

ASK ファミリーによるストレス応答 ～細胞がストレスを感じる仕組みと疾患～

一條 秀憲

要約：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。我々は、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しようとしている。特に ASK 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い、酸化ストレス、浸透圧ストレス、小胞体ストレス、細菌感染等に対する新たなストレス応答機構が徐々に解明されつつある。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、ストレス応答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。

1. はじめに

近年、地球規模での環境の劣化が深刻化している。オゾン層破壊による紫外線量の増加や二酸化炭素増加による地球温暖化をはじめ、排気ガスや工場廃液などの有害化学物質による汚染、さらには薬剤耐性菌や新型インフルエンザの出現等々、地球環境を劣化させる環境ストレスの種類ならびに量が激増しつつある。環境ストレスの解消は社会的要請度の極めて高い問題であるが、生物学的観点からはヒトや動植物がどのようにして環境ストレスに対処・適応するかを明らかにすることが未解明の重要な問題である。次々と出現してくる新たな環境ストレスに対する細胞生物学的反応(=ストレス応答)の分子機構を明らかにすることは、疾患・創薬研究にとって極めて重要な研究課題である。細胞における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明らかにすべきことが多く残されている。私たちは、「細胞がストレスを感知し、ストレスに適切に応答する仕組み」を明らかにするために、物理化学的ストレスによる MAP キナーゼファミリーの活性化機構とその病態生理学的意義を中心に解析している。本稿では、ASK-MAP キナーゼファミリーの解析を軸にストレス応答の分子機構から創薬基盤の創出を目指す私たちのアプローチの一端を紹介する。

2. 研究のねらい

紫外線、熱、放射線などの物理的ストレス、ホルムアルデヒド、環境ホルモンなどの化学的ストレス、あるいはウイルス、細菌などの生物的ストレス等に代表される環境ストレスに対し、細胞は多種多様なストレス応答機構をもって対処・適応することが明らかになりつつある。一方で、ストレス応答機構の破綻が、神経変性、癌、アレルギー、糖尿病など、多様な疾患の原因となることが分子レベルで明らかになりつつあり、にわかに注目を集めている。我々は、「細胞がストレスを感知し、ストレスに適切に応答する仕組み」を明らかにするために、環境ストレスによる MAP3K ファミリー活性化機構について解析している(図1)。

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。そのため、われわれは特に ASK1-MAP キナーゼ系ならびに ASK ファミリー分子群の解析を軸に据え、two-hybrid スクリーニングならびにプルダウン法による結合タンパク質解析とノックアウトマウス解析を主な手法として MAP3K ファミリー結合タンパク質の

キーワード：ストレス応答、環境ストレス、MAP キナーゼ、ASK ファミリー、アポトーシス

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室

JST・戦略的創造研究推進事業・CREST (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

e-mail: ichijo@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Title: ASK family proteins in stress and disease-“How cells sense stress”. Author: Hidenori Ichijo

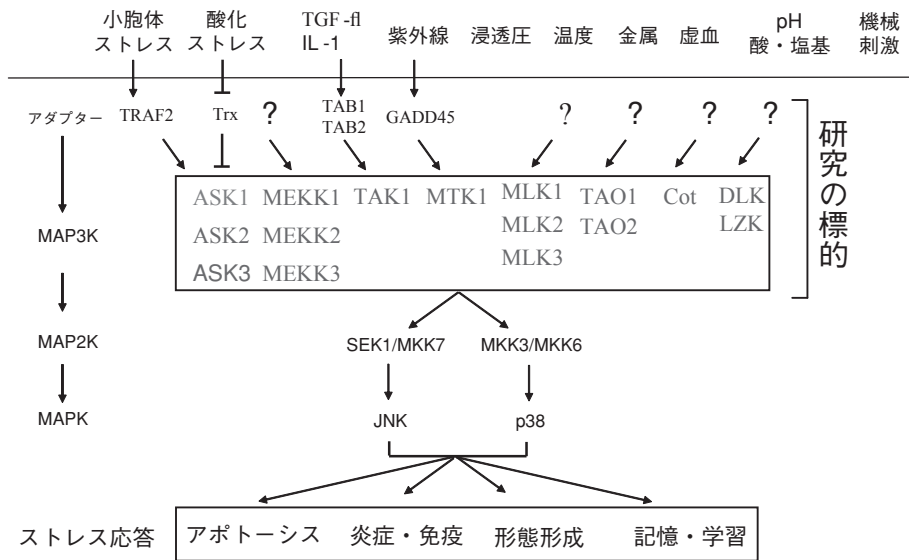


図1 ストレスの受容・認識・変換点 (分子スイッチ) としてのMAP3K

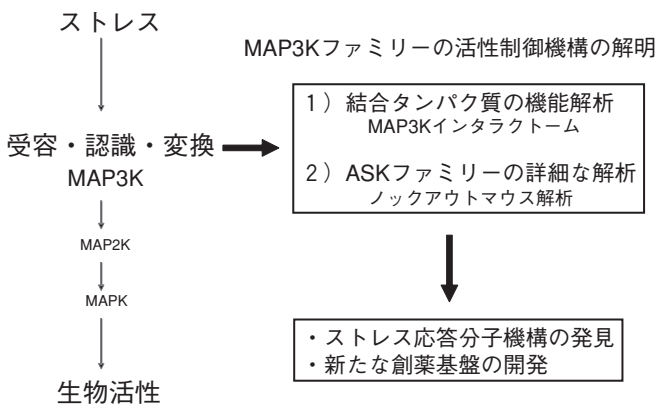


図2 研究のねらい

機能解析を行い、細胞のストレス応答分子機構の解明と創薬基盤の創出を目指している (図2)。

3. 研究成果

これまでの研究により、ASK1は様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をコントロールするためのシグナル伝達系として機能していることが明らかになってきた(1)。ASK1ノックアウトマウスの解析により、ASK1が酸化ストレスや小胞体ストレスによるアポトーシスに必要なシグナル分子であることも明らかになり、またASK1がポリグルタミン病やアルツハイマー病において認められる神経細胞死のメディエーターとしてこれらの疾患に深く関わっていることも

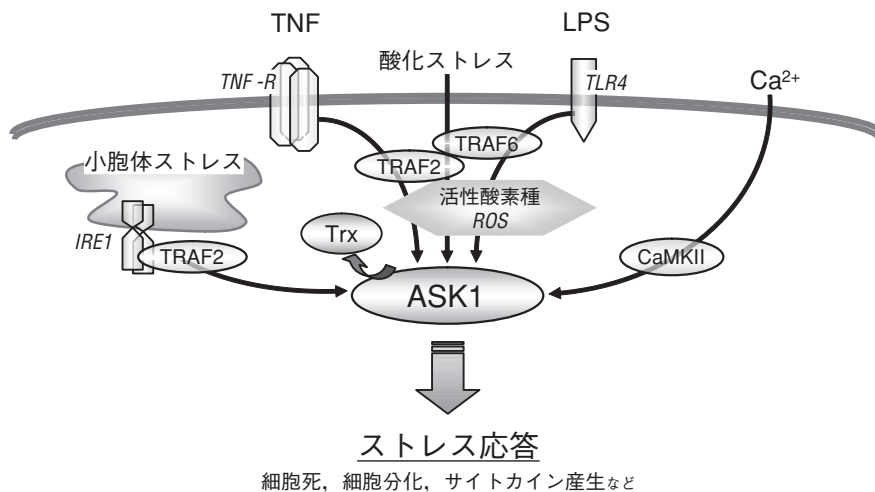


図3 Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) の活性化機構

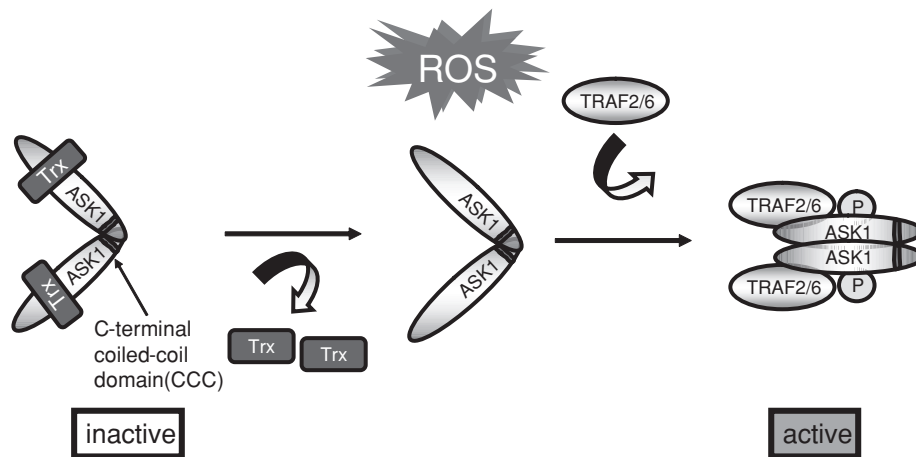


図4 ASK1 シグナルソームと活性化機構

示唆されている(2-4)。一方、ASK1 は一部の Toll-like receptor の下流で主に p38 の活性化を選択的に担うことによって自然免疫応答に必須の働きをすることも明らかになってきた(図3)(5)。すなわち ASK1 は、様々な環境変化に応じて、JNK ならびに p38 MAP キナーゼ経路を刺激の種類や細胞の種類特異的に活性化する MAP3K として機能する分子である。これまでにわれわれは ASK1 と高い相同性をもつ分子として ASK2 を同定しているが、最近、もう一つの ASK1 相同分子として ASK3 を見出したことから、哺乳類 ASK ファミリーが3つの分子から構成されることも明らかとなった。多種多様なストレスに応答するために、ある時はこれら3つの分子が協調的に、またある時はそれぞれが独自の活性化機構に基づいて互いに独立してストレス応答のシグナル伝達に寄与しているものと考えられ、それぞれの分子の活性化機構について解析を進めている。以下、酸化ストレス、酸性化ストレス、浸透圧ストレスならびに UV ストレス等に関する具体的な研究成果について簡潔に記す。

1) ASK ファミリー結合タンパク質の同定によるストレス応答機構の解明

培養細胞からの結合タンパク質プルダウン法ならびに酵母 two-hybrid スクリーニングによる ASK ファミリー活性制御分子の探索ならびに機能解析を行い、様々なストレスが ASK ファミリーの活性化に至るメカニズムについて解析した。特に ASK1 に関しては、(1) ASK1 は定常状態で C 末端のコイルドコイル領域を介して静的オリゴマーを形成しているが、ROS (活性酸素)により ASK1 活性阻害因子である Thioredoxin (Trx) が解離し、(2) 相反して ASK1 活性化因子である TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) およ

び TRAF6 が ASK1 へリクルートされることで ASK1 が活性化されるという、レドックスシグナルの分子スイッチとして機能する ASK1 複合体 (ASK1 signalosome) の役割を明らかにした(図4)(6)。さらに、これまで機能未知であった ASK1 の N 末端側に存在するコイルドコイル領域 (NCC) が酸化ストレス依存的な自身の分子間相互作用 (ホモオリゴマー化) と活性化に必要であることも明らかになった。すなわち、Trx は ASK1 の N 末端領域を介したホモオリゴマー形成を阻害することでその活性を負に制御し、逆に TRAF2 および TRAF6 は N 末端領域を介したホモオリゴマー化を促進させることで ASK1 の活性化に関与することが示唆されている。

一方、新たな ASK1 結合タンパク質として同定・命名した PGLM (phosphoglycerate mutase-like membrane protein) は、N 末端に膜貫通ドメイン、C 末端に phosphoglycerate mutase (PGAM) ドメインを有し、そのアミノ酸配列が線虫から哺乳類まで高度に保存されたタンパク質である。PGLM は、PGAM ファミリーに属するものの PGAM 活性は示さず、His105 を活性中心とする全く新しい構造をもったセリン・スレオニン特異的プロテインホスファターゼとして機能することが判明した。PGLM は、定常状態でリン酸化されている ASK1 の C 末端領域を脱リン酸化することから、ASK1 の C 末端に存在する「活性を負に制御するリン酸基」を脱リン酸化することによって ASK1 を活性化するだろうと考えられる。また、PGLM のホスファターゼ活性の至適 pH がこれまで知られている他のプロテインホスファターゼより酸性領域であることから、細胞内の酸性化に伴ってその活性が亢進することが示唆され、実際に細胞に酸を処置すると ASK1

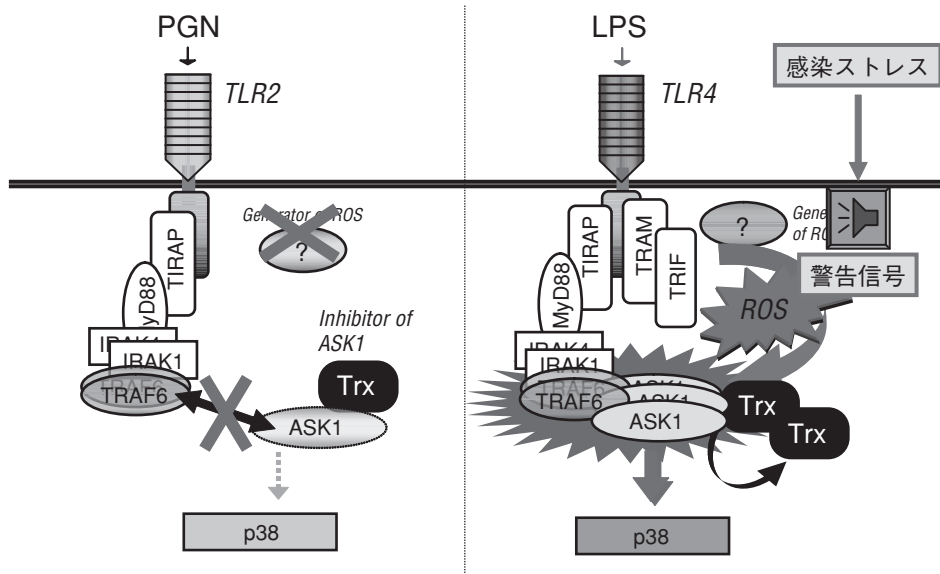


図5 LPS-TLR4 下流シグナルに特異的な ASK1-p38 経路の活性化メカニズム

は活性化されるが、PGLM をノックダウンした細胞ではその活性化は顕著に減弱していた。このことから、PGLM は酸化ストレスを認識して細胞内シグナル伝達へと変換する上で重要な分子であることが示唆されている。

一方、ASK1-p38 経路は自然免疫応答に重要な働きを持つことも明らかになった。TLR4 リガンド刺激特異的な ASK1-p38 経路の活性化メカニズムを検討したところ、ASK1 および p38 の活性化ならびに TRAF6 と ASK1 との結合は、活性酸素種を介してされることが明らかになった (図5)。

さらに、ASK3 に関する結合タンパク質解析の結果から、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。

2) 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

ASK ファミリーノックアウトマウスの作成・解析からもストレス応答シグナルに関する新たな知見が得られつつある。最近、ASK2 ノックアウト (KO) マウスを作成し、その皮膚腫瘍の形成について検討した。ASK2KO マウスは、ASK1KO マウスと同様、ほぼ正常に生まれ、非ストレス条件下では普通に生育する。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 法によって検出したところ、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 刺激による下流 MAP キナーゼ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。これらの結果より、ASK2 は DNA 障害ストレス (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、新たながん抑制遺伝子としての ASK2 の機能が注目されている。

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結合タンパク質による制御機構の存在を想定し、ASK ファミリー以外の MAP3K ファミリーをベイトとする酵母 two-hybrid スクリーニングならびに結合タンパク質プルダウン法によって解析を行ってきた。その過程で、MAP3K ファミリーのうち、これまでに MEKK2, MEKK3, TAO1, TAO2, Tpl-2, DLK についてスクリーニングを行い、それぞれの分子につき極めて興味深い結合分子を複数同定した。紙面の都合もあり、ここではその代表例として DLK 結合タンパク質について紹介する。DLK のキナーゼアッセイ系を指標としてさまざまな変異体解析を行った結果、DLK の活性

化が DLK 自身のキナーゼ領域の活性化ループ内に存在するセリン残基 (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。以前より、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、実際に 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 にてノックダウンすると、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 MAPK-KK 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 の活性化が増強したことから、UV ストレスによる 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つつある。

4. 今後の展望

私たちは、ストレス応答シグナル伝達機構のプロトタイプとしての ASK1-MAP キナーゼ系ならびにストレスセンサーとしての MAP3K ファミリーについて構造機能相関に基づく分子機能の比較解析を行い、ストレス応答機構の解明とその創薬基盤開発を全体目標として研究を行ってきた。その結果、現在までにこれらのストレス応答シグナル系が、炎症、がん、神経変性などの発症に深く関与することが徐々に明らかになるとともに、これらの研究成果が新しい創薬基盤の開発へと発展しつつあり、MAP3K ファミリー分子群の結合タンパク質解析は、当初の予想通り新たなストレス応答分子機構の解明に大きく寄与している。今後もさらなる結合タンパク質スクリーニングを継続しながらこれらの分子の機能解析を行うことにより、「ストレス応答シグナルの破綻と疾患発症メカニズム」の解明を目指したい。

文 献

- 1) 武田弘資, 他. 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. 羊土社; 2006. p. 51-59.
- 2) 門脇寿枝, 他. 実験医学. 2006;24(10):1553-1560.
- 3) Sekine Y, et al. Curr Mol Med. 2006;6:87-97.
- 4) Hayakawa T, et al. Microbes Infect. 2006;8:1098-1107.
- 5) Matsuzawa A, et al. Nat Immunol. 2005;6:587-592.
- 6) Noguchi T, et al. J Biol Chem. 2005;280:37033-37040.

著者プロフィール

一條 秀憲 (いちじょう ひでのり)

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室, 教授, 歯学博士.

◇ 1990 年 東京医科歯科大学大学院歯学研究科博士課程修了, '90 年 Ludwig 癌研究所 Uppsala Branch 留学, '92 年 東京医科歯科大学 歯学部 口腔病理学講座・助手, '95 年(財)癌研究会 癌研究所 生化学部・研究員, '98 年 東京医科歯科大学 大学院歯学総合研究科 分子情報伝達学分野・教授, '02 年 東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室・教授, 現在に至る. ◇研究テーマ: 大学院生から癌研時代まで, ずっと宮園浩平先生 (現東大医学部分子病理・教授) に師事し, 一貫して TGF- β のシグナル伝達. '98 年に独立する頃から, ASK ファミリーの解析を中心にストレス応答のシグナル伝達. ◇趣味: キャンプで飲み食い.

