

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	砂留 一範
論文題目	ERK5 経路の筋分化における機能並びに下流因子の同定		
(論文内容の要旨) 筋肉は動物の運動に必須の組織であり、収縮能をもつ繊維状の多核細胞から構成される。このような多核細胞は、筋芽細胞と呼ばれる単核の前駆細胞が、分化を通じて融合し、筋肉特異的な遺伝子群を発現する事によって形成される。筋分化においては、最終調節因子である MyoD ファミリーや MEF2 ファミリー、それらの下流の遺伝子群について、多くの知見が得られてきた。しかし細胞の融合過程を経て、どのように筋肉が形成されるのか、未だ不明な点が多い。本研究において申請者は、MAP キナーゼ(MAPK)経路の一つである ERK5 経路が、Klf、Sp1 ファミリーを介して、筋分化において細胞間融合を特異的に制御する事を明らかにした。 マウス筋芽細胞 C2C12 に対して分化を誘導すると ERK5 経路は活性化し、その活性は細胞の融合が起こる前後に渡って持続していた。ERK5 の活性を、ERK 経路の阻害剤である U0126 や、ERK5 の上流因子である MEK5 の優勢阻害型を過剰発現する事により阻害すると、融合は顕著に抑制された。また、MEK5 や ERK5 を siRNA によりノックダウンした際にも同様の結果が得られた。一方恒常的活性型の MEK5 を過剰発現させると、融合は促進された。しかし上記のどちらの場合においても、分化のマーカー遺伝子の発現は影響をうけず、融合以外の分化の進行に大きな変化はみられなかった。次に申請者はマイクロアレイを用いて、分化過程において ERK5 により発現の制御を受ける遺伝子 189 個を同定した。これらの遺伝子群の中には MyoD、MEF2 ファミリーや、それらの下流にある分化のマーカー遺伝子は含まれていなかった。一方で、189 遺伝子のプロモーター領域には、Klf ファミリー、そして Sp1 ファミリーの結合配列が非常に高い頻度で存在した。189 個の遺伝子の中には Klf ファミリーに属する Klf2 と Klf4 が含まれていた。C2C12 において分化誘導後、これらの遺伝子の発現を siRNA により抑制すると、融合は顕著に抑制された。また、Sp1 の発現を siRNA により阻害すると Klf2 と Klf4 の発現が阻害され、融合が抑制された。ChIP アッセイにより Sp1 は Klf2/4 を直接制御する事が示された。また、ERK5、Sp1、Klf のそれぞれの発現を抑制すると、細胞は類似した特徴的な形態を示した。この事は、ERK5/Sp1/Klf 経路は共通のメカニズムを介して、細胞間の融合を制御している事を示唆する。さらに、ERK5/Sp1/Klf 経路の下流因子として、Npnt を同定した。 以上の結果は、ERK5/Sp1/Klf 経路が、筋肉の形成過程において細胞間融合を特異的に制御する事を示すものである。			

(論文審査の結果の要旨)

筋肉は筋芽細胞と呼ばれる単核の前駆細胞が、分化を通じて融合し、筋肉特異的な遺伝子群を発現する事によって形成される。この分化の過程は、MyoDファミリーやMEF2ファミリーのような少数の転写因子によって制御される事が知られている。本研究において申請者は、MAP キナーゼ(MAPK)経路の一つである ERK5 経路が、分化における細胞融合を制御する事を明らかにし、さらにその下流の標的遺伝子として Klf、Sp1 転写因子を同定した。

マウス筋芽細胞 C2C12 に対して分化を誘導すると ERK5 経路は活性化し、その活性は細胞の融合が起こる前後に渡って持続していた。ERK5 の活性を、ERK 経路の阻害剤である U0126 や、ERK5 の上流因子である MEK5 の優勢阻害型を過剰発現する事により阻害すると、融合は顕著に抑制された。また、MEK5 や ERK5 を siRNA によりノックダウンした際にも同様の結果が得られた。一方恒常的活性型の MEK5 を過剰発現させると、融合は促進された。しかし上記のどちらの場合においても、分化のマーカー遺伝子の発現は影響をうけず、融合以外の分化の進行に大きな変化はみられなかった。次に申請者はマイクロアレイを用いて、分化過程において ERK5 により発現の制御を受ける遺伝子について解析した所、189 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子群の中には MyoD、MEF2 ファミリーや、それらの下流にある分化のマーカー遺伝子は含まれていなかった。申請者は 189 遺伝子のプロモーター領域を解析し、これら遺伝子群の発現制御に関与しうる転写因子として、Klf ファミリー、並びに Sp1 ファミリーを同定した。189 個の遺伝子の中には Klf ファミリーに属する Klf2 と Klf4 が含まれていた。C2C12 において分化誘導後、これらの遺伝子の発現を siRNA により抑制すると、融合は顕著に抑制された。また、Sp1 の発現を siRNA により阻害すると Klf2 と Klf4 の発現が阻害され、融合が抑制された。ChIP アッセイにより Sp1 は Klf2/4 を直接制御する事が示された。またレポーターアッセイにより ERK5 が Sp1 の活性を制御する事が示唆された。また、ERK5、Sp1、Klf のそれぞれの発現を抑制すると、細胞は類似した特徴的な形態を示した。この事は、ERK5/Sp1/Klf 経路は共通のメカニズムを介して、細胞間の融合を制御している事を示唆する。さらに、ERK5/Sp1/Klf 経路の下流因子として、いくつかの遺伝子を同定した。以上の結果は、ERK5/Sp1/Klf 経路が、筋肉の形成過程において細胞間融合を特異的に制御する事を示すものである。

以上のように、本論文で述べられた成果は重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに平成 23 年 1 月 24 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日