

氏 名	やまもと たくや 山 本 拓 也
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 82 号
学位授与の日付	平 成 18 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	G0/G1 期から S 期における ERK MAP キナーゼの持続的活性化による遺伝子発現の制御機構
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 田 栄 介 教 授 米 原 伸 教 授 根 岸 学

論 文 内 容 の 要 旨

ERK MAP キナーゼは、細胞増殖、細胞分化、細胞運動、アポトーシスなど様々な細胞応答の制御に関与する。静止期にある細胞が増殖刺激により再び増殖を開始するためには、一過的な ERK の活性化では不十分であり、持続的な活性化が必要であるとされてきた。しかし、どの程度 ERK の活性化が続く必要があるのかは正確には知られていなかった。また、ERK が種々の早期応答遺伝子の発現を誘導することはよくわかっているが、長時間の活性化が、なぜ G0 期の細胞を S 期へ進入させるのに必要なのかは不明であった。

最初に、MEK の阻害剤である U0126 や優勢不能型 MEK (SASAMEK) を用いた実験から G0 期の細胞が S 期へ進入するためには ERK の活性化が S 期直前まで持続する必要があることを明らかにした。次に、マイクロアレイによるゲノムワイドな解析によって、ERK 経路によって制御される遺伝子群の同定を行い、それらが ERK の活性化時間によって受ける影響を調べた。増殖因子で G0 期の細胞を刺激すると、ERK の活性化依存的に早期応答遺伝子群から S 期への進入に必要な遺伝子群まで段階的に発現が誘導された。ERK の一過的な活性化は早期応答遺伝子群の発現を誘導することができるが、それだけでは G1 中期や後期における遺伝子の発現増加を誘導することができなかった。また、興味深いことに、ERK の活性化依存的に発現が低下する遺伝子が多数存在することがわかった。この発現が低下する遺伝子群は、発現が増加する遺伝子群とは異なり、G1 期を通して発現が抑制されていた。ERK の一過的な活性化だけでは、この G1 期を通じた発現抑制も引き起こすことはできなかった。次に、ERK の活性化依存的に発現が増加してくる遺伝子群について持続的な ERK の活性化が及ぼす影響を調べた。G1 中期に発現が増加してくる遺伝子群 (CyclinD 等) は少なくとも G1 後期まで高い発現レベルを維持するが、途中で ERK が不活性化するとこれらの遺伝子群の発現レベルは速やかに G0 期の発現レベルまで戻ることが明らかとなった。一方、G1 後期から S 期にかけて、発現が増加してくる遺伝子群 (CyclinE 等) は、ひとたび発現が上昇すると、その維持には ERK の活性化は必要ではないことが明らかとなった。以上の結果は、ERK の活性化は、G1 中期における遺伝子発現変化を誘導するだけではなくその維持にも必要であること、ひとたび S 期への進入が起こればその後の遺伝子の発現プログラムには影響を及ぼさないことを示唆している。また、発現が低下してくる遺伝子群について持続的な ERK の活性化が及ぼす影響を調べた。これら発現が低下する遺伝子群の発現レベルは、G1 期の中期や後期であっても ERK の活性化がなくなると元の状態まで急激に回復した。つまり、持続的な ERK の活性化によって発現量が抑え続けられている一群の遺伝子が存在することがわかった。このような挙動を顕著に示す遺伝子をリストアップしその機能を解析した。驚くべきことに、調べた15個の遺伝子のうち8個の遺伝子には細胞の増殖を抑制する機能があることがわかった。さらに、G1 期の途中でであってもこれらの発現量を増加させると、細胞が S 期へ進入するのを阻害した。以上の結果は、静止期の細胞が S 期へ進入するためには、ERK の持続的な活性化によって増殖抑制遺伝子の発現レベルを低く保ち続けなければならないことを示唆している。

以上のように本研究では、ERK の活性化時間と G1 期のゲノムワイドな遺伝子発現変化の関係を調べることにより、静

止期にある細胞が増殖刺激により再び増殖を開始する際の ERKMAP キナーゼの役割を明らかにし、G1 期における新たな分子制御機構を見出した。

論文審査の結果の要旨

G0 期の細胞が増殖因子刺激によって、G0 期の状態を脱出し G1 期、S 期へと移行する際、ERKMAP キナーゼの活性化が必要である。このとき、細胞が S 期へと進むためには一過的な ERK の活性化では不十分であり、持続的な活性化が必要であることが知られていた。しかしながら、どの程度 ERK の活性化が続く必要があるのかは正確には知られておらず、また、なぜそのような長時間の活性化が細胞を S 期へと進行させるのに必要であるのかは明らかにされていなかった。申請者は ERK の活性化時間と遺伝子発現の関係に注目し、細胞が G0/G1 期から S 期へ進入するときの分子メカニズムについて解析を行った。

最初に申請者は、MEK の阻害剤である U0126 や優勢不能型 MEK (SASAMEK) を用いた実験から G0 期の細胞が S 期へ進入するためには ERK の活性化が S 期直前まで持続する必要があることを明らかにした。次に、申請者はマイクロアレイを用いたゲノムワイドな解析によって、ERK 経路によって制御される遺伝子群の同定を行い、それらが ERK の活性化時間によって受ける影響を調べた。増殖因子刺激によって ERK の活性化依存的に発現が増加する遺伝子群は、時間的な発現パターンによって大きく 3 つに分類できることを明らかにした。まず、一過的に増加する早期応答遺伝子群が誘導され、次に、G1 中期にサイクリン D に代表されるような遺伝子群の発現増加が見られた。この G1 中期に発現が誘導される遺伝子群は少なくとも G1 後期までその発現レベルが高いまま維持されていた。最後に G1 後期から S 期にかけて E2F のターゲット遺伝子を多数含む遺伝子群の発現が誘導された。また、ERK の活性化時間と遺伝子の発現変化の関係を調べることによって、ERK の活性化は、G1 中期における遺伝子発現変化を誘導するだけではなくその維持にも必要であること、ひとたび S 期への進入が起こればその後の遺伝子の発現プログラムには影響を及ぼさないことを明らかにした。さらに、申請者は、持続的な ERK の活性化によって発現量が抑え続けられている一群の遺伝子が存在することを明らかにした。これらの遺伝子群には、S 期への進入を抑える機能を持つ遺伝子が多数含まれていた。さらに、G1 期の途中であってもこれらの発現量を増加させると、細胞が S 期へ進入するのを阻害した。以上の結果から、静止期の細胞が S 期へ進入するためには、ERK の持続的な活性化によって増殖抑制遺伝子の発現レベルを低く保ち続けなければならないという新しい概念を提示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、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18年6月6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。