

|               |                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 西 村 一 郎                                                                                                                                      |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (医 学)                                                                                                                                    |
| 学 位 記 番 号     | 博 士 第 6 1 8 号                                                                                                                                |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                      |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 2 2 年 3 月 2 5 日                                                                                                                          |
| 学 位 論 文 題 目   | Balance between S6K-S6 and 4E-BP1 depends on ERK activity in developing neurons<br><br>(発育期神経細胞の S6K-S6、4 E-BP1 活性バランスは ERK 活性に依存する特異的構造である) |
| 審 査 委 員       | 主 査 教 授 竹 内 義 博<br><br>副 査 教 授 木 村 宏<br><br>副 査 教 授 佐 藤 浩                                                                                    |

## 論文内容要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                            |              |                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| *整理番号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 623                                                                                                                                        | (ふりがな)<br>氏名 | にしむら いちろう<br>西村 一郎 |
| 学位論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>Balance between S6K-S6 and 4E-BP1 depends on ERK activity in developing neurons</b><br>(発育期神経細胞のS6K-S6、4E-BP1活性バランスはERK活性に依存する特異的構造である) |              |                    |
| <p>&lt;目的&gt;<br/>         胎生期におけるp70 S6 kinase (S6K)、S6 ribosomal protein(S6)、eIF 4E binding protein 1 (4E-BP1)の活性化状態を詳細にすることによって、細胞・臓器成長期における蛋白合成状態の理解を試みた。各臓器特異的な蛋白合成調節の解明を介し、蛋白合成・生理的成長破綻による疾患群の理解を深めることを目的として研究を行った。</p> <p>&lt;方法&gt;<br/>         胎生11-19日の胎児病理標本を作製した。また、6-10月齢成体マウスの脳、筋、骨格、肝、消化管、等、各臓器病理標本を作製した。各組織のphospho-S6 (240/244)、phospho-4E-BP1 (70) (pS6, p4E-BP1) の発現を免疫組織化学的に検索し、時相、臓器特異的な優位性等、考察した。<br/>         発育期細胞における蛋白合成調節経路の量的解析の為、Neuro-2a神経細胞、C2C12筋細胞を分化誘導し、S6-S6K、4E-BP1両経路、更に、ERK, Akt, mTOR経路の活性化状態をwestern blot法にて評価した。<br/>         更に、ERK活性阻害剤であるPD98059の存在下、非存在下において、上記経路の活性化状態の評価を行なうとともに、Neuro-2a神経細胞における神経分化障害の有無について検証した。</p> <p>&lt;結果&gt;<br/>         胎生13日以前では、全身各組織においてpS6, p4E-BP1は豊富に存在し、高い蛋白合成活性を示唆した。一方、胎生17-19日に至るとp4E-BP1は各組織で豊富に存在しているにも関わらず、神経等、外胚葉系組織を除き、pS6の発現は低下していた(図.1)。同様に、成体マウスでもp4E-BP1は全身で豊富に存在するも、pS6は、神経等、外胚葉系組織以外ではその発現をほとんど認めなかった (図.2)。</p> |                                                                                                                                            |              |                    |

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

Western blot法による定量的評価では、Neuro-2a神経細胞において分化誘導後24-48時間で高活性を維持されているphospho-S6K (389)(pS6K)、pS6が、C2C12筋細胞においては漸減されていった。p4E-BP1については両細胞株とも分化誘導以後も高く維持されていた(図.3A)。S6K上流経路分子、ERK, Akt, mTORの中ではphospho-ERK (202/204)(pERK)の状態が、pS6K, pS6経時的変化と最もよく相関していた(図.3A)。

分化誘導時、Neuro-2a神経細胞ではpERKは分化誘導2時間後、24-48時間後以上と二峰性でその発現活性のピークを迎えるが(図.3A)、この活性変化はPD98059により阻害された(図.3B)。ERK経路の阻害により、S6K-S6のリン酸化も同様に抑制された。Akt, mTOR, 4E-BP1は特に変化を示さなかった(図.3A-B)。C2C12筋細胞においては、PD98059によるERK経路の阻害によって、S6K-S6, 4E-BP1両経路の活性状態に変化を認めなかった。(図.3A-B)

更に、PD98059によるERK経路の阻害によって、Neuro-2a神経細胞は神経突起の成長、及び神経分化が著しく抑制される所見を示した。(図.4)

#### <考察>

組織器官発生において、細胞の増殖、成長、分化、死が活発かつ統合的に調整される胎生期は、蛋白合成経路、その破綻による疾患機構等、これらを解明するのに重要な時期である。蛋白合成経路において、mTOR、GβL、raptorからなるmTORC1複合体はS6Kと4E-BP1をリン酸化させ、S6K、4E-BP1それぞれのcascadeから蛋白合成を促進し、細胞、組織の成長を促す。しかし、胎生期におけるS6K、4E-BP1両経路の活性化状態や量的評価等、過去、形態学的に詳細にされたことはない。

今回の研究からは、胎生中期以前は何れの組織においてもS6Kと4E-BP1の活性はバランスよく高く維持されており、盛んな細胞増殖に適応していると思われた。一方、胎生後期以降、各組織で分化が進むと、各組織におけるS6K、4E-BP1活性は必ずしも同等ではなくなる。これら変化は組織特異的な分化成熟度と関連していると考えられた。

本研究では、分化成熟後も神経細胞においてはS6K-S6の活性が高く維持されていた。S6Kは、最近、蛋白合成そのものより糖代謝により重要な役割を果たしていることが知られてきている。S6Kのノックアウトマウスは、蛋白合成阻害による胎生致死よりも、むしろ、小躯体と耐糖能異常の所見を示す。これらを踏まえると、神経細胞における高いS6K活性は、神経細胞自身の細胞サイズ、神経突起の維持と持続的高糖代謝活性の維持に寄与しているのかもしれない。過去の研究報告もあわせると、神経細胞におけるS6K-S6活性の維持には、mTORC1活性とERK活性の両者が必要であると思われたが、本研究による結果、特にERK経路阻害剤を用いた研究結果からは、成長、分化中の神経細胞において、S6K-S6活性を維持し、神経突起成長や細胞分化に寄与しているのは、mTORC1よりむしろERKであることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |    |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|-------|
| 整理番号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 623 | 氏名 | 西村 一郎 |
| 論文審査委員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |    |       |
| (学位論文審査の結果の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |    |       |
| <p>タンパク合成経路において, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は p70 ribosomal S6 kinase (S6K) と eIF4E binding protein 1 (4E-BP1) のリン酸化によってタンパク合成を促進し細胞の成長を促す。本研究は胎生 11-19 日および生後 6-10 月の C57BL6 マウスにおける S6K、4E-BP1 両経路の活性化状態を免疫組織化学、細胞培養および Western blot 法を用いて検討したものである。</p> <p>胎生 13 日までは、pS6K、p4E-BP1 は各組織において高い活性を示した。胎生 17-19 日では p4E-BP1 は各組織に発現していたが、pS6 は神経系組織以外では発現が低下し、成体では神経系組織以外には発現を認めなかった。Western blot 法による検討では、Neuro-2a 神経細胞において分化誘導後 24-48 時間で pS6K、pS6 は高い活性を示していたが、C2C12 筋細胞ではそれらの活性は漸減した。p4E-BP1 については Neuro-2a 神経細胞、C2C12 筋細胞とも、分化誘導後も高い活性を維持していた。PD98059 による extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の阻害によって、Neuro-2a 神経細胞の神経突起の成長および分化が抑制された。</p> <p>本研究は胎生期における S6K、4E-BP1 両経路の活性化状態を形態学的に明らかにし、神経細胞において S6K-S6 活性を維持、神経突起の成長や分化に寄与するのは mTORC1 よりむしろ ERK であることを示唆するものであり、博士 (医学) の学位を授与することに値すると判定された。</p> |     |    |       |
| (平成 22 年 1 月 26 日)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |    |       |