

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 畑中 良

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- $\alpha$  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。そこで申請者は 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 $\Delta$ 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た。申請者はこの表現型を 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システムの探索を行った。同定したメラニン蓄積系統は、*kuma* (*key upswing in melanin accumulation*)系統と名付けられ、その中で申請者は *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 が新規 ASK1 活性化因子として同定された。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 を活性化することが示された。さらに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が申請者により明らかとなった。

### 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。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。そこで申請者は、Pan complex 同様に 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示された。

### **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、申請者は 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 DASK1 の活性化が検出された。そこで、申請者は 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。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。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。また、翻訳を抑制する生理的なストレスとして申請者は ASK1 を活性化するストレスとしてよく知られる過酸化水素に着目した。そして過酸化水素依存的な DASK1 の活性化に DPan complex が必要であるかの検討が行われ、DPan2 及び DPan3 いずれのノックダウンによっても DASK1 の活性化が減弱した。よって、翻訳阻害剤だけでなく、過酸化水素によって誘導される DASK1 の活性化にも DPan complex が必要であることが示唆された。

### **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、申請者はスクリーニング系で用いたメラニン蓄積に着目した。DASK1ΔN によるメラニン蓄積は、シ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。また、シ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申請者は検討した。S2 細胞に CHX を処理して TH の mRNA 発現量を確認した結果、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の検討が行われ、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 の発現が一部抑制していたことが示された。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。

本研究において、申請者は ASK1 活性化因子としての DPABP 結合因子群についての解析を行い、主に以下のことを明らかにした。

- mRNA の翻訳から Poly(A)鎖の分解の過程において PABP に結合する eRF3、Pan complex、Ccr4-Caf1 complex はシウジョウバエにおいても DPABP に結合し、かつ全て DASK1 を活性化する
- DPan complex と DCcr4-Caf1 complex はいずれも CHX などの翻訳阻害剤によって誘導される DASK1 の活性化に必要である

- DPan complex は過酸化水素依存的な DASK1 の活性化に必要である
- DASK1 と DPABP 結合因子群はいずれも CHX によって誘導される DTH の mRNA の発現上昇に必要である

これらの結果から、細胞にストレスが加わって翻訳が抑制された場合、翻訳装置上で DPABP 結合因子群がそのストレスを感知して DASK1 を活性化し、DTH の発現を誘導しているという可能性が示唆された。様々なストレスにより翻訳の抑制が起こることが知られているため、各種ストレスセンサーから翻訳抑制へとシグナルが集約された後に DASK1 経路を活性化させることは合理的であると言え、そこに意義が見出だせる。また創薬の点から考えても ASK1 活性化機構の解明は重要課題であり、その一端を担って翻訳阻害を引き金とする ASK1 活性化機構の存在を明らかにしたという意味でも博士の学位に十分値すると言える。