

論文審査の結果の要旨

氏名 中里 款

本論文は、着床前初期胚の発生を調節するメカニズムを明らかにするために、体細胞において多種のシグナル伝達経路に關与する転写因子である Stat5 とこれが關与するシグナルカスケードが、着床前初期発生にどの様に働いているかについて解析を行ったものである。全体は 4 章からなり、第 1 章ではマウス着床前初期胚における Stat5 の発現について、第 2 章では各発生段階における Stat5 の活性化機構について、第 3 章では Jak-Stat5 下流遺伝子の発現について、そして第 4 章では Jak-Stat5 シグナル伝達系活性化に關与するサイトカインレセプターの発現について述べられている。

第 1 章では、Stat5 の 2 つのホモログである Stat5A と Stat5B の初期発生過程での発現とその細胞内局在を調べた。RT-PCR による mRNA 発現の解析を行った結果、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。次いで免疫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。

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。そこで第 2 章では、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。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。そこで 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 の核局在及びその後の発生への影響を調べた。その結果、Ag490 および SU6656 は様々な発生段階で Stat5A および Stat5B の核局在あるいは発生を阻害したが、それらの作用時期は阻害剤間および Stat 間で異なっていた。これらの結果より、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ことが示された。

第 2 章において、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、第 3 章では 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。まず 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、in vitro 転写活性測定およびマイクロアレイによる解析を行った。その結果、いずれも Ag490 による阻害効果は認められなかった。次に Jak-Stat5 シグナル伝達系に関係している遺伝子である三種類のモニター遺伝子の発現をリアルタイム PCR によって調べたところ、Ag490 による著しい発現抑制が認められた。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。

最後に第 4 章では、Jak-Stat5 シグナル伝達系を活性化する上流のサイトカインレセプターが初期発生過程で発現しているかどうかを PCR 法によって確かめた。その結果、様々なレセプターがそれぞれ異なる時期に発現していることが明らかとなった。さらに一部のサイトカインによって誘導される serine 残基のリン酸化状態を調べたところ、1 細胞後期から桑実胚期までのみリン酸化が検出された。

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が構築された。この様に本研究は着床前初期発生を調節するメカニズムの解明に大きく寄与するものであると考えられる。

なお、本論文第 4 章の一部は、永田昌男、青木不学との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。