

論文の内容の要旨

論文題目

ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常

氏名 山崎 世和

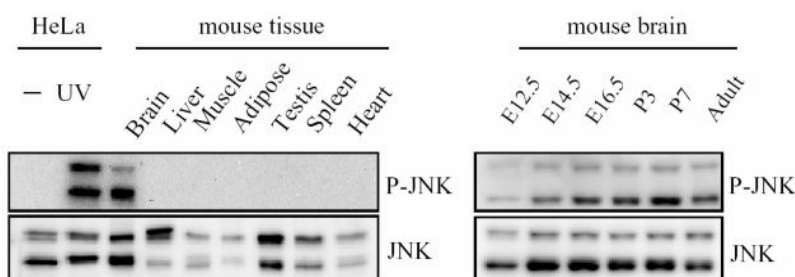
[序]

ストレス応答性 SAPK/JNK シグナル伝達系は、細胞外からの刺激により活性化され、様々な生理応答を引き起こすことが知られている。細胞外からの刺激を受けると、リン酸化カスケードによって JNK 活性化因子である MKK7、MKK4 が活性化され、JNK をリン酸化する。リン酸化された JNK は、c-Jun、DCX や IRS など様々な分子を基質としてリン酸化することが知られており、これらの基質は遺伝子発現や細胞骨格の制御を通じて、細胞増殖、細胞死、細胞の形態変化などの細胞応答を引き起こすことが報告されている。

私はストレスに応答して活性化する JNK が、脳において活性化されていること、またその活性化が発生期から成体に至るまで恒常的に維持されていることを見出した (図 1)。そこで、JNK の恒常的な活性化の意義を明らかにするため、JNK の活性化因子である *Mkk7*

の条件付き欠損マウスの解析を行い、興味深い結果を得たのでここに報告する。

[方法と結果]



神経系特異的MKK7欠損マウスの作出 図1 成体及び発生期のマウス脳におけるJNKの恒常的活性化

脳において認められたJNKの活性化を抑制するために、JNKの活性化因子であるMKK7を欠損させることを考えた。*Mkk7*の遺伝子領域にloxP配列を導入した*Mkk7^{lox}*マウスと、*Nestin*プロモーター下でCreを発現する*Nestin-Cre*マウスを交配させ、神経系特異的MKK7欠損マウス (*Mkk7^{lox/lox} Nestin-Cre*マウス、以下、*Mkk7*CKOマウスという) を作出した。

Mkk7 CKO マウスは生後直後に死亡する

*Mkk7^{flox/+} Nestin-Cre*マウスと*Mkk7^{flox/flox}*マウスを交配し、胎仔及び新生児について遺伝子型を調べた。その結果、胎生12.5日から出生直前の18.5日まで、*Mkk7*CKOマウスが生存していることが確認され

Table 1

Stage	No. of litters	No. of embryos or newborns with genotype:				
		total	flox/+	flox/flox	flox/+ Nestin-Cre	flox/flox Nestin-Cre
E12.5	2	15	6	3	4	2
E14.5	6	46	10	11	17	8
E16.5	6	51	12	17	9	13
E18.5	7	54	14	9	14	17
P1	5	29	9	7	13	0

Mkk7^{flox/+} Nestin-Cre mice crossed with *Mkk7^{flox/flox}* mice.

た。しかしながら、生後1日齢では、*Mkk7*CKOマウスを一匹も見出すことが出来なかった (Table 1)。

*Mkk7*CKOマウスは出生直前まで生存していることから、帝王切開によって胎生18.5日のマウス胎仔を摘出し、観察を行った。*Mkk7*を欠損していない (Control) マウスでは、自発的に呼吸を行うようになったが、*Mkk7*CKOマウスにおいては、自発呼吸を始めることがなく死亡した。自発呼吸など、生後の行動に異常が見られたことから、*Mkk7*CKOマウスでは神経系に異常が生じていることが考えられた。

Mkk7 CKO マウスは脳の軸索路が正常に形成されない

*Mkk7*CKOマウスの脳の形態を調べるために、脳の切片を作製し、Nissl染色を行った。その結果、Controlのマウスと比較して、*Mkk7*CKOマウスの脳では、脳室が拡大していること、線条体が縮小していることが明らかとなった (図2)。

さらに詳細に脳の構造を調べていくと、脳梁 (CC)、前交連 (AC)、内包及び大脳皮質の

中間帯において構造異常があることを見出した(図3)。これらの構造異常が観察された領域は脳の主要な軸索路として知られている。以上より、*Mkk7*CKO マウス

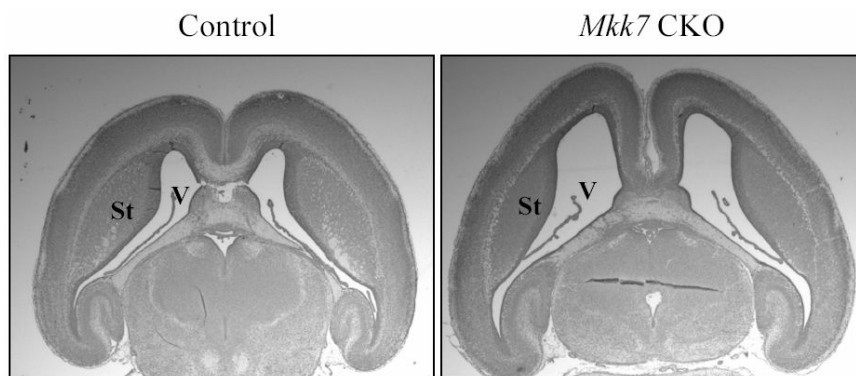


図2 *Mkk7*CKOマウスは脳室の拡大と線条体の縮小を呈する
V: 脳室 St: 線条体

***Mkk7*CKO マウスは軸索の形成異常を呈する**

Mkk7 CKO マウスは軸索路が正常に形成されていないことから、軸索の形成に異常があるかどうかを検討すべく、軸索マーカである TAG-1、L1 の発現を免疫染色により調べた。その結果、脳梁、大脳皮質において TAG-1 陽性領域の消失、L1 陽性領域の減少を胎生 18.5 日の脳で見出し、また線条体においても同様の異常が、胎生 16.5 日から生じていることが明らかとなった。このことから、*Mkk7* CKO マウスは軸索形成異常の表現型を示すことが示唆された。

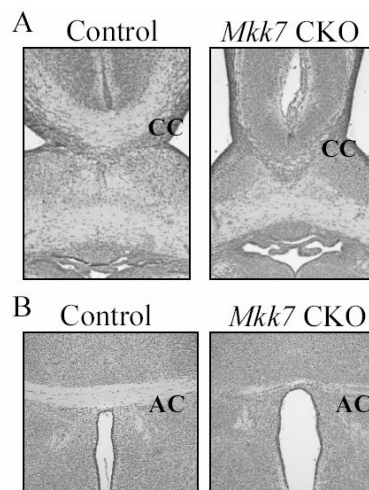


図3 *Mkk7*CKOマウスは軸索路が正常に形成されない
CC: 脳梁 AC: 前交連

MKK7 は神経細胞において軸索伸長を制御している

Mkk7 CKO マウスで認められた軸索形成異常が、軸索を伸ばしている神経細胞における異常なのか、外部環境に起因する異常なのかを調べる目的で、*Mkk7^{lox}* マウスへ *in utero* electroporation 法による遺伝子導入を行った。胎生 15.5 日のマウスの側脳室に pCAG-NLS-Cre、

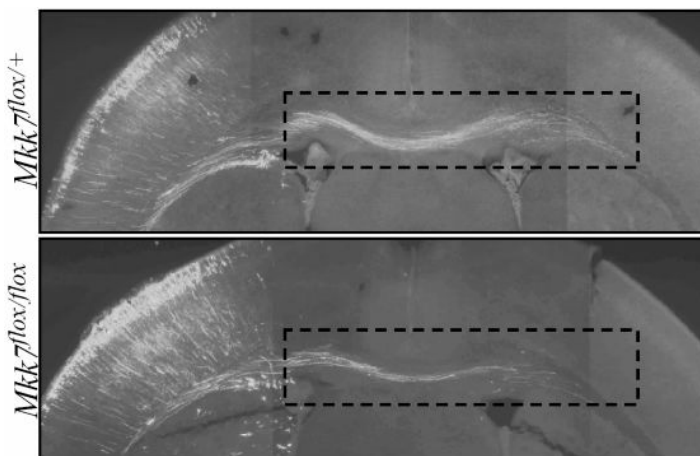


図4 神経細胞で*Mkk7*を欠損すると軸索伸長が減少する

pCAG-floxed-polyA-EGFP を注入し、electroporation によって遺伝子導入した。生後 4 日齢のマウスを灌流固定した後、切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色したところ、*Mkk7^{lox/lox}* マウスでは、*Mkk7^{lox/+}* マウスと比較して、大脳皮質の神経細胞から伸びている軸索数の減少が観察された (図 4)。この結果から、MKK7 は神経細胞において軸索伸長を制御していると考えられた。

Mkk7 CKO マウスでは微小管関連タンパク質 DCX のリン酸化が低下する

軸索伸長過程において、微小管の安定化と不安定化が交互に起こる微小管ダイナミクスが重要であると考えられている。そこで *Mkk7* CKO マウスにおいて、微小管関連タンパク質の一つである Doublecortin (DCX) のリン酸化が低下している可能性を考え、*Mkk7* CKO マウスの脳から調製したサンプルを用いて検討を行った。その結果、JNK のリン酸化とともに DCX のリン酸化が顕著に低下していることが明らかとなった (図 5)。

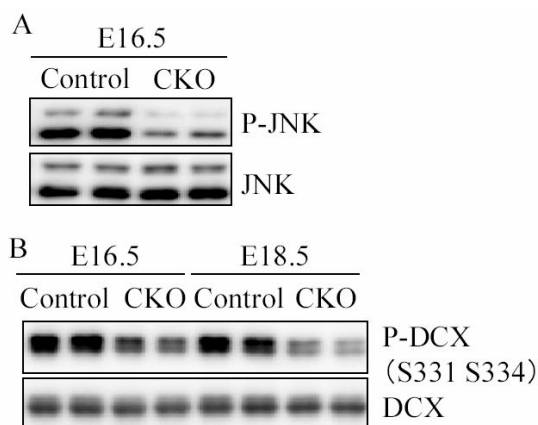


図 5 *Mkk7* CKO マウスの脳で JNK (A) 及び DCX (B) のリン酸化が顕著に低下する

【まとめ】

本研究では、脳における JNK 活性化の意義を調べる目的で、神経系特異的 MKK7 欠損マウスを作成し、その解析を行った。JNK の活性化因子である MKK7 を欠損したマウスでは、脳における JNK のリン酸化が顕著に抑制されており、またこのマウスは軸索形成に異常を示すことから、胎生期の脳における JNK の活性化は、軸索形成を制御していることが示唆された。

さらに、軸索形成において MKK7-JNK シグナルによって制御されている基質として、微小管関連タンパク質である DCX に注目し、*Mkk7* CKO マウスの脳において DCX のリン酸化が抑制されていることを明らかにした。微小管関連タンパク質は、リン酸化を受けることで微小管と

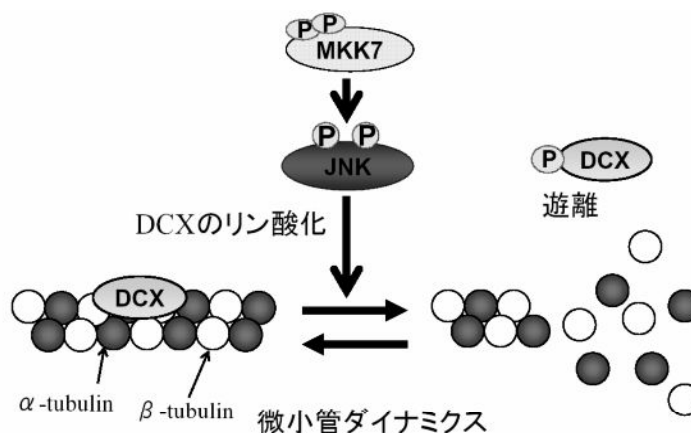


図 6 MKK7-JNK シグナルによる微小管ダイナミクスの制御

の親和性が変化し、微小管ダイナミクスを制御していることが知られている。このことから、脳における JNK の活性化が、DCX をはじめとする微小管関連タンパク質をリン酸化し、微小管ダイナミクスを制御することで、軸索形成に関与していると考えられた (図 6)。

本研究によって、脳において恒常的に活性化している JNK の発生期における機能の一端が明らかとなった。