

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加納 聖

Transforming growth factor-beta (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り、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 Smad を介して直接核へと伝達される。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ピンは、Smad2、Smad3 と Smad4 の協調によってシグナルを伝達することがわかっているが、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。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を試みた。

第 1 章では、Smad ファミリーの中で相同性が特に高い Smad2 と Smad3 の構造や機能の相違を考察するために、degenerate PCR によって得られたクローンのうち Smad3 cDNA の塩基配列を 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た。ノーザンブロットによって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 やアクチピ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巣の機能や大きさを操作でき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 とアクチピンのシグナルを伝達する 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。*in situ* ハイブリダイゼーションにより、長日

条件と短日条件両方において、Smad2 と Smad3 mRNA は精祖細胞ならびに精母細胞での局在が観察された。TGF- β 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、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。また、ノーザンブロットによって Smad2 と Smad3 mRNA の発現量の推移を調べた結果、Smad2 と Smad3 では短日条件と長日条件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精子発生の制御において Smad2 と Smad3 は異なる機能を有する可能性が示唆された。構造上 Smad3 は Smad2 と比較して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、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の精巣を用いた。免疫組織化学染色法を用いて、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、長日条件の精巣では、Smad2、Smad3 とともにライディッヒ細胞、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、短日条件の精巣の精母細胞において Smad が細胞質から核へ移動し、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 遺伝子の長日条件と短日条件による発現の相違を調べ、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から、点灯条件によって萎縮した精巣において Smad2 ならびに Smad3 は細胞質から核へのシグナル伝達を行っている可能性が示唆された。

以上、本研究は生体、特に精巣における Smad2 ならびに Smad3 の発現と局在およびその機能的意義を検索したものである。今回得られた結果は、多くの新規の分子生物学的、細胞組織化学的知見を含み、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。