

審査の結果の要旨

氏名 高河原 周一

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く残っている。本研究は、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、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て行った研究である。

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*Drosophila*ASK1 (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、各臓器に局限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。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。

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、ショウジョウバエにおける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。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。

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。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。

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 ファミリーのなかでも 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調べた。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。このような現象は Nur1 や Nur77 についても認められたことから、ASK1 は種を問わず NR4A ファミリー分子の活性化にはたら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。

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。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。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。

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。

本研究は、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報告である。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。本研究の成果によって、ASK1 を介した NR4A ファミリー分子の活性制御が、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ことで大いに期待される。本研究は多様な生理機能を有する ASK1 を介するシグナル伝達経路に新たな知見を与えるものであり、その理解に大いに貢献するものとして、博士 (薬学) の学位に値するものと判断した。