

細胞死を特異的に抑制するユビキチン化酵素の同定

東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室
松沢 厚

1. はじめに

生体は、常に環境変化や活性酸素などのストレスに晒されており、これら環境ストレスに迅速かつ適切に対処していくために、精巧な感知システムと細胞内情報伝達系を備えている。このストレス応答機構の破綻は様々な病態の原因に繋がる。ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) は活性酸素などのストレス刺激によって活性化し、細胞死を誘導するストレス応答キナーゼである¹⁾。最近我々は、ASK1が活性酸素刺激によって活性化すると同時に、ユビキチン化を介して分解され、不活性化されることで、酸化ストレス誘導性の細胞死が抑制されるメカニズムを見出した。また、活性酸素依存的なASK1結合分子として脱ユビキチン化酵素USP9Xを同定し、実際にASK1の持続的活性化およびASK1依存的な細胞死を促進したことから、キナーゼシグナル伝達制御におけるユビキチン化の重要性について明らかにした^{2), 3)}。脳・心虚血性疾患での虚血再灌流後の活性酸素産生による細胞死は、病態の重篤性や予後の回復度を決定する重要なファクターである。ASK1特異的なユビキチン化酵素(ユビキチンリガーゼ)は、ASK1のユビキチン化分解を促進することで、このような活性酸素依存的な虚血性細胞死を抑制できると考えられるが、その実体は不明である。そこで本研究では、ASK1特異的なユビキチン化酵素をsiRNAスクリーニングによって同定し、活性酸素誘導性の細胞死の抑制機構を分子レベルで明らかにすることで、脳・心虚血性疾患の新規治療ターゲットの発見と新たな治療戦略開発を目的とする。

2. 方法

ASK1は活性酸素によって活性化し、細胞死を誘導するが、同時に活性化したASK1はユビキチン化分解によって不活性化される。一方、活性酸素依存的なASK1結合分子として同定した脱ユビキチン化酵素USP9Xが、ASK1の持続的活性化やASK1依存的な細胞死を促進することから、ASK1特異的なユビキチン化酵素は、ASK1の持続的活性化を抑制し、活性酸素による細胞死を抑制できると考えられ、活性酸素誘導性の細胞死の抑制機構を理解する上で本酵素の同定は非常に重要である。また本酵素の同定は、脳・心虚血性疾患のような活性酸素誘導性の細胞死を病態の主因とする疾患に対する画期的な治療戦略開発にも繋げることができる。

そこで我々は、siRNAスクリーニング法により、活性酸素に応答するASK1特異的なユビキチン化酵素の同定を試みた。活性化ASK1のユビキチン化分解を、細胞機能画像解析装置を用いて検出し、ASK1特異的なユビキチン結合酵素同定のためのsiRNAスクリーニング系の構築を行った。具体的には、蛍光蛋白を融合したASK1を安定的に発現した細胞を樹立し、ASK1活性化に伴って蛍光蛋白が分解されることを、個々の細胞の蛍光顕微鏡画像を統計的に処理できる細胞イメージングアナライザーArrayScanを用いて検出する系を確立すると共に、約1500のユビキチン関連遺伝子のsiRNAライブラリーによって、標的となるユビキ

チン化酵素をノックダウンし、siRNAスクリーニングを行うことでASK1特異的なユビキチン化酵素を同定することを試みた。さらに、このsiRNAスクリーニングによって同定されたASK1特異的なユビキチン化酵素の幾つかの候補遺伝子について、さらにASK1のユビキチン化・活性化や活性酸素依存的細胞死への関与を指標として機能解析を進め、最終的にASK1特異的なユビキチン化酵素の絞り込みを行った。

3. 結果

まず、構築したsiRNAスクリーニング系で行った1次スクリーニングでは18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、siRNAの種類を増やした2次スクリーニングでは、このうち14遺伝子で再現性が確認できた。さらに3次スクリーニングでは、実際にsiRNAによるASK1分解の抑制をウェスタンブロットにより確認することで、その候補を6遺伝子に絞り込んだ。これらの中で、単独でユビキチン化酵素活性ドメインを持つ分子、または基質認識分子は4遺伝子であった。

これら4遺伝子の中で、2遺伝子については、その過剰発現によってASK1のユビキチン化が亢進し、逆にノックダウンによって減少することが確認できた。この2遺伝子のうち、一方の遺伝子のみにおいて、そのノックダウンにより活性酸素誘導性の細胞死が増強されたことから、本遺伝子がASK1特異的なユビキチン化酵素であると考えられ、最終的に候補を一つに絞り込むことができた。おそらく本酵素は、ASK1のユビキチン化分解を促進し、ASK1を不活性化することで、活性酸素誘導性の細胞死を抑制していると考えられる。実際に本酵素のノックダウンによって、活性酸素刺激依存的なASK1およびASK1の下流シグナルであるp38、JNKの活性化の有意な増強が認められ、持続的な活性化が観察された。この結果は、本酵素が通常ではASK1およびp38、JNKの活性化、特に持続的な活性化を抑制していることを示している。このASK1特異的なユビキチン化酵素は、これまで詳細な解析が行われていない機能未知の新たなユビキチン化酵素であった。

4. 考察

以上のように、本研究では、活性酸素刺激依存的なASK1特異的なユビキチン化酵素を、独自に構築したスクリーニング法によって同定することができた。その機能解析により、ユビキチン化・脱ユビキチン化酵素によるASK1を介した活性酸素シグナルの活性制御機構が、細胞死などの制御メカニズムにとって重要であることが分かってきた。ASK1は、脱ユビキチン化によって活性化が持続し、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り、細胞死ではなく、生存シグナルが誘導されるものと考えられる(【図】参照)。おそらく、活性酸素に応答したユビキチン化・脱ユビキチン化酵素両者によるASK1を介した活性酸素シグナルの微調整(ファインチューニング)の仕組みが、細胞死・生存といった酸化ストレス応答のバランス制御に重要な役割を果たしている可能性がある。ユビキチン化によるリン酸化シグナルの調節システムは、シグナルの分岐や時空間的制御による多様な生理応答を生み出すために不可欠であり、このようなシステムの破綻が様々な疾患の原因となっている^{4), 5)}。今後、このASK1特異的なユビキチン化酵素の*in vivo*も含めた詳細な機能解析により、さらにASK1を介した活性酸素依存的な細胞死の分子制御メカニズムを明らかにし、脳・心虚血性疾患の予後回復の向上など、関連疾患の治療戦略開発に繋げていくことを目指したい。

5. 発表論文・参考文献

- 1) Matsuzawa, A., Ichijo, H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 1325-1336 (2008).
- 2) Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A., 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) Soga, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H. Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway. *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 439587 (2012).
- 4) Matsuzawa, A., Tseng, P. H., Vallabhapurapu, S., Luo, J. L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D. A., Gallagher, E., Karin, M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science*, **321**, 663-668 (2008).
- 5) Tseng, P. H., Matsuzawa, A., Zhang, W., Mino, T., Vignali, D. A., Karin, M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat. Immunol.*, **11**, 70-75 (2010).

