

「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

ストレス応答機構の破綻は様々な疾患の発症原因となるが、多様な環境ストレスに対するセンサーの実体ならびにシグナル伝達機構については不明な点が多い。本研究は、ストレス応答性 MAP キナーゼタンパク質群の解析を通じて、ストレスの受容・認識ならびにシグナル伝達機構を解明することを目的としている。ASK1 ファミリーの解析を軸として、他の MAP3K ファミリー分子群についてもその結合タンパク質解析を行った結果、酸化ストレス、浸透圧ストレス、細菌感染等に対する新たなストレス応答機構の発見に至った。またこれらのシグナル系が、炎症、がん、神経変性などの発症に深く関与することも明らかになり、本研究の成果が全く新しい創薬基盤の開発へと発展しつつある。

2. 研究実施内容

1) ASK1 との複合体形成による ASK2 の安定化機構

これまでに ASK2 は少なくとも強制発現系において、ASK1 と同様に JNK、p38 両経路を活性化する能力を持つこと、また細胞内において ASK1 と複合体を形成することが分かっている。しかし、定常状態でのキナーゼ活性が ASK1 と比較して非常に低く保たれていることなどから、ASK1 と異なった独自の活性制御機構を持つと考えられる。内在性 ASK2 の発現や局在変化を解析するために ASK2 特異的モノクローナル抗体を作製したところ、野生型細胞内での ASK1 と ASK2 の内在性分子どうしの複合体形成が確認された。一方、ASK1 ノックアウトマウス由来の細胞においては、ASK2 mRNA の発現には野生型細胞との大きな差は認められないのに対し、ASK2 タンパク質の発現が野生型に比べ 1/10 程度にまで減弱していることが明らかとなった。また、ASK1 欠損細胞に野生型 ASK1 を導入することで ASK2 の発現が回復するが、ASK2 との結合部位を持たない ASK1 変異体を ASK1 欠損細胞に導入しても ASK2 の発現は回復しなかった。これらの結果から、ASK2 タンパク質の安定化には ASK1 との複合体形成が必要であることが強く示唆された。現在、ASK2 が ASK1 によって安定化されるメカニズムとその生理的意義について検討している。

2) 2段階皮膚発癌モデルを用いたASK2ノックアウトマウスの解析（投稿準備中）

腫瘍形成過程への ASK2 の関与を検討する目的で、ASK2 ノックアウトマウスを用いて、2 段階皮膚発癌モデルについて検討を行った。野生型及び ASK2 ノックアウトマウスそれぞれの背

部にイニシエーターとして化学発癌剤 DMBA(dimethylbenzanthracene)を塗布後、プロモーターとして TPA(12-*O*- tetradecanoylphorbol-13-acetate)をおよそ 20 週間継続塗布し、腫瘍の形成数・発生時期を経時的に比較したところ、野生型に比べ ASK2 ノックアウトマウスは、腫瘍の形成数が 3 倍程度多く、発生時期は 2 週間ほど早いことが明らかとなった。本結果は腫瘍形成過程への ASK2 の関与を示唆するものである。現在、ASK2 ノックアウトマウスの皮膚切片による組織染色や初代培養ケラチノサイトを用い、腫瘍形成の各過程における ASK2 の生理機能について解析を進めている。

3) 新規 ASK ファミリー分子 ASK3 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 ASK3 と ASK1 との内在性分子間の結合を確認し、互いにリン酸化し合う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 ASK3 を不活性化すること、逆に低浸透圧刺激では ASK3 が活性化されることが判明した。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る。

4) 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^{-/-}MEF は ASK1^{-/-}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・解析を行っている。

5) 活性酸素依存的な ASK1 活性化における TRAF ファミリーの役割

ASK1 の活性化機構において ASK1 自身のホモオリゴマー形成が重要な因子要因であると示唆されてきたが、その詳細は明らかではなかった。そこで細胞内における ASK1 複合体の解析を試みたところ、ASK1 は定常状態においてすでにホモオリゴマー形成しており、ASK1 の抑制因子であるチオレドキシン(Trx)とともに 2,000kDa に達するシグナルソームを形成していることが明らかとなった。さらに過酸化水素存在下では、この ASK1 シグナルソームから Trx が解離し、相反して TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)や TRAF6 がリクルートされることでさらに高分子量化することも明らかとなった。また、TRAF2^{-/-} および TRAF6^{-/-} MEF を用いた解析より、TRAF2 や TRAF6 が ASK1 シグナルソームにリクルートされることが ROS 依存的な ASK1 の活性化および細胞死に必須であるということが示唆された明らかとなった。一方、ASK1 は TNF や LPS (lipopolysaccharide)によっても TRAF 依存のかつ ROS 依存的に活性化される。活性酸素高感度プローブ HPF を用いた解析から、この活性化が TNF や LPS 特異的に産生された ROS によるものであることが示唆された。さらに、TRAF2 や TRAF6 の過剰発現が ROS の蓄積産生を増強することし、それぞれのドミナントネガティブ変異体の過剰発現により TNF や LPS による ROS の蓄積産生が抑えられる抑えられたことなどから、TRAF2 や TRAF6 が積極的に ROS の蓄積産生にも関与していることが示唆された。

6) 新規 ASK1 結合タンパク質 PGLM 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、新たな ASK1 結合分子として PGLM (phosphoglycerate mutase (PGAM)-like protein containing a putative trans-membrane domain) を同定した。PGLM は HEK293 細胞内で ASK1 と結合し、そのキナーゼ活性を上昇させた。PGLM の His105 (PGAM においてリン酸基を転移させる活性に必須である His8 に相当する) に変異を導入すると ASK1 に対する結合能は保持されたが、活性化能は消失した。ASK1 と共発現させた PGLM は、定常状態でリン酸化されている ASK1 のカルボキシル末端領域の脱リン酸化を引き起こすことから、ASK1 のキナーゼ活性に対して抑制的に働くリン酸化部位を PGLM が脱リン酸化することによって ASK1 を活性化していると考えられる。ASK1 に対する脱リン酸化は、大腸菌で作製したリコンビナント PGLM によっても観察され、His105 変異体のリコンビナントタンパク質では認められなかったことから、PGLM 自身が protein phosphatase としての活性をもつことが強く示唆された。実際、リン酸化ペプチドを用いた *in vitro* 実験により、PGLM は His105 に依存して serine/threonine phosphatase 活性をもつことが明らかとなった。よって PGLM は新規の protein phosphatase として機能し、新たな機構で ASK1 の活性を制御する分子であることが示唆される。

7) 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スの制御に関わっていることが示唆されている。我々は、哺乳類 ASK1 の知見に基づいて DASK1 タ

ンパク質の N 末端を欠失させた「恒常活性化型 DASK1 (DASK1ΔN)」を作製し、各種組織特異的プロモーター依存的に DASK1ΔN を発現させ、ショウジョウバエ各組織において DASK1 活性化が誘導する表現型を探索した。その結果、背側正中線領域に DASK1ΔN を発現させた際、成虫においてその発現領域に一致して明らかな黒色の色素沈着が認められた。この色素沈着は、dopa ならびに dopamine から誘導されるメラニンの合成亢進によることが遺伝学的解析によって示唆され、dopa の産生に必須の酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の発現上昇が確認された。この表現型はドミナントネガティブ型 p38 変異体の過剰発現によって抑制されたことから、DASK1 は p38 経路を介して TH の発現を制御する活性をもつと考えられる。さらに哺乳類細胞においても ASK1 が TH プロモーターを p38 依存的に活性化することが示されたことから、種を越えて保存された ASK1 の生理機能においてこの経路が重要な役割を果たしていることが示唆される。

3. 研究実施体制

「一條秀憲」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

- Takeda, K., Noguchi, T. and Ichijo, H. ASK1 Signalingosome: a Signaling Complex Essential for Cellular Stress Responses.
J. Oral Biosci., (review article), 48, 7-11 (2006).
- Liu, Q., Wilkins, B.J., Lee, Y.J., Ichijo, H. and Molkenin, J.D. Direct Interaction and Reciprocal Regulation Between ASK1 and Calcineurin-NFAT Controls Cardiomyocyte Death and Growth.
Mol. Cell. Biol., in press.
- Hayakawa, T., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. The ASK1-MAP kinase pathways in the immune and stress responses.
Microbes Infect., (review article), in press.
- Sekine, Y., Takeda, K. and Ichijo, H. The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases.
Curr. Mol. Med., (review article), 6, 87-97 (2006).
- Lee, K.H., Nishimura, S., Matsunaga, S., Fusetani, N., Ichijo, H., Horinouchi, S., Yoshida, M. Induction of a ribotoxic stress response that stimulates stress-activated protein kinases by 13-deoxytetracycline, an antitumor marine macrolide.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 161–171 (2006).

- Harada, C., Nakamura, K., Namekata, K., Okumura, A., Mitamura, Y., Iizuka, Y., Kashiwagi, K., Yoshida, K., Ohno, S., Matsuzawa, A., Tanaka, K., Ichijo, H. and Harada, T. Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress-induced neural cell apoptosis in vivo.

Am. J. Pathol., 168, 261–269 (2006).

- Mizumura, K., Takeda, K., Hashimoto, S., Horie, T. and Ichijo, H. Identification of Op18/stathmin as a potential target of ASK1-p38 MAP kinase cascade.

J. Cell. Physiol., 206, 363–370 (2006).

- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. and Ichijo, H. Recruitment of TRAF family proteins to the ASK1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death.

J. Biol. Chem., 280, 37033–37040 (2005).

- Watanabe, T., Otsu, K., Takeda, T., Yamaguchi, O., Hikoso, S., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Taniike, M., Nakai, A., Matsumura, Y., Nishida, K., Ichijo, H. and Hori, M. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 333, 562–567 (2005).

- Izumi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Yoshiyama, M., Omura, T., Shiota, M., Matsuzawa, A., Yukimura, T., Murohara, T., Takeya, M., Ichijo, H., Yoshikawa, J. and Iwao, H. Important Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Ischemia-induced Angiogenesis.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25, 1877–1883 (2005).

- Kumasawa, F., Hashimoto, S., Onose, A., Jibiki, I., Mizumura, K., Matsumoto, M., Maruoka, S., Gon, Y., Kobayashi, T., Takahashi, N., Ichijo, H. and Horie, T. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in leukotriene D4-induced activator protein-1 in airway smooth muscle cells.

Eur. J. Pharmacol., 517, 11–16 (2005).

- Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling.

Antioxid. Redox Signal. (review article), 7, 472–481 (2005).

- Omura, T., Yoshiyama, M., Matsumoto, R., Kusuyama, T., Enomoto, S., Nishiya, D., Izumi, Y., Kim, S., Ichijo, H., Motojima, M., Akioka, K., Iwao, H., Takeuchi, K. and Yoshikawa, J. Role of c-Jun NH2-terminal kinase in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiac plasminogen activator inhibitor-1 expression.

J. Mol. Cell Cardiol., 38, 583–92 (2005).

- Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B.S., Zhao, X., Ichijo, H. and Mouradian, M.,M. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits ASK1 activity and cell death.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 102, 9691–9696 (2005).

- Bijangi-Vishehsaraei, K., Saadatzaheh, M.R., Werne, A., McKenzie, K.A., Kapur, R., Ichijo, H. and Haneline, L.S. Enhanced TNF- α induced apoptosis in fanconi anemia type C deficient cells is dependent on Apoptosis Signal-regulating Kinase 1.
Blood, 106, 4124-4130 (2005).
- Sayama, K., Komatsuzawa, H., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Ouhara, K., Tokumaru, S., Dai, X., Tohyama, M., ten Dijke, P., Sugai, M., Ichijo, H. and Hashimoto, K. New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of *b*-defensins, LL37, and TLR2.
Eur. J. Immunol., 35, 1886-1895 (2005).
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR-4 mediated innate immunity.
Nat. Immunol., 6, 587-592 (2005).
- Dersch, K., Ichijo, H., Bhakdi, S. and Husmann, M. Fatty acids liberated from low density lipoprotein trigger endothelial apoptosis *via* mitogen activated protein kinases.
Cell Death Differ., 12, 1107-1114 (2005).
- Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T. and Ichijo, H. Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation.
Cell Death Differ., 12, 19-24 (2005).
- 武田弘資、一條秀憲：ストレスキナーゼによる細胞死制御－MAP キナーゼ：JNK, p38－，**細胞死・アポトーシス集中マスター**，辻本賀英 編，羊土社，51-60，2006.
- 永井宏彰、武田弘資、一條秀憲：病態におけるストレス応答性 MAP キナーゼ経路の役割－ASK1 は疾患治療のターゲットとなるか？－，**化学と生物** 44(3)，144-146，2006.
- 松沢厚，一條秀憲：ストレス応答キナーゼ ASK1 による自然免疫シグナルの制御機構－活性酸素を介した TRAF6-ASK1-p38 経路の TLR4 下流特異的活性化－，**臨床免疫** 45(1)，79-84，2006.
- 野口拓也，武田弘資，一條秀憲：活性酸素とリン酸化シグナルとの関わり：ASK1 の活性化機構，**細胞工学** 25(2)，149-152，2006.
- 石井絢，一條秀憲：MAP キナーゼカスケードによるストレス誘導性アポトーシスの制御，（別冊・医学のあゆみ）**レドックス・ストレス防御の医学**，淀井淳司，松尾禎之 編，医歯薬出版，36-41，2005.
- 松沢厚，三枝かおる，一條秀憲：ストレス応答キナーゼ ASK1 による新たな自然免疫シグナル制御機構の発見：活性酸素が自然免疫応答に果たす役割，**細胞工学**，24(7)，706-707，2005.
- 野口拓也，武田弘資，一條秀憲：プロテインキナーゼによる酸化ストレス応答，**酸化ストレスマーカー**，二木鋭雄，野口範子，内田浩二編，学会出版センター，166-170，2005.

- 三輪崇志, 松沢 厚, 一條秀憲: **アポトーシス, 酸化ストレスナビゲーター**, 倉林正彦 監修, 山岸昌一 編, メディカルビュー社, 112-113, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 5 件)