

論文の内容の要旨

論文題目 ASK1 を介した新たなストレス応答シグナル伝達経路の探索

氏名 高河原 周一

[背景]

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)は MAPKKK ファミリーに属し、JNK および p38 経路を活性化する。ASK1 は酸化ストレスをはじめとする様々なストレスによって活性化され、アポトーシスの誘導など多様な生理機能を発揮することでストレス応答において重要な役割を担っていると考えられている。しかし ASK1 の活性化機構の解析が進む一方で、ASK1 がどのような経路でストレス応答のシグナルを下流へと伝達しているかについては不明な点が多い。そこで本研究では、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析法を用いて ASK1 の下流で機能する分子を探索する系を確立し、ASK1 を介した新たなストレス応答シグナル伝達経路を見出すことを目的とした。さらに、その結果見出されたシグナル伝達系の哺乳類細胞における機能を解析し、種を越えて保存されたストレス応答シグナル伝達経路としての意義を明らかにし、ストレスが引き金または増悪因子となる疾患への理解と治療法の確立につなげたいと考えた。

[方法と結果]

1. DASK1 の異所性発現を用いたスクリーニング系の確立

ショウジョウバエにおいては哺乳類 ASK1 の相同分子である DASK1 が存在し、哺乳類細胞と同様にアポトーシスの制御に関わっていることが明らかとなっている。まず、哺乳類 ASK1 の知見に基づいて DASK1 タンパク質の N 末端を欠失させた「恒常活性化型 DASK1 (DASK1ΔN)」を作製し、DASK1 の活性化が誘導するショウジョウバエ各組織における表現型を UAS/GAL4 システムを用いて探索した。転写因子 GAL4 の標的配列である UAS 配列の下流に DASK1 遺伝子を挿入した UAS-DASK1ΔN を導入したショウジョウバエ系統を作製し、組織特異的プロモーター依存的に GAL4 を発現する各種ドライバー系統と交配することにより DASK1 シグナルを異所性に活性化させ、その表現型を観察した。全身に発現させると致死とな

り、各臓器に限局して発現させると顕著な表現型が得られない傾向であったが、唯一、背側正中線領域に GAL4 を発現するドライバーである *pnr-GAL4* を用いて *DASK1ΔN* を発現させたところ、成虫において *DASK1ΔN* 発現領域に一致した明らかな黒色の色素沈着が認められた (Fig.1)。そこで、この表現型を指標として *DASK1* の下流で機能する分子の探索を試みた。

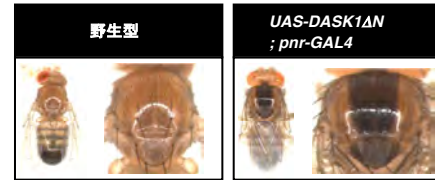


Fig. 1 *DASK1ΔN* の異所性の発現によって誘導される表現型

2. *DASK1* による tyrosine hydroxylase (TH) の発現誘導

ショウジョウバエの全ゲノムの約 85% をカバーする染色体欠失系統と *DASK1ΔN* 発現系統 (*pnr>DASK1ΔN*) との交配を行い、色素沈着の表現型を示すために必要な遺伝子をスクリーニングした。その結果得られた候補遺伝子群には、ショウジョウバエにおけるメラニン合成に関わる遺伝子が含まれていた。そこで Fig.2 に示したメラニン合成経路に関するこれまでの知見をもとに、メラニン合成に異常を示す変異系統との交配実験を行った結果、

この表現型が *dopa* ならびに *dopamine* から誘導されるメラニンの合成亢進によるものであることが確認された。さらに、*tyrosine* から *dopa* を産生する律速酵素である *tyrosine hydroxylase* (TH) が *DASK1ΔN* の発現に依存して転写レベルで誘導され、TH 遺伝子を標的とする double strand RNA (dsRNA) の発現によって内在性 TH をノックダウンすることで、*DASK1ΔN* の発現による色素沈着がほぼ完全に抑制された (Fig.3)。これらの結果から、*DASK1* から TH の発現誘導に至るシグナル伝達経路がショウジョウバエにおいて機能していることが明らかとなった。

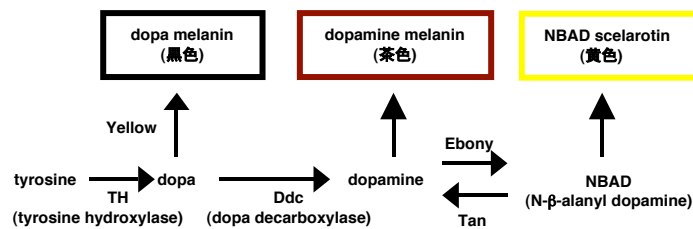


Fig. 2 ショウジョウバエにおけるメラニン合成経路

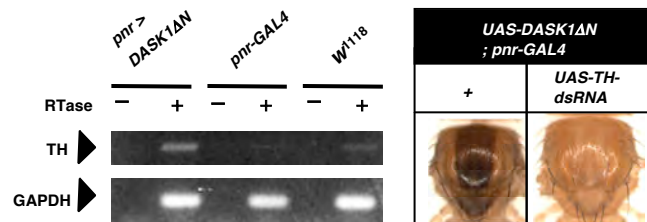


Fig. 3 *DASK1* による TH の発現誘導 (左) とメラニン合成における TH の必要性 (右)

3. *DASK1* による TH の発現制御機構

哺乳類細胞においては、核内受容体 NR4A ファミリー分子 (*Nurr1*, *Nur77*, *NOR1*) が TH の発現制御に関わっていることが知られており、その ortholog である *DHR38* をコードする遺伝子が前述のスクリーニングで得られた染色体欠失領域に含まれていた。*DHR38* をノックダウンした変異体においては *DASK1* による色素沈着が抑制されたことから、ショウジョウバエにおいても *DHR38* が TH の転写制御に寄与しているものと考えられた (Fig.4)。また、*DASK1* による色素沈着の表現型は、*JNK* 経路の変異によっては抑制されずにドミナントネガティブ型 *p38* の過剰発現によって抑制されたことから、*DASK1* が *p38* 経路依存的に *DHR38* を介した TH の発現調節を行う新たなシグナル伝達経路の存在が強く示唆された。



Fig. 4 *DASK1* によるメラニン合成への *DHR38* の必要性

4. 哺乳類細胞における ASK1-p38 経路による TH の発現誘導機構

ショウジョウバエにおいて見出されたこのようなシグナル伝達経路が、哺乳類細胞においても保存されているかを検討した。NR4A ファミリーの中でも TH の発現制御における生理機能が明らかとなっている Nurr1 に注目し、TH 遺伝子プロモーター領域を含むレポーター遺伝子を用いてその転写活性を検討した。その結果、Nurr1 および ASK1ΔN それぞれの単独発現によってある程度の転写活性が認められたが、両者の共発現によって TH の転写は相乗的に増強された (Fig.5)。このような現象は Nor1 や Nur77 についても認められたことから、ASK1 は NR4A ファミリー分子すべての活性化に働くことが示唆された。また、この Nurr1 と ASK1ΔN の共発現による TH の転写の促進は、JNK の阻害剤によってはほとんど抑制されずに p38 阻害剤によって抑制されたことから、ASK1ΔN はショウジョウバエと同様、おもに p38 経路を介して Nurr1 を活性化し、TH の転写を促進するものと考えられた。

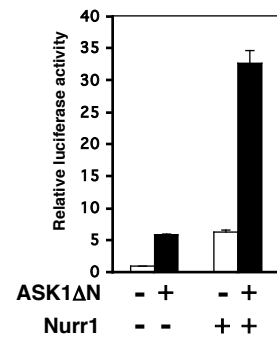


Fig. 5 ASK1 による Nurr1 の転写活性化能の増強

5. p38 による NR4A ファミリー分子の活性化機構

一般的な核内受容体はリガンドとの結合に依存してその転写活性化能を亢進させる。一方、NR4A ファミリー分子についてはリガンド非依存的に活性を持つことが示されているものの、活性調節機構については不明な点が多い。ASK1-p38 経路はキナーゼ活性に依存して Nurr1 を活性化することから、p38 によるリン酸化によって Nurr1 の活性化が制御される可能性を検討した。p38 の標的となる至適リン酸化モチーフを多数含む Nurr1 の N 末端領域を基質として *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、Nurr1 が p38 によって直接リン酸化されることが分かった (Fig.6a)。また、細胞内においても ASK1ΔN と p38 の共発現によって Nurr1 のリン酸化による顕著な電気泳動度の変化が観察された (Fig.6b)。さらに DHR38 も哺乳類細胞内で p38 によってリン酸化されたことから、NR4A ファミリー分子は ASK1-p38 経路によってリン酸化されることにより転写活性が増強するものと考えられた。そこで、Nurr1 の活性化に必要なリン酸化部位を探索するために、予想リン酸化部位を Ala に置換した変異体を作製した。この結果、予想リン酸化部位の複数の部位を Ala に置換した変異体 Nurr1 においては野生型 Nurr1 と比較して、ASK1 による転写能の活性化が部分的にはあるが抑制されることが観察された。よって、ASK1-p38 経路による Nurr1 の活性化にはリン酸化制御が実際に関与することが示唆された。

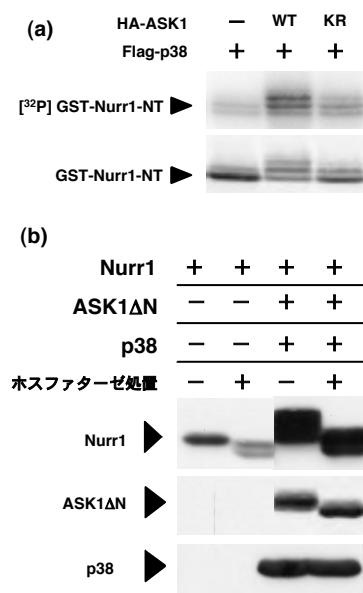


Fig. 6 p38 による Nurr1 のリン酸化 (a) *in vitro* における p38 による Nurr1 のリン酸化 (b) 電気泳動度の変化として捉えた細胞内における Nurr1 の p38 によるリン酸化

6. マウス個体における ASK1 の TH の発現制御

Nurr1 は黒質線条体のドーパミン神経において TH の発現誘導を担っていると考えられていることから、生体内において実際に ASK1 が Nurr1 の活性を制御しているかを知るための手がかりとして、ASK1 ノックアウト (ASK1^{-/-}) マウスにおける TH の発現を検討した。線条体を単離し、野生型マウス (WT) と比較し

た結果、ASK1^{-/-}マウスにおいては TH のタンパク量が減少していることが観察された (Fig.7)。よって、ASK1 は TH の発現に必要であり、ASK1 による Nurr1 の活性化機構が実際に生体内で機能していることが示唆された。一方、線条体内のドーパミン量については、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスにおいて差は認められなかったことから、TH の発現量の減少の代償として、ドーパミン量を一定に保持するために TH の機能亢進やドーパミンの代謝の抑制が行われている可能性が考えられる。

[まとめと考察]

私は本研究において、ショウジョウバエを用いた遺伝学的手法を用いて ASK1 の下流で機能する分子を探索するスクリーニング系を確立し、ASK1 を介したシグナル伝達経路として新たに p38 による NR4A ファミリー分子のリン酸化による転写活性制御系を見出した (Fig.8)。この経路によるショウジョウバエの標的遺伝子が TH であることも明らかにしたが、一方で TH の過剰発現だけでは DASK1 Δ N の発現による色素沈着と同様の表現型は誘導されないことを確認している。つまり、今回見出した色素沈着の表現型を誘導するためには DHR38 による TH 以外の遺伝子発現や、DASK1 や p38 からの付加的なシグナルが必要であることを示しており、今回のスクリーニングによって得られた候補遺伝子群に新たなシグナル伝達経路を構成するものが多く含まれていることが予想され、今後の解析に期待がかかる。

ショウジョウバエにおける TH の発現上昇はメラニン合成の亢進につながる。ショウジョウバエにおけるメラニン合成経路は異物の侵入に対する生体防御に働くことが知られている。哺乳類や線虫においては ASK1-p38 経路が自然免疫応答の制御に深く関わっていることが示されていることから、NR4A ファミリー分子による転写制御も、病原微生物の感染を含めた様々なストレスに対する生体防御機構に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、ASK1^{-/-}マウスを用いた解析により、ASK1 による Nurr1 の活

性制御機構が、TH の発現制御を介して神経機能の制御にも働いている可能性も考えられる。今後、ASK1 を介した NR4A ファミリー分子の活性制御がどのようなシグナルによって行われているかを明らかにすることで、パーキンソン病をはじめとする様々な疾患の発症メカニズムの解明や新たな治療標的の発見につながるのではないかと考えている。

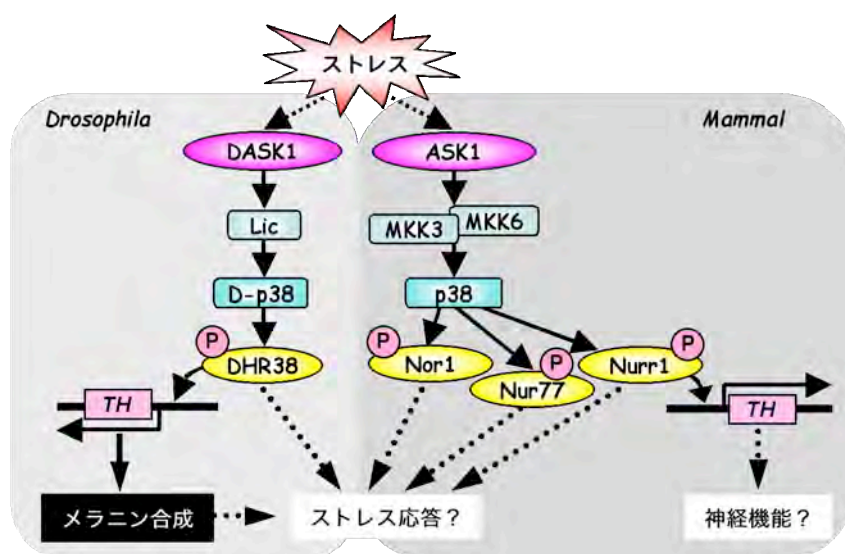


Fig.8 ASK1 を介した新たなシグナル伝達経路

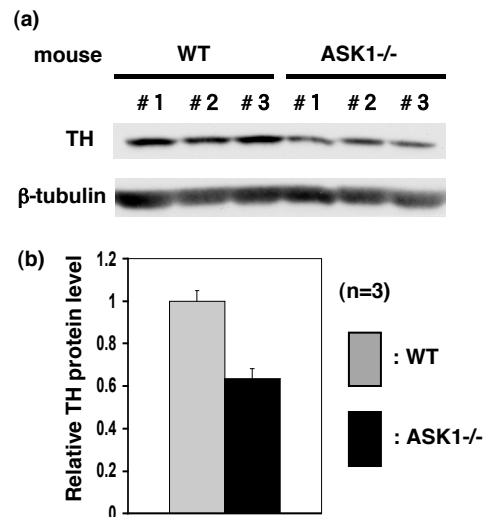


Fig.7 線条体における TH の発現量
(a) WT マウス, ASK1^{-/-}マウスにおける TH の発現
(b) 相対的な TH タンパクレベル