

論文の内容の要旨

論文題目 細胞内シグナル伝達因子 Smad2 および Smad3 の生体、特に精巣における発現と機能に関する研究

氏名 加 納 聖

Transforming growth factor-beta (TGF- β)、アクチビン、インヒビン、BMPなどの共通の構造を持つ分泌タンパクから構成されるTGF- β ファミリータンパク質の作用は細胞の増殖、分化、細胞死、細胞外マトリックスの産生、個体発生、炎症作用、発がん、ホメオスタシスなど多岐にわたり、生体には欠かすことのできない因子群である。これまでTGF- β ファミリーは、TGF- β 、BMP、アクチビン、インヒビンなどのリガンドならびにそのレセプターの構造や機能を中心に解析が行われてきた。近年、細胞外からのリガンドによる刺激が細胞内シグナル伝達因子であるSmadを介して直接核へと伝達されていることが明らかにされた。特に、細胞の増殖、細胞周期因子の制御、免疫、細胞外マトリックスの産生など、その作用が多岐にわたるTGF- β や、生殖系と密接に関連し、精子や卵胞の発達に欠かすことのできないアクチビンは、Smadファミリーの中でもSmad2、Smad3とSmad4の連携によってシグナルを伝達することがわかっている。しかし、これらのSmadに関する研究の多くが、*in vitro*中心の解析で、生体における発現や局在などの解析はほとんど行われていない。以上の経緯を背景として、

本研究ではSmadファミリーの中でもTGF- β とアクチピンのシグナルを伝達するSmad2とSmad3の生体における機能を分子生物学的アプローチと細胞組織化学的アプローチを用いて解明することを試みた。

第1章では、まずdegenerate PCR法を用いて新規Smadファミリーの探索を行い、新しい構造や機能を持つSmadファミリーがあるかどうかを調べた。しかし、得られたSmadファミリーの断片はすべて既知のSmadファミリーの一部であり、新規のSmadのクローニングを行うことはできなかった。そこで、Smadファミリーの中でも塩基配列ならびに推定アミノ酸配列の相同性が特に高い、Smad2とSmad3のマウスにおける構造や機能の違いを推測するために、degenerate PCRによって得られたクローンのうちSmad3 cDNAのオープンリーディングフレームの塩基配列を5'/3' RACE法を用いて決定し、マウスの様々な組織でその発現を調べた。その結果、マウスSmad3推定アミノ酸配列は、他の動物種のSmad3と高い相同性を持ち、異なる種間で保存されているSmadである可能性が示唆された。また、マウスSmad2推定アミノ酸配列との比較により、Smad3はSmad2と比較してN末端側のMH-1ドメインの2つの領域を欠いていることがわかった。ヒトSmad2では、このSmad2特異的な領域がDNA結合能を阻害している可能性が示唆されているが、マウスでも同様に、構造上の比較からSmad2とSmad3ではDNA結合に差があり、この構造上の相違は異なる動物種間でも保存されている可能性が示唆された。

さらに、マウスでのSmad3の発現や局在をノーザンブロット法と*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて調べ、Smadの生体におけるTGF- β ファミリーシグナル伝達との関連について調べた。マウスの組織においてSmad3 mRNAの発現がみられ、Smad3を介したシグナル伝達経路は生体において一般的な経路である可能性が考えられた。また、他のSmad同様、マウスSmad3 mRNAは複数の転写産物を持つことがわかったが、これらに機能的な差異があるかどうか、また組織によって異なる転写産物の発現量がなぜ違うかなど今後の検討課題である。ノーザンブロットによってSmad3 mRNAの強い発現がみられた脳と卵巣において、*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、Smad3 mRNAは、アクチピンやTGF- β などリガンドのレセプターが局在する脳の海馬歯状回の錐体細胞や顆粒細胞、大脳皮質の顆粒細胞、卵巣においては卵胞上皮細胞において局在がみられた。この結果により、これらの部位においてSmad3

がTGF- β やアクチビンなどのリガンドのシグナルを伝達している可能性が示唆された。

第2章では、飼育室の点灯条件によってその精巢の機能や大きさを人為的に操作できるゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を用いた。実験室内のゴールデンハムスターの精子発生を維持するためには最低一日12.5時間以上の点灯時間が必要であり、12.5時間以下の点灯時間であると精子発生は行われなくなり、精巢は萎縮する。ゴールデンハムスターの長日点灯条件ならびに短日点灯条件における精子発生の変化をモデルとして、TGF- β とアクチビンのシグナルを細胞質から核へと伝達するSmad2ならびにSmad3の発現や局在の変化を調べ、Smadの生体におけるシグナル伝達の機能について考察した。長日点灯条件で生後8週目まで飼育し、十分に性成熟した雄ゴールデンハムスターを、さらに長日点灯条件と短日点灯条件でそれぞれ13週間飼育を行い、基本的な精巢の形態的特徴を観察したところ、長日点灯条件13週後の精巢では、活発に精子発生が行われていたが、短日点灯条件13週後の精巢は萎縮し、精細管の直径も細くなり、精子発生が停止していた。また、精巢重量も短日点灯条件では著しく減少していた。次に *in situ* ハイブリダイゼーションにより、長日点灯条件と短日点灯条件においた両方のゴールデンハムスター精巢において、Smad2 mRNA と Smad3 mRNA は基底膜に近い精祖細胞ならびに精母細胞に局在していることが観察された。マウス精巢において、Smad2 mRNA がプレレプトテン期からパキテン期までの減数分裂前の精母細胞で局在がみられた結果と一部合致する。また、TGF- β のI型、II型レセプターとアクチビンII型レセプターが精祖細胞と精母細胞において発現していることから、Smad2あるいはSmad3は、初期の精子発生と減数分裂においてTGF- β ファミリーのシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。ノーザンブロットでは長日点灯条件と短日点灯条件においたゴールデンハムスター精巢におけるSmad2 mRNA と Smad3 mRNA の発現量の推移を調べた。その結果、Smad2 mRNA と Smad3 mRNA では短日点灯条件の精巢と長日点灯条件の精巢で発現パターンが異なることがわかった。Smad2 と Smad3 は推定アミノ酸配列の相同性が高く、機能の類似が予想されているが、点灯条件の変化によるゴールデンハムスターの精子発生の制御においてはSmad2 と Smad3 は異なる機能を有する可能性が示唆された。多くの季節繁殖動物の精巢において分泌されるインヒビンが変化することを考えると、本研究においても、飼育室内の点灯条件変化によるインヒビン・アクチビンならびにTGF- β などのリガンド

によるシグナルの変化があると考えられるが、Smad2 と Smad3 の発現量のバランス変化によってこれらに対する調節が行われている可能性も考えられた。培養細胞において Smad3 と Smad4 を同時に強制発現させた系では、Smad2 と Smad4 を同時に強制発現させた系よりも高い PAI-1 遺伝子のプロモーター活性があり、また構造上 Smad3 は Smad2 と比較して DNA 結合力が強く、強力な転写因子として機能する可能性があるため、短日点灯条件のゴールデンハムスター精巣において Smad2 mRNA と Smad3 mRNA のバランスが変化し、発現量が増加した Smad3 によってより強い細胞内シグナル伝達が行われている可能性が考えられる。

第3章では、第2章に引き続き雄ゴールデンハムスターの長日点灯条件ならびに短日点灯条件によって実験室内で機能を人為的に変化させた精巣を用いた。長日点灯条件と短日点灯条件でそれぞれ13週飼育を行い、Smad2 タンパクならびに Smad3 タンパクに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学染色法を用いて、TGF- β とアクチビンのシグナルを細胞質から核へと伝達する Smad2 と Smad3 タンパクの精巣内における局在の、点灯条件による相違について調べ、生体における Smad2 と Smad3 のシグナル伝達について考察した。その結果、長日点灯条件の精巣では、Smad2、Smad3 ともライディッヒ細胞、精母細胞の細胞質に局在がみられたが、短日点灯条件の精巣ではライディッヒ細胞、精母細胞の核内に局在がみられた。点灯条件の変化により精母細胞内の Smad の局在が変化し、短日点灯条件のゴールデンハムスター精巣の精母細胞において Smad が細胞質から核へ移動し、TGF- β ファミリーのシグナル伝達が行われている可能性が示唆された。また、TGF- β や Smad のシグナル伝達の指標となる PAI-1 遺伝子発現の長日点灯条件と短日点灯条件による相違を調べ、生体における Smad2 ならびに Smad3 による TGF- β ファミリーのシグナル伝達との関連を考察した。短日点灯条件のゴールデンハムスター精巣において TGF- β と Smad の核内へのシグナル伝達の指標となる PAI-1 mRNA の発現パターンが Smad3 mRNA の発現パターンとほぼ一致することが示された。飼育室の点灯条件変化によって退縮した精巣における PAI-1 遺伝子の発現量の増加が精子発生の制御にどのような働きを持つかどうかは不明であるが、短日点灯条件によって萎縮した精巣において Smad2 ならびに Smad3 は細胞質から核へ、例えば細胞増殖を押さえるような核内の標的遺伝子の活性化するようなシグナル伝達を行っている可能性が示唆された。