

表3. JCRB におけるヒト ES、iPS 細胞の継代の手順

	手 順	時 間
準 備	25 cm ² フラスコ ^① に0.1%ゼラチン溶液を 2 ml ずつ入れる ^② 。 37°Cインキュベーターに静置。 MEF 用培地を作成 ^③ 。 ゼラチン液を吸引。PBS にて洗浄。 各フラスコに MEF 用培地を 4 ml ずつ入れる。 15 ml チューブに MEF 培地を 9 ml 入れる。 N ₂ に入れたまま MEF をクリーンベンチ近くを持ってくる。 バイアルの蓋をクリーンベンチ内で開けてバイアルの N ₂ を抜く。 37°Cウォーターバスに入れて溶解。半分以上凍った状態でクリーンベンチ内へ移動する。MEF 培地でピペッティングしながら溶解。MEF 浮遊液を 15 ml チューブに入れる。 1000 rpm 遠心 新しい MEF 用培地に MEF を浮遊させる。 MEF 細胞浮遊液を 1 ml ずつ各フラスコに入れる。 MEF を CO ₂ インキュベーターに入れて、培養。 MEF 用培地からES用培地 (FGF-2 なし) に交換し、培養 ^④ 。	30 min できるだけ短い時間で行う。 2 min
	ヒト ES、iPS 細胞を培養しているフラスコの培地を吸引。 1 unit/ml Dispase [®] (Roche/ 解凍後 3 日以内に使用) を 1 ml 入れる。 37°C・CO ₂ インキュベーターに入れてインキュベーション。 Dispase を吸引。 hES 培地 10 ml を入れて、10 ml ピペットをつけたピペットエイド (強にする) で培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす (できるだけ回数を少なくする。2 回程度のピペッティングでコロニーがはがれないような場合は、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす)。 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。 15 ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300 rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する)。 新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない)。 MEF の培地を吸引。 各フラスコに細胞浮遊液を入れる (Slit の割合は株による) 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認。 CO ₂ インキュベーターに入れて培養。	3~10 min ^⑤ 2 min 24 h
培地 交 換	接着率が悪い株の場合、翌日の培地交換は行わない場合もある 培地交換に必要な hES 培地をチューブに分取し、FGF-2 を入れる。 37°Cウォーターバスで培地を温める。 細胞の状態を顕微鏡でチェック。 温めた培地をクリーンベンチに持ってくる。 フラスコの培地を吸引。 温めた培地を入れる。 細胞の状態をチェック ^⑥ 。 CO ₂ インキュベーターに入れて、培養。 基本的に毎日培地交換を行う ^⑦ 。	(24 h) 5 min

- ① メーカーによって細胞の生着率や継代時のディスペーゼの処理時間なども変わってくる。当バンクではコーニングを使用している。
- ② 成育医療センター樹立 iPS 細胞は、C57/BL6 マウスの MEF を使用して樹立されている。市販のものでは、Hygro Resistant Strain C57/BL6 (ミリポア) が使用可能であることを確認している。MEF バイアル 1 本を30枚の 25 cm² フラスコに播種している。ただし、ロット差があるため、新しいロットの際には、密度を変えて播種してチェックする必要がある。
- ③ high glucose, L-glutaminem, 15%牛胎児血清 (ES グレード) 含有 DMEM
- ④ MEF は播種してから24時間後では十分に広がっていないため、2 日後以降に使用する方が望ましい。継代する前に、事前にヒト ES 用培地に交換をしておき、MEF をヒト ES 培地になじませておくとよい。
- ⑤ Dispase の活性は解凍後 3 日以後は急激に低下する。細胞分散の処理時間を一定にするためには、用事解凍して使用するのが望ましい。また、提示されている酵素活性が同様であっても、会社によって微妙にその活性は異なる。当セルバンクでは Roch・Dispase 1 unit/ml で使用できることは確認している。
- ⑥ Dispase に対する感受性は株によって異なる。新しいロットのディスペーゼあるいは新しい細胞株の場合には、まず、3 分37°Cで処理して顕微鏡でコロニーの状態を確認する。ES、iPS 細胞のコロニーのエッジが光って、少しだけ丸くカールしていたら、すぐにディスペーゼを除く。コロニーが巻きあがるようにカールしている場合には処理時間が長すぎる。その場合、簡単に揺らしただけでコロニーがはがれてしまう可能性があるため、ディスペーゼは吸引せずに、培地を加えて遠心してディスペーゼを除く。2~3 回培地で洗った方が生着率が良い。
- ⑦ 培地の調整でよく間違えるのが 2-ME の濃度である。2-ME の濃度が高い場合、培地交換してすぐに細胞が死んでいく。
- ⑧ 平日は毎日培地交換を行うが、週末は土曜日が日曜日のどちらか 1 回のみに行っている。ただし、その場合、コンフルエントでない状態にしておく必要がある。

色体異常が誘導されると報告されている^{20,21)}。操作者による差も大きく、今後改良がもっとも必要な事項であると考えられる。

① 機械的

機械的、いわゆる mechanical による継代方法¹⁾が、染色体変異が少なく、分化能や未分化性の維持がもっとも良いと、ヒト ES 細胞研究者の間では信じられている。顕微鏡下で、形のよいコロニーを探し、まず、その周りのフィーダーを先の細いプラスチックパスツールで除き、コロニーを50~100程度の細胞集団になるようにプラスチックパスツールで小さく刻んでからピックアップし、新しいMEFの上に播種する。この手法は熟練と時間を要し、また、大容量での培養は難しい³⁾。最近、インビトロジェンから専用のスクレーパー (StemPro EZPassage) が発売された。時間と熟練は要さずに継代できるがコストは高くなる。

② コラゲナーゼ

0.1% コラゲナーゼ IV¹³⁾ とセルスクレーパーを用いる方法が一般的に使用されている。培地を除き、0.1% コラゲナーゼ IV を 1 ml 加えて37°Cのインキュベーターに入れて約10分程度処理する。時間は酵素活性によるが、時々、顕微鏡下で観察し、フィーダーとコロニーの間に間隙ができる程度になったら、コラゲナーゼを吸引し、新しい培地を2~3 ml 加えてからセルスクレーパーで細胞をはがす。培地をさらに7 ml 程度加えてフィーダーとコロニーを引き離すように、ピペッティングを数回行う。シェフィールド大学では、コラゲナーゼとガラスビーズを使用している。

③ EDTA

0.1~0.2% EDTA で処理すると、適度な大きさにコロニーが分散され、未分化なコロニーだけが回収できる。分化した細胞集団から未分化なコロ

ニーを選択する際に使用できる。しかし、EDTA に対する感受性は細胞株によって異なり、シングルセルになる細胞株もあり、すべての細胞株に使用できるわけではない。

④ トリプシン/EDTA

ヒト ES 細胞はトリプシンに弱く、0.05% trypsin / 1 mM EDTA を使用する。通常の継代に使用されている細胞株もあるが、FACS による解析の際にシングルセルにするために使用されることが多い。

⑤ トリプシン/コラゲナーゼ (CTK)

日本国内では末盛ら³⁾ により開発された $[Ca^{2+}]$ で活性を弱めたトリプシンとコラゲナーゼとの混合液 CTK が使用されていることが多い。処理時間も短く簡便であるが、均一で適度な大きさのコロニーにするためには若干の熟練を要する。

⑥ ディスパーゼ

合同酒精が自然界より分離選択したバチルス属の菌株の培養液より精製したプロテアーゼで、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに細胞を分散できる。Thomson らによる樹立時には、機械的方法かディスパーゼが用いられている。当セルバンクにおいては、現在、iPS 細胞の継代にはディスパーゼを使用している。

⑦ アクユターゼ™

ミリポアから販売されているプロテアーゼ、コラーゲン分解酵素による細胞剥離剤とされているが組成は明らかにされていない。ヒト ES 細胞は通常シングルセルとなると増殖できないが、この分散液を使用した場合には、シングルセルにしても細胞が増殖できる。クローナルアッセイなどの場合に使用されている。

⑧ ROCK インヒビター

細胞分散液ではないが、シングルセルにした際のアポトーシスを阻害する薬剤として、笹井ら²²⁾により報告された。遺伝子導入後のクローニングなど、シングルセルにする必要がある際に使用されている。

4. 未分化性の同定法について

未分化なヒト ES 細胞に発現するマーカー分子や表面抗原などが報告されているが、未分化性を同定する決定的なマーカー分子は見つかっていない。現状では、形態からの判断がもっとも確実であると言われている。

① 形 態

細胞質がほとんどなく、丸い核を持った細胞がコンパクトに集合したコロニーを形成し、細胞間境が明瞭でない特徴的な様相を呈する¹⁷⁾ (図1)。

② アルカリフォスファターゼ活性の同定

未分化なマウス、サル、ヒトの ES 細胞は、組織非特異的アルカリフォスファターゼ活性を示すことが知られている。その機能については、明らかとなっていない。

③ FACS による細胞表面抗原の同定

ヒト Embryonal carcinoma (EC) に発現する糖脂質である stage specific embryonic antigen (SSEA)-3、

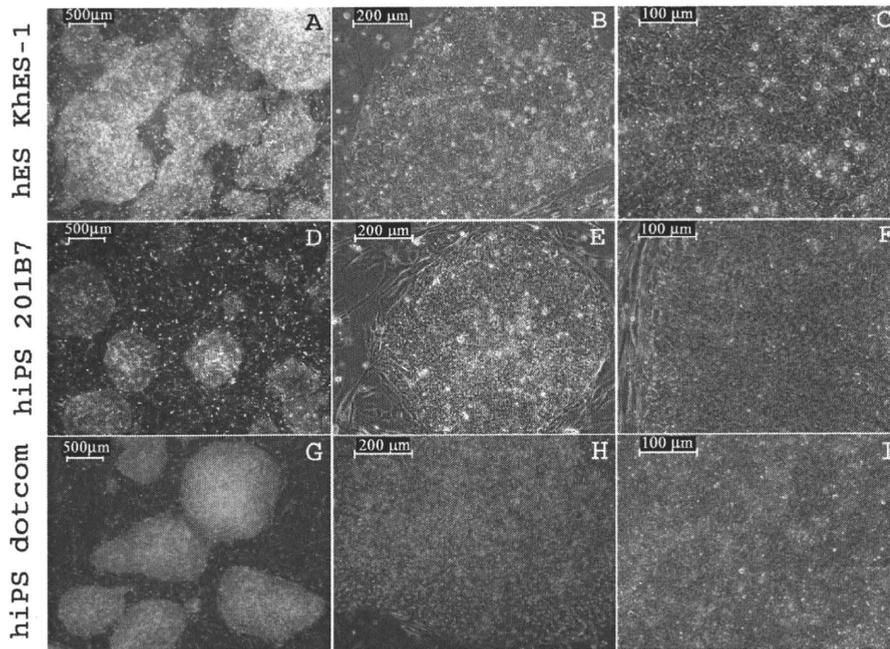


図1：
 A~C：hES khES-1 京都大学再生医科学研究所 により分配されたヒト ES 細胞 khES-1。
 D~F：hiPS 201B7;物質—細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター/再生医科学研究所・山中伸弥教授から共同研究契約により提供されたヒト iPS 細胞 201B7 clone。
 G~I：hiPS Dotcom; 国立成育医療センター生殖医療研究部梅澤明弘部長より寄託されたヒト iPS 細胞 dotcom clone。

SSEA-4、糖タンパクである Tra-1-60、Tra-1-81 が広く使用されている²³⁾。SSEA-1 は、マウスにおいては未分化な ES 細胞において発現するが、ヒトにおいては、分化した ES 細胞において発現する。SSEA-3、SSEA-4 は、未分化なヒト ES 細胞にも発現するが、赤血球にも発現する。一般的には、SSEA-1 と、SSEA-3 あるいは SSEA-4 が調べられている。しかし、SSEA-3 が発現しているからといって SSEA-4 が発現しているとは限らないため、これらの抗体をセットで解析することが望ましい。

④ RT-PCR による遺伝子発現の解析

現在、多くの転写因子が未分化性維持に機能していることが報告されている。なかでも、OCT3/4、NANOG、SOX2 はマウスならびにヒト ES 細胞の未分化マーカー遺伝子として認識されている²⁴⁾。そのほかに、REX-1、TGDF、FGF-4、LIN28、LEFTB など未分化なヒト ES 細胞に発現することが報告されている。ヒト ES 細胞研究 Initiative project による世界で樹立された59株のヒト ES 細胞における遺伝子発現解析の結果が報告されているので¹²⁾、参照されたい。

5. 培養の実際

ヒトES、iPS細胞は、継代ごとに、あるいは、操作者により細胞の状態が異なってしまうことはよく見られ、大変扱いが難しい。操作者の腕が問われる細胞である。油断をすると、ほとんどの細胞が分化してしまう。実験をする上でも、毎回同じ結果を得ることが難しいため、指導する研究者は間違いが起きないように十分に監督する必要があるだろう。株によって相当に特徴が異なるため、あまり扱いにくいようであれば、株を変えることをお勧めする。以上、簡単ではあるが、ヒトES、iPS細胞の培養方法についての概要をまとめてみた。本総説が、多くの研究者によるより良い成果産出

の一助となることを願う。

謝 辞

ヒトES、iPS細胞の培養に関与している独・医薬基盤研のすべての皆様に感謝します。なお、ヒトES、iPS細胞に関する本研究は、厚生労働省科学研究費補助金によりサポートされています。

文 献

- 1) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147, 1998.
- 2) Suemori, H.: [Establishment of human embryonic stem cell lines and their therapeutic application]. *Rinsho Byori*, 52, 254–258, 2004.
- 3) Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N.: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 926–932, 2006.
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676, 2006.
- 5) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861–872, 2007.
- 6) Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. and Thomson, J. A.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917–1920, 2007.
- 7) Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. and Daley, G. Q.: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146, 2008.
- 8) Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. and Melton, D. A.: Induction of pluripotent stem cells from

- primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008.
- 9) Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E. and Eggan, K.: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218–1221, 2008.
 - 10) Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, C. A., Chien, K. R. and Melton, D. A.: Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26, 313–315, 2008.
 - 11) Andrews, P. W., Benvenisty, N., McKay, R., Pera, M. F., Rossant, J., Semb, H. and Stacey, G. N.: The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat Biotechnol*, 23, 795–797, 2005.
 - 12) Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R. D., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery, C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K. Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. F., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A. and Zhang, W.: Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*, 2007.
 - 13) Hoffman, L. M. and Carpenter, M. K.: Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23, 699–708, 2005.
 - 14) Park, S. P., Lee, Y. J., Lee, K. S., Ah Shin, H., Cho, H. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y. and Lim, J. H.: Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod*, 19, 676–684, 2004.
 - 15) Skottman, H. and Hovatta, O.: Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*, 132, 691–698, 2006.
 - 16) Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S. and McKay, R. D.: Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1063–1075, 2006.
 - 17) Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J. and Andrews, P. W.: Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 13, 325–336, 2004.
 - 18) Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. and Thomson, J. A.: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 24, 185–187, 2006.
 - 19) Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. and Bongso, A.: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18, 399–404, 2000.
 - 20) Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A. and Andrews, P. W.: Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 22, 53–54, 2004.
 - 21) Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S. and Schulz, T. C.: Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev*, 13, 585–597, 2004.
 - 22) Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K. and Sasai, Y.: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 25, 681–686, 2007.
 - 23) Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H. and Andrews, P. W.: Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 20, 329–337, 2002.
 - 24) Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. and Young, R. A.: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947–956, 2005.

- 25) Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J. A.: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, 227, 271–278, 2000.
- 26) Sheffield, T. U. o.: Center for Stem Cell Biology Training Course in Human Embryonic Stem Cell Culture 2007 Protocol Handbook. 2007.
(Accepted 21 January 2009)

Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan

Miho Kusuda Furue

Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan, Laboratory of Cell Processing, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Abstract In 1998, human embryonic stem (ES) cells have been established. Since then, the human ES cells have been used as a tool for understanding the mechanisms in human development and regeneration application research in the world. However, in Japan, not so many searchers have used human ES cells. It is caused from several issues. In 2007, human induced pluripotent stem (iPS) cells have been developed. The situation in Japanese stem cell research have been changing. As the characteristics of Human iPS cells are quite similar to those of human ES cells, researcher can use the protocols of human ES cells for iPS cell research. In this review, I have summarized the culture and characteristics of human ES and iPS cells.

Key Words: human ES cells, human iPS cells, feeder cells

マウス ES 細胞の無血清培養法

林 洋平¹⁾、古江-楠田 美保^{2,3,4)*}、明石 靖史⁵⁾、岡本 哲治⁵⁾、浅島 誠^{1,4)}

¹⁾ 東京大学大学院 総合文化研究科 生命環境科学系

²⁾ 独立行政法人 医薬基盤研究所 生物資源研究部門 細胞資源研究室

³⁾ 京都大学再生医科学研究センター 幹細胞医学研究センター 細胞プロセッシング

⁴⁾ 科学技術振興機構 国際共同研究事業

⁵⁾ 広島大学大学院 医歯薬総合 先進医療開発科学講座 分子口腔医学 顎顔面外科学

【要約】 マウス胚性幹 (ES) 細胞は、哺乳類の発生過程における培養モデルとして、分子生物学的、生化学的解析に用いられている。しかし、培養条件下における未分化状態の維持、及び分化制御はいまだ不十分である。我々の研究グループは、未分化マウス胚性幹細胞の既知の成分よりなる無血清培地の確立を行った。従来の血清入りの条件とこの無血清培養条件を比較したところ、白血病阻害因子 (LIF) の効果が異なっており、この無血清条件下では LIF は未分化性の維持のみならず細胞の生存、増殖に働いていることが示された。また、細胞外マトリックスの効果を検証したところ、コラーゲンが未分化性の維持に適していることがわかった。このように、無血清培養法はマウス ES 細胞における生理活性物質の影響を解析するのに適しており、今後、その応用による分化誘導法の開発が期待できる。ここで、その方法について概説する。

キーワード： ES 細胞、無血清培養、細胞外マトリックス

序 文

胚性幹 (ES) 細胞^{1,2)} は、成体を構成する全種類の細胞種に寄与することができ、*in vitro* においても同様の分化能を示すと考えられている。このため、ES 細胞は哺乳類・発生過程の解析ツールとして、分子生物学的、生化学的解析に用いられて

いる^{3,4)}。ES 細胞を *in vitro* における生物学的解析のための確実な培養モデルとして使用するためには、未分化状態の維持、及び分化制御が重要であると考えられる。しかし、未だその制御技術は不十分である。その一因として、現在、一般的な ES 細胞の培養条件においては支持細胞や動物血清が用いられていることが挙げられる。これら動物由来の不特定因子が存在している培養条件では、安定した再現性が得られず、添加した生理活性物質の影響を正確に解析することは困難である。ES 細胞の未分化性ならびに分化を制御するために、単純かつ既知の因子よりなる培養液の開発、また、そのような条件下における生理活性物質の詳細な

連絡者：古江-楠田 美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 生物資源研究部門 細胞資源研究室

〒567-0085 茨木市彩都あさぎ1-6-8

TEL : 072-641-9811 内線 (3210)

FAX : 072-641-9851

E-mail: mkfurue@nibio.go.jp

解析が求められている。

我々は、これまで種々の無血清培地の開発、ならびにそれらを用いた各種細胞の培養法の確立を行ってきた^{5,6)}。今回、支持細胞を用いず未分化性を長期に維持できるマウスES細胞の無血清培養条件を確立した。また、その過程で白血病阻害因子(LIF)と細胞外マトリックス(ECM)の効果を検証した⁷⁾ので、これを概説する。

1. 未分化マウスES細胞の無血清培養条件の探索

一般的なマウスES細胞の培養は、まずマウス胎児由来線維芽細胞を播種し、翌日に、それを支持細胞としそこに播種する。血清を含む培地で2~3日ごとに継代培養することにより未分化状態を維持できる^{1,2)}。支持細胞と血清を培養液から除去することは困難であると考えられていたが、支持細胞から分泌されるLIFが未分化性維持に重要であることが明らかとなり、支持細胞の代わりにLIFを用いることが可能となった⁸⁾。1999年に行われたWilesらは、無血清培養条件で3代以上培養すると分化した細胞が出現してしまうと報告している⁹⁾。このことから、血清にはES細胞の未分化状態を維持するためのさらに重要な因子が含まれていると考えられていた。2003年に、Smithらのグループが神経細胞培養用のサプリメントであるN2ならびにB27と、BMP4ならびにLIFを用いることで、支持細胞だけでなく血清も使用することなくES細胞の自己複製能を維持したまま培養できるという結果を報告し¹⁰⁾、ES細胞が血清を用いず未分化性を維持できることが明らかとなった。

一方、我々も独自に未分化ES細胞の無血清培養に成功した。マウスES細胞用にESF基礎培地を開発し、その培地に7F(亜セレン酸ナトリウム、メルカプトエタノール、エタノールアミン、インシュリン、トランスフェリン、オレイン酸-BSA、

LIF)を加えたESF7培地をマウスES細胞の未分化維持用の培地として採用した。血清入りの培地からESF7培地に移して、ES細胞のD3株(ES-D3細胞)を3代ほど培養すると、ほぼ全てのコロニーが、境界に突起のない、細胞間隙が不明瞭なコロニーとなった(培養6日目、図1A)。これは、未分化ES細胞に特有の様相である。一方、一般に使用されている血清入りのES細胞培養用培地CEMで2~3日は未分化状態を維持できるが、6日間培養したものでは一部の細胞が分化してコロニーより出て成長し、線維芽様、上皮様、あるいは神経様の細胞が観察される(図1B)。ESF7培地中で一ヶ月間培養した細胞において未分化マーカーの検出を行ったところ、アルカリホスファ

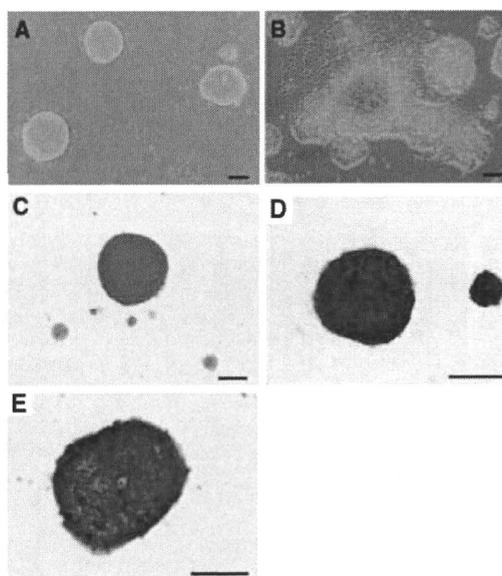


図1 無血清培養条件でのES-D3細胞の未分化性。(A): ESF7培地中でのES-D3細胞の位相差顕微鏡像。(B): CEM培地中でのES-D3細胞の位相差顕微鏡像。(C): ESF7培地中でのES-D3細胞におけるアルカリホスファターゼ活性染色像。(D): ESF7培地中でのES-D3細胞におけるOct3/4の免疫染色像。(E): ESF7培地中でのES-D3細胞におけるSSEA-1の免疫染色像。Bars: 100 μ m (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41, 19-28, 2005. Figure 1 A, B, C, E, Gより)

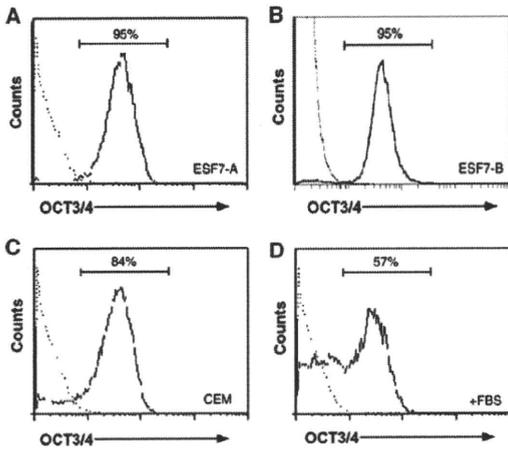


図 2 Oct3/4 タンパク質のフローサイトメトリーによる発現プロファイル.
 (A): ESF7 培地にて 6 ヶ月間培養した ES-D3 細胞の発現プロファイル. (B): ESF7 培地にて 2年間培養した ES-D3 細胞の発現プロファイル. (C): CEM 培地にて 6 日間培養した ES-D3 細胞の発現プロファイル. (D): ESF 基礎培地に FBS と、2-メルカプトエタノールを添加して 6 日間培養した ES-D3 細胞の発現プロファイル. (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41, 19-28, 2005. Figure 4より)

ターゼ活性はほとんどの細胞が陽性 (図 1C) であり、転写因子である Oct3/4 (図 1D)、細胞表面抗原である SSEA1 (図 1E) も同様にほとんどの細胞で陽性であった。さらに Oct3/4 の発現を flow cytometry によって解析すると、ESF7 培地で 6 ヶ月以上培養したもの (図 2A)、2 年以上培養したもの (図 2B)、ともに 95% 以上の細胞が陽性であった。一方、CEM 培地では 84% の陽性率であり、(図 2C)、LIF をのぞくと、57% まで陽性率は低下する (図 2D)。以上の結果から、ESF7 培地を用いて ES-D3 細胞の未分化性を効率的に維持できることが示された。また、株化されていない 129/SV マウス由来の ES 細胞 (継代数 10) を ESF7 培地へ移して培養を行うと、ES-D3 細胞同様に未分化様コロニーが観察され (図 3A)、これらのコロニーは、ES 細胞の未分化マーカーの一つであるアルカリホスファターゼ活性が (図 3B)、Oct-3/4 であった (図 3C)。また、この株化していない ES 細胞の ESF7 培地での増殖能を検討すると (図 3D)、

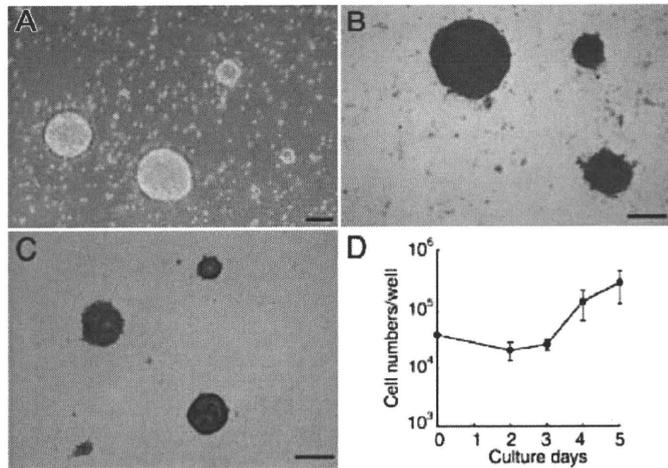


図 3 株化されていない 129Sv マウス由来の ES 細胞の無血清培養条件下の未分化性.
 (A): ESF7 培地で 3 日間培養した 129Sv ES 細胞 (継代数 12) の位相差顕微鏡像. (B): ESF7 培地中での 129Sv ES 細胞におけるアルカリホスファターゼ活性染色像. (C): ESF7 培地中での 129Sv ES 細胞における Oct3/4 の免疫染色像. (D): 129Sv ES 細胞の増殖曲線. 129Sv ES細胞を 4×10^4 cells/well (24 well plate) にて播種し、細胞数を 1 日毎に計測. 値は平均値 ± 標準偏差 Bars; 100 μ m. (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41, 19-28, 2005. Figure 6より)

倍加時間は14時間であり、十分な増殖が得られることがわかった。以上の結果は、種々の ES 細胞の未分化性の維持において、ESF7 培地が有効であることを示している。

2. 無血清培養条件下における ES 細胞に対する LIF の効果

インターロイキン6ファミリーに属するサイトカインである LIF は gp130 と、低結合能のレセプ

ターからなるヘテロ受容体と結合し、細胞内のシグナルを活性化させる。これまで LIF は、マウス ES 細胞の未分化性の維持に対して重要であることが示されている⁸⁾。その下流シグナル経路である STAT3 経路の活性化は特に、マウス ES 細胞の未分化性の維持に対して必須であることが示されている^{12,13)}。一方、別の下流シグナルである MAPK 経路の活性化は、ES 細胞の未分化性に、抑制的に働くことが報告されている¹⁴⁾。また、別の下流シグナルである PI3K 経路¹⁵⁾ や Src ファミリーの活

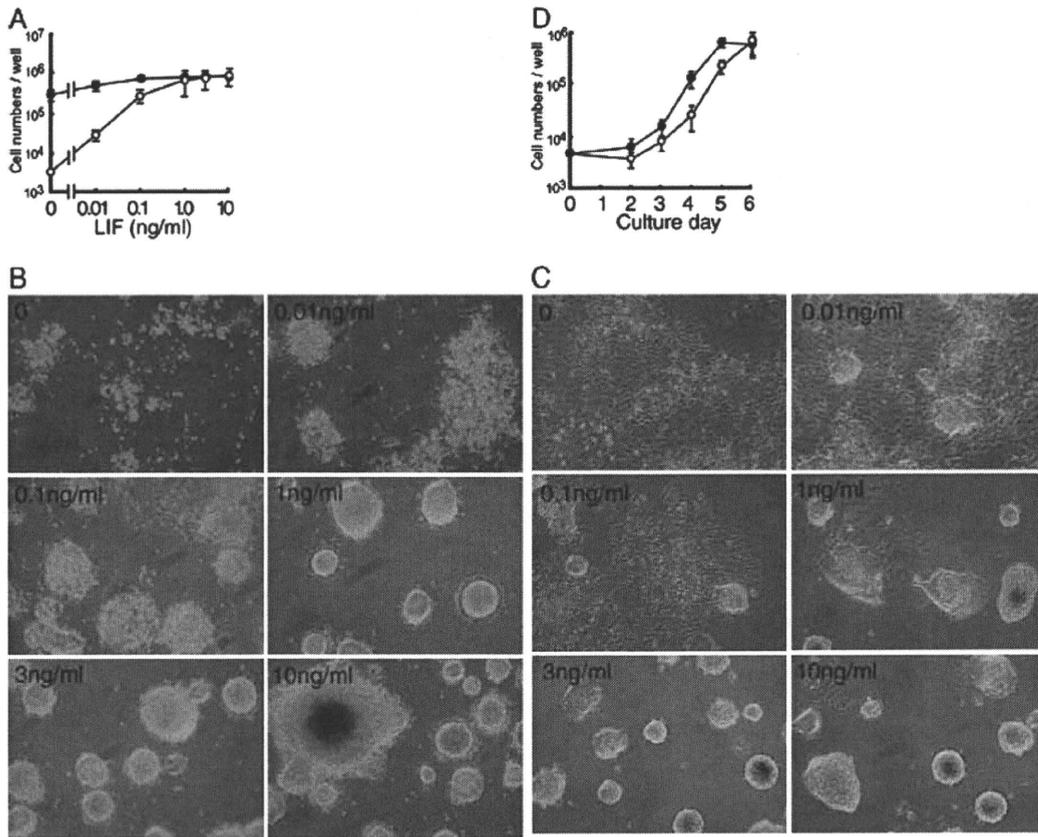


図4 無血清条件下のES細胞における LIF の効果。

(A): ESF7 培地中 (白丸)、CEM 培地中 (黒丸) における各 LIF 濃度で添加した条件にて、ES-D3 細胞を 5×10^3 cells/well (24well plate) にて播種し、細胞数を 5 日目に計測。値は 3 回の計測の平均値±標準偏差。(B): 各 LIF 濃度の ESF7 培地で 3 日間培養した ES-D3 細胞の位相差顕微鏡像。(C): 各 LIF 濃度の CEM 培地で 3 日間培養した ES-D3 細胞の位相差顕微鏡像。(D): ES-D3 細胞の増殖曲線。ES-D3 細胞を 5×10^3 cells/well (24 well plate) にて播種し、細胞数を 1 日毎に triplicate させて計測。値は平均値±標準偏差 Bars; 100 μ m. (In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41, 19–28, 2005. Figure 2 より)

性化¹⁶⁾も未分化性の維持に促進的に働くことが報告されている。LIFによるマウスES細胞の未分化性の維持は、これらの下流シグナルの活性化のバランスで成り立っていると考えられている。

無血清培養条件ESF7においてLIFの効果を検討したところ、これまで知られていなかったマウスES細胞に対する生存、増殖に対する機能が明らかとなった。血清を含む培養条件CEM、あるいはESF7培地でLIFの濃度のES-D3細胞の増殖能に及ぼす影響を調べた。その結果、ESF7では培養5日後でのES-D3細胞の細胞数はLIFの濃度依存的に増大した。一方、CEMではLIFの濃度を変化させてもほとんど細胞数に変化はなかった(図4A)。細胞の形態は、ESF7では、LIFの非存在下あるいは低濃度では、ほとんどが細胞死を示す縮小した細胞形態が観察されたが、高濃度のLIF存在下では細胞死はほとんど見られず、未分化の形態を維持していた(図4B)。CEMでは、LIFの非存在下あるいは低濃度では、ほとんどのコロニーにおいて分化した細胞形態が観察されたが、高濃度のLIF存在下では、未分化の形態を呈していた(図4C)。細胞増殖は、ESF7とCEMでその倍加時間はほぼ同等であった(図4D)。以上の結果から、無血清培養条件下において解析することにより、LIFはES細胞の未分化性の維持と増殖性の両方に関与していることが明らかとなった。さらに、ESF7で、LIF存在下、非存在下の条件で培養した細胞のDNAをPropidium Iodideで染色してflow cytometryで解析すると、LIF存在下では、G0/G1期を示すDNA量以下にはピークはほとんど検出されなかったが、LIF非存在下では、G0/G1期を示すDNA量以下のピークが多くなり、S期やG2/M期を示すDNA量のピークは減少していた(図5)。以上の結果は、ESF7からLIFをのぞくと、DNAの断片化によるアポトーシスを起こすことを示しており、LIFはES細胞の生存に必要な役割を持っていることを示している。また、血清中には未分

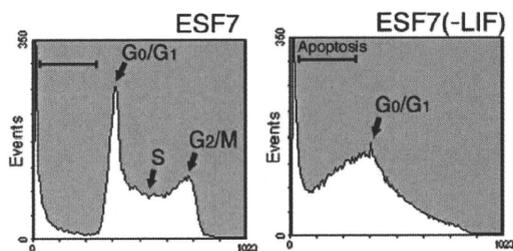


図5 フローサイトメトリーによるES-D3細胞におけるDNA量の解析。

ES-D3細胞をLIFあり(左パネル)／なし(右パネル)のESF7培地にて2日間培養。その細胞のDNAをPIにて染色、フローサイトメトリーにて解析。矢印はそれぞれG1期、S期、G2期の細胞のDNA量のピークを示す。(In Vitro Cell Dev Biol Anim. 41, 19-28, 2005. Figure 3より)

化性の維持には働かないが、ES細胞の増殖を促進する因子、アポトーシスを抑制し、分化を促進する因子が含まれていることが示唆される。

今後は、これら血清含有条件/無血清条件で異なったマウスES細胞のLIFの下流シグナルの挙動を調べることで、これらのシグナルの関与がより詳細に明らかになることが期待できる。

3. 無血清条件下におけるECMのES細胞に対する効果

細胞外マトリックス(ECM)成分は、移動や増殖など細胞の挙動に、多大な影響を与えることが知られている^{17,18,19,20)}。一部の種類の幹細胞においては、ECMが自己複製能に対して重要な機能を果たしていることがこれまでに示されている²¹⁾。また、ラミニンやフィブロネクチンなど比較的発生初期に発現がみられるECM成分、またはその主要なレセプターであるインテグリンを欠損したES細胞では、分化異常が見られる^{22,23)}ことから、細胞分化に重要な役割を持っていることが推測される。

筆者らはES細胞の無血清条件培養法を確立する

にあたり、ES 細胞の未分化維持に適する ECM 成分の探索を行った。さらに、それら ECM 成分の

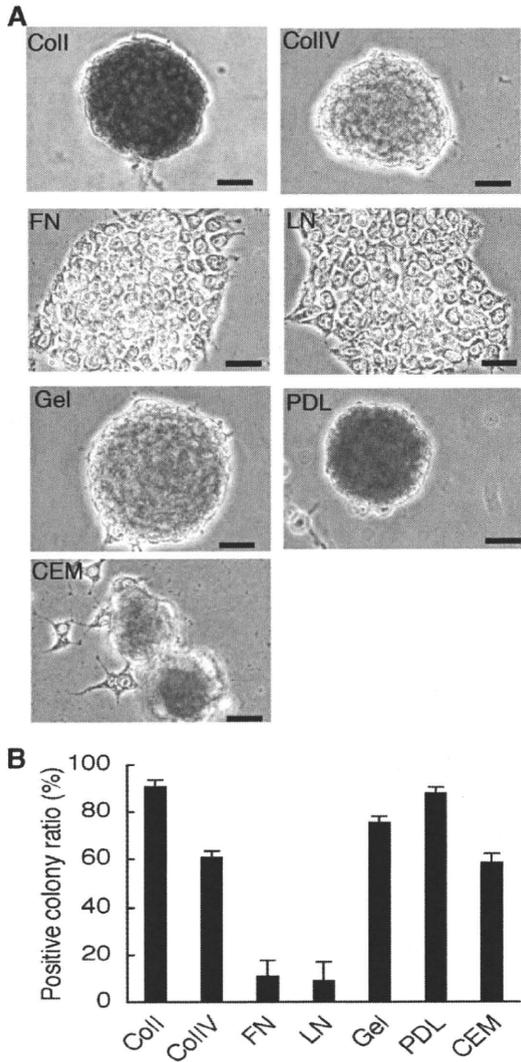


図 6 各 ECM 上での ES-D3 細胞の未分化性。
 (A): 各細胞外マトリックス上、ESF7 培地にて 4 日間培養した ES-D3 細胞のアルカリホスファターゼ活性染色像。Bars, 50 μ m. (B): 各細胞外マトリックス上、ESF7 培地にて 4 日間培養した ES-D3 細胞のアルカリホスファターゼ活性染色陽性コロニー数の割合。割合の値は 100 以上のコロニーから計測し、平均値±標準誤差を示す (N = 5). (Stem Cells. 25, 3005-3015, 2007. Figure 1 A, B より)

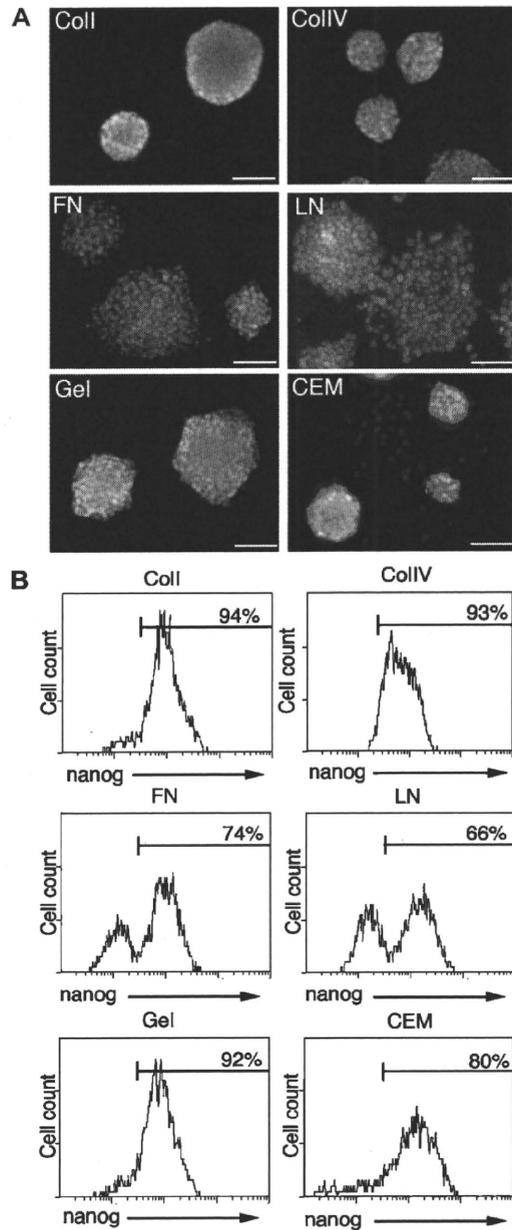


図 7 各 ECM 上での ES-D3 細胞の Nanog タンパク質の発現。(A): (A): 各細胞外マトリックス上、ESF7 培地にて 4 日間培養した ES-D3 細胞の Nanog タンパク質の免疫染色像。Bars, 50 μ m. (B): 各細胞外マトリックス上、ESF7 培地にて 4 日間培養した ES-D3 細胞の Nanog タンパク質のフローサイトメトリーによる発現プロファイル。(Stem Cells. 25, 3005-3015, 2007. Figure 1 C, D より)

ES 細胞に対する影響も解析した²⁴⁾。ESF7 培地を用いて、各種細胞外マトリックス成分（I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ゼラチン）でコートしたディッシュ上で ES-D3 細胞を培養し、未分化マーカーの検出を行った。ES 細胞の未分化マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ（AP）活性を基質染色により検出した。AP 活性は、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ゼラチンにおいては高い陽性率を示したが、ラミニンやフィブロネクチン上では、陽性率は低下した（図 6A, B）。未分化マーカーである Nanog タンパク質の抗体を用いて免疫染色法、Flow Cytometry 法によって、その発現を同定すると、フィブロネクチンやラミニン上において一部の細胞においてその発現が低下していた（図 7A, B）。以上の結果から、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ゼラチン上では ES 細胞は未分化に保たれ、フィブロネクチン、ラミニン上では分化が促進されていることが示された。この結果を踏まえ、ES 細胞の未分化性を維持した培養は各種コラーゲン上で行うことが適切であると考えた。

おわりに

無血清培地 ESF7 を用いて、支持細胞を用いることなく、マウス ES 細胞株の未分化性を維持でき、また、長期間に渡って継代可能である。この培養法は、マウス ES 細胞に対する外因性の生理活性物質の影響を調べるのに適しており、これまでの結果では、LIF が ES 細胞の未分化性の維持に関わるのみならず、生存、増殖にまで関わる必須の分子であることが示されている。さらに、ECM 成分では、コラーゲンでは未分化性を維持できるが、フィブロネクチンやラミニンは LIF 存在下であっても、ES 細胞の分化を促進することがわかった。また、今回は示していないが、培地の組成、使用する ECM を変化させることで、マウス ES 細胞を各種

の細胞系列へと特異的に分化誘導することも可能である^{11, 25)}。ES 細胞を不特定の因子を含まない条件で培養することは、ES 細胞の効率的な未分化維持、分化制御を可能とし、これらの分子的機構を解明するのに有効であると考えられる。

近年、ヒト ES 細胞や iPS 細胞の再生移植医療への応用が考えられている。しかし、支持細胞や動物血清を用いる従来の培養方法では、ウイルスやヒトの免疫系に対して抗原となりうる物質を含んでおり²⁶⁾、移植医療に使用することは安全面に問題がある。そこで、これらの動物由来因子を含まない培養条件の開発が必要となっている。今回紹介したマウスにおける無血清培養法を改良して、古江らは、ヒト ES 細胞用の無血清培地 hESF9 を開発した²⁷⁾。この培養法は、添加因子の正確な影響を高感度に解析でき、効率的な分化培養を行うのに利点があるとともに、ウイルスなどの病原体や特定の抗原物質を含まない再生移植医療に適していると考えられ、今後期待される。

文 献

- 1) Evans M. J. and Kaufman M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154-156, 1981.
- 2) Martin G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78, 7634-7638, 1981.
- 3) Gardner R. L. and Brook F. A.: Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol*. 41, 235-243, 1997.
- 4) Tanaka T. S., Kunath T., Kimber W. L., Jaradat S. A., Stagg C. A., Usuda M., Yokota T., Niwa H., Rossant J. and Ko M. S.: Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res*. 12, 1921-1928, 2002.
- 5) Furue M., Zhang Y., Okamoto T., Hata R. I. and Asashima M.: Activin A induces expression of rat Sel-11 mRNA, a negative regulator of notch signaling, in rat salivary gland-derived epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 282, 745-749, 2001.

- 6) Ohnuma K., Hayashi Y., Furue M., Kaneko K. and Asashima M.: Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells. *J Neurosci Methods*. 2005.
- 7) Abe T., Furue M., Kondow A., Matsuzaki K. and Asashima M.: Notch signaling modulates the nuclear localization of carboxy-terminal-phosphorylated smad2 and controls the competence of ectodermal cells for activin A. *Mech Dev*. 122, 671–680, 2005.
- 8) Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M. and Rogers D.: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336, 688–690, 1988, Gao Z., Mackenzie I. C., Williams D. M., Cruchley A. T., Leigh I. and Lane E. B.: Patterns of keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. *J Oral Pathol*. 17, 178–185, 1988.
- 9) Wiles M. V. and Johansson B. M.: Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res*. 247, 241–248, 1999.
- 10) Campbell K.: Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr Opin Neurobiol*. 13, 50–56, 2003.
- 11) Furue M., Okamoto T., Hayashi Y., Okochi H., Fujimoto M., Myoishi Y., Abe T., Ohnuma K., Sato G. H., Asashima M. and Sato J. D.: Leukemia Inhibitory Factor as an Anti-Apoptotic Mitogen for Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells in a Serum-Free Medium without Feeder Cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 41, 19–28, 2005.
- 12) Niwa H., Burdon T., Chambers I. and Smith A.: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 12, 2048–2060, 1998.
- 13) Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T. and Yokota T.: STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J*. 18, 4261–4269, 1999.
- 14) Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J. and Smith A.: Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 210, 30–43, 1999.
- 15) Paling N. R., Wheadon H., Bone H. K. and Welham M. J.: Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*. 279, 48063–48070, 2004.
- 16) Anneren C., Cowan C. A. and Melton D. A.: The Src family of tyrosine kinases is important for embryonic stem cell self-renewal. *J Biol Chem*. 279, 31590–31598, 2004.
- 17) Hata R., Akai J. and Kimura A.: Cell position-dependent reciprocal feedback regulation of type I collagen gene expression in cultured human skin fibroblasts. *Cell Biol Int*. 22, 185–191, 1998.
- 18) Boudreau N. and Bissell M. J.: Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol*. 10, 640–646, 1998.
- 19) Danen E. H. and Yamada K. M.: Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol*. 189, 1–13, 2001.
- 20) Ramirez F. and Rifkin D. B.: Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol*. 22, 101–107, 2003.
- 21) Watt F. M. and Hogan B. L.: Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 287, 1427–1430, 2000.
- 22) Fassler R., Pfaff M., Murphy J., Noegel A. A., Johansson S., Timpl R. and Albrecht R.: Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol*. 128, 979–988, 1995.
- 23) Li S., Harrison D., Carbonetto S., Fassler R., Smyth N., Edgar D. and Yurchenco P. D.: Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*. 157, 1279–1290, 2002.
- 24) Hayashi Y., Furue M. K., Okamoto T., Ohnuma K., Myoishi Y., Fukuhara Y., Abe T., Sato J. D., Hata R. and Asashima M.: Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*. 25, 3005–3015, 2007.
- 25) Nakanishi M., Kurisaki A., Hayashi Y., Warashina M., Ishiura S., Kusuda-Furue M. and Asashima M.: Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. *Faseb J*. 2008.
- 26) Martin M. J., Muotri A., Gage F. and Varki A.: Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*. 11, 228–232, 2005.
- 27) Furue M. K., Na J., Jackson J. P., Okamoto T., Jones M., Baker D., Hata R., Moore H. D., Sato J. D. and Andrews P. W.: Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105, 13409–13414, 2008.

(Accepted ●●, 2008)

Chemically defined serum-free culture for mouse embryonic stem cells

Yohei Hayashi¹⁾, Miho Kusuda Furue^{2,3,4)}, Yasufumi Myoishi⁵⁾, Tetsuji Okamoto⁵⁾, Makoto Asashima^{1,4)}

¹⁾ Department of Life Sciences (Biology), Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

²⁾ JCRB Cell Bank, Division of Bioresources, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

³⁾ Laboratory of Cell Processing, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

⁴⁾ International Cooperative Research Project ÅilCORPÅj/Japan Science and Technology Agency (JST)

⁵⁾ Department of Molecular Oral Medicine and Maxillofacial Surgery, Division of Frontier Medical Sciences, Graduate Science School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Abstract

Mouse embryonic stem cells are pluripotent cells derived from the inner cell mass of blastocysts, which differentiate into all three germ layers of the developing mouse embryo. Experimental manipulation of mouse embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo* provides a model of mammalian development that is amenable to molecular and cellular analysis. We have developed a chemically defined serum-free medium which can maintain mouse embryonic stem cells in undifferentiated phenotype for more than two years. Under the serum-free culture conditions, leukemia inhibitory factor is sufficient to stimulate cell proliferation, inhibited cell differentiation, and maintained self-renewal of ES cells although the proliferation effect of LIF was not observed in the presence of serum. This serum-free culture method may be useful to study the biological effect of various factors on mouse ES cells. We have introduced this culture method here.

The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice

Kenji Miyado^{*†§}, Keiichi Yoshida^{*¶}, Kazuo Yamagata^{||}, Keiichi Sakakibara^{*}, Masaru Okabe^{**}, Xiaobiao Wang^{*}, Kiyoko Miyamoto^{*}, Hidenori Akutsu^{*}, Takahiko Kondo^{*}, Yuji Takahashi^{*}, Tadanobu Ban^{††}, Chizuru Ito[¶], Kiyotaka Toshimori[¶], Akihiro Nakamura^{*}, Masahiko Ito^{*}, Mami Miyado^{*}, Eisuke Mekada^{**}, and Akihiro Umezawa^{*}

^{*}National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan; [†]School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8510, Japan; [¶]Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan; ^{||}Center for Developmental Biology, RIKEN Kobe Institute, 2-2-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan; and ^{**}Research Institute for Microbial Diseases, and ^{††}Faculty of Medicine, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Edited by Ryuzo Yanagimachi, University of Hawaii, Honolulu, HI, and approved July 8, 2008 (received for review November 8, 2007)

Membrane fusion is an essential step in the encounter of two nuclei from sex cells—sperm and egg—in fertilization. However, aside from the involvement of two molecules, CD9 and Izumo, the mechanism of fusion remains unclear. Here, we show that sperm-egg fusion is mediated by vesicles containing CD9 that are released from the egg and interact with sperm. We demonstrate that the CD9^{-/-} eggs, which have a defective sperm-fusing ability, have impaired release of CD9-containing vesicles. We investigate the fusion-facilitating activity of CD9-containing vesicles by examining the fusion of sperm to CD9^{-/-} eggs with the aid of exogenous CD9-containing vesicles. Moreover, we show, by examining the fusion of sperm to CD9^{-/-} eggs, that hamster eggs have a similar fusing ability as mouse eggs. The CD9-containing vesicle release from unfertilized eggs provides insight into the mechanism required for fusion with sperm.

fertilization | membrane fusion | EGFP | exosome

Fertilization is an essential process that naturally produces a cell capable of developing into a new individual. It consists of sequential events, including membrane fusion of sperm and egg (1). Despite the importance of understanding fertilization in controlling human reproduction and preserving endangered species, the molecular basis underlying the fusion remains a mystery, however. Previously, we reported that a tetraspan-membrane protein (tetraspanin), CD9, is expressed on the egg plasma membrane and is required for sperm-egg fusion (2–4). A role of CD9 in other fusion events also has been demonstrated (5). When sperm are added to eggs from CD9^{-/-} females, the sperm bind to the egg plasma membrane normally, but fusion is severely impaired (2–4). Two recent observations suggest that CD9 plays a role in the organization of egg membrane. First, CD9 is transferred from the egg to the fertilizing sperm present in the perivitelline space (PVS) (6), suggesting the involvement of a process similar to trogocytosis, a mechanism of cell-to-cell contact-dependent transfer of membrane fragments (7). Second, CD9 deficiency alters the length and density of microvilli on the egg plasma membrane (8). CD9 is also known to be a component of exosomes, membrane vesicles released from a wide range of cells (9, 10). Despite its relationship to CD9, the involvement of exosome release in sperm-egg fusion remains unknown. In the present study, we analyzed the potential of enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged CD9 (CD9-EGFP) as a reporter protein to study sperm-egg fusion in living mouse eggs.

Results

To observe the movement of CD9 during sperm-egg fusion, we generated a transgenic mouse line that expressed CD9-EGFP only in eggs (Fig. 1A), and converted to the genetic background of CD9^{-/-} mice by mating mice. Western blot analysis using anti-CD9 monoclonal antibody (mAb) revealed that an expected CD9-EGFP with a molecular mass of 51 kDa (CD9 and EGFP

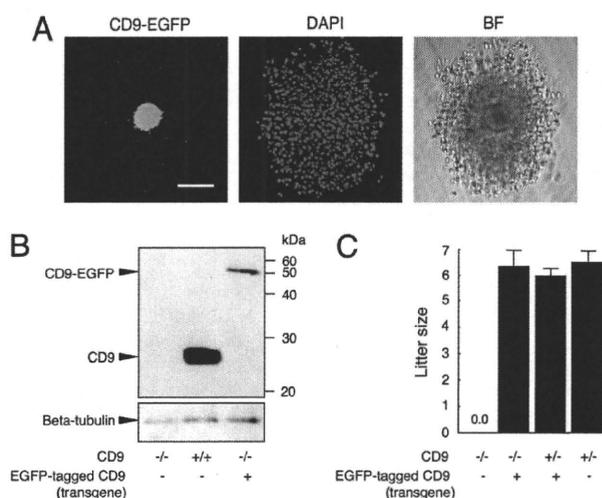


Fig. 1. Generation of mice expressing CD9-EGFP in eggs. (A) CD9-EGFP specifically expressed in eggs with mouse ZP3-promoter. Cumulus oocyte complex from Tg⁺CD9^{+/+} oviducts was collected at 14 h after injection of human chorionic gonadotropin. Nuclei of an egg and cumulus cells were counterstained with DAPI. (Left) CD9-EGFP. (Center) DAPI. (Right) Bright field. Scale bar: 100 μ m. (B) Western blot analysis for eggs collected from CD9^{-/-}, CD9^{+/+}, and Tg⁺CD9^{-/-} mice. The same amounts, including 30 eggs of each lysate, were examined by anti-CD9 and anti-beta-tubulin mAbs (internal control). (C) Litter sizes of CD9^{-/-} ($n = 31$), Tg⁺CD9^{-/-} ($n = 35$), Tg⁺CD9^{+/+} ($n = 16$), and CD9^{+/+} mice ($n = 15$) (mean \pm SEM). The numbers of females examined are in parentheses.

contributing to 24 and 27 kDa, respectively) was expressed in the eggs collected from Tg⁺CD9^{-/-} mice; however, the amount of CD9-EGFP expressed in CD9^{-/-} eggs was estimated to be 10% of that of endogenous CD9 in the CD9^{+/+} eggs (Fig. 1B). Despite the small amount of CD9-EGFP expressed in eggs, CD9-EGFP demonstrated the ability to reverse the sterility of CD9^{-/-} females (Fig. 1C). The numbers of pups obtained from Tg⁺CD9^{-/-} females (6.4 ± 0.5) were similar to those from

Author contributions: K. Miyado, K. Yamagata, M.O., and A.U. designed research; K. Miyado, K. Yoshida, K.S., X.W., K. Miyamoto, H.A., T.K., Y.T., T.B., C.I., A.N., M.I., and M.M. performed research; K. Miyado contributed new reagents/analytic tools; K. Miyado, K. Yoshida, H.A., K.T., E.M., and A.U. analyzed data; and K. Miyado wrote the paper.

The authors declare no conflicts of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

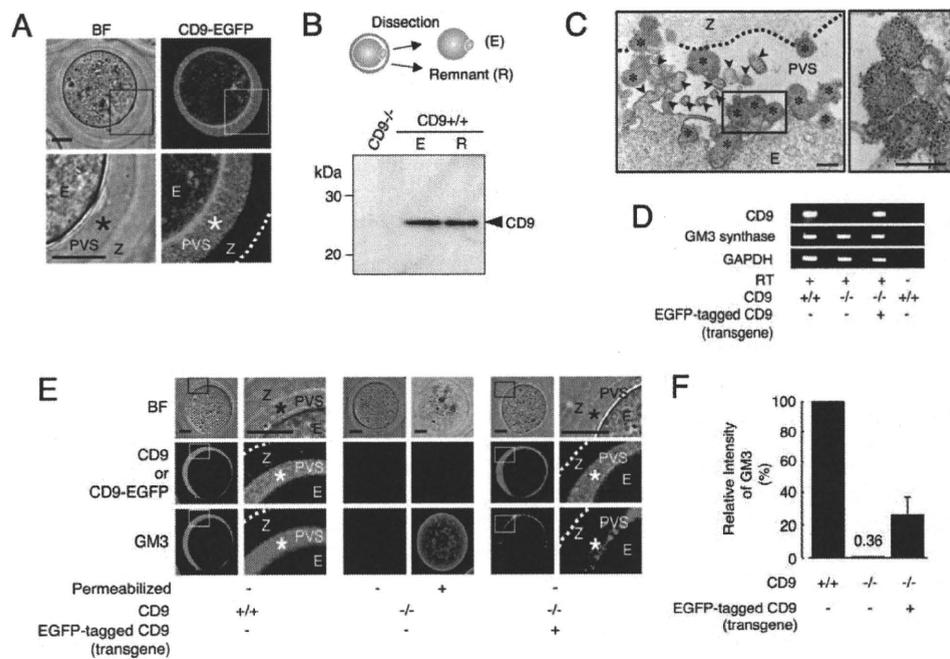
*K. Miyado and K. Yoshida contributed equally to this work.

§To whom correspondence should be addressed. E-mail: kmiyado@nch.go.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0710608105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

Fig. 2. Identification of secretory vesicles containing CD9 from unfertilized eggs. **A**, A single confocal image showing CD9-EGFP in unfertilized $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs (E), including the PVS (*), zona pellucida (Z), and the outer margin of the zona pellucida (dotted line). (Left) Bright field. (Right) CD9-EGFP. Lower are enlarged images of the boxed areas. **(B)** Western blot analysis for eggs mechanically fractionated as shown in the diagram: zona-intact $CD9^{-/-}$ eggs (E) (10 eggs per lane) and zona-free $CD9^{+/+}$ eggs (10 eggs per lane). The medium (R) containing the remnant material from 40 eggs treated with a piezo manipulator was loaded in each lane. **(C)** Immunoelectron-microscopic analysis of $CD9^{+/+}$ eggs. The zona-intact $CD9^{+/+}$ eggs were examined using anti-CD9-mAb and 5-nm gold beads conjugated with anti-rat IgG Ab. Left panel: Image including CD9-containing vesicles (*), microvilli (arrowheads), zona pellucida (Z), perivitelline space (PVS), and egg (E). (Right) An enlarged image of the boxed region in the left panel. Scale bar: 200 nm. **(D)** RT-PCR for CD9, GM3 synthase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcripts in $CD9^{+/+}$, $CD9^{-/-}$, and $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs. The same amounts, including 50 eggs in each reaction, were examined. **(E)** Localization of GM3 and CD9 in $CD9^{+/+}$, $CD9^{-/-}$, and $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs. (Left) Wild-type. (Middle) $CD9^{-/-}$. (Right) $Tg^+CD9^{-/-}$. Right-side of the sets of wild-type and $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs are enlarged images of the boxed regions. The live eggs were examined, and the internal localization of GM3 in $CD9^{-/-}$ eggs was examined under fixed, permeabilized conditions. **(F)** Comparison of the fluorescent intensities of GM3 stained by antibody in wild-type ($n = 10$), $CD9^{-/-}$ ($n = 9$), and $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs ($n = 10$) (mean \pm SEM). The average values of the wild-type eggs were set to 100%.



$Tg^+CD9^{+/+}$ and $CD9^{+/+}$ females (6.0 ± 0.2 and 6.5 ± 0.5) and greater than those from $CD9^{-/-}$ females (0.0 ± 0.0). The $CD9^{+/+}$ females did not exhibit any loss in fertility that could cause a reduction of litter size relative to that of the $CD9^{+/+}$ females (4). Furthermore, the transgene had no effect on normal fertility. These results demonstrate that transgenically expressed CD9-EGFP can compensate for the loss of intrinsic CD9 and yield eggs with the ability to fuse with sperm.

Based on the foregoing evidence, we observed the subcellular localization of CD9-EGFP in "living" $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs (Fig. 2A). As expected, confocal microscopic analysis allowed the visualization of two types of CD9-EGFP localization: intense on the plasma membrane and also in the cytoplasm. Unexpectedly, we found loosely filled, noncompacted CD9-EGFP in the PVS, a space formed between the zona pellucida and the plasma membrane of the egg. The localization of CD9 outside the eggs also was confirmed by Western blot analysis using anti-CD9 mAb (Fig. 2B). As shown in the diagram, $CD9^{+/+}$ eggs were mechanically fractionated into denuded eggs and other components (R) using a piezo manipulator (11). The fraction R, containing the zona pellucida and the components in the PVS, was centrifuged and subjected to Western blot analysis. The amount of CD9 in the remnant material from 40 eggs was found to be densitometrically equal to that of 10 zona-free eggs, demonstrating an estimated relative abundance of CD9 in the remnant of 20% per egg. Subsequently, we performed immunoelectron-microscopic analysis on the $CD9^{+/+}$ eggs. We identified the vesicles bound to gold particles inside the PVS (Fig. 2C). The sectioned microvilli contained a branched network of actin filaments, whereas the variously sized vesicles (50–250 nm in diameter) had uniformly dense materials rather than actin filaments. We also compared $CD9^{+/+}$, $Tg^+CD9^{-/-}$, and $CD9^{-/-}$ eggs by electron-microscopic analysis [supporting information (SI) Fig. S1]. The accumulation of vesicles in the PVS in the $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs was comparable to that in the $CD9^{+/+}$ eggs, whereas it was not seen in the $CD9^{-/-}$ or germinal vesicle-staged $CD9^{+/+}$ eggs. These results indicate

that 20% of the total amount of CD9 is stored as vesicles in the PVS during meiosis.

We next examined the expression of ganglioside GM3, identified as a CD9-associated molecule (12) and a component of exosomes (10), in $CD9^{+/+}$, $CD9^{-/-}$, and $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs. First, we confirmed the expression of GM3 synthase (ST3GalV/SAT-1) (13) in these eggs by RT-PCR (Fig. 2D). Then we investigated the localization of GM3 by immunostaining these live eggs with anti-GM3 mAb (Fig. 2E). This antibody has been demonstrated to recognize GM3 in the plasma membrane of cells without treatment for permeabilization (14). Finally, we measured the fluorescent intensities of GM3 in these live eggs (Fig. 2F). As expected, in wild-type eggs, GM3 was colocalized with CD9 in the PVS and plasma membrane (Fig. 2E Left and Fig. 2F). In contrast, in $CD9^{-/-}$ eggs, the fluorescent intensities of GM3 were decreased dramatically in the PVS and plasma membrane ($0.4\% \pm 0.2\%$, relative to 100% for the $CD9^{+/+}$ eggs), consistent with the loss of CD9 (Fig. 2E Center and Fig. 2F), whereas GM3 could be detected in the cytoplasm of $CD9^{-/-}$ eggs that had been permeabilized by a detergent after fixation. Moreover, the expression of CD9-EGFP reversed the decrease of GM3 in the PVS and plasma membrane of $CD9^{-/-}$ eggs ($25.6 \pm 10.7\%$) (Fig. 2E Right and Fig. 2F), corresponding to the amount of CD9-EGFP quantified by Western blot analysis (Fig. 1B). In addition, electron-microscopic analysis revealed that the number of characteristic membrane structures, termed microvilli (1), were significantly decreased in the $CD9^{-/-}$ eggs compared with the $CD9^{+/+}$ eggs (Fig. S2A and B). The numbers of microvilli were increased by $\approx 50\%$ by the expression of CD9-EGFP in the $CD9^{-/-}$ eggs. The analyses of three types of eggs indicate that CD9- and GM3-containing vesicle release is linked to microvilli formation.

We next investigated the involvement of CD9-containing vesicles in sperm-egg fusion (Fig. 3). We found that, based on the length of microvilli (Fig. S2C), zona-intact $Tg^+CD9^{-/-}$ eggs can be categorized into two groups (Fig. 3A). From single

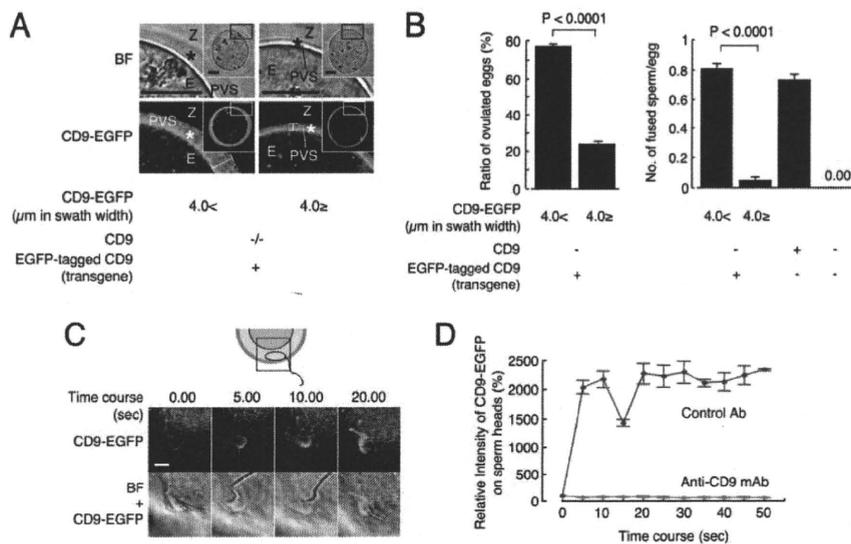


Fig. 3. Involvement of CD9-containing vesicles in sperm-egg fusion. (A) Categorization of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs (E) into two groups according to the thickness of CD9-EGFP in the PVS (*) and the inner region of the zona pellucida (Z) ($>4.0 \mu\text{m}$ or $\leq 4.0 \mu\text{m}$), indicated by double-headed lines. The boxed regions in *Insets* are enlarged. Scale bar: $20 \mu\text{m}$. (B) Comparison of the fusing ability of two groups of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs with wild-type sperm. Left graph: Ratio of two groups of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs ovulated from 12 females (mean \pm SEM). Right graph: Number of sperm fused per egg in two groups of zona-intact $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs ovulated from 12 females ($>4.0 \mu\text{m}$, $n = 204$; $\leq 4.0 \mu\text{m}$, $n = 66$) (mean \pm SEM). $\text{CD9}^{+/+}$ ($n = 120$) and $\text{CD9}^{-/-}$ ($n = 112$) served as positive and negative controls, respectively. (C and D) Monitoring of the association of egg CD9-containing vesicles with wild-type sperm. $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs were incubated with the sperm and monitored immediately after the sperm penetrated the zona pellucida under the presence of anti-CD9 mAb (boxed region). The values were calculated from data scanning by confocal microscopy (15 sperm in triplicate dishes) Blue: Preimmune rat IgG. Red: Anti-CD9 mAb (KMC8) (mean \pm SEM). The average values of the fluorescent intensities of CD9-EGFP at 0 s were set to 100%, and the final concentration of antibodies was adjusted to $50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Scale bar, $5 \mu\text{m}$.

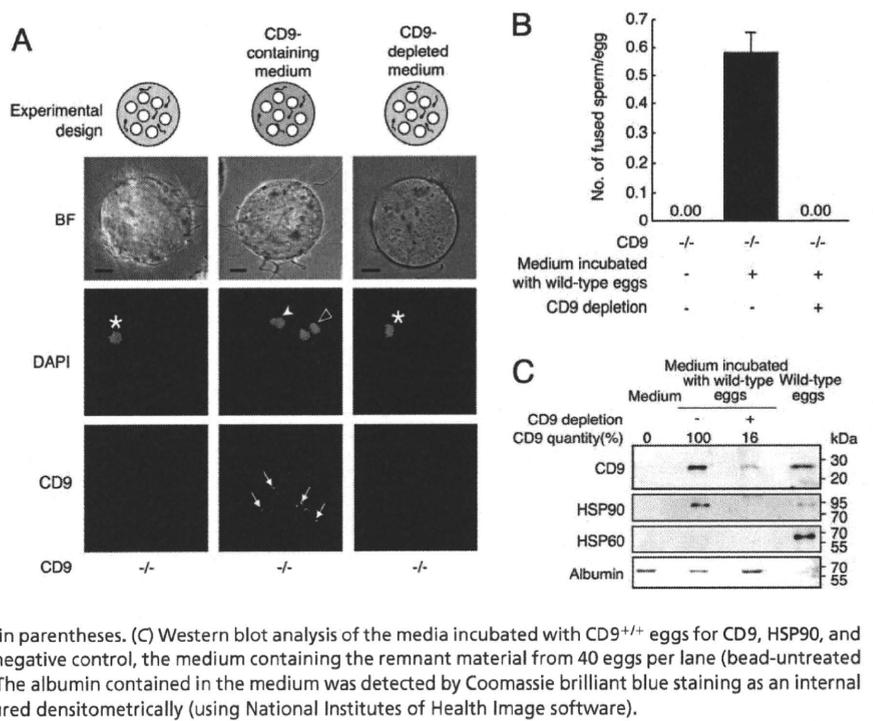
confocal images sectioned through the largest diameter, the accumulation of CD9-EGFP from the plasma membrane to the inner region of the zona pellucida was $>4.0 \mu\text{m}$ in swath width in one group and $\leq 4.0 \mu\text{m}$ in the other group. The accumulation of CD9-EGFP was predicted to show that CD9-containing vesicles are more highly accumulated within the PVS in the $>4.0\text{-}\mu\text{m}$ group compared with the $\leq 4.0\text{-}\mu\text{m}$ group. Comparing the ratio of these two groups in $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ -ovulated eggs revealed a much higher percentage of the $>4.0\text{-}\mu\text{m}$ group ($77.0 \pm 1.3\%$ vs. $23.7 \pm 1.5\%$) (Fig. 3B Left). Therefore, we focused on the heterogeneity of CD9-EGFP accumulation within the PVS and determined the ratio of the two groups in zona-intact $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs that successfully fused with the sperm 6 h after insemination. The $>4.0\text{-}\mu\text{m}$ group of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs showed higher activity for fusion with sperm (0.81 ± 0.04 sperm fused per egg), compared with the $\leq 4.0\text{-}\mu\text{m}$ group of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs (0.05 ± 0.03) and the $\text{CD9}^{-/-}$ eggs (0.00 ± 0.00), and comparable activity to that of wild-type eggs (0.73 ± 0.04) (Fig. 3B Right). The average activity of all $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs (0.72 ± 0.03 sperm fused per egg) was equal to that of wild-type eggs (0.73 ± 0.04 sperm fused per egg). The difference between the two groups of $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs was statistically significant (Fig. 3B). These results suggest that the quantities of CD9-containing vesicles, as assessed by the swath width of CD9-EGFP, are strongly correlated with the frequency of sperm-egg fusion.

To detect the association between sperm and CD9-containing vesicles, we serially monitored the wild-type sperm that penetrated the zona pellucida of the $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs (Fig. 3 C and D). As shown in the diagram, we began monitoring the sperm immediately after the head portion of sperm penetrated the zona pellucida of the $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs (Fig. 3C Upper, boxed area in the diagram). Soon after we began to monitor the sperm, the fluorescent intensities of CD9-EGFP on the sperm heads increased and then decreased rapidly between 0 s and 15 s, then increased again, reaching a maximum at 20 s. At this point, the

CD9-EGFP fully covered the surface of the sperm heads. In contrast, when the sperm were incubated with $\text{Tg}^+\text{CD9}^{-/-}$ eggs in the medium containing anti-CD9 mAb, no increase in intensity of CD9-EGFP on the sperm heads was detected. Anti-CD9 mAbs have been reported to inhibit sperm-egg fusion (4, 15, 16). Our findings demonstrate that the anti-CD9 mAb inhibited the association of sperm with CD9-containing vesicles in parallel to inhibition of sperm-egg fusion.

To determine whether CD9-containing vesicles are capable of initiating sperm-egg fusion, we incubated the sperm with $\text{CD9}^{-/-}$ eggs in medium containing the vesicles collected from $\text{CD9}^{+/+}$ eggs (Fig. 4 and Fig. S3). To restrict the source of CD9 into the vesicles from the $\text{CD9}^{+/+}$ eggs, we used sperm collected from the epididymis of $\text{CD9}^{-/-}$ males. We estimated the capability of the vesicles to influence fusion by counting the number of sperm fused with $\text{CD9}^{-/-}$ eggs. As shown in the experimental design, after the zona pellucida was removed from the $\text{CD9}^{-/-}$ eggs, the eggs were incubated with sperm in the medium containing the vesicles (Fig. 4A). When examined at 1 h after incubation, the sperm were seen to be capable of fusing with $\text{CD9}^{-/-}$ eggs after co-incubation with the vesicles (Fig. 4A Center), indicating restoration of the fusibility of $\text{CD9}^{-/-}$ eggs with the sperm (0.58 ± 0.07 sperm fused per egg) (Fig. 4B). We detected further evidence of sperm-egg fusion in the $\text{CD9}^{-/-}$ eggs from which a second polar body had been extruded. In contrast, we did not detect improved fusibility of sperm with eggs in medium depleted of CD9-containing vesicles using beads conjugated with anti-CD9 mAb (Fig. 4A Right and B). After treatment with the beads, the quantity of CD9 in the depleted medium was significantly decreased, to 16% of the untreated medium (Fig. 4C). In addition, $\text{CD9}^{-/-}$ remnants failed to rescue the fusing ability of $\text{CD9}^{-/-}$ eggs. These findings indicate that the association with CD9-containing vesicles renders the sperm capable of fusing with eggs without endogenous CD9 expression. We estimated the relative abundance of CD9 in the remnant as 18% of the total amount in the eggs (Fig. 4C). We further found

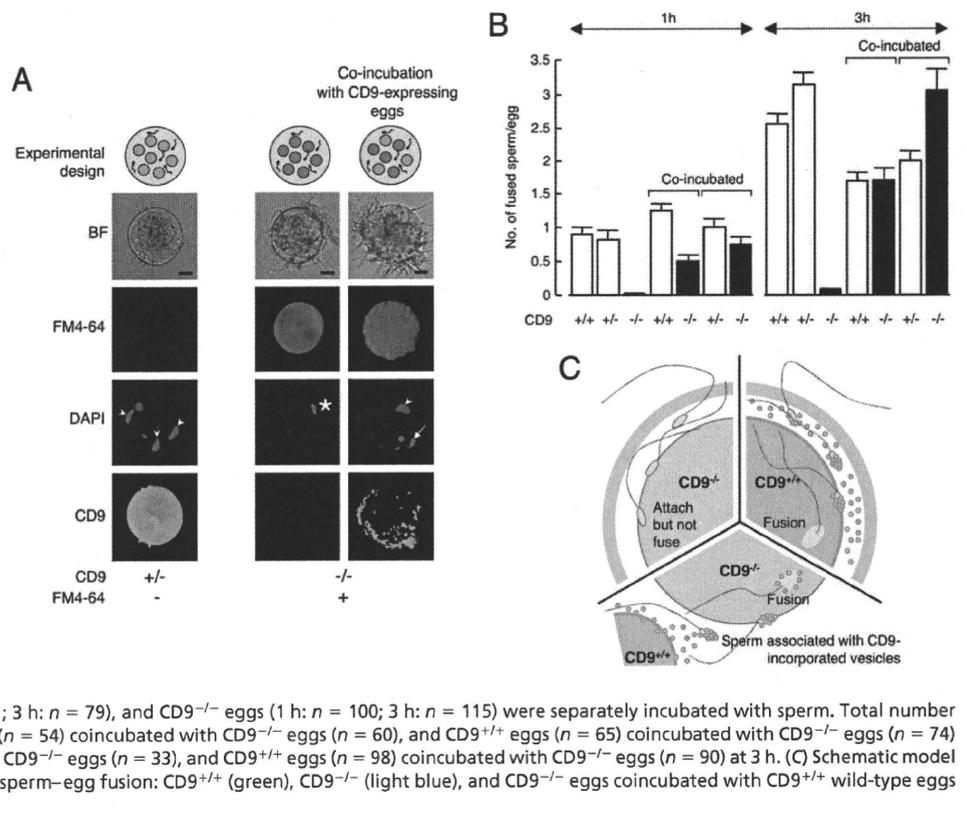
Fig. 4. Identification of fusion-facilitating activity of CD9-containing vesicles. (A) Estimation of the fusion-facilitating ability of the vesicles in sperm-egg fusion. As shown in the experimental design, CD9^{-/-} sperm were incubated with CD9^{-/-} eggs (white circles) in media containing egg-released vesicles after the zona pellucida was removed from these eggs. CD9 was detected by anti-CD9 mAb conjugated with Alexa488. The eggs were preloaded with DAPI before incubation with the sperm, to allow counting of the number of fused sperm. (Left) CD9^{-/-} eggs at 1 h after incubation with the sperm, as a negative control. (Center) CD9^{-/-} eggs cultured in the medium containing CD9 collected from wild-type eggs. (Right) CD9^{-/-} eggs cultured in the medium depleted of CD9 by beads conjugated with anti-CD9 mAb, showing the fused sperm to eggs (arrowhead), metaphase II-arrested chromosomes (*), a second polar body (open arrowhead), and CD9 translocated on the sperm heads (arrow). The fluorescent z-series images were projected as three-dimensional images. Scale bar: 20 μ m. (B) Number of fused sperm with the zona-free eggs counted at 1 h after incubation (mean \pm SEM): CD9^{-/-} eggs as a negative control ($n = 51$), CD9^{-/-} eggs cultured in the medium containing CD9 ($n = 112$), and CD9^{-/-} eggs cultured in the medium depleted of CD9 by antibody-conjugated beads ($n = 74$). The total numbers of eggs examined are in parentheses. (C) Western blot analysis of the media incubated with CD9^{+/+} eggs for CD9, HSP90, and HSP60. Loaded samples (left to right): The medium as a negative control, the medium containing the remnant material from 40 eggs per lane (bead-untreated and -treated), and 5 eggs per lane as a positive control. The albumin contained in the medium was detected by Coomassie brilliant blue staining as an internal control. The quantities of CD9 in the media were measured densitometrically (using National Institutes of Health Image software).



that the decreased amount of CD9 after the bead treatment was synchronized with that of a cytoplasmic chaperone, HSP90 (17), but not with a mitochondrial chaperone, HSP60 (18). Our analysis of the egg-conditioned medium indicated that CD9-containing vesicles contained HSP90, a conserved component of exosomes (9, 10).

To estimate the contribution of CD9-containing vesicles to sperm-egg fusion, we examined the restoration of the impaired sperm-fusing ability in CD9^{-/-} eggs co-incubated with CD9^{+/-} or CD9^{+/+} eggs expressing endogenous CD9 (Figs. 5 and S4A). We predicted that when sperm were incubated with a mixture of eggs, the vesicles released from CD9^{+/-} or CD9^{+/+} eggs would

Fig. 5. Recovery of impaired fusion of CD9^{-/-} eggs with sperm by CD9-containing vesicles. (A) Estimation of the fusion-facilitating ability of the vesicles in sperm-egg fusion. As shown in the experimental design, sperm were incubated with a mixture of CD9-expressing eggs (green circles) and CD9^{-/-} eggs (red circles) after the zona pellucida was removed from these eggs. The eggs were preloaded with DAPI before incubation with sperm, to allow counting of the number of fused sperm. CD9^{-/-} eggs were prestained with FM4-64 and thus were easily distinguished from CD9-expressing eggs after incubation with the sperm. (Left) CD9^{+/-} eggs at 1 h after incubation with the sperm, as a positive control. (Center) CD9^{-/-} eggs, as a negative control. (Right) CD9^{-/-} eggs co-incubated with CD9^{+/-} eggs, showing fused sperm to egg (arrowheads), metaphase II-arrested chromosomes (*), and extruded second polar body (arrow). The fluorescent z-series images were projected as three-dimensional images. CD9 was detected by anti-CD9 mAb conjugated with Alexa488. Scale bar: 20 μ m. (B) Numbers of fused sperm with the zona-free eggs counted at 1 and 3 h after incubation (mean \pm SEM). CD9^{+/-} (1 h: $n = 34$; 3 h: $n = 55$), CD9^{+/+} (1 h: $n = 71$; 3 h: $n = 79$), and CD9^{-/-} eggs (1 h: $n = 100$; 3 h: $n = 115$) were separately incubated with sperm. Total number of coincubated eggs examined: CD9^{+/-} eggs ($n = 54$) coincubated with CD9^{-/-} eggs ($n = 60$), and CD9^{+/-} eggs ($n = 65$) coincubated with CD9^{-/-} eggs ($n = 74$) at 1 h; CD9^{-/-} eggs ($n = 51$) coincubated with CD9^{-/-} eggs ($n = 33$), and CD9^{+/+} eggs ($n = 98$) coincubated with CD9^{-/-} eggs ($n = 90$) at 3 h. (C) Schematic model of involvement of CD9-containing vesicles in sperm-egg fusion: CD9^{+/-} (green), CD9^{-/-} (light blue), and CD9^{-/-} eggs coincubated with CD9^{+/-} wild-type eggs with sperm (yellow).



interact with sperm, and these sperm could fuse with CD9^{-/-} eggs. If sperm-fusing ability were regulated mainly by CD9-containing vesicles, then the number of sperm fused to CD9^{-/-} eggs would be predicted to be almost equal to that fused to CD9^{+/-} or CD9^{+/+} eggs coincubated with CD9^{-/-} eggs. We counted the number of fused sperm in coincubated CD9-expressing eggs (CD9^{+/-} and CD9^{+/+}) and CD9^{-/-} eggs. The CD9^{-/-} eggs were prestained with FM4-64 (19), a fluorescent dye used to stain the membrane of live cells, and thus could be easily distinguished from the CD9^{+/-} and CD9^{+/+} eggs. FM4-64 did not transfer between the CD9^{-/-} eggs and the CD9^{+/-} or CD9^{+/+} eggs. As shown in the experimental design, after the zona pellucida was removed from the eggs, CD9^{-/-} eggs (red circles) were mixed with CD9^{+/-} or CD9^{+/+} eggs (green circles), and sperm were added to the medium containing these eggs (Fig. 5A). At 1 h after insemination, significant fusion of sperm with the CD9^{-/-} eggs was facilitated (0.75 ± 0.11 and 0.50 ± 0.09 sperm fused per egg), corresponding to that in the CD9^{+/-} (1.00 ± 0.13) and CD9^{+/+} eggs (1.25 ± 0.10). At 3 h after insemination, the fusion of sperm with the CD9^{-/-} eggs was restored (3.06 ± 0.30 and 1.70 ± 0.18 sperm fused per egg) to levels comparable to those in the CD9^{+/-} (2.00 ± 0.15) and CD9^{+/+} eggs (1.69 ± 0.13). We also detected a second polar body extruding from the CD9^{-/-} eggs (Fig. 5A Right, arrow). In contrast, we did not observe the translocation of vesicles from the CD9^{+/-} and CD9^{+/+} eggs to the CD9^{-/-} eggs when sperm were not added to the mixture, even after 10 h of incubation (Fig. 5B). These data demonstrate that the defect in the fusing ability of CD9^{-/-} eggs is caused by dysfunction of the mechanism facilitating the sperm-fusing activity through CD9-containing vesicles.

To further study the involvement of CD9-containing vesicles in regulating sperm-fusing ability, we evaluated the capability of hamster eggs in sperm-egg fusion (Fig. 5S). Hamster eggs have the ability to fuse with other mammalian sperm and thus are used as a tool to evaluate the fusing ability of human sperm (20). When hamster eggs were incubated with CD9^{-/-} eggs after the zona pellucida was removed from these eggs, the sperm-fusing ability of these eggs was improved significantly. The sperm-fusing ability acquired through the exposure to hamster eggs was not as great as that produced by exposure to mouse eggs, probably due to the slightly different CD9 in hamster and mouse eggs (21). These results indicate that the function of CD9-containing vesicles in the acquisition of sperm-fusing ability is widely conserved in mammals.

Discussion

In sperm-egg fusion, there is a significant direct interaction between the cell membranes of sperm and eggs (1, 20, 22); however, our results demonstrate that CD9-containing vesicle-sperm interaction precedes the direct cell membrane interaction between sperm and eggs. Based on our data, we propose that the release of CD9-containing vesicles from eggs before fertilization facilitates the sperm-fusing ability that renders the sperm competent to fuse with CD9^{-/-} eggs (Fig. 5C). Our finding of CD9-EGFP in living unfertilized eggs demonstrates that CD9-containing vesicles are present in the PVS, and that these vesicles accumulate inside the PVS during the germinal vesicle (1) and metaphase II-arrested stages (1). During this period, the egg undergoes drastic cytological changes with the increased number of microvilli (1, 22), predicting the correlation between vesicle release and microvilli formation. As expected, this correlation is supported by the finding that CD9 deficiency leads not only to impaired microvilli formation (8) (Fig. 5S2), but also to decreased accumulation of vesicles within the PVS. These data support the association between the release of CD9-containing vesicles from eggs and the formation of microvilli on the egg plasma membrane.

As reported previously, somatic cells are capable of releasing proteins and lipids included in membrane organelles, termed exosomes (9, 10), which are pinched out from the plasma membrane (23). Exosomes share many additional properties with retroviral particles, including similar lipid and protein compositions, such as tetraspanin (23). GM3 and HSP90 are known to be conserved components of exosomes (10). Our results show that CD9-containing vesicles released from eggs share these two components, implying that the vesicles are "exosome-like." Previous studies of macrophages have proposed that exosome biogenesis occurs only by outward budding at endosomal membranes, followed by the fusion of vesicle-laden endosomes with the plasma membrane (9, 23). If the CD9-containing vesicle were derived from exosomes and generated from the fusion of endosomes with the plasma membrane, then the vesicles would contain some proteases (9, 23), fuse with the sperm membrane, and possibly activate the sperm fusogenic factor(s) by enzymatic activities.

In hamster eggs, expansion of the PVS has been deemed essential or at least beneficial to normal fertilization (20, 21, 24), indicating that materials involved in fusion with sperm are released from eggs before fertilization in hamsters and in mice. Because anti-CD9 mAbs are not available for hamster CD9, we could not directly confirm CD9-containing vesicle release from hamster eggs before fertilization. Instead, our co-incubation assay demonstrated that hamster eggs facilitate the fusion of sperm with CD9^{-/-} eggs, indicating that hamster eggs share a similar mechanism with mouse eggs through egg-released materials. Moreover, it has been reported that growing oocytes bind to sperm and transfer fluorescent dyes to the sperm head (25). At this stage, oocytes have CD9 on the cell membrane but lack CD9-containing vesicles (Fig. 5S1). We presume that the transfer of fluorescent dye from growing oocytes to sperm heads is mediated by CD9 on the cell membrane. Based on our findings, we propose that the CD9-containing vesicle has an ability to facilitate sperm-egg fusion. This knowledge has great potential for clinical applications, such as the induction of sperm-egg fusion using exogenous sources.

Materials and Methods

Animals. The mice that we produced were back-crossed into a C57BL/6 genetic background. Wild-type eggs were collected from C57BL/6 females (8–12 weeks old). Wild-type sperm were obtained from the epididymides of B6C3F1 males (8–12 weeks old). Hamster eggs were obtained commercially as frozen unfertilized eggs (NOSAN).

Antibodies and Chemicals. Antibodies against CD9 (KMC; BD PharMingen), beta-tubulin (Tub2.1; Sigma), HSP60 (24/HSP60; BD PharMingen), HSP90 (16F1; MBL), and GM3 (GMR6; Seikagaku) were used. Antibodies labeled with biotin by a labeling kit (Dojindo) and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Sigma) were used for Western blot analysis. For immunostaining, antibodies were labeled directly with Alexa488 and Alexa546 using labeling kits (Invitrogen). FM4-64 (Invitrogen) was used to define the lipid bilayer of live eggs without disturbing sperm-egg fusion ($10 \mu\text{M}$ at final concentration). We used DAPI (Invitrogen), a fluorescent dye that slowly permeates the living cell membrane (semipermeable) and slowly leaks out of cells after washing relative to Hoechst33342 (permeable), in counting the number of sperm fused per egg.

Transgenic Mice. The construct expressing mouse CD9 tagged at the N terminus with EGFP (CD9-EGFP) was subcloned into plasmid DNA-containing mouse ZP3 promoter (26). The expression cassette was excised by restriction enzyme digestion and microinjected into fertilized eggs of C57BL/6 mice, according to standard techniques (27).

Genotyping and RT-PCR. Mouse genotyping and RT-PCR were performed following standard procedures (27). (Primer sets are listed in Table S1).

Egg Collection. Eggs were collected from the oviduct 14–16 h after human chorionic gonadotropin injection (4). The eggs were placed in a drop of TYH