

## 論文の内容の要旨

# 酸化ストレスによる ASK1 活性化分子機構に関する研究

藤野 悟央

### 【序論】

細胞内シグナル伝達機構の破綻は、様々な疾患の発症原因となっている。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードは、多様な環境ストレスを伝達し、分化・増殖・細胞死などの生命現象の制御に関与する細胞内シグナル伝達経路の一つである。MAPK kinase kinase (MAPKKK) はこのシグナル伝達経路の最上流に位置しており、細胞内外の多様な刺激を認識し、その情報をリン酸化シグナルとして下流へ伝達するセンサーそのもの、もしくはそれに近い領域で機能するものと考えられている。Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は、JNK および p38 MAPK 経路の上流に位置する MAPKKK の一つである。ASK1 は特に活性酸素 (ROS) によって強く活性化され、アポトーシスや炎症生サイトカイン産生などのストレス応答を誘導する。ROS による ASK1 活性化分子機構に関し当研究室は、(1) ASK1 は定常状態で C 末端のコイルドコイル領域 (CCC) を介して静的ホモオリゴマーを形成しているが、ROS により ASK1 活性阻害因子である Thioredoxin (Trx) が解離すると、(2) 相反して ASK1 活性化促進因子である TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) および TRAF6 が ASK1 ヘ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てきた (図 1)。

しかしながら、Trx および TRAF2 ならびに TRAF6 (TRAF2/6) が ROS 依存的に ASK1 の活性を調節する詳細な分子機構は明らかとなっていなかった。私は修士課程において、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 ROS 刺激依存的な自身の分子

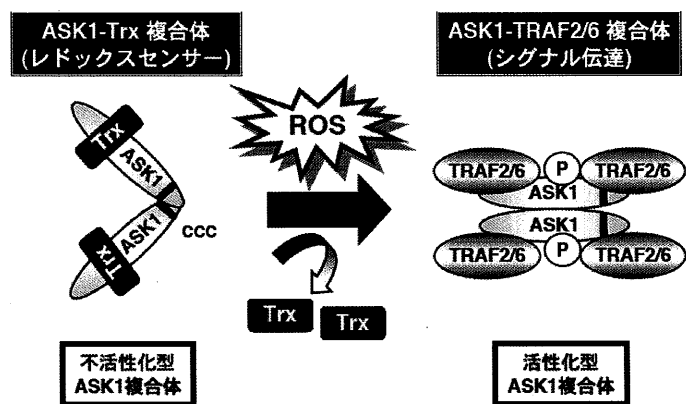


図 1. ASK1 複合体における ASK1 活性化機構

間相互作用（ホモオリゴマー化）と活性化に重要であることを示唆した。また、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 ASK1 の自己リン酸化による活性化を負に制御することを明らかにし、Trx による ASK1 活性制御の分子機構に迫る知見を得た。本研究は Trx に関するこれまでの知見を踏まえつつ、TRAF2/6 による ASK1 活性化の分子機構を明らかにし、ASK1 シグナル伝達経路におけるレドックスセンシング分子機構のさらなる解明を目的とした。

## 【方法と結果】

### 1. Trx および TRAF2/6 に対する ASK1 の結合領域を同定

ヒトおよびマウス ASK1 はそれぞれ全長 1374 残基および 1380 残基のアミノ酸 (aa) から構成されており、分子中央部付近にはセリン/スレオニンキナーゼ領域、N 末端と C 末端にそれぞれ 1 ヶ所ずつコイルドコイル領域 (NCC, CCC) を有している。はじめに、Trx および TRAF2/6 に対する ASK1 の結合領域を同定するため、ASK1 の各種欠損変異体を作製し、免疫沈降法による結合実験を行った。その結果、Trx 結合領域は 46 番目から 277 番目のアミノ酸を含む領域 (46-277aa)、TRAF2/6 結合領域 (TBD) は 384-655aa に存在し、Trx および TRAF2/6 はいずれも NCC (297-324aa) を挟んで互いに隣接した N 末端領域に結合することが明らかとなった (図 2)。

### 2. NCC は ROS による ASK1 の活性化に必要である

NCC の機能はこれまで不明であったが、N 末端領域を介した ASK1 のホモオリゴマー形成および活性化に重要な役割を果たすことを示唆する知見を以前報告した。そこで ASK1 の活性化における NCC の必要性をさらに検討するため、NCC を欠損した変異体 (ASK1 $\Delta$ NCC) を作製し、その活性を野生型 ASK1 (ASK1WT) と比較した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激に対し ASK1 $\Delta$ NCC の自己リン酸化による活性化は ASK1WT に比べ減弱しており、NCC は ROS による ASK1 の活性化に必要であることが明らかとなった (図 3)。

### 3. Trx および TRAF2/6 による ASK1 の N 末端領域を介した相互作用の調節

ROS により Trx は ASK1 から解離し、TRAF2/6 が結合することで ASK1 は活性化される。また、定常状態において CCC を介してホモオリゴマーを形成している ASK1 は、ROS 依存的にさらに別の会合でホモオリゴマーを形成し、自己リン酸化により活性化することが知られている。Trx および TRAF2/6 はいずれも ASK1 の N 末端側に結合領域を有することから、Trx は物理的に ASK1 の N 末端領域でのホモオリゴマー形成を抑制し、TRAF2/6 は ASK1 のホモオリゴマー形成を促進させると考えられた。定常状態で形成される CCC を介した ASK1 の強いホモオリゴマー形成の影響を排除するため、予め C 末端領域を欠損させた ASK1 $\Delta$ C (1-947aa) を用い、Trx および TRAF2/6 による ASK1 の N 末端領域でのホモオリゴマー形成の調節につい

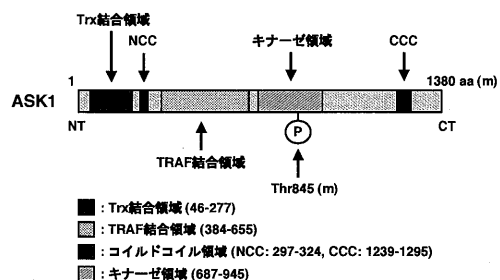


図 2. ASK1 のドメイン構造

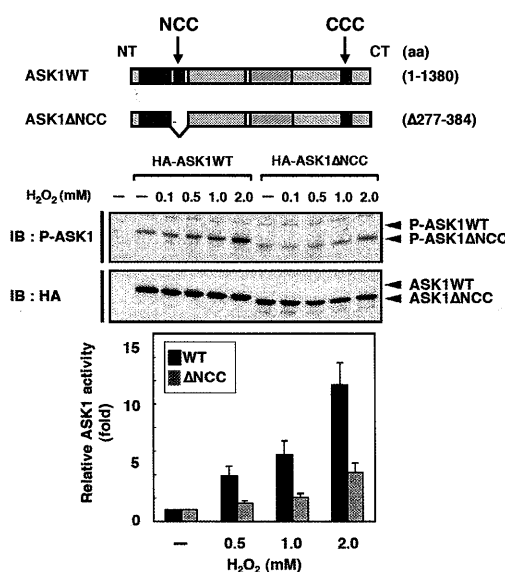


図 3. ASK1 活性化における NCC の必要性

て検討した。HEK293A 細胞に、ASK1ΔC と Trx および TRAF2/6 を過剰発現させ、免疫沈降法による結合実験を行った結果、Trx は ASK1 の N 末端領域の相互作用を阻害する一方 (図 4)、相反して TRAF2/6 はその相互作用を促進させることが明らかとなった (図 5)。おそらくこの機構により Trx は ASK1 の活性化を負に制御し、TRAF2/6 は ASK1 の活性化に促進的に働くものと考えられる。

#### 4. TRAF2/6 は ASK1 の N 末端領域を介した相互作用に必要である

ASK1 の N 末端領域を介したホモオリゴマー形成における TRAF2/6 の必要性を検討するため、HEK293A 細胞において内在性の TRAF2/6 をノックダウンし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激に対する ASK1ΔC の相互作用への関与を検討した。その結果、TRAF2/6 ノックダウン細胞ではコントロールの細胞に比べ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による ASK1ΔC の相互作用の減弱が見られた。このことから、ROS による ASK1 の N 末端領域を介した相互作用には TRAF2/6 が必要であることが明らかとなった (図 6)。

#### 5. TRAF2/6 との結合阻害を機序とする新規 ASK1 活性阻害薬の可能性

TRAF2/6 は ROS により ASK1 に結合し、ASK1 の活性化促進因子として働く。また TRAF2/6 の各ノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による ASK1 活性化の大幅な減弱が見られる。このことから、TRAF2/6 の ASK1 への結合を阻害すれば、ASK1 の活性化を抑制できることが予想される。TRAF2/6 に対する ASK1 の結合領域の絞り込みをさらに行った結果、両者はともに ASK1 の 521-548aa (TBD-m5) を含む領域に強く結合することが明らかとなった (図 7)。これらの領域 (TBD-middle, TBD-m5) を HEK293A 細胞に過剰発現すると、定常状態での ASK1 の活性と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による ASK1 の活性化が共に抑制された (図 8, 9)。この結果から、TBD-middle、TBD-m5 は TRAF2/6 に強く結合し、TRAF2/6 の ASK1 への結合を阻害することで、ASK1 の活性化を抑制することが示唆される。

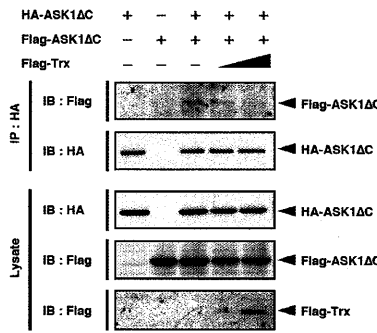


図 4. Trx による ASK1 の N 末端領域を介したオリゴマー化の抑制

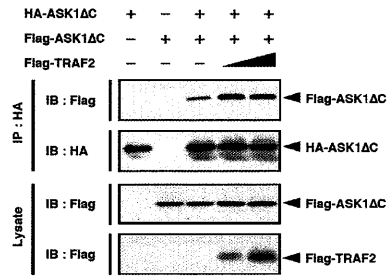


図 5. TRAF2 による ASK1 の N 末端領域を介したオリゴマー化の促進

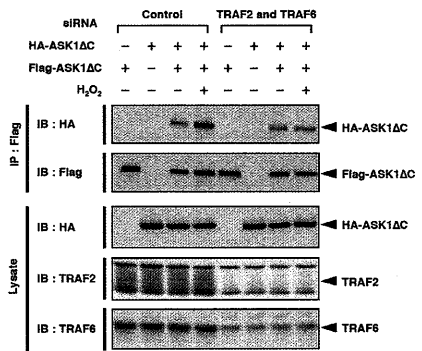


図 6. ASK1 の N 末端領域を介したオリゴマー化における TRAF2/6 の必要性

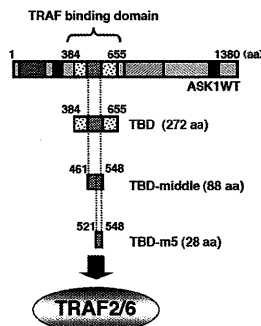


図 7. TRAF2/6 結合領域の同定

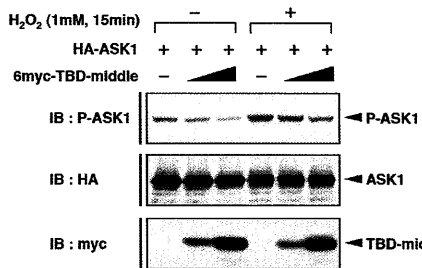


図 8. TBD-middle による ASK1 活性化の阻害

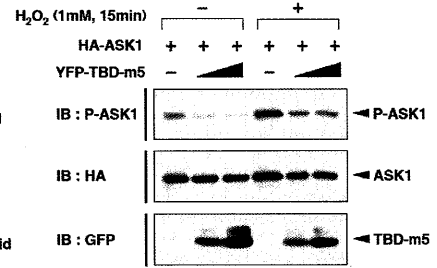


図 9. TBD-m5 による ASK1 活性化の阻害

## 【まとめと考察】

本研究において私は、Trx および TRAF2/6 に対する ASK1 の結合領域がいずれも N 末端側に存在することを見出し、Trx および TRAF2/6 の ROS 依存的なタンパク質相互作用によって ASK1 の N 末端領域を介したホモオリゴマー形成が制御されることで ASK1 の活性調節が行われるという、新規 ASK1 活性化分子機構を明らかにした。本研究から得られた知見に基づき、そのモデルを図 10 に示す。定常状態において Trx は ASK1 の N 末端領域を介した相互作用を阻害し、ASK1 の活性化を抑制する。ROS により Trx が ASK1 から解離すると、TRAF2/6 が ASK1 にリクルートされ、ASK1 の N 末端領域を介した相互作用が促進される。その結果、ASK1 はホモオリゴマー形成による自己リン酸化が亢進し活性化されると考えられる (図 10)。

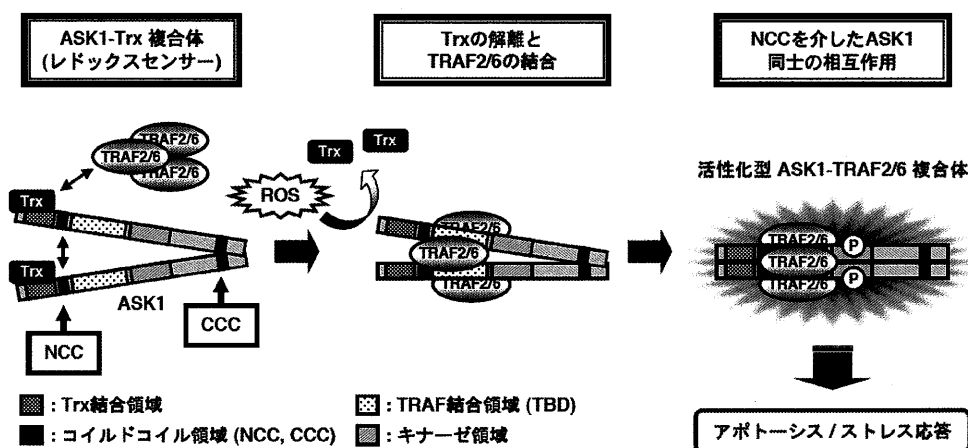


図 10. ROS による ASK1 活性化の分子機構

ASK1 活性化の亢進は神経変性疾患、虚血性疾患、炎症性疾患など様々な疾患に関与することが報告され、ASK1 活性阻害薬はこれらの疾患の克服につながるものと期待される。TBD-middle および TBD-m5 が ASK1 の活性化を抑制するという結果は、ASK1 活性化因子である TRAF2/6 と ASK1 の結合を阻害する化合物が ASK1 活性阻害薬になる可能性があることを示唆している。今後、本作用機序に基づく ASK1 活性阻害薬の新規創薬基盤の創出に向けて、細胞内に導入可能な候補化合物の探索、ASK1 シグナル伝達経路の阻害効果とその特異性の生化学的解析などについて検討を進めていきたい。