

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 丹羽 國祥

細胞体積調節は、細胞の恒常性維持に必須の構成要素である。細胞内外の浸透圧変化による細胞体積の膨張や収縮は、細胞内や細胞間のシグナル伝達に影響を及ぼす。そのため、細胞は細胞体積変化を迅速に相殺する防御機構を有しており、自身の細胞体積を環境に合わせて適切に調節している。低浸透圧環境などが引き起こす細胞膨張時において、膨張した細胞は **regulatory volume decrease (RVD)** 機構を誘導することで元の細胞体積に戻す。これまでに **RVD** 機構の基盤は、細胞膜上のイオンチャネルやイオントランスポーターの活性化を介した、細胞外へのイオンやタウリンなどの放出によることが明らかになっている。また、**RVD** 機構は細胞体積の回復だけでなく、様々な生理現象に関与することが提唱されている。具体的には、炎症や神経の興奮性、そして細胞死と言った様々な生理現象への関与が報告されている。そのため、**RVD** 機構は細胞・個体にとって極めて重要であると考えられるが、細胞膨張の認識からエフェクター分子に至るまでのシグナル伝達経路についてはほとんど不明である。

当研究室で同定された **Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)** は腎臓に顕著に発現し、腎臓において血圧制御に関与する分子である。一方、細胞において **ASK3** は低浸透圧時に活性化し、逆に高浸透圧時に不活性化するという両方向性の浸透圧応答を示す。また、**ASK3** は浸透圧応答に重要な **WNK1-SPAK/OSR1** 経路の上流に位置し、キナーゼ活性依存的にこの経路を負に制御することが明らかになっている。これまでに、**WNK1-SPAK/OSR1** 経路は **KCC** や **NKCC** といったイオントランスポーターの活性を制御することで、細胞体積調節機構に関与することが報告されている。そのため、**ASK3** は **WNK1-SPAK/OSR1** 経路を介して細胞体積調節機構に関与している可能性が推測された。しかし、これまでに細胞体積調節機構における **ASK3** の必要性やエフェクター分子に対する影響は検証されておらず、細胞における **ASK3** の生理的役割は不明であった。

以上の研究背景を踏まえ、本研究では細胞における **ASK3** の生理的意義の解明及び **ASK3** の低浸透圧時における活性化機構の解明を目的として行われた。具体的には、**RVD** 機構のエフェクター分子である **volume-regulated anion channel (VRAC)** の活性を評価する実験系や細胞体積測定系を構築し、**ASK3** の細胞体積調節機構への関与を評価した。また、**ASK3** の低浸透圧依存的な活性化を指標にしたゲノムワイド **siRNA** スクリーニングにより、**ASK3** の活性化制御分子を同定した。

以下は、本研究によって新たに得られた主要な知見である。

1. RVD エフェクター分子 VRAC の活性化に ASK3 は必要である
2. ASK3 は低浸透圧誘導性 RVD 機構に寄与する
3. ゲノムワイド siRNA スクリーニングによる ASK3 の低浸透圧依存的な活性化制御分子として metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) を同定
4. mGluR5 の活性化は ASK を活性化させる
5. mGluR5 は低浸透圧時に活性化する

本研究によって、ASK3 の細胞における生理学的意義は、低浸透圧時に VRAC を活性化し、RVD を誘導することであることが明らかになった。また、ASK3 は WNK1-SPAK/OSR1 経路も制御することから、ASK3 は主要な RVD エフェクター分子である VRAC 及び KCC の両方の活性を調節していると考えられる。さらに、RVD 機構は細胞膨張からの体積回復だけでなく、様々な生理学的役割を有するため、ASK3 は RVD 機構の関与が示唆される生理現象にも影響を及ぼすことが示唆される。

そして、RVD 制御分子である ASK3 の活性化を指標にしたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことによって mGluR5 を同定した。これまでに mGluR5 と浸透圧応答や細胞体積調節機構との関係は報告されておらず、本研究は mGluR5 の新規役割を示唆するものである。本研究によって mGluR5 は RVD 制御分子である ASK3 の上流分子であることが明らかになったことから、mGluR5-ASK3 シグナル伝達経路は神経細胞膨張時に RVD 機構を介して神経保護作用を発揮する可能性がある。さらに、mGluR5 の視点から ASK3 を俯瞰することによって、ASK3 による血圧制御以外の新規役割の発見につながる潜在性を有しており、本研究は非常に意義深い。以上より、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。