

—総説—

特集：卵子学会トピックス 2018

精子先体膜タンパク質 EQUATORIN の機能； 遺伝子改変マウスを用いた解析

Function of the sperm acrosomal EQUATORIN protein analyzed using genetically modified mice

年森 清隆^{1,2*}・伊藤 千鶴²

Kiyotaka Toshimori^{1,2*} and Chizuru Ito²

¹千葉大学未来医療教育研究センター 〒260-8670 千葉市

²千葉大学大学院医学研究院機能形態学・生殖生物学 〒260-8670 千葉市

¹Future Medicine Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

²Department of Functional Anatomy, Reproductive Biology and Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

要旨：精子は、父親のゲノムを卵子に伝えるために、先体反応と卵子との接着融合から初期胚発生に至る過程に関わる機能分子を持っている。これらの機能分子をコードする遺伝子は精子形成過程で発現し、産生されたタンパク質は精子の機能部位に配備される。様々な機能タンパク質をターゲットにした遺伝子改変マウスが多数作られている。これらのモデルマウスの解析から得られた情報は、ヒトの生殖や不妊を理解するために有用なものも多い。この総説では、先体膜タンパク質エクアトリン EQUATORIN をコードする *Eqtn* 遺伝子改変マウスと抗 EQUATORIN 抗体を用いて解析した例を紹介する。

キーワード：精子、先体、EQUATORIN、遺伝子改変マウス、不妊症

Abstract: Spermatozoa have functional molecules involved in the acrosome reaction and fusion, through to early embryo formation, which transport the paternal genome to the oocyte. The genes encoding these proteins are expressed during spermatogenesis, and then the proteins produced are organized in sperm functional domains. There are many genetically modified mice targeting various functional proteins. Information obtained from the model mice is valuable to understand human reproduction and infertility. In this minireview, we introduce an example of a sperm acrosomal EQUATORIN protein, which is analyzed by using genetically modified mice targeting *Eqtn* gene and anti-EQUATORIN antibodies.

Key words: Spermatozoa, Acrosome, EQUATORIN, Genetically modified mouse, Infertility

はじめに

筆者らは1992年に、単クローン抗体MN9の抗原タンパク質(35～60 kDa)がヒトやマウスを含む哺乳動物の精子先体にあることを報告した¹⁾。1998年に、このタンパク質が

赤道部EQUATOR(後先体)に多くあること、そしてMN9抗体を加えると精子は卵子に進入できず、卵子はMIIのまま卵皮質顆粒が放出されないことから、精子卵子膜融合に関わるタンパク質の候補として、EQUATORINと命名して報告した²⁾。EQUATORIN遺伝子は、2000年に未解明の遺伝子C9orf11³⁾として報告され、2006年にAfaf(acrosome formation associated factor)として報告された⁴⁾。筆者らは2009年に、EQUATORINは精子先体にあるI型膜貫通N,O-結合型シアロ糖タンパク質であること、そしてMN9抗体が138番目のアミノ酸はスレオニン(138スレオニン)に付加されるO-結合型糖鎖(O-グリカン)を認識することを明ら

(受付 2019年7月6日/受理 2019年7月16日)

別刷請求先：〒260-8670 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1

千葉大学未来医療教育研究センター

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: ktoshi@faculty.chiba-u.jp

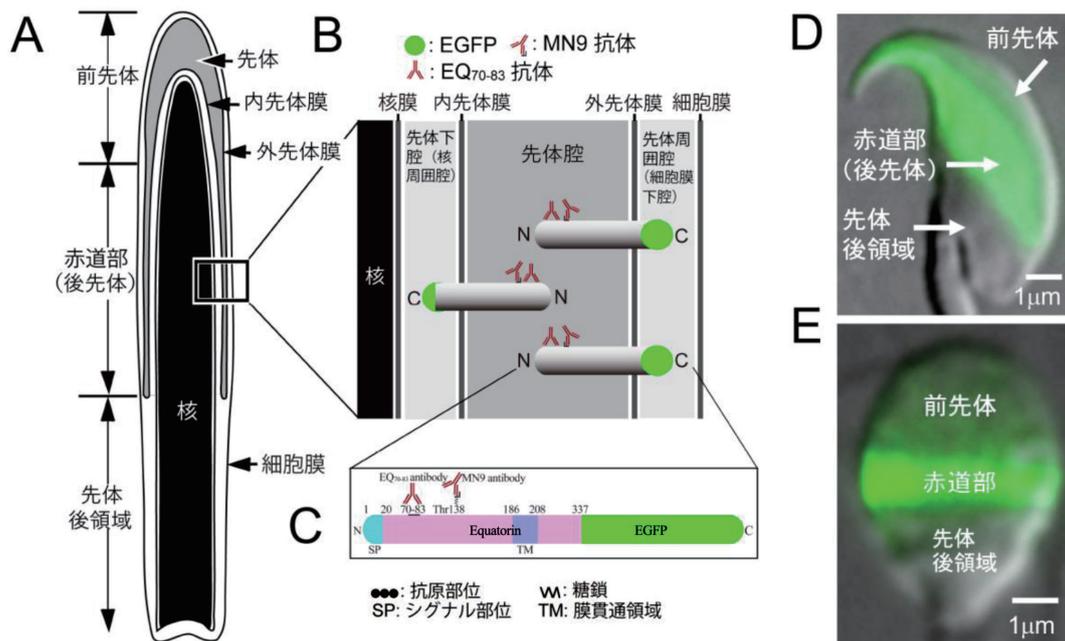


図1 EQUATORINの局在. A: 精子頭部 (矢状断). BとC: $Eqtn^{+/+}$ -Tg ($Eqtn$ -Egfp) 精子の先体内におけるEQUATORINの局在 (B) とEGFP (緑色蛍光タンパク質) をつないだ $Eqtn$ 遺伝子構造. EGFPはC末につないでいる. N末は先体腔内にある. C末は, 外先体膜に局在する場合は先体周囲腔 (細胞膜下腔) にあり, 内先体膜に局在する場合は先体下腔 (核周囲腔) にある. C: 特異抗体の認識部位. MN9抗体は138番目スレオニン (Thr138) から出るO-グリカン部位を認識する. EQ70-83抗体は70~83番目のアミノ酸配列を認識する. D: $Eqtn^{+/+}$ -Tg ($Eqtn$ -Egfp) 精子頭部の側面像. 高解像顕微鏡像. E: MN9抗体で蛍光免疫染色したヒト精子頭部. 赤道部が強陽性.

かにし, EQUATORINをコードする遺伝子 $Eqtn$ を報告した⁵⁾. 現在, National Center for Biotechnology Information (NCBI) には, ヒト $EQTN$ およびマウス $Eqtn$ として登録されている. $EQTN$ 遺伝子は, 哺乳動物に広く保存されている. ヒト $EQTN$ 遺伝子は第9番染色体 (9p21.2) にあり, 9個のエクソンから成り, 294個のアミノ酸をコードする (ENSEMBL accession number: ENSG00000120160). マウス $Eqtn$ I (long form) 遺伝子は, 第4番染色体にあり, 9個のエクソンから成り, 337個のアミノ酸をコードする. マウス精子では, EQUATORINのN末側は先体周囲腔 (細胞膜下腔) に位置し, C末側は先体下腔 (核周囲腔) に位置する (図1). 筆者らはEQUATORINを解析するために, MN9抗体以外にN末側の70~83番目のアミノ酸を認識するEQ70-83抗体⁵⁾ や市販の抗EQUATORIN抗体を用いてきた. また, 生きた精子を解析するために, C末側に緑色蛍光タンパク質EGFPをつないだトランスジェニック (Tg) マウス $Eqtn^{+/+}$ -Tg ($Eqtn$ -Egfp) マウスを用いている (図1)⁶⁾. さらに, 生体内での機能は, エクソン1~5を欠損した $Eqtn$ 遺伝子欠損 (EQTN-KO) マウスおよびEQTN/SPESP1-DKO (ダブルノックアウト) マウス⁷⁾ を用いて解析している.

遺伝子改変マウスの解析

EQTN-KO マウス解析の報告は2つある. 1つは2014年

の中国のグループが, Dr. D. Garbersのラボで作成されて Jackson Laboratory にストックされているエクソン4~7を欠損した B6;129S- $Eqtn^{tm1Gar}/J$ と呼ばれるKOマウスを解析した報告である (使用時の詳細は不明)⁸⁾. そのKOホモ雄では, 先体形成は障害されないが, 先体反応が障害され, 妊孕率は優位に (53%) 減少した⁸⁾. 一方筆者らは, $Eqtn$ I (long form) のエクソン1~5を欠損したEQTN-KOマウスを作成した. バッククロスにより安定したマウスを解析した結果, EQTN-KO精子の先体形成と先体反応は正常に進行したが, 精子卵子接着が障害され, 困卵腔にはKO精子が蓄積した. その結果, 妊孕率が優位に (29%) 減少した⁷⁾. 詳細な解析の結果, EQTN-KO精子には精子卵子膜接着融合に関わるタンパク質として知られている精子由来のIZUMO1⁹⁾が存在し, また, EQTN-KO精子が到達した困卵腔には卵子由来のCD9¹⁰⁻¹²⁾とJUNO¹³⁾が存在していた (図2:A-C)⁷⁾. さらに, 受精卵の2細胞形成が優位に (5時間で51%, 10時間で29%) 阻害され, EQTN-KO胎児 (腔腔形成後17日) の体重平均は野生型に比較すると優位に (7%) 減少した. EQTN-KOの機能欠損をレスキューするために, EQTN-KOに $Eqtn$ 遺伝子を導入した $Eqtn^{-/-}$ -Tg ($Eqtn$) マウスを作成した. そのフェノタイプは正常状態に回復し, 妊孕率も野生型と同程度に回復した⁷⁾. したがって, KOマウスによって示されたEQUATORINの機能欠損は正しいことが証明された. さ

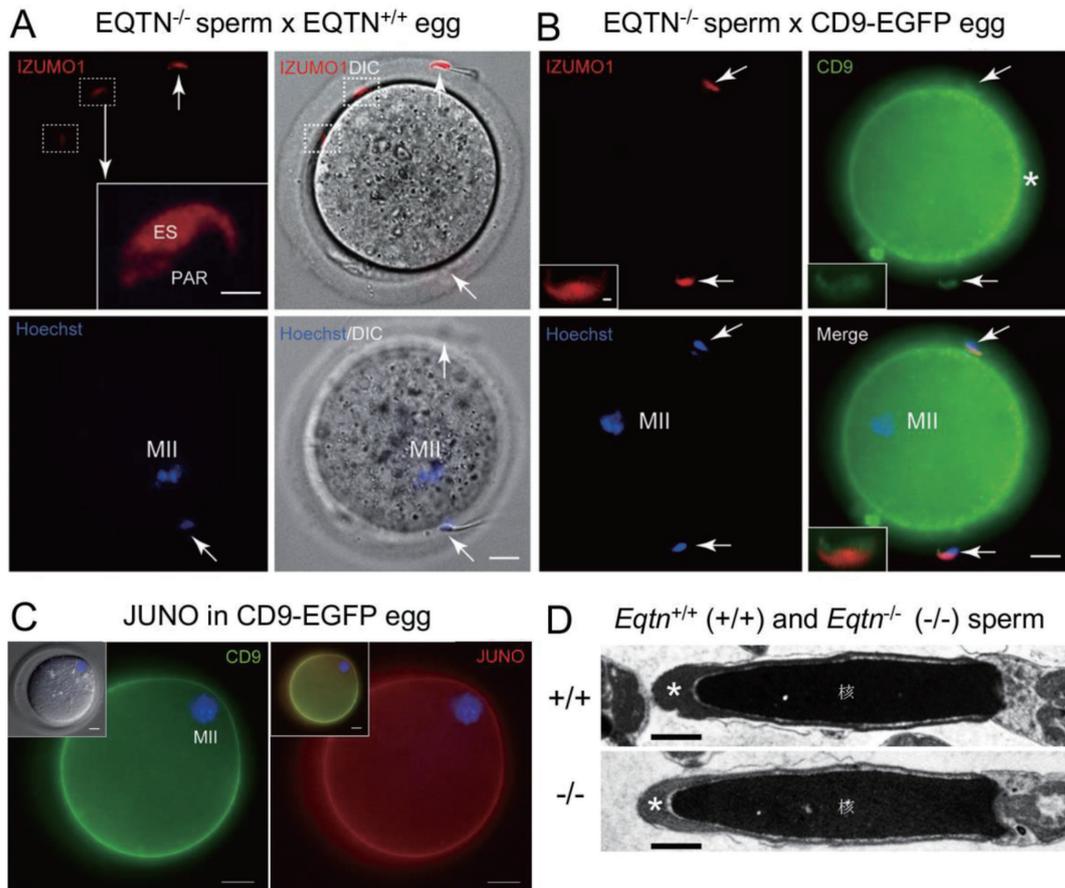


図2 EQTN-KO精子のフェノタイプ. AとB:抗IZUMO1抗体(赤)を用いた蛍光免疫染色. C:抗JUNO抗体(赤)を用いた蛍光免疫染色. A:EQTN^{-/-}雄とEQTN^{+/+}雌と交配させて膨大部から回収された卵子内に到達したEQTN-KO精子にはIZUMO1が存在する. 2匹の精子(围卵腔内;四角部位)と1匹(透明带上;矢印)はいずれもIZUMO1が陽性である. 精子と融合しなかった卵細胞の染色体はMIIを示している(ヘキスト:青). 挿入図;四角部位の高倍率像. スケールバー=10 μm, 5 μm(挿入図). DIC:微分干渉像. B:EQTN^{-/-}雄とCD9^{+/+}-Tg(CD9-EGFP)雌と交配させて膨大部から回収された卵子に到達したEQTN^{-/-}精子像. 2匹の精子はいずれも, IZUMO1が陽性(赤)であると同時に, Cd9^{+/+}-Tg(CD9-EGFP)卵母細胞からエクソサートーシスされて精子に結合したCD9(緑)で染まっている. 卵母細胞は精子と膜融合しないため, この像でも染色体はMIIである. スケールバー=10 μm, 1 μm(挿入図). C:抗JUNO抗体(赤)を用いた蛍光免疫染色. Bで使用したCD9^{+/+}-Tg(CD9-EGFP)卵の围卵腔には, CD9(緑)とJUNO(赤)が同時に存在する. D:野生型(+/+)とEQTN-KOホモ(-/-)の精子頭部の電子顕微鏡像. EQTN-KO精子は, 野生型と同じ構造(先体:*)を持っており, 異常はみられない. スケールバー=10 μm. 文献⁷⁾のFig. 1C, Fig. 3, Fig. S5を修正.

に, SPESP1-KO精子ではEQUATORINの分布が異常(先体反応後の分布パターン)になることが報告されており¹⁴⁾, 我々の解析ではEQTN-KO精子でSPESP1とIZUMO1の分布が乱れていたため⁷⁾, EQTNとSPESP1の2つの遺伝子を同時に欠損したEQTN/SPESP1-DKOマウスを新たに作成した. そのDKO雄は健康であったが, 妊孕率は70%減少した(図3)⁷⁾. この減少率は, EQTN-KO単独(37%減少)あるいはSPESP1-KO単独(22%減少)よりも顕著であった. SPESP1は先体内にあり, 先体反応後も先体外に出ないことを考慮すると, SPESP1はEQUATORINが先体外に出るまでに, EQUATORINの機能を促進している可能性がある.

中国のグループが用いたB6;129S-*Eqtn*^{tm1Gar}/J-KOマウス(C57BL/6J and 129バックグラウンドのマウスで維持されている)と筆者らが用いたEQTN-KOマウス(129S/Sv-由来のembryonic stem cellsとC57BL/6Jマウス)の機能障害が起こる時期の違いは, 遺伝的バックグラウンドの違いによるのかもしれない. 筆者らのEQTN-KOマウスの結果は, 以前に報告していたMN9抗体を用いた*in vitro*²⁾と*in vivo*¹⁵⁾条件下で起こった精子卵子融合過程の阻害と同じであった. 広義の融合過程は, 精子卵子の接着と膜融合の二つの過程で構成されるのであろう. これまでの結果が全て正しければ, 精子卵子の接着から融合過程にはIZUMO1, CD9およ

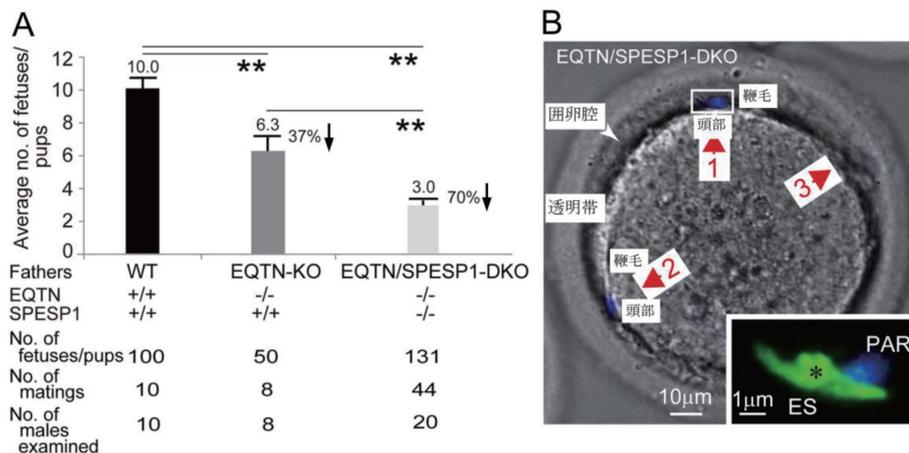


図3 EQTN/SPESP1-DKO. A: EQTN/SPESP1-DKOの出産数(平均3.0)は、野生型(WT:平均10.0)およびEQTN-KO単独(平均6.3)とSPESP1-KO単独(平均7.8)¹⁴⁾よりも、優位に減少する。*** $P < 0.01$ 。B: 抗IZUMO1抗体(緑)を用いた蛍光免疫染色。EQTN/SPESP1-DKO雄と野生型雌を交配させた卵母細胞の囲卵腔に到達したEQTN/SPESP1-DKO精子3匹を示す(卵子と融合できないため蓄積されている)。3匹全てがIZUMO1陽性である。挿入図: 赤道部に異常な塊(*)になったIZUMO1を示す。ES: 赤道部。PAR: 先体後領域。文献⁷⁾のFig. 5DとEを修正。

びJUNO以外のタンパク質も関与することになる。

EQUATORINは、IZUMO1と次のような局在と挙動の違いがある。先体反応前の成熟精子では、IZUMO1は前先体の外先体膜にあり、EQUATORINは赤道部の内外先体膜にある(図1)。先体反応が始まると、IZUMO1はすぐに前先体から赤道部さらに先体後領域の細胞膜上に移動する。ほぼ同時に、EQUATORINは赤道部細胞膜上に移動し、一部は先体内に残る。EQTN-KO精子では、IZUMO1の異常な動き(分布)がみられるため(図3)⁷⁾、両者には未解明の相互関係があるのかもしれない。EQUATORINの分子量は、先体反応過程で60 kDaから35 kDa程度に減少する(図4)¹⁶⁾。EQUATORINは糖鎖を多く含むため、恐らく糖鎖部分が切り取られてコアタンパク質部分が残ると推測される。さらに、コアタンパク質にも修飾が起こる可能性がある。

精子形成、受精と初期胚における挙動

生きたEqtn^{+/+}-Tg(Eqtn-Egfp)精子を共焦点走査型レーザー顕微鏡で撮影した蛍光像を図1Dで示す。このTgマウスを用いて、生の精巢から取り出した精子細胞の先体形成⁶⁾や受精時から初期胚における挙動を解析した。その結果、受精瞬間では、表層にあるEQUATORINは卵細胞表面に拡散し、一部(恐らく、内先体膜にあるEQUATORIN)は精子卵子膜融合後、受精卵の細胞質内に取り込まれて、男性前核周辺に観察された(図4C)。野生型でEQUATORINの一部が卵細胞質内に取り込まれることとEQTN-KO精子では正常に受精できないことは、胎児体重の減少と何らかの関係があるのかもしれない。

精子形成過程における遺伝子発現と意義

野生型マウスの精巢をインサイチュウハイブリダイゼーション法で解析すると、EQUATORINのmRNAは、ステージI~VIIの初期精母細胞で弱く発現し始め、ステージVIII~XIIでいったん消失する。そして、ステージI~VIIステップ1~7の円形精子細胞になると再度強く発現するようになる。その後すぐに減少してステップ8~16では発現しない(図4A)。精母細胞時期のRNA発現により産生されたEQUATORINは、初期円形精子細胞の先体形成に必要であり、ステップ1~7の円形精子細胞でRNAが発現し産生されたEQUATORINは、その後の全ての先体形成に必要であることがわかる。

抗EQUATORIN抗体を用いて、ヒトを含む諸種の精子形成過程を解析した。Golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing (GOPC) 遺伝子欠損マウスのホモ精巢では、ゴルジ装置由来の輸送小胞が前先体顆粒として成長する段階で融合できず、先体が欠損する結果、円(球)形頭部精子症 Round headed spermatozoa or Globozoospermiaが起こる¹⁷⁾。GOPCホモマウス精巢の先体形成過程を、MN9抗体と先体後領域(活性関連因子が存在すると考えられる部位)を認識するMN13抗体を用いた免疫染色法で解析すると、先体の欠損と同時に先体後領域も連動して形成されないことが判明した^{18, 19)}。すなわち、正常で扁平な頭部を持つ野生型精子およびヒト精子頭部は、この2つの抗体がともに陽性であるが、GOPCホモマウスおよびヒトの円(球)形頭部精子はともに陰性となる(図5)。この解析から、ヒト円(球)形頭部精子症の発症も同様のメカニズムであると結論した。

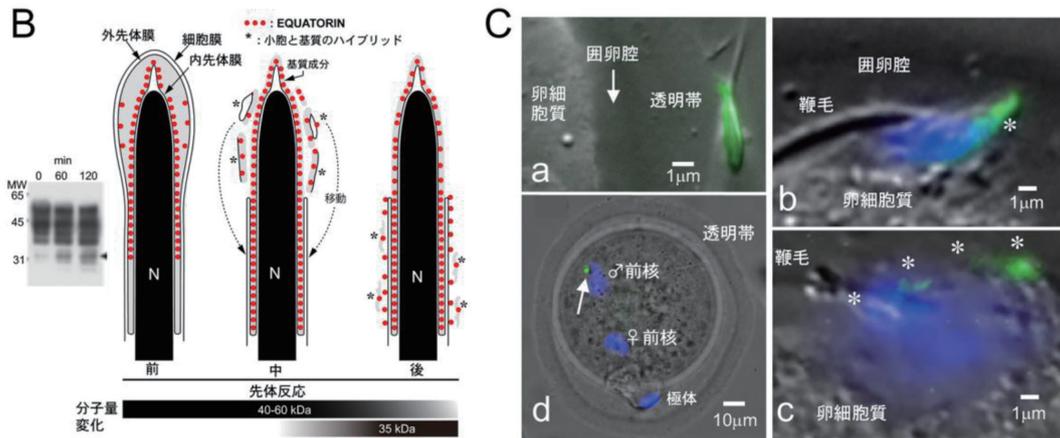
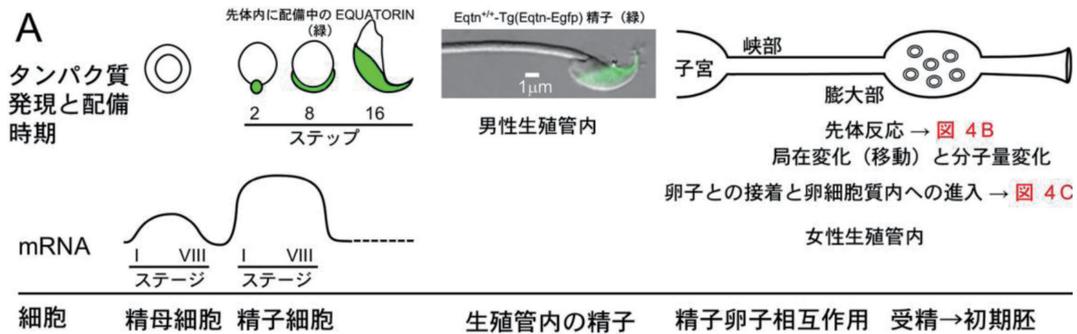


図4 野生型精子のEQUATORINに起こる現象. A: 精巣内発現 (インサイチュウハイブリダイゼーション法によるEQTNのmRNA発現) から受精/初期発生に至る主なイベント. ステージI~VIII頃までの初期パキテン期精母細胞で発現し始め, 一旦消失してから, ステージIの円形精子細胞で次第に強く発現し, ステージVIIIのステップ8円形精子細胞で停止する. ステップ1 (S1) 以降の先体 (緑) に強く局在する. B: 先体反応過程におけるEQUATORINの移動. 先体内から赤道部の細胞膜表面に移動する. 挿入図; 先体反応 (0, 60, 120分後) における分子量の変化. MN9抗体を用いたウエスタンブロット. C: 受精前後の挙動. 蛍光像. aとd;野生型雌とEqtn^{+/+}-Tg (Eqtn-Egfp) 雄の交配後, 卵子に到達したEqtn^{+/+}-Tg (Eqtn-Egfp)精子. bとc:野生型の雄と雌を交配後, 卵子表面 (膜融合直後)の精子. MN9抗体を用いた免疫染色. 青;ヘキスト (核). 試料はライブイメージで選択して得た. a:透明帯上の精子 (緑:赤道部). bとc:精子卵子膜融合直後のEQUATORIN (緑)の蛍光免疫染色像. EQUATORINは赤道部から周辺に拡散する (*). d:受精卵の細胞質内に取り込まれたEQUATORIN (矢印;緑)が, 男性 (♂) 前核近傍にみえる.

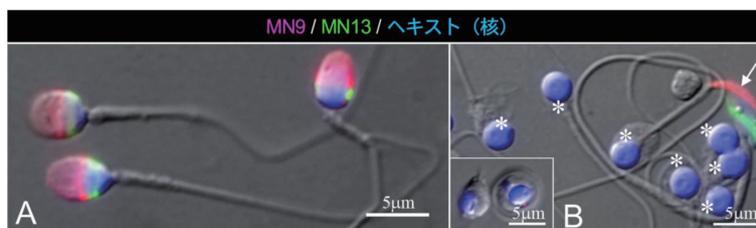


図5 ヒト円 (球) 形頭部精子とGPCP欠損精子の蛍光免疫抗体染色. MN9抗体 (赤). MN13抗体 (緑). A: ヒト正常精子. MN9抗体とMN13抗体が陽性である. B: ヒト円 (球) 形頭部精子 (*). MN9抗体とMN13抗体がともに陰性である. コントロールとして, 一緒に混ぜたマウス精子 (矢印) は, ともに陽性である. 挿入図; GOPC欠損精子. MN9抗体とMN13抗体がともに陰性である.

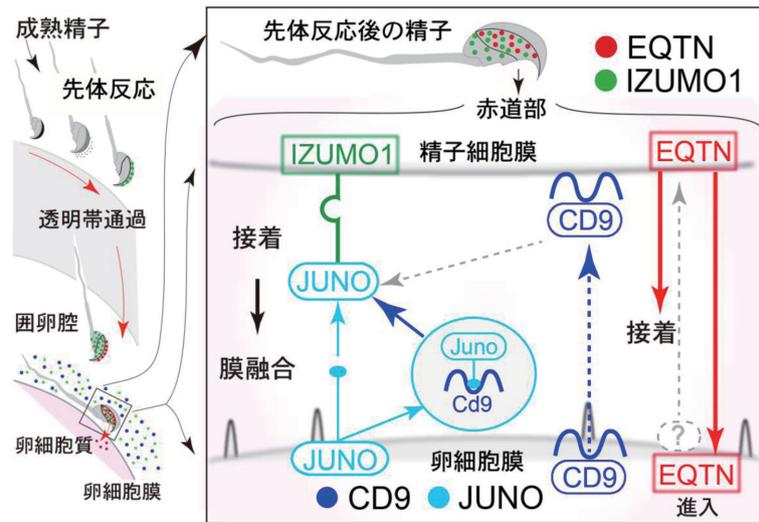


図6 精子卵子の接着融合に関わるタンパク質の相互作用 (仮説). 左図; EQUATORINは、IZUMO1とともに先体反応中に赤道部に出現した状態で卵胞腔に到達する。卵胞腔には、卵母細胞由来のCD9とJUNOが満ちている。これらのタンパク質は、離れた部位あるいは近傍において相互作用が起こる可能性がある。その結果、精子と卵子は接着し、その後、脂質二重層の膜融合が起こる。内先体膜に残存するEQUATORINは、精子内に取り込まれて、初期発生に何らかの影響を及ぼす可能性がある。

EQUATORINの138スレオニンにはO-結合型糖鎖(O-グリカン)が付加されることを述べた。そのO-結合型糖鎖の形成には、N-acetylgalactosaminyl transferase 3 (GalNAc transferase 3; Galnt3)が必須である。Galnt3遺伝子を欠損したGALNT3-KOマウスの雄は、乏無力奇形精子症oligoasthenoteratozoospermiaであり不妊であった²⁰⁾。そのホモ雄の精子形成過程を、MN9抗体やEQ70-83抗体を用いた蛍光免疫染色およびPNA(ピーナッツレクチン)を用いた蛍光染色で解析すると、コントロール(野生型)では全ての染色法で先体形成過程が検出されたが、GALNT3-KOマウス精巣ではMN9抗体の信号は検出されなかった²⁰⁾。すなわち、EQUATORINのO-グリコシル化が障害されていた。

精巣内発現から初期胚発生における機能

これまでの実験結果を総合して考察すると、EQUATORINの発現とその後における機能は、次のように考えることができる(図6)。EQUATORINは、1) 精巣内では、精子形成過程で産生され、N,O-結合型シアロ糖タンパク質として先体内に配備されて、機能発現を待つ。先体形成過程が障害されて先体が欠損すると、精子頭部は球(円)形化し、卵活性化因子も消失する。2) 先体反応が開始されるまで(男性生殖内管と女性生殖内管内では)先体内に保存される。3) 先体反応の開始と同時に、あるいは透明帯を通過する前に、赤道部外先体膜から赤道部細胞膜上に移動し始める。ほぼ同時に、IZUMO1が前先体から赤道部細胞膜上に移動し始める。4) 精子が卵胞腔に達すると、独自のメカニズムで接着

から膜融合へと進む。このとき、IZUMO1は卵子からのCD9やJUNOの影響を受けて、接着から膜融合へと進む。5) 膜融合後、内先体膜のEQUATORINは、卵胞腔質内に入り、初期発生から胎児の成長過程に何らかの影響を及ぼす可能性がある。IZUMO1は卵子内には入らない。

さいごに

精子先体膜タンパク質EQUATORINは、ヒトを含めた哺乳動物に広く存在するため、その遺伝子と特異抗体は先体反応や卵子との融合を含めた精子機能を診断するマーカーとして使える²¹⁾。しかし、先体反応と同時にどのような分子修飾を受けて赤道部に移動し、先体反応や卵子との接着融合過程そして受精卵内で機能するのか、その分子メカニズムはまだ不明な点が多い。現在、CRISPR/Cas9システムを用いて、より早く遺伝子改変動物が産生されており、解析が進んでいる²²⁾。今後、受精関係だけでなく多くの精子機能が理解されていくと思われる。

文献

- 1) Toshimori, K., Tanii, I., Araki, S. and Oura, C. (1992): Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell Tissue Res.*, 270, 459-468.
- 2) Toshimori, K., Saxena, D.K., Tanii, I. and Yoshinaga, K. (1998): An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice.

- Biol. Reprod., 59, 22–29.
- 3) Ruiz, A. Pujana, M.A. and Estivill, X. (2000): Isolation and characterisation of a novel human gene (C9orf11) on chromosome 9p21, a region frequently deleted in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1517, 128–134.
 - 4) Li, Y.C., Hu, X.Q., Zhang, K.Y., Guo, J. Hu, Z.Y., Tao, S.X., Xiao, L.J., Wang, Q.Z., Han, C.S. and Liu, Y.X. (2006): Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. *FEBS Lett.*, 580, 4266–4273.
 - 5) Yamatoya, K., Yoshida, K., Ito, C., Maekawa, M., Yanagida, M., Takamori, K., Ogawa, H., Araki, Y., Miyado, K., Toyama, Y. and Toshimori, K. (2009): Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse. *Biol. Reprod.*, 81, 889–897.
 - 6) Ito, C. Yamatoya, K., Yoshida, K., Fujimura, L., Hatano, M., Miyado, K. and Toshimori, K. (2013): Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res.*, 352, 739–750.
 - 7) Ito, C. Yamatoya, K., Yoshida, K., Fujimura, L., Sugiyama, H., Sukanami, A., Tamura, Y., Hatano, M., Miyado, K. and Toshimori, K. (2018): Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion. *Reproduction*, 156, 579–590.
 - 8) Hao, J., Chen, M., Ji, S., Wang, X., Wang, Y., Huang, X., Yang, L., Wang, Y., Cui, X., Lv, L., Liu, Y. and Gao, F. (2014): Equatorin is not essential for acrosome biogenesis but is required for the acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444, 537–542.
 - 9) 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.
 - 10) Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S. and Kudo, A. (2000): The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.*, 24, 279–282.
 - 11) Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000): Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287, 319–321.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Fujihara, Y., Murakami, M., Inoue, N., Satouh, Y., Kaseda, K., Ikawa, M. and Okabe, M. (2010): Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J. Cell Sci.*, 123, 1531–1536.
 - 15) Yoshinaga, K., Saxena, D.K., Oh-oka, T., Tanii, I. and Toshimori, K. (2001): Inhibition of mouse fertilization in vivo by intra-oviductal injection of an anti-equatorin monoclonal antibody. *Reproduction*, 122, 649–655.
 - 16) Yoshida, K., Ito, C., Yamatoya, K., Maekawa, M., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F. and Toshimori, K. (2010): A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. *Reproduction*, 139, 533–544.
 - 17) Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K. and Noda, T. (2002): Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *PNAS USA*, 99, 11211–11216.
 - 18) Ito, C., Akutsu, H., Yao, R., Kyono, K., Suzuki-Toyota, F., Toyama, Y., Maekawa, M., Noda, T. and Toshimori, K. (2009): Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum. Reprod.*, 24, 2588–2595.
 - 19) Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Kyono, K., Yao, R., Noda, T. and Toshimori, K. (2010): Appearance of an oocyte activation-related substance during spermatogenesis in mice and humans. *Hum. Reprod.*, 25, 2734–2744.
 - 20) Miyazaki, T., Mori, M., Yoshida, C.A., Ito, C., Yamatoya, K., Moriishi, T., Kawai, Y., Komori, H., Kawane, T., Izumi, S., Toshimori, K. and Komori, T. (2013): Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem. Cell Biol.*, 139, 339–354.
 - 21) Ito, C. and Toshimori, K. (2016): Acrosome markers of human sperm. *Anat. Sci. Int.*, 98, 128–142.
 - 22) Okabe, M. (2018): Sperm-egg interaction and fertilization: past, present, and future. *Biol. Reprod.*, 99, 134–146.