

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分  
平成28年3月15日現在

ストレスシグナルの動的制御機構解明による創薬基盤の確立

Homeostasis Regulation via Stress Signaling and its  
Molecular Basis for Drug Development

課題番号：25221302

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

本研究は、細胞の機能維持に深く関わる4つの根源的なストレスに焦点をあて、最先端の手法を取り入れた生化学・分子生物学的アプローチにより、ストレスの受容・認識の分子機構の解明を目指す。また、これら明らかにした分子機構に基づく創薬基盤の確立に向け、遺伝子欠損マウスを用いた病態モデル解析やスクリーニングによる有用低分子化合物の同定をも目指す。

研究分野：生化学，分子生物学

キーワード：生化学、分子生物学、細胞生物学、細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

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、がん、神経変性疾患、自己免疫疾患、代謝性疾患などをはじめとする多様な疾患の発症原因となる。ホルモンやサイトカインなどの受容体を介したシグナル伝達機構と比して、物理化学ストレスによって活性化されるシグナルは、そのストレスセンサーの分子実体ならびにその動的制御機構について不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は、細胞の機能維持に深く関わる4つの根源的なストレス(酸化ストレス、浸透圧ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリアストレス)に焦点をあて、ストレス受容から細胞応答に至る一連のストレスシグナル分子機構の解明とそれに基づいた新たな創薬基盤の創成を目指すことを研究目的とする。

3. 研究の方法

ストレスの受容・認識の鍵となる分子群（主にASK1/ASK2/ASK3, SOD1/Derlin1, PGAM5）に着目し、「①これらの分子の新たな制御因子の探索による物理化学的ストレス受容・認識の分子機構の解明」、「②これらの分子の遺伝子欠損マウス等を用いた病態モデル研究」、を行うことにより、4つのストレスが関与するヒトの疾患病態を分子機構に基づいて解明する。加えて「③低分子化合物スクリーニング」をあわせて行うことにより、解明した分子機構に基づいた創薬への応用を目指す。また、外部共同研究者との「④構造解析」を進め、得られた知見

の別角度からの検証も行う。

4. これまでの成果

ストレスの受容・認識の分子機構解明に向けた強力なツールとして、我々はこれまでに、全自動画像解析装置を用いたハイコンテントかつハイスループットな画像解析技術を用いたImage-basedのゲノムワイドsiRNAスクリーニング系の構築に成功している。実際、蛍光タグを付加したASK1の量を画像解析装置で定量する系を確立し、siRNAスクリーニング系と組み合わせることで、酸化ストレス依存的なASK1の分解を担うE3リガーゼの同定に成功した。また、注目するストレス応答分子の活性を評価できる抗体を使用して免疫染色を行い、各種ストレス応答分子の活性を可視化した後に、上述した全自動画像解析に供することで、ストレス依存的な活性変動を定量する系の構築し、ゲノムワイドsiRNAスクリーニング系と組み合わせることによって、ストレスの受容・認識を制御する新規因子の探索を複数行っている。例えば、浸透圧ストレス依存的なASK3の活性変動を制御する因子の探索、ミトコンドリアストレス依存的なPGAM5の切断を制御する因子の探索などがあげられ、これらのスクリーニングの完遂により、浸透圧ストレスセンサーやミトコンドリアストレスセンサーなどの同定が期待されるものと考えている。実際、計画を予定していたスクリーニングは、どれもスクリーニングを完了し、既に複数の候補因子の同定に成功している。

ストレスの認識・受容の分子機構解明に向けて、上記のsiRNAスクリーニングの他に、着

目するストレス応答分子の結合分子探索もあわせて行っている。結合分子探索においては、従来の過剰発現した bait タンパク質を用いた Pull-down 法だけでなく、独自の手法を用いて、ストレス応答分子が構成する複合体を単離する方法を確立し、この手法による複合体構成因子の同定も試みている。

また、明らかにしたストレスの受容・認識の分子機構をターゲットとした創薬基盤の確立を目指す目的で、着目する各種ストレス応答分子の遺伝子欠損マウスを用いた病態モデル解析、さらには、低分子化合物スクリーニングによる有用低分子化合物の同定も進めている。我々は、これまでに家族性 ALS の原因となる SOD1 の神経毒性発揮機構として、変異型 SOD1 が ERAD と呼ばれる小胞体膜品質管理機構において機能する膜タンパク質 Derlin-1 に結合し、ERAD を阻害することで小胞体ストレスを惹起し、神経細胞死を誘導することを報告してきた。そこで、FRET 法を用いた SOD1-Derlin-1 結合を評価する系を構築し、東京大学創薬機構が保有する約 16 万化合物の低分子化合物ライブラリーの中から、SOD1-Derlin-1 結合を阻害する化合物の探索を行った結果、この結合に対し阻害活性を持つ化合物の同定に成功した。さらに、この化合物の合成展開により、細胞膜透過性を持つ阻害剤の獲得にも成功した。実際、この化合物を ALS モデルマウスに脳室内持続投与することで ALS 病態の改善をもたらすことも確認している。

各種遺伝子欠損マウスを用いた病態モデル解析からは、ASK1 が感作された CD4<sup>+</sup>T 細胞における IL-17 の産生に寄与した結果、接触性皮膚炎を促進するとの知見が得られた。また、PGAM5 欠損マウスが様々な代謝性ストレス（飢餓・低温ストレス、高脂肪食負荷）に対し、耐性を示すことを見出し、ミトコンドリア局在のストレス応答分子が、*in vivo* においては全身代謝制御因子として機能している可能性を見出した。現在、ASK1 ならびに、ASK1 の活性制御因子の欠損マウスを用いたその他の各種病態モデルにおいても、表現型を見出している複数のモデルが存在し、これらの病態発症メカニズムにおける各々のストレス応答分子の役割について解析を進めている。

## 5. 今後の計画

今後は、大規模スクリーニングによって得られた因子の詳細な解析を通じ、ストレス認識・受容の分子機構にアドレスするとともに、既に表現型を見出している各種病態モデルにおけるそれぞれのストレス応答分子の役割の詳細を明らかにしていく。複雑に絡み合ったストレスシグナル伝達機構を分子レベルで丁寧に解明することで、生命の機能維持の根幹に関わる重要な知見が得られるとともに、医学薬学分野における新たな疾患治療法・診断法の開発にも繋がるものと期待している。

## 6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

- Hattori, K., Naguro, I., Okabe, K., Funatsu, T., Furutani, S., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte function. *Nat. Commun.*, in press.
- Sekine, S., Yao, A., Hattori, K., Sugawara, S., Naguro, I., Koike, M., Uchiyama, Y., Takeda, K. and Ichijo, H. The ablation of mitochondrial protein phosphatase Pgam5 confers resistance against metabolic stress. *EBioMedicine*, in press.
- Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. and Ichijo, H. The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, 51, 81-89 (2016).
- Watanabe, T., Sekine, S., Naguro, I., Sekine, Y. and Ichijo, H. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1(ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. *J. Biol. Chem.*, 290, 10791-10803 (2015).
- Mosallanejad, K., Sekine, Y., Ishikura-Kinoshita, S., Kumagai, K., Nagano, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Naguro, I. and Ichijo, H. The DEAH-Box RNA Helicase DHX15 activates NF- $\kappa$ B and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses. *Sci. Signal.*, 7, ra40 (2014).
- Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. *Sci. Signal.*, 7, ra8 (2014).
- Mizukami, J., Sato, T., Camps, M., Ji, H., Rueckle, T., Swinnen, D., Tsuboi, R., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1 promotes the contact hypersensitivity response through IL-17 production. *Sci. Rep.*, 4, 4714 (2014).
- Homma, K., Fujisawa, T., Tsuburaya, N., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Takeda, K., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Naguro, I. and Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol. Cell*, 52, 75-86 (2013).

## 受賞

平成 25 年度 持田記念学術賞

平成 27 年度 高峰記念第一三共賞

ホームページ

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