

論文内容の要旨

論文題目 ”Involvement of Stat5 signaling pathway in the regulation of mouse preimplantation development”

(マウス着床前初期胚における Stat5 シグナル伝達系の解析)

氏名 中里 款

序論

哺乳類において、受精から胚盤胞期胚までの発生段階にある胚を着床前初期胚と呼ぶ。着床前初期発生は通常の体細胞分裂と比較して非常に短い間隔で細胞分裂を繰り返し、またその過程で細胞の分化が始まるなどの特殊な様態を呈する。だが、このような発生を制御するメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

一般の細胞においては細胞分裂をサイトカインと総称される細胞外分泌因子が制御しており、これらのサイトカインが細胞膜表面のレセプターを経由して分裂シグナルを伝達する。このため、着床前初期胚においても同様にサイトカインのシグナル伝達が機能している可能性がある。よって本研究では、体細胞において多種のシグナル伝達経路に関与する転写因子である Stat5 と、これが関与するシグナルカスケードについての解析を行った。

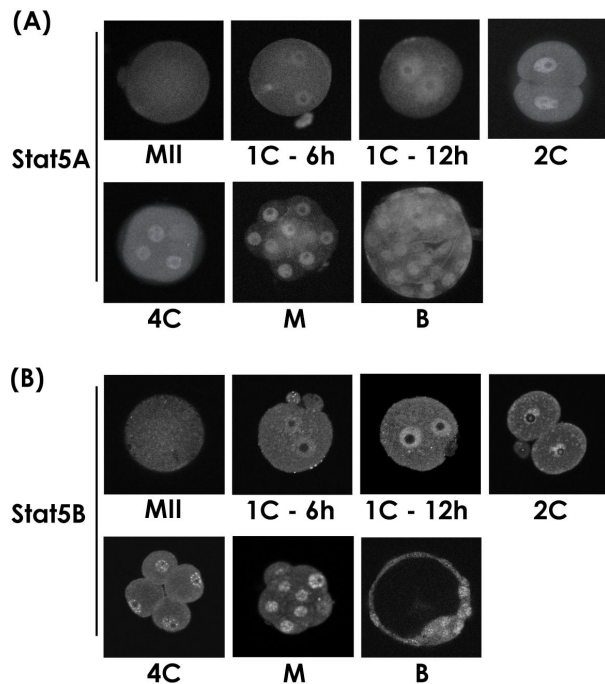


図1 着床前初期胚の抗Stat5抗体を用いた免疫染色像

第一章 マウス初期胚における Stat5 発現解析

哺乳類の Stat5 には Stat5A と Stat5B の二種のホモログが存在することが知られている。マウスでは、Stat5A と Stat5B はアミノ酸配列で 90%以上、mRNA 配列で 96%の相同性を有しているため、最初にこの二種の遺伝子配列が異なる領域をもとにプライマーを設計し、RT-PCR による mRNA 発現の解析を行った。その結果、Stat5A と Stat5B の mRNA がともに MII 期卵細胞に蓄積されており、受精後 4 細胞期まで減少を続けたのち増加傾向に転じて、胚盤胞期胚まで増加を続けることが明らかとなった。

次に抗 Stat5A 抗体及び抗 Stat5B 抗体を用いてイムノプロットを行ったところ、Stat5A と Stat5B のタンパク質はいずれも MII 期卵細胞に蓄積されており、受精後 1 細胞期において減少するが、2 細胞期以降再び合成されることが示された。

さらに免疫蛍光染色を行ったところ、Stat5A と Stat5B のタンパク質はいずれも MII 期卵細胞では局在が検出されなかったが、1 細胞期の前核形成直後から核に局在しており、以後、核への局在は胚盤胞期胚に到るまでのすべての発生段階において継続的に認められた (図 1)。

これらの結果から、Stat5 がマウスの初期胚において発生の開始とともに継続的に活性化した状態であること、また、Stat5 が発生に関して何らかの機能を担っていることが示唆された。

第二章 着床前初期胚の各発生段階における Stat5 活性化機構の解析

マウス着床前初期胚で Stat5A と Stat5B が発現し、核内に局在していることが明らかとなったが、この核局在は Stat5 のチロシン残基がリン酸化され、活性化状態にあることを示している。よって次に Stat5 を活性化するシグナル伝達機構を明らかにするため、上流で Stat5 のリン酸化を行うキナーゼを解析した。

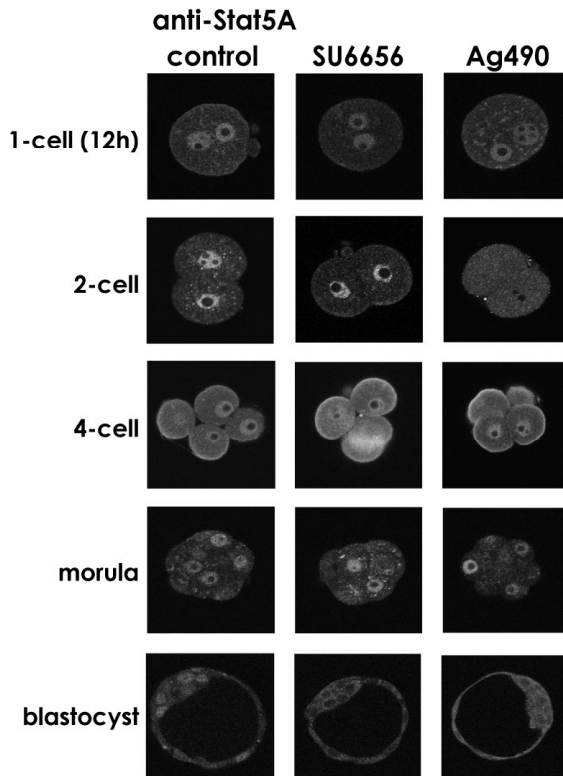


図2 Ag490及びSU6656のStat5A核局在に対する影響

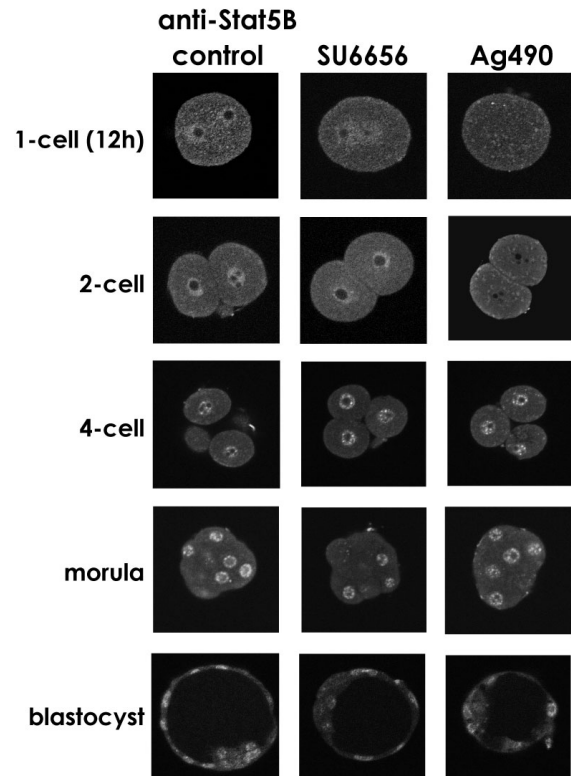


図3 Ag490及びSU6656のStat5B核局在に対する影響

体細胞においては Stat5 を活性化するキナーゼとして、主に Jak family kinases (Jaks) と Src family kinases (SFKs) が知られている。よって Jaks の阻害剤である Ag490、または SFKs の阻害剤である SU6656 をそれぞれ培地に添加して各発生段階の胚を培養し、Stat5 核局在への影響を調べた (図 2・図 3)。その結果、Ag490 は Stat5A の 2 細胞期、桑実胚期、胚盤胞期 (内部細胞塊及び栄養外胚葉) における核移行を阻害したが、Stat5B については 1 細胞期、2 細胞期、胚盤胞期 (内部細胞塊) において核移行を阻害しており、Stat5A と Stat5B が着床前初期胚の特定の発生段階で Jak を経由した活性化機構による制御を受けていること、さらに Stat5A と Stat5B が Jak によって異なる制御を受けていることが明らかとなった。また、SU6656 は桑実胚期までは Stat5 の核移行に影響しないが、胚盤胞期においては Stat5A の内部細胞塊及び栄養外胚葉における核移行を阻害し、Stat5B については内部細胞塊における核移行のみを阻害した。これらの結果から、マウスの着床

前初期胚においては発生段階ごとに Stat5 の活性化に關与する上流のチロシンキナーゼが切り替わっていること、また Stat5A と Stat5B が異なるシグナル伝達系による活性化制御を受けている事が示された。

阻害剤を添加した培地における初期胚の発生率を測定したところ、Ag490 を添加した培地においては 2 細胞期から 4 細胞期への発生が著しく阻害された。SU6656 を添加した培地では、2 細胞期から 4 細胞期にかけての発生阻害は観察されなかった。しかし、桑実胚から胚盤胞期胚にかけての時期においては、Ag490 及び SU6656 がどちらも発生率を減少させることが明らかとなった。

上記の結果と総合すると、阻害剤によって Stat5A および Stat5B の両者において核局在の減少が起る時期と発生率が低下する時期が一致することから、マウス初期胚の発生に Stat5 が關与していることが示唆された。

第三章 マウス 2 細胞期胚における Jak-Stat5 下流遺伝子の発現解析

2 細胞期胚における Stat5A 及び Stat5B の活性化がいずれも Jak によって制御されている事が示されたため、次に 2 細胞期において実際に Jak-Stat5 シグナル伝達系が機能して遺伝子の発現制御を行っていることを確認するための解析を行った。

最初に Ag490 により Jak のキナーゼ活性を阻害した場合、初期胚のトータルな転写活性に影響があるかどうかを調べるため、媒精後 6 時間から媒精後 29 時間まで Ag490 添加／未添加の培地で培養した初期胚を用いて、in vitro の転写活性測定を行った。その結果、Ag490 の有無に関わらず総転写活性への影響は見られなかった。このことから、Jak キナーゼの活性阻害による遺伝子発現への影響はある種の限られた遺伝子に対するものであることが示唆された。

さらに、Jak-Stat シグナル伝達系によってその発現が調節される遺伝子を同定するために Ag490 添加／未添加で培養した 2 細胞期胚の mRNA から得られた cDNA を PCR によって増幅し、マウスの 35000 遺伝子に対するマイクロアレイを行った。この結果、Ag490 によって発現量が増加する遺伝子の種類はきわめてわずかであることが確認された。

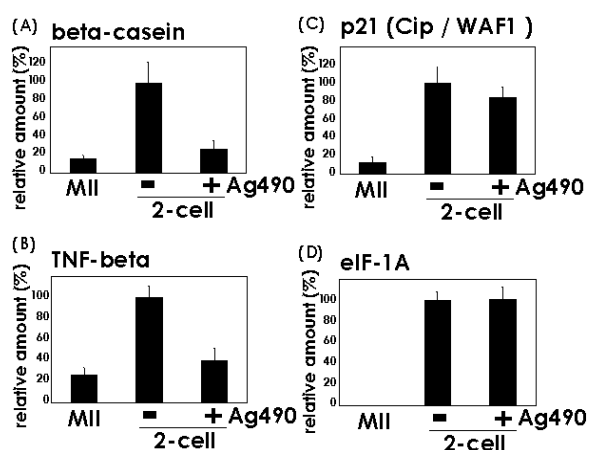


図4 Jak-Stat5下流遺伝子の発現

次に Jak-Stat5 シグナル伝達系に關係している遺伝子である β カゼイン、TNF- β 、p21 の三種類のモニター遺伝子と、これに加えて対照として選択した eIF-1A 遺伝子のそれぞれの転写産物に対し、逆転写及びリアルタイム PCR を用いて mRNA の半定量を行った。

その結果、これらの遺伝子はいずれも MII 期卵細胞から 2 細胞期にかけて発現量が増加するという点では共通していたが、Ag490 を添加した場合の変動に差が見られた (図 4)。

Stat5 を主な転写制御因子として持つと考えられている β カゼインは Ag490 によって発現量の増加が強く抑制され、TNF- β もこれによく似た変動を示したが、p21 は Ag490 を添加した培地でも発現量がわずかしこ減少しなかった。一方、Stat5 非依存である eIF-1A の発現量は 1 から 2 細胞期にかけて発現量が増大するが、Ag490 の添加による発現量の変化は認められなかった。

以上の結果から、マウスの 2 細胞期胚においては Jak-Stat5 シグナル伝達系の下流遺伝子として知られる遺伝子群が発現していたが、これらの遺伝子の発現は Jak の阻害剤である Ag490 によって特異的に抑制されることが示された。このことから、2 細胞期胚において Stat5 は Jak

による制御を受けて転写因子として機能していることが強く示唆された。

また Ag490 の添加は遺伝子の発現を抑制すると同時に、初期胚の発生を 2 細胞期で停止させる。このことから Ag490 によって抑制される遺伝子は種類としてはわずかであるが、初期胚の発生に関与する遺伝子を含んでいることが示唆された。Jak-Stat5 シグナル伝達系下流の遺伝子群は、そのような遺伝子の候補であると考えられる。

第四章 Jak-Stat5 シグナル伝達系活性化に関与するサイトカインレセプターの解析

マウスの着床前初期胚において、少なくとも一部のステージにおいては Jak-Stat5 シグナル伝達系が活性化して遺伝子の発現制御を行っている事が確かめられた。よって次に、MII 期卵細胞から拡張胚盤胞期胚に到るまでのステージにおいて、Jak-Stat5 シグナル伝達系を活性化しうる上流のサイトカインレセプターが発現していることを確かめることとした。

Jak-Stat シグナル伝達系を活性化しうるサイトカインレセプター(PrIR, GHR, TNFR, IL-3R, IL-5R, GM-CSFR)に対し、RT-PCR 法を用いて未受精卵から拡張胚盤胞期胚までの各発生段階における mRNA 量を半定量した。その結果、今回調べた全てのサイトカインレセプターがマウスの着床前初期胚で発現していることを確認した。また、それぞれの mRNA の発現パターンはレセプターによって異なっていた (図 5)。

PrIR は 2 細胞期以前に強く発現しており、この時期の Stat5 リン酸化に関与して初期胚の発生を制御する可能性が示された。

PrIR 以外のサイトカインレセプターはすべて 4 細胞期以前で低い発現量を示す一方、桑実胚から拡張杯盤胞期胚にかけての発生段階のいずれかで発現が増加していた。これは細胞の分化が開始される時期と一致しており、これらのサイトカインレセプターは Jak-Stat シグナル伝達系を活性化して、細胞の分化制御に重要な役割を果たしているのではないかと思われる。

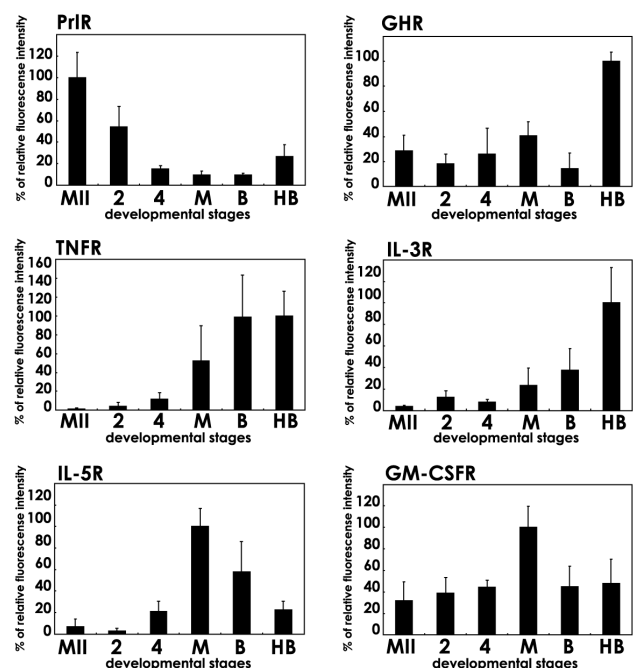


図5 Jak-Stat5シグナル伝達系を活性化するサイトカインレセプターmRNAの半定量

結論

今回の研究結果から、マウスの着床前初期胚においては Stat5A と Stat5B が継続的に発現しており、発生段階ごとに異なったキナーゼによる活性化を受けながら遺伝子の発現制御を行っていることが示された。また、キナーゼ阻害剤を用いた実験の結果は、Jak-Stat シグナル伝達系がマウスの初期発生を制御していることを示唆する。さらに、Jak-Stat5 シグナル伝達系の活性化をさらに上流で制御するレセプターの遺伝子はマウス初期胚において多種類が発現しており、その発現量はそれぞれ異なる発生段階で最大値を示していた。

これらの結果から、着床前初期胚においてはサイトカインレセプターの発現を発生段階ごとに切り替えており、それらの下流で継続的に活性化された Stat5 が転写因子として機能することで増殖や分化に関与するというモデルを提唱する。