

論文内容の要旨

論文題目 Expression and function of Jak2 during meiotic maturation
and preimplantation development

(減数分裂期および初期発生時における Jak2 の発現とその機能について)

氏名 伊藤昌彦

序論

一般に細胞増殖や分化のシグナル伝達において、チロシンリン酸化酵素は重要な役割を果たしている。マウス初期胚では、これまで発生の調節に関与するいくつかの成長因子が報告されている (Insulin、IGF-I、EGF、TGF- α など)。これらの受容体はチロシンリン酸化酵素活性をもち、初期胚のシグナル伝達に関与していると思われるが、その機能は 4 細胞期以降において明らかにされているだけであり、それ以前の時期、受精後から 4 細胞期までの発生を調節するチロシンリン酸化酵素についての知見は得られていない。したがって、4 細胞期以前の発生を調節するシグナル伝達は成長因子の受容体以外のチロシンリン酸化酵素を介する可能性も考えられる。そこで、受精から 4 細胞期の発生を調節するチロシンリン酸化酵素を同定し、その機能を明らかにすることにより、マウス初期胚の発生制御機構を解明することを目的として本研究を行った。

1. マウス初期胚における Jak2 の発現とその局在

未受精卵は初期発生に必要とされる mRNA を蓄積している。そこで、初期発生を制御するチロシンリン酸化酵素を同定するために、チロシンリン酸化酵素の保存領域に対する degenerate primer を用いた RT-PCR 法により、未受精卵で発現しているチロシンリン酸化酵素のクローニングを試みた。その結果、未受精卵で発現しているチロシンリン酸化酵素のひとつが Jak2 であるこ

とが明らかとなった (Table. 1)。Jak2 は膜レセプターの細胞内ドメインに結合する非受容体型チロシンリン酸化酵素であり、Jak-Stat 経路を介して IFN, IL, PRL, GH, GM-CSF, EPO, LIF などのリガンドからのシグナルを伝達することが知られている。そこでマウス初期胚における Jak2 の機能を明らかにするために、受精後の Jak2 の発現を調べた。Jak2 特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法により、Jak2 mRNA は未受精卵でもっとも多く存在し、発生の進行に伴い急激に減少していくことが明らかとなった (Fig. 1)。また、抗 Jak2 抗体を用いた免疫染色法により、Jak2 タンパクの発現と局在を調べた (Fig. 2)。その結果、Jak2 は 2 細胞期後期まで発現しており、その局在は間期では核内に、分裂期では染色体上にあることが明らかになった。また、1 細胞期胚では雌性前核に顕著な局在が認められたが、雄性前核にはほとんどその局在が認められなかった。次に 2 細胞期後期にみられる Jak2 の局在の消失がどのように調節されているかを明らかにするために、DNA あるいはタンパク質合成の阻害実験を行った (Fig. 3)。その結果、1 細胞期で DNA 合成を阻害した胚では局在が消失するのに対して、タンパク合成を阻害した胚では局在の消失が抑制された。したがって、2 細胞期後期における Jak2 の局在消失には受精後に合成されるタンパクが必要であり、細胞周期非依存的な機構により調節されていることが明らかとなった。

Table 1. Summary of the frequencies of PTK cDNAs isolated from oocytes and embryos

Stage	PTKs	No. of clone obtained
M II	Jak2	9
	Jak1	1
2-cell	Lyn	7
	Ptk6	4
blastocyst	Lyn	8
	Musk	1
	Ddr2	1

Fig.1 Expression pattern of Jak2 transcripts during preimplantation development

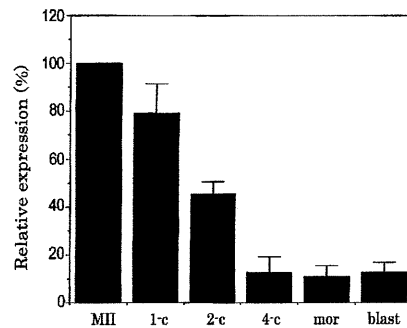


Fig. 2 Immunolocalization of Jak2 in mouse oocytes and embryos

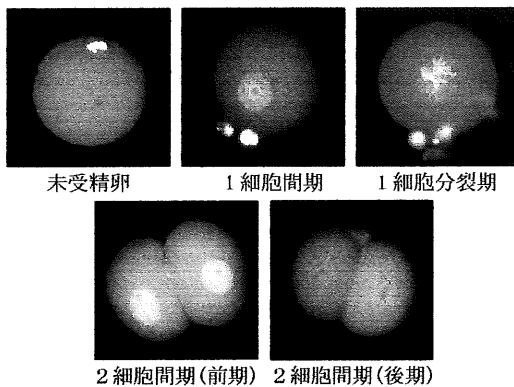
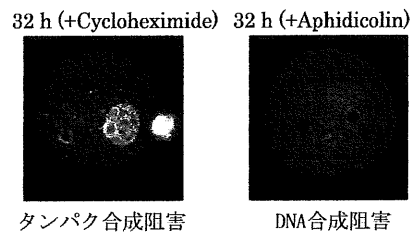


Fig. 3 Disappearance of Jak2 localization in the late G2 phase of two-cell embryos.



2. Jak2 の核局在機構の解析

マウス初期胚における Jak2 の核局在機構を明らかにするための実験を行った。はじめに、核への局在がマウス初期胚に特異的なものであるかを確かめるために、Jak2 を発現している NIH3T3 細胞、Nb2 細胞での局在を免疫染色法により調べた (Fig. 4)。その結果、Jak2 は細胞質のみに局在し、核には局在していないことが明らかとなった。また、Nb2 細胞はプロラクチンの刺激によ

り Jak2 が活性化し、Jak2-stat 経路を介して、細胞増殖が調節されることが知られている。そこで既知のシグナル伝達機構における Jak2 の活性化と核への局在との関連を調べた。その結果、プロラクチンの刺激後も Jak2 の核局在は認められなかった。これらのことから、Jak2 はマウス初期胚特異的な機能と関連した、これまでの作用機構とは異なる新たな機能を持つことが示唆された。また Jak2 の核への局在は GFP との融合タンパクを発現させ、初期胚および培養細胞で蛍光を観察することによっても確認することができた (Fig. 5)。

先に行った免疫染色実験では、2 細胞期前期において Jak2 は核内で一様な局在を示していた。しかしながら、2 細胞期前期の核内では精子由来、卵子由来の染色体が別々に分かれて局在していることが知られている。そこで、Jak2 が精子由来の染色体に蓄積する時期を明らかにするために、1 細胞期分裂期での Jak2 の局在を免疫染色法により詳細に調べた。その結果、分裂期中期から後期にかけて精子由来の染色体に Jak2 の蓄積が始まることが明らかとなった (Fig. 6)。また、雄性前核や NIH3T3 細胞の核を未受精卵に移植した細胞では、Jak2 は染色体に蓄積しないことが明らかとなった。これらのことから、Jak2 の染色体への蓄積はクロマチン構造の違いに依存していることが示された。

Fig. 4 Immunolocalization of Jak2 in culture cells

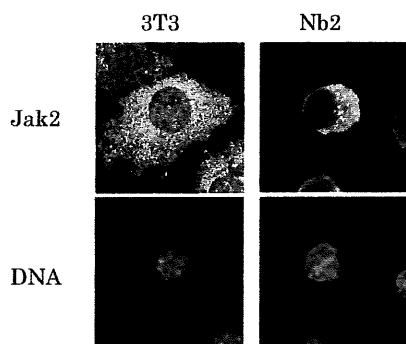


Fig. 5 localization of Jak2-GFP in the embryos and culture cells

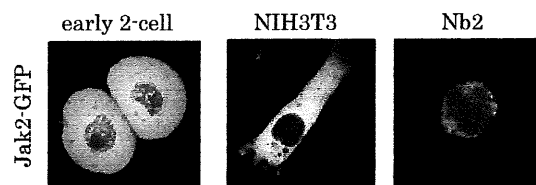
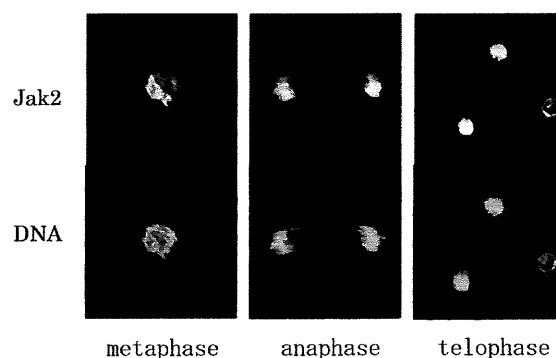


Fig. 6. Accumulation of Jak2 on the male-derived chromosomes.



3. 減数分裂期における Jak2 の発現と機能

Jak2 が雌性前核のみに局在していたことから、そのゲノミックインプリンティングへの関与を考えた。哺乳類の正常な発生には染色体の由来による発現調節機構が不可欠である。この機構をゲノミックインプリンティングとよび、インプリンティングを受ける染色体領域または遺伝子は、配偶子形成過程で精子由来か卵子由来かの「しるし=インプリント」を刷り込まれる。このインプリントの違いは受精を経て、同一の核に入っても維持され、さらに複製・細胞分裂を繰り返して

も消失しない。そして体細胞ではインプリントにしたがって父性または母性対立遺伝子特異的な発現が起こる。一方始原生殖細胞ではインプリントの消去が起こり、つづく配偶子形成過程に新たなインプリントを獲得する。このような機構を維持するためのエピジェネティックな修飾として DNA のメチル化が知られている。そこで、本研究により明らかとなった Jak2 の雌性前核特異的な局在は、受精直後の雄性前核の脱メチル化と負の相関関係にあることから、ゲノミックインプリンティングへの関与を検証した。はじめに DNA メチル化が消去される胎生 12.5 日の始原生殖細胞での Jak2 の局在を調べた (Fig. 7)。その結果、雄性、雌性生殖隆起内に存在する始原生殖細胞ではともに核に Jak2 の局在は認められなかった。また、インプリンティングを獲得する生後 5 日から 20 日の第一減数分裂前期の卵成長期では、DNA のメチル化と Jak2 の核局在の開始は同時期に起きることが明らかとなった (Fig. 8)。これらのことから、核に局在する Jak2 は DNA のメチル化および脱メチル化に関連する機能を持つ可能性が示唆された。

Fig. 7. Immunohistochemical staining of Jak2 in ovaries and genital ridges.

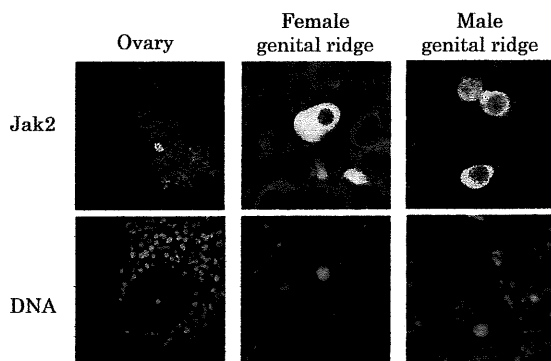
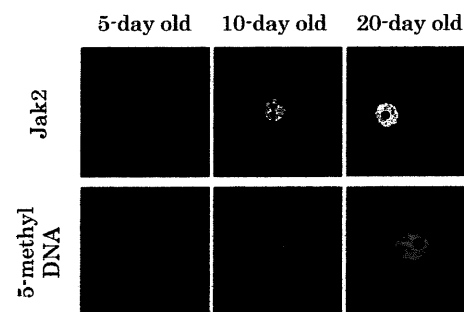


Fig. 8 Nuclear localization of Jak2 and methylated DNA during oogenesis



結論

現在までに広く知られている Jak2 の機能は、サイトカインなどのシグナルを受け、転写因子である Stat を介して遺伝子発現を調節するものである。したがって Jak2 が核に局在するかぎり、受容体からのシグナルを伝達することができないことから、Jak2 の核への局在はこれまでに知られていない新規の機能を示唆するものである。受精後、ゲノムはひとつの細胞のなかで配偶子ごとに別々の独立した核を形成する。1 細胞期において、この雄性、雌性前核は同じ細胞質中に存在するにもかかわらず、いくつかの異なる性質を有している。たとえば、両者の DNA 合成の順序は時間的、空間的に同調していない。また転写調節の機構も異なっており、雄性前核は雌性前核と比べ高い転写活性を持っている。そして DNA の脱メチル化においても異なる調節を受けていることが知られている。このように雄性、雌性前核は多くの点で異なる性質を有している。したがって、前核ごとに異なる調節機構を維持するためには、これらのゲノムの由来を見分けるための目印やそれを制御する機構が存在すると考えられる。本研究により明らかとなった雌性前核特異的な Jak2 の局在は、これまでに知られない雌雄の由来による染色体制御機構に関与していることが考えられる。