

審査の結果の要旨

氏名 刈屋(松村) 佑美

本研究は、軟骨細胞分化や軟骨細胞の形質維持に機能すると考えられている物理刺激の一種である静水圧刺激のシグナル伝達経路を明らかにするため、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に静水圧を負荷し、生化学的及び分子生物学的手法を用いて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ATDC5 細胞に静水圧を負荷し、Western blotting 法を用いて検討を行った結果、静水圧負荷依存的な分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)の一種である ERK1/2 の活性化を検出した。ERK の上流因子である MEK の選択的阻害剤 UO126 存在下で同様の実験を行ったところ、静水圧負荷による ERK の活性化が抑制されたことから、静水圧負荷によって MEK/ERK 経路が活性化することが示された。
2. MEK/ERK 経路の上流因子として知られている低分子量 G タンパク質 Ras 及び Rap1 への静水圧負荷の影響について、それぞれの activation assay を用いて検討した結果、両方とも活性化することが示された。これらの結果から、静水圧負荷によって、Ras/MEK/ERK 及び Rap1/MEK/ERK 経路が活性化することが示唆された。
3. 軟骨細胞において重要な転写因子である Sox9 の発現制御への関与が報告されている転写因子 CREB に対する静水圧負荷の影響を Western blotting 法を用いて検討を行った結果、静水圧負荷依存的な活性化を検出した。神経細胞等において、ERK が CREB を活性化する上流因子の一つであることが知られていることから、選択的 MEK 阻害剤 UO126 存在下で同様の実験を行った。その結果、UO126 の存在の有無にかかわらず CREB の活性化が認められたことから、本実験条件においては静水圧負荷による CREB の活性化には、MEK/ERK 経路は関与しないことが示された。
4. 静水圧負荷による転写因子 Sox9 の遺伝子発現への影響を RT-qPCR を用いて検討を行った結果、静水圧負荷後 2 時間静置した軟骨細胞において Sox9 の mRNA 量が有為に増加することが示された。この mRNA 量の増加に MEK/ERK 経路が関与するかを検討するために、選択的 MEK 阻害剤 UO126 存在下で同様の実験を行ったところ、UO126 の存在の有無にかかわらず Sox9 の mRNA 量の増加が認められたことから、本実験条件においては静水圧負荷による Sox9 の mRNA 量の増加には MEK/ERK 経路は関与しないことが示された。
5. 細胞膜とアクチン線維のリンカータンパク質である ERM タンパク質への静水圧負荷の影響を Western blotting 法を用いて検討を行った結果、静水圧負荷依存的な活性化を検出した。
6. Rap1 の活性化因子である Epac1 と複合体を形成する ERM タンパク質の

一種である Ezrin の恒常活性型 TD 変異体及び、Ezrin を活性化する Rho 結合キナーゼ(ROCK)の上流因子である RhoA の恒常活性型 RhoV14 変異体を作製し、HEK293 細胞に発現させて蛍光顕微鏡解析を行ったところ、Ezrin TD 及び RhoV14 存在下において Epac1 が細胞質から細胞膜へと Ezrin と共に局在変化することが示された。一方、ドミナントネガティブ変異体 Ezrin TA 存在下では、Epac1 の局在変化は観察されなかった。

7. RhoV14 存在下において、Ezrin の活性化による Epac1 の細胞膜への局在変化が Rap1 に与える影響について activation assay を用いて検討を行ったところ、Epac1 による Rap1 の活性化が示された。静水圧負荷によって、ERM タンパク質に加えて Rap1 も活性化することが本研究から明らかになったため、静水圧負荷によって RhoA/ROCK/Ezrin/Epac1/Rap1 経路が活性化する可能性が示唆された。

以上、本論文はマウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞への静水圧負荷及び、そのシグナル伝達経路の解析から、静水圧刺激によって活性化される複数のシグナル伝達経路を同定した。本研究はこれまで未知に等しかった、軟骨細胞における静水圧のシグナル伝達経路及び受容体の解明に重要な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。