

審査の結果の要旨

氏名 松本 佐保姫

本研究は、生物学的に非常に重要な現象であるアポトーシスの中で、2本鎖のRNA(dsRNA)によるアポトーシスの経路を明らかにすることを目的とした。そのために最近注目されている RNAi の技術を用いて、独自の発現ベクターライブラリーを作製してスクリーニングを行い、下記の結果を得ている。

1. 細胞の中に dsRNA（または RNA ウイルスなど）が導入されると、アポトーシスが誘導される事が知られている。合成の siRNA を細胞に導入しても、このような非特異的な遺伝子抑制効果を引き起こしうるため、siRNA を用いて dsRNA によるアポトーシスの経路を解析することは困難であると考えられてきた。しかし、細胞の中で dsRNA を発現させるベクター系を用いることにより、アポトーシスが誘導されない事を示し、siRNA 発現ベクターによる dsRNA のアポトーシス経路の解析を可能にした。
2. アポトーシス関連遺伝子、キナーゼ、転写因子など 241 の遺伝子をターゲットとし、およそ 700 個の siRNA 発現ベクターを作製して、dsRNA によるアポトーシス経路に関わる因子のスクリーニングを行った。その結果、ミトコンドリア関連遺伝子、MAPK など 28 の遺伝子において、その遺伝子をノックダウンすると dsRNA によるアポトーシスが抑制される事を見出した。
3. これらの因子に関して、解析を行った。dsRNA によるアポトーシスを誘導すると cytochrome c が放出される事をウェスタンブロッティングの手法を用いて確認し、dsRNA によるアポトーシスの経路にミトコンドリアを介するものが存在している事を示した。次にミトコンドリアの上流に位置する因子を同定するために、スクリーニングで取れた因子に対する siRNA 発現ベクターを導入してからアポトーシスを誘導し、cytochrome c の放出に影響を与えるものがあるかどうかを解析した。その結果、JNK/SAPK をノックダウンすると、cytochrome c の放出が抑制される事

を示した。

4. dsRNAによるアポトーシスを誘導すると、ERK1/2のリン酸化が誘導される事をウェスタンブロッティングの手法を用いて解析し、dsRNAによるアポトーシスの経路においてERK2が関与している事を示した。さらに、ERK2の上流に位置する因子を同定するために、スクリーニングで取れた因子に対するsiRNA発現ベクターを導入してからアポトーシスを誘導し、ERK1/2のリン酸化に影響を与えるものがあるかどうかを解析した。その結果、MST2およびPKC α をノックダウンすると、dsRNAによるERK1/2のリン酸化が抑制された。よってMST2およびPKC α がERK2の上流の因子として働きうると結論された。

以上、本論分は、dsRNAによるアポトーシスの経路の解析を行い、今まで知られていたPKR依存的な経路に加えて、新たにJNK/SAPKを介するミトコンドリアの経路およびMST2・PKC α を介するERK2の経路が存在することを明らかにした。特に、一般には細胞の生存や増殖に関与すると考えられているERK2がアポトーシス促進的に働いている事をdsRNAのアポトーシスの系において初めて示している。本研究は、非特異的な抑制効果を引き起こさないsiRNA発現ベクターを用いたライブラリーの構築に成功し、それを用いて、dsRNAのアポトーシス経路を解析し、今まで同定されていなかった新しい経路の同定に成功しており、学位の授与に値するものと考えられる。