

「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

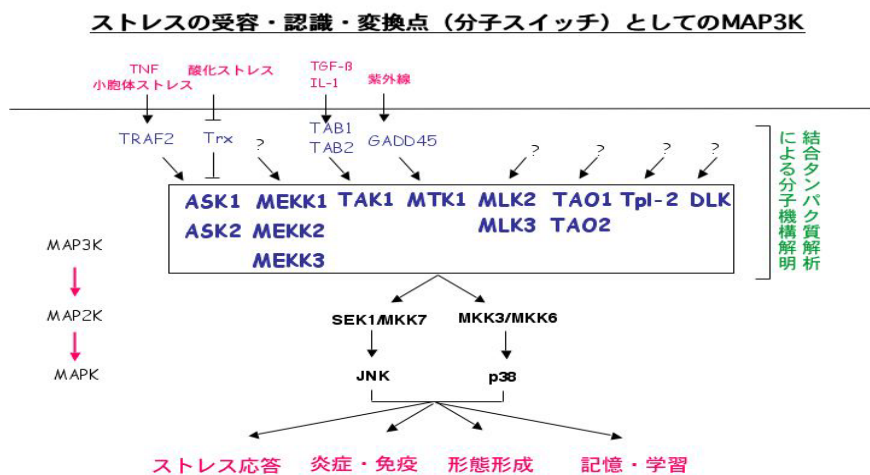
(東京大学 教授)

### 「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。two-hybridスクリーニング、プロテオーム解析ならびにノックアウトマウス作成を主な手法として、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。これまでの成果として、主にASKファミリー分子群の活性化機構ならびに生理機能の解析を行い、ASK-MAPキナーゼ系を介する多様なストレス応答機構ならびにその表現型の一部としてのアポトーシス、自然免疫応答ならびにカルシウムシグナル応答における、ASKファミリーの新たな役割を明らかにするに至っている。

#### 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) 新規ASKファミリー分子の機能解析

ASK1の相同分子としてのASK2に加え、新規ASKファミリー分子ASK3を同定した。ASK3はASK1と約55%の相同性を持ち、キナーゼドメインにおける相同性は約86%である。組織分布は、ノザンブロットの結果、ASK1およびASK2が広範な組織に分布しているのに対し、ASK3は広範な組織に分布しているものの、特に腎臓に高発現していることが分かった。In vitro kinase assayの結果、ASK3はキナーゼ活性を持ち、HEK293細胞に過剰発現するとASK1同様、下流のJNKおよびp38 MAPキナーゼ経路を活性化した。また、ASK1と同様にキナーゼドメイン中の2カ所のスレオニン残基のリン酸化が活性化に重要であることを明らかにし、活性化刺激の一つとして酸化ストレスを同定した。さらに、HEK293細胞において新規ASK1相同分子とASK1との内在性分子間の結合を確認し、互いにリン酸化しうることを明らかにした。これらの結果は、両者が複合体を形成し、互いの機能に影響し合っている可能性を示唆する。一方、ASK1を活性化することが知られている高浸透圧刺激が新規ASK1相同分子を不活性化することが分かった。ASK3の組織分布が腎臓に多いことを考え合わせると、ASK3が腎臓において、浸透圧の恒常性維持など独自の機能を持っている可能性も考えられる。このようにASK3は、ASK1およびASK2と協調的もしくは相補的にアポトーシス制御などに働いている可能性とともに、全く独自の機能を持っている可能性があり、大変興味深い分子と言える。

## 3) ASK2、ASK3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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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。一方、ASK2ノックアウトマウス由来の初代培養マクロファージ様細胞に様々なストレス刺激を加え、JNK、p38の活性化を指標に野生型マウス由来の細胞との反応性の比較を行った結果、Thapsigarginによるp38の活性化がASK2欠損細胞において減弱していることが明らかとなった。その際、ASK1の活性化も減弱していることを示唆する結果も得られた。一方、p38の活性化に対するASK1の寄与が極めて大きいと考えられている過酸化水素によって強刺激した場合、ASK2欠損細胞ではASK1欠損細胞ほどの明らかなp38活性化の減弱は認められなかった。このことからマクロファージ系細胞においては、すべてのASK1活性化刺激に対し

てASK2が機能するわけではなく、ある特定の刺激に対して、ASK2がASK1と協調的に下流のMAPキナーゼ経路を制御していることが示唆された。現在、ASK2の関与しているシグナル系の探索をさらに進めるとともに、ASK1の制御因子としてのASK2の機能についても解析を進めている。また、ASK1・ASK2ダブルノックアウトマウスの解析ならびに新規ASKファミリー分子ASK3のノックアウトマウス作成を開始している。

#### 4) 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。最近、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今後さらに検討する必要がある。

#### 5) 酸化ストレスによるASK1活性化の分子メカニズム

上記の結果から、ASK1の活性化機構においては自身のホモオリゴマー形成が重要な因子であると考えられているが、ゲル濾過カラムによる解析結果から定常状態におけるASK1は様々な細胞種においてオリゴマーを中心とした2,000kDaにも達する高分子量複合体を形成していることが明らかとなった。さらに酸化ストレス存在下では、このASK1複合体がさらに高分子量化することも明らかとなった。このことは酸化ストレスによるASK1の活性化に伴う分子メカニズムに関して、ASK1の抑制因子であるチオレドキシンの解離だけではなく、他の制御因子との新たな複合体形成が生じていることを示唆している。そこで我々は酸化ストレス依存的にASK1と複合体形成する因子を検討した。その結果、TRAF2、TRAF6、RIP1といったTNFやIL-1のシグナル経路において必須なアダプター分子が、酸化ストレス依存的にASK1と複合体を形成することが明らかとなった。これらのうちRIP1をRNAi法にてノックダウンしたところ、酸化ストレス依存的なTRAF2やTRAF6とASK1との複合体形成が抑制され、ASK1の活性化も減弱した。これまでに我々は、TRAF2やTRAF6がASK1を活性化しうること、TRAF2がTNFによるASK1の活性化に必要なことを示してきたが、これらの結果は両者が酸化ストレスにおける共通のASK1活性化因子であることを示唆している。また、RIP1がTRAFファミリー分子によるASK1の活性化に必須の分子であることも強く示唆される。現在、これら3つの分子が定常状態のASK1複合体をどのように制御しているかについて引き続き検討を行っている。

#### 6) 新規ASK1結合タンパク質の機能解析

HEK293細胞に発現させたFlag-ASK1と相互作用する分子のプロテオミクス解析により、

新規結合タンパク質としてhypothetical protein MGC5352を同定した。MGC5352はショウジョウバエや線虫に至るまで非常によく保存された分子で、N末端に膜貫通領域と予想される部位、C末端側にphosphoglycerate mutase familyに相同性の高い領域（PGAMドメイン）を有している。過剰発現系でASK1との結合を確認したところ、両者の結合にはMGC5352の膜貫通領域が必要であることが分かった。また、MGC5352の過剰発現はJNK、p38の活性化を誘導し、この活性化能は、膜貫通領域欠失変異体やPGAMドメイン内で種を越えて保存されているHis105の変異体においては消失していた。以上の結果から、MGC5352は非常にユニークな構造を持ち、まったく新しい機構でMAPキナーゼ経路の活性化を制御する分子であると考えられる。現在、この分子のASK1の活性化に対する作用を検討中であり、ASK1の直接の活性化分子として機能する可能性と、ASK1-JNK、-p38経路の足場タンパク質としてJNK、p38の活性化を促進する可能性の両面からこの新規分子の機能解析をい

#### 7) 既知ASK1結合タンパク質のASK1活性化能に関する相対評価

細胞内の酸化還元状態により酵素活性や発現量が変動するレドックス関連タンパク質であり、ASK1の活性を負に制御するものとして知られるThioredoxin (Trx)、Glutaredoxin (GRX)、Glutathione S-transferase Mu (GST $\mu$ )、Heat Shock Protein 72 (HSP72)に着眼し、様々なストレス刺激によるASK1の活性制御機構の解析を行った。HEK293細胞にASK1およびTrx、GRX、GST $\mu$ 、HSP72をそれぞれ共発現させ、活性酸素、活性窒素、カルシウム負荷刺激を与えた。その結果ASK1単独発現に比べ、ほとんどの刺激に対し上記タンパク質はASK1の活性化を抑制したが、活性窒素刺激に限り、GRXはむしろASK1の活性化を増強させる方向に働くことが分かった。これはストレス受容とシグナル変換の多様性が示唆される結果である。また免疫沈降法によりASK1と上記タンパク質の結合の強さを比較検討したところ、Trxが最も強くASK1と結合することが明らかとなった。このことからASK1の活性制御にはTrxが中心的な役割を果たしていることが示唆された。そこでTrxに焦点を当て、ストレス刺激によるASK1との結合解離を免疫沈降法により検討した。その結果、活性酸素刺激ではTrxはASK1から解離する一方、活性窒素およびカルシウム負荷刺激では、ASK1の活性化に対しTrxの解離は見られなかった。これは、活性窒素、カルシウム負荷刺激時には、1) Trxとの結合状態を保ったままASK1を活性化させる上流タンパク質が関与している可能性、もしくは2) Trxと結合していないASK1が特異的に活性化されるという可能性が示唆される。現在、ASK1の上流として報告されているTRAFファミリーやDaxxによるASK1とTrxの結合解離を検討中である。さらにASK1のホモオリゴマー形成およびその構造に対するTrxの影響についても解析を進めており、それらの結果も含めてTRXによるASK1の詳細な活性制御機構を考察したい。

#### 8) ショウジョウバエを用いた新たなストレス応答シグナル伝達経路の探索

遺伝学的な解析が容易なショウジョウバエを用い、ASK1によって制御される新たな生体機能と、それを担うシグナル分子の同定を目指して解析を行っている。ショウジョウバエにおいては哺乳類ASK1の相同分子であるDASK1が存在し、哺乳類細胞と同様にアポトーシ

その制御に関わっていることが示唆されている。今回まず、活性化したDASK1シグナルに関与する因子を探索するために哺乳類ASK1の知見に基づいてDASK1タンパク質のN末端を558残基欠失させた「恒常活性化型DASK1 (DASK1 $\Delta$ N)」を作製し、DASK1の活性化が誘導するショウジョウバエ各組織における表現型をGAL4/UASシステムを用いて探索した。転写因子GAL4の標的配列であるUAS配列の下流にDASK1遺伝子を挿入したUAS-DASK1 $\Delta$ Nを導入したショウジョウバエ系統を作製し、組織特異的プロモーター依存的にGAL4を発現する各種ドライバー系統とを交配することによりDASK1シグナルを異所性に活性化させ、その表現型を観察した。その結果、背側正中線領域にGAL4を発現するドライバーであるpnr-GAL4を用いてDASK1 $\Delta$ Nを発現させたところ、成虫においてDASK1 $\Delta$ N発現領域に一致した明らかな黒色の色素沈着が認められた。現在、この表現型を指標にゲノムの8割をカバーする染色体欠失系統の遺伝学的スクリーニングを行い、DASK1からこの表現型へ至るまでのシグナル経路を探索中である。

#### 9) ASK1-MEKK1ダブルノックアウトマウスの作製およびその解析

JNK/p38経路の活性化にASK1とMEKK1が共通に関与していると考えられている刺激の一つがTNFである。TNFシグナルにおいては、TNFレセプターに結合するアダプター分子であるTRAF2を介して、ASK1、MEKK1両分子にシグナルが伝達され、JNKなどの下流のMAPキナーゼが活性化されると考えられている。これまでの報告で、TNFによるJNKの活性化については、ASK1欠損マウス胎児繊維芽細胞(MEF)ならびに、MEKK1欠損細胞においてそれぞれ部分的な活性化の減弱が見られたことから、両分子が部分的にJNKの活性化を担っていることが示唆されたが、実際のところ、両分子のシグナルの特異性ならびに相補性については明らかではない。そこで我々は、ASK1欠損マウスとMEKK1欠損マウスを掛け合わせることで、ダブルノックアウトマウスを作製し、TNF-TRAF2-JNKシグナル伝達経路におけるASK1とMEKK1の果たす役割とその制御メカニズムについて解析した。野生型及びダブルノックアウト細胞をTNFで刺激したところ、野生型と比較してダブルノックアウト細胞では、程度及び持続時間の両面において、JNKの活性化の低下が顕著に認められたことから、TNFによるJNKの活性化はASK1とMEKK1の2分子によって主に制御されていることが示唆された。現在、TNFによるASK1とMEKK1のシグナルの特異性及びその生理機能についてさらに検討中である。

#### 10) 自然免疫応答におけるASK1-p38系シグナルの解析

自然免疫は進化的に保存された病原体感染初期の迅速な生体防御反応に不可欠であり、近年、病原体成分のパターン識別受容体であるTLR及び結合アダプター分子群の多様性によってその特異性が決定されることが明らかとなってきた。しかしながら、それらの下流シグナル因子及びその特異性については不明である。最近、ASK1が線虫の自然免疫応答に必須な分子であることが遺伝学的解析により報告された (Kim, H. D., et al.: *Science*, 297: 623-626, 2002)。我々はこれまで、ASK1欠損マウスが敗血症モデルに対して耐性であることなどから、LPS (lipopolysaccharide) シグナルにおけるASK1-p38経路の重要性を明らかにしてきた。今回、TLR下流シグナルにおけるASK1-p38経路の特異性と、その活

活性化メカニズムについて検討した。マクロファージ培養細胞系において、ASK1はTLR4リガンドのLPSによって強く活性化され、TLR2リガンドであるPGN (peptidoglycan) などの活性化は非常に弱かった。ASK1欠損マウス由来の樹状細胞や脾細胞では、各種リガンド刺激の中で、LPS刺激によるサイトカイン産生が特異的に抑制され、同時にp38の活性化が消失していた。PGNなどによるp38の活性化はほぼ正常に認められたことから、ASK1-p38経路はTLR4シグナルに特異性を持つことが示唆された。このLPS刺激特異的なASK1-p38経路の活性化メカニズムを検討したところ、PGN刺激などと比較して、LPSによるASK1及びp38の活性化、またTLR下流のアダプター分子であるTRAF6とASK1との結合は、各種抗酸化剤によって著しく抑制されたことから、TLR4シグナルの下流において、おそらく活性酸素種を介してASK1-p38経路の活性化が増強されているものと考えられた。以上の結果は、TLR下流において選択的シグナル伝達機構がMAPKKKレベルで存在することを示すものである。

### 1 1) 家族性筋萎縮性側索硬化症におけるASK1の関与

神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のうち、家族性ALSの一部はSOD1遺伝子の変異が原因で発症する。その発症機構は、変異SOD1タンパク質が細胞内に蓄積することによって細胞毒性を発揮し、運動神経細胞が変性をきたすことによると考えられている。しかし、細胞内に変異SOD1が蓄積した結果、どのようなシグナル伝達が生じて細胞が傷害され、変性していくかという一連のメカニズムについては未だ明らかでない。近年、変異SOD1トランスジェニック (Tg) マウスを用いた解析および*in vitro*の実験から、ALS病態進行にはTNF、Fasリガンドなどの炎症性サイトカインや活性酸素種の関与が示唆されている。一方我々は、TNFや活性酸素さらに異常タンパク質蓄積に伴う小胞体ストレスシグナルにおいて、ASK1 (JNK/p38経路を活性化するMAPKKK) が強く活性化されることと、その際に見られるアポトーシスに深く関与していることを報告してきた。そこで、ALS発症分子機構の解明を目的として、変異SOD1によって惹起される運動神経細胞死におけるASK1の役割について検討を行った。SOD1 (G93A) TgマウスとASK1<sup>-/-</sup>マウスの交配実験より、SOD1 (G93A) Tg・ASK1<sup>-/-</sup>マウスはSOD1 (G93A) Tg・ASK1<sup>+/+</sup>マウスに比べて個体生存率が上昇することを見出した。また細胞レベルでは、マウス胎児由来の運動神経初代培養系において、変異SOD1 (A4V、G85R、G93A) の過剰発現により神経細胞死が惹起され、さらにASK1<sup>-/-</sup>マウス由来細胞においてはその神経細胞死が抑制されていることが確認された。さらに現在は、運動神経細胞株NSC34細胞を用いて変異SOD1依存的に細胞死を誘導する実験系を確立し、その際に見られる細胞内シグナル伝達について検討中である。

### 1 2) 活性酸素依存的ASK1活性化を介したアミロイドβ誘導性神経細胞死

アミロイドβ (Aβ) はアルツハイマー病における老人斑の主要成分であり、神経細胞死を誘導することが示唆されている。このAβによる神経細胞死の原因として、活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO)、小胞体ストレスの関与が報告されている。最近、Aβ誘導性神経細胞死にJNK-c-Jun経路が関与することが報告され、我々はこれまでにJNK/p38経路においてMAPKKKとして機能するASK1が、ROS誘導性のJNK活性化およびアポトーシスに必須であることを明らかにしていることから、Aβ誘導性神経細胞死におけるASK1の関与について

て検討した。神経培養細胞株において、A $\beta$ 刺激によりASK1が活性化された。この活性化は抗酸化剤であるpropyl gallate、MnTBAPならびにvitamin Eにより抑制され、さらにROS認識蛍光標識プローブ（HPF）を用いることにより、A $\beta$ によるROSの細胞内産生が確認されたことから、A $\beta$ がROSを介してASK1を活性化することが明らかとなった。無刺激下において酸化還元タンパク質Thioredoxin (Trx) は、ASK1と結合しその活性を抑制している。そこで、A $\beta$ により産生されるROSが、ASK1を活性化する分子機構を解析するためにTrxの関与を検討した結果、A $\beta$ 刺激によりTrxはASK1から解離することが明らかとなった。さらにASK1ノックアウトマウス由来の初代培養神経細胞を用いてA $\beta$ によるJNKの活性化および神経細胞死に対するASK1の必要性について検討した結果、ASK1 $^{-/-}$ 神経細胞ではASK1 $^{+/+}$ 細胞に比べてJNKの活性化、神経細胞死ともに抑制されていた。一方、A $\beta$ 誘導性のROS産生がASK1を介するか否かを検討したところ、ASK1 $^{-/-}$ 細胞においてもASK1 $^{+/+}$ と同様A $\beta$ 刺激によるROSの産生が検出された。これらの結果よりA $\beta$ 誘導性神経細胞死は、何らかのメカニズムを介して産生されたROS依存的に活性化されたASK1が大きく関与していることが示唆された。

### 1 3) 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ている。すでにMAP3Kファミリーのうち、8種類について、スクリーニングを終了し、現在機能解析を行っている。

## 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、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（原著論文）発表

○ Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T. and Ichijo, H. Amyloid  $\beta$  induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation.

**Cell Death Differ.**, 12, 19-24 (2005).

○ Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T.A.,

Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., Ichijo, H., Yamasaki, Y. and Hori, M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide.

**Nat. Med.**, 10, 1128-1132 (2004).

- Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., Nakai, A., Tsujimoto, I., Matsumura, Y., Miyazaki, J., Chien, K.R., Matsuzawa, A., Sadamitsu, C., Ichijo, H., Baccarini, M., Hori, M. and Otsu, K. Cardiac-specific Disruption of *c-raf-1* Gene Induces Cardiac Dysfunction and Apoptosis.

**J. Clin. Invest.**, 114, 937-943 (2004).

- Huang, S., Shu, L., Easton, J., Harwood, F. C., Germain, G. S., Ichijo, H. and Houghton, P. J. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Activates Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Signaling by Suppressing Protein Phosphatase 5 Activity.

**J. Biol. Chem.**, 279, 36490-36496 (2004).

- Subramanian RR, Zhang H, Wang H, Ichijo H, Miyashita T, Fu H. Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins.

**Exp. Cell Res.** 29, 581-591 (2004).

- Omura, T., Yoshiyama, M., Kim, S., Matsumoto, R., Nakamura, Y., Izumi, Y., Ichijo, H., Sudo, T., Akioka, K., Iwao, H., Takeuchi, K. and Yoshikawa, J. Involvement of Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 on Angiotensin II-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression.

**Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 24, 1-6 (2004).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：4件）