

論文内容の要旨

論文題目

ストレス応答性キナーゼ MKK7 による SAPK/JNK の活性化機構およびその生理的役割の解析

氏名 岸本 宏之

序

Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase (SAPK/JNK) は熱、紫外線などの物理化学的ストレスや炎症性サイトカインによって活性化されるキナーゼの一つである。活性化されたSAPK/JNKはc-Junファミリーなどの転写因子のリン酸化によって遺伝子発現を調節し、アポトーシス誘導やストレス応答の制御に関与することが知られている (Fig. 1)。

SEK1はSAPK/JNKをリン酸化、活性化するセリン/スレオニン及びチロシンキナーゼ (dual-specificity kinase) であり、当初唯一のSAPK/JNK活性化因子として知られていた。我々は *sek1* 遺伝子のジーンターゲットングにより、SEK1を介した情報伝達は、マウス発生過程においては胎児の初期肝形成に必須の役割を果たしていること、免疫系においては胸腺T細胞の生存シグナルとして働くことを示してきた。このとき末梢T細胞では、SEK1が存在しないにも関わらずSAPK/JNKの活性化が認められたことから、他のSAPK/JNK活性化因子SEK2の存在が想定された。そしてSEK2の実体としてクローニングされたのがMKK7である。

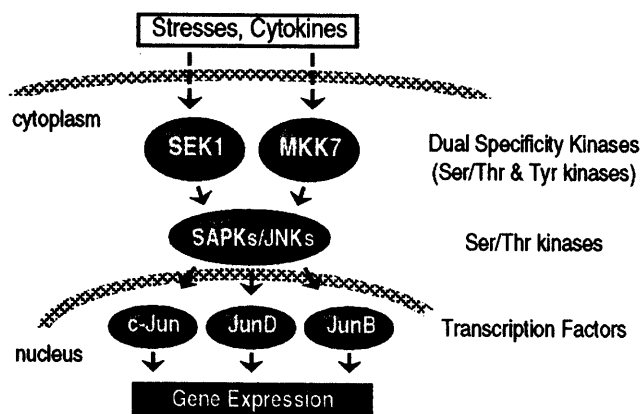


Fig. 1 哺乳類のSAPK/JNKシグナル伝達経路

本研究において私はMKK7の免疫系における生理的役割を明らかにする目的で、*mkk7*遺伝子のジーンターゲットングを行った。キメラマウスを用いた免疫担当細胞での解析を行い、細胞周期制御におけるMKK7→SAPK/JNKシグナル系の役割、MKK7とSEK1による協調的なSAPK/JNKの活性化の分子機構について新たな知見を見出した。

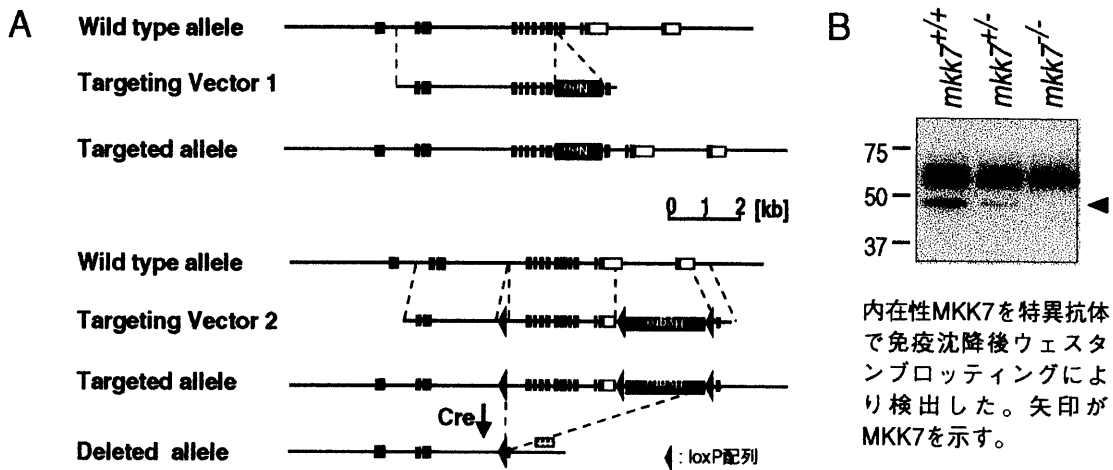


Fig. 2 マウス*mkk7*遺伝子の構造およびジーンターゲットング

1. *mkk7* 遺伝子欠損 ES 細胞の作出

*mkk7*遺伝子は10 kbpの範囲内にすべてのExonが含まれるコンパクトな構造をとっていた (Fig. 2A)。二つの相同染色体上の*mkk7*遺伝子を共に破壊し、MKK7を完全に欠損したES細胞を作出するために2種のTargeting vectorを作成した。Targeting vector 1は相同組換えによるネオマイシン耐性遺伝子の挿入により*mkk7*遺伝子を破壊するもの、Targeting vector 2はCre-loxPシステムにより条件付きで*mkk7*遺伝子を破壊するものである。*mkk7*遺伝子欠損マウスは胎生致死になることが予想されるが、今回作出したES細胞を用いて将来的にコンディショナルノックアウトマウスの作成が可能である。まずTargeting vector 1を用いて一方の相同染色体上の*mkk7*遺伝子が破壊された*mkk7*^{+/-}ES細胞を得た。次にTargeting vector 2を用いて、もう一方の相同染色体上の*mkk7*遺伝子のゲノムにloxP配列を導入し、さらにCreを発現させて両相同染色体上の*mkk7*遺伝子を破壊した*mkk7*^{-/-}ES細胞を得た。この*mkk7*^{-/-}ES細胞ではMKK7が完全に欠失していた (Fig. 2B)。

2. *mkk7* 遺伝子変異キメラマウスの作出

V (D) J組換え能を失った*rag1*遺伝子変異マウスはT・B細胞を産生できないので、*rag1*遺伝子変異の胚盤胞にES細胞を導入すればES細胞由来のT・B細胞が産生されるようになる。このシステムを利用して、*rag1*遺伝子変異の胚盤胞と*mkk7*^{+/-}ES細胞から*mkk7*^{+/-}T・B細胞を有するキメラマウスを作出した。また*mkk7*^{+/-}マスト細胞をキメラマウス骨髄から薬剤選択によって調製した。

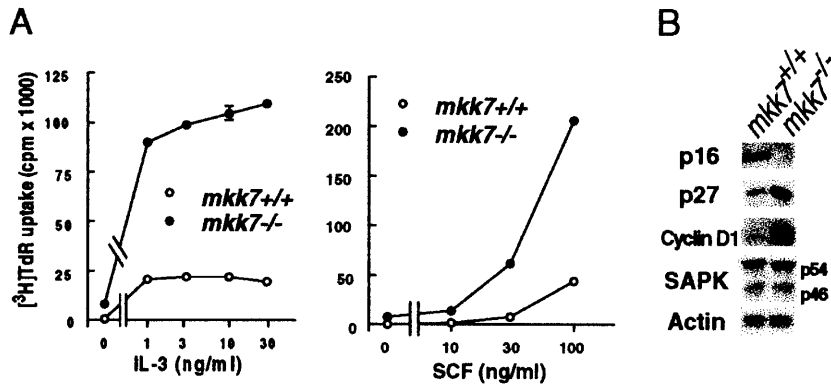


Fig. 3 野生型および*mkk7*遺伝子欠損マスト細胞におけるサイトカイン刺激による細胞増殖と細胞周期制御因子の発現

3. *mkk7* 遺伝子欠損 T・B 細胞およびマスト細胞の解析

まず *mkk7*^{-/-}T 細胞を解析した。胸腺、末梢における T 細胞の発生は正常であり、末梢 T 細胞の活性化、胸腺 T 細胞の T 細胞受容体や Fas を介したアポトーシスについても野生型と同等であった。しかし胸腺 T 細胞の T 細胞受容体を介した刺激による増殖を検討したところ、過増殖を示すことが明らかになった。次に B 細胞についても同様の解析を行った。骨髄、脾臓における B 細胞の発生は正常であった。そして B 細胞の活性化による増殖について調べたところ胸腺 T 細胞と同様に過増殖を示した。これらの結果は MKK7 は胸腺 T 細胞や B 細胞の増殖制御において抑制性の役割を担っていることを示唆している。以下、この表現型の詳細な分子メカニズムを生化学的に解析することを考え、長期培養が可能なマスト細胞の解析を行った。マスト細胞の Interleukin-3 (IL-3)、Stem Cell Factor (SCF) による増殖を調べたところ、*mkk7*^{-/-} マスト細胞はやはり過増殖を示した (Fig. 3A)。つまり増殖刺激に対する過増殖は *mkk7* 遺伝子を欠損した T・B 細胞、マスト細胞に共通にみられる表現型であった。このマスト細胞における細胞周期制御因子の発現状態を検討したところ、細胞周期の G1 から S 期への移行の促進に関与する Cyclin D1 の発現が亢進しており、逆に細胞周期阻害に関わる p16^{INK4a} の発現がほぼ消失していることが見出された (Fig. 3B)。以上から *mkk7*^{-/-} マスト細胞の過増殖性は、MKK7 → SAPK/JNK シグナル系に

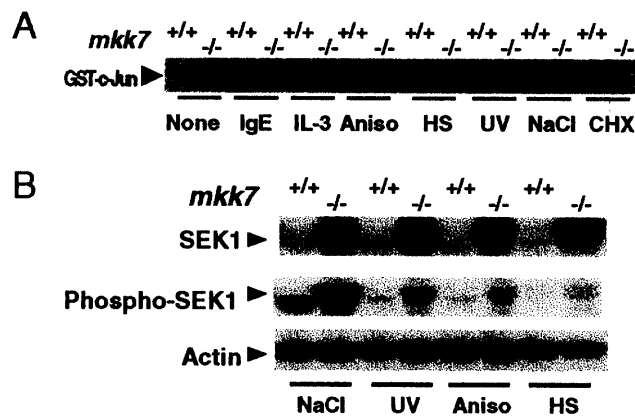


Fig. 4 マスト細胞における SAPK/JNK の活性化と SEK1 の発現およびリン酸化状態

よる細胞周期に関わる因子の転写制御が失われた結果であることが示唆された。

4. *mkk7* 遺伝子欠損細胞における SAPK/JNK の活性化

mkk7^{-/-}マスト細胞における SAPK/JNK の活性化を検討したところ、野生型でみられる IgE やストレス刺激による強い SAPK/JNK の活性化はほぼ完全に消失していた (Fig. 4A)。この *mkk7*^{-/-}マスト細胞では野生型に比べ SEK1 は遙かに高いレベルで発現しており、さらに高レベルでリン酸化を受けていることが明らかになった (Fig. 4B)。すなわち、*mkk7*^{-/-}マスト細胞では活性化された SEK1 が過剰に存在するにもかかわらず SAPK/JNK は活性化されていない。同様に *mkk7*^{-/-}ES 細胞における SAPK/JNK の活性化を検討した。熱ショック、UV といった物理化学的ストレスによって活性化された場合の SAPK/JNK の活性は著しく減少していた。これらの結果は、MKK7 非存在下では強い SAPK/JNK の活性化はおこらないというもので、マスト細胞や ES 細胞においては、SEK1 と MKK7 はそれぞれ単独では強い SAPK/JNK の活性化に十分ではなく、協調的に働くことが必要であることが示唆された。

総括

MKK7 を欠損した胸腺 T 細胞、B 細胞そしてマスト細胞は、それぞれの増殖刺激に対して過増殖を示すことが見出された。マスト細胞における生化学的解析により、これは MKK7 欠損により、細胞周期を制御する因子 Cyclin D1、p16^{INK4a} の発現調節が失われた結果であることが示唆された。転写因子 JunB が p16^{INK4a} の転写を直接活性化することが知られているので、MKK7 → SAPK/JNK のシグナル系が JunB を介して細胞周期を制御している可能性が考えられる。一方、MKK7 を欠失したマスト細胞においては、活性化した SEK1 が過剰に存在するにも関わらず SAPK/JNK は活性化されないことが見出された。この結果から、細胞内において MKK7 と SEK1 はそれぞれ単独で SAPK/JNK を活性化するのではなく、協調的に働いていることが示唆された。本研究により、MKK7 を介した SAPK/JNK シグナル系について、免疫担当細胞の細胞増殖の抑制という新たな役割を見出すことができた。またそれぞれ独立に機能すると考えられていた SEK1 と MKK7 が、協調的に SAPK/JNK を活性化していることが明らかになった。