

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 キム・ヨン・ヒ・サラ

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細胞増殖の調節に重要な役割を果たしている。核内蛋白質 c-Jun は、細胞周期の進行に必要な様々な遺伝子の転写を促進するトランス作用転写活性化複合体 AP-1 の主要な構成因子である。 *c-jun* 遺伝子発現の選択的阻害は細胞周期の進行を抑え、つまり細胞の増殖を抑制する。また、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。しかし、 *c-jun* 遺伝子の発現誘導とアポトーシスとを結び付ける分子機構は現在のところ、よくわかっていない。そこで、本論文においてキムは *c-jun* 遺伝子のアンチセンス鎖を発現させることにより、 *c-jun* の発現を抑制した細胞株 *c-junAS* を樹立し、細胞周期およびアポトーシスとの関係を調べた。

キムは、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な細胞株 *c-junAS* の樹立に成功した。マウス Friend 白血病細胞株（以下、F-MEL 細胞）に *c-jun* 遺伝子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 *c-junAS* は、血清成分の欠乏または細胞周期の停止に惹起するアポトーシスに抵抗性を示した。 *c-junAS* 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* アンチセンス鎖の転写が誘導され、その結果 *c-jun* の発現が抑制され、低血清培養時にも増殖が可能となる。少なくとも幾つかのタイプのアポトーシスの開始に *c-jun* 遺伝子の発現が必要であることが強く示唆される。

また、過酸化水素は血清除去により惹起されるアポトーシスに関与すると考えられているが、アンチセンス *c-jun* の発現によるその阻害を示し、 *c-jun* 発現とアポトーシスの関係を解明するための理想的なツールであることを示した。 *c-jun* の発現を抑制することにより、抗酸化酵素（スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）、カタラーゼやグルタチオン-S-転位酵素（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。

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。アンチセンス c-jun 遺伝子を用いるこの方法を他の細胞株に適応するためには、今後さらに研究をすすめる必要があると考えられた。

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-junAS 細胞を用いて、アポトーシスへとつながる c-jun 発現に関して、一酸化窒素による酸化ストレスの関係を明らかにした。

本論文は、第一に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な細胞株 c-junAS の樹立に成功、第二に c-jun の発現を抑制することにより、抗酸化酵素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の発見、最後に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ことを示した。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。