



Title	Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice.
Author(s)	谷河, 麻耶
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47229
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	谷 河 麻 耶
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 1 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. (CD81 遺伝子欠損マウスを用いた受精機構の解明に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 部 勝 (副査) 教 授 八 木 清 仁 教 授 山 本 弘 教 授 中 川 晋 作

論 文 内 容 の 要 旨

膜 4 回貫通型蛋白質テトラスパンインの一種である cluster of differentiation (CD) 81 は、卵側の受精必須因子として知られている CD9 とアミノ酸の 1 次配列が 45% の相同性をもつ分子である。これまで、テトラスパンインファミリーに属するヒト由来の CD81 蛋白質に C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) のエンベロープ糖蛋白質が結合すると報告されており、CD81 分子は、C 型肝炎ウイルスのレセプターとしての働きがあるとされ、HCV は CD81 の LEL ドメインに結合して感染、すなわち膜融合を起こすと考えられている。また CD81 は、受精必須因子である CD9 と分子量ならびに一次構造上の類似性が高い分子である。したがって、全体的な立体構造についても相同であることが推測されている。培養細胞では、免疫沈降反応を用いて CD9 と CD81 が相互作用している可能性が示されている。さらに CD81 はマウス卵で発現が報告されていることから、CD81 は CD9 のように受精において膜融合に関わっている因子として働いている可能性がある。しかし、これまで CD81 遺伝子欠損 (*CD81*^{-/-}) マウスの生殖系に関する報告はなされていなかった。本論文では *CD81*^{-/-} マウスを用い、CD81 の受精における働きを調べた。

まず自然交配によって不妊傾向が示されるか検討したところ、野生型雌とのペアでは産仔が 11.0±0.8 匹であるのに対し、*CD81*^{-/-} 雌とのペアでは 1.3±2.5 匹となり、CD81 の欠損は雌において不妊の要因になることが明らかになった。しかし *CD81*^{-/-} マウスの排卵数や卵子の形態には異常は認められなかった。

卵細胞膜に存在する CD9 は精子と卵子が融合するために必要であることが知られている。*CD81*^{-/-} マウスに不妊傾向が見られるのは CD81 が欠損することにより卵子上の CD9 の存在形態に何らかの影響を与え、それが不妊傾向に結びついた可能性もある。そこで *CD81*^{-/-} 卵子における CD9 を検出した。しかし、野生型、*CD81*^{+/-}、*CD81*^{-/-}、それぞれの卵子において CD9 の量は変化していないように見えた。CD9 の存在量の比較は、厳密にはゲル泳動でなく ELISA などの定量によって行う必要がある。しかし、CD9 が半分量になった *CD9*^{+/-} マウスでも膜融合の異常は認められないという報告がある。つまり、CD9 が半分に減少したとしても受精に異常は起こらないことになる。今回の結果では、半定量的ではあるが、*CD81*^{-/-} の CD9 の存在量には野生型と比べて、倍の差があるようには見えなかった。従って、*CD81*^{-/-} 卵子には CD9 が十分量あると考えられ、*CD81*^{-/-} マウスの不妊傾向は CD9 の影響によるものではないと思われた。

次に *CD81*^{-/-} 卵子が不妊傾向を示す原因を調べるために、体外授精を行った。透明帯を除去したのちに、野生型

卵子と *CD81*^{-/-} 卵子に精子を加えると、*CD81*^{-/-} 卵子の精子との融合能は、野生型卵子に比べ低下する傾向があることが認められた。また透明帯を除去しない状態で体外授精を行い、受精が成立し2細胞期に至るまで発生を進ませた後に観察すると *CD81*^{-/-} 卵子は、野生型卵子の卵割率が 65%であるのに対し 15%にまで低下していた。さらに *CD81*^{-/-} 卵子では、複数の精子が卵子細胞と透明帯の間のスペース（囲卵腔）に侵入していた。通常、精子が卵子と融合すると、透明帯の物理的、化学的变化と精子結合活性の喪失がもたらされる。この反応により、複数の精子が囲卵腔に侵入できないようになり多精阻止が起こると考えられている。*CD81*^{-/-} 卵子において複数の精子が囲卵腔に存在するということは、精子と卵子の融合に何らかの障害が起こるため融合が遅れ、さらに次の精子の侵入を許したため結果的に多精阻止の機構が働いていないように見えるものと考えられた。

精子と卵子の膜融合が遅延する理由のひとつとして、精子の先体反応の不全も考えられるかもしれない。精子の先体反応とは、透明帯通過時に起こる精子頭部の形態変化であり、反応を起こし先体内膜が露出した精子でなければ、卵子と融合することができない。そこで *CD81*^{-/-} 卵子の囲卵腔に侵入した精子が、先体反応を起こしているか観察する必要があると考えた。そこで、精子の存在と先体反応の有無を可視的に観察できる RBGS (Red Body Green Sperm) トランスジェニックマウスを用いて、*CD81*^{-/-} 卵子と体外授精を行い、囲卵腔に侵入した精子が先体反応を起こしているかを観察し、それと同時に囲卵腔の精子数を数え、野生型卵子と比較した。この RBGS トランスジェニックマウスは、アクロシンのプロモーターの下流に先体内に蓄積するように GFP (green fluorescence protein) にシグナルペプチド結合させたトランスジーンと、ミトコンドリア移行シグナルを結合した DsRed2 を、CAG プロモーターの下流に結合したトランスジーンをもち、両者のダブルトランスジェニックマウスである。RBGS マウスの精子は、先体反応を起こすと頭部先体の GFP 蛍光が消え、中片部の DsRed2 蛍光のみとなる。これにより蛍光顕微鏡下で精子の先体反応の有無が確認でき、さらに中片部の蛍光によって先体反応を起こした精子の存在を確認することができる。*CD81*^{-/-} 卵子の囲卵腔に侵入した精子は、先体の GFP の蛍光を失い、先体反応をおこしていることが観察された。*CD81*^{-/-} 卵子の囲卵腔に侵入した精子数は、野生型卵子の囲卵腔に侵入した精子より有意に多く観察された。よって *CD81*^{-/-} 卵子では精子との膜融合が遅れていることが示唆された。

以上より *CD81*^{-/-} 卵子では膜融合に何らかの障害が起こると考えられるために、CD81 は受精の膜融合に関わる因子であることを示唆することができた。そこで CD81 がどのように融合能の維持に関わっているか知るために、その局在部位について検討を加えることにした。すると、4回膜貫通蛋白質である CD81 は細胞膜表面にのみ存在しているものと考えられたが、卵子外の透明帯にも存在することが明らかになった。免疫染色に用いた抗 CD81 抗体は、CD81 を認識する際、CD81 の3次元構造が保たれていることが必要である。そして3次元構造を保つためには膜に貫通した構造であることが必要である。このことから透明帯で検出された CD81 は3次元構造を保っているといえる。つまり、膜の成分に貫通した状態を保ったままで透明帯にも存在していると考えられる。ただし、透明帯に存在する CD81 が膜融合の維持にどの程度の影響を及ぼしているかは今のところ分からない。

野生型卵子と *CD81*^{-/-} 卵子を透明帯を除去した条件で人工授精を行うと融合能が低下した。さらに透明帯がある条件で人工授精を行うと、*CD81*^{-/-} 卵子において複数の精子が囲卵腔に観察されることから、透明帯が存在することが、融合能に影響を与えている可能性もある。また、今回の実験から4回膜貫通蛋白質である CD81 が、透明帯に多く存在していることが分かった。CD81 以外にも、透明帯には様々な分子が存在しているものの、CD81 を含む透明帯に存在する何らかの集合体構造が、精子と卵子の融合能に影響を与えている可能性もあると思われる。CD81 が、どのように膜融合能を維持しているか詳細についてはまだまだ明らかにしてゆかなければならない点が多いものの、本研究では卵子の CD81 は受精の膜融合に関わる因子であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

4回膜貫通蛋白質テトラスパニンである CD9 が卵子上において精子との融合に必須な蛋白質であることを受け、本論文では卵子上に存在するもうひとつのテトラスパニンファミリー蛋白質である CD81 の役割について検討を行っている。CD81 遺伝子欠損マウスについては B 細胞の免疫応答異常や T 細胞の増殖異常が知られていたが、生殖系の

異常については報告されていなかった。しかし今回、交尾当たりの産仔数を調べることによって、CD81 遺伝子欠損マウスの雌が不妊傾向を示すことが明らかにされた。さらに CD81 遺伝子欠損卵子の受精能を体外授精の系を用いて解析した結果、精子との融合能が低下していることが明らかにされ、CD81 は CD9 と同様に受精のステップのうちの膜融合の部分に関わっていることが示された。CD81 の局在についても検討を行い、CD81 は膜蛋白質であるにも関わらず免疫染色を行うと膜から離れた透明帯に強い染色が認められ、卵子から遊離した形でも存在していることを発見した。透明帯を保持したまま体外授精を行った場合、透明帯を取り除いて行った場合と比較して CD81 遺伝子を欠損させた卵子の融合能に、野生型卵子に比べより大きな影響が現れることから、透明帯に存在する CD81 にも精子との融合能を高める働きがある可能性が示された。これらの知見は受精に関与する分子として CD81 を新たに加えるものであり、本研究が博士（薬学）の学位授与に値するものと認める。