〔別紙２〕

審　査　の　結　果　の　要　旨

氏　名　曽我　真弓

ストレス応答性リン酸化酵素であるASK1は様々な組織･細胞種に普遍的に発現し、それぞれの場所や場面に応じて適切なストレス応答を誘導することが知られている。申請者の所属する研究室では近年、脂肪組織におけるASK1の機能に着目した研究が精力的に行われており、その結果、褐色脂肪組織において熱産生をはじめとした代謝応答にASK1が関与することが明らかとなった。しかしながら、脂肪組織におけるASK1機能の詳細なメカニズムには不明な点が多く残されており、その解明が待たれていた。

ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた解析から、ASK1は非常に大きな複合体を形成していることが分かっている。一般にシグナル伝達分子及びその活性を制御する因子はシグナル経路特異的な複合体を形成することで、特異的なシグナルを素早く制御することを可能にしている。このことから、ASK1 複合体内に含まれる結合因子には、各種特異的なASK1シグナルに関する未知の鍵分子が内包されていることが期待される。しかしながら、これまでに細胞種･組織特異的なASK1複合体を精製する試みは行われてこなかった。また、これまでに行われきたASK1結合因子の解析は過剰発現したASK1を用いたものであったため、非特異的な結合分子が同定され得るといった問題点が存在した。そこで申請者は初代培養褐色脂肪細胞より内在性ASK1複合体を精製し、複合体構成因子を同定することでASK1機能の解明を試みた。

長年、特異的かつ高効率に内在性ASK1複合体を精製する技術は存在しなかったが、申請者の所属する研究室において近年、内在性のリン酸化酵素を精製する系として新規ケミカルプルダウン法が構築された。

リン酸化酵素のATP結合部位にはゲートキーパー領域などが存在するため、1NA-PP1のような”かさ高い”ATPアナログは侵入することが出来ない。しかしながら、ゲートキーパー領域などに変異を加えることで 1NA-PP1 が侵入することが可能となることが知られている。このような変異を加えたリン酸化酵素を Analog-sensitive (as) 型リン酸化酵素とよび、as型に変異させたASK1 (as-ASK1) をノックインしたマウスが既に存在していた。新規ケミカルプルダウン法は as-ASK1 ノックインマウス由来の初代培養細胞や組織を用いて、1NA-PP1 を結合させた担体により細胞内から as-ASK1 を精製する。本ケミカルプルダウン法において1NA-PP1は野生型リン酸化酵素のATP結合部位に結合することが出来ないため、as型に改変されたASK1のみを特異的に精製することが可能である。実際に本ケミカルプルダウン法を用いることで ASK1 を精製することが可能なことがある種の細胞においては確かめられているが、様々な初代培養細胞で複合体を精製することが可能かに関しては不明であった。

そこで申請者は新規ケミカルプルダウン法により初代培養細胞褐色脂肪から内在性ASK1複合体を精製し、複合体構成因子を同定することで褐色脂肪細胞におけるASK1の詳細な機能解析を行うと共に、新規ケミカルプルダウン法の有用性を示すことを目的として本研究を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとなった。

1. 新規ケミカルプルダウン法を用いて初代培養褐色脂肪細胞より ASK1 複合体を精製することが可能である

2. 新規ケミカルプルダウン法によって、新規 ASK1 結合因子として RIPK2 を同定した

3. ASK1 は NOD1-RIPK2-NF κ B 経路を TAK1 の活性化を阻害することで抑制的に制御することが示唆された

4. ASK1 は RIPK2 と TAK1 の結合を阻害することで、TAK1 の活性化を阻害していることが示唆された

5. 初代培養褐色脂肪細胞において ASK1 は NOD1-RIPK2-NFκB 経路を抑制的に制御することで、炎症性サイトカイン産生を抑制的に制御することが示唆された

過去の報告から ASK1 は、樹状細胞において TLR4 アゴニストである LPS 刺激依存的な炎症性サイトカイン産生に寄与することが報告されている。刺激の種類によっては ASK1 が炎症性サイトカイン産生に対して抑制的に機能する可能性を示唆したものは本研究が初めてである。また、本研究ではその詳細なメカニズムとして ASK1-RIPK2 の結合による TAK1-RIPK2 の結合阻害が関与することを示している。この ASK1 の機能はこれまでに知られていた MAP3K としての機能と異なる機能であり、本研究は新規の ASK1 機能を明らかにしたと言える。

過去の報告において ASK1 欠損マウスに高脂肪食負荷を行うと、耐糖能が悪化することが示されている。脂肪組織における炎症が耐糖能の獲得に寄与していることを鑑みると、本研究で明らかにした ASK1 による炎症性サイトカイン産生の抑制メカニズムがこの表現型に関与する可能性が考えられる。また、ASK1 を介して脂肪炎症を制御することが可能となれば、肥満病態改善を目的とした創薬のターゲットとなり得る。

また、本研究では新規ケミカルプルダウン法を用いて初代培養細胞より内在性の ASK1 複合体を精製し、複合体構成因子を同定することで、ASK1 の新規機能解明へと繋げている。このことから、本研究は新規ケミカルプルダウン法が初代培養細胞からリン酸化酵素複合体を精製し、新規機能を解明する手法として有用であることを初めて示したものである。本精製法は ATP 結合部位を持つタンパク質であれば同様に用いることが可能な実験系であると考えられることから、ATP 結合部位を持つあらゆるタンパク質の機能を解析する新たな手法として提示できるという点においても意義深い研究である。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。