

論文の内容の要旨

論文題目 翻訳抑制時における脱アデニル化酵素の ASK1 活性化因子としての機能解析

氏名 畑中 良

【序論】

生体内において細胞は絶えず外環境、内環境からの様々なストレスに曝されている。ストレス応答性の Mitogen-activated Protein (MAP)キナーゼ経路は酵母から高等植物、哺乳類に至るまで高度に保存された細胞内シグナル伝達経路であり、このような環境変化に対して生体の恒常性を維持するために重要な役割を果たす。Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は MAP3K ファミリーに属するキナーゼであり、酸化ストレスや小胞体ストレス、カルシウム過負荷、そして炎症性サイトカインである TNF- α などによって活性化し、p38 経路や JNK 経路を通じて細胞死や免疫応答などのストレス応答を誘導する。ASK1 は循環器系疾患や神経変性疾患などの病態への関与も示唆されており、ASK1 の生理的・病的ストレス応答の詳細を明らかにすることは重要課題といえるが、ASK1 活性化の分子メカニズムは未解明な部分が多い。そこで私は修士課程において、ASK1 の上流分子を同定し、新たな ASK1 活性化機構を発見すべく、ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを行った。ショウジョウバエの ASK1 (DASK1)の恒常的活性化体である、DASK1 Δ N をショウジョウバエの背側中央領域に発現させると、胸部において Dp38 経路依存的なメラニンの蓄積というユニークな表現型が観察される (Fig. 1) [1]。この表現型を DASK1 活性化の指標として捉え、内在性遺伝子の発現誘導が可能なショウジョウバエ変異体系統である GS 系統を用いて、遺伝子発現によってメラニンの蓄積が起こるような系統の探索を行った [2]。同定したメラニン蓄積系統は、*kuma* (*key upswing in melanin accumulation*)系統と名付け、その中で私は *kuma4* 系統の解析を行った。その結果、mRNA の Poly(A)鎖を分解する脱アデニル化酵素複合体 Pan complex のサブユニットである Poly(A) nuclease 3 (Pan3)のショウジョウバエオルソログ DPan3 を新規 ASK1 活性化因子として同定した。Pan3 は Poly(A) 鎖分解時に Pan2 と Poly(A) binding protein (PABP)と結合するが、DPan3 だけでなく、DPan2

及びDPABPもショウジョウバエ由来のS2細胞においてDASK1を活性化することを示した。さらに博士課程において、翻訳抑制時に誘導されるDASK1の活性化にDPan complexと、別の脱アデニル化酵素複合体であるDCcr4-Caf1 complexが関与していることを明らかにした。

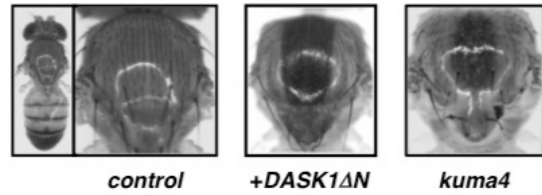


Fig. 1 ショウジョウバエ背側中央領域においてDASK1ΔNを異所性発現することで誘導されるメラニン蓄積、及びkuma4系統の表現型

【方法と結果】

S2細胞においてDPABP結合因子群はDASK1を活性化する

mRNAの翻訳時には、Poly(A)鎖に結合して翻訳の効率を上昇させているPABPと、リボソームからポリペプチド鎖を解離させる機能を持つ翻訳終結因子であるeukaryotic release factor 3 (eRF3)とが結合している。mRNAの翻訳終結時にはPABPからeRF3が解離し、

代わりにPan complexがPABPに結合してPoly(A)鎖の分解を途中まで行い、その後Ccr4-Caf1 complexがPABPに結合して残りのPoly(A)鎖の分解を行う[3]。また、eRF3はヒトにおいてASK1の抑制因子である14-3-3をASK1から解離させることでASK1を活性化させるという報告がある[4]。そこで、Pan complex同様、PABPと結合する分子群がASK1を活性化するかを確かめるため、これらのショウジョウバエオルソログのDASK1活性化能を検討した。その結果、DPan complexやDPABP同様に、DCcr4とDCaf1の共発現やDeRF3もDASK1を活性化することが分かった (Fig. 2)。

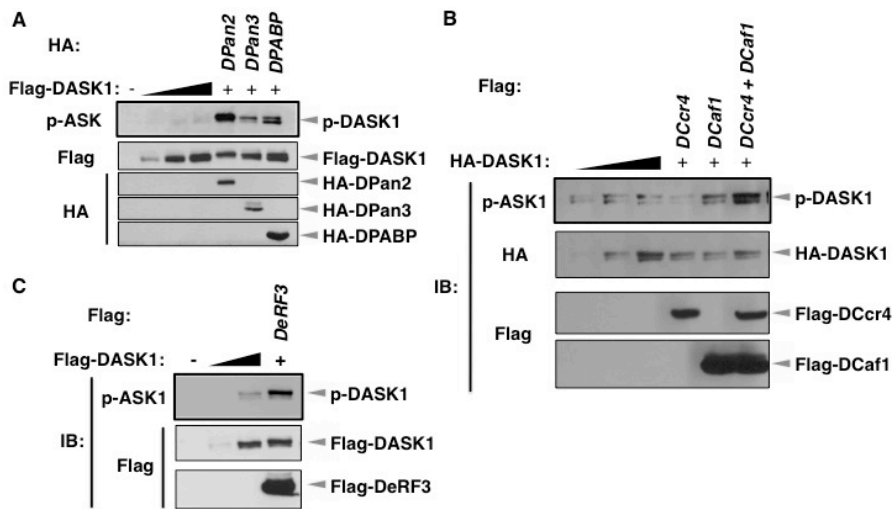


Fig. 2 DPABP結合因子群とDPABPはいずれもDASK1を活性化する
A) DPan2、DPan3及びDPABPによるDASK1の活性化
B) DCcr4とDCaf1の共発現によるDASK1の活性化
C) DeRF3によるDASK1の活性化

翻訳阻害剤によって誘導されるDASK1の活性化には、DPan complex及びDCcr4-Caf1 complexが必要である

DPABP及び翻訳終結からPoly(A)鎖分解時にDPABPに結合する各分子がいずれもDASK1を活性化したため、DPan complexが関与するストレスとして翻訳装置に影響を与えるようなストレスを想定し、S2細胞に翻訳阻害剤処理を行った。すると、Cycloheximide (CHX)、Puromycin、Emetineなど各種翻訳阻害剤処理によって

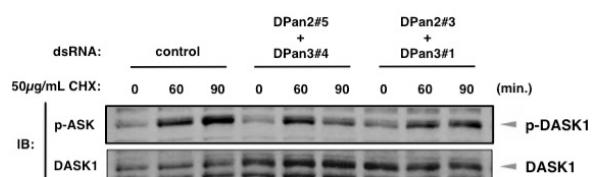


Fig. 3 DPan complexはCHXにより誘導されるDASK1の活性化に必要である

DASK1 の活性化が検出された。そこで、DPan complex と DCcr4-Caf1 complex の翻訳阻害剤依存的な DASK1 活性化に対する必要性をノックダウン系を用いて検討した。その結果、CHX による DASK1 の活性化は DPan complex のノックダウンによって抑制された (Fig. 3)。また、CHX、Puromycin、Emetine による DASK1 の活性化は DCcr4 及び DCaf1 いずれのノックダウンによっても抑制された (Fig. 4)。よって、翻訳阻害剤による DASK1 の活性化には DPan complex 及び DCcr4-Caf1 complex が必要であることが示唆された。

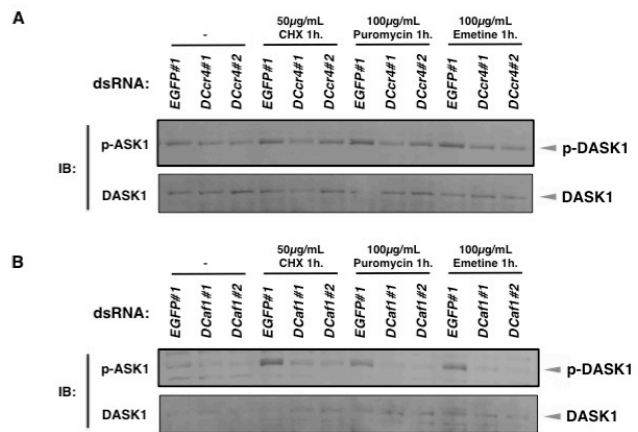


Fig. 4 DCcr4とDCaf1は各種翻訳阻害剤により誘導されるDASK1の活性化に必要である
 A) DCcr4のDASK1活性化に対する必要性
 B) DCaf1のDASK1活性化に対する必要性

CHX によって誘導される TH の発現上昇には DASK1 や DPan complex、DCcr4-Caf1 complex が必要である

脱アデニル化酵素によって活性化される DASK1 がどのようなストレス応答を誘導するか検討する上で、スクリーニング系で用いたメラニン蓄積に着目した。DASK1 Δ N によるメラニン蓄積は、ショウジョウバエのメラニン合成経路において必須の遺伝子である tyrosine hydroxylase (TH) の Dp38 経路依存的な発現誘導を介していることが示唆されている [1]。

また、ショウジョウバエが病原体に感染した時に TH を介してメラニンが合成され、病原体の隔離や、合成中間体の毒性による病原体の除去などが行われていることが知られている。少なくとも一部の病原体感染時も翻訳の抑制が起こっていることから、この翻訳抑制が脱アデニル化酵素を介して DASK1 を活性化し、TH の発現誘導を行っている可能性を検討した。S2 細胞に CHX を処理して TH の mRNA 発現量を確認して

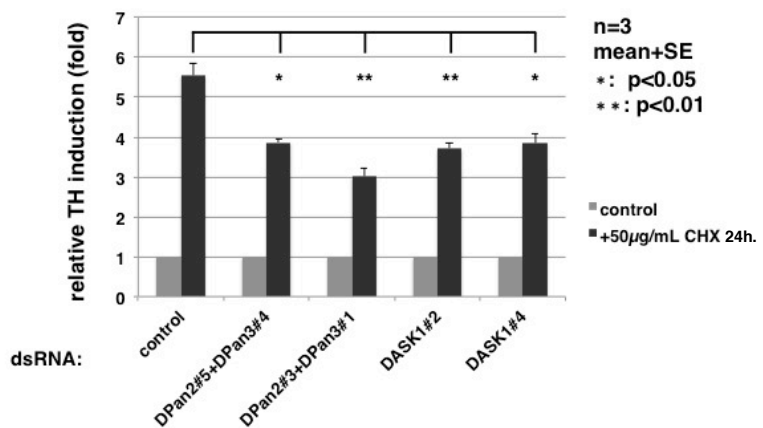


Fig. 5 DPan complexとDASK1はCHXによって誘導されるTHの発現上昇に必要である

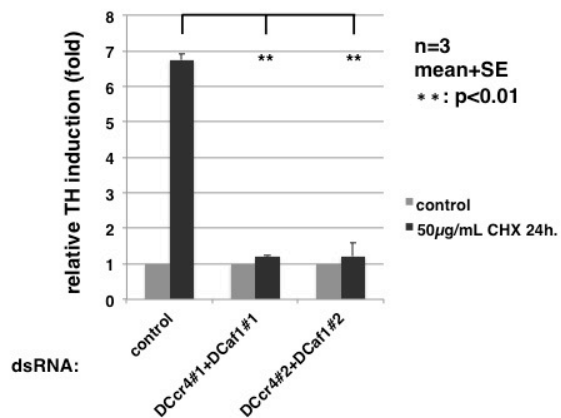


Fig. 6 DCcr4-Caf1 complexはCHXによって誘導されるTHの発現上昇に必要である

みたところ、刺激依存的に TH の発現の上昇が見られた。そこで各分子の TH 誘導に対する必要性を検討した結果、DASK1、DPan complex 及び DCcr4-Caf1 complex のいずれのノックダウンによっても CHX によって誘導される TH の発現が一部抑制されていた (Fig. 5, 6)。よって、翻訳抑制依存的な脱アデニル化酵素を介した DASK1 活性化は、TH の発現誘導に必要であることが示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私はショウジョウバエにおいて、脱アデニル化酵素である Pan complex と Ccr4-Caf1 complex が、翻訳抑制時に DASK1 を活性化し、TH の遺伝子発現を誘導するという可能性を示した。このことからショウジョウバエが病原体に感染した時に翻訳抑制が起こり、脱アデニル化酵素によって DASK1-TH 経路が活性化し、免疫応答を誘導していることが考えられる。今後はハエ個体を用いた感染実験等により、その可能性を検討していきたい。また、病原体感染以外にも翻訳抑制を引き起こすストレスは小胞体ストレスや酸化ストレスなど多々あるが、脱アデニル化酵素はそれら全ての下流で DASK1 を活性化するのか、それともストレス特異的なのかを見極めていきたい。

【参考文献】

1. Sekine, Y., S. Takagahara, R. Hatanaka, *et al.* 2011. *J Cell Sci.* 124:3006-3016.
2. Sekine, Y., R. Hatanaka, *et al.* 2012. *Mol Cell.* 48:692-704.
3. Funakoshi, Y., *et al.* 2007. *Genes Dev.* 21:3135-3148.
4. Lee, J.A., *et al.* 2008. *Oncogene.* 27:1297-1305.