

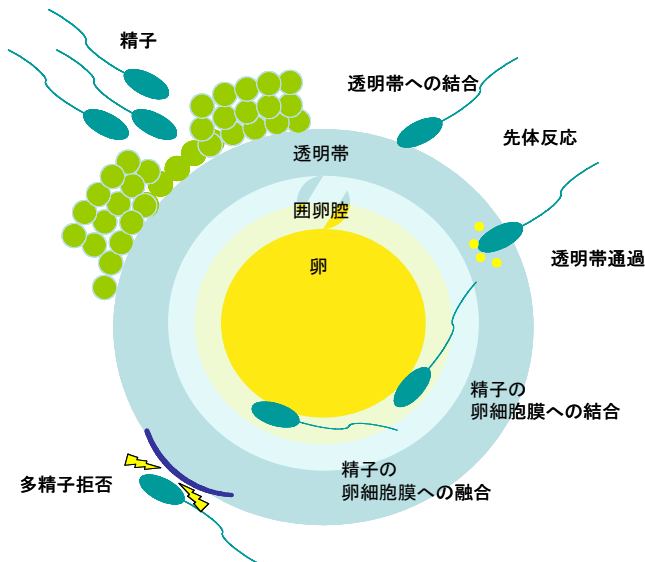
研究課題別評価

1 研究課題名:受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明と不妊治療への応用

2 研究者氏名:宮戸 健二

3 研究のねらい:

受精は、生命の始まりとして、多くの生物に共通したメカニズムが存在すると考えられてきたが、共通したメカニズムや因子はいままで発見されていない。哺乳動物では精子と卵の細胞膜にある因子でさえ、ほとんどわかっておらず、解明が遅れている現象の一つである。受精を分子レベルで解明するための研究は、避妊や不妊などの人類が直面する深刻な問題を解決するための基盤研究になると考えられるが、哺乳動物を材料にした研究者が少ないため研究が進まないのが現状である。このような状況にあって、私はマウスを用いた実験から膜4回貫通型蛋白質 CD9 が受精の膜融合に必須であることを明らかにしてきた。CD9 は、細胞接着分子や膜結合型細胞増殖因子などと細胞膜で複合体を形成し、細胞接着を介した細胞増殖を制御すると考えられている膜蛋白質である。卵細胞膜でも、CD9 と結合している因子群が、単独あるいは協同して機能することが予想される。そこで、CD9 に蛍光蛋白質 GFP を融合させた蛋白質(CD9-EGFP)を卵特異的に



発現させることによって受精のイメージング系を構築する。さらに、CD9 結合蛋白質の単離および機能解析を行うことにより、受精の膜融合を制御する分子メカニズムの解明をめざす。加えて、細胞膜の融合機構を応用した新規の不妊治療法の開発に挑戦する。

4 研究成果

哺乳動物の卵は、両生類や棘皮動物とは異なり、一個体から得られる細胞数がとても少なく、過排卵処理をしたマウスからでも 20 個前後が排卵されるだけである。そのために、生化学実験を行うためには、より多くの動物個体を飼育維持する必要がある。そこで本研究では、生化学実験よりも、受精前後での精子と卵の動き、および蛋白質の動態をできる限り詳細に追跡することに重点を置いた。その結果、いままで知られていなかった受精の膜融合を制御するメカニズムを発見することができた(投稿準備中)。まず、免疫染色と電子顕微鏡による観察から、野生型マウス卵では CD9 は卵細胞膜を全体にわたって覆っている微絨毛に特異的に局在するのに対して、CD9 欠損卵ではほとんどの微絨毛が消失していることを見つけた。続いて、生きた卵での CD9 の挙動をイメージングするために、CD9-EGFP を発現させた CD9 欠損卵(CD9-EGFP 卵)を作製したところ、卵細胞膜の微絨毛が再形成され、しかも、精子との膜融合能を回復させることができた。この結果から、マウス卵では、CD9-EGFP は CD9 と同等の機能を有することが示された。続いて、CD9-EGFP 卵を使って、受精過程を生きた状態で観察する実験系を作ることにより、精子と卵細胞膜が相互作用する一連の過程をイメージングすることが可能となった。哺乳動物の受精過程をイメージングした研究は、本研究が初めてである。この実験系を用いて精子と卵の受精前後での挙動を観察したところ、従来の受精研究では、膜融合は精子が卵の細胞膜に結合した後に始まると考えられていたが、実際には全く異なる細胞膜間での相互認識メカニズムが存在することを示す結果が得られた。また、この膜融合の制御メカニズムが実際に機能していることを、CD9 欠損卵と野生型卵を用いた再構成系によって証明することができた。さらに、CD9 欠損マウスの解析から、CD9 は骨形成¹やミエリンの形成²にも関わることがわかってきた。このことは、本研究の成果が、受精研究ばかり

ではなく、その他の生命現象の理解にもつながることを示している。また、膜融合を調節する CD9 の機能領域を同定するため、未受精卵での遺伝子発現系の構築と未受精卵 cDNA ライブラリーを作製し³、CD9 の機能領域が C 末端の 7 アミノ酸であることを明らかにした。さらに、CD9 の C 末端に結合する蛋白質を同定した。応用面としては、受精の膜融合メカニズムを応用した新しい精子導入法を開発することができた。受精の分子機構に基づいた精子導入法を開発したことにより、現在行われているガラスキャピラリーによって卵に穴を開ける方法 (ICSI) よりも卵へのダメージが少ない生殖医療技術の開発も可能になると考えられる。また、精子ばかりでなく、DNA や蛋白質なども卵への導入が可能かどうかを今後検討していく。

今後の展開

この研究により、受精の膜融合を調節する新しい制御メカニズムが存在することを明らかにすることができた。しかし、2つの細胞膜に存在する異なった配向をもった蛋白質または脂質が、すみやかに混合するメカニズムを解明するためには、まだ不十分である。そこで、今後の研究を進めるために、膜成分の配向をすばやく検出する実験系を新しく構築する。ある種の脂質マーカーを使うことにより、膜成分の混合の有無を検出することが可能である。また、脂質に埋もれた蛋白質の構造変化を検出するための実験系を構築する。細胞膜では、膜貫通領域を有する膜蛋白質であっても、状況によって構造が不安定になったり、配向が逆転したりすることが予想され、現に、いくつかの状況証拠が得られている。今後は、膜融合の分子メカニズムを、蛋白質や脂質の配向と密接に関連させながら研究を展開していく。受精の膜融合の制御メカニズムをより詳細に解析することにより、受精後のシグナル伝達系の解明、受精以外の融合現象の解明にもつながると考えている。

5 自己評価:

卵を用いた生化学的解析を一つの柱としていたものの、マウス1個体から20個前後しか採取できないという材料確保の難しさから、蛋白質レベルでの解析に限界があり、免疫染色や GFP 融合蛋白質を用いた観察を中心とした研究に方向を変更せざるを得なかった。ただ、結果として、受精の研究では見落とされていた現象を新しく見つけることができたことは、運が良かったと考えている。

6 研究総括の見解:

CD9欠損卵に導入したCD9-EGFP遺伝子の発現で、CD9-EGFP融合蛋白質が機能し、卵細胞膜微絨毛の再形成、精子との膜融合能の回復をもたらすことを見いだしたことは、生きた細胞における受精の過程で起こる現象を目で見ることを可能にした優れた成果と考える。観察された現象は百聞は一見にしかずであるので、その現象を分生物学的に証明、説明して行くことが今後重要と考える。ユニークなアプローチであるので、ユニークな発見が続くことを期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, Kawase I, Mekada E. Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of blood monocytes/alveolar macrophages. *J Cell Biol.*, 100: 3221-6 (2003).
2. Ishibashi T, Ding L, Ikenaka K, Inoue Y, Miyado K, Mekada E, Baba H. Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci.* 24:96-102 (2004).
3. Nakanishi T, Kubota H, Ishibashi N, Kumagai S, Watanabe H, Yamashita M, Kashiwabara S, Miyado K, Baba T. Functional role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 during oocyte maturation. *Developmental Biology*. In press.

総説

4. 宮戸健二、谷河麻耶: テトラスパニンが制御する複合体形成と細胞機能 医学のあゆみ

209: 960-963, 2004.

口頭発表

5. Miyado, K. Tetraspanin and gamete membrane fusion.. Fertilization and activation of development, Gordon research conference, July 2003 (NH, USA)
6. 宮戸健二 受精の膜融合を制御する膜ドメインの形成機構の解明 理化学研究所筑波セミナー、2004年10月(筑波)
7. Miyado, K. Microvilli formation required for sperm-egg fusion is CD9-dependent. The 4th international symposium on the molecular and cell biology of egg- and embryo-coats, November 2004 (Mie, Japan)
8. Miyado, K. Tetraspanin and gamete membrane fusion.. Mammalian oogenesis and epigenetic modification, October 2005 (Chiba, Japan)
9. 宮戸健二 テトラスパニンによる膜融合の制御機構 第28回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2005年12月(福岡)

特許出願

特願 2005-129198 「哺乳動物卵内への細胞外物質の導入促進剤および導入方法」