

## ストレスシグナルの分子機構解明による創薬基盤の確立

Establishment of the basis for drug development  
by the analysis of molecular mechanisms of  
stress signaling

一條 秀憲 (ICHIJO HIDENORI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授



### 研究の概要

ストレス応答性 ASK ファミリーキナーゼならびにその活性制御タンパク質群の機能解析を中心テーマとして推進し、酸化ストレス、小胞体ストレス、浸透圧ストレスなどの物理化学的ストレスが如何にしてリン酸化シグナルに変換され、またストレスシグナルが如何にして細胞機能を司るかという、基本的な生命現象の分子の実体の解明を目指す。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ストレス、ASK ファミリー

### 1. 研究開始当初の背景

ASK ファミリーに代表される MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K) ファミリーは、ストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系の最上流に存在するタンパク質キナーゼである。我々はこれまでに、ASK ファミリーの一員である ASK1 が、酸化ストレスセンサーであるチオレドキシニン(Trx)との結合・乖離を介して酸化ストレスシグナルの分子スイッチとして機能していることを解明し、MAP3K ファミリーが、多種多様なストレスに特異性をもって対処すべく産み出された「ストレスの受容・認識・変換機構の担い手」であることを世界で初めて実証してきた。しかしながら、ASK ファミリーならびにその活性制御タンパク質の構造的ならびに時空間的制御機構に関する知見は依然乏しく、ストレス応答の表現型としてのアポトーシス、細部増殖、細胞分化、サイトカイン産生等、極めて多彩な細胞機能に深く関与する ASK ファミリーの詳細な活性制御分子機構の早急な解明が期待されている。さらに ASK ファミリーは、酸化ストレスのみならず小胞体ストレスや浸透圧ストレス等、他の物理化学的ストレスにおいても重要な機能を持つことが判明しており、ASK ファミリーの活性制御機構を解明することによって、これまで未知であった様々な物理化学的ストレスの受容・認識・変換機構が全く新しい観点から解明されるとともに、その成果はストレス応答の新たな分子機構に基づく創薬基盤の開発に繋がることも期待される。事実、ASK ファミリーは

後述の如く様々な疾患の発症・進行に関与することが示唆されており、疾患関連分子の重要ターゲットとしても極めて注目されている。

### 2. 研究の目的

ストレス応答は、細胞が持つ最も基本的な生命現象のひとつであり、その破綻は、炎症、がん、神経変性、自己免疫などをはじめとする多様な疾患の発症原因となる。シグナル伝達分子の多くは、ホルモンやサイトカインなどの生理活性物質のみならず物理化学的ストレスによってもその活性が制御されるが、ストレスセンサーの実体ならびにタンパク質によるストレス認識の構造的ならびに時空間的分子基盤については不明な点が多く残されている。本研究は、ストレス応答性 ASK ファミリーキナーゼならびにその活性制御タンパク質群の機能解析を中心テーマとして推進し、酸化ストレス、小胞体ストレス、浸透圧ストレスなどの物理化学的ストレスが如何にしてリン酸化シグナルに変換され、またストレスシグナルが如何にして細胞機能を司るかという、基本的な生命現象の分子の実体の解明を目指す。その特徴は、研究代表者が世界に先駆けて明らかにしてきた ASK ファミリーとその活性制御タンパク質群を標的とし、最先端のシグナル伝達解析技術を用いて研究を進めることにある。また、ASK ファミリー阻害剤等の基盤開発も視野に入れ、ストレスの受容・認識・変換の分子機構の解明ならびにストレスシグナルと疾患との関わ

りを解明する事を目的としている。

### 3. 研究の方法

1) ASKファミリー結合分子の機能解析: ASKファミリー結合たんぱく質の解析を進めながら、さらにASKファミリー結合たんぱく質をベイトとして用いた酵母two-hybrid法ならびにプルダウン-MASS解析等による検討を行い、ASKファミリーに至るストレスシグナルを上流に遡って解析する。2) ノックアウトマウスを用いたASKファミリーシグナルの分子特異性解析: DNAチップによる遺伝子発現プロファイリングの比較解析ならびにプロテオーム解析の検討を行い、ASKファミリーによるストレス応答シグナルの分子特異性を明らかにする。3) 遺伝学的解析法によるASKファミリーシグナルの解析: ショウジョウバエならびに線虫においてASKファミリーの関与する表現型を活用し、遺伝学的相補性を指標にASKファミリーの上流下流分子のスクリーニングを行う。4) 自然免疫応答におけるASKファミリーの機能解明: 自然免疫と獲得免疫を機能的に繋ぐASKファミリーの生理的役割について評価するため、細菌やウイルス感染に対する免疫防御機構でのASK1の機能を*in vivo*感染モデルで明らかにする。

### 4. これまでの成果

[ミトコンドリアストレスとPGAM5]: ASK1の結合分子の一つとして我々の見いだした Phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5)は、これまでに知られていない分子とも相同性を持たない、まったく新しいタイプのセリン・スレオニン特異的プロテインホスファターゼとしてミトコンドリアにおいて機能し、その活性依存的にASK1ならびにその下流のMAPキナーゼ経路を活性化することが明らかとなった。[ASK1結合分子の探索と機能解析]: プルダウン-MASS解析により、活性酸素刺激依存的なASK1結合分子および活性制御分子の網羅的探索(インタラクトーム解析)を行ったところ、新たに脱ユビキチン化酵素USP9Xならびに抗酸化蛋白質ペルオキシレドキシシン1 (Prx1)を同定した。[自然免疫応答におけるASK1の機能解明]: マクロファージの外来異物の貪食能・消化能の定量的な評価系を新たに構築し、実際にASK1欠損細胞では貪食能・消化能が低下していることを見出した。[遺伝学的機能解析線虫におけるASK1オルソログであるNSY-1の欠損個体は、酸化ストレス、小胞体ストレス、細菌感染に対して脆弱であることが分かり、これらのストレスに対して個体の生存を維持する上でNSY-1が重要な役割を担うことを確認した。その後、より幅広いストレス刺激に対するNSY-1欠損線虫の表現型を探索したところ、

無酸素状態においてはむしろ生存が延長するという、これまでのストレス刺激とはまったく逆の表現型をNSY-1欠損線虫が示すことが明らかとなった。

### 5. 今後の計画

1) ASKファミリー結合分子群の機能解析、2) ノックアウトマウスを用いたASKファミリーシグナルの分子特異性解析、3) 遺伝学的解析法によるASKファミリーシグナルの解析、4) 自然免疫応答におけるASKファミリーの機能解明、5) 小胞体ストレスにおけるASKファミリーの役割の解明に焦点を当て、特に病態生理学的意義と創薬基盤という観点から、残りの期間を研究の仕上げと成果公表を意識しながら全うしたい。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. and Ichijo, H. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. *EMBO J.*, 4, 2501-2514 (2010).
2. Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Mol. Cell*, 36, 805-818 (2009).
3. Takeda, K., Komuro, Y., Hayakawa, T., Oguchi, H., Ishida, Y., Murakami, S., Noguchi, T., Kinoshita, H., Sekine, Y., Iemura, S., Natsume, T., and Ichijo, H. Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12301-12305 (2009).
4. Iriyama, T., Takeda, K., Nakamura, H., Morimoto, Y., Kuroiwa, T., Mizukami, J., Umeda, T., Noguchi, T., Naguro, I., Nishitoh, H., Saegusa, K., Tobiume, K., Homma, T., Shimada, Y., Tsuda, H., Aiko, S., Imoto, I., Inazawa, J., Chida, K., Kamei, Y., Kozuma, S., Taketani, Y., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J.*, 28, 843-853 (2009).
5. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.*, 22, 1451-1464 (2008).

以上に加えて、計25報の英語原著論文、14報の英語総説を報告した。

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>