

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791179

研究課題名（和文）糖鎖プローブによる卵子評価の開発と生殖医療への応用

研究課題名（英文） Evaluation of egg ability for fertilization by sugar chain molecular probes

研究代表者

宮本 潔子（MIYAMOTO KIYOKO）

国立成育医療センター（研究所）・生殖・細胞医療研究部・共同研究員

研究者番号：20415590

研究成果の概要（和文）：

糖鎖プローブを用いた細胞表面構造の解析から、卵子の受精能・発生能力の推定方法の開発を試みた。卵子の質は加齢によって低下すると考えられているため、糖鎖プローブを用いた卵子評価方法が確立されれば、生殖医療に大いに貢献できると考えられる。具体的にはマウス卵子を用いた、受精能が消失または低下した卵子を用いて、糖鎖の有無について検討を行い、卵子が糖脂質GM3を含む融合促進構造体（エキソソーム）を放出し、精子の膜融合能を制御していることを発見した。エキソソームを放出できないCD9欠損卵子は精子との融合能力が消失することも明らかになった。本研究での発見は生殖医療の領域に大いに貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：

Sugar-specific probes such as lectins and antibodies have been used as a molecular probe for labeling sugar chains and evaluating cell activities. In order to evaluate egg ability in fertilization, especially fusion with sperm, we studied each of CD9- and CD81-deficient eggs. Eventually, we found that CD9- and ganglioside GM3-containing vesicles are released from eggs before fertilization, and regulate sperm-fusing ability. We named the vesicles as egg exosomes. Our results suggest that GM3-containing exosomes regulate sperm-egg fusion in mammals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	780,000	4,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学 ・ 糖鎖・レクチン・卵子・受精

1. 研究開始当初の背景

加齢によってヒト卵子の受精能力が低下（卵子の質の低下）することは統計学的に明らかであるものの、卵子の質の低下が卵子のもつどのような性質（膜成分や細胞質成分）の不足または増加によるものなのかといった検討は、卵子が貴重な細胞ということがあり、検討が行われてこなかった。一方、マウスを用いた受精の分化メカニズムの研究からはテトラスパニンと呼ばれる膜タンパク質ファミリー分子 CD9 および CD81 が欠損した場合、マウス卵子の精子との受精能力が低下することが知られていた。マウス卵子の精子と融合能力を制御する因子、分子メカニズムについての研究も、卵子側で CD9 および CD81 が機能し、精子側因子としてイムノグロブリンファミリーに属する因子 IZUMO が必須であることが知られているものの、それ以上の因子や具体的な制御機構については全く知られていなかった。

2. 研究の目的

糖鎖プローブを用いたヒト卵子の質の低下を検出する方法の開発をめざした研究を行った。卵子の質の低下を検出する方法としては、形態学的な観察のみで、マーカーとなる因子の発見には至っていない。そこで、マウス卵子を用いた研究を行った。

3. 研究の方法

受精の膜融合過程に異常を示す 2 系統の遺伝子欠損マウス（CD9欠損マウス、CD81欠損マウス）を用いて、受精能力の低下によって局在や存在量に変化する糖鎖について検討を行った。蛍光ラベルしたレクチンの他に鎖鎖構造を認識する特異的な抗体も用いた。

4. 研究成果

当研究部では、すでにヒト幹細胞に対して行ったレクチン・抗糖鎖抗体による網羅的解析と、これらマーカーを用いて分画した細胞集団の細胞生物学的解析の結果から、各細胞種・分化度別の細胞表面糖鎖プロファイルを作成した経験がある。本研究では、糖鎖プローブによる卵子評価の開発と生殖医療への応用を目指した研究を行い、マウス精子と卵子の膜融合に必須な膜構造体としてエキソソームを見出し、エキソソームの主要な構成成分として糖脂質 GM3 が含まれていることを明らかにした（PNAS, 105:12921-6, 2008）。CD9 欠損卵子では細胞膜上に CD9 が存在しないために精子との膜融合能が消失してい

る。CD9 が関わる膜融合機能が低下することが知られていた。そこで、CD9 の卵子での動態を可視化する目的で CD9 の N 末端にオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 EGFP を融合させた融合タンパク質 CD9-EGFP を卵子特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作製し、CD9 欠損雌マウスのバックグラウンドに交配によって導入した。CD9-EGFP は予想した通りに卵子特異的に発現し、更に、CD9 が欠損したことによる精子との膜融合異常が野生型卵子と同等のレベルまで回復した。以上のことから、CD9-EGFP は膜融合において CD9 と同等の機能を持っていると考えられた。そこで、生きた卵子での CD9 の動態を観察することが可能になったため、共焦点レーザー研究を用いて詳細に観察を行ったところ、膜タンパク質 CD9 は卵細胞膜だけでなく、細胞外マトリックス（透明帯）との隙間の部分の細胞外の領域に細胞膜と同等量が受精前の卵子では蓄積していることを見つけた。また、単独で配偶子に特異的に結合するレクチンを特定することが目指した研究を行った。ヒト幹細胞を用いた経験から、複数のレクチンを用いた場合の方がより正確に細胞の分化能を特定することが可能である。そこで、複数のレクチンのマッピング情報による標準化を行った。現在までに得られているヒト幹細胞のデータを基にして行った解析では、医生物学的特性と糖鎖との連関が明確になっているため、レクチン認識による細胞糖鎖に関する定量データを主成分解析およびクラスター解析を行うことにより、受精能との相関関係を推定することを試みた。結果として、受精能との有意な関連を示すようなレクチンを見いだすことはできなかったものの、卵子では特定の糖鎖の局在が体細胞と全く異なることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

（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 2 件）

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).

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 Reprod Dev*, 75(1):150-5 (2008).

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 潔子 (MIYAMOTO KIYOKO)

国立成育医療センター (研究所)

研究者番号：20415590

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者