

審査の結果の要旨

氏名 西 躰 元

ストレス応答性 MAP キナーゼである SAPK/JNK や p38 は、細胞の生死に深く関わることが知られている。しかしながら、これらのシグナル伝達系がアポトーシス誘導に必須の役割を果たしているか否かについては混沌としている。JNK シグナル伝達系が神経細胞や繊維芽細胞においてアポトーシス誘導に必須であるという報告があるが、その一方で、肝臓細胞ではむしろ生存促進に関わるというように、細胞の生死における役割については未だ明確に説明されていないのが現状である。「ストレス応答性 SAPK/JNK 系のアポトーシス誘導における役割の解明」と題する本論文においては、これら各種の細胞が分化・成熟する前の未分化細胞において、JNK 経路が細胞の生死にどのように関わっているかを解析し、マウス胚性幹 (ES) 細胞においては JNK シグナル系がアポトーシス誘導に必須ではないことを明らかにしている。また、初代細胞の状態を変化させると、JNK シグナル系に依存したアポトーシス誘導経路を獲得する可能性を提示している。

1. JNK の活性化因子 SEK1 と MKK7 を欠損した ES 細胞の作出

JNK の活性化を完全に抑えることを目的に、JNK の活性化因子である上流キナーゼの SEK1 と MKK7 をコードする両遺伝子を相同組換えを利用して破壊した。両遺伝子を破壊した (DKO) ES 細胞では、SEK1、MKK7 の発現が完全に消失した。また各種の刺激によって誘導される JNK の活性化も完全に消失していた。しかしながら、DKO 細胞は野生型と同様の増殖能を保持していた。

2. JNK の活性化を欠く DKO 細胞を用いたアポトーシス誘導の解析

i) ゲノムの断片化を指標にした検討

細胞にストレス刺激を加えると、シトクロム c がミトコンドリアから放出され、細胞質中の caspase 9 及び Apaf1 と複合体をつくる。この複合体が様々なタンパク質の分解を担う caspase 3 を活性化させ、その結果、ゲノムの断片化など、アポトーシス固有の現象が引き起こされる。野生型 ES 細胞では各種ストレス刺激によってゲノムの断片化が観察された。JNK シグナル系がアポトーシス誘導に必須であるならば、ゲノムの断片化も抑えられるはずであるが、DKO 細胞では野生型と同程度に断片化が観察された。これとは対照的に、Apaf1 を欠損した ES 細胞では全く断片化が観察されなかった。これらの結果は、ES 細胞において JNK シグナル系がアポトーシス誘導に必須ではないことを示唆する。さらなる確認のため他の指標でアポトーシスを検出した。

ii) Caspase3 様活性を指標にした検討

Caspase 3 等に切断される配列をもち、切断されると蛍光を発する人工基質を用いて、各種のストレスに対する活性を調べた。その結果、野生型および DKO 細胞で同じように刺激に応じた caspase 3 様の活性化が観察された。これとは対照的に、Apaf1 欠損型では活性化が全く観察されなかった。

iii) p38 阻害剤 (SB203580) を用いた検討

p38 は JNK と共にアポトーシス誘導へ関与することが示唆されている。そこで、p38 が JNK によるアポトーシスの活性を相補しているのではないかと考え、p38 の活性を阻害剤により抑制することで caspase 3 様活性へ影響を与えるかを調べた。その結果、野生型でも DKO 細胞においても、阻害剤存在下と非存在下とで同程度のアポトーシスが認められた。このことから、p38 も ES 細胞においてはアポトーシス誘導に必須ではないことが示された。

iv) Bax の局在変化を指標にした検討

ミトコンドリア周辺に存在する Bax は、アポトーシス誘導時に細胞質からミトコンドリアに移動し、ミトコンドリア内部からのシトクロム c 放出を促すと考えられている。JNK はこの Bax の活性化を制御することが報告されている。そこで、刺激後ミトコンドリア膜を分画し、Bax のミトコンドリアへの移動を調べた。その結果、野生型、DKO 細胞でほぼ同様の移行が見出された。これらの結果から、ES 細胞においてはアポトーシス誘導時の Bax の活性にも JNK シグナルが影響を与えていないことが示された。

3. 細胞の継代によるアポトーシス誘導能の変化

ES 細胞においては、JNK シグナル系がアポトーシス誘導に必須ではないことが明らかになった。そこで細胞を分化することで、JNK シグナル系がアポトーシス誘導能を獲得するかを調べた。レチノイン酸により繊維芽細胞に分化された ES 細胞を用いて caspase 3 様活性を調べたところでは、野生型と DKO 細胞でストレスによる活性上昇に差が見出されなかった。一方、MKK7 を欠損したマウス胎児より調製した胚性繊維芽細胞では、野生型と同じように細胞死が見られたが、興味深いことに、継代を繰り返すことで細胞死の抑制が観察された。これらの結果は、継代によって、JNK シグナル系がアポトーシス誘導能を獲得したことを示唆する。

本研究は、ES 細胞のような未分化な状態の細胞においては、JNK シグナルに依存したアポトーシスの誘導経路は認められず、継代など細胞の状態が変化することによって、JNK 依存性のアポトーシス誘導能を獲得する可能性があることを見出している。これらの研究成果は、細胞の分化・成熟による機能獲得を解明する上で重要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。