

## 審査の結果の要旨

氏名 岸 本 宏 之

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プロテインキナーゼファミリーのメンバーである。リン酸化によるSAPK/JNKの活性化は、c-Junなどの転写因子をさらにリン酸化し、遺伝子発現を介してアポトーシスの誘導やストレス応答を制御している。SEK1はSAPK/JNKをリン酸化するセリン/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活性化因子と考えられた。しかし、*sek1* 遺伝子のジーンターゲットイングによる解析から他のSAPK/JNK活性化因子 (SEK2) の存在が想定され、その実体としてMKK7が単離・同定された。「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」と題する本論文においては、免疫系におけるMKK7の生理的役割を解明する目的から、*mkk7* 遺伝子のジーンターゲットイングを行なった。キメラマウス由来の免疫担当細胞を用いた解析から、MKK7→SAPK/JNKシグナル系が細胞周期を抑制的に制御すること、さらに、MKK7とSEK1による協調的なSAPK/JNKの活性化機構を明らかにしている。

### 1. *mkk7* 遺伝子欠損 ES 細胞と変異キメラマウスの作出

*mkk7* 遺伝子は 10 kbp の範囲内にすべてのエクソンが含まれる構造をとるが、二つの相同染色体上の *mkk7* 遺伝子を共に破壊して 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。その一つは、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、もう一つは、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となるよう、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。まず一方の相同染色体上の *mkk7* 遺伝子が破壊された *mkk7*<sup>+/−</sup> ES 細胞を取得し、次にもう一方の染色体上の *mkk7* 遺伝子のゲノムに loxP 配列を導入し、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*<sup>−/−</sup> ES 細胞を作出した。この *mkk7*<sup>−/−</sup> ES 細胞では MKK7 が完全に欠失していることを確認した。

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*<sup>−/−</sup> ES 細胞から *mkk7*<sup>−/−</sup> T・B 細胞を有するキメラマウスを作出した。また、キメラマウスの骨髄から薬剤選択によって、*mkk7*<sup>−/−</sup> マスト細胞も調製した。

## 2. *mkk7* 遺伝子を欠損した T・B 細胞およびマスト細胞の特性

胸腺、末梢における *mkk7* 遺伝子欠損 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 *mkk7* 遺伝子欠損の効果は認められなかった。しかし、胸腺 T 細胞の T 細胞受容体刺激を介した増殖は逆に増強され、*mkk7* 遺伝子欠損が過増殖の表現型を示すことが明らかにされた。B 細胞においても T 細胞と同様の効果が認められることから、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うことが示された。この表現型の分子機構を生化学的に解析するために、長期培養が可能なマスト細胞を用いて解析を行った。interleukin-3, stem cell factor によるマスト細胞の増殖は、*mkk7* 遺伝子欠損で同様に増強された。細胞周期制御因子の発現状態を解析した結果、細胞周期の G1 から S 期への移行において、促進的に関与する cyclin D1 の発現が亢進しており、逆に抑制的に関わる p16<sup>INK4a</sup> の発現がほぼ消失していることが見出された。すなわち、MKK7→SAPK/JNK シグナル系は細胞周期を抑制的に制御しており、*mkk7*<sup>-/-</sup>マスト細胞の過増殖性は、周期関連転写因子の制御不全に起因することが明らかにされた。

## 3. *mkk7* 遺伝子欠損細胞における SAPK/JNK の活性化動態

*mkk7*<sup>-/-</sup>マスト細胞における SAPK/JNK の活性化を検討した結果、野生型で認められる 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。この *mkk7*<sup>-/-</sup>マスト細胞では、野生型に比べて SEK1 が著しく高発現しており、さらに刺激による SEK1 のリン酸化も増大していた。しかしながら、SAPK/JNK の活性化は観察されなかった。*mkk7*<sup>-/-</sup>ES 細胞における SAPK/JNK の活性化を同様に検討した結果、熱ショック、UV といった物理化学的ストレスによる SAPK/JNK の活性は著しく減弱していた。これらの結果は、SEK1 と MKK7 はそれぞれ単独では SAPK/JNK の活性化に不十分であり、協調的に働くことが必要であることを意味している。

以上を要するに、本研究は、ジーンターゲットングにより MKK7 を欠損させた諸種の免疫担当細胞を用いてその増殖能を解析し、MKK7 が細胞周期を制御する因子 cyclin D1, p16<sup>INK4a</sup> の発現を調節するという新規のシグナル伝達経路を提唱している。さらに、それぞれが独立して機能すると当初考えられていた SEK1 と MKK7 が、協調的に SAPK/JNK を活性化することを明らかにしている。これらの研究成果は、今後の細胞のシグナル伝達研究に有用な知見を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。