

審査の結果の要旨

氏名 山崎 世和

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 の活性化因子である 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。「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」と題した本論文においては、ストレスに応答して活性化される JNK が、脳において活性化されていること、またその活性化が胎生期から観察されることを見出し、この JNK 活性化の意義の解明に向けて 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、興味深い結果を見出している。

1. 神経系特異的 MKK7 欠損マウスの作出

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、*Mkk7* CKO マウス) を作出した。このマウスでは、活性化因子 MKK7 の欠損により、胎生期から脳において観察される JNK の活性化が抑制された。

2. *Mkk7* CKO マウスは生後直後に死亡する

Mkk7^{lox/+} Nestin-Cre マウスと *Mkk7^{lox/lox}* マウスを交配し、胎仔及び新生仔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 マウスの生存が確認されたものの、生後 1 日齢においては 1 個体も見いだせないことを明らかにした。この結果を受けて生後直後に死亡している可能性を考え、胎生 18.5 日のマウス胎仔を帝王切開により摘出し観察した。そして、*Mkk7* CKO マウスは自発呼吸を始めることなく死亡してしまうという上記の可能性を支持する結果を得た。

3. *Mkk7* CKO マウスは脳の軸索路が正常に形成されない

胎生 18.5 日のマウスの脳切片を Nissl 染色し、脳の形態を観察した。その結果、*Mkk7* CKO マウスの脳において脳室が拡大し、線条体が縮小していることを明らかにした。また、より詳細に観察し、脳梁、前交連、内包など主要な軸索路や、大脳皮質中間帯など軸索に富む領域が形成異常を呈することを見出した。

4. *Mkk7* CKO マウスは軸索の形成異常を呈する

Mkk7 CKO マウスにおいて軸索に富む領域の異常が観察されたため、軸索マーカーである TAG-1、L1 の免疫染色を行った。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を明らかにした。これらの結果から、*Mkk7* CKO マウスは軸索形成異常の表現型を示すことを示した。

5. MKK7 は神経細胞において軸索伸長を制御する

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、あるいは外部環境に起因する異常なのかを、*in utero* electroporation 法によって検討した。胎生 15.5 日のマウスの側脳室に pCAG-NLS-Cre、pCAG-floxed-polyA-EGFP を注入し、electroporation によって遺伝子導入した。生後 4 日齢において切片を作製し抗 GFP 抗体で免疫染色した結果、*Mkk7^{flox/flox}* マウスでは、*Mkk7^{flox/+}* マウスと比較して大脳皮質の神経細胞から伸長する軸索数の減少が観察されることを示した。この結果は、MKK7 が神経細胞において軸索伸長を制御することを示唆するものであった。

6. *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は、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 Western Blot によって検討した。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を明らかにした。

本研究によって、胎生期における JNK の活性化は軸索形成を制御していることが明らかとなった。また微小管関連タンパク質 DCX のリン酸化が低下していることを見出し、MKK7-JNK シグナルが微小管ダイナミクスを介して軸索形成を制御しているというモデルが提示された。さらに、本研究で解析された *Mkk7* CKO マウスの表現型は、既に他のグループによって解析されているもう一つの JNK 活性化因子 *Mkk4* の欠損マウスとは異なるものであった。以上を要するに、本研究は、JNK の機能が上流のキナーゼ (MKK7 または MKK4) によるリン酸化によって変化する可能性を示唆しており、シグナル伝達経路の選択性という観点から見ても意義深く、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。