

氏名・(本籍)	荒木 信一 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第238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9年3月24日
学位論文題目	Endothelin-1 activates c-Jun NH ₂ -terminal kinase in mesangial cells (メサンギウム細胞におけるエンドセリン-1のc-Jun NH ₂ -terminal kinase活性化作用)

審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	戸 田 昇
	副査 教授	吉 川 隆 一

論文内容の要旨

【目的】

腎糸球体メサンギウム細胞は、収縮能・細胞外基質産生能などを有し、腎糸球体機能調節に重要な役割を担っている。血管作働性物質であるEndothelin-1 (ET-1) は、メサンギウム細胞を収縮させると共に、同細胞に対する増殖作用・細胞外基質産生亢進作用を有し、生理的及び病的状態での同細胞機能を修飾していると考えられている。しかし、このような細胞応答を伝達するET-1の細胞内情報伝達機構は未だ十分に解明されていない。近年、細胞内情報伝達において、種々の細胞外刺激により活性化されるmitogen-activated protein kinase (MAPK、別名ERK) の重要性が提唱されている。さらに、c-Junをリン酸化し、その転写活性を亢進させるc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) が同定され、MAPKのスーパーファミリーの一つであることが明らかとなった。そこで、本研究では、メサンギウム細胞でのET-1の細胞内情報伝達を明らかにすることを目的に、ET-1のJNK活性化作用及びその機構を検討した。

【方法】

1. メサンギウム細胞の培養法；SD系雄性ラット腎より単離した糸球体を培養し、メサンギウム細胞を得た。Subconfluent (80%) の細胞を、fetal bovine serum (FBS) を0.4%に減じた培養液にて48時間孵置し、実験に供した。
2. JNKの発現；メサンギウム細胞でのJNKの発現を、JNKに対する特異抗体を用いたimmunoblot法にて検討した。
3. JNK活性の測定法；JNK活性測定には、JNKがc-Junのアミノ酸末端に結合し、近傍の63、73番目のセリンをリン酸化する特性を利用したsolid-phase kinase法を用いた。すなわち、細胞をET-1等にて刺激後、細胞溶解液をグルタチオンセフェロースビーズに結合したGST-c-Junと反応させ、ビーズを回収後、基質であるGST-c-Jun上でリン酸化反応を行い、c-Junへのリン酸化能を測定した。一部の実験では、JNKの特異抗体を用いたimmune complex kinase法、及びGST-c-Junを含むSDS-ポリアクリルゲルを用いたin-gel kinase法による検討を行った。
4. AP-1のDNA結合能の測定法；細胞をET-1にて刺激後、核蛋白を抽出し、ラベルしたAP-1 consensus oligonucleotideと反応させ、gel mobility shift法を用いて、AP-1の結合能を測定した。

【結果】

1. メサンギウム細胞において、46kDaと55kDaのJNKの発現を認めた。
2. Immune complex kinase法及びsolid-phase kinase法で測定したJNK活性は、共に、ET-1刺激後10分より亢進し、15-20分にて最大となり、60分には基礎値に復した。また、in-gel

kinase法により、ET-1 刺激後15分で46kDaと55kDaのJNKの活性化を認めたが、他のc-Junをリン酸化するキナーゼは認められなかった。

3. ET-1 のJNK活性化作用は、濃度依存性に認められた。
4. ET-1 によるJNK活性化作用は、ET_Aレセプター拮抗剤前孵置により抑制された。
5. Phorbol 12, 13 dibutyrateの16時間前孵置、あるいはprotein kinase C (PKC) 阻害剤前孵置にて、ET-1 によるJNK活性化作用は影響を受けなかった。
6. 細胞内カルシウムキレート剤前孵置にて、ET-1 のJNK活性化作用が抑制された。また、細胞内カルシウムを増加させるionomycin及びthapsigarginによりJNKが活性化された。
7. ET-1 のJNK活性化作用は、protein tyrosine kinase (PTK) 阻害剤前孵置にて抑制された。
8. ET-1 によるAP-1 のDNA結合能は、刺激後30分より増加し、1時間にて最大となった。また、c-Junおよびc-Fos抗体によりAP-1 のsupershiftを認めた。

【考 察】

メサンギウム細胞において、ET-1 がJNKを活性化することを示した。その活性化機構は、ET_Aレセプターを介し、PKC非依存性であり、細胞内カルシウム・PTK依存性であった。さらに、ET-1 は、転写因子の一つであるAP-1 のDNA結合能を亢進させた。これまでに、ET-1 は、PKC・PTK依存性にERKを活性化し、c-Junと共にAP-1 を構成するc-Fosの発現を誘導することが報告されている。すなわち、ET-1 は、メサンギウム細胞においてJNKとERKを異なった機構を介して活性化し、c-Junとc-FosによるAP-1 のDNA結合能を亢進させ、同細胞機能を修飾している可能性が考えられた。

【結 論】

培養メサンギウム細胞において、ET-1 が、MAPKスーパーファミリーの一つであるJNKを、ERKとは異なった機構で活性化することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

腎糸球体メサンギウム細胞の機能異常は、糸球体腎炎などの腎糸球体疾患の成因の一つである。血管作働性物質であるEndothelin-1 (ET-1) は、メサンギウム細胞に対して収縮・増殖・細胞外基質産生などの作用を有し、病的状態での同細胞機能異常に関与していると考えられている。しかし、このような細胞応答を引き起こすET-1 の細胞内情報伝達機構は、未だ十分に解明されていない。本研究では、近年、細胞内情報伝達系において、その重要性が提唱されているMAPKスーパーファミリーの一つであるc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) のET-1 による活性化機序について検討し、メサンギウム細胞内情報伝達機構を明らかにしようと試みられた。

本論文では、

- 1) 培養メサンギウム細胞において、ET-1 がJNKを時間依存性及び濃度依存性に活性化すること、
- 2) ET-1 はET_A受容体を介してJNKを活性化し、この作用に細胞内カルシウム及びprotein tyrosine kinase (PTK) は関与するがprotein kinase C (PKC) は関与しないこと、
- 3) ET-1 はc-Jun及びc-Fosを含む転写因子AP-1 のDNA結合能を亢進することを確認した。

これまでの報告では、培養メサンギウム細胞において、ET-1 はPKC・PTK依存性にERKを活性化し、c-Fosの発現を誘導するとされている。本論文の結果より、ET-1 は、メサンギウム細胞においてJNKをERKとは異なった機構を介して活性化し、AP-1 のDNA結合能を亢進して、同細胞機能を修飾する可能性が示唆される。

本論文は、メサンギウム細胞におけるET-1 の作用発現にかかわる細胞内情報伝達機構の新しい一面を示した興味あるものであり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認められた。