\mu$ l が入った Coverglass Chamber 8 Well (IWAKI; 以下、8 ウェルディッシュと表記) に播種した。また、異なる DNA が導入された細胞を混合する際は、各ウェルから懸濁液を 100  $\mu$ l とり、D-MEM (+) 200  $\mu$ l が入った 8 ウェルディッシュに播種した (以下、本手法を Mixing assay と記す)。

#### DNA 導入溶液

---

jetPRIME Buffer	50 $\mu$ l
jetPRIME	1.5 $\mu$ l
各 Plasmids	100 ng

#### (4) 遺伝子の発現誘導

融合因子の過剰発現は細胞や組織に対して、毒性を示す場合があるため、正確な時間や場所において発現を制御しなければならない。そこで、BHK 細胞における融合因子の発現を mifepristone による誘導系である Gene Switch System (Invitrogen)を用いた(Wang et al., 1994)。発現を制御するプラスミドの pSwitch には、GAL4 UAS の下流に、酵母の DNA 結合ドメイン、プロゲステロン受容体、ヒト p65 活性ドメインが座乗しており、転写、翻訳の後に、この複合体が発現する。この複合体は、mifepristone が加わると、二量体を形成し、誘導型プラスミドの pGENE ベクターの GAL4 UAS に結合する。正のフィードバックによって、目的の遺伝子を発現させる。

(3)で記した DNA 導入方法に従って、8 ウェルディッシュに播種した 20 時間後に、終濃度が  $10^{-4}$  mM になるように mifepristone を添加した。

#### (5) 免疫蛍光染色

IZUMO1、JUNO、CD9 の局在を調べるために、免疫蛍光染色をおこなった。(3. 材料と方法 (3) を参照)に従って、各遺伝子を発現させた。培地を 4% PFA/PBS に置換し、37 °C、3 分間インキュベートして、細胞を固定した。次に 0.5% TritonX に置換し、室温で 10 分間インキュベートすることで、透過処理をおこなった。一次抗体には、抗 IZUMO1 抗体 (KS64-125)、抗 JUNO 抗体 (ab228451; abcam)、抗 CD9 抗体 (KMC8.8; Santa Cruz)、を添加し、3 時間室温でインキュベートした。一次抗体を PBS で洗い流し、二次抗体として Anti-rat Alexa 488 もしくは 594 を添加し、1 時間インキュベートした。二次抗体を洗い流し、顕微鏡で観察した。

## (6) pH パルス実験

(3)で記した DNA 導入方法に従って、8 ウェルディッシュに播種した 20 時間後に、培地を PBS (pH 5.3)に置換して、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件下で 4 分間静置した。その後、D-MEM (+)に再度、置換した。

## (7) 顕微鏡観察及び撮影画像処理

Cell Voyager CV 1000 (横河電機)は、スピニングディスク式共焦点顕微鏡で、温度、CO<sub>2</sub> 濃度を制御可能な顕微鏡である。光源として 405 nm、488 nm および 561 nm の LD レーザーを用いた。三つの波長ともにレーザーパワーを 10.0%、Exposure を 100 ms、Gain を 100%とした。対物レンズは 40x のドライレンズ(20×UPLSAPO, NA 0.75, WD 0.60 mm; 40×UPLSAPO, NA 0.95, WD 0.18 mm; オリンパス)および 100x の油浸レンズ (100×UPLSAPO, NA 1.40, WD 0.13 mm; オリンパス)を用いた。6 分間隔で 12 時間撮影し、Z 軸方向に 10 μm を 5 枚の光学切片として観察した。

スピニングディスク式共焦点スキャナユニット CSU-W1 (横河電機)及び EMCCD (iXON3 888; Andor)を搭載した倒立型蛍光顕微鏡 (IX-83; Olympus)を用いて、免疫蛍光染色をおこなった。光源として、445nm、488nm、561nm のレーザー、対物レンズに 60 倍シリコーン浸レンズ (60xUPLSAPO, NA 1.30, WD 0.3 mm; Olympus)を用いた。

得られた画像は、Fiji (<http://fiji.sc/>)によって、明るさやコントラストを調整した。また、輝度の測定やトラッキングを行った。

## (8) Chimera を用いたタンパク質の立体構造モデリング

マウス IZUMO1、マウス SPACA6、シロイヌナズナ GCS1/HAP2、クラミドモナス GCS1/HAP2、センチウ EFF-1、デングウイルス E glycoprotein を、タンパク質や核酸などの生体高分子を表示する 3 次元ビューワープログラムである Chimera を用いて、立体構造モデリングした。モデリングに用いたアミノ酸配列は以下の通りである：



mouseIZUMO1 (Uniprot accession no. Q9D9J7); mouseSPACA6 (alphafold); *Arabidodopsis thaliana* GCS1/HAP2 (A0A1U7QS27); *Chlamydomonas reinhardtii* GCS1/HAP2 (A0A287BMD8); *Caenorhabditis elegans* EFF-1 (A0A287BMD8) ; Dengue virus E glycoprotein (1OK8)の配列を用いた。

### (9) MEGAX を用いた IZUMO1 と JUNO の分子系統解析

IZUMO1 及び JUNO のアミノ酸配列をもとに、MEGAX を用いて分子系統解析を行った。系統樹の作製は、Neighbor-joining 法で作成し、Bootstrap 値は 1000 回サンプリングで行った。IZUMO1 のアミノ酸配列は以下の通りである: mouse, *Mus musculus* (Uniprot accession no. Q9D9J7); human, *Homo sapiens* (Q8IYV9); golden hamster, *Mesocricetus auratus* (A0A1U7QS27); pig, *Sus scrofa* (A0A287BMD8), and opossum, *Monodelphis domestica* (H9H653)。JUNO のアミノ酸配列は以下の通りである: mouse, *M. musculus* (Q9EQF4); human, *H. sapiens* (A6ND01); golden hamster, *M. auratus* (A0A1U7RC80); pig, *S. scrofa* (F1STK4), and opossum, *M. domestica* (F7AHC3)の配列を用いた。

### (10) トランスクリプトームデータを用いた被子植物の受精関連因子の探索

本研究室が所有するシロイヌナズナおよびトレンニア(*Torenia fournieri*)における雌性配偶子のトランスクリプトームデータの卵細胞・中央細胞・助細胞の発現量に対して、統計解析ソフト R (<https://www.R-project.org/>)を用いて、Tukey-Kramer test により、多重比較を行った。有意水準 5%とした。

また、絞り込む候補遺伝子に、シグナル配列があるかどうかを調べるために、タンパク質のシグナル配列の切断部位を予測する SignalP を用いて行った(Petersen et al., 2011)。さらに、膜貫通ドメインの有無を調べるために、TMHMM (Transmembrane Hidden Markov Model)を用いて、膜貫通ドメインを予測した (Krogh et al., 2001)。候補遺伝子の構造の

予測を、Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0)を用いて行った (Kelley et al., 2016)。

### (11) AVEXIS assay

AVEXIS assay とは、五量体の目的タンパク質が、候補遺伝子を発現している細胞に対して、相互作用するかどうかを検証する実験系である (Bianchi et al., 2014)。IZUMO1 五量体と GEX2 五量体を精製するためのコンストラクトを作製した。CD200-Cd4d3+4-COMP-blac-3xFLAG-6his (Addgene71471; COMP は cartilage oligomeric matrix protein で、五量体の形成を引き起こす。blac は  $\beta$  ラクターマーゼであり、nitrocefin を加水分解することで、黄色から赤色へと呈色反応を引き起こす)を NotI 及び AscI で制限酵素処理し、CD200 領域を IZUMO1 もしくは GEX2 の細胞外ドメインに置き換えた。五量体を精製するために、HEK293F 細胞を 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件下で、Freestyle293 media 50 ml 中で震盪培養した (100rpm)。DNA 導入 1 日前に、 $2.5 \times 10^5$  cells/ml の密度で播種した。

(3. 材料と方法 (3) を参照) に従って、HEK293F 細胞 (浮遊細胞) に、IZUMO1 五量体もしくは GEX2 五量体プラスミドを 10  $\mu$ g 導入した。その後、5 日間、震盪培養を行った。培地を回収し、3000 g、20 分間遠心をし、上清を 0.22  $\mu$ M フィルターで濾過した。濾過した上清を HisTRAP FF (GE Health care) で精製した。さらに、精製した溶液を透析した。透析した溶液中に含まれるタンパク質の濃度を測定するために、nitrocefin 75  $\mu$ l に、透析した溶液を 25  $\mu$ l 加え、吸光度を測定した。続いて、相互作用を調べるために、(3. 材料と方法 (3) を参照) に従って、培養細胞にパートナー遺伝子を発現させた。発現後、五量体タンパク質を添加し、2 時間インキュベートした。インキュベート後、PBS で洗い流し、4% PFA/PBS で固定した。再度、PBS で洗い流し、一次抗体として抗 FLAG 抗体を添加し、1 時間インキュベートした。一次抗体を PBS で洗い流し、二次抗体として Anti-rabbit Alexa 488 を添加し、1 時間インキュベートした。二次抗体を洗い流し、顕微鏡で観察した。

## 4. 結果

### (1) ライブイメージングによる細胞間接着の解析

受精因子群の融合活性を調べるために、Valansi ら (2017)の実験手法を参考に、BHK細胞を用いて、ライブイメージングによる Fusion assay を行い、細胞が多核化する過程を映像として捉え、融合を評価することができた (中島 修士論文)。この実験系をもとに、哺乳類の接着因子と考えられる IZUMO1-JUNO の分子ペア (Inoue et al., 2015; Ohto et al., 2016; Aydin et al., 2016)の接着性を調べようと考えた。接着を評価するには、細胞が接着する前後の状態を含めた過程を観察する必要がある。従来の Cell aggregation assay や Cell adhesion assay では、細胞混合後の様子しか観察しておらず、接着を正しく評価できているのか判断が難しい。また、分子を直接可視化し、リアルタイムに観察することで、接着過程における分子の動態を追うことが可能となる。そこで、改めて、ライブイメージングにおける細胞接着の評価に適した細胞を選考した。BHK細胞、HeLa細胞、COS-7細胞に対して、ライブイメージングを行って、細胞の移動性をトラッキングし、接着が判別しやすい細胞の形態かどうかを調べた。3つの細胞株の中で、個々の細胞が接着せず、移動性の高いのは、BHK細胞だった (図2)。したがって、Fusion assay に引き続き、BHK細胞を用いて、接着を調べることにした。

IZUMO1-JUNO の分子ペアの接着性の検証に先立って、Ca<sup>2+</sup>依存的に細胞間接着を担う Cadherin をコントロールとして用いて、細胞接着を調べた。Cadherin 遺伝子のみの導入は、異なる細胞で発現した cadherin がホモフィリックな接着をする可能性があり、ヘテロフィリックな接着をする IZUMO1・JUNO のようなペア分子を導入することがない。GFP で標識した E-cadherin を細胞に導入すると、E-cadherin-GFP のシグナルは、接着前では細胞質中に均一に広がっていた (図 3A)。しかし、一時的に E-cadherin 発現細胞同士が接着すると、接触面に E-cadherin が集積した (図 3A, 7:30)。E-cadherin-GFP の

蛍光輝度は、細胞が接触している表面で特異的に高くなっていた（図 3B）。そして、細胞が離れると E-cadherin の集積も解消された（図 3A, 8:00）。このことから、接触面での分子の集積を指標に細胞接着の評価ができると示唆された。

## (2) 接着因子の可視化による分子動態解析

Cadherin を用いた実験では、培養細胞に 1 種類の遺伝子を導入して、ホモフィリックな接着を調べたが、ヘテロフィリックな分子による接着を調べるためには、少なくとも 2 種類の細胞を混合しなければならない。そこで、異なる遺伝子が導入された細胞を混合して観察する手法を確立した (3. 材料と方法 (3) を参照)。本手法を用いて、IZUMO1 と JUNO というヘテロフィリックな接着因子でも、隣接する細胞の接触面で一時的な集積が見られるのかを調べた。BHK 細胞へ IZUMO1 及び JUNO をそれぞれ導入し、4 時間後に混合した。20 時間インキュベートしたのちに、mifepristone を加えて、遺伝子の発現誘導をおこなった。IZUMO1 発現細胞と JUNO 発現細胞が接触する前は、各分子は細胞質内に広がっていた。しかし、接触し始めると、徐々に IZUMO1 分子が JUNO 発現細胞との接触面に集積し始めた (47% of contacting cells, n = 53; 図 4)。一方、JUNO の集積は見られなかった。さらに、IZUMO1 の集積が、隣接した IZUMO1 発現細胞と JUNO 発現細胞の相互作用によるものなのかを調べた。まず IZUMO1 と JUNO を共導入し、同一細胞内で同時に発現させた時、集積は見られなかった (0%, n = 63; 図 4C)。この時の IZUMO1 と JUNO の膜局在を、免疫蛍光染色によって調べた。IZUMO1 を抗体で標識したところ、透過処理の有無に関わらず、IZUMO1 は膜に局在していなかった(図 5; IZUMO1 が細胞膜に局在する例については図 7 を参照)。共結晶構造解析の結果より、IZUMO1 の  $\beta$ -ヘアピン領域が JUNO との結合に重要であることが報告されており (Ohto et al., 2016; Aydin et al., 2016)、 $\beta$ -ヘアピン領域欠損 IZUMO1 を作製し、 $\beta$ -ヘアピン領域欠損 IZUMO1 と JUNO の Mixing assay を行った。その結果、集積はほとんど見られ

なかった (7% of cases, n = 59; 図 4C)。また、哺乳類の配偶子融合に必要な雌側の因子として CD9 が報告されている (Miyado et al., 2000)。そこで、IZUMO1 の集積が CD9 によって制御されるのかどうかを調べた。IZUMO1 発現細胞と JUNO/CD9 発現細胞を混合したところ、IZUMO1 の集積や頻度に変化はなかった (44%, n = 62; 図 4C)。

以上より、本実験系は、導入した接着因子ペアの親和性による相互作用を可視化するアッセイとして有用であることが示唆された。この実験系を Live Imaging-based Adhesion Molecule (LIAM) assay と名付けた。

### (3) 変異体を用いた IZUMO1・JUNO の集積及び移行の解析

E-cadherin、IZUMO1、JUNO の発現が遺伝子誘導系である必要がないとわかったため、cytomegalovirus (CMV) promoter による非誘導系でスループットを上げ、実験を行った。誘導系の実験では、IZUMO1 の集積だけが観察されたが(図 4)、本実験では、IZUMO1 と JUNO の両方の集積が観察された (図 6)。IZUMO1 の集積は接触した細胞の 72%観察され (39/54; 図 6B)、一方 JUNO 集積は、接触した細胞の 37%観察された (20/54; 図 6B)。JUNO の集積が観察された時、接触している細胞で発現している IZUMO1 の集積も観察された。IZUMO1 と JUNO の集積率に違いがあったが、細胞膜に局在するタンパク質の量が違うためと考えられた。そこで、免疫蛍光染色を行うことで、細胞膜に IZUMO1 及び JUNO が局在しているのかを調べた。透過処理をしていない場合、IZUMO1 抗体及び JUNO 抗体によるシグナルは細胞膜に検出された (図 7)。一方で、透過処理をすると IZUMO1 抗体は、蛍光タンパク質 Venus と局在が一致しており、ER に局在していた (図 7A)。また、JUNO 抗体では、細胞膜と ER での局在が検出された (図 7B)。集積が IZUMO1 と JUNO の相互作用に関わるアミノ酸によるものなのかを調べるために、IZUMO1-JUNO の共結晶構造解析を元に、IZUMO1 と JUNO の変異コンストラクトを作製した。IZUMO1 の 148 番目のトリプトファン及び JUNO の 62 番目のトリプトフ

ファンが相互作用に重要であるため(Ohto et al., 2016; Aydin et al., 2016)、それぞれのトリプトファンをアラニンに置換した。IZUMO1 W148A 発現細胞と JUNO 発現細胞を混合すると、集積は観察されなかった (0% of 45 contacting cells; 図 6B)。また、IZUMO1 発現細胞と JUNO W62A 発現細胞を混合した時も、同様に観察されなかった (0% of 67 contacting cells; 図 6B)。

UniProt や AlphaFold といったデータベースに基づくと、SPACA6 はシグナル配列、Ig-like domain、N-linked glycosylation、膜貫通ドメインをもち、IZUMO1 と類似したドメイン構造を持つ (図 9)。また、SPACA6 は IZUMO1 と同様に精子の頭部のアクロソーマルキャップに局在する (Noda et al., 2020; Barbaux et al., 2020)。IZUMO1 の代わりに、酷似した特徴をもつ SPACA6 を用いて LIAM assay を行った。SPACA6 及び JUNO 集積は起こらなかった (図 6)。したがって、以上の結果より、集積は相互作用に重要なアミノ酸によることがわかった。

IZUMO1 の集積が見られた細胞の 38%で、IZUMO1 が接触している反対側の細胞に移行していることがわかった。いくつかの IZUMO1 や JUNO の輝点は、細胞が離れた後でも観察された (図 10)。IZUMO1 は接触した細胞の 27%で、JUNO 発現細胞に移行した。一方、JUNO は接触した細胞の 7.4%で、IZUMO1 発現細胞に移行した。この IZUMO1 及び JUNO 移行は、一方向性で、IZUMO1 もしくは JUNO のどちらかが選択的に移行した。IZUMO1 及び JUNO の移行は、IZUMO1 の集積後に観察された。また、この分子の移行も IZUMO1 と JUNO の相互作用に重要なアミノ酸によるものだった。IZUMO1 W148A や JUNO W62A を用いた時は、集積と同様に移行も見られなかった。SPACA6 と JUNO の混合においても分子の移行は起こらなかった。以上のように、LIAM assay によって、集積だけではなく分子の移行も捉えることができた。

#### (4) LIAM assay を用いた IZUMO1-JUNO の種特異的な相互作用の解析

自由自在な組み合わせで接着を評価できる LIAM assay を用いて、マウス、ヒト、ハムスター、そしてブタの IZUMO1 と JUNO の種特異性を調べることにした。これら哺乳類の 4 種において、マウスは系統的にハムスター、ヒト、ブタの順に近縁である (Nishihara et al., 2006)。IZUMO1 及び JUNO の分子系統解析は、これら 4 種の系統関係と一致している (図 11)。マウス IZUMO1 は、ハムスターと 61%、ヒトと 52%、ブタと 50% のホモロジーがあった (図 11A, 13)。一方、マウス JUNO は、ハムスターと 74%、ヒトと 68%、ブタと 65% のホモロジーがあった (図 11B, 14)。これら 4 種間の種特異性は、タンパク質間相互作用を調べる AVEXIS assay という生化学的手法で、一部の組み合わせが調べられているが、全ての組み合わせが調べられているわけではない。AVEXIS assay では、全ての同種同士、ハムスター-JUNO が異種と相互作用することが示された (Bianchi et al., 2014; Bianchi and Wright, 2015)。

そこで、LIAM assay を用いて、マウス、ヒト、ハムスター、ブタの IZUMO1 と JUNO の全ての組み合わせにおける相互作用を調べた。まず、同種での組み合わせを調べた。マウスの IZUMO1・JUNO では、IZUMO1 の集積が 72% (39/54; 図 6; 表 4)、JUNO の集積が 37% 観察された (20/54; 図 3; 表 5)。さらに、IZUMO1 の移行 27% (15/54; 表 6; 図 10)、JUNO の移行は 7.40% だった (4/54; 表 7)。この結果は、マウスの IZUMO1・JUNO において強い結合を示した AVEXIS assay の結果と一致していた。ヒトの IZUMO1・JUNO では、IZUMO1 と JUNO の集積は同程度観察された (IZUMO1 accumulation: 28%, 14/51, 表 4; JUNO accumulation: 29%, 15/51, 表 5)。この組み合わせでは、IZUMO1 の移行は観察されなかったが、JUNO の移行は頻繁に観察された (64%, 33/51, 表 7, 図 14A)。ハムスターの IZUMO1・JUNO では、IZUMO1 及び JUNO の集積 (IZUMO1: 77%, 41/57, 表 4; JUNO: 28%, 16/57, 表 5; 図 14B)、移行が観察された (IZUMO1: 31%, 18/57, 表 6; JUNO: 28%, 16/57, 表 7, 図 9B)。ブタの IZUMO1・JUNO では、低い割合で IZUMO1 の

集積が観察された (24%, 10/41, 表 4, 図 14C)。以上より、同種の IZUMO1・JUNO の相互作用は、全ての組み合わせで、確認されたが、集積や移行の頻度は、種によって異なっていた。

次に、マウス IZUMO1 とヒト、ハムスター、ブタ JUNO の異種間相互作用を調べた。マウス IZUMO1 発現細胞とヒト JUNO 発現細胞を混合した時、マウス IZUMO1 は接触面に集積したが (50%, 19/38; 表 4)、JUNO 集積や IZUMO1・JUNO の移行は観察されなかった (表 5-7)。マウス IZUMO1 発現細胞とハムスター JUNO 発現細胞を混合した時、マウス IZUMO1 とヒト JUNO の結果と同じように、マウス IZUMO1 の集積のみが観察された (78%, 35/45, 表 4)。マウス IZUMO1 発現細胞とブタ JUNO 発現細胞を混合した時、IZUMO1・JUNO の集積及び移行は観察されなかった。以上より、接着因子の移行は、同種間相互作用と相関があることが示唆された。次に、ヒト IZUMO1 とマウス、ハムスター、ブタ JUNO の異種間相互作用を調べた。これらの組み合わせでは、集積及び移行が全く観察されなかった。先行研究において、ヒト精子とハムスター卵は受精ができることが報告されている (Yanagimachi et al., 1976)。さらに、ヒト IZUMO1 とハムスター JUNO が相互作用することも報告されている (Bianchi and Wright, 2015)。そこで、BHK 細胞ではなく、HEK293T 細胞に変えて、ヒト IZUMO1 とハムスター JUNO の LIAM assay を行った。すると、IZUMO1 の集積が観察された(図 15)。次に、ハムスター IZUMO1 とマウス、ヒト、ブタ JUNO の異種間相互作用を調べた。ハムスター IZUMO1 発現細胞とマウス JUNO 発現細胞を混合した時、同種間 (マウス IZUMO1 × マウス JUNO、ハムスター IZUMO1 × ハムスター JUNO) よりも低率ではあったが、IZUMO1 及び JUNO 集積が観察された (表 4、5)。この結果は、これらの結果は、Yanagimachi らによる異種間受精の結果や AVEXIS assay の結果と一致していた (Yanagimachi et al., 1976; Bianchi and Wright, 2015)。一方で、移行は観察されなかった (表 6、7)。最後に、ブタ IZUMO1 とマウス、ヒト、ハムスター JUNO の異種間相互作用を調べた。ブタ IZUMO1 発現細胞と



マウス JUNO 発現細胞を混合した時、集積及び移行は観察されなかった (表 4-7)。しかし、ブタ IZUMO1 発現細胞とヒト JUNO 発現細胞を混合した時、IZUMO1 及び JUNO の集積が観察された (図 14D; 表 6、7)。予想外にも、ブタ IZUMO1 とヒト JUNO という異種間でも IZUMO1 及び JUNO の移行が検出された。また、ブタ IZUMO1 発現細胞とハムスター JUNO 発現細胞を混合した時も、IZUMO1 及び JUNO の集積が観察された (表 6、7)。先行研究では、これらの組み合わせの相互作用は調べられておらず、LIAM assay により得られた。

## (5) 融合因子 GCS1/HAP2 の解析条件の検討

LIAM assay は、Valansi ら (2017) の Fusion アッセイをもとに開発した方法である。融合因子を導入した際には、ライブイメージングにより細胞融合を映像として捉えることができる (中島 修士論文)。その細胞融合は人為的に発現させた融合因子である GCS1/HAP2 や EFF-1 などの機能に依存したものであるが、融合の効率は低い。LIAM assay との組み合わせを視野に、融合率を向上できないか、解析条件を再検討した。融合因子の発現を厳密に制御しなければ、細胞が死ぬことが報告されていたため (Jin et al., 2004; Podbilewicz et al., 2006; Valansi et al., 2017)、誘導系による発現制御を行っていた (中島 修士論文)。しかし、接着因子 E-cadherin、IZUMO1、JUNO の集積及び移行の解析で用いた CMV promoter による非誘導系は、誘導系 (GeneSwitch System) と比較して、発現量が高くなかった。そのことに着目し、CMV promoter 制御下で、融合因子の発現を確認した。GCS1/HAP2 を蛍光タンパク質 Venus で標識し、12 時間タイムラプス観察したところ、ほとんどの GCS1/HAP2-Venus 発現細胞が死細胞となることはなかった。この結果より、融合因子についても CMV promoter による発現系で実験をすることにした。後に、接着因子 E-cadherin-GFP と融合因子の共導入実験を実施することを考慮し、GFP とは異なる波長で励起される mCherry を GCS1/HAP2 の C 末端に融合するコンス

トラクト GCS1/HAP2-mCherry を作製した。GCS1/HAP2-mCherry を BHK 細胞に導入して観察したが、発現効率はとても低かった (図 16 A)。そこで、GCS1/HAP2-mCherry とシロイヌナズナの CNIH を共導入する着想に至った。Wudick らは、CNIH1/4 のソーティング機能によって花粉中の Glutamate receptor-like channel (GLR) 3.3 が精細胞膜へと局在することを発見し、この機能は、花粉だけではなく、動物の培養細胞でも示された (Wudick et al., 2018)。そこで GCS1/HAP2-mCherry と CNIH1、CNIH4、CNIH1/4 をそれぞれ BHK 細胞へと共導入した。興味深いことに、いずれの組み合わせにおいても、発現効率が上昇した(図 16 B-D)。それぞれの局在を観察したところ、GCS1/HAP2-mCherry 発現細胞と共導入した細胞とで違いはなかった (図 17)。以上のことから、CNIH は GCS1/HAP2 の発現効率を高めるのに適していると考えられた。ただし、これまでのところ CNIH の共同入による融合率の向上は見られていない。

GCS1/HAP2 による細胞融合の機構は未だ明らかとなっていないが、GCS1/HAP2 の構造類縁体である EFF-1 および Class II 融合タンパク質を介した融合機構のモデルは提唱されている。EFF-1 を介した融合機構は、融合する細胞同士の EFF-1 が三量体を形成し、脂質二重膜に突き刺さり、双方向性の融合を引き起こすというモデルである (Pérez-Vargas et al., 2014)。また、デング熱ウイルスの E タンパク質のような Class II 融合蛋白質を介した融合機構は、低 pH に晒されると、E タンパク質は構造変化をし、三量体を形成することで、膜融合を促進する (Modis et al., 2004)。そこで、配偶子融合因子 GCS1/HAP2 も低 pH 条件下で、細胞融合が促進されるのか調べた。Schowalter らが確立した Syncytium assay を参照して、実験を行った (Schowalter et al., 2006)。本研究では、多核の巨大細胞の Syncytium を 1 細胞あたり核が 3 個以上であるものとした。まず、コントロールとして、pRFPcyto 発現細胞の syncytium 形成を調べたところ、全く存在しなかった (n = 60)。低 pH 条件で、BHK 細胞は syncytium を形成しないことがわかった。次に、GCS1/HAP2 発現細胞の syncytium 形成を調べたところ、コントロールと同様に全

く存在しなかった (n = 249)。このことから、GCS1/HAP2 は、低 pH 条件下でも、融合を促進しないことが示唆された。以上から、発現を誘導系から非誘導系に変更する改変だけを加え、これ以降の解析を進めた。

## (6) 接着因子及び融合因子の共導入による機能解析

これまでの実験では、融合と接着を別々に評価してきたが、受精は接着・融合の一連の過程である。そこで、接着因子と融合因子を共導入し、接着因子存在下で融合率が上昇するのかを調べた。先行研究では、センチュウの体細胞融合因子 EFF-1 とショウジョウバエの接着因子 Sns を S2R+細胞で共発現したところ、融合が促進することが報告されている (Shilagardi et al., 2013)。そこでまず、接着因子として E-cadherin、融合因子として EFF-1 を共導入した。共導入して 1 日後に、mifepristone によって、EFF-1 の発現を誘導した。E-cadherin・EFF-1 発現細胞同士が、接触した後に多核化している様子が観察された (図 18; 8:00)。しかし、Fusion assay で見られた細胞の中に、核が複数あるというよりも、細胞の中に細胞があるという cell-in-cell 構造が形成されていた (平均 nuclei/cells = 1.6, 図 18, 19)。細胞の中に取り込まれたほとんどの細胞は、ディッシュから剥がれた浮遊した細胞であった。次に、接着因子 E-cadherin と融合因子 GCS1/HAP2 を共導入した。この実験においても、細胞塊が形成され、cell-in-cell 構造が観察された (平均 nuclei/cells = 1.4, 図 19, 20)。さらに、接着因子 E-cadherin と、Fusion assay において細胞融合により多核化率の上昇を引き起こした IZUMO1 (中島 修士論文) を共導入した。EFF-1 や GCS1/HAP2 と同様の結果が得られた (平均 nuclei/cells = 1.4, 図 19, 21)。次に、cell-in-cell 構造の形成が、融合因子の機能によるものなのかを調べるために、接着因子 E-cadherin と融合因子 GCS1/HAP2 $\Delta$ Loop (融合に必要と考えられている Loop 領域を欠損した GCS1/HAP2) を共導入した。融合機能を失った GCS1/HAP2 が発現しているにもかかわらず、cell-in-cell 構造は観察された。

誘導系による融合因子の発現制御では、2つの細胞が1つになる融合ではなく、細胞の中に細胞を含む cell-in-cell 構造が観察されたため、非誘導系において、再度、接着因子及び融合因子の共導入による機能解析を行うこととした。接着因子 E-cadherin と融合因子 GCS1/HAP2 を共導入した。細胞分裂した後、接触したままであった娘細胞は、最短で分裂 54 分後に、最長で分裂 7 時間 18 分後に、細胞融合し多核細胞となった。また、接触面に集積していた E-cadherin が消失し、細胞が融合した (図 22)。E-cadherin + GCS1/HAP2 の多核化率は、 $3.5 \pm 1.6\%$  ( $n = 3$ )と、GCS1/HAP2 単独の時よりも上昇していた (図 23)。

本研究では、雌雄の配偶子が接着および融合するために細胞膜上で直接的に機能する分子群を「受精装置」として捉えている。そこで次に、配偶子接着因子 IZUMO1・JUNO それぞれに融合因子 GCS1/HAP2 を共導入した。IZUMO1 発現細胞と JUNO 発現細胞を混合した時と同様に、分子の集積が観察されたが、細胞融合は観察されなかった。

## (7) 新規配偶子接着因子の探索

受精装置の「構成因子セット」はあらゆる生物で未解明だが、植物では「GCS1/HAP2」、「GEX2」と融合因子と接着因子の両方が同定されており、3 つ目の主要構成因子として「未同定の GEX2 パートナー分子」を同定することで、受精装置の分子動態解明に迫れると期待される。

そこで LIAM assay でのスクリーニングを視野に、当研究室で既に有するシロイヌナズナ及びトレニアの雌性配偶子に関するトランスクリプトームデータ (須崎, 2015; 筒井, 2017) を用いて候補を探索した。シロイヌナズナのトランスクリプトームデータの発現量に対して、Tukey-Kramer test を行い、シグナル配列・膜貫通ドメインを考慮して絞り込みを行ったところ、9 の候補遺伝子が得られた (中島 修士論文)。同様に、トレ

ニアのトランスクリプトームデータからは、11の候補遺伝子が得られた（中島 修士論文）。候補因子と考えられるアノテーションがなかった。

上記の絞り込み条件では、GPI アンカー型の膜タンパク質などを排除してしまうため、膜貫通ドメインを考慮しない条件で絞り込みを行った。シロイヌナズナのトランスクリプトームデータにおいて、SignalP を用いてシグナル配列があるものを絞り込んだ。すると、4055 遺伝子に絞ることができた。続いて、発現量が 50 ppm 以上という条件で絞り込んだところ、324 遺伝子に絞ることができた。そこから酵素や代謝などに関わっているものを除いたところ、130 の候補遺伝子が得られた。この中には、花粉管の認証に関わっていると考えられている FERONIA も含まれていた。同様に、トレニアのトランスクリプトームデータからは、78 の候補遺伝子が得られた。相同性のある候補遺伝子は 3 つあった (AT3G51050、AT5G11560、AT5G58100)。

これらの候補因子の可能性があると考えられる遺伝子群の一部に関して、試験的に解析を進めた。33 遺伝子を対象として PCR によって増幅し、クローニングができた 25 遺伝子(表 8、9)に対して、AtGEX2 もしくは TfGEX2 との相互作用を検証するために、LIAM assay を行った。AtGEX2、TfGEX2 及び候補遺伝子の発現効率が低いため、CNIH4 も共導入しながら解析を進めているが、これまでのところ GEX2 及び候補遺伝子において、分子の集積や移行は観察されていない。

LIAM assay によって、接着が検出されなかったため、AVEXIS assay というハイスループットなタンパク質間相互作用系を用いて、相互作用を検出することを試みた。GEX2 五量体を精製する他に、コントロールとして、IZUMO1 と JUNO の相互作用を調べるために、五量体 IZUMO1 を精製した。五量体 IZUMO1 発現 HEK293F 細胞の培養液の上清の吸光度を測定すると 10 分で 0.189 であった (図 24)。上清をカラムによって精製すると 10 分で 0.416 になった (図 24)。一方、GEX2 は上清を絡む精製しても 0.231 だった (図 24)。しかし、先行研究では、10 分で約 0.6 であったため、先行研究

と比較して低濃度であった (Bianchi et al., 2014)。精製した五量体 IZUMO1 を用いて、AVEXIS assay を行った。mCherry-JUNO 発現 HEK293T 細胞に、五量体 IZUMO1 を添加し、Alexa Fluor 488 で五量体 IZUMO1 を標識した。五量体 IZUMO1 を添加していないコントロールにおいても Alexa Fluor 488 の蛍光が検出されてしまった (図 25)。

## 5. 考察

### 5-1. LIAM assay を用いた接着因子の解析

本研究では、動物の培養細胞で配偶子接着因子を調べる LIAM assay を開発した。LIAM assay は、さまざまな生物の融合因子の機能を顕微鏡下で検証する Fusion assay に、ライブイメージング技術を取り込むことで、接着過程を調べる汎用性の高い実験系となった。LIAM assay によって、接着因子の表現型として、集積と移行という 2 つの動態が検出された。これまでにホモフィリックまたはヘテロフィリックな接着因子の集積は報告されてきたが (Nagafuchi et al., 1987; Fogel et al., 2007; Tang et al., 2018)、本研究によって、一時的な接触が、接着因子の集積に必要不可欠であることが示唆された。また、接触している隣接する細胞から分子が移行するという興味深い現象が観察された。IZUMO1 もしくは JUNO の一方向性の移行は、エクソソームによる移行やトロゴサイトーシスのような細胞活性が関わっていると考えられる (Barraud-Lange et al., 2012; Bettadapur et al., 2020)。実際、先行研究において、精子と卵母細胞の接触後に、卵母細胞膜断片が精子へ映ることが報告されている (Barraud-Lange et al., 2012)。このトロゴサイトーシスのような現象は、CD9 非依存的であり、受精前に起こった。一方向性の移行しか報告されていない点では共通しているが、卵母細胞から精子への方向性の決まった移行である点では異なっている。卵母細胞から精子への膜断片の移行について、その仕組みも意義も明らかではない。LIAM assay での結果のように、卵母細胞と精子の接触後に、IZUMO1 と JUNO の相互作用を介して移行が起こるのか、興味を持たれる。また、仕組みについても、トロゴサイトーシスは、免疫系や神経系において細胞死誘導、膜交換による機能調節や機能変化を制御している (Bettadapur et al., 2020)。受精過程においても、接着因子依存的なトロゴサイトーシスによる膜交換が、何らかの受精過程を制御しているとするに興味深い。

また、集積や移行は、分子の厳密な構造に依存した。IZUMO1 と JUNO を共発現したときは、免疫蛍光染色により細胞膜へ局在しないことがわかった。これまで IZUMO1 と JUNO の cis での相互作用は報告されていなかったが、細胞内で IZUMO1 と JUNO が相互作用することで、膜輸送が起これなかったことが示唆された。先行研究において、精子が卵と受精することによって、JUNO の膜局在が消失することが報告されている (Inoue et al., 2015)。このことから、IZUMO1 と JUNO が相互作用すると膜から細胞内への輸送が起こっていると考えられる。IZUMO1 と JUNO の相互作用に重要なアミノ酸の点変異だけで、完全にこれらのシグナルは消失した。また IZUMO1 と共通ドメインを持つ SPACA6 においても、これらのシグナルが消失した。したがって、LIAM によって接着因子ペアの相互作用を検出できたと示唆された。今後は、LIAM assay において、FRET (Fluorescence resonance energy transfer) や GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) のような蛍光イメージング技術と併用することで、接着因子の相互作用に関して新たな知見が得られると考えられる。これまでにさまざまな種で、FRET を用いた配偶子間相互作用は調べられていない。相互作用が検出できた場合、相互作用点や面の経時変化、分子の集積の有無などの動態を調べることで、細胞膜の接着から融合に至る過程を解明する突破口になることが期待される。

さらに、LIAM assay の利点は、さまざまな組み合わせでのホモフィリックもしくはヘテロフィリックな接着活性をハイスループットに検出できる点である。今回、マウス、ヒト、ハムスター、ブタの IZUMO1・JUNO の同種間相互作用を確認した後に、ヒト IZUMO1 とブタ JUNO という異種間相互作用が起こり得る候補を見つけた。4種の系統関係を調べると、ヒトとブタは比較的近縁であった。In vivo でのヒト精子とブタ卵の接着性の検証は興味深い。また、先行研究において、ハムスターの卵はさまざまな種の精子と受精できることが報告されていたが (Yanagimachi et al., 1976)、LIAM assay においても、ハムスターJUNO は幅広い種の IZUMO1 と相互作用した。先行研究において、ヒト精子とハムスター卵の受精が可能であることやヒト IZUMO1 とハムスターJUNO の



相互作用が起きることが報告されていたが、BHK 細胞を用いて、ヒト IZUMO1 とハムスター JUNO の相互作用を調べた時、相互作用は検出されなかった。しかし、ヒト由来の HEK293T 細胞を用いたところ、ヒト IZUMO1 の集積が観察された。先行研究のヒト IZUMO1 もヒト由来であり、ヒト IZUMO1 はヒト由来細胞による修飾を受けることで、活性型になることが示唆された。今後、LIAM assay による詳細なアミノ酸のスワップ実験を通して、ハムスター卵が他種の卵との互換性がなぜあるのかが解明されると考えられる。

## 5-2. 融合因子 GCS1/HAP2 及び CNIH の共導入実験

融合因子 GCS1/HAP2 に蛍光タンパク質 mCherry を融合した GCS1/HAP2-mCherry の発現効率が、低かった。しかし、GCS1/HAP2-mCherry に CNIH を共導入したときに、発現効率が上がった。*Drosophila* では、CORNICHON が COP II と相互作用し、かつ他の因子とも相互作用することで、さまざまな因子を小胞輸送していると考えられている (Bökel et al., 2006)。また、酵母の CNIH は、タンパク質を細胞膜へ輸送していることが報告されている (Rosas-Santiago et al., 2017)。シロイヌナズナにおいても、CNIH は、タンパク質のソーティング、輸送、局在化を担っていると考えられている (Wudick et al., 2018)。しかし、本実験では、CNIH が GCS1/HAP2 の局在に変化をもたらしていないが、蛍光タンパク質の輝度を指標として発現効率を増加させるという新たな機能が見出された。発現効率を増加させた要因として、二つの理由が考えられる。1) タンパク質の転写・翻訳を促進する働き、2) タンパク質のフォールディングを補助する働き、である。この二つの仮説を立証することで、CNIH の新規機能が明らかにされることが期待される。また、動物の培養細胞において、植物の遺伝子を導入すると codon usage の問題で、発現しないことがある。しかし、CNIH を共導入することで、植物の遺伝子を動物の培養細胞で構成的アプローチをとることが可能となり、ブレークスルーテクノロジーとして期待される。

### 5-3. 融合因子 GCS1/HAP2 の pH 変化に伴う融合機構の解析

GCS1/HAP2 は、ウイルス Class II 融合タンパク質と立体構造が酷似している (Valansi et al., 2017; Fédry et al., 2017)。Class II 融合タンパク質のアルファウイルスに属するセムリキ森林ウイルス、シンドビウイルスや、フラビウイルスに属するデングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱病ウイルスの膜融合タンパク質は、低 pH に応答して、立体構造を変化させる (Modis et al., 2004)。この立体構造の変化により膜融合が生じる。例えば、デングウイルスの場合、低 pH による 149 番目のヒスチジンのプロトン化が、近傍の 147-151 及び 153 番目のアミノ酸との相互作用を妨げることで、構造変化を引き起こすと推測されている (Christian et al., 2013)。このプロトン化が起こる GCS1/HAP2 の相同領域には、ヒスチジンを含め、極性アミノ酸が存在しない。従って、少なくともこの領域におけるアミノ酸の修飾による構造変化はないと考えられる。分子動力学シミュレーションなどによって、アミノ酸の修飾による構造の変化を予測することで、GCS1/HAP2 の融合機構の一端が明らかになると考えられる。また、花粉中の精細胞膜上で、GCS1/HAP2 の発現は確認されているが、2 つの精細胞同士は融合しない。何が要因となって、融合活性型の GCS1/HAP2 となるのかを調べるために、インタラクトーム解析なども必要だと考える。

### 5-4. 接着因子及び融合因子の共導入による機能解析

接着因子 E-cadherin と誘導系による融合因子を共発現させたところ、cell-in-cell 構造が観察された。一方、接着因子 E-cadherin と非誘導系による融合因子を共発現させた時は、cell-in-cell 構造は観察されなかった。この cell-in-cell 構造は、エントーシスと呼ばれる現象によって形成されたと考えられる。エントーシスは、非アポトーシス細胞死プログラムで、主に癌細胞を用いた実験で、解析されている。エントーシスは、Rho-ROCK シグナル経路の制御下にあり、かつ cadherin 依存的に、細胞を取り込むことが明らかと

なっている (Overholtzer et al., 2007)。しかし、本研究において、エントーシスは、E-cadherin と誘導系による融合因子を共発現させた時に見られた。誘導系による融合因子の過剰発現によってディッシュに付着できなくなった細胞が、E-cadherin 依存的に細胞に取り込まれることで、cell-in-cell 構造が形成されることが示唆された。また、このことから、同等の細胞であったのにもかかわらず、正常細胞が、隣接していた細胞が死細胞になったことを何らかの仕組みによって認識し、取り込んでいると考えられる。仕組みの一つの可能性として、Cadherin 依存的ではないが、死細胞ないし死につつある細胞を除去するエフェロサイトーシスという現象がある (Poon et al., 2014)。エフェロサイトーシスが起るステップとして、まず死細胞や隣接する細胞からタンパク質、脂質、糖などの物質による Find me シグナルが発生し、次に Eat me シグナルと呼ばれる情報伝達により、貪食が起こる。本実験では可視化できていない要因による細胞間コミュニケーションがあったと考えられる。

非誘導系コンストラクトを用いた LIAM assay において、接着因子 E-cadherin と融合因子 GCS1/HAP2 を共導入した時、融合率が上昇していた。一方で、接着因子 IZUMO1・JUNO と融合因子 GCS1/HAP2 を共導入した時、融合は観察されなかった。この要因として、IZUMO と JUNO の相互作用は、E-cadherin のホモフィリックな相互作用と比較して、親和性が低いことから、GCS1 を介した細胞融合を促進しなかったと考えられた。しかし実際は、Bianchi ら (2014) によって、IZUMO1 と JUNO の親和性は、解離定数  $K_D = 12.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (37°C) と報告され (Bianchi et al., 2014)、一方 Katsamba ら (2009) によって、E-cadherin の親和性は、解離定数  $K_D = 160.0 \pm 21.3 \mu\text{M}$  (37°C) と報告された (Katsamba et al., 2009)。IZUMO と JUNO の相互作用は、E-cadherin のホモフィリックな相互作用よりも親和性が高いことから、IZUMO と JUNO の相互作用時は、GCS1 を介した融合ができない状態であると考えられる。Inoue ら (2015) は、IZUMO1 と JUNO の接着は速やかに消失し、IZUMO1 の二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提唱した (Inoue et al., 2015)。少なくとも IZUMO1 が関与する融合機構だけでも単量体・二量体が関与する 2 段階の活性があると考えられる。二量体化をリアルタイムに可視化できれば、IZUMO が関与する融合機構に迫ることができると期待される。

また、現在唯一クラミドモナスにおいて、雌雄の配偶子が接着および融合するために細胞膜上で直接的に機能する「受精装置」が明らかとなっている。Plus-type cell で接着因子 FUS1 が発現しており、minus-type cell で接着因子 MAR1 及び融合因子 GCS1/HAP2 が発現している。予備的な実験において FUS1 と MAR1 を用いた LIAM assay を試みたが、集積や移行は観察されていない。培養細胞において、クラミドモナスの遺伝子が機能的に発現しているかどうかは不明な点があるが、IZUMO1-JUNO のような動物の接着因子だけでなく、植物細胞の接着因子について解析できる条件を明確にしておくことは極めて重要であろう。LIAM assay を用いた今後の研究の展開のために、優先して取り組むべき課題の一つと言える。

## 5-5. 雌性配偶子における接着および融合に関わる新奇鍵分子の探索

本研究において、未同定な GEX2 パートナー分子の候補因子として、シロイヌナズナ及びトレニアのトランスクリプトームデータから、のべ 208 候補遺伝子を得た。その中で、ロイシンリッチリピートタンパク質のアノテーションがついている候補遺伝子が 17 個あった。ロイシンリッチリピートタンパク質は、タンパク質間相互作用を介し、様々な機能をもたらす。例えば、神経系において、ロイシンリッチリピートタンパク質の NGL と GPI アンカータンパク質のネトリン G が相互作用し、接着を引き起こすことでシナプスが結合する (Matsukawa et al., 2014)。このように、ロイシンリッチリピートタンパク質が、細胞間接着に関与することから、未同定な GEX2 パートナー分子もロイシンリッチリピートタンパク質である可能性がある。しかし、ロイシンリッチリピートタンパク質を含め、LIAM assay によって、GEX2 と候補因子の集積や移行を観察することが

できなかった。GEX2 と共通ドメインを持つ FUS1 とそのパートナー分子である MAR1 においても集積や移行が観察されなかった。集積や移行が見られなかった要因として、1) 候補因子内にパートナー分子が存在しなかったからなのか、2) 動物培養細胞で植物の遺伝子が機能的であるか、現状では不明である。候補因子を増やすために、クラミドモナスの FUS1・MAR1 の知見を踏まえて、構造生物学的な検討も加えてさらに絞り込みを進める必要がある。また、JUNO 同定の実績がある AVEXIS assay の確立を行い、GEX2 パートナー分子のスクリーニングを目指す。本研究では、精製タンパク質濃度が先行研究と比較して低かったが、本研究で新たに発現効率を促進する CNIH の新規機能を見出したので、五量体発現コンストラクトと共発現することで、充分量の五量体 IZUMO1 及び GEX2 の獲得をする。GEX2 パートナー分子が同定されれば、受精装置の主要構成因子のセットが解明される可能性がある。さらに主要因子のセットが揃うことに加え、本研究による分子動態の可視化を端緒に、受精装置の作動原理について飛躍的な研究の進展が期待される。本研究の「装置を細胞内で組み上げる構成的なアプローチ」は、あらゆる生物の受精因子の解析に応用可能であり、動植物を自在に行き来した研究を展開していくことが可能となる。

## 6. 参考文献

- Avella, M.A., Baibakov, B., and Dean, J.** (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J. Cell Biol.* **205**: 801–809.
- Avinoam, O., Fridman, K., Valansi, C., Abutbul, I., Zeev-Ben-Mordehai, T., Maurer, U.E., Sapir, A., Danino, D., Grünewald, K., White, J.M., and Podbilewicz, B.** (2011). Conserved eukaryotic fusogens can fuse viral envelopes to cells. *Science* **332**: 589–592.
- Aydin, H., Sultana, A., Li, S., Thavalingam, A., and Lee, J.E.** (2016). Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* **534**: 562–565.
- Barboux, S., Ialy-Radio, C., Chalbi, M., Dybal, E., Homps-Legrand, M., Do Cruzeiro, M., Vaiman, D., Wolf, J.P., and Ziyat, A.** (2020). Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci. Rep.* **10**: 1–15.
- Barraud-Lange, V., Boissonnas, C.C., Serres, C., Auer, J., Schmitt, A., Lefèvre, B., Wolf, J.P., and Ziyat, A.** (2012). Membrane transfer from oocyte to sperm occurs in two CD9-independent ways that do not supply the fertilising ability of Cd9-deleted oocytes. *Reproduction* **144**: 53–66.
- Bettadapur, A., Miller, H.W., and Ralston, K.S.** (2020). Biting Off What Can Be Chewed: Trophocytosis in Health, Infection, and Disease. *Infect. Immun.* **88**: e00930-19.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G.J.** (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**: 483–487.
- Bianchi, E. and Wright, G.J.** (2015). Cross-species fertilization: The hamster egg receptor, Juno, binds the human sperm ligand, Izumo1. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**: 1–4.
- Bleckmann, A., Alter, S., and Dresselhaus, T.** (2014). The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. *Front. Plant Sci.* **5**: 452.
- Bökel, C., Dass, S., Wilsch-Bräuninger, M., and Roth, S.** (2006). Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF $\alpha$ -like growth factor Gurken. *Development* **133**: 459–470.
- Christian, E.A., Kahle, K.M., Mattia, K., Puffer, B.A., Pfaff, J.M., Miller, A., Paes, C., Davidson, E., and Doranz, B.J.** (2013). Atomic-level functional model of dengue virus Envelope protein infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 18662–18667.

- Cole, E.S., Cassidy-Hanley, D., Fricke Pinello, J., Zeng, H., Hsueh, M., Kolbin, D., Ozzello, C., Giddings, T., Winey, M., and Clark, T.G.** (2014). Function of the male-gamete-specific fusion protein HAP2 in a seven-sexed ciliate. *Curr. Biol.* **24**: 2168–2173.
- Fédry, J. et al.** (2017). The Ancient Gamete Fusogen HAP2 Is a Eukaryotic Class II Fusion Protein. *Cell* **168**: 904–915.
- Fogel, A.I., Akins, M.R., Krupp, A.J., Stagi, M., Stein, V., and Biederer, T.** (2007). SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J. Neurosci.* **27**: 12516–12530.
- Fujihara, Y., Herberg, S., Blaha, A., Panser, K., Kobayashi, K., Larasati, T., Novatchkova, M., Theussl, H.C., Olszanska, O., Ikawa, M., and Pauli, A.** (2021). The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**.
- Fujihara, Y., Lu, Y., Noda, T., Oji, A., Larasati, T., Kojima-Kita, K., Yu, Z., Matzuk, R.M., Matzuk, M.M., and Ikawa, M.** (2020). Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**: 9393–9400.
- Herberg, S., Gert, K.R., Schleiffer, A., and Pauli, A.** (2018). The Ly6/uPAR protein Bouncer is necessary and sufficient for species-specific fertilization. *Science* **361**: 1029–1033.
- Inoue, N., Hagihara, Y., and Wada, I.** (2021). Evolutionarily conserved sperm factors, *dst1* and *dst2*, are required for gamete fusion. *Elife* **10**: 1–12.
- Inoue, N., Hagihara, Y., Wright, D., Suzuki, T., and Wada, I.** (2015). Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat. Commun.* **6**: 1–12.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M.** (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**: 234–238.
- Jin, H., Carlile, C., Nolan, S., and Grote, E.** (2004). Prm1 prevents contact-dependent lysis of yeast mating pairs. *Eukaryot. Cell* **3**: 1664–1673.
- Katsamba, P., Carroll, K., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Posy, S., Rajebhosale, M., Price, S., Jessell, T.M., Ben-Shaul, A., Shapiro, L., and Honig, B.H.** (2009). Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 11594–11599.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.** (2016). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**: 845–858.

- Klein, D.E., Choi, J.L., and Harrison, S.C.** (2013). Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion. *87*: 2287–2293.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L.L.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567–580.
- Lamas-Toranzo, I., Hamze, J.G., Bianchi, E., Fernández-Fuertes, B., Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., Fernández-González, R., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., Wright, G.J., Jiménez-Movilla, M., and Bermejo-álvarez, P.** (2020). TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. *Elife* **9**: 1–18.
- Liu, Y., Tewari, R., Ning, J., Blagborough, A.M., Garbom, S., Pei, J., Grishin, N. V., Steele, R.E., Sinden, R.E., Snell, W.J., and Billker, O.** (2008). The conserved plant sterility gene. *Genes Dev.* **22**: 1051–1068.
- Mayr E** (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia Univ.Press, New York
- Matsukawa, H., Akiyoshi-Nishimura, S., Zhang, Q., Luján, R., Yamaguchi, K., Goto, H., Yaguchi, K., Hashikawa, T., Sano, C., Shigemoto, R., Nakashiba, T., and Itohara, S.** (2014). Netrin-G/NGL complexes encode functional synaptic diversification. *J. Neurosci.* **34**: 15779–15792.
- Misamore, M.J., Gupta, S., and Snell, W.J.** (2003). The Chlamydomonas Fus1 protein is present on the mating type plus fusion organelle and required for a critical membrane adhesion event during fusion with minus gametes. *Mol. Biol. Cell* **14**: 2530–2542.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., and Mekada, E.** (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**: 321–324.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C.** (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**: 313–319.
- Mohler, W.A., Shemer, G., Del Campo, J.J., Valansi, C., Opoku-Serebuoh, E., Scranton, V., Assaf, N., White, J.G., and Podbilewicz, B.** (2002). The type 1 membrane protein EFF-1 is essential for development cell fusion. *Dev. Cell* **2**: 355–362.
- Mori, T., Igawa, T., Tamiya, G., Miyagishima, S., and Berger, F.** (2014). Gamete Attachment Requires GEX2 for Successful Fertilization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **24**: 170–175.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., and Kuroiwa, T.** (2006). GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat. Cell Biol.* **8**: 64–71.



- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., and Takeichi, M.** (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* **329**: 341–343.
- Nishihara, H., Hasegawa, M., and Okada, N.** (2006). Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 9929–9934.
- Noda, T., Lu, Y., Fujihara, Y., Oura, S., Koyano, T., Kobayashi, S., Matzuk, M.M., and Ikawa, M.** (2020). Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**.
- Ohto, U., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Inoue, N., and Shimizu, T.** (2016). Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* **534**: 566–9.
- Overholtzer, M., Mailloux, A.A., Mounie, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., and Brugge, J.S.** (2007). A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* **131**: 966–979.
- Pérez-Vargas, J., Krey, T., Valansi, C., Avinoam, O., Haouz, A., Jamin, M., Raveh-Barak, H., Podbilewicz, B., and Rey, F.A.** (2014). Structural basis of eukaryotic cell-cell fusion. *Cell* **157**: 407–419.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**: 785–786.
- Pinello, J.F., Lai, A.L., Millet, J.K., Cassidy-Hanley, D., Freed, J.H., and Clark, T.G.** (2017). Structure-Function Studies Link Class II Viral Fusogens with the Ancestral Gamete Fusion Protein HAP2. *Curr. Biol.* **27**: 651–660.
- Pinello, J.F., Liu, Y., and Snell, W.J.** (2021). MAR1 links membrane adhesion to membrane merger during cell-cell fusion in *Chlamydomonas*. *Dev. Cell* **56**: 2021.09.03.458930.
- Podbilewicz, B.** (2014). Virus and Cell Fusion Mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**: 111–139.
- Podbilewicz, B., Leikina, E., Sapir, A., Valansi, C., Suissa, M., Shemer, G., and Chernomordik, L. V.** (2006). The *C. elegans* Developmental Fusogen EFF-1 Mediates Homotypic Fusion in Heterologous Cells and In Vivo. *Dev. Cell* **11**: 471–481.
- Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., and Ravichandran, K.S.** (2014). Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* **14**: 166–180.

- Quinn, M.E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D.G., Petrany, M.J., Prasad, V., and Millay, D.P.** (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nat. Commun.* **8**: 1–9.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Yáñez-Domínguez, C., Vera-Estrella, R., Zimmermannová, O., Sychrová, H., and Pantoja, O.** (2017). Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**: 1809–1818.
- Schwalter, R.M., Smith, S.E., and Dutch, R.E.** (2006). Characterization of Human Metapneumovirus F Protein-Promoted Membrane Fusion: Critical Roles for Proteolytic Processing and Low pH. *J. Virol.* **80**: 10931–10941.
- Shilagardi, K., Li, S., Luo, F., Marikar, F., Duan, R., Jin, P., Kim, J.H., Murnen, K., and Chen, E.H.** (2013). Actin-propelled invasive membrane protrusions promote fusogenic protein engagement during cell-cell fusion. *Science* **340**: 359–363.
- Steele, R.E. and Dana, C.E.** (2009). Evolutionary history of the HAP2/GCS1 gene and sexual reproduction in metazoans. *PLoS One* **4**: 1–5.
- Tang, H., Chang, H., Dong, Y., Guo, L., Shi, X., Wu, Y., Huang, Y., and He, Y.** (2018). Architecture of cell–cell adhesion mediated by sidekicks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: 9246–9251.
- Valansi, C., Moi, D., Leikina, E., Matveev, E., Graña, M., Chernomordik, L. V., Romero, H., Aguilar, P.S., and Podbilewicz, B.** (2017). Arabidopsis HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens. *J. Cell Biol.* **216**: 571–581.
- Wang, Y., O’Malley, B.W., Tsai, S.Y., and O’Malley, B.W.** (1994). A regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 8180–8184.
- Wudick, M.M., Portes, M.T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M.A., Nunes, C.O., Campos, C., Santa Cruz Damineli, D., Carvalho, J.C., Lima, P.T., Pantoja, O., and Feijó, J.A.** (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Science* **360**: 533–536.
- Yanagimachi, R.** (1984). Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* **10**: 187–232.
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., and Rogers, J.** (1976). The Use of Zona-Free Assessment Ova as a Test-System Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **15**: 471–476.

須崎大地 (2015) ライブセルイメージングと顕微細胞操作による被子植物の雌性配偶体発生の解析, 名古屋大学博士論文

筒井大貴 (2017) 少数細胞遺伝子発現解析とCRISPR/Cas9による高効率な遺伝子破壊系の開発を基盤とした植物生殖関連遺伝子の探索と解析, 名古屋大学博士論文

中島耕大 (2019) 培養細胞を用いたライブセルイメージングによる受精因子の解析, 名古屋大学修士論文

## 7. 謝辞

本研究は、多くの方からのご指導ご鞭撻をいただき、まとめ上げることができました。

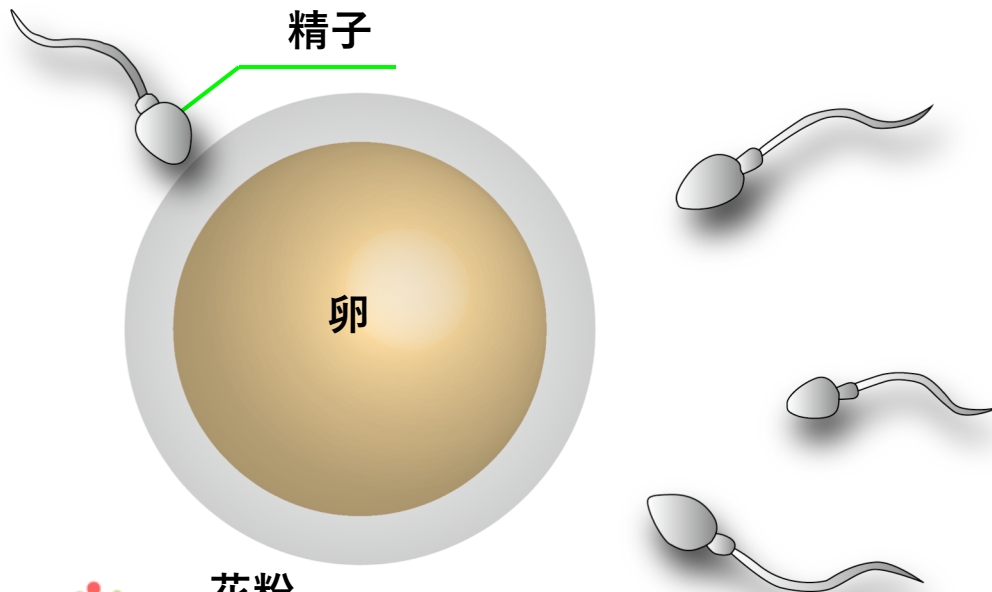
まず、指導教官である東山哲也教授には、私が大変興味を抱いている「動植物の受精における原理」の解明に向けた大きな一歩として、本研究テーマを与えていただきました。この場を借りて、深くお礼申し上げます。本研究アプローチは、大変ユニークである一方で、確立するのには多くの困難が立ちはだかっていました。困難にぶつかった時には、多面的に捉え、解決策を見出すアドバイスをいただきました。また、本研究の端緒となり、当研究室でこれまで扱っていなかった BHK 細胞を用いた実験系を立ち上げるに際し、Technion- Israel Institute of Technology の Benjamin Podbilewicz 教授、Clari Valansi 博士には、詳細に書かれたプロトコールやプラスミドを提供していただきました。何度も困難にぶつかりましたが、その都度メールで連絡を取り合い、有用なアドバイスや激励の言葉をいただき、研究を進めていく上で、心の支えとなりました。本当にありがとうございました。University of York の Gavin Wright 教授、Enrica Bianchi 博士には、JUNO を扱う実験について、有用な助言をいただきました。さらに、AVEXIS assay を本研究室で立ち上げるあたり、Zoom やメールを用いて、助言をしていただきました。AVEXIS assay に必要な HEK293F 細胞及び HEK293T 細胞を名古屋大学大学院生命理学研究科の平子善章講師から分与していただきました。名古屋大学大学院生命農学研究科の動物統合生理学研究室の吉村崇教授らには、マウスの精巣及び卵巣の cDNA を分与していただきました。京都大学大学院理学研究科植物分子遺伝研究室の西村芳樹博士より、クラミドモナスのプラス型 mt+及びマイナス型 mt-の配偶子の cDNA を分与していただきました。本研究のアプローチには、シロイヌナズナだけでなく、多くの生物種の因子を使用するため、大変貴重な提供となりました。大阪大学微生物病研究所・附属感染動物実

験施設の伊川正人教授には、IZUMO1、JUNO、CD9 の抗体を分与していただきました。  
法政大学生命科学部生命機能学科豊岡博子博士には、ゴニウム GCS1/HAP2 抗体を分与していただきました。

最後に、私は名古屋大学リーディング大学院プログラムおよび卓越大学院プログラムに参加させていただきました。研究のみならず、将来必ず必要になるノウハウを得る数多くの機会を与えていただきました。このような素晴らしい環境で学べることは、私の研究生活において、大きなアドバンテージになりました。研究者としてまだまだ発展途上ですので、今後も皆さまからのご指導ご鞭撻を賜り、研究に邁進して行く所存です。よろしくお願ひ致します。

## 8. 図・表

A



B

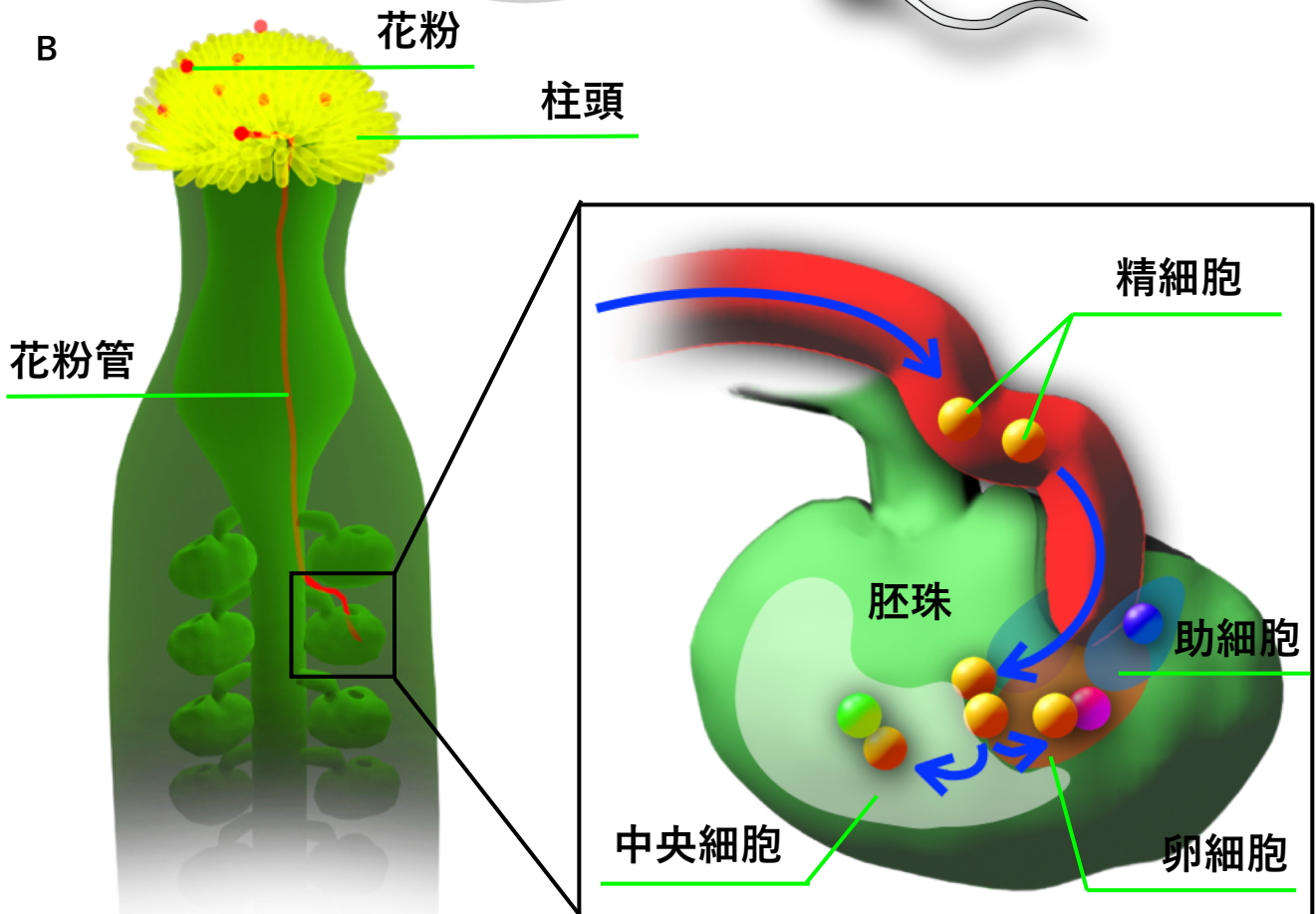
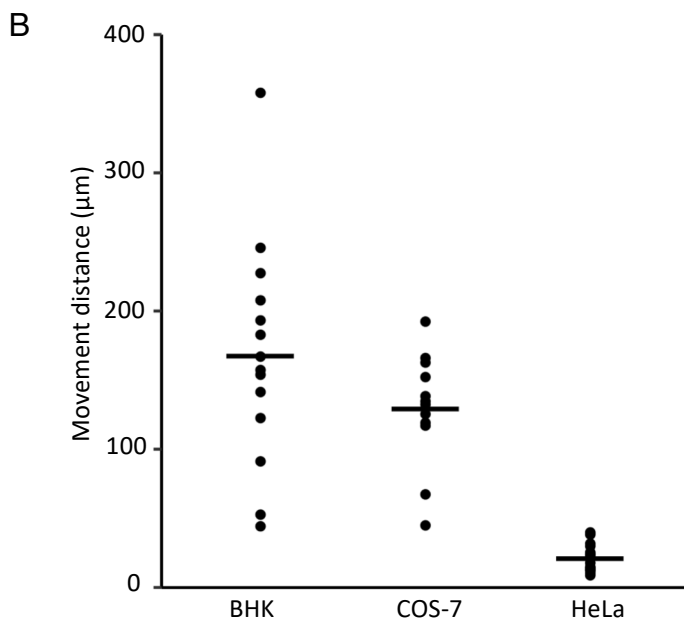
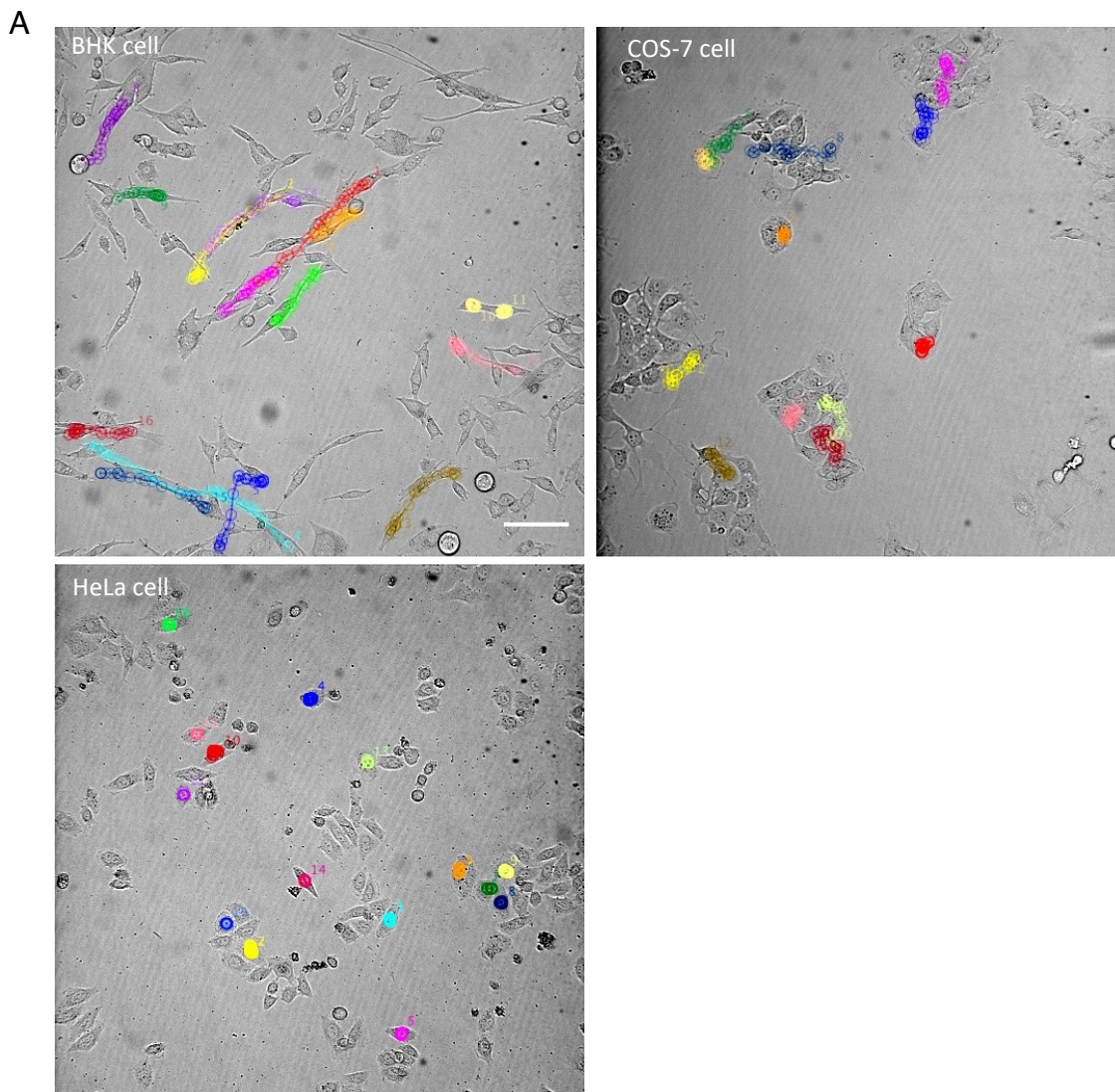


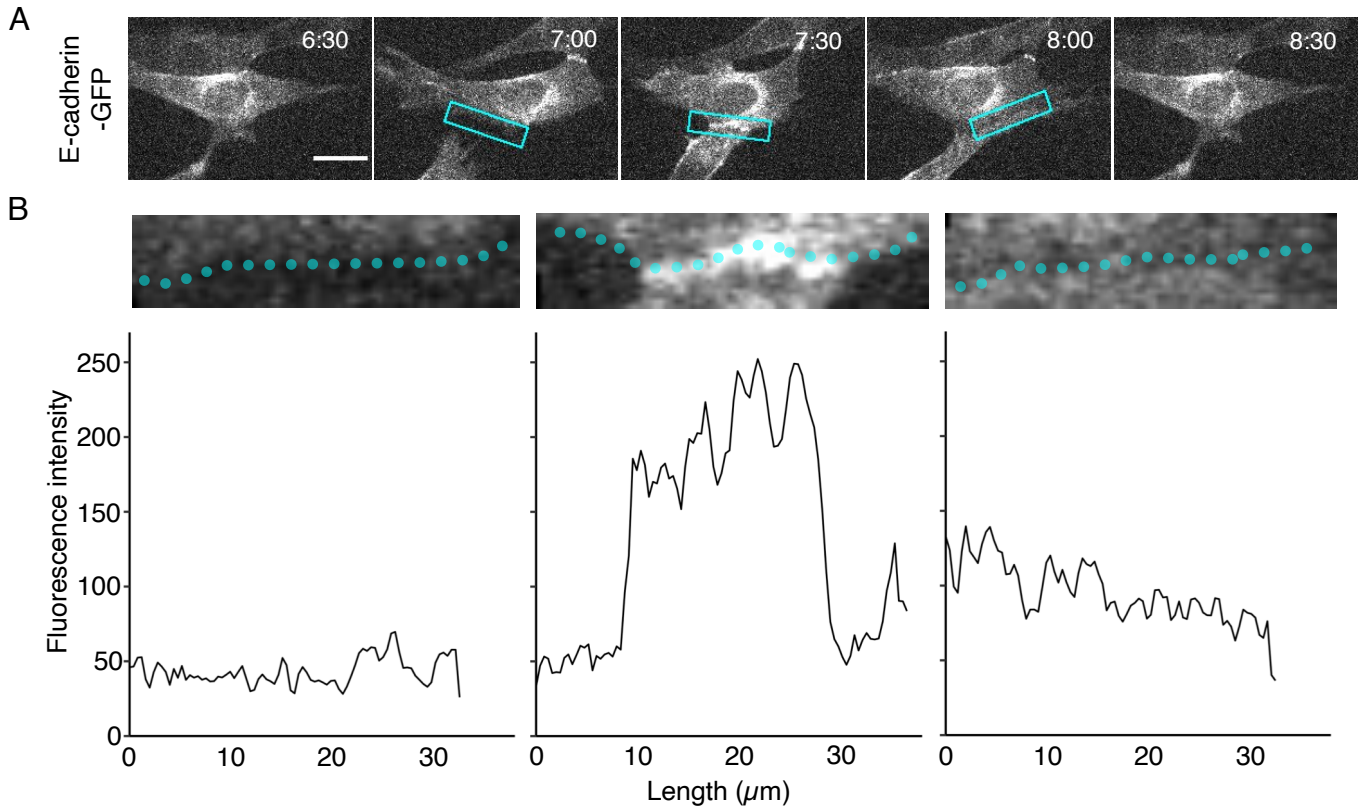
図1：動物および植物の受精様式

動物の受精 (A) と植物の重複受精 (B) を示した。(A) 動物の受精では、一つの卵に対して、多数の精子が誘引され、一つの精子が融合する。(B) 植物の重複受精は、基本的に一つの胚珠に対して、一本の花粉管が誘引され、後に二つの精細胞がそれぞれ、卵細胞および中央細胞と受精する。



**図2：接着因子解析に適切な培養細胞の検討**

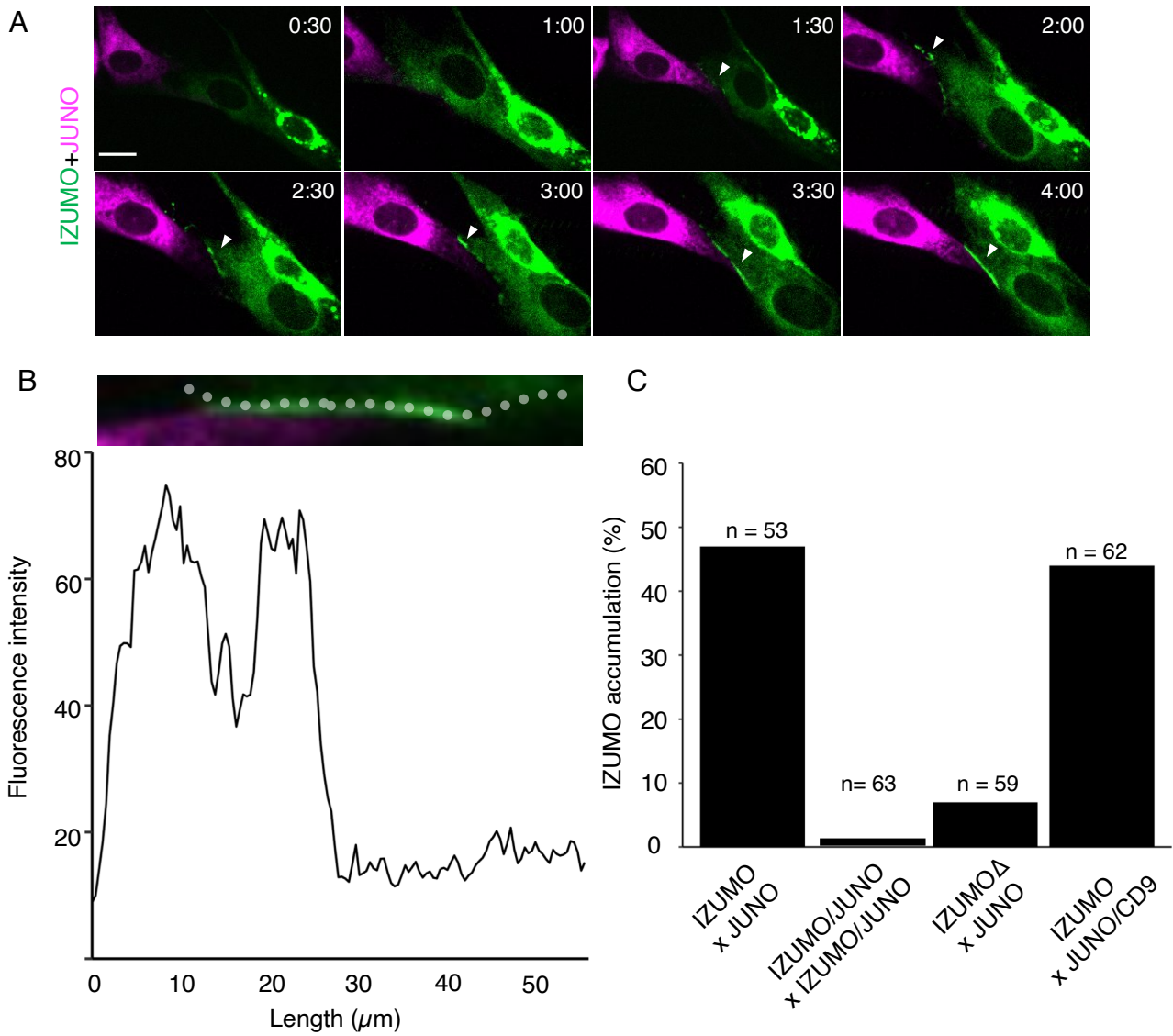
(A) 画像解析ソフトFijiのプラグインMTrackJを用いて、BHK細胞、COS-7細胞、HeLa細胞のトラッキングを行った。スケールバーは50 μm。(B) 各培養細胞の移動距離。ドットは各細胞の移動距離を示した。バーは平均を示した。



### 図3：隣接した細胞の接触面でのCadherinの集積

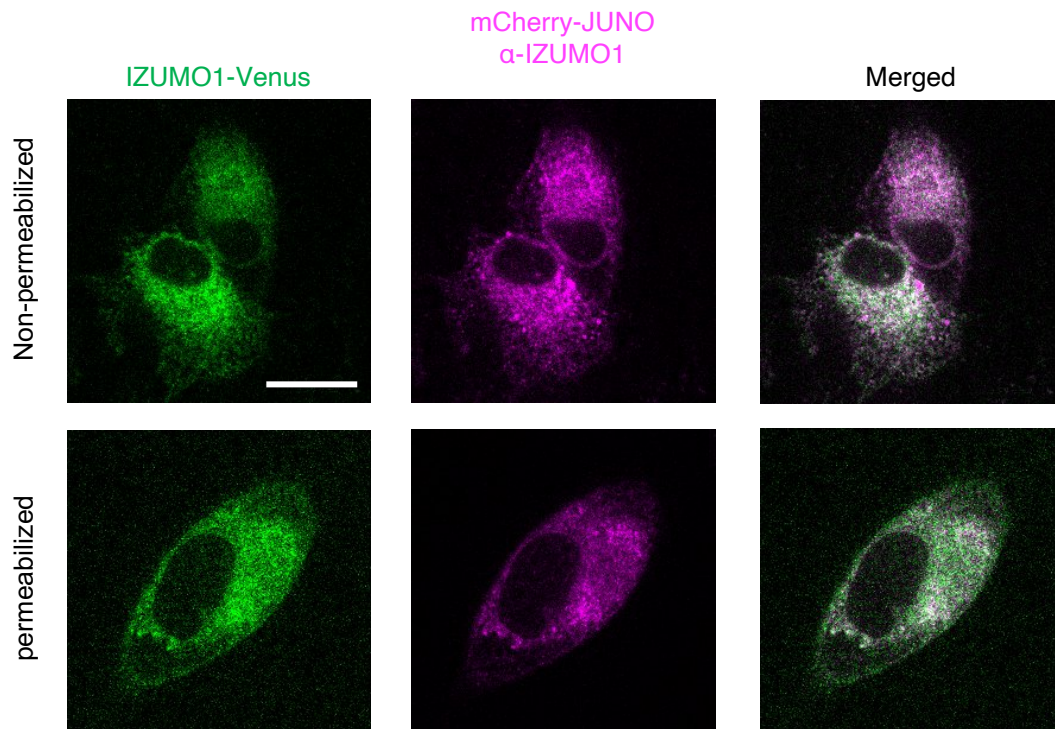
(A) E-cadherin発現細胞のタイムラプスイメージング。ボックスは、(B)での蛍光強度を測定した領域を示した。時間 (時：分) は観察開始からの時間を示した。スケールバーは 20  $\mu\text{m}$ 。 (B) 蛍光強度のプロファイル。左は接触前 (7:00)、真ん中は接触時 (7:30)、右は離れる時 (8:00)。





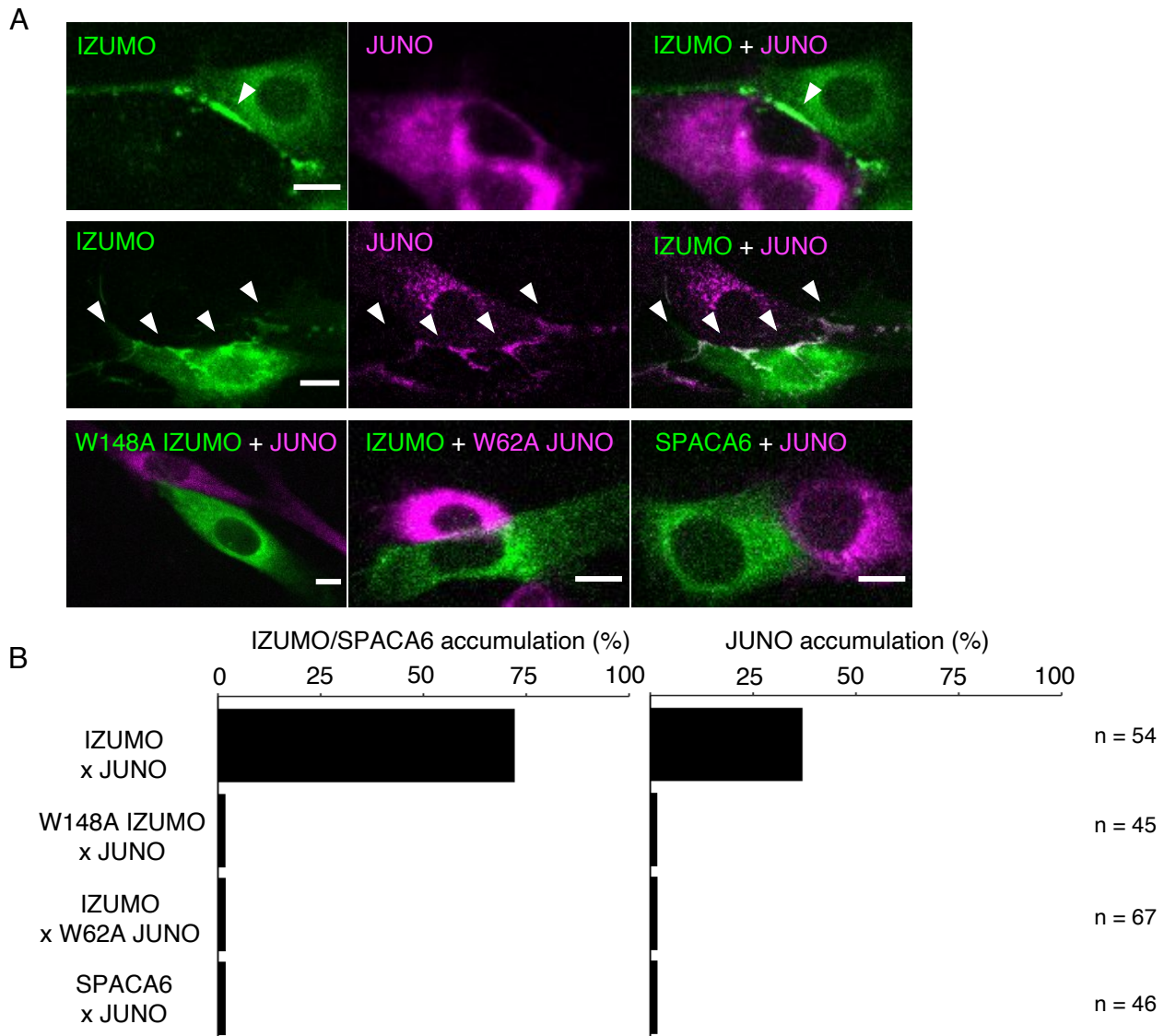
#### 図4：隣接した細胞の接触面でのIZUMOの集積

(A) IZUMO及びJUNO発現細胞のタイムラプスイメージング。時間 (時：分) は観察開始からの時間を示した。矢尻は、集積を示した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。 (B) (A)の4:00での、IZUMOの蛍光強度のプロファイル。 (C) さまざまな組み合わせでのIZUMOの集積率。nはライブイメージングによって観察した接触した細胞のペア数を示した。



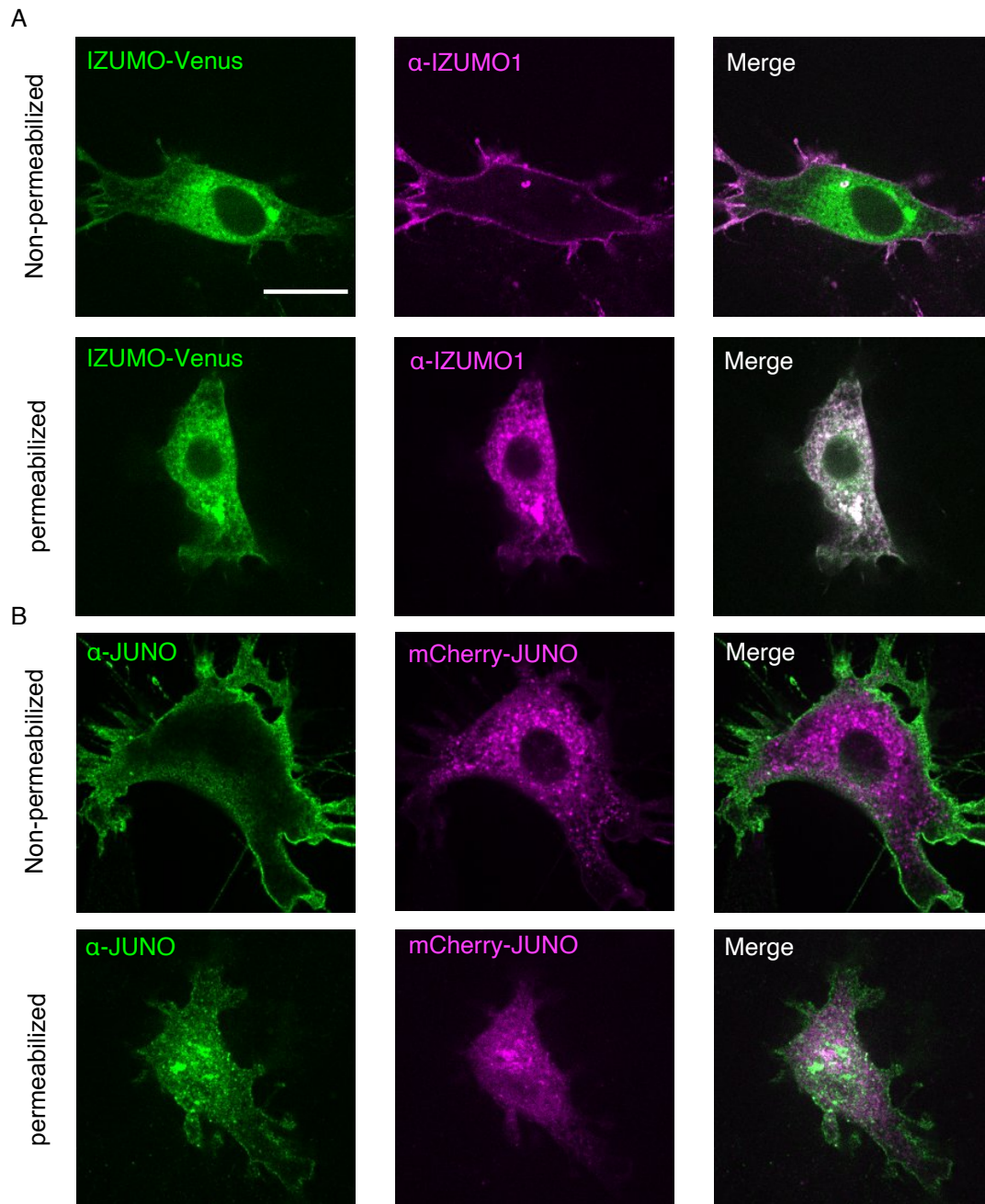
### 図5：IZUMO・JUNO共発現細胞の免疫蛍光染色

IZUMO・JUNO共発現細胞において、IZUMO-VenusをIZUMO抗体によって標識した。透過処理をしていない場合(上段)、透過処理をした場合(下段)の両方において、IZUMOは細胞膜に局在していなかった。スケールバーは10 μm。



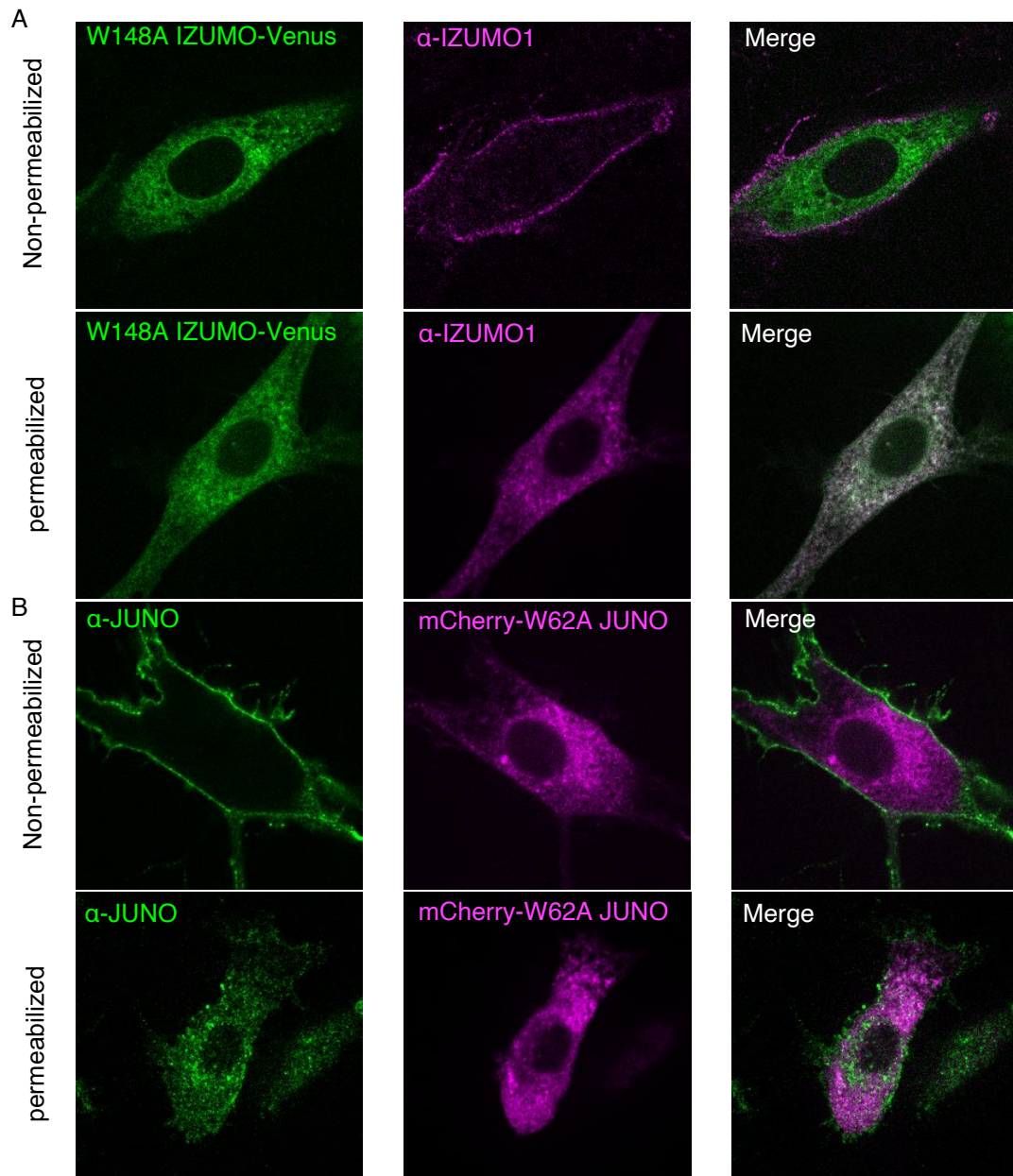
**図6：IZUMO及びJUNOの集積はアミノ酸配列に依存した**

(A)IZUMOもしくはSPACA6とJUNOを用いて、LIAM assayを行った。IZUMO発現細胞 (緑)とJUNO発現細胞 (マゼンタ)を混合したとき、IZUMOの集積だけが観察される場合 (上段)と、IZUMO・JUNOの両方が集積している場合 (中段)が観察された。矢尻は集積を示した。点変異の入ったW148A IZUMO (下段左)及びW62A JUNO (下段真ん中)では、集積は観察されなかった。SPACA6でも集積は観察されなかった (下段右)。スケールバーは10 μm。(B) IZUMO/SPACA6及びJUNOの集積率



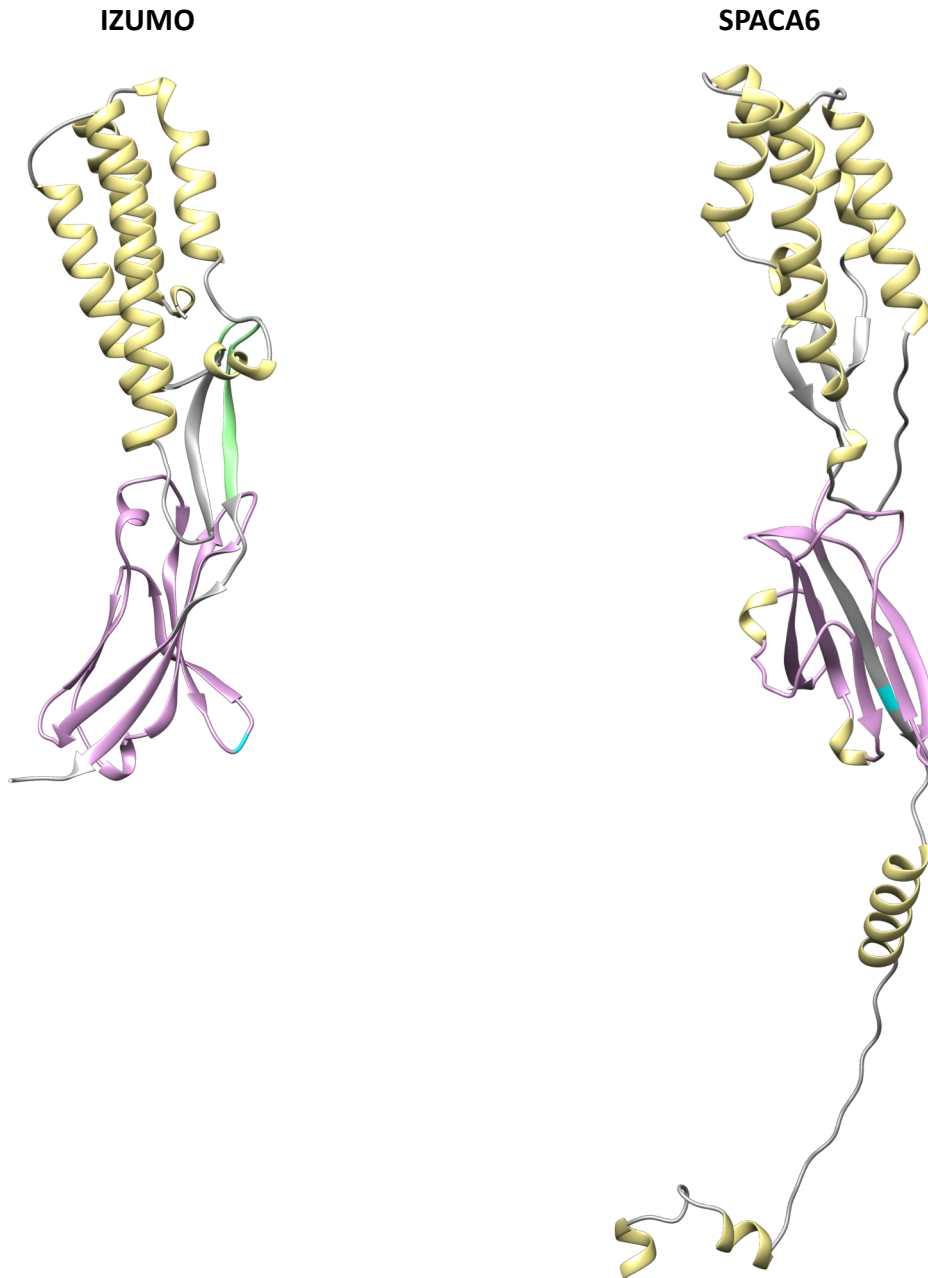
### 図7：IZUMO及びJUNO発現細胞の免疫蛍光染色

(A) IZUMOの膜局在を調べた。IZUMO-Venus (緑)をIZUMO抗体 (マゼンタ)によって標識した。透過処理をしていない場合、IZUMOは細胞膜に局在していた(上段)。透過処理をした場合、IZUMO-Venusの局在は、IZUMO抗体の局在と一致しており、ERに局在していた(下段)。(B) JUNOの膜局在を調べた。mCherry-JUNO (マゼンタ)をJUNO抗体 (緑)によって標識した。透過処理をしていない場合、JUNOは細胞膜に局在していた(上段)。透過処理をした場合、mCherry-JUNOの局在は、JUNO抗体の局在と一致しており、ERに局在していた(下段)。スケールバーは10  $\mu$ m。



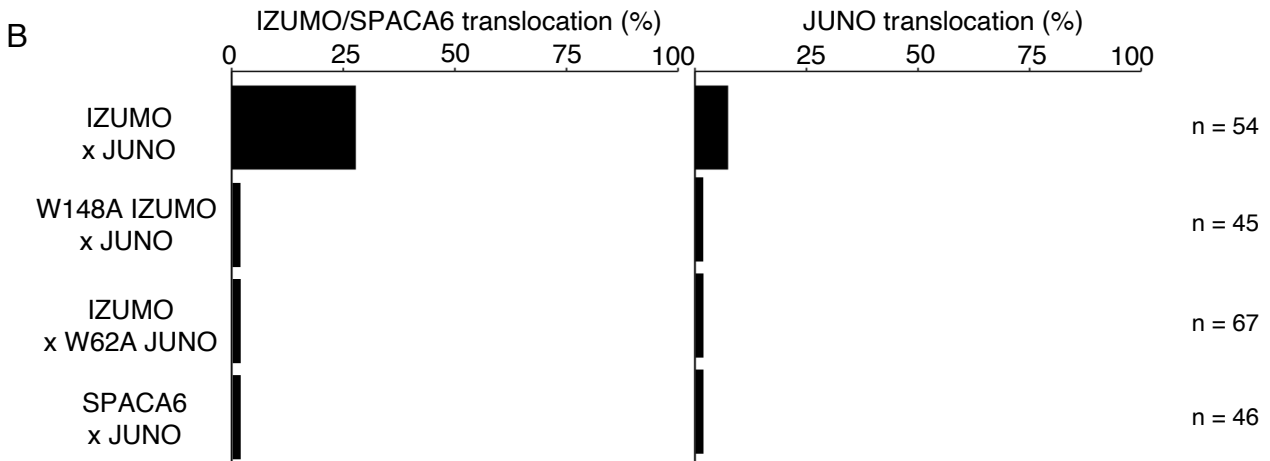
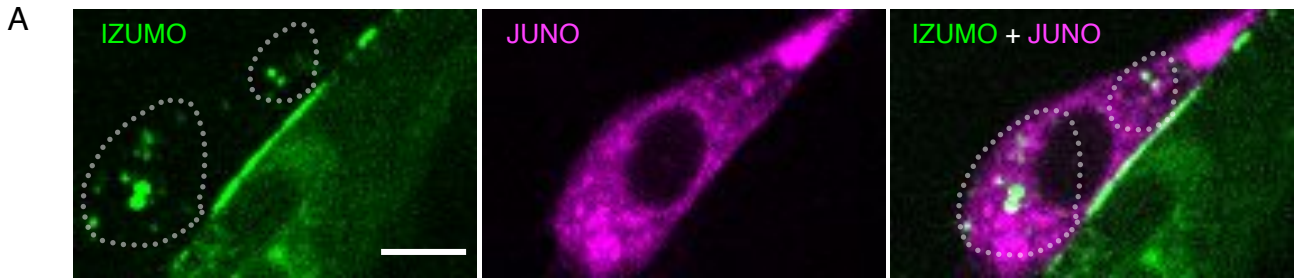
### 図8：IZUMO変異体及びJUNO変異体の免疫蛍光染色

(A) W148A IZUMOの膜局在を調べた。W148A IZUMO-Venus (緑)をIZUMO抗体 (マゼンタ)によって標識した。透過処理をしていない場合、IZUMOは細胞膜に局在していた(上段)。透過処理をした場合、W148A IZUMO-Venusの局在は、IZUMO抗体の局在と一致しており、ERに局在していた(下段)。(B) W62A JUNOの膜局在を調べた。mCherry-W62A JUNO (マゼンタ)をJUNO抗体 (緑)によって標識した。透過処理をしていない場合、JUNOは細胞膜に局在していた(上段)。透過処理をした場合、mCherry-W62A JUNOの局在は、JUNO抗体の局在と一致しており、ERに局在していた(下段)。スケールバーは10  $\mu$ m。



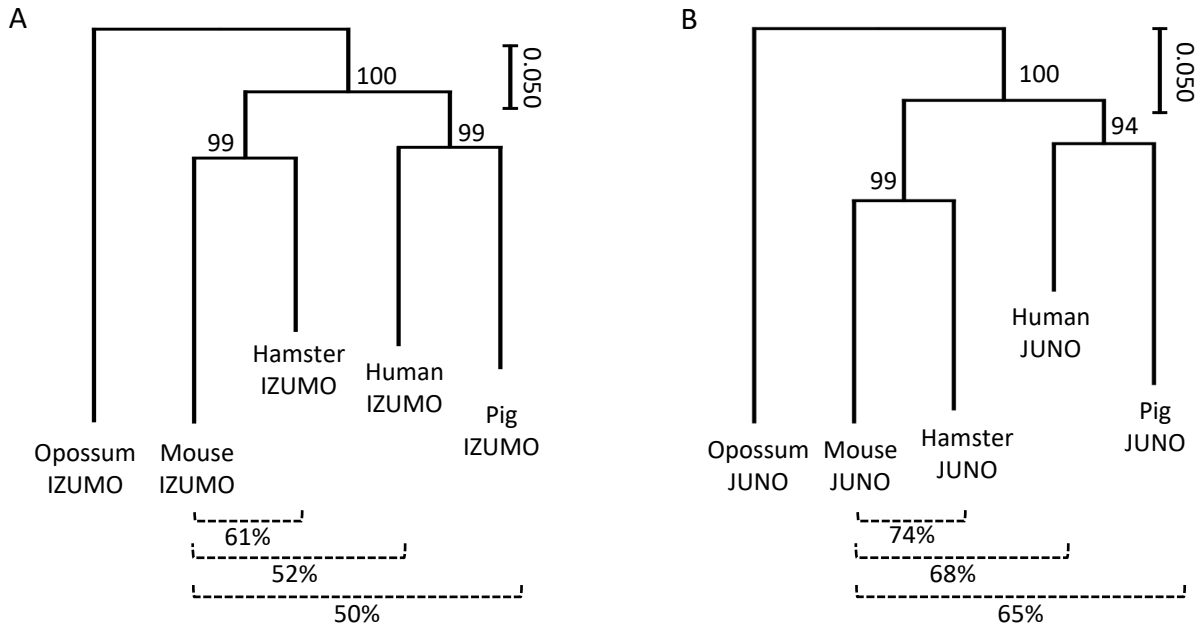
**図9：IZUMOとSPACA6の立体構造**

左は、Chimeraを用いたIZUMO (Uniprot accession no. Q9D9J7)のモデリング。右は、AlphaFoldによって構造予測されたSPACA6。IZUMO及びSPACA6は、シグナル配列、Ig-likeドメイン(マゼンタ)、N結合型グリコシル化(シアン)、膜貫通ドメインを持つ。



**図10：IZUMO及びJUNOの移行はアミノ酸配列に依存した**

(A) 隣接した細胞へのIZUMOの移行。点線で囲まれた領域に移行したシグナルが検出された。スケールバーは10  $\mu$ m。 (B) IZUMO/SPACA6及びJUNOの集積率。



**図11：IZUMO及びJUNOの分子系統樹**

MEGA XのNeighbour-joining法を用いて、IZUMO1(A)とJUNO(B)の系統樹を作製した。Bootstrap値は1000回サンプリングで行った。%: マウスと比較したときのホモロジーの割合。



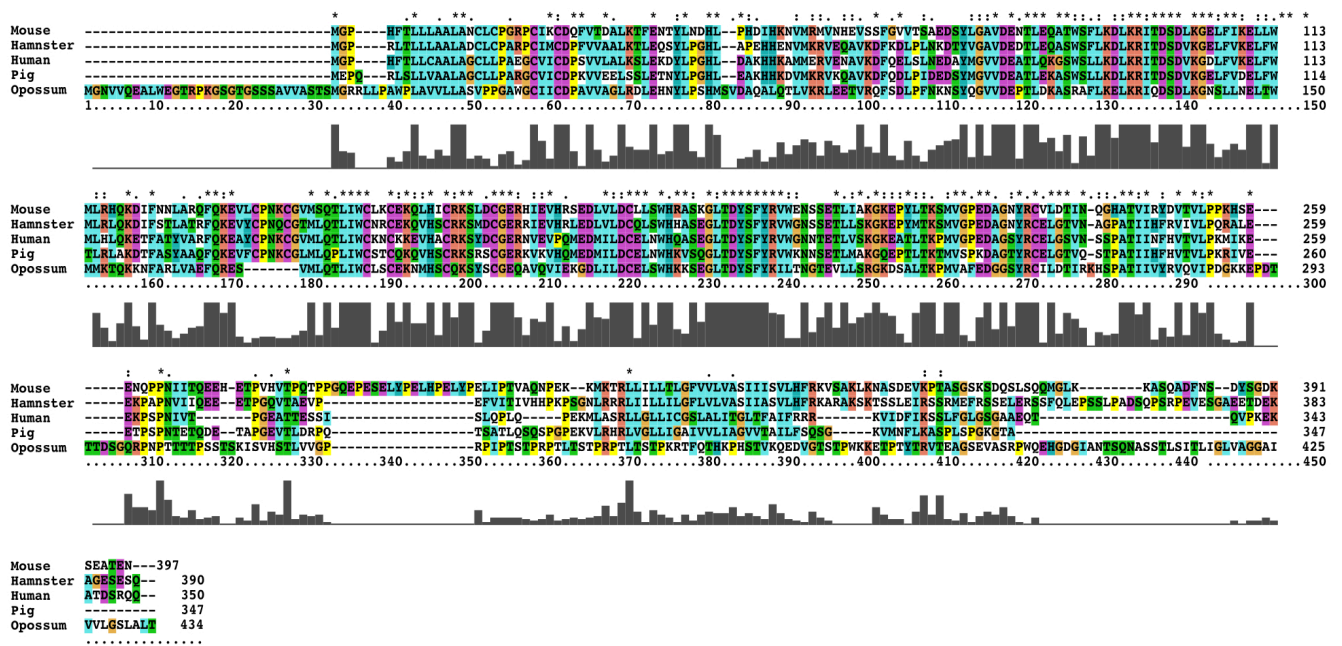
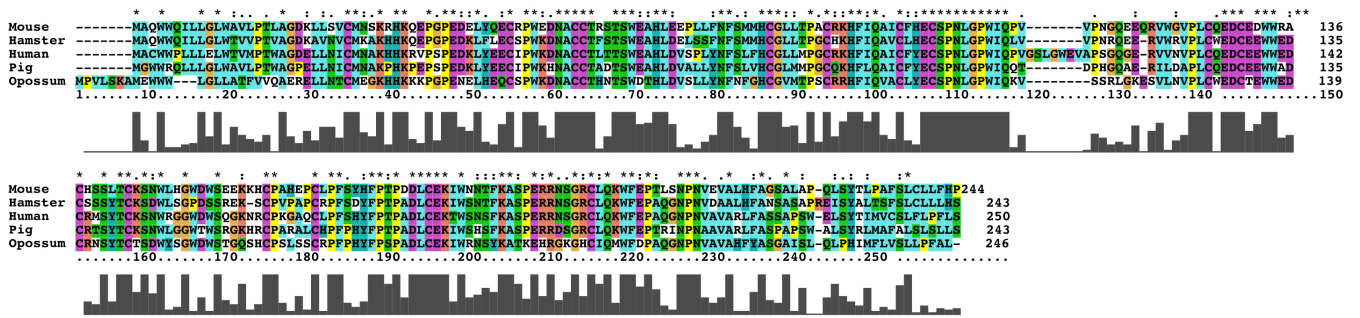


図12 : IZUMOのアミノ酸配列

Clustal X を用いて、IZUMOのアミノ酸配列をアライメントした。パラメーターやカラーコードはClustal Xのプログラムに従った。IZUMOの全長のアミノ酸配列は以下のものを用いた。

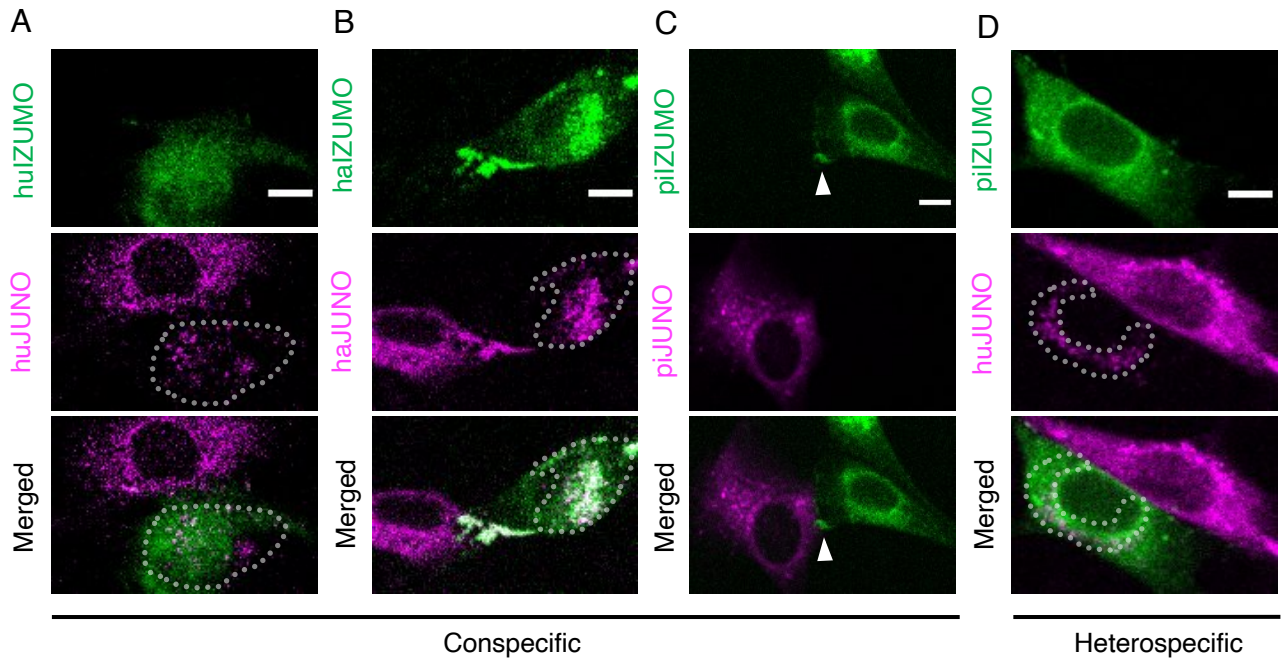
*Mus musculus* (Uniprot accession no. Q9D9J7); human, *Homo sapiens* (Q8IYV9); golden hamster, *Mesocricetus auratus* (A0A1U7QS27); pig, *Sus scrofa* (A0A287BMD8), opossum, *Monodelphis domestica* (H9H653).



### 図13 : JUNOのアミノ酸配列

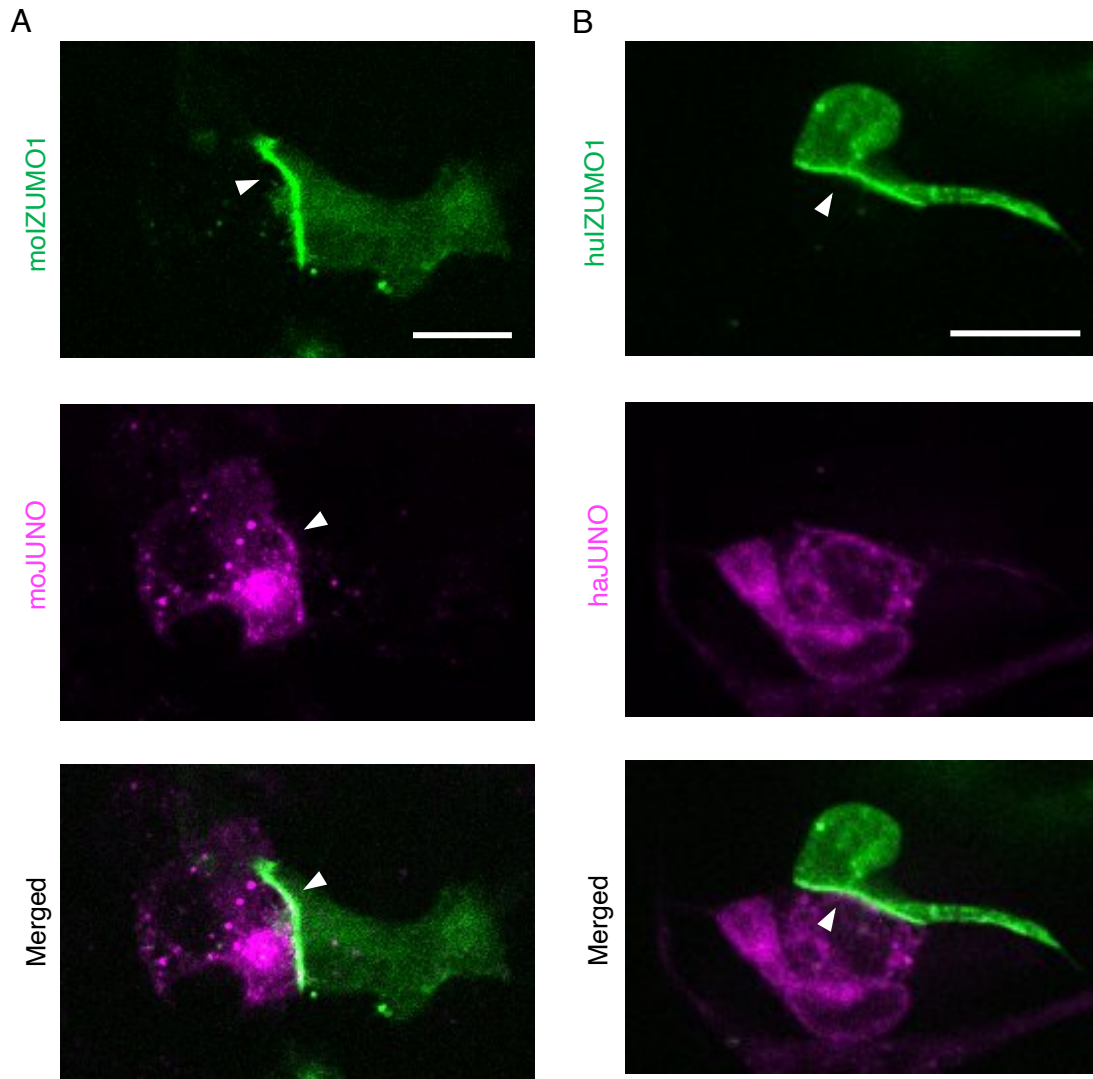
Clustal X を用いて、JUNOのアミノ酸配列をアライメントした。パラメーターやカラーコードはClustal Xのプログラムに従った。JUNOの全長のアミノ酸配列は以下のものを用いた。

mouse, *M. musculus* (Q9EQF4); human, *H. sapiens* (A6ND01); golden hamster, *M. auratus* (AOA1U7RC80); pig, *S. scrofa* (F1STK4), opossum, *M. domestica* (F7AHC3).



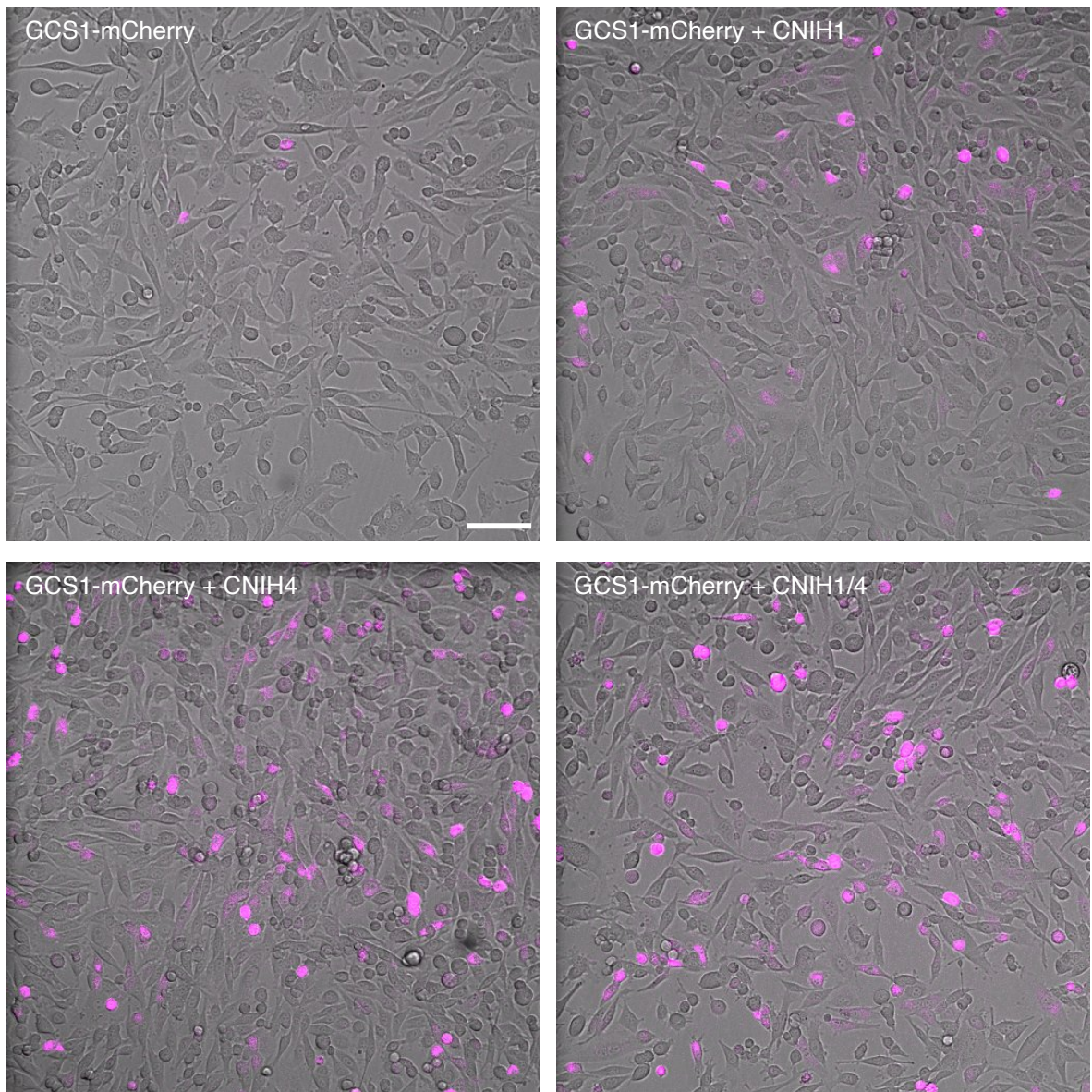
**図14：同種及び異種でのIZUMO・JUNOの集積及び移行**

(A-D) 同種及び異種でのIZUMO (緑)・JUNO (マゼンタ)の集積及び移行。点線で囲まれた領域に移行したシグナルが検出された。(C)の矢尻はIZUMOの集積を示した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。



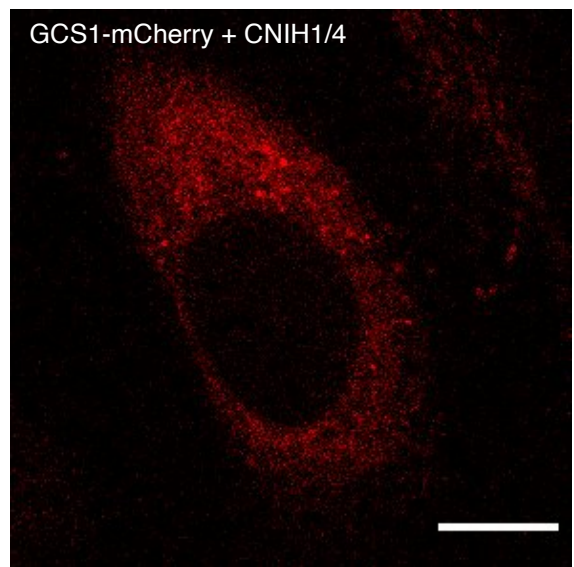
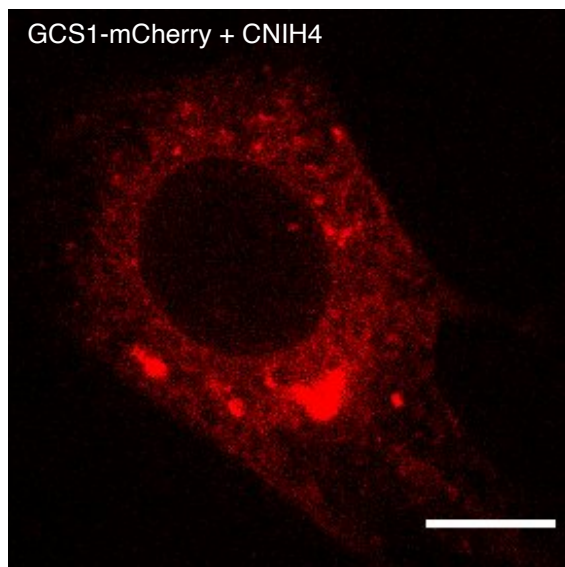
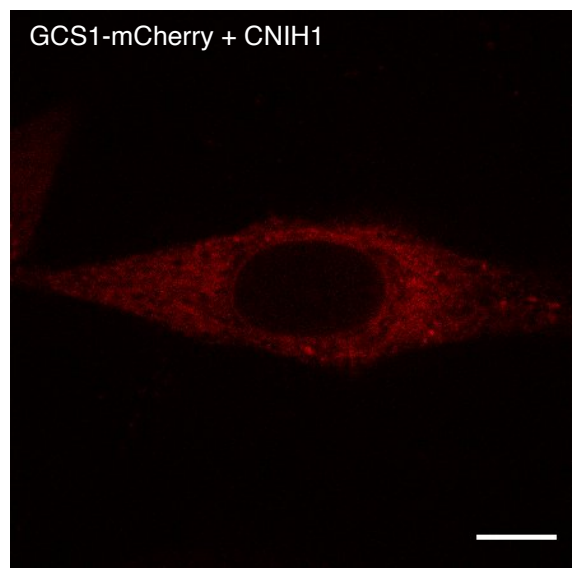
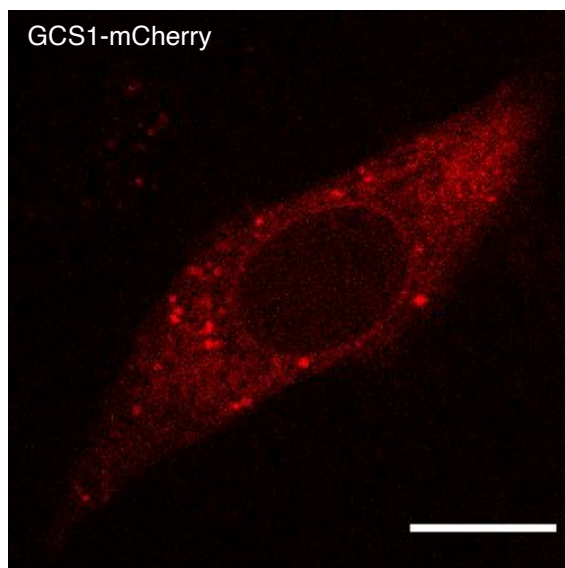
**図15：HEK293T細胞を用いた同種及び異種でのIZUMO・JUNOの集積**

(A) マウスIZUMO発現細胞 (緑)とマウスJUNO発現細胞 (マゼンタ)の集積。矢尻は集積を示した。(A) ヒトIZUMO発現細胞(緑)とハムスターJUNO発現細胞 (マゼンタ)の集積。矢尻は集積を示した。スケールバーは10 μm。



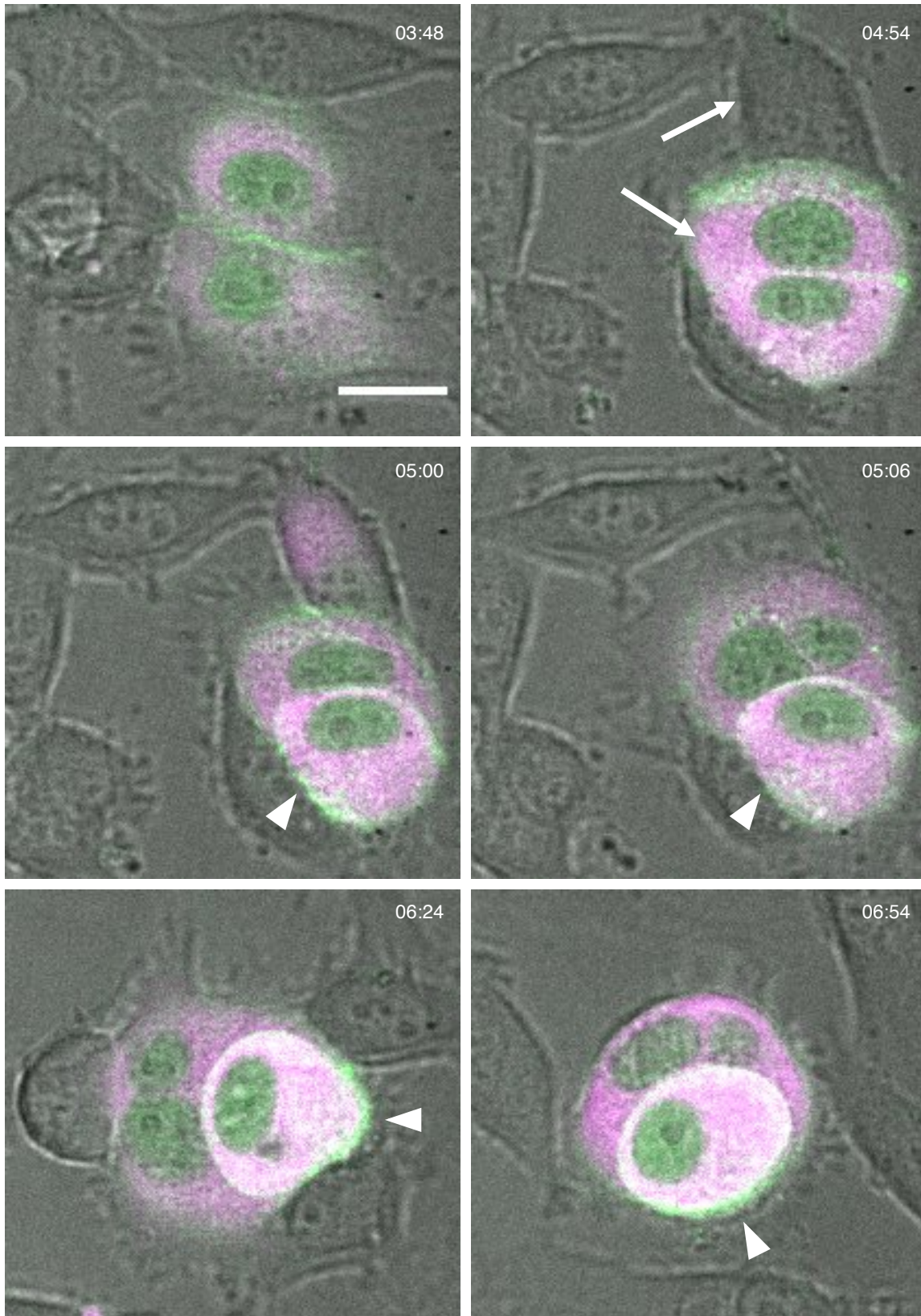
**図16：GCS1の発現効率**

CNIHとGCS1-mCherryを共導入したときのGCS1-mCherryの発現効率を調べた。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ 。

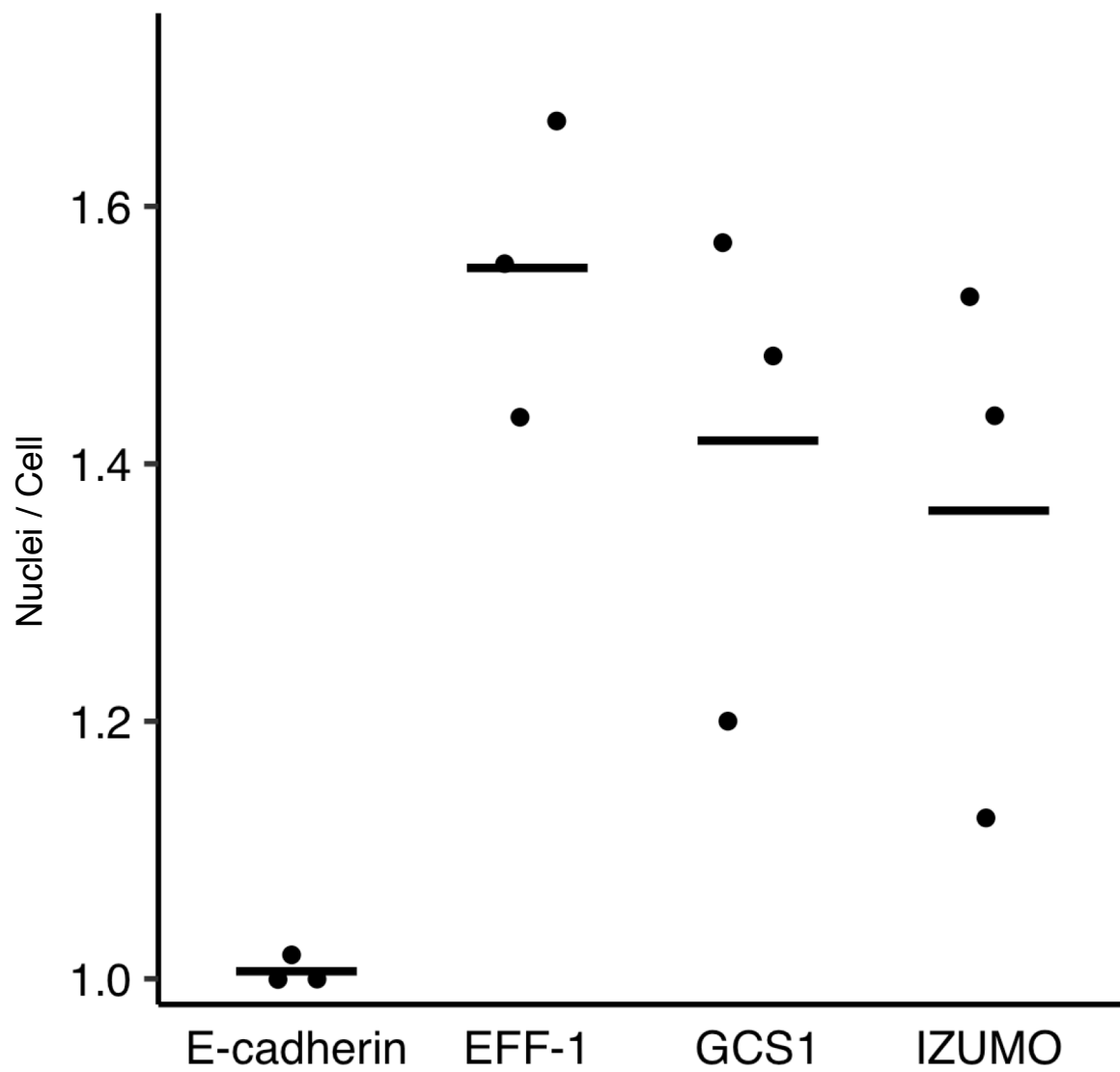


**図17：GCS1とCNIHの共導入によるBHK細胞内での局在**

(A) GCS1-mCherry, (B) GCS1-mCherry + CNIH1, (C) GCS1-mCherry + CNIH4, (D) GCS1-mCherry + CNIH1/4。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。

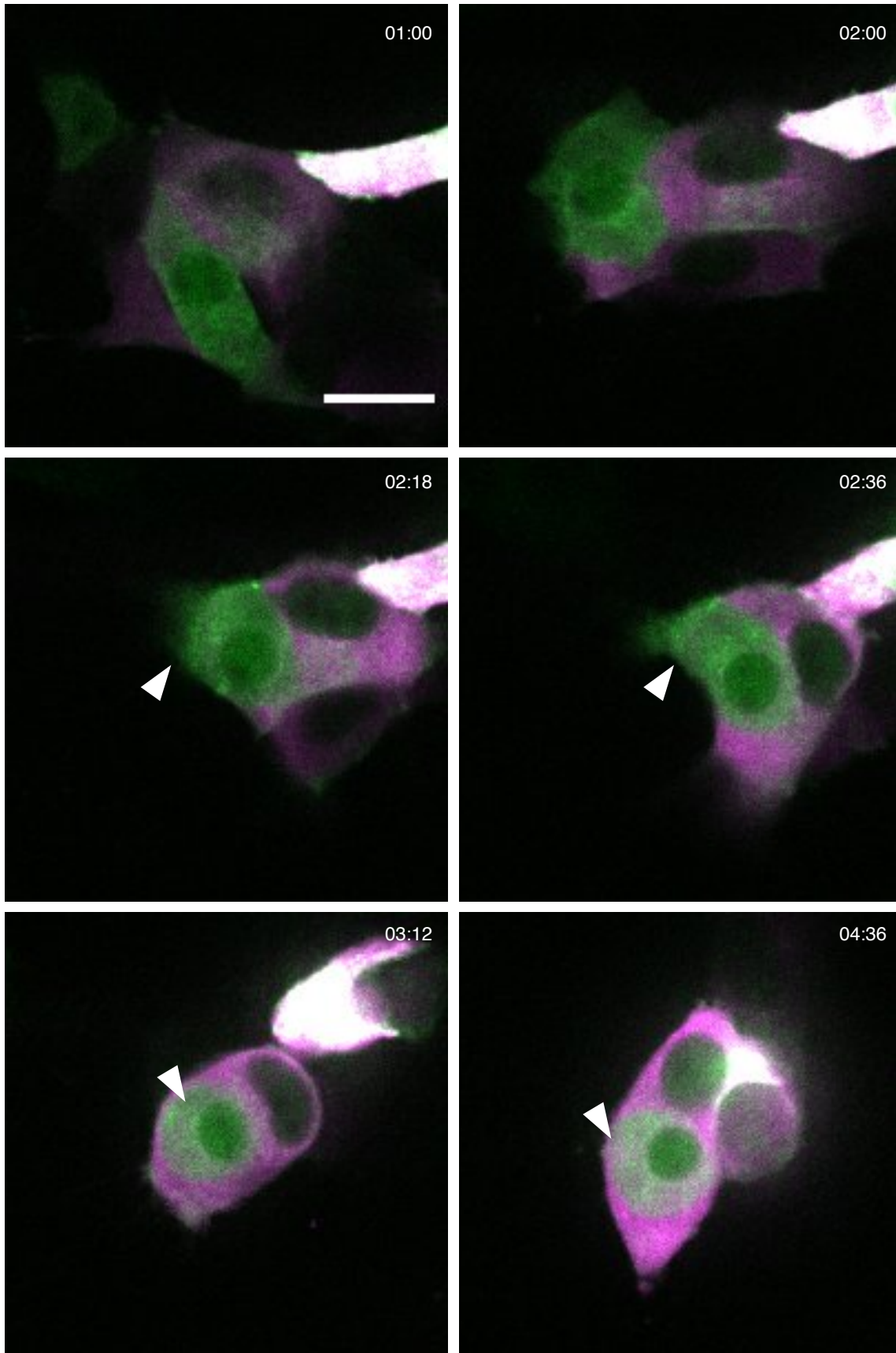


**図18：接着因子E-cadherin及び体細胞融合因子EFF-1発現細胞のタイムラプス解析**  
 E-cadherin (緑)、EFF-1、pRFPCyto (マゼンタ)を共導入した。矢尻は取り込まれた細胞を示した。矢印は、融合する細胞を示した。時間 (時：分) は観察開始からの時間を示した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

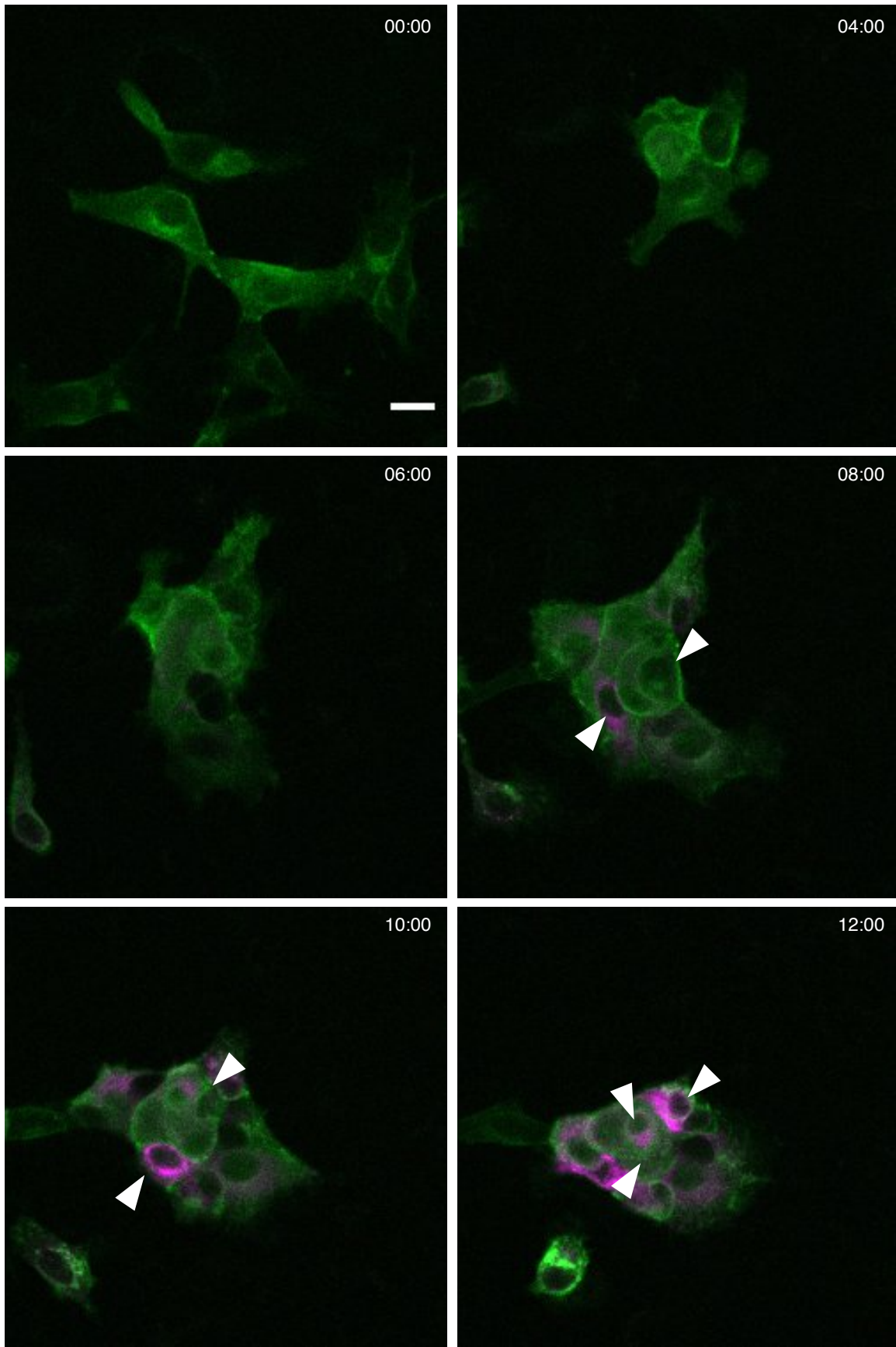


**図19：接着因子E-cadherinと融合因子を共導入したときの多核化率**  
 接着因子E-cadherinとEFF-1、GCS1そしてIZUMOをそれぞれ共導入したときの多核化率を示した。

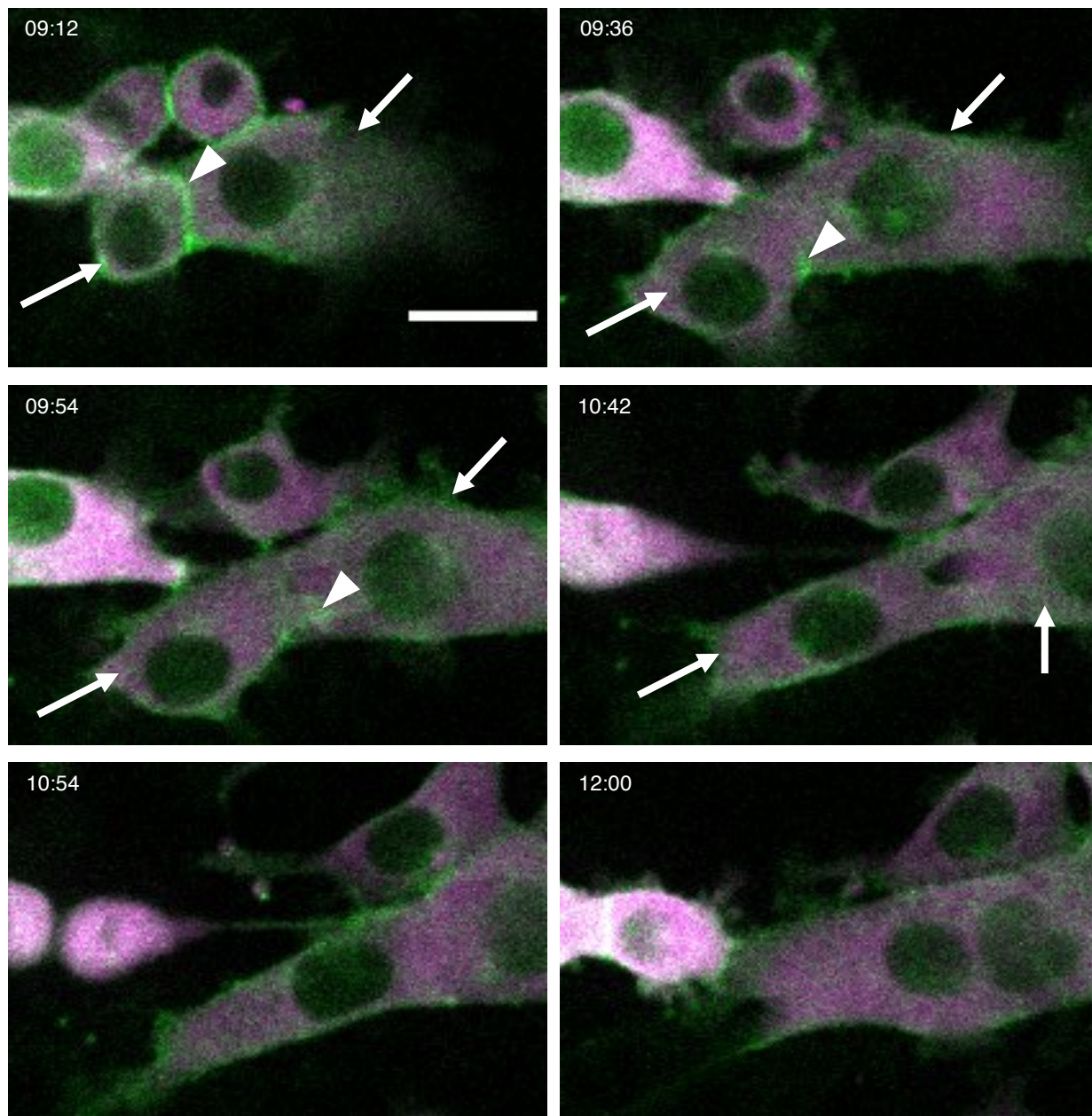




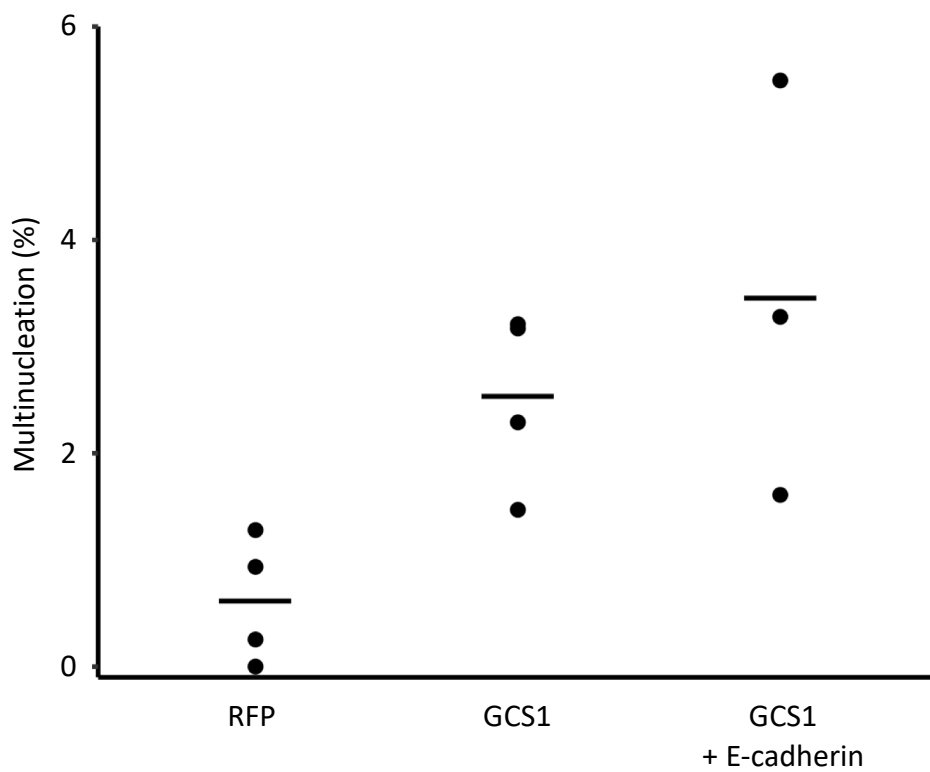
**図20：接着因子E-cadherin及び配偶子融合因子GCS1発現細胞のタイムラプス解析**  
 E-cadherin (緑)、GCS1、pRFPcyto (マゼンタ)を共導入した。矢尻は取り込まれた細胞を示した。時間 (時：分) は観察開始からの時間を示した。スケールバーは20  $\mu$ m。



**図21：接着因子E-cadherin及び接着因子IZUMO発現細胞のタイムラプス解析**  
 E-cadherin (緑)、IZUMO (マゼンタ)を共導入した。矢尻は取り込まれた細胞を示した。時間(時：分)は観察開始からの時間を示した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

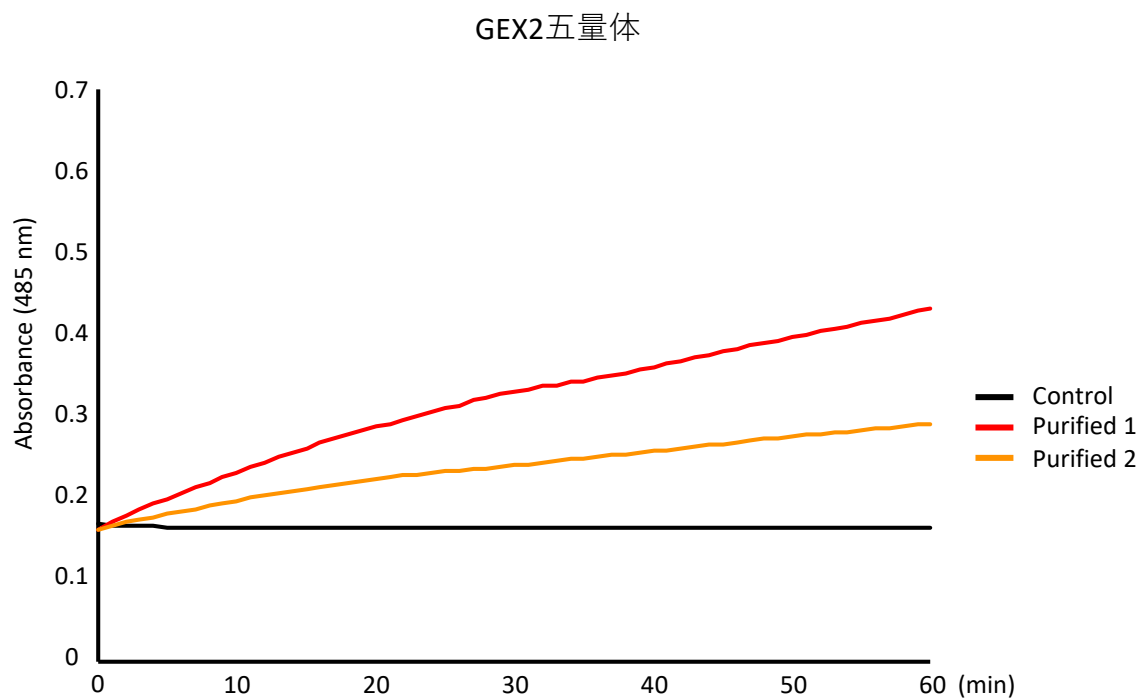
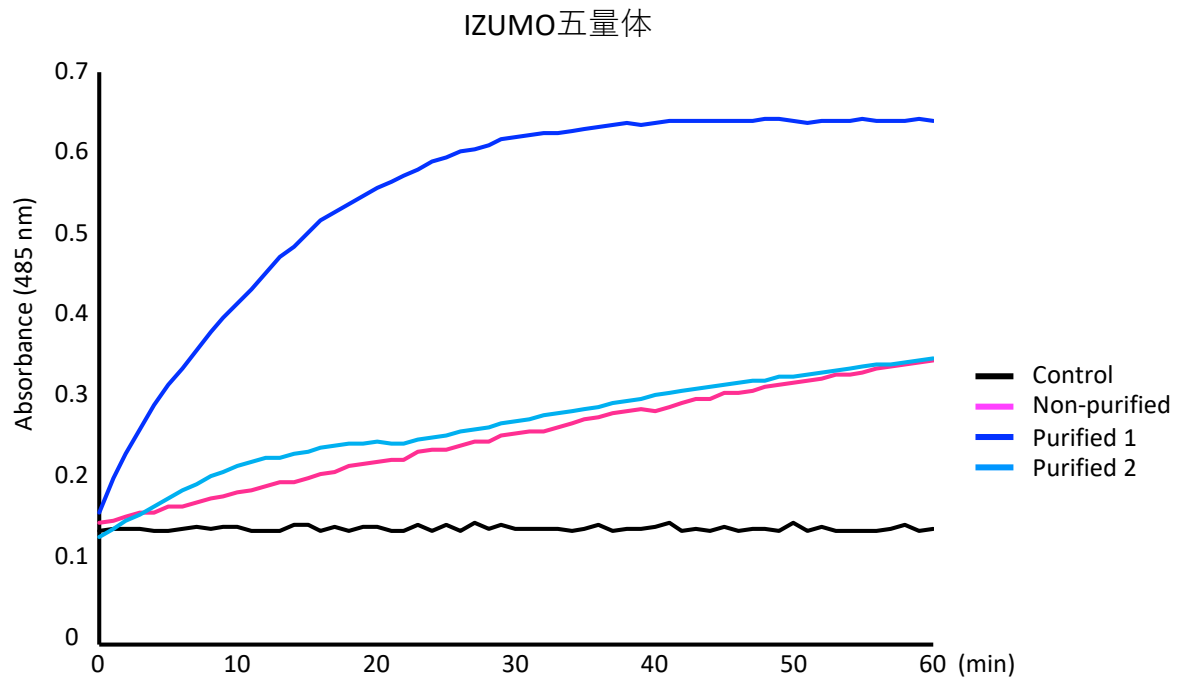


**図22：接着因子E-cadherin及び配偶子融合因子GCS1発現細胞 (非誘導)のタイムラプス解析**  
 E-cadherin (緑)、GCS1、pRFPcyto (マゼンタ)を共導入した。矢尻はE-cadherinの集積を示した。矢印は融合する細胞を示した。時間 (時：分) は観察開始からの時間を示した。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。



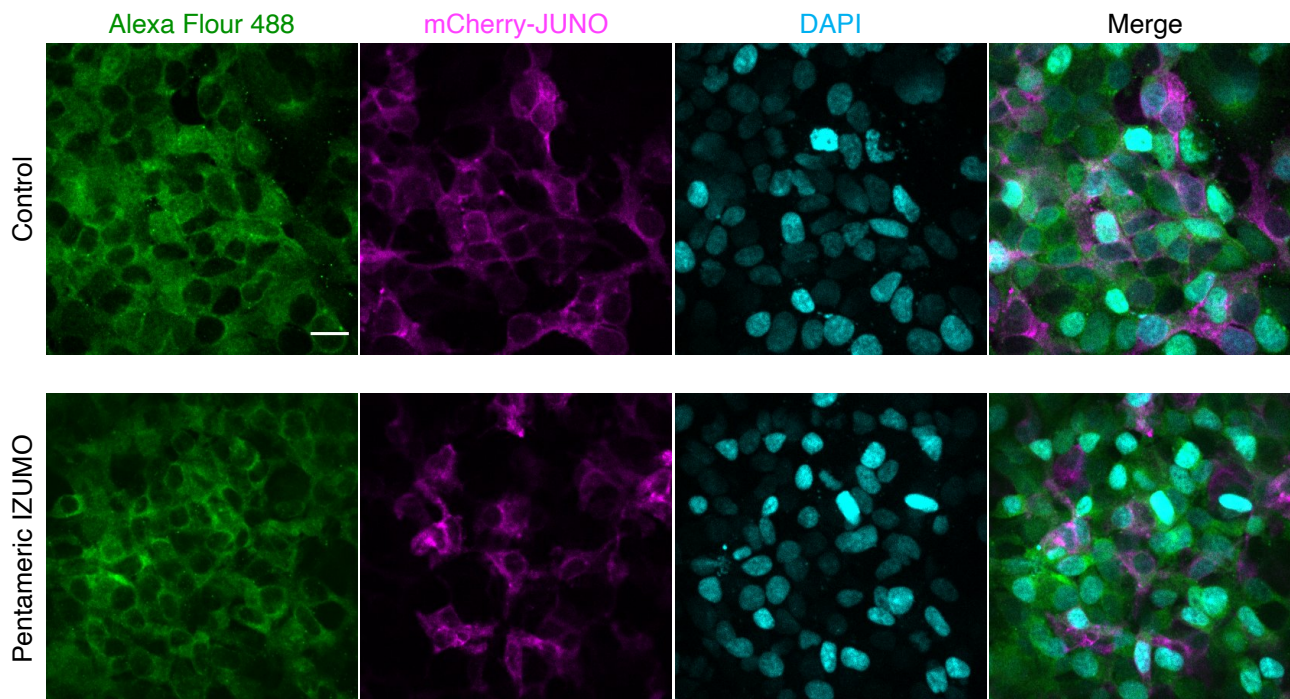
**図23：非誘導系のGCS1発現細胞の多核化率**

pRFPcyto、GCS1、E-cadherin + GCS1を導入したときの多核化率を示した。バーは平均を示した。



**図24：IZUMO五量体及びGEX2五量体の吸光度**

Nitrocefinの呈色反応変化を用いて、1分ごとに吸光度 (485 nm)を1時間測定し、相対的な濃度を求めた。



**図25：IZUMO五量体とJUNO発現細胞を用いたAVEXIS assay**

mCherry-JUNO発現細胞に、五量体IZUMOを添加した。五量体IZUMOをAlexa Flour 488で標識した (緑)。五量体IZUMOを添加していないコントロール(上段)と五量体IZUMOを添加した条件(下段)の両方において、Alexa Flour 488の蛍光が検出された。スケールバーは20  $\mu\text{m}$ 。

作製したプラスミド	管理番号	インサート			ベクター		
		テンプレート	プライマー/制限酵素		テンプレート	プライマー/制限酵素	
mouse E-cadherin-GFP	pKPN166	Addgene #67937					
pGENE::IZUMO-Venus	pKPN69	マウスの精巢cDNA pKPN3 上記の2断片	KPNp130 KPNp128 KPNp130	KPNp131 KPNp129 KPNp129	pKPN10	Kpn I	Not I
pGENE::IZUMO-mCherry	pKPN70	マウスの精巢cDNA pKPN4 上記の2断片	KPNp130 KPNp128 KPNp130	KPNp131 KPNp129 KPNp129	pKPN10	Kpn I	Not I
pGENE::IZUMO Δ-Venus	pKPN95	pKPN69	KPNp157	KPNp158			
pGENE::JUNO	pKPN75	マウスの卵巣cDNA	KPNp132	KPNp137	pKPN10	Kpn I	Not I
pGENE::mCherry-JUNO	pKPN167	pKPN4	KPNp208	KPNp206	pKPN75	KPNp207	KPNp209
pGENE::CD9-mTurquoise2	pKPN192	マウスの卵巣cDNA pKPN55 上記の2断片	KPNp220 KPNp128 KPNp220	KPNp221 KPNp129 KPNp129	pKPN10	Kpn I	Not I
mouse IZUMO-Venus	pKPN247	pKPN69	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
mouse mCherry-JUNO	pKPN248	pKPN167	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
humanIZUMO-Venus	pKPN260	人工合成 pKPN3 上記の2断片	KPNp434 KPNp128 KPNp434	KPNp435 KPNp129 KPNp129	pKPN166	Kpn I	Not I
hamsterIZUMO-Venus	pKPN261	人工合成 pKPN3 上記の2断片	KPNp436 KPNp128 KPNp436	KPNp437 KPNp129 KPNp129	pKPN166	Kpn I	Not I
pigIZUMO-Venus	pKPN262	人工合成 pKPN3 上記の2断片	KPNp438 KPNp128 KPNp438	KPNp439 KPNp129 KPNp129	pKPN166	Kpn I	Not I
humanJUNO	pKPN263	人工合成	KPNp440	KPNp441	pKPN166	Kpn I	Not I
hamsterJUNO	pKPN264	人工合成	KPNp445	KPNp446	pKPN166	Kpn I	Not I
pigJUNO	pKPN265	人工合成	KPNp449	KPNp450	pKPN166	Kpn I	Not I
mCherry-humanJUNO	pKPN269	pKPN4	KPNp444	KPNp206	pKPN263	KPNp442	KPNp443
mCherry-hamsterJUNO	pKPN270	pKPN4	KPNp444	KPNp206	pKPN264	KPNp447	KPNp448
mCherry-pigJUNO	pKPN271	pKPN4	KPNp444	KPNp206	pKPN265	KPNp451	KPNp452
IZUMO W148A-Venus	pKPN257	pKPN247	KPNp428	KPNp429			
mCherry-JUNO W62A	pKPN258	pKPN248	KPNp430	KPNp431			
SPACA6-Venus	pKPN245	マウスの精巢cDNA pKPN3 上記の2断片	KPNp420 KPNp128 KPNp420	KPNp421 KPNp129 KPNp129	pKPN166	Kpn I	Not I
pGENE::GCS1	pKPN76	pSN30	KPNp138	KPNp139	pKPN10	Kpn I	Pme I
pGENE::EFF-1	pKPN64	Benjamin Podbilewicz博士より分与していただき、形質転換し直した。					
GCS1	pKPN249	pKPN76	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
GCS1-mCherry	pKPN256	pKPN21	Kpn I	Pme I	pKPN166	Kpn I	Pme I
CNIH1	pKPN240	人工合成	KPNp400	KPNp401	pKPN166	Kpn I	Not I
CNIH4	pKPN241	人工合成	KPNp402	KPNp403	pKPN166	Kpn I	Not I

**表1：細胞接着や細胞融合に使用したプラスミド**

(A) 画像解析ソフトFijiのプラグインMTrackJを用いて、BHK細胞、COS-7細胞、HeLa細胞のトラッキングを行った。スケールバーは50 μm。(B) 各培養細胞の移動距離。ドットは各細胞の移動距離を示した。バーは平均を示した。

作製したプラスミド	管理番号	インサート			ベクター		
		テンプレート	プライマー/制限酵素		テンプレート	プライマー/制限酵素	
pGENE::ToreniaGEX2	pKPN183	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp222	KPNp223	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfA001479	pKPN184	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp224	KPNp225	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfA035026	pKPN185	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp226	KPNp227	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfA051419	pKPN186	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp228	KPNp229	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfB080621	pKPN187	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp234	KPNp235	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfA021506	pKPN189	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp238	KPNp239	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT3G19700	pKPN190	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp246	KPNp247	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT2G24130	pKPN191	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp248	KPNp249	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT3G02880	pKPN194	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp260	KPNp261	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT1G31420	pKPN195	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp262	KPNp263	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT2G01820	pKPN197	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp254	KPNp255	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT3G16860(w/o mCherry)	pKPN198	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp293	KPNp294	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT4G16180	pKPN199	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp256	KPNp257	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT4G25240(w/o mCherry)	pKPN200	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp264	KPNp265	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT5G01950	pKPN201	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp250	KPNp251	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT5G58100	pKPN202	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp252	KPNp253	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT4G25240	pKPN203	pKPN200	KPNp269	KPNp270	pKPN4	KPNp264	KPNp206
pGENE::AT2G02220	pKPN204	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp291	KPNp292	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT4G39400	pKPN205	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp297	KPNp298	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT5G06820	pKPN206	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp299	KPNp300	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::TfA002688	pKPN207	トレニアの雌蕊cDNA	KPNp303	KPNp304	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT5G11560	pKPN212	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp317	KPNp318	pKPN21	KPNp267	KPNp266
pGENE::AT3G16860	pKPN213	pKPN198	KPNp307	KPNp308	pKPN4	KPNp267	KPNp206
pGENE::AT3G61640(w/o mCherry)	pKPN223	シロイヌナズナの雌蕊cDNA	KPNp329	KPNp330	pKPN21	KPNp276	KPNp266
GEX2::Venus	pKPN276	pKPN67	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
ToreniaGEX2	pKPN277	pKPN183	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
TfA001479	pKPN278	pKPN184	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
TfA035026	pKPN279	pKPN185	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
TfA051419	pKPN280	pKPN186	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
TfA021506	pKPN281	pKPN189	KPNp459	KPNp458	pKPN166	Kpn I	Not I
AT3G19700	pKPN282	pKPN190	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT2G24130	pKPN283	pKPN191	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT3G02880	pKPN284	pKPN194	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT1G31420	pKPN285	pKPN195	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT2G01820	pKPN286	pKPN197	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT3G16860(w/o mCherry)	pKPN287	pKPN198	Hind III	Pme I	pKPN166	Hind III	Pme I
AT4G16180	pKPN288	pKPN199	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT4G25240(w/o mCherry)	pKPN289	pKPN200	Hind III	Pme I	pKPN166	Hind III	Pme I
AT5G58100	pKPN290	pKPN202	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT4G25240	pKPN291	pKPN203	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT2G02220	pKPN292	pKPN204	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT4G39400	pKPN293	pKPN205	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT5G06820	pKPN294	pKPN206	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
TfA002688	pKPN295	pKPN207	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT3G16860	pKPN296	pKPN213	Hind III	Pme I	pKPN166	Hind III	Pme I
AT3G61640(w/o mCherry)	pKPN297	pKPN223	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT1G09790	pKPN298	pKPN275	Nhe I	Pme I	pKPN166	Nhe I	Pme I
AT1G80540	pKPN299	pKPN233	Hind III	Pme I	pKPN166	Hind III	Pme I
AT5G51480	pKPN300	人工合成	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
IZUMO-Cd4d3+4-COMP-blac-3xFLAG-6his	pKPN237	pKPN74	KPNp393	KPNp394	pKPN236	Not I	Asc I
GEX2-Cd4d3+4-COMP-blac-3xFLAG-6his	pKPN238	pKPN67	KPNp395	KPNp396	pKPN236	Not I	Asc I
FUS1-Venus	pKPN82	pKPN82	Kpn I	Not I	pKPN166	Kpn I	Not I
MAR1-mCherry	pKPN307	人工合成 pKPN4 上記の2断片	KPNp469 KPNp471 KPNp128 KPNp469	KPNp470 KPNp472 KPNp458 KPNp458	pKPN166	Kpn I	Not I

表2: GEX2パートナーのスクリーニングに使用したプラスミド

(A) 画像解析ソフトFijiのプラグインMTrackJを用いて、BHK細胞、COS-7細胞、HeLa細胞のトラッキングを行った。スケールバーは50 μm。(B) 各培養細胞の移動距離。ドットは各細胞の移動距離を示した。バーは平均を示した。



名称	塩基配列 (5'→3')
KPNp128	TCAGGTGGAGGGGGCAGCGGGGGGGAGGTATGGTGAGCAAGGGCGAG
KPNp129	GTGACCTCGAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
KPNp130	TCACAGGCCACCAAGCTTGGTACCATGGGGCCGCATTTTACACTC
KPNp131	GCTGCCCCCTCCACCTGAGTTTTCTGTTGCCTCGCTCTTATCT
KPNp132	TCACAGGCCACCAAGCTTGGTACCATGGCACAGTGGTGGCAGA
KPNp137	GTGACCTCGAGCGGCCGCTCAGGGATGGAACAACAGGCACAGA
KPNp138	TCACAGGCCACCAAGCTTGGTACCATGGTGAACGCGATTTTAATGGCT
KPNp139	GTGACCTCGAGCGGCCGCTTAACTCTCACGTAGTCTTTGTTTCCTCTG
KPNp157	GATTGTGGAGAGCGCCACATAG
KPNp158	AAGAACTTCCTTTTGAAGTGTCTAGC
KPNp206	TCCACCACCTCCAGATCCACCACCTCCAGACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
KPNp207	GTGGATCTGGAGGTGGTGGAGGGGACAAACTGCTCAGCG
KPNp208	CAGTCCTACCCACCTTGGCAATGGTGGAGCAAGGGCGAGG
KPNp209	TGCCAAGGTGGGTAGGACTG
KPNp220	TCACAGGCCACCAAGCTTGGTACCATGCCGGTCAAAGGAGGTAG
KPNp221	GCTGCCCCCTCCACCTGAGACCATTTCTCGGCTCCTGC
KPNp222	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGGCATCTCAAACGACACTACAT
KPNp223	GCCCTTGCTCACCATCCATGAAAGGCAACTTACTGGTGTGTAGC
KPNp224	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGAGGAAGCGAGACTTGGC
KPNp225	GCCCTTGCTCACCATCCATGACAAGTGCCCCGAAGATGG
KPNp226	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGAGGACCATTATCTTATTCTTGATCTTAACTCCA
KPNp227	GCCCTTGCTCACCATCCATGAAACCATGTGATGTAGTATAAAGGAGAGATGG
KPNp228	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGACAGACGCCGTACACG
KPNp229	GCCCTTGCTCACCATCCATGAAAAGTCTTCTCTTGTTCGAAAAG
KPNp234	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGTTGAAGAGATTGAAAGAGATGGGGAAG
KPNp235	GCCCTTGCTCACCATCCATGAAAGAACATGGGAAGAAGATGATGATG
KPNp238	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGTGTTGCCCTCGAGTTGC
KPNp239	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGTTGATCTTCGGCTTTGGTCTTC
KPNp246	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGCTCCGGCTACTATTTATCGTTCCG
KPNp247	GCCCTTGCTCACCATCCATGATACAACCTTTAGTAATCTCATCATTAGCACTCTCACC
KPNp248	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGGATTATTGTTCTTTGTTGGTTGTCTCG
KPNp249	GCCCTTGCTCACCATCCATGATGAACTAGCTTCTCCTTGTTTCTTG
KPNp250	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGGTGTTCCTCAAAGACTCTATCTAC
KPNp251	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGCGAGGAGCGATGCTGG
KPNp252	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGCGGAGATTCGGGGCT
KPNp253	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGTTGATCTTTGGCTTAGGAGCTCT
KPNp254	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGTCAAATTCCTTTGGTACTCTCTG
KPNp255	GCCCTTGCTCACCATCCATGAACGTCCATCCACAGAAGTGAACG
KPNp256	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGGAGTTGAGATCGGATTCACGATC
KPNp257	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGCGAGAAGGAGGAGAAGAGAAG
KPNp260	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGAAGTATAAGCGTAAGCTAAGTCTCTCTG
KPNp261	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGTCCGATACAGGATTTGGGGAG
KPNp262	TTCACAGGCCACCAAGCTTGTATGATGGGCATCTGTGAGATGAAAAG

表3：クローニングに使用したプライマー

KPNp263	GCCCTTGCTCACCATCCATGAATCAGAGCTGGAATCATAAAATTCGCTG
KPNp264	AGCTTGGTACCATGGCGGCGACTTGTCT
KPNp265	CTCGAGCGGCCGAGCAAAATCTGAACACCGAGGC
KPNp266	CAAGCTTGGTGGCCTGTGAA
KPNp267	CATGGATGGTGAGCAAGGGC
KPNp269	GTGGATCTGGAGGTGGTGGAGCGGACCCTTTCGTCTCCTAC
KPNp270	CGCGAAAGAAACGGCGGAGA
KPNp291	TTCACAGGCCACCAAGCTTGATGCGTGTTTCATCGTTTTTGTGTG
KPNp292	GCCCTTGCTCACCATCCATGAGACATCATCAAGCCAAGAGACTAACT
KPNp293	CACCAAGCTTGGTACCATGGGTTAACTCGAAATTTCAATTTATGGATTC
KPNp294	CTCGAGCGGCCGCAAAATCCGAAGAAACAGTAGAGCCAAAAAT
KPNp297	TTCACAGGCCACCAAGCTTGATGAAGACTTTTTCAAGCTTCTTTCTCTCTG
KPNp298	GCCCTTGCTCACCATCCATGATAATTTTCCTTCAGGAACTTCTTTATACTCATATCAACC
KPNp299	TTCACAGGCCACCAAGCTTGATGAAAACCAAACAGCAATTGCGATT
KPNp300	GCCCTTGCTCACCATCCATGAAGAGGAGAGGTAGCTGAAGGTAGG
KPNp303	TTCACAGGCCACCAAGCTTGATGTCTCCCACCACCCTCAT
KPNp304	GCCCTTGCTCACCATCCATGATAGCCTATGCATCCAGATAAACACTAC
KPNp307	CTCGCCCTTGCTCACCATAGACGACGTTAGTTGAATCGCC
KPNp308	GTGGATCTGGAGGTGGTGGACAACGCAACTCCACCAC
KPNp329	TTCACAGGCCACCAAGCTTGGTACCATGGCGTCGAGGAACTCC
KPNp330	ATGGGTGACCTCGAGCGGCCGCTTAGAAGAAGGTGTAGGAGGAAGAAGATGC
KPNp393	TCCAAGTTTAAACTGCGGCCGCCACCATGGGGCCGCATTTTACACTC
KPNp394	TGATGGAGGTGACGCGCGCGCGGAGTTTTTCAATTTTTCTCTGGATTTTGAG
KPNp395	TCCAAGTTTAAACTGCGGCCGCCACCATGGCGATTAATTCGTTTCACTGTAAATC
KPNp396	TGATGGAGGTGACGCGCGGCCCTCTGACGGTAAGTTTGTGACGAG
KPNp400	AGATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGCTTGGGATTTGTTTTTA
KPNp401	GCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCTCAAAACAAATGAAGTAGATCA
KPNp402	AGATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGGAGATATCTGGACATGG
KPNp403	GCTGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCTCAGTCCTCGTAATCATCCAG
KPNp428	GCATGTCTTAAGTGCAGAAAGCAGTTGC
KPNp429	GATCAAAGTCTGCGACATCACTCC
KPNp430	GCAGAAGCCCACCTTGAGGAGC
KPNp431	ACTTGTGGAACGTGTGCAGC
KPNp434	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGGGCCGCATTTTACCC
KPNp435	GCTGCCCCCTCCACCTGATTGTTGCCTCGAATCTGTGGC
KPNp436	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGGGCCGCTTTAC
KPNp437	GCTGCCCCCTCCACCTGATTGGCTTTCTGATTCCCCTGC
KPNp438	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGAGCCGCGAGCGG
KPNp439	GCTGCCCCCTCCACCTGAAGCAGTGCCCTTGCCAGG
KPNp440	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGCATGCTGGTGGCC
KPNp441	TGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTATCAGGAAAGGAACGGCAGGAAC
KPNp442	CCTCGCCCTTGCTCACCATAGCCAGGTGGGCATG
KPNp443	GTGGATCTGGAGGTGGTGGAGGGACGAGCTGCTCAACA

表3：クローニングに使用したプライマー (続き)

KPNp444	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG
KPNp445	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGCACAGTGGTGGCAG
KPNp446	TGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTATCAGGAATGGAGCAGCAGGC
KPNp447	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTCCTGCCACAGTGGGCAC
KPNp448	GTGGATCTGGAGGTGGTGGAGACAAGGGCGGTCAACGTCTG
KPNp449	GATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGGATGGTGGAGGCAGC
KPNp450	TGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTAGGACAACAAGCTCAGTGAAAGAGC
KPNp451	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCCCAGGTAGGCAGCA
KPNp452	GTGGATCTGGAGGTGGTGGAGGTCCAGAACTCTTGAACATCTGTATG
KPNp458	TGATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
KPNp459	AGATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGTGTTGCCCTCGAGTTGC
KPNp469	ATGGCCAGAATGCTGGTGACCATGCTGGCCGGCGAGCTGCTGCTGGGCTGTCTGTTTCGCTCAGTTAGC
KPNp470	TCGGTGAGGCAGCCACACTCCGTCGTGCTCGTCGCCGTCGCCCT
KPNp471	AGATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCATGGCCAGAATGCTGGTGAC
KPNp472	CCGCTGCCCCCTCCACCTGATCGGTGAGGCAGCCACAC

表3：クローニングに使用したプライマー (続き)

IZUMO				
JUNO	Mouse	Human	Hamster	Pig
Mouse	72% (n = 54)	0.0% (n = 50)	33% (n = 36)	0.0% (n = 64)
Human	50% (n = 38)	27% (n = 51)	0.0% (n = 58)	48% (n = 63)
Hamster	78% (n = 40)	0.0% (n = 46)	77% (n = 57)	13% (n = 84)
Pig	0.0% (n = 26)	0.0% (n = 38)	0.0% (n = 37)	24% (n = 41)

n : number of contacted cells

表4：同種及び異種でのIZUMOの集積率

IZUMO				
JUNO	Mouse	Human	Hamster	Pig
Mouse	37% (n = 54)	2.0% (n = 50)	25% (n = 36)	0.0% (n = 64)
Human	0.0% (n = 38)	29% (n = 51)	3.4% (n = 58)	49% (n = 63)
Hamster	0.0% (n = 40)	0.0% (n = 46)	16% (n = 57)	7.1% (n = 84)
Pig	0.0% (n = 26)	0.0% (n = 38)	0.0% (n = 37)	0.0% (n = 41)

n : number of contacted cells

表5：同種及び異種でのJUNOの集積率

IZUMO				
JUNO	Mouse	Human	Hamster	Pig
Mouse	28% (n = 54)	0.0% (n = 50)	0.0% (n = 36)	0.0% (n = 64)
Human	0.0% (n = 38)	0.0% (n = 51)	0.0% (n = 58)	3.2% (n = 63)
Hamster	0.0% (n = 40)	0.0% (n = 46)	44% (n = 57)	0.0% (n = 84)
Pig	0.0% (n = 26)	0.0% (n = 38)	0.0% (n = 37)	0.0% (n = 41)

n : number of contacted cells

表6：同種及び異種でのIZUMOの移行率

IZUMO				
JUNO	Mouse	Human	Hamster	Pig
Mouse	7.4% (n = 54)	0.0% (n = 50)	0.0% (n = 36)	0.0% (n = 64)
Human	0.0% (n = 38)	65% (n = 51)	0.0% (n = 58)	32% (n = 63)
Hamster	0.0% (n = 40)	0.0% (n = 46)	28% (n = 57)	0.0% (n = 84)
Pig	0.0% (n = 26)	0.0% (n = 38)	0.0% (n = 37)	0.0% (n = 41)

n : number of contacted cells

表7：同種及び異種でのJUNOの移行率

	CCx6	CCx7	ECx15	ECx17	ECx18	SYx13	SYx14	SYx4	S-C	S-E	E-C	クローニング
AT1G31420.2	104.465999	116.680079	128.367786	58.6591011	77.1504913	1.41553957	72.3710335	0.76786332	0.09269091	0.16000122	0.76975954	○
AT1G56140.1	115.377341	15.5086891	115.681867	44.2178218	130.765678	0.28310791	0.08656822	0.230359	0.30634789	0.08695946	0.71904171	×
AT1G56145.1	128.713426	38.3155849	62.401007	111.88553	22.7172328	0.14155396	29.3466272	0.15357267	0.22225984	0.31245882	0.88788516	×
AT2G01820.1	179.363607	183.82358	554.340374	440.321482	342.079992	0.56621583	0.43284111	1.07500865	0.06970782	0.00108624	0.01750803	○
AT2G02220.1	21.7553305	101.809983	428.029764	302.923025	254.294564	0.70776978	0.25970467	0.99822232	0.5657722	0.0030712	0.01217963	○
AT2G24130.1	80.8247574	22.1683027	81.3955992	5.70774372	157.950843	0.14155396	0.17313644	0.30714533	0.56023783	0.22371864	0.80525661	○
AT3G02880.1	123.931295	250.875853	303.913476	191.106263	297.337742	338.313957	332.162267	584.420775	0.13641717	0.27321923	0.72824453	○
AT3G16860.1	265.172558	298.040514	125.693457	115.117626	104.713228	157.832662	26.7495806	0.61429066	0.01595236	0.50440036	0.04592781	○
AT3G19700.1	48.0233767	62.7645771	157.579686	122.20073	239.946838	0.56621583	0.25970467	0.38393166	0.34109598	0.00628531	0.04496332	○
AT3G28720.1	179.565669	71.7048802	69.4639781	60.034461	36.687387	0	32.0302421	0.230359	0.04524717	0.38521934	0.19621237	×
AT3G62360.1	442.044069	452.762494	236.986681	166.48732	471.083669	16.9864748	6.14634375	92.2203851	0.01823641	0.06985203	0.31937115	×
AT4G16180.2	102.916858	150.61674	96.618702	64.2293088	26.3041642	69.2198848	0.08656822	0.15357267	0.06046353	0.45261033	0.22934782	○
AT4G25240.1	90.3890203	137.844878	227.249381	442.659594	358.567292	1.13243165	0.69254578	0.76786332	0.27192312	0.00442151	0.03608187	○
AT4G39400.1	31.5216554	97.6135138	23.3832345	46.9685417	149.895979	0.14155396	0.17313644	0.230359	0.37142464	0.23490623	0.97731945	○
AT5G01950.1	245.303139	229.984737	26.6061436	30.3954545	95.9032208	6.65303596	41.8990194	1.61251298	0.00090325	0.38217704	0.00197402	○
AT5G06820.1	126.221329	63.8593081	190.014495	49.3754216	58.7124049	0.14155396	0.17313644	1.15179498	0.22328675	0.1524377	0.99568608	○
AT5G11560.1	410.791829	319.205313	624.83294	823.634295	676.671479	316.373093	88.9921321	606.381666	0.98425298	0.11049632	0.18377523	○
AT5G47020.1	97.5958945	169.774532	61.0295563	134.028825	52.1048995	58.0371222	19.8241228	0.84464966	0.07512355	0.29842289	0.41928095	×
AT5G58100.1	85.0680571	198.602448	230.403718	49.8567975	56.6357603	673.230618	34.713857	1035.07976	0.38156486	0.27797902	0.99468089	○
AT1G09790.1	0.33676982	0	302.473453	180.172151	294.128382	0.70776978	0.08656822	0.69107699	0.99996218	0.00174132	0.00287955	○
AT1G80540.1	94.6323201	104.729265	559.551887	343.908751	516.832777	381.629467	402.801936	174.151402	0.15755007	0.27691035	0.02843954	○
AT3G61640.1	4.37800769	15.3262339	40.8692309	65.9485087	81.870138	5.2374964	23.027147	73.8684517	0.60353827	0.4332079	0.1619193	○
AT5G51480.1	15.0199341	40.687502	39.7720704	226.246709	94.6446484	0.28310791	0.08656822	0.15357267	0.87641598	0.12940803	0.30840597	○

表8：シロイヌナズナのトランスクリプトームデータを用いたGEX2パートナー分子候補のクローニング結果

CCは中央細胞、ECは卵細胞、SYは助細胞を表している。S-C、S-E、E-Cは各細胞間での有意差を示している。



	TfECx19-mRNA	TfECx18-mRNA	TfECx22-mRNA	TfCCx10-mRNA	TfCCx6-mRNA	TfCCx9-mRNA	TfSYx16-mRNA	TfSYx17-mRNA	TfSYx32-mRNA	S-C	E-S	E-C	クローニング
TfA001479	153.0274958	210.7303915	61.79679967	253.7749391	242.9310255	263.0213561	108.0192267	60.00090885	128.2402334	0.01818559	0.5509352	0.06718289	○
TfA002688	291.4393932	482.6559363	302.0799603	72.17001367	53.25484627	69.38007187	577.9202667	384.6505405	401.0404984	0.00388466	0.42802155	0.01502888	○
TfA021506	222.069837	68.21949963	104.9187423	121.1354998	124.4970979	115.5618535	93.51610821	68.5279011	98.9387773	0.68094953	0.51833834	0.95414903	○
TfA035026	143.4291924	43.09853205	50.9314283	41.68949019	45.877989	65.29889118	19.84026613	26.204903	22.34699656	0.57981285	0.17294346	0.57900341	○
TfA051419	82.67629493	163.7029878	96.20380901	164.4965026	170.2740341	157.4476554	16.59156759	41.49109642	18.91612987	0.00168733	0.01525074	0.13159139	○
TfB072915	146.1559831	146.3207069	145.0979802	89.3767608	101.8612619	121.6836245	42.92923081	125.5131664	135.1946929	0.99167073	0.25454515	0.2958302	○
TfB073216	115.1796404	28.09738554	12.4499047	57.81467035	64.26960574	60.8995512	15.663368	9.566869349	20.02884339	0.26394839	0.39745639	0.93681098	×
TfB077744	280.9685168	214.4211498	173.3932181	86.50123037	118.1394413	123.2184949	75.70305311	144.096401	0.954058487	0.03139044	0.02229314	0.40277606	×
TfB080621	43.30143679	124.6523841	82.50891385	70.40017683	66.08856685	73.35388308	1.740374222	3.22361902	0	0.02820777	0.01277335	0.77088951	○
TfB088790	102.963618	134.4150351	129.3658279	143.1601361	123.9918337	123.0798179	38.28823289	101.6999807	67.96825095	0.03266535	0.05582692	0.90020366	×

表9：トレニアのトランスクリプトームデータを用いたGEX2パートナー分子候補のクローニング結果

CCは中央細胞、ECは卵細胞、SYは助細胞を表している。S-C、S-E、E-Cは各細胞間での有意差を示している。