

学 位 論 文 題 名

マウス初期発生におけるギャップ結合の形成機構と
機能的役割に関する研究

学位論文内容の要旨

胚の体外培養は哺乳動物初期胚の発生機構の解明に必要な技術であるとともに、核移植や遺伝子導入等の技術による家畜の遺伝的改良に有効な手段である。培養環境や培養液の組成の改善等により、胚盤胞への発生率が高くなってきているが、体内発生に比較してまだ大きな差がある。また、培養液への添加物質の胚発生への作用機序についても不明な点が多い。哺乳動物胚の初期発生において、マウスでは、胚ゲノムの転写が2細胞期で開始され、8細胞期に形態的に大きな変化（コンパクション）が起こる。この時期を境に細胞間コミュニケーションが中心体チャンネルからギャップ結合チャンネルへと変わる。本研究では、ギャップ結合形成機構の解明並びにギャップ結合形成を制御する要因と胚発生への意義を明らかにすることにより、マウス胚の発生過程に於けるギャップ結合の機能的役割を解明することを目的とした。得られた研究成果は以下のよう
に要約される。

1. マウス初期発生過程に於けるギャップ結合の形成機構

ギャップ結合構成タンパク質であるコネキシン43 (Cx43) は4細胞期中期にすでに合成されている（第5章）が、ギャップ結合の形成が認められるのは、8細胞期中期以降である（第4章第4節）であることを明らかにした。ついで、4細胞期胚を割球分離し、4細胞中期及び後期に再集合させて、ギャップ結合形成への4細胞期胚の割球間接着の関与を調べたところ、4細胞期前期での割球間接着の阻害によりギャップ結合形成の遅延が認められた。このことから、割球間接着を介してギャップ結合形成とそれを制御する細胞間情報伝達系が4細胞期にすでに存在していることが示唆された。

ギャップ結合構成タンパク質 (Cx43) の粗面小胞体からゴルジ体への輸送を阻害するブレフェルジンA (BFA) を用いて、Cx43の細胞内輸送開始時期を検討し、その開始時期が8細胞時期初期であることを明らかにした（第4章第3節）。さらにウエスタンブロット法を用いてCx43産生量の検討を試み、8細胞期後期から16細胞期中期へと胚の発生が進むにつれてリン酸化Cx43が増加することから、ギャップ結合形成にCx43のリン酸化が関係していることを明らかにした。（第5章）

2. ギャップ結合形成を制御する条件

4細胞期胚の割球間接着の有無がギャップ結合の形成に関わっていることから、ギャ

ップ結合形成を人為的に制御することを試みた。赤血球凝集能を有するレクチンの1つであるフィトヘマグルチン(PHA)を培養液に添加したが、PHAにはギャップ結合形成促進の効果は認められなかった(第6章第2節)。次いで、タンパク質のリン酸化酵素プロテインキナーゼを活性化するdibutyryl cAMP (dbcAMP) 及びプロテインキナーゼを活性化する12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いてギャップ結合形成の促進効果を調べた。ギャップ結合は、dbcAMP添加により促進され(第6章第3節)、TPA添加により阻害された(第6章第4節)。Cx43のリン酸化のギャップ結合形成への関与を明らかにするために、dbcAMPあるいはTPAを添加したときのCx43の発現をウェスタンブロット法を用いて調べた。いずれを添加してもリン酸化Cx43の増加が認められたことから、dbcAMPによるギャップ結合促進はリン酸化Cx43の量の増加により、TPAによる形成阻害はリン酸化Cx43のコネクソン形成を阻害することに因ると考察した。

3. ギャップ結合形成の制御が胚の発生に及ぼす影響

ギャップ結合形成の制御がマウス胚のその後の発生に及ぼす影響を明らかにするために、体内受精胚と体外受精胚を用いてdbcAMPおよびTPAによりギャップ結合を促進または遅延させ、胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数および内部細胞塊の細胞数への影響を調べた。dbcAMPの添加は、無添加区との間に著しい差は認められず(第7章第2節)、ギャップ結合形成の一時的な促進は、体内受精、体外受精いずれの胚でもその後の発生に影響しないことを明らかにした。また、dbcAMP添加培養時間を長くしたとき、内部細胞塊数の細胞数が増加したことから、細胞内でdbcAMP濃度の上昇により、内部細胞塊の細胞増殖が活性化されることが示唆された。

以上のことから、マウス胚の初期発生過程において、Cx43は8細胞期初期の細胞内輸送により細胞膜に移動し、8細胞後期にリン酸化すると同時にギャップ結合を形成することを明らかにした。また、ギャップ結合の形成の一時的な促進は胚の発生に効果が無いことを明らかにした。dbcAMPは胚盤胞形成時期に添加することにより、総細胞数を増加させることなく内部細胞塊の細胞数を増加できたことは、今後の体外培養技術の改善に新しい知見をもたらした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	清水	弘
副査	教授	大久保	正彦
副査	教授	近藤	敬治
副査	助教授	上田	純治

学位論文題名

マウス初期発生におけるギャップ結合の形成機構と 機能的役割に関する研究

本論文は図22、表21を含む105頁からなる和文論文で、別に1編の参考論文が添えられている。

マウス胚は、8細胞期に形態的に大きな変化、コンパクション、が起り、この時期を境に細胞間コミュニケーションが、中心体チャンネルからギャップ結合チャンネルへと変わる。本研究では、ギャップ結合形成機構の解明、ギャップ結合形成を制御する要因と胚発生への意義を明らかにすることにより、哺乳動物の胚発生過程におけるギャップ結合の機能的役割を解明することを目的とした。得られた研究成果は以下のように要約される。

1. マウス初期発生過程に於けるギャップ結合の形成機構

ギャップ結合構成タンパク質であるコネキシン43 (Cx43) は4細胞期中期に既に合成されているが(第5章)、ギャップ結合の形成が認められるのは、8細胞期中期以降であることを明らかにした(第4章第4節)。4細胞期胚の割球を分離して、時期を変えて再集合させ、4細胞期前期に割球間接着を阻害すると、ギャップ結合形成の遅延が認められた。このことから、ギャップ結合形成を制御する細胞間情報伝達系が4細胞期に既に存在していることが示唆された。

ギャップ結合構成タンパク質(Cx43)の粗面小胞体からゴルジ体への輸送を阻害するブレフェルジンA (BFA) を用いて、Cx43の細胞内輸送開始時期を検討し、その開始時期が8細胞期初期であることを明らかにした(第4章第3節)。さらにウェスタンブロット法によりCx43のリン酸化の時期の検討を試み、8細胞期後期から16細胞期中期へと胚の発生が進むにつれてリン酸化Cx43が増加することから、ギャップ結合形成にCx43のリン酸化が関係していることを明らかにした(第5章)。

2. ギャップ結合形成を制御する条件

4 細胞期胚の割球間接着の有無がギャップ結合の形成に関わっていることから、ギャップ結合形成を人為的に制御することを試みた。赤血球凝集能を有するレクチンの1つであるフィトヘマグルチニン(PHA)を培養液に添加したが、PHAにはギャップ結合形成促進効果は認められなかった(第6章第2節)。

次いで、タンパク質のリン酸化酵素であるプロテインキナーゼAを活性化するジブチリルcAMP (dbcAMP) 及びプロテインキナーゼCを活性化する12-O-テトラデカノイルホルボーラー-13-エステル (TPA) を用いてギャップ結合形成の促進効果を調べた。ギャップ結合は、dbcAMP添加により促進され(第6章第3節)、TPA添加により阻害された(第6章第4節)。Cx43のリン酸化のギャップ結合形成への関与を明らかにするために、dbcAMP, TPAを添加したときのCx43の発現をウェスタンブロット法により調べた。いずれを添加してもリン酸化Cx43の増加が認められたことから、dbcAMPによるギャップ結合形成促進はリン酸化Cx43の量の増加により、TPAによる形成阻害はリン酸化Cx43のコネクソン形成を阻害することに因ると考察した。

3. ギャップ結合形成の制御が胚の発生に及ぼす影響

ギャップ結合形成の制御がマウス胚のその後の発生に及ぼす影響を明らかにするために、体内受精胚と体外受精胚を用いてdbcAMPおよびTPAによりギャップ結合を促進または遅延させ、胚盤胞への発生率、胚盤胞の総細胞数および内部細胞塊の細胞数への影響を調べた。dbcAMPの添加は、無添加区との間に著しい差は認められず(第7章第2節)、ギャップ結合形成の一時的な促進は、体内受精、体外受精いずれの胚でもその後の発生に影響しないことを明らかにした。また、dbcAMP添加培養時間を長くしたとき、内部細胞塊の細胞数が増加したことから、細胞内のdbcAMP濃度の上昇により、内部細胞塊の細胞増殖が活性化されることが示唆された。

以上のように、本研究はマウス胚を用いて、初期発生過程に於けるギャップ結合の機能的役割を明らかにし、発生学上ならびに体外培養技術の進展に大きく寄与するものがあります。よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者

小川英彦 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格ある者と認定した。