

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### 浸透圧ストレスにおけるASK3の活性制御機構と 新たな生理機能の解析

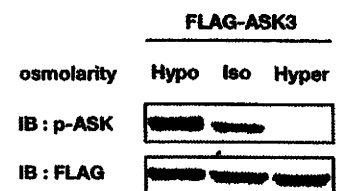
梅田 剛

#### 【序論】

ASK3 (Apoptosis signal-regulating kinase 3) は MAPKKK ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、ASK1 や ASK2 と共に ASK ファミリーを形成する一員として、最も新しく同定された分子である。これまでの ASK1 に対する研究から、ASK3 も酸化ストレス等の物理化学的ストレスに応答して下流の JNK および p38 MAPK 経路を活性化し、細胞死をはじめとする様々な生理応答を担っていることが予想された。そこで様々なストレスに対する ASK3 の活性変化を調べたところ、浸透圧ストレスに対して ASK1 とは異なる特徴的な挙動を示すことが明らかになった。ASK1 は低浸透圧でも高浸透圧でも活性化するが、ASK3 は低浸透圧で活性化して、高浸透圧では不活性化するという両方向性の活性変化を示すのである (Fig. 1)。

ASK3 は腎臓や胃および腸といった組織に発現が多く、特に管腔側の細胞に高発現している。これらの組織は大きな浸透圧変化に晒されることが多く、細胞は適応するために特別な機構を備えていると考えられる。ASK3 はその活性変化の特徴から、細胞外での浸透圧変化を細胞内シグナルに変換するシステムとして適していると考えられるが、その活性制御機構および ASK3 上流の浸透圧受容因子の分子実体については全く不明であった。そこで本研究では、ショウジョウバエ培養細胞を用いた RNAi screening を行い、ASK3 活性制御因子の探索を試みた。また、screening から得られた PPM1A および PPM1B というホスファターゼが、浸透圧ストレスにおける ASK3 の活性をどのような局面で制御するかを解析した。さらに、より上流の因子を含めた、網羅的な探索を行うためにヒト培養細胞での RNAi による High content screening の系を確立した。

また、最近の ASK3 ノックアウトマウス解析において、野生型マウスよりも高血圧症状を呈しやすいということが明らかになってきた。さらに、ASK3 のインタラクトーム解析から、結合因子として、WNK1



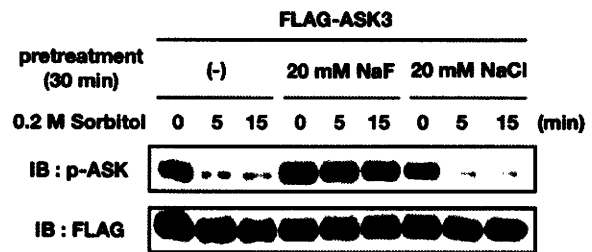
(Figure 1) ASK3 は浸透圧ストレスに対して両方向にその活性を変化させる

およびWNK4という遺伝性高血圧症の原因遺伝子であるキナーゼが同定された。WNK1はSPAK/OSR1というキナーゼをリン酸化することでイオントランスポーターの活性を制御していると考えられている。よって本研究では、WNK1-SPAK/OSR1経路のリン酸化レベルに対し、ASK3が及ぼす影響についての解析を行った。

## 【方法と結果】

### 1. ASK3の刺激依存的な活性制御にはホスファターゼによる脱リン酸化が関与する

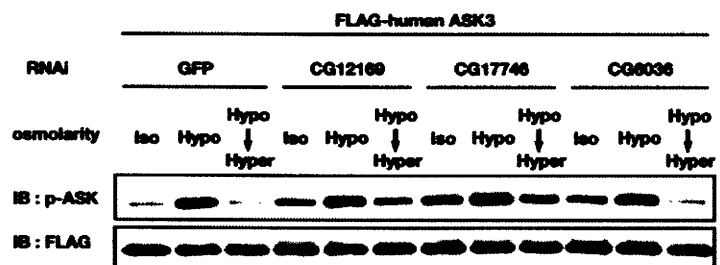
これまでの研究から、ASK3の浸透圧による活性変化は非常に短い時間で起きることが分かっている。特に高浸透圧での活性化型ASK3(活性化に必須であるThr808がリン酸化されたフォーム)の減弱は刺激後2分でも観察される(Fig. 2)。このようなASK3リン酸化レベルのダイナミックな変化を引き起こすには、プロテインホスファターゼの関与が必要であると考え、培養細胞に各種ホスファターゼ阻害剤を投与して実験を行った。するとPP1やPP2Aの阻害剤であるCalyculin AやOkadaic acid、PP2B阻害剤であるCyclosporin A、さらにチロシンホスファターゼ阻害剤である $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ではASK3の高浸透圧刺激による不活性化は抑制されなかったが、より非特異的な阻害剤であるNaFを投与することでASK3の不活性化が完全に抑制された(Fig. 2)。この結果より何らかのホスファターゼがASK3の活性制御に関わっていることが示唆された。



(Figure 2) ASK3の不活性化はNaFの前処置で抑制される

### 2. ショウジョウバエ培養細胞でのRNAi screeningによるASK3-ホスファターゼの探索

浸透圧ストレスにおいてASK3の活性を制御するホスファターゼを同定するために、RNAi screeningの系を構築した。まず、dsRNAを用いた簡便で高効率なノックダウンが可能であり、ホスファターゼ遺伝子群が哺乳類とも高度に保存されているショウジョウバエの培養細胞である、S2細胞が利用できないか試みた。そのためにはASK3がS2細胞内においても脱リン酸化を受けることが必要であるが、ショウジョウバエには哺乳類のASK3と同じ挙動を示すオルソログが存在しない。そこで、ヒトASK3をS2細胞に発現させ、高浸透圧ストレスでヒトASK3が脱リン酸化されることを確かめた。この細胞を用い、ショウジョウバエのホスファターゼ遺伝子に対してRNAi screeningを行った。標的遺伝子のdsRNAはショウジョウバエのgenomic DNAから約500 bpの領域をPCRでクローニングして、増幅断片を鋳型にin vitro transcriptionを行うことで合成した。ASK3のリン酸化レベルをウエスタンブロット法により評価した結果、PPMファミリーホスファターゼに属するCG12169, CG17746, CG6036の3遺伝子がASK3の脱リン酸化に関わっていることが示唆された(Fig. 3)。



(Figure 3) S2細胞を用いたRNAi screeningで得られた3遺伝子をノックダウンするとASK3の脱リン酸化が抑制される

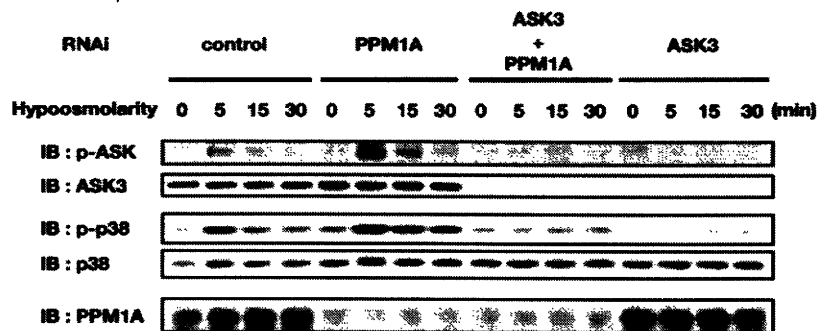
### 3. PPM1A および PPM1B は ASK3 を脱リン酸化する

次に、ヒトとショウジョウバエの間での相同性から、screening で得られた 3 遺伝子のオルソログと考えられる PPM ファミリーのヒト遺伝子を 4 種類選び、ヒト培養細胞内で ASK3 を脱リン酸化することができるか検討した。その結果、PPM1A および PPM1B が ASK3 をホスファターゼ活性依存的に脱リン酸化することを見出した。この時、同じ PPM ファミリーに属する PPM1G や、既に ASK1 を脱リン酸化する事が知られている PP5 では ASK3 は脱リン酸化されなかった。また、in vitro の脱リン酸化実験により、ASK3 のキナーゼ活性化に必須な Thr 残基が直接脱リン酸化されることが明らかになった。

### 4. PPM1A および PPM1B は低浸透圧ストレス依存的な ASK3-p38 MAPK 経路を負に制御する

実際の浸透圧ストレス応答において、PPM1A や PPM1B が ASK3 の活性を制御するのか検討するために、RNAi 実験を行った。HEK293 細胞および HeLa 細胞で PPM1A 又は PPM1B をノックダウンしたところ、低浸透圧ストレスによる ASK3 および下流の p38 MAPK の早い時間での活性化が顕著に増強することが明らかになった。また、これらホスファターゼと ASK3 を同時にノックダウンすると、p38 活性化の増強がキャンセルされた (Fig. 4)。これは、PPM1A および PPM1B が低浸透圧ストレス状況下で、ASK3 を脱リン酸化することにより ASK3-p38 経路を負に制御していることを示唆する結果である。

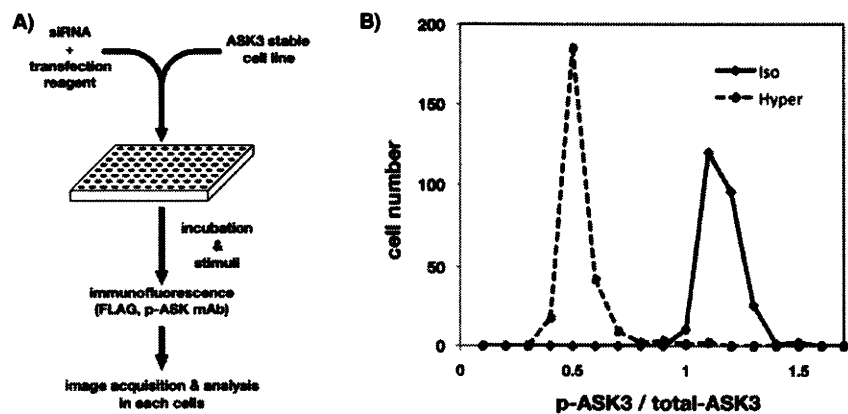
これとは対照的に、高浸透圧ストレス時における ASK3 の脱リン酸化に関しては PPM1A と PPM1B の両方を同時にノックダウンしてもほとんど抑制されなかったことから、高浸透圧ストレスに特異的な別のホスファターゼの存在が示唆された。



(Figure 4) HEK293 細胞で PPM1A をノックダウンすると低浸透圧ストレス依存的な ASK3 および p38 経路の活性化が増強した

### 5. ヒト培養細胞を用いたゲノムワイド High content screening 系の確立

高浸透圧ストレス特異的な ASK3-ホスファターゼ、およびさらに上流で浸透圧変化を感知していると考えられるセンサー分子を同定するために、ヒト培養細胞を用いたゲノムワイド RNAi screening の系の確立を試みた。この screening では、約 18,000 のヒト遺伝子に対して設計された siRNA を用いるため、より多検体を同時に評価する実験系が必要である。私は、HEK293 細胞から ASK3 の安定発現細胞株を樹立し、96 well plate 上で蛍光免疫染色を行うことで、個々の細胞における ASK3 のリン酸化レベルを多数・同時に検出



(Figure 5) ASK3 のリン酸化レベルを指標とした High content screening

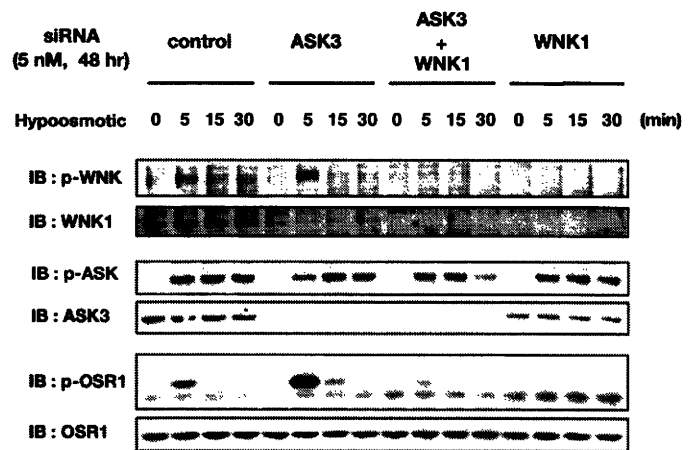
A. 実験系の概要 B. 浸透圧刺激下での、各細胞における ASK3 リン酸化レベル

する High content imaging の系の構築に成功した (Fig. 5)。現在、全ゲノムに先駆けてホスファターゼ約 300 遺伝子に対して screening を行っている。

## 6. ASK3 は WNK1-SPAK/OSR1 経路を負に制御する

ASK3 の結合分子として、当研究室において同定された WNK1/4 という分子は、PHAI1 という遺伝性高血圧症の原因遺伝子であり、ASK3 ノックアウトマウスの表現型との関係が予想された。WNK1-SPAK/OSR1 経路は浸透圧ストレスで活性化することから、ASK3 がこの経路の活性に影響するか、ノックダウン実験によって検討した。考え、ノックダウン実験を行った。すると、HeLa 細胞において低浸透圧ストレス依存的な WNK1 および OSR1 の活性化を示すリン酸化が観察されたが、ASK3 を siRNA でノックダウンすることによって、両者のリン酸化が亢進することが明らかになった。ここでさらに、WNK1 のノックダウンを組み合わせると OSR1 の活性化亢進が打ち消されたことから、ASK3 は WNK1 の上流で働いていることが示唆された (Fig. 6)。

また、ASK3 の WNK1-SPAK/OSR1 経路に対する抑制作用が、ASK3 のキナーゼ活性によるものかを検討するために、過剰発現系で実験を行った。HeLa 細胞に、組換えアデノウイルスを用いて ASK3 の野生型およびキナーゼ活性欠失変異体を発現させたところ、キナーゼ活性依存的に WNK1 および OSR1 のリン酸化を抑制した。以上より、WNK1-OSR1 経路が ASK3 によるリン酸化で制御されていることが示唆された。



〈Figure 6〉 ASK3 の発現抑制によって、WNK1 および OSR1 のリン酸化促進が観察された。

### 【まとめと考察】

本研究において私は、ショウジョウバエの系を用いた RNAi screening から ASK3 の活性制御因子として PPM1A および PPM1B を見出し、低浸透圧ストレス時に活性化する ASK3 を脱リン酸化することで p38 経路を負に制御していることを明らかにした。近年、PPM ファミリーは MAP キナーゼ経路の各分子を制御するという報告がなされている。今回の知見は、低浸透圧ストレス応答における MAP キナーゼ経路のホスファターゼによる制御として新しいものである。今後はこれらのホスファターゼが ASK3 を脱リン酸化する詳細な分子機構を解析していきたい。また、今回確立したゲノムワイド screening を進めていき、高浸透圧ストレス特異的な ASK3 のホスファターゼやさらに上流の因子を同定することで、未だに不明な点が多く残されている哺乳類細胞の浸透圧感知メカニズムを解明していきたい。さらに、ASK3 が既存の MAP キナーゼ経路以外に関与する経路として、WNK-SPAK/OSR1 経路を見出し、ASK3 ノックアウトマウスの表現型を支持する結果を得た。今後は培養細胞だけでなく、組織や個体での ASK3 活性と WNK-SPAK/OSR1 シグナルの関係を検討していきたい。