

多様な翻訳後修飾を介したストレス応答シグナル伝達の制御機構

平田 祐介, 松沢 厚

1. はじめに

生体は、紫外線や活性酸素などの細胞障害性の刺激や、病原体感染など、さまざまなストレスに日常的にさらされており、個々のストレスに対して適切に対処することで、その恒常性を維持している。ストレスには、種類の違いがあるだけでなく、個々のストレスにも強度や持続時間などの質的な違いが存在するため、ストレスを受けた細胞は、それらの違いを敏感に感知し、状況に応じて最適な応答を誘導する必要がある。たとえば、紫外線や活性酸素などによってDNA損傷を受けた細胞は、損傷が軽度の場合には、細胞周期の休止やDNA修復機構の活性化によって生存・増殖を維持しようとするが、損傷が重度の場合には、細胞老化と呼ばれる不可逆的な増殖停止、あるいは細胞死を自ら誘導することで、生存・増殖を放棄する。このように、ストレスに応じて細胞が適切な応答を誘導するためには、感知したストレスの情報を細胞内に正確に伝えるシグナル伝達機構が重要な役割を果たす。ストレス応答に関わるシグナル伝達機構の破綻は、がんや自己免疫疾患等のさまざまな疾患発症の原因となることから、その詳細な仕組みの理解は、生物学的な観点からだけでなく、疾患の病態解明や治療戦略開発の観点からも重要である。

ストレス応答キナーゼASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) は、MAPキナーゼ経路の最上流のMAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3キナーゼ) であり、活性酸素、病原体感染、小胞体ストレスなど、さまざまなストレスに応答して活性化し、活性化したASK1は、その基質となるMAPキナーゼキナーゼ (MAP2キナーゼ) をリン酸化して活性化し、さらにその下流のストレス応答性MAPキナーゼであるJNK (c-jun N-terminal kinase) やp38はMAP2

キナーゼによりリン酸化を受けて活性化する。このようなリン酸化反応のリレーによって、ASK1は受けたストレスの情報を細胞内に伝達し、細胞死や炎症など多様な細胞応答を誘導する¹⁻⁴⁾。これまでに我々は、ASK1が約2000kDaにも達する巨大な複合体 (ASK1シグナロソーム) を形成していることを見いだしており⁵⁾、この複合体構成因子について、生化学的・遺伝学的スクリーニングによる探索・同定、および詳細な機能解析により、実際にASK1の活性化を厳密かつ適切に制御する上で重要な役割を担うことを明らかにしてきた。最近我々は、ASK1のユビキチン化制御因子として、ユビキチン化酵素Roquin-2および脱ユビキチン化酵素USP9X (ubiquitin-specific protease 9X) の同定に成功し、これらの分子によってASK1のユビキチン化が可逆的な制御を受けることで、ASK1活性化およびその下流における細胞死誘導が厳密に制御される機構を明らかにした⁶⁻⁸⁾。さらに最近、そのスクリーニングの過程で同定した機能未知のユビキチン化酵素TRIM48 (tripartite motif 48) の機能解析から、TRIM48が、ASK1活性化抑制因子であるアルギニンメチル化酵素PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) をユビキチン化し、分解に導くことで、ASK1活性化を正に制御する機構を明らかにした⁹⁾。したがって、ASK1シグナロソームは、ASK1自身、さらにはその構成因子のリン酸化・ユビキチン化・メチル化などの翻訳後修飾をストレス刺激に応じて調節することにより、ASK1活性化を厳密に制御しているものと考えられる。本稿では、ストレス応答キナーゼASK1の多様な翻訳後修飾を介した活性調節機構と、その生理的・病理的意義について、最近の我々の研究成果を基に概説する。

2. ASK1シグナロソームと活性酸素によるASK1活性化機構

我々は、ASK1活性化制御機構を解明する上で鍵となるASK1活性制御因子の実体を捉えるため、ゲル濾過クロマトグラフィーを利用した分子量の解析を行ったところ、ASK1が定常状態で約2000kDaの複合体 (ASK1シグナロソーム) を形成することを見いだした (図1A)⁵⁾。この結果は、ASK1活性化が多様な分子との会合によって制御を受けていることを示すものであり、実際、具体的な構成因子として初期に同定されたのが、活性酸素によるASK1

東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野 (〒983-0836 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)

Regulatory mechanisms of stress-responsive signaling pathways mediated by various types of post-translational modifications

Yusuke Hirata and Atsushi Matsuzawa (Laboratory of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900815

© 2018 公益社団法人日本生化学会

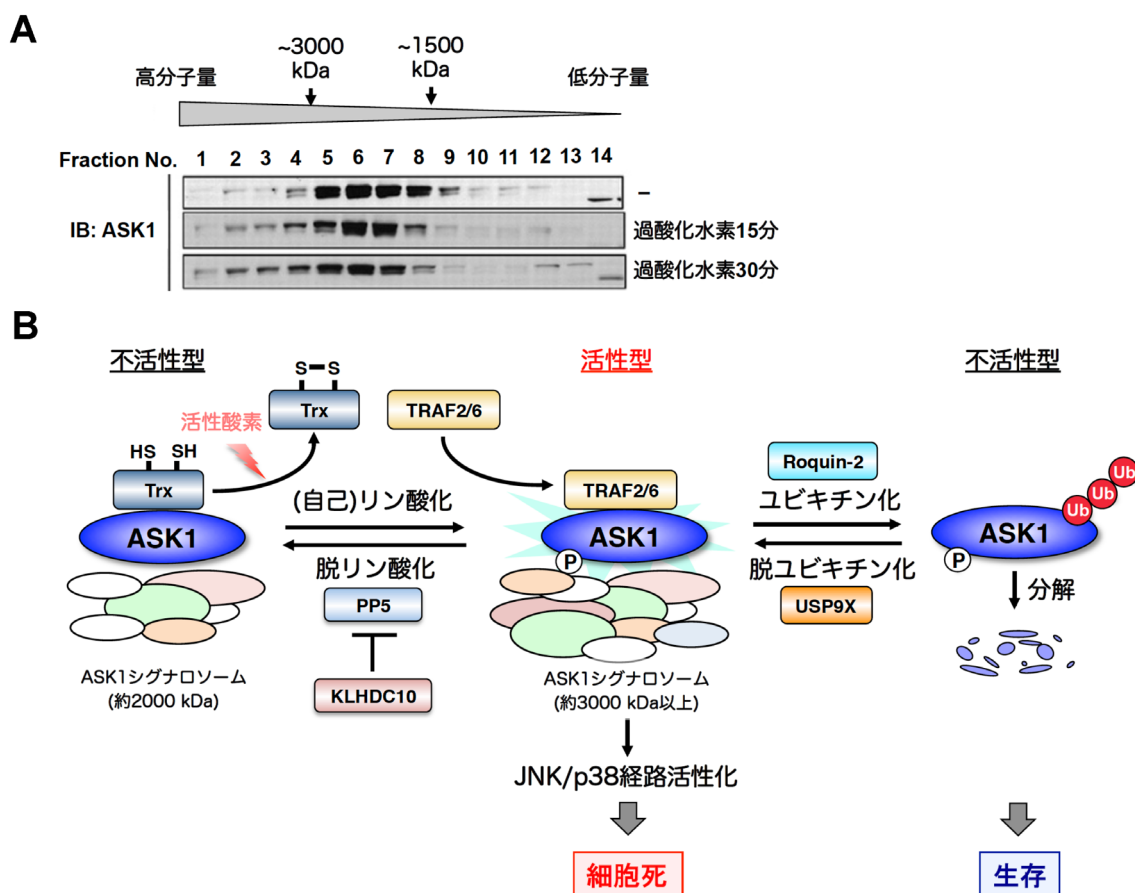


図1 ASK1シグナロソームと活性酸素によるASK1活性制御機構

(A) ASK1シグナロソームの分子量解析. HEK293細胞を過酸化水素刺激した後に回収し, ゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し, immunoblot (IB) でASK1を検出した. ASK1のバンドは, 過酸化水素刺激依存的に高分子量側にシフトする. (B) 活性酸素によるASK1活性制御機構. 定常状態では, 還元型TrxがASK1に結合して活性化を阻害している. 活性酸素によりTrx分子内のシステイン残基どうしがジスルフィド結合し, 酸化型になると, TrxはASK1から解離し, TRAF2またはTRAF6がASK1に結合することで, ASK1は自己リン酸化によって活性化される. このように, ASK1シグナロソーム構成因子が活性酸素依存的に解離・会合することで, ASK1活性化の強弱や持続時間などが適切かつ厳密に制御される.

活性化の直接的な制御因子である, レドックス (酸化還元) 応答性分子チオレドキシン (thioredoxin: Trx) およびTRAF (*TNF* receptor-associated factor) ファミリー分子のTRAF2・TRAF6である^{2, 5, 10}. 定常状態において, 還元型TrxはASK1のN末端領域に結合しASK1ホモオリゴマー化を阻害する¹¹. 酸化ストレスなどにより活性酸素が産生され, Trxが酸化型となると, TrxはASK1から解離し, 引き続いてTRAF2やTRAF6がASK1に結合することで, ASK1のホモオリゴマー化が増強され, 自己リン酸化によってASK1の活性化が起こる (図1B)^{2, 5, 10, 11}. このASK1-Trx複合体は, 活性酸素という物理化学的な情報 (ストレス) を, リン酸化シグナルという生物学的な情報に変換する分子スイッチの役割を果たしていると考えられる.

興味深い点は, 炎症性サイトカインTNF- α や過酸化水素処置によってASK1活性化を誘導すると, ASK1シグナロ

ソームがさらに高分子量の複合体 (約3000kDa以上) を形成する点で (図1A, 1B)⁵, ストレス刺激に応じて, TrxやTRAF2, TRAF6といったASK1シグナロソーム構成因子がリモデリング (解離・会合) を行うことで, ASK1活性化が複雑な制御を受けていることを示唆している. 特に, ストレス刺激依存的にASK1シグナロソームの分子量が大幅に増大することから, 活性化自体もしくはその後の活性化持続・収束において重要な役割を担う分子が, 活性化依存的に会合してくるものと想定される. ASK1活性化の過不足や破綻が生じた場合には, がんや自己免疫疾患などさまざまな疾患につながる事が知られており¹², ASK1活性化は, 正・負の制御因子によって, そのバランスが厳密に制御されなければならない. そのため, ASK1関連疾患の治療戦略開発の上では, ASK1活性化のon/offの制御のみならず, その微細な制御を可能にする創薬ターゲット分子の同定が重要と

なることから、我々は次に、ASK1活性化の持続・収束のような「微調整」を担う分子機構の解明を目標とした。

3. ASK1の持続的活性化の制御機構

ASK1シグナルソームの発見以降、ASK1の持続的活性化を制御する因子が、次々に同定された。ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングにより同定されたのが、ASK1を基質とする脱リン酸化酵素PP5 (protein phosphatase 5)¹³⁾の活性抑制因子KLHDC10 (kelch domain containing 10)である⁶⁾。KLHDC10は、活性酸素刺激依存的にPP5との結合が増強し、そのホスファターゼ活性を抑制することでASK1リン酸化状態を維持し、その持続的な活性化をもたらす(図1B)。また、過酸化水素刺激依存的にASK1に結合する分子をプルダウンアッセイによって探索した結果、脱ユビキチン化酵素USP9Xを同定した⁷⁾。この同定を契機に、ASK1が活性化後にユビキチン化を受け、分解に導かれることが見いだされ、USP9Xがこのユビキチン化を抑制することでASK1が分解を免れ、活性化が持続することが明らかになった。そこで我々は次に、ASK1ユビキチン化を担うユビキチン化酵素の同定を試みた。酸化ストレス刺激に伴うASK1の分解を指標とし、約1500のユビキチン関連遺伝子を対象としたsiRNAスクリーニングを行い、発現抑制によってASK1分解が顕著に抑制される遺伝子として、最終的に遺伝子産物がユビキチン化酵素活性ドメインを持つ四つの候補が得られた。これら4遺伝子について、過剰発現によってASK1ユビキチン化が亢進し、発現抑制によってASK1ユビキチン化が減弱する遺伝子として、Roquin-2およびTRIM48が同定された⁸⁾。詳細な解析から、Roquin-2がASK1を基質とするユビキチン化酵素であることが判明し、Roquin-2が酸化ストレス刺激依存的にASK1と結合し、ユビキチン化によって分解を促進することを明らかにした⁸⁾。実際に、Roquin-2の発現抑制時には、酸化ストレス刺激依存的なASK1およびその下流のp38, JNKの持続的な活性化が増強し、細胞死が亢進する。したがって、USP9XとRoquin-2が、酸化ストレス刺激に応じて活性化したASK1のユビキチン修飾状態を微調整することで、ASK1の持続的活性化を厳密に制御し、生存・細胞死の運命決定を調節していることが明らかとなった(図1B)^{7,8)}。

4. 多様な翻訳後修飾によるASK1活性化の新規調節機構

上述のsiRNAスクリーニングでRoquin-2とともに同定したTRIM48は、ヒトでは約100種類ほど存在するTRIMファミリー分子の一つで、ユビキチン化酵素活性ドメインであるRINGドメインを保持するが、まったく報告例がない機能未知の分子であった。そこで我々は、ASK1活性制御と

の関連を探るため、HEK293A細胞において、スクリーニングで同定した4遺伝子を各々発現抑制した際の、過酸化水素刺激によるASK1活性化を評価したところ、Roquin-2を含む3遺伝子の発現抑制下では、予想どおりASK1活性化の亢進が認められた一方、TRIM48発現抑制下では、逆にASK1活性化が抑制されることが判明した(図2A)⁹⁾。さらに、野生型TRIM48を過剰発現した場合にはASK1活性化が亢進した一方、ユビキチン化酵素活性を欠損した変異型TRIM48を過剰発現した場合にはASK1活性化への影響が認められなかったことから、TRIM48はユビキチン化酵素活性依存的にASK1活性化を促進することが示唆された。

TRIM48はRoquin-2と同様にASK1ユビキチン化を促進する一方、ASK1活性化に関しては、それぞれ正・負の作用、すなわち真逆の作用を有する。我々は、これらの現象を矛盾なく説明可能なモデルとして、TRIM48がASK1活性化を促進する結果、Roquin-2によるASK1ユビキチン化が結果的に亢進することを想定した。実際に、Roquin-2欠損細胞においてTRIM48を過剰発現しても、ASK1ユビキチン化の促進が認められなかったことから、このモデルが正しいことが示された。そこで、TRIM48のASK1活性制御に関わるユビキチン化基質を探索するため、プルダウンアッセイによりTRIM48の結合因子を探索したところ、アルギニンメチル化酵素PRMT1を同定した。PRMT1は、ASK1のArg78, Arg80をメチル化することで、Trxとの結合を増強し、酸化ストレス刺激依存的なTrxとの解離を阻害することによって、ASK1活性化を抑制することが報告されている¹⁴⁾。したがって、TRIM48は、ASK1活性化抑制因子PRMT1をユビキチン化し、分解に導く結果、ASK1活性化を正に制御していることが予想された。実際に、TRIM48過剰発現によってPRMT1のユビキチン化および分解が亢進すること、TRIM48発現抑制下では、酸化ストレス刺激時に、Trx-ASK1間の結合増強に伴って、ASK1活性化が減弱することが示された。

そこで、TRIM48によるASK1活性化促進作用の生理的・病理的意義を明らかにするため、まず、細胞レベルで酸化ストレス誘導性細胞死への寄与を調べた。TRIM48発現抑制下では、酸化ストレス誘導剤diamide処置時の細胞死が顕著に抑制されたが、PRMT1を同時に発現抑制したところ、細胞生存の有意な回復が認められたことから、TRIM48が、PRMT1の機能減弱によってASK1活性化に伴う細胞死を促進することが示唆された。さらに、個体レベルでのTRIM48の重要性を検討するため、免疫不全マウスへのがん細胞皮下移植モデルにより、腫瘍形成へのTRIM48の寄与を調べた。A549細胞に野生型TRIM48または変異型TRIM48を安定発現した細胞株を皮下移植すると、野生型TRIM48の安定発現株を移植した場合のみ、腫瘍サイズの顕著な縮小が認められた(図2B)。摘出した腫瘍切片中のアポトーシス細胞数を、TUNEL染色によって

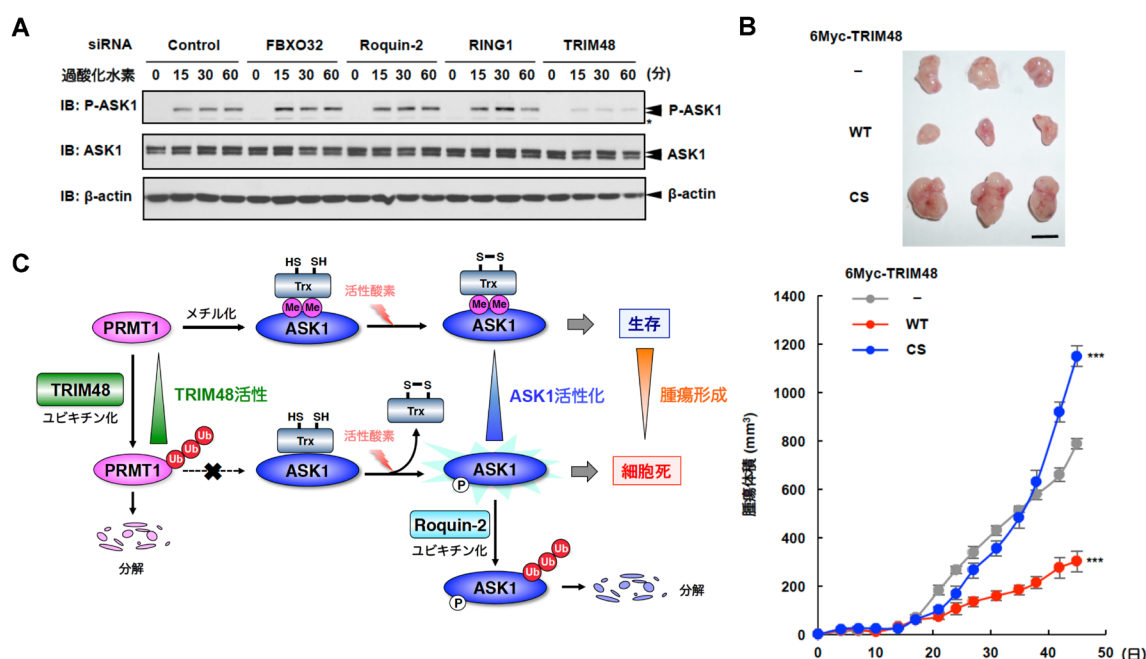


図2 TRIM48によるASK1活性促進作用とその分子機構

(A) HEK293A細胞において、siRNAスクリーニングで同定したASK1分解に寄与する4遺伝子（FBXO32, Roquin-2, RING1, TRIM48）を発現抑制し、過酸化水素刺激を行った際のASK1リン酸化状態（活性化）の解析。FBXO32, Roquin-2, RING1の発現抑制下では、ASK1活性化が亢進した一方で、TRIM48発現抑制下では、ASK1活性化が減弱した。IB: immunoblot, *は非特異的バンド。(B) 6Mycタグ付きの野生型TRIM48 (WT) または変異型TRIM48 (CS) を安定発現するA549細胞を樹立し、ヌードマウスに皮下移植してから45日後に腫瘍を摘出し、撮影を行った（上の写真）。黒いバーは10mmを表す。下のグラフは、同様の実験について、経時的な腫瘍体積（腫瘍形成）を比較したものである。平均値 \pm S.E.M. [コントロール(-), WT: n=6, CS: n=5]. ***: $p < 0.001$ (コントロール細胞との比較で、一元配置分散分析の後、ダネットの検定を行った)。腫瘍細胞内では、代謝異常等に起因した活性酸素の産生上昇が起ることが知られており、TRIM48が活性酸素によるASK1活性化を促進し、細胞死を亢進することで、腫瘍増殖が抑制されたものと想定される。(C) TRIM48によるASK1活性制御機構。PRMT1は、ASK1のTrxとの結合に重要なArg78, Arg80をメチル化することでTrxとの結合を増強し、活性酸素刺激時のTrx解離の阻害により、ASK1活性化を抑制する。TRIM48によってPRMT1がユビキチン化・分解されると、TrxがASK1から解離しやすくなり、ASK1活性化が促進する。このTRIM48によるASK1活性化促進作用は、酸化ストレス誘導性の細胞死を促進し、腫瘍形成の抑制に重要な役割を果たす。

調べたところ、野生型TRIM48の安定発現株の移植片では、アポトーシス細胞数の著しい増加が認められたことから、TRIM48は、ASK1活性化に伴う細胞死亢進作用によって、腫瘍形成を抑制することが示唆された。

以上の結果より、TRIM48は、ASK1活性化抑制因子PRMT1のユビキチン化・分解を介して、ASK1のメチル化・ユビキチン化・リン酸化状態を調節することでASK1活性制御に寄与し、酸化ストレス誘導性の細胞死や腫瘍形成の抑制において、重要な役割を果たしていると考えられる（図2C）。

5. おわりに

TRIM48は、酸化ストレス刺激の有無によらずASK1に結合することから、恒常的にASK1シグナロソームを構成し、ASK1活性調節に寄与していると考えられる。しかし興味深いことに、TRIM48によるASK1活性化促進作用は、

酸化ストレス刺激依存的に増強することが示唆されており、現在我々は、TRIM48の活性調節機構と、そのがん発症・進展との関連の解明に向けた研究に着手している。

本稿で紹介したASK1以外にも、同じMAP3キナーゼファミリー分子であるTAK1をはじめ、さまざまなストレス応答に関わるキナーゼ分子が、その活性制御因子とともに多様な翻訳後修飾を受けることで活性調節を受けることが報告されてきている¹⁵⁾。ストレス刺激に応じたキナーゼ分子の活性化は、そのon/offだけでなく、タイミングや持続時間、場所などがバランスよく厳密に制御されることによって初めて適切な生理応答が誘導される。このような厳密な制御を実現する上で、リン酸化のみならず、ユビキチン化やメチル化のような多様な翻訳後修飾によるキナーゼ分子の活性調節が不可欠である。以上のことから、キナーゼ分子の多様な活性制御因子や翻訳後修飾を介した活性調節機構の解明は、ストレス応答シグナルのバランス制

御の破綻が原因で生じる諸疾患の新規創薬ターゲットや治療戦略の開発につながるものと期待される。

謝辞

この一連の研究は、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室の一條秀憲教授のご指導・ご協力のもとで行ったものです。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。また、本研究に携わっていただいた多くの研究者の方々に、深く感謝致します。

文 献

- 1) Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90–94.
- 2) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.*, **17**, 2596–2606.
- 3) Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., & Ichijo, H. (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.*, **6**, 587–592.
- 4) Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2008) Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1325–1336.
- 5) Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., & Ichijo, H. (2005) Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37033–37040.
- 6) Sekine, Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Sono, N., Iemura, S., Natsume, T., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K., & Ichijo, H. (2011) The kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. *Mol. Cell*, **48**, 692–704.
- 7) Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2009) 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.
- 8) Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2014) Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. *Sci. Signal.*, **7**, ra8.
- 9) Hirata, Y., Katagiri, K., Nagaoka, K., Morishita, T., Kudoh, Y., Hatta, T., Naguro, I., Kano, K., Udagawa, T., Natsume, T., et al. (2017) TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitin-dependent degradation of the ASK1 negative regulator PRMT1. *Cell Reports*, **21**, 2447–2457.
- 10) Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell*, **2**, 389–395.
- 11) Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., & Ichijo, H. (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-Terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 8152–8163.
- 12) Soga, M., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2012) Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway. *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 439587.
- 13) Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H., & Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.*, **20**, 6028–6036.
- 14) Cho, J.H., Lee, M.K., Yoon, K.W., Cho, S.G., & Choi, E.J. (2012) Arginine methylation-dependent regulation of ASK1 signaling by PRMT1. *Cell Death Differ.*, **19**, 859–870.
- 15) Hirata, Y., Takahashi, M., Morishita, T., Noguchi, T., & Matsuzawa, A. (2017) Post-translational modifications of the TAK1-TAB complex. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 205.

著者寸描

●平田 祐介 (ひらた ゆうすけ)



東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野助教。薬学（博士）。

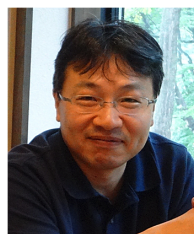
■略歴 2007年東京大学薬学部卒業。12年同大学院薬学系研究科博士課程修了・博士（薬学）。12～14年大阪大学微生物病研究所細胞制御分野特任研究員。14年より現職。

■研究テーマと抱負 家族をはじめ、研究に没頭できる環境を与えてくださっている全ての方々への感謝を大切にしながら、今後も日々研鑽を積み、まだまだ謎に満ちたストレス応答の分子機構を解き明かしていきたい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~eisei/eisei.HP/index.html>

■趣味 将棋、音楽鑑賞、料理。

●松沢 厚 (まつざわ あつし)



東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野教授。薬学（博士）。

■略歴 1992年東京大学薬学部卒業。97年同大学院薬学系研究科博士課程修了・博士（薬学）。キッセイ薬品工業中央研究所研究員、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室助教、准教授を経て、2014年より現職。その間、06～08年カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部客員研究員。

■研究テーマと抱負 活性酸素、病原体感染や薬物など、生体恒常性を乱す全てのストレスに対して、生命維持に不可欠なストレス感知—応答の仕組みについて、ストレスキナーゼを中心としたシグナル複合体でのシグナル制御機構の解析を基に明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~eisei/eisei.HP/index.html>

■趣味 家族で散歩、美術館巡り。