

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19390431

研究課題名（和文） 不妊病態に関わる膜融合因子の研究と生殖医療への応用

研究課題名（英文） The function of CD9 in sperm-egg fusion and its clinical application

研究代表者

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)

国立成育医療センター（研究所）・生殖・細胞医療研究部・室長

研究者番号：60324844

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・生殖医学

キーワード：受精・膜融合・CD9・テトラスパニン

#### 1. 研究計画の概要

加齢による卵巣機能の低下は、生理的な環境変化によって卵子の有する受精能力が障害を受けた結果として生じる可能性がある。そこで、損傷を受けた卵子の機能を回復させるための培養法の開発が必要である。しかし、卵子の受精能力に関する科学的な知見が不足しているため、培養方法や培養液の組成が十分に検証できないのが現状である。そこで、本研究では、卵子のもつ受精能力に関する基礎的研究を行った。具体的には、卵子の膜融合関連因子 CD9 および CD9 を含むエキソソーム (exosome) の機能解析を行った。更に、チューブリン  $\beta 2 A$  (tubb2A) の機能に注目して研究を行い、微小管の重合促進・重合阻害によって受精能力を制御する方法を開発することをめざした研究を行った。

#### 2. 研究の進捗状況

卵子の膜融合関連因子 CD9 の機能解析を行い、C 末端に膜融合の機能領域があることを明らかにし、CD9 結合タンパク質として tubb2A を同定した。CD9 の膜融合における機能がチューブリンを主成分とする微小管によって調節されている可能性がある。Tubb2A は細胞特異的に発現するタンパク質で、このタンパク質の機能解析から受精の膜融合の分子実体に近づくことができる。更に、加齢による微小管と CD9 の結合様式の変化により、卵子の受精能力が低下する可能性が考えられた。

#### 3. 現在までの達成度

卵子の受精能力が低下する原因として一定の成果を出すことができた。膜融合因子と

しての膜タンパク質 CD9 の研究では、世界的にも評価されており、膜融合の分子実体の解明に向けての研究は順調に進んでいる。応用研究については、マウスを用いた研究の域を出ていないため、ヒト卵子の受精能力の回復に向けた研究として、卵子の培養液を用いた評価法の検討、更に、ヒト加齢卵子の受精能力の回復法の確立を目指した研究を行う。

#### 4. 今後の研究の推進方策

加齢による生殖能の低下について CD9 および tubb2A の機能に注目して研究を行い、微小管の重合促進・重合阻害によって受精能力を制御する方法を開発することをめざす。微小管の重合促進剤 (タキソール等)、重合阻害剤 (コルヒチン等) は、すでに抗がん剤として使われている試薬で、特定の細胞機能を阻害および促進することが知られている。これら試薬の受精効率への効果、加齢卵子への効果を検討する。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res*, 2010 Apr 29. [Epub ahead of print]

2. Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi JI, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*, 78(2-3): 137-42 (2009)
  3. Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Toshimori K. Equatorin: Identification and Characterization of the Epitope of the MN9 Antibody in the Mouse. *Biol Reprod*, 81(5) 889-97 (2009)
  4. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(35): 12921-6 (2008)
  5. Takeda Y, He P, Tachibana I, Zhou B, Miyado K, Kaneko H, Suzuki M, Minami S, Iwasaki T, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Yoshida M, Osaki T, Komori T, Mekada E, Kawase I. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem* 283(38): 26089-97 (2008)
  6. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 26(7): 1695-704 (2008)
  7. Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Umezawa A, and Miyado K. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Repro Dev*, 75:150-5 (2008)
  8. Ito M, Muraki M, Takahashi Y, Imai M, Tsukui T, Yamakawa N, Nakagawa K, Ohgi S, Horikawa T, Iwasaki W, Iida A, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Miyado K, Kono T, Hosoi Y, Saito H. Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility. *Fertil Steril*, 90(4):1026-35 (2008)
  9. Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 364 (4):838-43 (2007)
  10. Miyado M, Ogi H, Yamada G, Kitoh J, Jogahara T, Oda S, Sato I, Miyado K, Sunohara M. Sonic hedgehog expression during early tooth development in *Suncus murinus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2):269-75 (2007)
  11. Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, 18(5):1586-94 (2007)
- [学会発表] (計 4 件)
1. Miyado K. CD9 action in the egg and on the sperm of mice. Gordon Research Conferences. Colby-Sawyer College, New London, NH, USA. July 20, 2009 (招待講演)
  2. 宮戸健二. 受精の膜融合における卵側因子 CD9 とエキソソームの役割. 第 82 回日

本生化学会大会. 神戸ポートアイランド. 2009  
年 10 月 23 日 (招待講演)

3. 宮戸健二 CD9 action in the egg and on the  
sperm of mice. 第 32 回日本分子生物学会年会.  
パシフィコ横浜. 2009 年 12 月 10 日 (招待講  
演)
4. Miyado K. Tetraspanin and gamete  
membrane fusion. FASEB Summer  
Research Conference. New Haven, CT,  
USA. June 26, 2008 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

宮戸健二、岡部 勝編. 顕微鏡なるほど Q&A.  
羊土社. 2008 年 12 月発行

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]