

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790058
研究課題名（和文）
新規に同定したキナーゼ（ASK3）を中心とした浸透圧ストレス応答メカニズムの解明
研究課題名（英文）
The analysis of cellular osmotic stress response focusing on a novel kinase ASK3
研究代表者
名黒 功 （NAGURO ISAO）
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：80401222

研究成果の概要（和文）：

我々が新たに同定した ASK3 というキナーゼが細胞レベルで浸透圧の変化に対し応答し、活性を変化させることを明らかにした。その活性変化がどのような分子メカニズムによってなされるか詳細に検討し、生体の水とイオンの恒常性、その中でも特に血圧調節に ASK3 が重要な働きをしている可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：

We found that ASK3 responds to osmotic stress in the cell and alters its kinase activity by the osmotic change. We investigated the molecular mechanism how ASK3 alters the kinase activity and we suggested that ASK3 may play an important role in water and ion regulation, especially in blood pressure regulation of the body.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ストレス応答性、浸透圧、細胞内情報伝達、リン酸化酵素、MAPK、ASK3

1. 研究開始当初の背景

生体は環境から重力、紫外線、熱、浸透圧など様々な物理化学的ストレスを受けており、それらに対する的確な応答機能の破綻はがんをはじめとする様々な疾患の原因となる。しかし、これまでこのようなストレスがどのようにして細胞レベルで感受され、適切な応答につながっているかについては未解明な部分が非常に多く残されている。特に、ストレスの感知と情報の伝達には細胞内のタンパクが重要な役割を担っていると考えられているが、具体的にどのような分子が働いているか、同定を含めた解析が待たれている。

これらのストレスのうち、浸透圧ストレスは生体に必須の水とイオンのバランスが変化することを意味しており、浸透圧の恒常性が乱れることは即座に個体の命を脅かすことになる。従って、細菌からヒトにいたるまで生物は浸透圧ストレスに応答するメカニズムを細胞レベルで備えているが、特に哺乳類など高等動物の細胞ではどのような分子メカニズムで浸透圧ストレス応答が達成されているか不明な点が残されている。この分子メカニズムの解明は脱水や浮腫、体液バランスの不全など、水の関わる病態の原因の解明と治療方針策定の手がかりになると考えられる。

この問題について、最近我々が同定したASK3というキナーゼが浸透圧ストレスに応答することが明らかになったため、この分子を中心に詳細に解析することで浸透圧ストレス応答の分子メカニズムの一端を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、最近我々が同定した浸透圧応答性のASK3という分子を手がかりにし、未だ分子メカニズムの明らかになっていない浸透圧ストレス応答について分子生物学的なレベルまで踏み込んだ解析を目指すものである。

具体的には

(1) ASK3 がどのようにして浸透圧変化を感知しているか。

(2) ASK3 の浸透圧応答性が細胞レベル、個体レベルでどのような役割を担っているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究ではASK3が低浸透圧では活性化、高浸透圧では不活性化するキナーゼ（リン酸化酵素）であることをふまえ、それぞれの浸透圧ストレスによるASK3の活性変化を担う分子群、およびASK3によるリン酸化を介する制御を受ける分子群を探索した。

ASK3に結合するタンパクの同定を目的に、yeast two-hybridスクリーニングおよび、浸透圧刺激を行った細胞からのASK3 pull downを行った。これによって得られた結合タンパクを解析し、浸透圧ストレス応答のシグナル伝達においてASK3の上流でキナーゼ活性に影響を与える分子、または逆にASK3の下流で制御を受ける分子に分けて解析を行った。

ASK3が細胞レベル、個体レベルでどのような役割を担うかについて、細胞レベルでは浸透圧ストレスによって変化する細胞内のイオン濃度を検出し、ASK3を失わせた細胞でその変化がどのように違ってくるかの解析を行った。個体レベルの役割については、ASK3

ノックアウトマウスの作製を行い、特に浸透圧応答性という視点から水やイオンの関与する体液や血圧、尿量の変化などについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ASK3 は浸透圧に応答してキナーゼ活性を変化させることを明らかにしていたが、より詳細に解析を行うことで、低浸透圧での活性化、高浸透圧での不活性化それぞれが数分以内に起こる非常に早い応答であること、および活性変化に必要な浸透圧変化は ~ 20 mOsm 程度で十分であることを明らかにした。このことは ASK3 が生体内で起こりうるわずかな浸透圧変化に素早く応答することを意味しており、生体の浸透圧ストレス応答にとって重要な役割を担っていることを示唆している。

(2) ASK3 の体内における発現臓器の解析を行い腎臓に多く発現していることを見出した。腎臓は尿の組成調節を介して脊椎動物の水とイオンの恒常性を保つために重要な臓器であり、また個体において最も浸透圧の大きな変化が起こりうる場所でもある。ASK3 が腎臓の尿細管上皮細胞に発現していたことから、腎臓の尿組成の調節に関わることが想定され、ASK3 が細胞レベルのみならず、個体レベルの浸透圧ストレス応答で重要な役割を担っていることが想定された。

(3) Yeast two-hybrid スクリーニングの結果から数多くの ASK3 結合分子を同定したが、そのうちの一つに Tyr キナーゼが見出された。この Tyr キナーゼは ASK3 をリン酸化することを明らかにし、また共発現させると ASK3 の活性を抑制したことから、ASK3 の制御分子として考えることができた。今後この分子を

ASK3 の上流因子としてとらえ、浸透圧応答性などを解析することで高浸透圧における ASK3 の不活性化を制御する分子メカニズムの解明を目指す。

(4) 同様に yeast two-hybrid スクリーニングで得られた結合分子に腎臓に多く発現し、遺伝性高血圧症の原因となるタンパクがあり、この分子は ASK3 によって活性が制御されることを明らかにした。その制御は ASK3 のキナーゼ活性依存的であることから浸透圧に応答して活性変化した ASK3 の下流で制御されていると考えられる。この分子を制御する分子機構については未だ世界的にも知られておらず、本研究の結果はこの分子が原因となる高血圧症の理解に非常に重要であると考えられる。また、この結果は ASK3 が個体の血圧制御に関与する可能性を示唆している。

(5) このことと関係して ASK3 ノックアウトマウスの解析において、ASK3 を欠損したマウスでは高血圧傾向にあることを明らかにした。通常環境で飼育した ASK3 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて週齢と共に血圧が上昇した。また、食餌により食塩負荷を行った場合、野生型では血圧にほぼ変化の無い状態で、ASK3 ノックアウトマウスは有為な血圧上昇を示した。これらのことから ASK3 が個体の血圧制御に関与することが *in vivo* の実験からも明らかになった。特に食塩負荷による影響が見られたことから、やはり腎臓における水とイオンの制御に関して ASK3 が重要な役割を担っていることが想定された。今後は、ASK3 が具体的にどのようなメカニズムにより血圧制御に関わるか、先の高血圧症の原因遺伝子でもある結合分子の制御機構などと共に解析することで、これま

で原因の分かっていなかった種類の高血圧症の病態の理解や治療が可能になる可能性がある。

以上の結果は我々が世界に先駆けて同定した ASK3 という新規分子を中心に解析を行い得られた結果であり新規性および独自性が非常に高いものである。ASK3 は腎臓以外にも発現しており、今回得られた結果の他にも個体レベルで重要な働きを担っている可能性がある。今後は結合分子のスクリーニングで得られた他の分子と ASK3 の関係なども解析することで、ASK3 がどのように浸透圧変化を感知し、活性を変化させるのかについての詳細な分子メカニズムの解析に踏み込んでいきたい。また、浸透圧ストレスは細胞体積の変化を伴うことから、細胞体積の調節機構とも密接な関係にあり、ASK3 が細胞体積の調節機構を制御している可能性も考えられ、解析すべき重要なポイントであると考えている。このように浸透圧ストレスにおける ASK3 の解析を行い、その結果を手がかりにすることで、これまで明らかにされていなかった浸透圧ストレス応答の生理学的、病態生理学的な理解を深めていけると考えている。

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. Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. and Ichijo, H. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. **EMBO J.**, in press.
2. Shimizu, Y., Naguro, I., Nishitoh, H. and Ichijo, H. ER stress-induced cell death and inflammatory signaling: a therapeutic insight into intractable diseases. **Endoplasmic Reticulum Stress and Human Disease**, (review article), in press.

3. Hattori, K., Naguro, I., Runchel, C. and Ichijo, H. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. **Cell Communication and Signaling**, (review article), 7, 9 (2009).
4. Maruyama, J., Naguro, I., Takeda, K. and Ichijo, H. Stress-Activated MAP Kinase Cascades in Cellular Senescence. **Curr. Med. Chem.** (review article), 16, 1229-1235 (2009).
5. Iriyama, T., Takeda, K., Nakamura, H., Morimoto, Y., Kuroiwa, T., Mizukami, J., Umeda, T., Noguchi, T., Naguro, I., Nishitoh, H., Saegusa, K., Tobiume, K., Homma, T., Shimada, Y., Tsuda, H., Aiko, S., Imoto, I., Inazawa, J., Chida, K., Kamei, Y., Kozuma, S., Taketani, Y., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. **EMBO J.**, 28, 843-853 (2009).
6. Noguchi, T., Ishii, K., Fukutomi, H., Naguro, I., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAP kinase pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. **J. Biol. Chem.**, 283, 7657-7665 (2008).
7. Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I. and Ichijo, H. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) in stress and immune response. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, (review article), 48, 199-225 (2008).

[学会発表] (計 20 件)

1. 名黒 功, 梅田 剛, 丸山順一, 武田弘資, 一條秀憲: ASK3 は浸透圧ストレスに両方向性に応答し WNK1-SPAK/OSR1 経路の抑制因子として働く, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.9-12, 横浜.
2. Naguro, I., Umeda, T., Maruyama, J., Ichijo, H.: ASK3 bidirectionally responds to osmotic stress and negatively regulates WNK1-SPAK/OSR1 pathway, The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.6-9, 札幌.
3. Naguro, I., Shimizu, Y., Umeda, T., Maruyama, J. and Ichijo, H.: ASK3, a novel ASK family kinase, bidirectionally responds to osmotic

stress and negatively regulates WNK1-SPAK/OSR1 pathway, Gordon Research Conferences -Cellular Osmoregulation & Mechanotransduction-, 2009.7.5-10, USA.

4. 名黒功、橋本淳、梅田剛、武田弘資、一條秀憲: 新規 MAP3K である ASK3 の浸透圧ストレス応答における WNK-SPAK/OSR1 シグナル伝達経路の制御, BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9-12, 神戸.
5. Naguro, I.,: ASK family kinases regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis, Gordon Research Conferences, 2008.6.15-20, USA.

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・助教

研究者番号: 80401222