

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 梅田 剛

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ตอบสนอง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。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した。ASK3 は腎臓や胃および腸といった組織に発現が多く、これらの組織は大きな浸透圧変化に晒されることが多い。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。

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た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 および WNK4 という遺伝性高血圧症の原因遺伝子が同定された。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。

本研究では、ショウジョウバエ培養細胞を用いた RNAi screening で、ASK3 活性制御因子の探索を行い、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 系を確立した。また、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。以下に本研究から得られた主な知見をまとめた。

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。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 Na_3VO_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。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。

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 細胞が利用できるか試みた. 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ェ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.

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. 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.

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. そこで, 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・同時に検出する High content imaging の系の構築に成功した.

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。

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。

本研究において、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 が見出され、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が明らかになった。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。また、本研究で確立したゲノムワイド screening 系により、網羅的な ASK3 の活性制御因子の探索が可能になり、哺乳類細胞の浸透圧感知機構に迫ることができると考えられる。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、高血圧という ASK3 ノックアウトマウスの表現型を支持する結果を得た。以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値するものと判定した。