

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

一條 秀憲

(東京大学大学院薬学系研究科 教授)

## 「ストレスの受容・認識とシグナル変換の分子機構」

### 1. 研究実施の概要

本研究計画は、「ストレスの受容・認識とシグナル変換の分子機構」を明らかにするために、物理化学的ストレスによるMAP3Kファミリー活性化機構について解析するものである。プロテオーム解析ならびにtwo-hybridスクリーニングを主な手法として、MAP3Kファミリー結合タンパク質の機能解析を行い、細胞のストレス応答分子機構の解明を目指すものである。本年度は特に、ASK1-MAPキナーゼ系を介するストレス応答における一表現型としてのアポトーシスならびにカルシウムシグナル応答に注目し、それらのシグナル伝達機構におけるASK1ファミリー分子の機能の解析を行い、数多くの新たな知見を得た。

### 2. 研究実施内容

1) ASK1・ASK2ヘテロオリゴマー形成による活性化機構。

ASK1結合タンパク質としてASK1に相同性の高い新規遺伝子ASK2をtwo-hybrid法により同定し、機能解析を行った。これまでの解析により、酸化ストレスによるASK1同士のオリゴマー形成に伴う活性化ループの自己リン酸化の重要性が明らかになっている。また活性化ループの自己リン酸化部位に対する抗リン酸化ASK1抗体を作製したところ、ASK1の活性化状態を極めて感度よく検出しうることが判明した。さらにこの抗体がASK2のリン酸化状態もモニターしうることが判明した。さらにASK2とASK1が協調的に下流のシグナルを活性化することを突き止めた。一方、ASK2ノックアウトマウス由来の細胞では、ASK1の活性化が減弱している知見が得られ、ASK1・ASK2ヘテロオリゴマー形成による活性化機構の重要性が示唆された。

2) ASK2ならびにASK1・ASK2ダブルノックアウトマウスの作製と解析。

ASK2ノックアウトマウスを作製した。ASK2ノックアウトマウスは見掛け上異常を見せずに誕生・成育した。ASK2ノックアウトマウス由来のMEF細胞を用いてTNF、Fas、活性酸素( $H_2O_2$ )等のASK1活性化刺激が細胞に及ぼす影響を検討したところ、ASK2<sup>-/-</sup>MEFはASK1<sup>-/-</sup>MEFと同様に少なくとも活性酸素によるアポトーシスに強い耐性をもつことが明らかになり、これまで主にドミナントネガティブASK1等を用いて解析されてきたASKファミリー分子群のプロアポトーティックな機能がノックアウトマウスでも確認された。現在ASK1・

ASK2ダブルノックアウトマウスの解析を開始している。

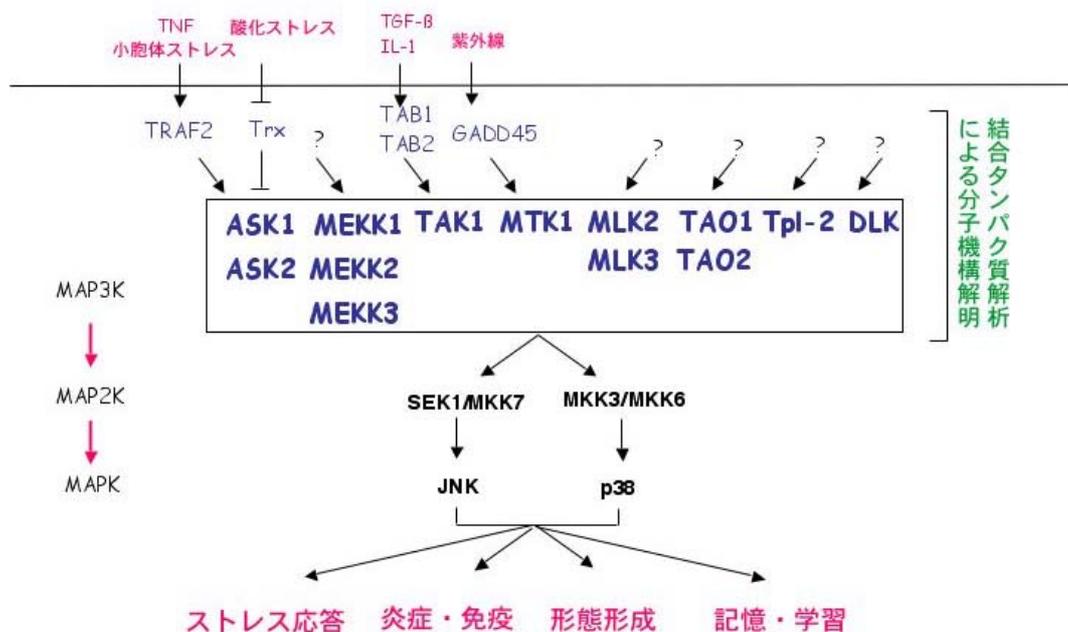
### 3) カルシウムシグナルにおけるCaMKII-ASK1シグナル経路の解明

Ca<sup>2+</sup>シグナルは、筋収縮や神経伝達物質の放出などをはじめとする多くの生体機能の維持に必須である。また、Ca<sup>2+</sup>の恒常性は、様々な疾患の発症ならびに病態に深く関与している。今年度、ASK1が、Ca<sup>2+</sup>シグナルにおいて重要な機能をもつことが明らかとなった。ASK1は、Ca<sup>2+</sup>刺激依存性にCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMKII) と結合し、活性化される。ASK1ノックアウトマウス由来の細胞ではCa<sup>2+</sup>によるp38の活性化が著しく減弱していることから、ASK1はCaMKIIを介したCa<sup>2+</sup>シグナルによるp38の活性化に必須の機能をもつと考えられる。ASK1は酸化ストレスやTNF、Fasなどのアポトーシス誘導刺激によって活性化されるとともに、アポトーシスの誘導のみならず、条件によっては分化や生存シグナルをも伝達しうる幅広い生理活性をもつことが示唆されている。このようなASK1の生理活性がCa<sup>2+</sup>シグナルによってどのように調節されているかについて検討する必要がある。現在ASK1・ASK2ダブルノックアウトマウスの解析を開始している。

### 4) MAP3Kファミリーの活性制御分子機構解析

MAP3Kファミリー活性化の分子機構としてMAP3Kファミリー結合たんぱく質の存在を想定し、ASK1以外のMAP3Kファミリーをベイトとするtwo-hybrid 法ならびにPull-down/2次元電気泳動法等によって解析を行った。すでにMAP3Kファミリーのうち、6種類について、スクリーニングを終了し、機能解析を行っている。

## ストレスの受容・認識・変換点 (分子スイッチ) としてのMAP3K



### 3. 研究実施体制

#### 一條グループ

①研究分担グループ長：一條 秀 憲（東京大学大学院薬学系研究科、教授）

#### ②研究項目

ASK1ファミリー結合分子の単離

ASK1ファミリー結合分子の機能解析

MAP3Kファミリーの活性制御分子機構解析

ノックアウトマウスを用いたストレスシグナルの分子特異性解析

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Ichijo, H. Involvement of ASK1 in  $Ca^{2+}$ -induced p38 MAP kinase activation. *EMBO rep.*, 5, 161-166 (2004).
- Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotsu, S., Kashiwase, K., Nakayama, H., Hikoso, S., Takeda, T., Watanabe, T., Asahi, M., Taniike, M., Matsumura, Y., Tsujimoto, I., Hongo, K., Kusakari, Y., Kurihara, S., Nishida, K., Ichijo, H., Hori, M. and Otsu, K. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 15883-15888 (2003).
- Takamatsu, H., Nagao, T., Ichijo, H. and Adachi-Akahane, S. L-type  $Ca^{2+}$  channels serve as a sensor of the SR  $Ca^{2+}$  for tuning the efficacy of  $Ca^{2+}$  - induced  $Ca^{2+}$  release in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 552, 415-424 (2003).
- Izumiya, Y., Kim, S., Izumi, Y., Yoshida, K., Yoshiyama, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H., Iwao, H. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Remodeling *Circulation Res.*, 93, 874-883 (2003).
- Song, S., Kim, S.Y., Hong, Y.M., Jo, D.G., Lee, J.Y., Shim, S.M., Chung, C.W., Seo, S.J., Yoo, Y.J., Koh, J.Y., Lee, M.C., Yates, A.J., Ichijo, H., Jung, Y.K. Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol. Cell*, 12, 553-563 (2003).
- Cho, S.-G., Kim, J.W., Lee, Y.H., Hwang, H.S., Kim, M.-S., Ryoo, K., Kim, M.J., Noh, K.T., Kim, E.K. Cho, J.-H., Yoon, K.W., Cho, E.-G., Park, H.-S., Chi, S.W., Lee, M.-J., Kang, S.S., Ichijo, H., and Choi, E.-J.

Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities.

*J. Cell Biol.*, 163, 71-81 (2003).

- Izumi, Y., Kim, S., Yoshiyama, M., Izumiya, Y., Yoshida, K., Matsuzawa, A., Koyama, H., Nishizawa, Y., Ichijo, H., Yoshikawa, J. and Iwao, H. Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Injured Artery And Its Critical Role in Neointimal Hyperplasia.

*Circulation*, 108, 2812-2818 (2003).

- Maruoka, S., Hashimoto, S., Gon, Y., Nishitoh, H., Takeshita, I., Asai, Y., Mizumura, K., Shimizu, K., Ichijo, H. and Horie, T. ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307, 870-876 (2003).

- Matuskawa, J., Nakayama, K., Nagao, T., Ichijo, H. and Urushidani, T. Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion.

*J. Biol. Chem.*, 278, 36470-36475 (2003).

- Hashimoto, Y., Niikura, T., Chiba, T., Tsukamoto, E., Kadowaki, H., Nishitoh, H., Yamaguchi, Y., Ishizaka, M., Yamada, M., Nawa, M., Terashita, K., Aiso, S., Ichijo, H. and Nishimoto, I. The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained ASK1/JNK mediated neurotoxic signal via dimerization

*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306, 889-902 (2003).

- Hagiwara, M., Adachi-Akahane, S. and Nagao, T. High affinity binding of [3H]DTZ323 to the diltiazem-binding site of L-type Ca<sup>2+</sup> channels.

*Eur. J. Pharmacol.* 466, 63-71 (2003).

- Kobayashi, H., Miwa, T., Nagao, T., Adachi-Akahane, S. Negative modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels via  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in guinea-pig detrusor smooth muscle cells.

*Eur. J. Pharmacol.* 470, 9-15 (2003).

- Yamaguchi, S., Zhorov, B.S., Yoshioka, K., Nagao, T., Ichijo, H., and Adachi-Akahane, S. Key roles of Phe<sup>1112</sup> and Ser<sup>1115</sup> in the pore-forming IIIIS5-S6 linker of L-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1C$  subunit (CaV1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca<sup>2+</sup> channel agonists.

*Mol. Pharmacol.*, 64, 235-248 (2003).

- Tashiro, K., Nagao, T., Kurose, H., Ichijo, H. and Urushidani, T. Role of Rho in Rabbit Parietal Cell.

*J. Cell. Physiol.*, 197, 409-17 (2003).

- Oberst, A., Baehrecke, E., Mehmet, H., Ichijo, H. and Gupta, S. A place to

die for: apoptosis in cancer and infection, Capri 2002.

*Cell Death Differ.*, 10, 393-395 (2003)

- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H. and Ichijo, H. Roles of MAPKKK ASK1 in Stress-Induced Cell Death.

*Cell Struct Funct.*, 28, 23-29 (2003).