

多様なユビキチン化酵素群によるリン酸化シグナルの制御機構

松沢 厚

1. はじめに

生体や細胞は、環境変化や病原体感染、紫外線・活性酸素といった細胞障害性の刺激など、常にストレスにさらされている。生体はストレスに対して耐性システムを備えており、さまざまなストレス刺激に対して適切な応答を誘導することで、生命の恒常性を維持している。たとえば、病原体感染に対しては免疫を賦活化して病原体を排除し、活性酸素に対しては抗酸化物質の合成や活性酸素によって障害を受けたDNAなどを修復する耐性システムが働く。あるストレスに対して適切な応答を誘導するためには、ストレス刺激を細胞内に正しく伝えるシグナル伝達機構が重要となる。その破綻が多くの疾患の原因となることから、ストレスに対するシグナル伝達機構の理解は疾患の病態解明や治療戦略開発につながる。このようなストレス応答シグナル伝達機構において、キナーゼによるタンパク質リン酸化が中心的な役割を担っていることは周知のとおりである。リン酸基がリレーのバトンのように多彩なシグナル分子に受け渡されることで情報が伝達され、細胞は適切な応答を誘導できる。だが、単純にリン酸化によるシグナル分子のON/OFFだけでは、多彩な生理応答を誘導することはできない。シグナルの複雑なバリエーションを生み出すためには、シグナルの時間的・空間的制御、すなわち、キナーゼの活性化のタイミングや持続時間がどのように調節されるのか、細胞内のどこで活性化するのか、どのようにシグナルの分岐が行われるのか、このようなシグナルの厳密な制御メカニズムが重要である。しかし、その具体的な仕組みは、これまでよくわかっていなかった。

最近我々は、キナーゼやその活性制御分子などリン酸化シグナルに関わる分子がユビキチン化修飾を受けることで、その活性化の開始や持続時間、強度、細胞局在など、

シグナルの時間的・空間的制御が厳密に行われることを見いだした。キナーゼやリン酸化シグナルに関わる分子に対するユビキチン化修飾は、タンパク質分解はもちろん、分子間相互作用の誘起にも関わり、シグナル伝達制御において重要な役割を果たしていることがわかってきた。実際我々は、酸化ストレスや病原体感染などのさまざまなストレスによって活性化するストレス応答キナーゼASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) が、活性化に伴ってユビキチン化され、分解されること、また、そのユビキチン化を正・負に制御する特異的なユビキチン化・脱ユビキチン化酵素を同定し、それらがASK1の活性化とASK1依存的な細胞死の誘導を厳密に制御していることを明らかにした^{1,2)}。さらに、それ以外のTAK1 (TGF- β -activated kinase 1) やNIK (NF- κ B-inducing kinase), MEKK1 (MAP/ERK kinase kinase 1) などのいくつかのキナーゼの制御機構にも、共通にユビキチン化修飾が重要な働きを持つことがわかった³⁻⁵⁾。本稿では、ストレス刺激に対して多彩な生理作用を生み出すことができる、ユビキチン化によるリン酸化シグナルの新たな制御機構について、最近の我々の研究成果を基に概説する。

2. ストレス応答キナーゼASK1に特異的なユビキチン化酵素の同定

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) であるASK1は、活性酸素や抗がん剤、小胞体ストレス、病原体感染などさまざまなストレスに応答するストレス応答キナーゼとして働き、下流のJNK, p38 MAPキナーゼを活性化し、細胞死や炎症など多彩な生理作用を誘導する⁶⁻⁹⁾。ASK1は多様な結合因子とシグナル複合体を形成し、厳密な活性制御を受ける。最近我々は、酸化ストレス刺激依存的にASK1に結合する分子として脱ユビキチン化酵素USP9Xを同定した²⁾。ASK1は酸化ストレス依存的な活性化に伴って、ポリユビキチン化され、プロテアソーム分解により不活性化される。USP9Xは、酸化ストレス刺激依存的に結合したASK1を脱ユビキチン化することで、その分解を抑制し、ASK1を持続的に活性化させる働きを持つことがわかった。実際に、USP9X欠損細胞では、ASK1の活性化依存的な分解亢進によってASK1の持続的活性化が起こらず、酸化ストレス誘

東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)

Regulatory mechanisms of phosphorylation signaling by various ubiquitin-related enzymes

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

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870116

© 2015 公益社団法人日本生化学会

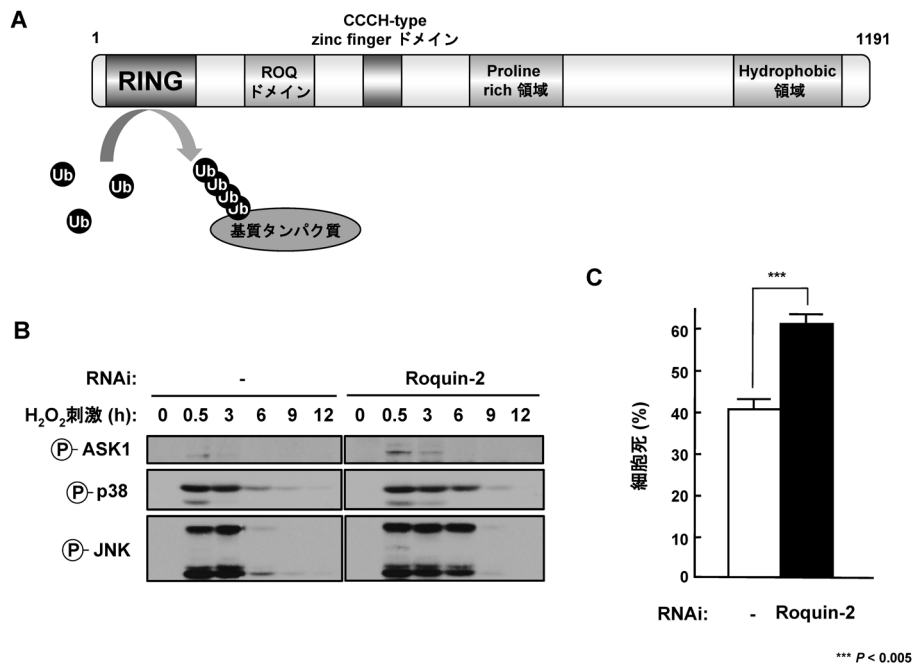


図1 ストレス応答キナーゼASK1に特異的なユビキチン化酵素Roquin-2

(A) Roquin-2のドメイン構造の模式図。Roquin-2は、ユビキチン化酵素活性ドメインであるRINGドメインを介して基質タンパク質のユビキチン化を行う。RING以外のドメインの機能はよくわかっていない。(B) Roquin-2のノックダウンにより、酸化ストレス依存的なASK1活性化、および、その下流のp38、JNKの持続的な活性化が増強した。(C) 酸化ストレス誘導性の細胞死はRoquin-2のノックダウンにより増強した。すなわち、通常ではRoquin-2がASK1、p38、JNKの持続的な活性化を抑制することで、酸化ストレス誘導性の細胞死を抑制していると考えられる。

導性細胞死が抑制される。このように我々は、ASK1へのユビキチン化は、その活性制御機構と酸化ストレス誘導性細胞死の制御に重要であることを明らかにしてきたが、一方でASK1に特異的に作用するユビキチン化酵素は不明であった。

そこで、酸化ストレス依存的なASK1のユビキチン化酵素の同定を試みた。ASK1は活性酸素といった活性化刺激によりユビキチン化を受けて分解されることから、この分解を検出するため、蛍光タンパク質を融合させたASK1分子の安定的な発現細胞を作製した。細胞イメージングアナライザーを用い、個々の細胞の蛍光顕微鏡画像の統計的解析によって、刺激後のASK1の分解による蛍光強度の低下を観察することで、ASK1分解の定量系を確立した。この系に、ユビキチン関連遺伝子約1500のsiRNAライブラリーよりそれぞれのsiRNAを添加し、ASK1の分解が起こらなくなることを指標に、ASK1特異的なユビキチン化酵素のスクリーニングを行ったところ、一次スクリーニングでは17遺伝子がASK1特異的なユビキチン化酵素の候補として同定できた。さらに、siRNAの種類を増やした二次スクリーニングにおいて14遺伝子で再現性が確認でき、三次スクリーニングでは、siRNAによるASK1分解の抑制を実際にウェスタンブロットで確認することで、候補を6遺伝子に絞り込んだ。このうち3遺伝子は一つのユビキチン

化酵素の複合体構成分子であり、残りの3遺伝子がユビキチン化酵素活性ドメインを持っていたため、これらの中で重要な4遺伝子について、ASK1との結合やASK1に対するユビキチン化などを指標に検討を進めたところ、最終的にRoquin-2 (RC3H2) という分子がASK1特異的なユビキチン化酵素であることが明らかとなった¹⁾。

Roquin-2は、ユビキチン化酵素活性ドメインであるRINGドメインを持つが、ユビキチン化酵素としては、転写因子FOXOのユビキチン化分解に関わり、線虫でのストレス耐性を抑制しているという報告が唯一である(図1A)¹⁰⁾。ユビキチン化酵素の機能とは別に、Roquin-2が炎症誘導に関わる分子のmRNAを不安定化させるという報告はあるものの、その生理機能はよくわかっていない¹¹⁾。実際に、Roquin-2のノックダウンによって、酸化ストレス刺激依存的なASK1とその下流のp38、JNKの持続的な活性化、および細胞死が増強することを確認しており、通常ではRoquin-2がこれらの持続的な活性化を抑制することで、酸化ストレス誘導性の細胞死を抑制していることが明らかとなった(図1B、1C)¹⁾。

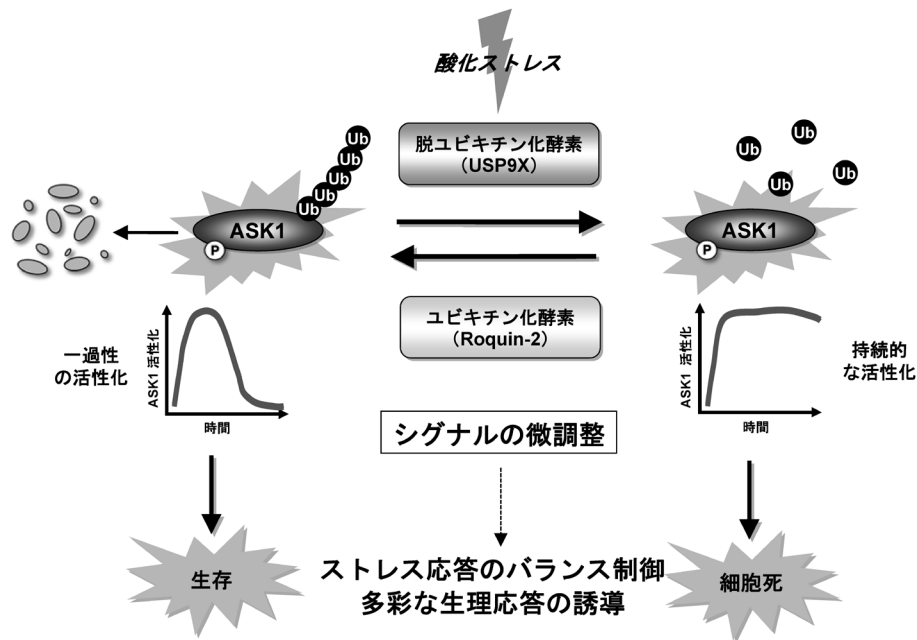


図2 ユビキチン化関連酵素によるストレス応答シグナルのバランス制御

ASK1は、脱ユビキチン化酵素USP9Xによって分解が抑制されて持続的に活性化することで、細胞死が誘導される一方、ユビキチン化酵素Roquin-2を介したユビキチン化分解によって活性化が一過性となり、細胞死のシグナルが抑制され、生存シグナルが優位になると考えられる。このようなユビキチン化関連酵素群によるリン酸化シグナルの微調整の仕組みが、細胞死・生存といったストレス応答のバランス制御や、多彩な生理応答の誘導に重要であると考えられる。

3. ユビキチン化関連酵素によるストレス応答シグナルのバランス制御

Roquin-2を欠損させた線虫は、ASK1の分解が抑制されるため、ASK1の活性化が亢進し、緑膿菌感染に対する抵抗性が高まった¹⁾。このようにRoquin-2はASK1のユビキチン化を介して、酸化ストレス誘導性の細胞死や病原体感染に対する免疫応答など、さまざまなストレス応答シグナルの制御に深く関与することがわかった。また、このRoquin-2によるASK1の分解は、原始的生物である線虫からヒトまで進化的に保存された重要な仕組みであった。

ASK1は活性酸素や病原体感染といったさまざまなストレスに応答し、障害を受けた細胞の細胞死による除去や、サイトカイン産生といった免疫応答誘導による感染防御など、ストレスに適応するための生理応答を誘導する。ASK1はストレスの強さに応じて活性化し、適切な生理応答を誘導する必要がある。これらの応答の過不足や破綻が生じると、がんや自己免疫疾患などさまざまな疾患につながる^{9, 12)}。したがって、ASK1の活性化は、正・負の制御因子によって、そのシグナルのバランスが厳密に制御されなければならない。実際に、ASK1の活性化は、前述のASK1の脱ユビキチン化酵素として働くUSP9Xと、ユビキチン化酵素Roquin-2という正・負の制御因子によって厳密に制御されていることがわかった。たとえば、ASK1は

脱ユビキチン化によって活性化が持続することで、細胞死が誘導される一方、ユビキチン化分解によって活性化が一過性となると、生存シグナルが優位になると考えられる(図2)。さらに我々は、スクリーニングで候補として絞り込んだ、Roquin-2とは別のユビキチン化酵素が、ASK1の活性化因子として働くことも新たに見いだしている。おそらく、このような活性酸素や病原体感染などのストレスに応答したユビキチン化・脱ユビキチン化酵素群によるリン酸化シグナルの微調整の仕組みが、細胞死・生存といったストレス応答のバランス制御や、多彩な生理応答の誘導に重要な役割を果たしているものと考えられる。興味深いことに、Roquin-2やUSP9Xは、それぞれ自己免疫疾患やがんの原因遺伝子である可能性が報告されている^{11, 13)}。我々の結果も含め、Roquin-2やUSP9Xといったユビキチン化関連酵素は、過剰な細胞死や免疫応答を原因とする虚血性疾患や神経変性疾患、がんや自己免疫疾患など、さまざまなヒトの疾患に対する新たな治療標的となることが期待される。

4. ユビキチン化を介した多様なリン酸化シグナルの制御機構と生理応答

ユビキチン化によるリン酸化シグナルの制御機構は、ASK1だけに特有なものではない。TAK1やNIK, MEKK1

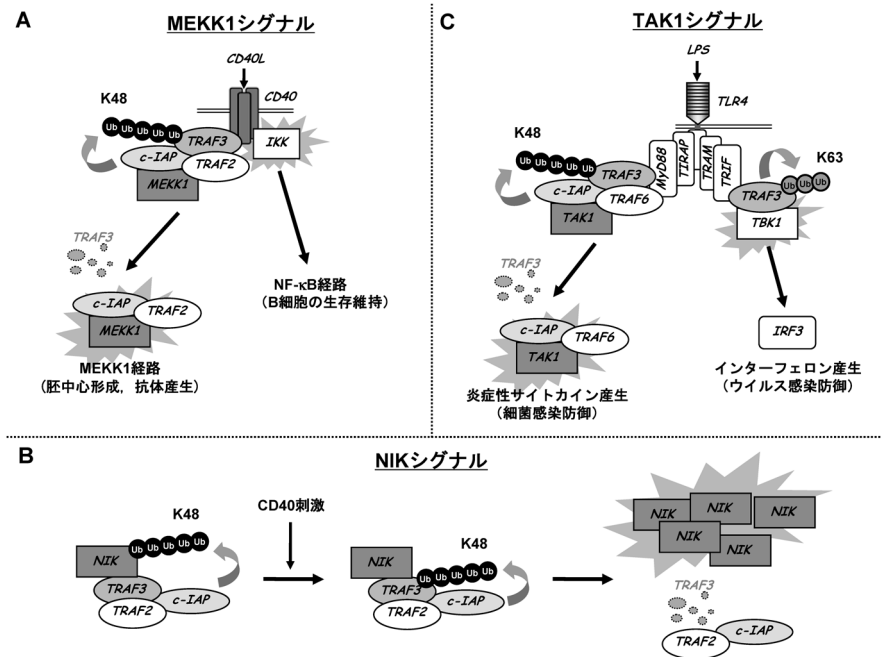


図3 ユビキチン化を介したリン酸化シグナルの多様な制御機構

(A) CD40受容体の下流では、ユビキチン化酵素c-IAPがアダプター分子TRAF3をユビキチン化分解することで、MAP3キナーゼの一つであるMEKK1は細胞質に移行して活性化し、胚中心形成や抗体産生に働く。一方、MEKK1とは別経路でB細胞の生存維持などに働くNF- κ Bシグナル経路の最上流キナーゼIKKは、ユビキチン化分解を介さずに受容体上で即座に活性化するため、これら二つの経路は、ユビキチン化による調節の有無によって時間的・空間的に調節が異なり、多彩なシグナルのバリエーションを生み出すことができる。(B) 定常状態では、c-IAPはNIKのユビキチン化分解を行い、NIKを不活性化している。一方、CD40受容体刺激が入ると、c-IAPは、NIKとc-IAPのリンカー分子であるTRAF3をユビキチン化分解するようになるため、NIKがc-IAPから遊離し、分解されずに蓄積して活性化する。(C) 自然免疫受容体TLR4の下流では、TAK1はMEKK1と同様な機構で活性化し、炎症性サイトカインを産生して細菌に対する防御応答を誘導する。一方、別なキナーゼであるTBK1は、TRAF3のK63ユビキチン化を介して活性化され、インターフェロン産生によりウイルス防御応答を誘導する。すなわち、K48とK63という結合型の異なるポリユビキチン化修飾によって、同一分子でもまったく異なる機能を誘導できることが明らかとなった。

といったMAP3キナーゼもユビキチン化によって厳密に制御を受けていることを我々は明らかにした。

たとえば、B細胞の増殖などに関わるCD40受容体刺激に応答するMEKK1は、同じシグナル複合体中の構成分子であるユビキチン化酵素c-IAPがアダプター分子TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3) をユビキチン化分解することで、細胞質に移行して初めて活性化できる (図3A)。CD40受容体下流には、MEKK1とは別経路で、生存など細胞の基本機能に関わるNF- κ Bシグナル経路が存在するが、この経路の最上流キナーゼIKKは、ユビキチン化分解を介さずに受容体上で即座に活性化する。したがって、これら二つの経路は、ユビキチン化による調節の有無によって時間的および空間的に分離され、多彩なシグナルのバリエーションを生み出すことができることがわかった⁵⁾。

同じくCD40受容体下流で活性化するNIKも、MEKK1と同様にc-IAPによるTRAF3のユビキチン化分解を介して活性化する。この場合、TRAF3はNIKとc-IAPのリンカー

分子として働く。無刺激の状態ではc-IAPはNIKのユビキチン化分解を行い、NIKを不活性化している一方、CD40受容体刺激が入ると、何らかの仕組みでc-IAPの基質が変化し、c-IAPはTRAF3をユビキチン化分解するようになるため、NIKがc-IAPから遊離し、分解されずに蓄積して活性化するというメカニズムが明らかとなった (図3B)⁴⁾。NIKがCD40受容体刺激で蓄積する現象はわかっていたが、その仕組みを分子レベルで初めて詳細に解明することができた。

また、ポリユビキチン化には、ユビキチン分子内の48位または63位のリシンのどちらかを介するかによって、K48およびK63という異なる結合型が存在する。その違いは異なる生理作用を誘導し、主にK48ユビキチン化はプロテアソームによるタンパク質分解に、K63ユビキチン化は分子間相互作用に働く。自然免疫受容体のToll様受容体4 (TLR4) の下流には、TAK1の活性化を介して炎症性サイトカインを産生して細菌に対する防御応答を誘導する経路

と、別なTBK1キナーゼの活性化を介してインターフェロンを産生してウイルスに対する防御応答を誘導する経路の二つが存在する。我々は、この二つのシグナル経路の分岐に、異なる結合型のユビキチン化が重要であることを見いだした。TLR4受容体のシグナル複合体にもTRAF3が構成因子として存在し、MEKK1の場合と同様な仕組みで、TRAF3のK48ユビキチン化分解を介してTAK1が細胞質移行し、TAK1は活性化する。一方、TRAF3がK63ユビキチン化されると、おそらくTBK1との結合を介して、TBK1の活性化が誘導されることがわかった(図3C)³⁾。すなわち、TRAF3のK48およびK63という結合型の異なるポリユビキチン化修飾によって、それぞれ異なるキナーゼ経路が活性化され、同一分子でもまったく異なる機能を誘導できることが明らかとなった。

以上のように、ユビキチン化を介してリン酸化シグナルは厳密に制御され、その仕組みは多彩な生理機能の誘導や基本的な生理機能の調節にとって重要であり、さまざまなリン酸化シグナルに共通に使われている普遍的なシステムであることがわかってきた。

5. おわりに

最近、上記のようなユビキチン化によるリン酸化シグナルの制御は、キナーゼやユビキチン化関連酵素などの構成因子によって受容体下流で形成されるシグナル複合体で行われるという例がいくつか報告され、このような複合体はUbiquitin-editing enzyme complexと呼ばれるようになってきた。我々が見いだしたTLR4やCD40受容体をはじめとして、さまざまな受容体に形成される複合体中では、キナーゼやその活性制御分子が、結合型の異なる多様なユビキチン化修飾を受け、複数のユビキチン化・脱ユビキチン化酵素によって調節を受けるという共通の仕組みがあると考えられる^{14, 15)}。このような仕組みによって、さまざまなストレスに対する多様なシグナルのバリエーションが生み出され、シグナルの微調整が行われることで、そのストレスの種類や強さに対する最も適切な生理応答が誘導できる。ユビキチン化によるリン酸化シグナルの制御機構を分子レベルで詳細に解明し、この仕組みの中で中心的な役割を果たすユビキチン化酵素群やその基質分子を標的とすることによって、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さまざまな疾患の治療戦略開発につながる

るものと期待している。

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研究室で行ったものです。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) Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2014) *Sci. Signal.*, **7**, ra8.
- 2) Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 805–818.
- 3) Tseng, P.H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D.A., & Karin, M. (2010) *Nat. Immunol.*, **11**, 70–75.
- 4) Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., & Karin, M. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 1364–1370.
- 5) Matsuzawa, A., Tseng, P.H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A., Gallagher, E., & Karin, M. (2008) *Science*, **321**, 663–668.
- 6) Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., & Gotoh, Y. (1997) *Science*, **275**, 90–94.
- 7) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., & Ichijo, H. (1998) *EMBO J.*, **17**, 2596–2606.
- 8) Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., & Ichijo, H. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 587–592.
- 9) Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1325–1336.
- 10) Li, W., Gao, B., Lee, S.M., Bennett, K., & Fang, D. (2007) *Dev. Cell*, **12**, 235–246.
- 11) Leppek, K., Schott, J., Reitter, S., Poetz, F., Hammond, M.C., & Stoecklin, G. (2013) *Cell*, **153**, 869–881.
- 12) Soga, M., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2012) *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 439587.
- 13) Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D.C., & Dixit, V.M. (2010) *Nature*, **463**, 103–107.
- 14) Wertz, I.E. (2011) *Nat. Immunol.*, **12**, 1133–1135.
- 15) Wertz, I.E. & Dixit, V.M. (2010) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a003350.

著者寸描**●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. 博士 (薬学).

■**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). 同年キッセイ薬品工業中央研究所研究員. 2002~08年東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室助教. 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. 08年東京

大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室准教授. 14年より現職.

■**研究テーマと抱負** 活性酸素, 病原体感染や薬物など, 生命の恒常性を乱す全てのストレスに対して, 生体・細胞が備えているストレス感知-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の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.