

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790078

研究課題名（和文）ASK3を手がかりとした浸透圧受容、応答メカニズムの解析

研究課題名（英文）The analysis of cellular osmotic stress sensing and response by focusing on ASK3

研究代表者 名黒 功（NAGURO ISAO）

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：80401222

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では ASK3 という浸透圧ストレスに応答する分子に焦点を当て、生体がどのようにして外界の浸透圧ストレスを受容し応答するかについて解析を行った。ASK3 の応答を指標にした ASK3 制御因子の探索から、浸透圧受容に関わる新たなタンパク質を複数同定下と共に、ASK3 の働きを解析することで、このタンパク質が個体レベルの血圧制御に関与することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In our project, we focused on an osmotic stress-responsive kinase ASK3 to investigate how organisms sense and respond to the stress. We performed a screening for the regulator of ASK3 upon osmotic stress, and found several proteins that are involved in the osmotic stress response in the cells. Furthermore, we identified that ASK3 is involved in the control of systemic blood pressure.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ストレス応答、RNAi スクリーニング、浸透圧ストレス、ASK3

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む生物は紫外線、重力など物理的な力、温度変化、浸透圧変化、化学物質など常に生活環境から様々な物理化学的ストレス（環境の変動）を受けているが、これらのストレスに適切に応答するメカニズムを有することで環境変化に適応し、生存を可能にして

いる。近年の研究から、これらのストレス応答メカニズムの破綻はがん、高血圧、糖尿病など環境因子を重要な要因とする様々な病気の原因になることが明らかにされており、生体の物理化学的ストレスに対する受容、応答メカニズムの詳細な理解は、基礎生物学的な観点だけでなく、現代においても治療が重要

な課題となっている病態の理解、治療方針の分子基盤に新たな切り口を与えるという点で、医学、薬学的にも重要な研究課題である。しかしながら、生体の物理化学的ストレスの受容、応答メカニズムについては未だ多くの謎が残されている。例えば、インスリンなどある種のホルモンや神経伝達物質は細胞表面における特異的な受容体と結合しリガンド-受容体の物質的な結合により情報を伝えるのに対し、重力や熱、浸透圧など物理化学的ストレスはリガンドと呼べる物質的な存在がなく、細胞のどこでどのような分子（センサー）が環境変化を受容し、応答メカニズムをスタートさせているかについて現在も精力的に研究が行われている。物理化学的ストレスのセンサー分子の同定は、これまで細胞レベルのシグナル伝達研究で常套手段として行われてきた、リガンドとの物質的な結合を手がかりにできない。この問題にアプローチするためには、センサー分子の探索において情報の流れとして上流の因子（リガンドなど）を頼りに探索するのではなく、下流の変化（細胞応答）をアウトプットとした機能的な探索などが必要となると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が世界に先駆けて解析を行っている ASK3 というキナーゼに焦点をあて、細胞内シグナル伝達経路を解析することで、未だに十分理解されていない、生体の物理化学的ストレスに対する受容、応答メカニズムを解き明かすことである。これまでの研究で ASK3 は特に浸透圧ストレスに対し非常にユニークな活性変化を示すことを明らかにしている。浸透圧ストレスがどのような分子機構で ASK3 の活性変化につながるのか、特にストレスを直接感知するセンサー分子の同定を念頭に解析を行う。また浸透圧スト

レス応答において ASK3 がどのような役割を担うかについての解析も行うこととした。

## 3. 研究の方法

本研究では ASK3 という我々が世界に先駆けて解析を行っているキナーゼを手がかりに、物理化学的ストレスの一つ、浸透圧ストレスに関して細胞レベルの受容、応答の分子メカニズムの解析と、そのシグナル伝達経路が担う生理応答の解析を行う。

**(1)浸透圧受容メカニズムの分子基盤の同定**では、ASK3 の特徴的な浸透圧応答をアウトプットの指標とし、細胞イメージングと High-content analysis (HCA) を組み合わせた全ゲノムスケールの RNAi スクリーニングを行った。このスクリーニングでは、解析対象は個々の細胞の蛍光強度でありながら、例数として数千から数万の細胞の情報を短時間で自動的に得られるため、その平均値は信頼性の高い統計量となる。個々の siRNA を処置した細胞の各ウェルから細胞免疫染色のデータを客観性の高い統計量として自動的に取り出し、浸透圧ストレスによる ASK3 の活性変化が失われる siRNA を探索することで、浸透圧センサーを含む ASK3 の上流分子群を同定した。

**(2)ASK3 のリン酸化基質分子の解析**では、これまで明らかにしてきた WNK-SPAK/OSR1 経路および p38 MAPK 経路における ASK3 の役割、およびその制御の生理的意義を生化学的、細胞生物学的手法により解析した。特に WNK1-SPAK/OSR1 経路における ASK3 の役割については、ASK3 のファミリー分子である ASK1、ASK2 との比較を行い、ASK3 の特異性について検討した。

**(3)ASK3 の生理的役割の解析**では、我々が作製した ASK3 ノックアウトマウスの解析を中心に、個体レベルで ASK3 が担う役割の解

析を行った。特に、ASK3 が腎臓に多く発現することや、WNK1 と関連することから、ASK3 KO の全身血圧を測定し、WNK1 変異体と同様に高血圧傾向にあるかについて詳細に検討した。同時に ASK3 KO マウスの腎臓の機能にも注目し、水やイオンの再吸収などに欠陥がある可能性を考慮し、血漿の各種イオン濃度、クレアチニン濃度の測定など腎機能の解析を行った。

#### 4. 研究成果

我々は以前、腎臓に多く発現する ASK3 というタンパク質が、浸透圧変化に対して感度よく、精密に応答し、浸透圧変化の際に必要な情報伝達を担っていることを明らかにした。ASK3 は低浸透圧ストレスにより活性化、高浸透圧ストレスにより不活性化する。本研究では、この分子の浸透圧ストレス依存的な活性変化を指標として、全ゲノムワイドスケール (~18,000 遺伝子) で siRNA スクリーニングを行ったところ、高浸透圧ストレスにおいて ASK3 の不活性化 (脱リン酸化) を制御するタンパク質を新たに複数同定することに成功した。これらのタンパク質はこれまで浸透圧ストレスと関連が全く知られていないものが多く、浸透圧ストレスという物理化学的ストレスを、細胞がどのようなタンパク質分子を使って受容しているかについて新しい知見を得た。今後、同様のスクリーニングにより、低浸透圧ストレス受容に関与するタンパク質分子も同定し、それぞれの相互関係を明らかにすることで、生体の浸透圧ストレス応答がどのようなシグナル伝達ネットワークによって形成されているかについて明らかにできると考えられる。

本研究ではさらに、この浸透圧ストレス応答分子である ASK3 が、生体においてどのような役割を果たすかについて解析を行った。

具体的には、ASK3 が遺伝性高血圧症の原因電子である WNK1 と結合するという我々の知見から、ASK3 と WNK1 の関係を解析したところ、ASK3 が WNK1 の上流で抑制因子として働き、腎臓における WNK1-SPAK/OSR1 シグナル経路のネガティブレギュレーターであることを明らかにした。さらに、ASK3 を失ったマウスでは、年齢とともに高血圧傾向を呈することを明らかにし、また ASK3 KO マウスが普通のマウスでは血圧に変化が見られない程度の高食塩食で高血圧になることを明らかにした。これは、ASK3 KO マウスでは、WNK1 のネガティブレギュレーターが失われ、遺伝性高血圧症につながる WNK1 変異で観察されるものと同様に、腎臓における NaCl 取り込みが過剰になっていることが原因であることが示唆された。これにより、ASK3 が腎臓で働き、体内のイオンバランスの調節をすることで、血圧コントロールに働いていることを世界で初めて提唱した。本研究成果により、浸透圧変化に対する新たな応答システムが明らかになり、それが体内の水とイオンバランスの調整を介して血圧制御などに働いていることが示唆された。この新たなシステムをターゲットとすることで、高血圧や浮腫など体内水分量の異常を原因とするヒトの疾患に対する治療薬開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計4件) 全て査読有

1. 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.**, (review article), 53, 135-144 (2013).  
doi: 10.1016/j.bior.2012.09.006
2. Fujisawa, T., Homma, K., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Tsuburaya, N., **Naguro, I.**, Matsuzawa, A., Takeda, K., Takahashi, Y., Goto, J., Tsuji, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H. A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants.  
**Ann. Neurol.**, 72, 739-749 (2012).  
doi:10.1002/ana.23668.
3. **Naguro, I.**, Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney.  
**Nat. Commun.**, 3, 1285 (2012).  
doi: 10.1038/ncomms2283
4. Sekine, Y., Takagahara, S., Hatanaka, R., Watanabe, T., Oguchi, H., Noguchi, T., **Naguro, I.**, Kobayashi, K., Tsunoda, M., Funatsu, T., Nomura, H., Toyoda, T., Matsuki, N., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K., and Ichijo, H. p38 MAP kinase regulates the expression of genes in the dopamine synthesis pathway through phosphorylation of NR4A nuclear receptors.  
**J. Cell Sci.** 124, 3006-3016 (2011).  
doi: 10.1242/jcs.085902

〔学会発表〕(計5件)

1. **名黒 功**、一條 秀憲, 浸透圧ストレス応答のシグナリング, 第3回シグナルネットワーク研究会, H23.5.27-28, 東京.
2. **名黒 功**、一條秀憲, ASK3の浸透圧ストレス応答と WNK1-SPAK/OSR1 経路の制御, 第84回日本生化学会大会, H23.9.21-24, 京都.
3. **Naguro, I.**, Ichijo, H., The role of an osmotic stress-responsive kinase ASK3 and an approach to the molecular mechanism of the

cellular osmo-sensing, 第34回日本分子生物学会年会, H23.12.13-16, 横浜.

4. **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 による WNK1-SPAK/OSR1 経路の制御, 第85回日本生化学会大会, H24.12.14-16, 福岡.
5. **名黒 功**、一條 秀憲, 浸透圧応答性キナーゼ ASK3 の HaloTag テクノロジーを利用した結合分子探索, 第7回メカノセンシング研究会, H25.3.7, 札幌.

〔その他〕

Fujisawa et al. **Ann. Neurol.** の紹介

• **Nature Reviews Neurology** 8, 414 (2012) の RESEARCH HIGHLIGHTS で Common conformational change identified in toxic SOD1 mutants—a novel diagnostic marker for ALS として紹介された。

• 2012.8.23 化学工業日報「ALS発症機構を解明—変異たん白が神経死関与—」

Naguro et al. **Nat. Commun.** の紹介

• **F1000 Prime** Article Recommendations (by Chou-Long Huang) に紹介された。

• **Renin Academy Japan Online** トピックスとして紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名黒 功 (NAGURO ISAO)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号: 80401222