

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650004

研究課題名(和文) 哺乳類細胞の浸透圧応答の分子基盤解明を目指したゲノムワイドRNAiスクリーニング

研究課題名(英文) A genome-wide RNAi screening for clarifying the molecular mechanism of osmotic stress response in the mammalian cell

研究代表者

名黒 功 (Naguro, Isao)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80401222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が見出したASK3という浸透圧応答性キナーゼを手がかりに、哺乳類細胞が浸透圧ストレスを受容・伝達する分子メカニズムの解明を行った。ASK3制御分子のゲノムワイドsiRNAスクリーニングの結果から、低・高浸透圧ストレスがそれぞれ異なるシステムにより感知されることが示唆され、さらに高浸透圧ストレスについては、予想外の生体物質がシグナル伝達に關与する事を新たに見出した。

本研究で得られた結果をより深く解析することで、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答メカニズムの全貌を明らかにすると同時に、ASK3など浸透圧ストレス応答分子と関わりの深い個体の血圧制御メカニズムの理解にも繋げて行きたい。

研究成果の概要(英文)：We studied the molecular mechanism how mammalian cells sense and transduce osmotic stress information, using ASK3 as an original probe. According to the results obtained from genome-wide siRNA screenings for ASK3 regulators, it is suggested that hypo- and hyper-tonic stress are received by different system. Moreover, we found that an unexpected molecule is involved in the signal transduction of hypertonic stress.

Our results contribute to the comprehensive understanding of osmotic stress response in the mammalian cells and blood pressure regulation, which is closely related to the osmotic stress-responsive molecules such as ASK3.

研究分野：分子生物学

キーワード：ASK3 浸透圧 RNAiスクリーニング MAPK キナーゼ ハイコンテンツアナリシス

1. 研究開始当初の背景

生体は、外界から常に物理化学的ストレスを受けており、細胞レベルで適切な応答を示すことで個体レベルでの恒常性を維持している。本研究のテーマである浸透圧ストレスも、腎臓や胃、腸など水に接する部位では常に生じている。また、生活習慣病である高血圧、乳幼児や高齢者に多い高張性脱水など、様々な疾患においても浸透圧は変化する。よって、細胞の浸透圧ストレス認識機構の分子レベルでの解明は、科学の観点からのみならず、医療・創薬の観点からも重要な課題である。

細胞は物質の実体のない浸透圧ストレスを、イオンの流出入や細胞膜の張力変化といった形で認識していると考えられており、細菌や酵母、植物における認識機構は明らかにされつつある。しかし、哺乳類細胞においては、ストレス受容後のシグナル伝達に関連する分子についての報告はあるものの(Burg, M. B., *et al. Physiol. Rev.* 2007)、具体的な浸透圧センシングの分子機構は未解明である。

近年、我々が新規に同定した ASK3 は、以前同定した ASK1 と相同性の高いリン酸化酵素であり、胃や十二指腸、腎尿細管など、浸透圧変化の激しい部位に強く発現していた。興味深いことに、ASK3 は低浸透圧ストレスによってリン酸化され、そのキナーゼ活性が亢進するのに対し、高浸透圧ストレスによって脱リン酸化され、キナーゼ活性が減弱した(Naguro, I., *et al. Nat. Commun.* 2012)。この活性変化は数分以内という極めて迅速な応答であると同時に可逆的であったことを考慮すると、ASK3 は、哺乳類細胞の浸透圧ストレス認識機構において、浸透圧ストレスというシグナルをリン酸化シグナル伝達へと変換するコンバーターのような重要な役割を担っていると予想された。

そこで我々は、浸透圧ストレスにおける ASK3 活性変化の分子機構を解明するため、哺乳類細胞において、高浸透圧ストレス依存的な ASK3 不活性化を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った。その結果、ヒトの約 18,000 遺伝子ライブラリーから 63 個の候補遺伝子にまで絞り込んだ。本研究では、この中から真の ASK3 制御分子を同定することで、高浸透圧ストレスにおける ASK3 活性変化の分子機構を解明し、最終的には細胞の浸透圧ストレス認識機構を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

細胞の浸透圧ストレス応答の破綻は、高血圧症をはじめ体内水分量調節不全を原因とする病態の原因になることも知られており、生体の浸透圧認識機構を解明することは治療・創薬の観点からも重要な課題である。しかし、哺乳類細胞の浸透圧認識の分子機

構は未だ不明な点が多い。近年、我々が同定した ASK3 は、低・高浸透圧ストレスに対して、逆方向性に活性が変化する独特の応答をする。そのため ASK3 は浸透圧ストレス認識機構においてキファクターとなっている可能性が考えられた。また、ASK3 ノックアウトマウスは高血圧症を呈することも見出している。そこで本研究では、哺乳類細胞における ASK3 活性を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングによって得られた候補分子から、高浸透圧ストレス認識に必要な分子を同定し、哺乳類細胞の高浸透圧ストレスに対する細胞応答メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。最終的には、そのメカニズムをターゲットとした、高血圧症などの治療・創薬を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、哺乳類細胞の浸透圧ストレス認識機構の解明を究極的な目的としているが、そのアプローチとして、我々が新規に同定した ASK3 に着目し、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構を解明する。ASK3 に着目するのは、前述の通り、浸透圧ストレスを認識してリン酸化シグナル伝達へとつなげるコンバーターのような役割を ASK3 が担っていると期待されるからである。

高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構の解明にあたり、まずは制御分子を同定する必要がある。既に我々は、哺乳類細胞において、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を指標とした蛍光免疫染色による siRNA スクリーニング系を構築し、実際にゲノムワイドスケール(約 18,000 遺伝子)で一次スクリーニングを行った。そして、1 遺伝子に対して独立の 4 種類の配列を別々に検討する二次スクリーニングを行って、一次スクリーニングで得られた候補遺伝子の妥当性を検証した。その結果、最終的に 63 個の候補分子まで絞り込んでいた。我々のスクリーニング系はスクリーニングの精度と感度を表す統計的な指標である Z'-factor が 0.6 を超えており、検出精度・感度が高かったこと、また、ASK3 活性に影響の強かったある候補分子に関して先行して解析したところ、その分子の過剰発現によって高浸透圧下の ASK3 不活性化が亢進したことから、スクリーニングは妥当であったと示唆されていた。従って、この候補分子 63 個をさらに解析していく妥当性が十分あると考えられた。

本研究では、上記の候補分子 63 個からスタートし、候補分子の妥当性の検証から真の ASK3 制御分子の同定を行い、これらについて詳細な解析を進める。得られた制御分子と ASK3 の関係を分子レベルで明らかにし、高浸透圧ストレス認識に必要な分子の同定とその役割を明らかにし、哺乳類

細胞の高浸透圧ストレスに対する細胞応答メカニズムを分子レベルで解明する。

4. 研究成果

(1) 本研究のテーマである「哺乳類細胞の浸透圧応答の分子基盤解明を目指したゲノムワイド RNAi スクリーニング」の達成に向けて、初年度はスクリーニングにより既に得られている候補分子の解析を進めた。

我々が世界に先駆けて同定し、解析を進めている ASK3 の浸透圧依存的活性変化を指標にしたユニークなスクリーニングにより、これまでに哺乳類細胞において高浸透圧応答に関わると考えられるタンパクが複数得られている。この得られたタンパクのうち、ASK3 の脱リン酸化を担うフォスファターゼに着目して解析を行った。

まず、このフォスファターゼが直接 ASK3 を脱リン酸化するかについて確認をした上で、どのようにして高浸透圧というストレス時に ASK3 の脱リン酸化を促進するかについて解析した。生化学的、分子生物学的解析の結果、高浸透圧ストレスによりこのフォスファターゼと ASK3 の結合が強くなることを突き止め、高浸透圧特異的な ASK3 脱リン酸化のメカニズムの一端を明らかにした。また、この結合促進は ASK3 のファミリー分子である ASK1 では観察されず、ASK1 と ASK3 の高浸透圧ストレス応答性の違いを説明する手がかりになるかもしれない。既に高浸透圧時に ASK3 が制御することが分かっている WNK1-SPAK/OSR1 経路に対して、このフォスファターゼの欠損も影響を与えることが確かめられ、このフォスファターゼが高浸透圧時のシグナル伝達に関わることを明らかにした。

(2) 最終年度では、上記のフォスファターゼに関する結果に加え、特にゲノムワイド siRNA スクリーニングにより得られた制御分子間の関係性に注目することで、浸透圧ストレスがどのようにして細胞に感知され、シグナル伝達を経た後 ASK3 活性変化につながるかという点に焦点を当てた。

スクリーニングで得られた高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に関与する候補分子のうち、前年度までに関与を明らかにしたフォスファターゼとは別の制御分子に着目して解析を行ったところ、この分子が、生体内低分子化合物の産生を介して ASK3 の活性を制御する事を明らかにした。また、この生体内低分子化合物は ASK3 とフォスファターゼの相互作用を促進する働きを持つことも明らかにした。このような生体内物質が浸透圧ストレス応答に関与する知見は全く知られておらず、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答の新たなメカニズムを明らかにする手がかりを得た。

また、予定していた高浸透圧ストレスに

よる不活性化だけでなく、低浸透圧ストレスによる ASK3 活性化を担う分子群を同定するゲノムワイド siRNA スクリーニングも完遂し、候補分子を同定した。この分子群は高浸透圧ストレスにおける ASK3 制御因子とは全く異なる分子群であり、高・低浸透圧でそれぞれ異なる制御機構で ASK3 活性が制御されていることが示唆された。

初年度を含め、本研究により明らかにした浸透圧ストレス応答において ASK3 を制御する分子群は、未だ明らかになっていない哺乳類細胞がどのような分子メカニズムで環境の浸透圧を感知し、応答するかという問題に対して、新規の具体的な手がかりを与えるものとして意義深い。未だ、スクリーニングで得られた候補分子全体の解析は完遂していないが、今後解析を継続することで、候補分子群の互いの関係性も明らかになり、ASK3 を介する浸透圧ストレス応答を司るシグナル伝達の分子ネットワークの全貌を明らかにできると考えている。このような結果を踏まえて、今後、細胞が浸透圧を感知する際に始めに応答する分子、つまり浸透圧センサーの同定とその浸透圧感知メカニズムの解明を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Kamiyama, M., Naguro, I. and Ichijo, H. In vivo gene manipulation reveals the impact of stress-responsive MAPK pathways on tumor progression. *Cancer Sci.*, in press (2015). 査読あり
doi: 10.1111/cas.12676.
2. Watanabe, T., Sekine, S., Naguro, I., Sekine, Y. and Ichijo, H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. *J. Biol. Chem.*, 290, 10791-10803 (2015). 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M114.623280.
3. Mosallanejad, K., Sekine, Y., Ishikura-Kinoshita, S., Kumagai, K., Nagano, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Naguro, I. and Ichijo, H. The DEAH-box RNA helicase DHX15 activates NF- κ B and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses. *Sci. Signal.*, 7, ra40 (2014). 査読あり
doi: 10.1126/scisignal.2004841.

4. Kawarazaki, Y., Ichijo, H. and **Naguro I.** Apoptosis signal-regulating kinase 1 as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets*, 18, 651-664 (2014). 査読あり
doi: 10.1517/14728222.2014.896903.
5. Maruyama, T., Arakai, T., Kawarazaki, Y., **Naguro, I.**, Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. *Sci. Signal.*, 7, ra8 (2014). 査読あり
doi: 10.1126/scisignal.2004822.
6. Homma, K., Fujisawa, T., Tsuburaya, N., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Takeda, K., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., **Naguro, I.** and Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol. Cell*, 52, 75-86 (2013). 査読あり
doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.038.
7. Shiizaki, S., **Naguro, I.** and Ichijo, H. Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv. Biol. Regul.*, 53, 135-144 (2013). 査読あり
doi: 10.1016/j.jbior.2012.09.006.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 名黒 功、一條 秀憲 ストレス応答性キナーゼASKファミリータンパク質の疾患への関わりと活性制御機構
第87回日本生化学会大会 2014年10月18日(京都)
2. Isao Naguro, Miki Kamiyama, Hidenori Ichijo Oxidative stress-activated kinase ASK1 is involved in the tumorigenesis and tumor metastasis.
Gordon Research Conference
Tiol-Based Redox Regulation & Singaling 2014年7月20-25日(Girona, Spain)
3. 名黒 功、一條 秀憲 浸透圧ストレスに応答するキナーゼASK3を介する細胞体積と血圧の調節
第36回日本分子生物学会年会 2014年12月3-6日(神戸)
4. Naguro, Kengo Watanabe, Hidenori Ichijo. Genome-wide siRNA screening for regulators of the osmotic stress-responsive kinase

Discovery on Target Functional Genomics Screening Strategies 2013年9月23-26日(Boston, U.S.A)

5. 名黒 功、一條 秀憲 浸透圧ストレスに両方向性に応答するASK3の役割
第86回日本生化学会大会 2013年9月11日(横浜市)

〔その他〕
ホームページ等
東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室
(<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
名黒 功 (Isao Naguro)
東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室・講師
研究者番号: 80401222