

「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

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 (J. Biol. Chem. 2007)

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。さらに ASK2 の活性化には ASK1 のキナーゼ活性は不要なものの、ASK1 のキナーゼ領域を含む構造が必要であることが判明した。現在、ASK2 が ASK1 によって安定化され、活性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)

ASK2 は、ASK1 と同様にストレス応答における重要なシグナル伝達分子と考えられることから、ストレス応答の異常に起因する発癌においても重要な役割を担っていることが示唆される。そこで本研究では二段階皮膚発癌モデルを用い、ASK2 ノックアウト(KO)マウス

スにおける皮膚腫瘍の形成について検討した。ASK2KO マウスおよび野生型マウスの背部にイニシエーターとして DMBA を塗布後、プロモーターとして TPA を継続塗布して経過を比較したところ、ASK2KO マウスにおいては、野生型マウスに比べて形成された腫瘍数が明らかに多く、また発生時期も比較的早いことが明らかとなった。DMBA 処理後の皮膚におけるアポトーシスを TUNEL 法にて検出したところ、ASK2KO マウスにおいて DMBA 処理によって生じる TUNEL 陽性細胞が減少している傾向が認められた。また、ASK2KO マウス由来の初代培養ケラチノサイトにおいては、DMBA 刺激による JNK、p38 MAPK の活性化が野生型由来細胞より減弱していることを確認した。以上の結果より、ASK2 は DMBA によるアポトーシスの誘導に関与し、二段階皮膚発癌モデルにおける腫瘍形成に対して抑制的に機能することが示唆された。

3) 新規 ASK ファミリー分子 ASK3 の機能解析 (投稿準備中)

ASK3 は ASK1 と一次配列上 57% の相同性があり、ASK1 と同様に自己リン酸化能を有し JNK および p38 経路を活性化した。また、ASK3 は腎臓に多く発現していた。HEK293 細胞に発現させた ASK3 は細胞外の浸透圧変化に応じてリン酸化活性を変化させ、高浸透圧刺激 (500 mOsm) では活性化、低浸透圧刺激 (200 mOsm) では不活性化した。また、この活性変化は HEK293 細胞の内在性の ASK3 でも同様に観察された。

酵母ツーハイブリッド法により ASK3 の結合分子を探索したところ、WNK4 が同定された。WNK4 は基質である SPAK に対するリン酸化制御を介して、いくつかのイオントランスポーターの活性を制御するリン酸化酵素である。HEK293 細胞において ASK3 と共発現すると WNK4 は共免疫沈降され、同時に SDS-PAGE 上の泳動度が低下していた。フォスファターゼを前処置することによりこの泳動度の変化は WNK4 分子のリン酸化によると考察され、さらに泳動度の変化は浸透圧により変化する ASK3 の活性依存的であったため、WNK4 が ASK3 により浸透圧依存的にリン酸化されることが示唆された。そこで、質量分析計により ASK3 依存的に WNK4 がリン酸化されることを確かめた。WNK4 の *in vitro* kinase assay を行ったところ、ASK3 の共発現により WNK4 のリン酸化活性が抑制されることが明らかになった。以上の結果から、ASK3 は浸透圧ストレスに対して活性が両方向に変化する新規のリン酸化酵素であることが明らかになった。ASK3 は浸透圧依存的に WNK-SPAK 経路のシグナル伝達を制御することにより細胞のイオン輸送を調節し浸透圧ストレス時の細胞体積調節などに関与している可能性が考えられる。

4) TPL2/Cot-NF- κ B 経路に対する選択的抑制機構 (投稿準備中)

MAP3K ファミリー分子は、増殖因子やサイトカインあるいは様々なストレスなどによって活性化され、下流の MAP キナーゼ経路を活性化することで多様な生理応答を導き出している。しかしながら、MAP3K ファミリー分子の活性化制御機構は依然不明な点が多いことから、我々はそれぞれの MAP3K に結合する分子を探索することで、その活性化と機能がどのように制御されているかを解析している。TAO2/MAP3K17 の結合分子として同定した AIP (arylhydrocarbon receptor-interacting protein) は、ペプチジルプロリル-シス/トランス-イソメラーゼ (PPIase) ファミリーに属するシャペロン様分子で、過剰発現系において TAO2

以外の多くの MAP3K と結合することがわかった。なかでも、TPL2/Cot/MAP3K8 との結合が顕著に強かったことから、TPL2 に対する AIP の作用を検討した。TPL2 は LPS や TNF などによって活性化され、MAP キナーゼ経路のみならず NF- κ B 経路も活性化することが知られている。過剰発現した TPL2 は ERK、JNK および p38 経路を活性化するとともに NF- κ B 経路も活性化した。しかし、AIP を共発現させると TPL2 による NF- κ B 経路の活性化のみが顕著に抑制された。このことは、AIP が TPL2 による NF- κ B 経路の活性化のみを選択的に抑制する因子であることを示唆している。

5) 新規結合分子 DICC1 による DLK の活性制御機構 (投稿準備中)

DLK (dual leucine zipper bearing kinase) /MUK/ZPK は MAPKKK ファミリーに属し、主として JNK 経路の活性化を介してアポトーシス誘導や神経細胞分化に関与する分子であるが、その活性制御機構については不明な点が多い。そこでまず我々は、DLK の活性化が Ser269 のリン酸化によって制御されることを見出し、そのリン酸化を特異的に認識する抗体を作製した。以前、強い紫外線 (UV) 刺激によって DLK が多量体化することが報告されていることから、DLK 発現細胞に UV 照射したところ、Ser269 のリン酸化の亢進が認められた。また、HEK293 細胞において内在性 DLK の発現を RNAi 法によって抑えると、UV による JNK の活性化が減弱することから、DLK が UV による JNK の活性化を担う分子であることが強く示唆された。さらに我々は、DLK の活性制御分子を同定することを目的に結合分子の探索を試みた。その結果、機能未知の新規分子を同定し、DICC1 (DLK inhibitory coiled-coil domain containing protein 1) と命名した。DICC1 は MAPKKK ファミリー分子の中では DLK に対して高い結合特異性を示し、DLK の定常状態でのキナーゼ活性と UV による活性化の両者を阻害した。また、内在性 DICC1 のノックダウンによって UV による JNK の活性化が増強する傾向が認められた。以上の結果より、UV による JNK 経路の活性化への DLK とその抑制因子 DICC1 の寄与が明らかとなり、現在その詳細な機構を解析中である。

3. 研究実施体制

(1)「一條秀憲」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

○Imoto, K., Kukidome, D., Nishikawa, T., Matsuhisa, T., Sonoda, K., Fujisawa, K., Yano, M., Motoshima, H., Taguchi, T., Tsuruzoe, K., Matsumura, T., Ichijo, H. and Araki, E. Impact of

mitochondrial reactive oxygen species and apoptosis signal-regulating kinase 1 on insulin. Signaling. **Diabetes**, 55, 1197-1204 (2006).

- Chiang, E., Dang, O., Anderson, K., Matsuzawa, A., Ichijo, H. and David, M. Apoptosis-regulating signal kinase 1 is required for reactive oxygen species-mediated activation of IFN regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, 176, 5720-5724 (2006).
- Kitagawa, D., Kajiho, H., Negishi, T., Ura, S., Watanabe, T., Wada, T., Ichijo, H., Katada, T. and Nishina, H. Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation. **EMBO J.**, 25, 3286-3297 (2006).
- Yokoi, T., Fukuo, K., Yasuda, O., Hotta, M., Miyazaki, J., Takemura, Y., Kawamoto, H., Ichijo, H., Ogiwara T. Related articles, links Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells. **Diabetes**, 55, 1660-1665 (2006).
- Van Laethem, A., Nys, K., Van Kelst, S., Claerhout, S., Ichijo, H., Vandenheede, J.R., Garmyn, M., Agostinis, P. Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, 41, 1361-1371 (2006).
- Takeda, K., Shimozono, R., Noguchi, T., Umeda, T., Morimoto, Y., Naguro, I., Tobiume, K., Saitoh, M., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Apoptosis signal-regulating kinase 2 (ASK2) functions as a MAP3K in a heteromeric complex with ASK1. **J. Biol. Chem.**, 282, 7522-7531 (2007).
- Osaka, N., Takahashi, T., Murakami, S., Matsuzawa, A., Noguchi, T., Fujiwara, T., Aburatani, H., Moriyama, K., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. **J. Cell Biol.**, in press.
- Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T. and Iwatsubo, T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial parkinson's disease. **Biochemistry**, 46, 1380-1388 (2007).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件(CREST 研究期間累積件数:6件)