

論文の内容の要旨

論文題目: "Establishment of *c-jun*AS cell line, Suppression of Apoptosis Induced by Reactive Oxygen Species and Its Application for Protein Production"

(*c-jun*アンチセンス細胞株の樹立、活性酸素により惹起されるアポトーシスの抑制及び蛋白生産への応用)

氏 名 キム ヨン ヒ サラ

本論文では、原がん遺伝子 *c-jun* のアンチセンス配列を導入することにより、細胞周期をコントロールでき、かつ培養系から増殖因子を除去した場合でもアポトーシスを抑制できるようにした細胞株の樹立をおこなった。本細胞株は、バッチ・フィードバッチあるいは灌流培養系、さらには血清成分の使用を避ける培養系において、アポトーシスを抑制することで高い生存率を維持でき、有用蛋白質の効率的な生産に応用できる。

本論文は以下の5章から構成されている。

第1章では、マウス Friend 白血病細胞株 (以下, FMEL 細胞) に原がん遺伝子 *c-jun* のアンチセンス配列を導入し、その発現を制御することにより生存率を維持したまま可逆的に細胞周期を停止することが可能な細胞株 (以下, *c-jun*AS 細胞) の樹立に関して述べている。この *c-jun*AS 細胞はグルココルチコイドホルモン (dexamethasone) の添加により *c-jun* のアンチセンス鎖の転写を誘導し、*c-jun* の発現が抑制され、低血清培養時にも増殖可能である。一方、同じ条件下では FMEL 細胞は急速に細胞死する。

原がん遺伝子 *c-jun* は初期応答遺伝子として知られ、増殖刺激に反応して急速に誘導され、AP-1 トランス活性化に働く転写活性化因子複合体を構成し、細胞周期の進行に必要な種々の遺伝子の転写を誘導することにより、細胞増殖の調節に重要な役割を果たしている。

これまでに *c-jun* 遺伝子発現の選択的阻害は細胞増殖の阻害をもたらし、*c-Jun* が自然細胞死、アポトーシスの誘導因子である可能性が報告されている。本研究で得られた結果も、*c-jun* の発現が少なくとも幾つかのタイプのアポトーシスを誘導することを強く示唆している。

第 2 章では、*c-junAS* 細胞の無血清培地培養下あるいは血清存在下で細胞周期停止状態における蛋白質生産性を評価した。アポトーシス抵抗性を持つ細胞株の樹立は、培養細胞を用いた有用物質の生産性を改善すると期待される。例えば、ワクチンや遺伝子治療用ベクターを生産する場合、血清中のウイルスやマイコプラズマの混入を避けるために血清成分を含まない培地中での培養が望ましいが、培地からの血清除去はしばしば細胞をアポトーシスに誘導する。

c-junAS 細胞はアポトーシスを抑制し、また細胞周期を停止することが可能であり、無血清培地下での培養や過剰増殖により誘導されるアポトーシスに抵抗性を示した。その結果、細胞の生存率が長期に渡って高く維持され、有用蛋白質の生産性を向上することができた。

第 3 章では、*c-junAS* 細胞を用いて、*c-jun* の発現と過酸化水素により誘導されるアポトーシスとの関係を示した。過酸化水素は血清除去により誘導されるアポトーシスに関与すると考えられており、また過酸化水素により FMEL 細胞にアポトーシスを誘導する際の *c-jun* 発現の関与が明らかにされている。

c-jun 発現とアポトーシスの関係を解明するために、本研究で樹立した *c-junAS* 細胞のようなアンチセンス *c-jun* の発現を調節可能な細胞が、理想的なツールとなりうることを示した。

第 4 章では、*c-junAS* 細胞を用いて、一酸化窒素による酸化ストレスと *c-jun* の発現との関係をアポトーシスと関連させて調べた。一酸化窒素やペルオキシナイトライトなどの種々の活性酸素種（以下、ROS）は、多くの細胞株でアポトーシスを誘導することが知られている。非酸化的刺激により誘導された場合でもアポトーシス時に細胞内で ROS の生産が観察されており、細胞内での酸化ストレスがアポトーシス進行の一般的特徴であることを示唆している。細胞内の酸化ストレスの状態と細胞の抗酸化機構による防御とのバランスにより、細胞がアポトーシスへ向かうかどうかの運命を決定すると考えられる。

c-jun の発現が、酸化ストレスで誘導されるアポトーシスを仲介することを示した。

第 5 章では、*c-junAS* 細胞を用いて、*c-jun* の発現と細胞内抗酸化ネットワークの関係を調べた。細胞内の抗酸化機構には、ビタミン E やビタミン C やユビキノール等の低分子抗酸化物質に加えて、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、やグルタチオン-S-転位酵素 (GST) などの抗酸化酵素が含ま

れ、これらの物質は個別にあるいは共同して相乗的に働き、堅固な抗酸化ネットワークを形成している。

c-jun の発現を抑制することにより、抗酸化酵素（SOD, GPx, カタラーゼ, GST）の酵素活性およびその蛋白発現が誘導され、また血清除去により GSH レベルが著しく増強されることを見出した。このことは、*c-Jun/AP-1* シグナル経路と抗酸化酵素の発現との関連を示唆している。