

受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその 応用に関する研究

所 属 国立成育医療センター研究所

研究者 藤本純一郎

ヒト ES 細胞マーカーSSEA-4 のエピトープは sialyl Gb5 であり Raft.2 抗体により同定されるが、このエピトープがマウス EC 細胞やヒト EC 細胞では糖蛋白上の糖鎖に存在することが判明した。ウニ精子に、硫酸化シアル酸 (8-O-硫酸化 N-アセチルノイラミン酸) をもつ新規糖鎖構造が特定の糖タンパク質に存在することを見だし、その糖鎖構造が硫酸化シアル酸をもつ新規シアル酸重合体 (α-2,9-結合ポリシアル酸) であることを明らかにした。この構造に対して作成したモノクローナル抗体は、ブタ精子由来ラフトにも反応し、また、ブタ精子に α-2,8-結合ポリシアル酸構造の存在も確認され、この構造の哺乳類精子での初めての証明となった。受精における膜融合では CD9 分子が重要な機能を発揮するが、CD9 欠損マウス卵子では、微絨毛が欠損していることが判明した。EGFP-CD9 発現卵を用いた解析で膜融合に伴って、卵膜全体の微絨毛の局在がダイナミックに変化することを明らかにした。また、CD9 の C 末端に結合する蛋白質として β-tubulin を同定した。従来、アクチン繊維によって裏打ちされた細胞膜の動態が膜融合に必須であると信じられてきたが、アクチン繊維は CD9 が存在する微絨毛には集積せず、アクチン重合阻害剤でも、受精の膜融合を抑制することはできなかった。卵成熟には複合糖質の関与が必須であり、ヒアルロン酸合成阻害モデルマウスでは妊娠率が低下する。ヒト不妊症での複合糖鎖の関与を検討するため、高感度かつ簡便な ELISA 法を開発した。

分担研究者

- (1) 名古屋大学生物機能開発利用研究センター 北島 健
- (2) 愛知医科大学・分子医科学研究所 木全弘治
- (3) 国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部 宮戸健二
- (4) 独立行政法人農業生物資源研究所 ゲノム研究グループ 安江 博
- (5) 生化学工業株式会社中央研究所 前田 浩

A. 研究目的

受精、初期胚発生ならびに器官形成過程における細胞表面糖鎖ならびにその関連分子が果たす役割を解析し、受精不全（不妊症）や不育症などの障害克服、幹細胞を用いた再生医療に応用可能な基盤情報を整備することを目的とする。細胞表面には多様な構造をもつ糖鎖が存在するが、精子や卵にはとりわけ大量の糖鎖が存在し受精に重要な役割を果たすことが示唆されてきた。

また、マウス初期胚モデルである胎児性癌細胞 (EC 細胞) 株では成熟段階を示す指標として SSEA などの糖鎖構造が古くから使用されており、最近ではヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) の指標としても注目を集めている。近年、細胞表面糖脂質は各種の重要な機能分子とともに局所的に集族し、いわゆるラフト構造を形成して刺激伝達のプラットフォームを提供することが明らかになってきた。また、各種の糖転移酵素が次々と遺伝子クローニングされ、糖鎖を対象とした分子生物学的なアプローチも可能となりつつある。しかしながら、配偶子形成、受精、初期胚発生、着床等の生命現象における糖鎖の役割に関する研究は未だ不十分であり、ラフト等の新たな概念からのアプローチ、遺伝子工学的アプローチ、モデル細胞や動物を用いた解析が必要である。特に不妊症等の克服にはこれらの基礎研究が必須である。そこで本研究では、大量の精子が調整可能なブタを用いて精子におけるラフト構造の詳細解析と糖質関連遺伝子発現解析、受精における CD9 等のテトラスパニン分子の機能解析、不妊症患者におけるヒアルロン酸結合蛋白解析、EC 細胞や ES 細胞等の幹細胞における糖鎖の構造と機能解析、を行う。

B. 研究方法

1) 初期胚モデルにおける SSEA-4 エピトープ解析

F9 および NCR-G3 細胞をトリプシン-EDTA 処理により単離し、細胞浮遊液を調整した。Raft.2 抗体および蛍光標識抗マウス IgM 二次抗体を用いた間接蛍光抗体法を用いて染色し、フローサイトメトリーおよ

び共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、双方の細胞から、脂質を抽出し、Raft.2 の反応性を TLC-イムノプロットにより検討した。同様に、蛋白抽出液を調整し、Raft.2 の反応性をイムノプロット解析により検討した。

2) 精子上の硫酸化シアル酸の解析

ウニ精子に存在する硫酸化シアル酸をもつ α -2,9-結合ポリシアル酸に対する抗体を作成し、ブタ精子から調整したラフトとの反応性を生化学的に検討した。

3) 複合糖鎖の機能解析

不妊雌マウスの卵巣の組織学的解析を行うと同時に、排卵状況を調べる。さらに、その卵子を採集し、体外受精実験と卵子細胞質内精子注入実験を行い、卵割または受精卵移植後の胚発生率を観察し、卵の成熟程度と受精能力を評価し、体内における受精障害の原因を解明する。SHAP-ヒアルロン酸共有結合複合体形成機構の研究については、複合体形成反応の基質の一つである血清中インター α -トリプシンインヒビター (ITI) の ELISA による定量検出法を確立した。

4) 受精膜融合の機序解明

CD9 の機能解析を行うため、各種の変異型 CD9cDNA の未受精卵への導入、機能分子の局在変動の追跡、two-hybrid システムや免疫沈降等による会合分子の同定、トランスジーン導入による CD9 可視化卵の作成と観察等を行った。

5) 精巣での発現遺伝子解析の効率化

ブタプロタミン遺伝子をモデルとして組織切片上で同遺伝子発現を効率よく実施できる条件設定を行った。

C. 研究結果

1) 初期胚モデル細胞での SSEA-4 エピトープの発現様式

マウス F9 細胞は生化学的解析では糖脂質 sialylGb5 は発現していないが、フローサイトメトリーでは数%が Raft.2 に対して陽性を示した。この反応性は主として細胞質内にあった。そこで、ヒト EC 細胞株 NCR-G3 での sialylGb5 発現様式を解析したところ、F9 と同様に細胞質内での反応性を認めた。蛋白の二次元電気泳動物との Raft.2 の反応性の結果、陽性反応を示すことが判明した。従って、SSEA-4 エピトープはこれらの細胞では糖蛋白上に存在していると結論した。

2) 硫酸化シアル酸の機能

ウニ精子において、硫酸化シアル酸 (8-O-硫酸化 N-アセチルノイラミン酸) をもつ新規糖鎖構造が特定の糖タンパク質に存在することを見いだした。また、その糖鎖構造が硫酸化シアル酸をもつ新規シアル酸重合体 (α -2,9-結合ポリシアル酸) であることを決定した (Miyata et al., *Glycobiology*, 14, 827, 2004)。この構造に対するモノクローナル抗体を作成し、ブタ精子由来ラフトとの反応性を検討したところ、ブタ精子においてもウニの精子で発見された硫酸化シアル酸をもつ糖タンパク質を見いだした。

3) 複合糖質の機能

(1) マウスモデルを用いた機能解析

卵丘組織細胞外マトリックスの形構築機構を解析するために、排卵直後の SHAP-HA 複合体欠損の卵丘組織における様々な卵丘マトリックス成分 (PG-M/Versican, TSG6 など) の分布と存在状態を、蛍光標識抗体を用いて調べた。卵丘細胞の表面にそれらの存在が観察され

たが、細胞と細胞の間には殆ど存在せず、卵丘マトリックス高次構造体の細胞間相互作用における SHAP-HA 複合体の中心的な役割が明らかとなった。

(2) SHAP-HA 複合体形成機構と不妊症

既に開発されていた SHAP-HA 複合体の ELISA 定量測定法を改良し、その感度を大幅に高めることに成功した。分担研究者が所属する施設の不妊症患者 24 名の血清を解析したが異常所見は得られなかった。

4) 受精膜融合の機序解明

CD9 を欠損した未受精卵に各種変異型 CD9 分子を発現させたところ、CD9 の C 末端が膜融合に重要であることが判明した。可視化 CD9 を発現する卵の観察等の結果、CD9 は微絨毛に存在し、受精過程に伴って精子結合部位へ集積すること、精子融合後は拡散することが判明した。未受精卵で CD9 と共役する分子として、b-tubulin、85Kd, 100Kd, 200Kd 超の未知蛋白が候補として挙げられた。

5) 精巣での発現遺伝子解析の効率化

ブタプロタミン遺伝子をモデルとし、組織固定用還流液と固定液の検討、ハイブリダイゼーション用プローブの選定、反応時間設定ならびに組織貼付用基材の選択などを行った。

D. 考察

受精の機序解明は、不妊症対策という臨床的な課題への対応策提示のみならず、ES 細胞の樹立やクローン化技術による医療技術の開発にもつながる可能性を持つ。

本研究では、卵の成熟、精子の機能、受精過程そして ES/EC 細胞という初期発生プロセス前後の重要な場면을対象とし、糖

鎖に着目しつつ機能分子の役割を明らかにする研究体制となっている。

すでにいくつかの重要な知見が得られているが、3年間でより具体的な成果を出したい。

E. 結論

1) 初期胚マーカーSSEA-4 エピトープがマウスおよびヒト EC 細胞では糖脂質のみならず糖蛋白としても存在することを明らかにした。

2) 哺乳類の精子上に硫酸化シアル酸をもつ新規シアル酸重合体が存在することを世界で初めて明らかにした。

3) 受精膜融合では CD9 の C 末端が重要であることを明らかにし、また、CD9 と共役する複数分子を同定した。

4) 不妊症の原因解明につながる複合糖質機能解析 ELISA を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant stock of Vero cells. *Microbiol Immunol* 48: 377-387, 2004.

2) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell

receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.

3) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.

4) Zhuo, V. C. Hascall, K. Kimata. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004; 279: 38079-38082.

5) S. Cattaruzza, M. Schiappacassi, K. Kimata, A. Colombatti, R. Perris. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *Faseb J* 2004;18:779-81.

6) N. Itano, T. Sawai, F. Atsumi, O. Miyaishi, S. Taniguchi, R. Kannagi, M. Hamaguchi, K. Kimata. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *J Biol Chem* 2004;279:18679-18687.

7) I. Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 2004;279:33281-33289.

8) 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).

9) Nakamura Y., Yamamoto M., Miyado K., Okano HJ., Fukagawa R., Higaki K., Yamasaki M. and Okano H.: A novel marker for Purkinje cells, KIAA0864 protein. An analysis based on a monoclonal antibody HFB-16 in developing human cerebellum. *J. Histochem. Cytochem.* In Press (2005).

2. 学会発表

1) 竹野内寿美, 清河信敬, 大喜多肇, 藤本純一郎. 糖脂質 Gb3 を介して伝達される細胞骨格系再構成の誘導刺激. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9~11日, 2004.

2) Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Katagiri Y, Okita H, Fujimoto J. Effects of intracellular signals mediated by Shiga toxin binding. 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, Japan, Aug 30~Sep 2, 2004.

3) Katagiri YU, Takenouchi H, Tang W-R, Taguchi T, Okita H, Kiyokawa N, Fujimoto J. SSEA-4 antigens on embryonal carcinoma cells defined with anti-sialylGb5 monoclonal antibody Raft.2 (ワークショップ). 第77回日本生化学会大会, 横浜, 10月14~16日, 2004.

4) Jiwen Wu, Lisheng Zhuo, Fukiko Atsumi, Mayumi Kawano, Koji Kimata. Structure and function of cumulus

HA-rich matrix. 第51回マトリックス研究会大会. 京都, 2004.4.9.

5) Hideto Watanabe, Kazu Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Fukiko Atsumi, Yoshihiko Yamada, Koji Kimata. Proteoglycan aggregate of versican / PG-M in cartilage. 11th Gordon Research Conference Proteoglycans. New Hampshire, U.S.A., 2004.7.11-16.

6) Miyado K, Kazuo Yamagata, Masaru Okabe et al. 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. Nov 8-13, 2004, Shima, Mie Pref, Japan.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し