

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	松 本 嗣 央												
論文審査委員	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border: none;">(主 査)</td> <td style="width: 25%; border: none;">柏 俣</td> <td style="width: 25%; border: none;">正 典</td> <td style="width: 25%; border: none; text-align: right;">⑩</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">(副 査)</td> <td style="border: none;">明 坂</td> <td style="border: none;">年 隆</td> <td style="border: none; text-align: right;">⑩</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">(副 査)</td> <td style="border: none;">近 藤</td> <td style="border: none;">信 夫</td> <td style="border: none; text-align: right;">⑩</td> </tr> </table>	(主 査)	柏 俣	正 典	⑩	(副 査)	明 坂	年 隆	⑩	(副 査)	近 藤	信 夫	⑩
(主 査)	柏 俣	正 典	⑩										
(副 査)	明 坂	年 隆	⑩										
(副 査)	近 藤	信 夫	⑩										
論文題目													
胎仔マウス顎下腺における新規 MAP キナーゼ ERK5 の発現と機能的役割													
論文内容の要旨													
<p>【目 的】</p> <p>Extracellular regulated protein kinase (ERK) 5 は ERK1/2 と相同性の高い遺伝子として単離された mitogen activated protein kinase (MAPK) の新規ファミリーである。ERK5 は古典的 ERK1/2 と同様に TEY 配列を有しているが、MAPK キナーゼである MEK1 や MEK2 では活性化されず、MEK5 によって特異的に活性化される。発見の当初、ERK 5 は高浸透圧や酸化ストレスなどの刺激で活性化されるキナーゼとして報告され、JNK/SAPK や p38MAPK と同様にストレス応答性の MAPK と考えられていた。しかし、その後、上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) や神経細胞成長因子 (nerve growth factor: NGF) および血清などの trophic 因子でも活性化されることが確認されたことから、その機能は広範であると考えられている。本研究で著者は、ERK 5 が胎生期マウス顎下腺に発現しているのか否か、また顎下腺分枝形態形成に対して如何なる機能を有するのかについて検討を行った。</p> <p>【方 法】</p> <p>1. 顎下腺原基の培養</p> <p>胎仔マウスから顎下腺を取出して実験に使用した。顎下腺原基は、無血清の DMEM/F-12 培地に浮かべた Track-Etch Membrane 上で培養を行った。細胞成長因子 (EGF、FGF7 および FGF10) あるいは各種阻害剤 (U0126 と BIX02188) は培養液に添加して実験を行い、培養 48 時間後の形態変化を実体顕微鏡下で観察した。一部の実験では回収した顎下腺のホモジネートを作製してウェスタンブロット用の試料とした。</p> <p>2. RT-PCR 解析</p> <p>胎生 13 日齢 (E13) の顎下腺をディスパーゼで処理し、上皮と間葉に分離した。上皮と間葉のそれぞれから total-RNA を抽出し、cDNA を合成した後、ERK5 と β-actin の RT-PCR を行った。</p> <p>3. ウェスタンブロット解析</p> <p>顎下腺ホモジネートの上清中に含まれる一定量のタンパク質試料を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写して酵素抗体法により化学発光させて特異的タンパク質を検出した。1 次抗体は、抗 p44/42 MAP kinase 抗体、抗 phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) 抗体、抗 ERK5 抗体、抗 phospho-ERK5 (Thr218/Tyr220) 抗体および抗 β-actin 抗体を使用した。</p>													

【結果および考察】

1. マウス顎下腺における ERK 5 の発現

E13 から成熟期マウス (Ad) の顎下腺の ERK1/2 と ERK 5 の発現パターンを比較した結果、ERK1/2 は E14 から生後 7 日齢 (P7) の顎下腺に発現しており、その発現量は発達に伴い増加することがわかった。また、E13 および Ad の顎下腺ではほとんど発現していなかった。ERK 5 の発現は、E13 からみられ E16 をピークに徐々に減少し、Ad ではほとんど確認できなかった。

2. ERK 5 の局在性

RT-PCR の結果から ERK 5 は顎下腺の上皮と間葉の両組織に存在していることが明らかになった。

3. ERK 5 の活性化

E14、E16 および E18 の顎下腺では EGF 処理後 5 分で ERK 1/2 のリン酸化が亢進したが、その後 60 分までリン酸化状態は持続した。一方、ERK 5 のリン酸化は E14 と E16 で亢進したが、E18 の顎下腺ではほとんど亢進はみられなかった。また、FGF7 と FGF10 の処理では ERK1/2 と ERK 5 リン酸化は促進しなかった。ERK1/2 は EGF などの細胞成長因子や発癌プロモーターなど種々の因子によって活性化される細胞増殖シグナルとして知られている。ERK 5 も ERK1/2 と同様に EGF 受容体などチロシンキナーゼ受容体によって活性化されることが知られている。胎仔マウス顎下腺において、ERK1/2 と ERK 5 のリン酸化反応が発生時期や細胞成長因子の種類によって異なるということは興味深い。

4. 分枝形態形成過程における ERK1/2 および ERK 5 の機能

対照の顎下腺と比較して、MEK 1 と MEK 2 の特異的な阻害剤である U0126 を添加して培養すると、著しい分枝形態形成の抑制が観察された。また、ERK 5 の特異的阻害剤である BIX02188 で処理すると同様に分枝形態形成の抑制が認められた。したがって、少なくとも ERK1/2 および ERK 5 は顎下腺の分枝形態形成に重要な役割をもつことが示唆された。

【結 論】

胎仔マウス顎下腺の発生過程に ERK 5 が発現していた。また、その応答性は胎生期や細胞成長因子の種類によって異なっていた。特異的酵素阻害剤を用いた実験により、ERK1/2 と ERK 5 は分枝形態形成に重要な役割を果たしていると考えられた。