

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 坪 野 洋 平

本研究は線虫を用いて、パラコートによる酸化ストレスによって SEK-1/MAPK kinase を介してインスリンシグナルを抑制し、DAF-16/forkhead transcription factor が核内に移行するメカニズムを、それらの経路に関係すると思われる蛋白をロックアウトした線虫に DAF-16 や AKT-1 と GFP の融合蛋白を発現させて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. DAF-16::GFP 融合蛋白の発現ベクターを線虫にインジェクションし、体内で発現させ、0.3 mM パラコートで約 4 時間刺激したときの反応を蛍光顕微鏡で観察した。N2 (wild-type) や JNK-1 などの変異体では刺激後 4 時間後に DAF-16 が核内へ移行するのが観察された。一方、SEK-1 と CED-3 の変異体においては DAF-16 の核内移行は見られなかった。よって、パラコート刺激による DAF-16 の核内移行には SEK-1 と CED-3 が関与することが示された。
2. AKT-1::GFP 融合蛋白発現ベクターを線虫のゲノム DNA からクローニングして、各変異体にインジェクションし発現させ、上記と同様な実験を行ったところ、N2 と JNK-1 の変異体においてはパラコート刺激によって AKT-1 の発現低下が認められたが、一方 SEK-1 と CED-3 の変異体においては AKT-1 の発現に変化は見られなかった。パラコート

刺激による DAF-16 の核内移行にはその上流にある AKT-1 の蛋白の発現低下が関与していることが示された。

3. 線虫の全身で強く発現し続ける *let-858* 蛋白の *promotor* の下流に *SEK-1* cDNA をつなげたベクターをつくり、それをインジェクションし、*SEK-1* を過剰発現するトランスジェニック線虫を作製した。*SEK-1* の過剰発現により、*forhead transcription factor* の下流で転写が促進される *p27*, *Bim* の線虫のホモログである *CKI-1*, *EGL-1* 遺伝子の転写の増加が認められた。
4. *SEK-1* の過剰発現によって、線虫の成長の抑制と卵におけるアポトーシス細胞の増加が認められ、*SEK-1* の下流ではアポトーシスや成長を抑制する蛋白の活性化の関与が考えられた。

以上、本論文は線虫を用いて、*SEK-1* のパラコートをを用いた酸化ストレスによって、*CED-3*, *AKT-1* が関与することによって、*DAF-16* が核内移行する可能性を示した。また、*in vivo* において *SEK-1* が成長抑制や、アポトーシス誘導に関係する可能性も示した。インスリンシグナルは細胞の成長、老化、癌化などに深く関わっていることがわかっており、本研究は *in vivo* でインスリンシグナルと *MAPK* の相互作用の一部を示したことにより、今後、マウスなどの哺乳動物を使った研究、さらにはヒトにおける老化や癌治療の研究に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。