

## 審査の結果の要旨

氏名 小室 美子

MAP キナーゼカスケードは外界からの刺激を伝達する重要な細胞内情報伝達経路であり、その中でも MAPKKK に位置する ASK1 は種々のストレスによって活性化され、下流の p38、JNK 経路を活性化してアポトーシスをはじめとするストレス応答を引き起こすことが示されている。これまでに ASK1 と結合する分子が数多く同定され、その解析が ASK1 の機能を解明する手がかりとなってきた。当研究室でも主に yeast two-hybrid 法を用いて ASK1 の活性化機構に重要な役割を担っている分子を同定してきた。しかしながら、ASK1 の活性制御機構および ASK1 の生理機能に関しては依然不明な点が多く残されている。本研究では、HEK293 細胞に発現させた ASK1 と結合する分子を Pull-down 法にて探索した結果、新規 ASK1 結合分子として PGLM が同定された。ASK1 との機能的相互作用について解析を行ったところ、PGLM はプロテインホスファターゼとして機能し、ASK1 の活性化に関わることが明らかとなった。哺乳類のプロテインホスファターゼはセリン・スレオニンホスファターゼとチロシンホスファターゼの各ファミリーに大きく二分されるが、PGLM は既知のプロテインホスファターゼとは一次構造上の類似性をもたず、全く新しいプロテインホスファターゼファミリーの一員としてストレス応答シグナルの制御に関わる可能性が考えられる。

### 1. Pull-down 法による ASK1 結合分子の同定

HEK293 細胞に Flag-ASK1 を過剰発現させ、抗 Flag 抗体により免疫沈降した。この免疫沈降物を Flag ペプチドにて溶出し、プロテアーゼ処理した後に質量分析 (LC-MS/MS) により解析した。その結果、新規 ASK1 結合分子として hypothetical protein MGC5352 を同定した。MGC5352 は哺乳類からショウジョウバエや線虫に至るまで非常によく保存された分子で、N 末端に膜貫通領域と予想される部位 (TM ドメイン)、C 末端側に phosphoglycerate mutase (PGAM) に相同性の高い領域 (PGAM ドメイン) を有していることから PGLM (PGAM-like protein containing a putative trans-membrane domain) と命名した。HEK293 細胞における過剰発現系で PGLM と ASK1 との結合を確認したところ、両者の結合が確認された。Northern blotting によって解析したところ、PGLM は mRNA レベルでユビキタスな組織に発現していることがわかった。

### 2. ASK1 の活性に対する PGLM の影響

HEK293 細胞に PGLM を単独で発現させると、内在性の JNK ならびに p38 が活性化された。また、PGLM と ASK1 を共発現させると、ASK1 の活性化に必須である活性化ループ内の Thr 残基のリン酸化 (p-Thr838) が亢進し、下流の JNK ならびに p38 も、ASK1 または PGLM を単独で発現させた際と比較して非常に強く活性化された。PGLM は、ASK1 のキナーゼ活性欠損体 (K709R) との共発現ではこのような作用を示さないことから、ASK1 の自己リン酸化による活性化を誘導し、ASK1 による JNK/p38 経路の活性化を増強することが示唆された。

### 3. PGLM の細胞内局在

PGLM の TM ドメインの役割を解明するために Venus タグをつけた PGLM WT および TM ドメインを欠損した変異体 PGLM  $\Delta$ TM を HEK293 細胞に発現させ、細胞内局在を観察した。その結果 PGLM WT は主にミトコンドリアに局在したが PGLM  $\Delta$ TM は細胞質に diffuse に存在したことから TM ドメインが PGLM のミトコンドリアへの局在に重要であることが示唆された。また  $\Delta$ TM は ASK1 との結合が WT と比較して非常に弱く、ASK1 の活性を増強させる能力もほとんどないことから、PGLM による ASK1 の活性化には両者の結合が必要であることが示唆された。

### 4. PGLM は脱リン酸化によって ASK1 を活性化する

PGAM はリン酸基の分子内転移を触媒する酵素として知られている。一方 PGAM のこの酵素反応は、糖リン酸エステルを基質に脱リン酸化、リン酸化を行っているとも捉えられる。PGLM に存在する PGAM ドメインにおいては、PGAM の酵素活性中心を構成するアミノ酸がよく保存されていることから、PGLM がリン酸化タンパク質を基質に脱リン酸化もしくはリン酸化反応を触媒する可能性を考えた。そこで His105 (酵母 PGAM の活性に必須の His8 に相当) に変異を加えた PGLM を作製し、ASK1 の活性に対する影響を検討した。その結果、PGLM の His105 変異体である H105A および H105F は ASK1 を活性化できず、下流の p38、JNK も活性化されなかったことから、PGLM はその酵素活性によって ASK1 を活性化させていることが示唆された。また PGLM と共発現させた ASK1 に SDS-PAGE 上での顕著な泳動度の促進が認められたことから、ASK1 が Thr838 のリン酸化以外に何らかの修飾を受けていると考えられた。ASK1 の各種欠損変異体を PGLM と共発現させて電気泳動度の変化を観察したところ、PGLM による修飾部位は ASK1 の C 末端領域 (CT) に存在することが示された。ASK1 CT を発現させた細胞抽出液を  $\lambda$ PPase 処理すると電気泳動度が促進し、この泳動度の促進は PGLM との共発現の際と同等であることから PGLM による ASK1 の修飾は脱リン酸化であることが示唆された。以上のことから ASK1 は、定常状態では C 末端領域がリン酸化を受けてその活性が負に制御されているが、PGLM はその領域を脱リン酸化することによって Thr838 の自己リン酸化を亢進させ、ASK1 を活性化すると考えられた。

### 5. PGLM はセリン・スレオニンホスファターゼである

以上の結果より、PGLM は *in vivo* において ASK1 を脱リン酸化することによって活性化することが示唆されたことから、実際に PGLM がホスファターゼとして機能するかを *in vitro* において検証した。大腸菌からリコンビナント PGLM を精製し、*p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) を基質として脱リン酸化活性を測定したところ、PGLM はホスファターゼ活性をもち、この活性は His105 の変異体では失われることがわかった。さらに PGLM がタンパク質に対して脱リン酸化能をもつかを検証するためにリン酸化ペプチドに対する脱リン酸化活性を測定したところ、PGLM は phospho-Ser/Thr 特異的に働くホスファターゼとして機能し、phospho-Tyr に対しては脱リン酸化能を持たないことが明らかとなった。一方、PGAM はどちらに対しても脱リン酸化能を持たなかった。

## 6. PGLM の生理的意義

ホスファターゼには acid phosphatase や alkaline phosphatase のようにその活性が pH に依存するものが知られていることから、PGLM の酵素活性の pH プロファイルを検討した。その結果、PGLM は既知のセリン・スレオニンホスファターゼと異なり、酸性領域に至適 pH をもつことが明らかとなった。様々な細胞傷害性ストレスは細胞質の pH 低下を引き起こすことが知られており、PGLM はそのような細胞内 pH 変動のセンサーとなることが考えられた。実際に ASK1 は酸性条件下で活性化されることから PGLM が細胞内 pH の変化を感知して ASK1 の活性制御に関わる可能性が示唆された。

本研究では、新規 ASK1 結合分子として PGLM を同定し、ASK1 の活性化に関与することを示した。ASK1 は定常状態では C 末端領域がリン酸化されておりその活性は負に制御されていると考えられる。PGLM はセリン・スレオニンホスファターゼとしてそのリン酸基を外すことによって ASK1 の活性化に必要なリン酸化の亢進を促し、ASK1 の活性化を引き起こすものと考えられる。PGLM は既知のプロテインホスファターゼに一次構造上の類似性をもたず、また PGAM ドメインをもつ分子として初めてセリン・スレオニンホスファターゼ活性をもつことが明らかとなった。PGLM は他のプロテインホスファターゼと比較して酸性領域に至適 pH をもつことが *in vitro* の実験で明らかとなり、ASK1 も酸性条件下で活性化されることが示された。様々な細胞傷害性ストレスは細胞質内の pH の低下を引き起こすことが知られていることから、PGLM はそのような pH 変動を感知してストレス応答に関与する可能性が考えられる。

以上の結果は PGAM ドメインをもつ分子がプロテインホスファターゼとして機能することを示したはじめての例であり、またそのような分子が細胞内 pH の変動を感知してストレス応答につなげるセンサーとして働いている可能性を示唆した全く新しい知見である。今後 PGLM の生理的な重要性や、ASK1 以外の PGLM の基質となるタンパク質との関係について解析が進むことで、細胞内シグナル伝達に新たな知見が得られるものと大いに期待される。以上のことから本研究は博士（薬学）の学位に十分値するものと判定した。