

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 藤 野 悟 央

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性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、「ASK1 は定常状態において 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、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 へリクルートされることで ASK1 が活性化される」ことがこれまでに明らかとなっている。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不明である。

本研究は、Trx および TRAF2/6 に焦点を当て、両タンパク質によって調節される ASK1 活性制御機構を詳細に解析したものである。さらに、その結果から見出された ASK1 活性化の分子機構を踏まえ、新規作用機序に基づく ASK1 活性阻害薬創出の基盤となる解析を行った。本研究から得られた主要な知見を以下に記す。

### 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。

### 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が本研究で得られた。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 (ASK1ΔNCC) 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 ASK1ΔNCC 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。

### 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面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ASK1ΔC(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末端領域同士の相互作用を阻害する一方、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。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。

### 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。これらのTRAF2/6結合領域(TBD:384-655aa, TBD-middle:461-548aa, TBD-m5:521-548aa)をそれぞれHEK293A細胞に過剰発現すると、定常状態でのASK1の活性および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。これらの結果から、ASK1のTRAF2/6結合領域に由来するペプチドはTRAF2/6に強く結合し、TRAF2/6とASK1の正常な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。

本研究において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が見出され、TrxおよびTRAF2/6のROS依存的なタンパク質間相互作用によって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

活性化分子機構が明らかとなった。その機構を以下に記す。「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」。さらに、ROS による ASK1 の活性化には TRAF2/6 が必要であるという点に着目することで、ASK1 と TRAF2/6 の正常な結合を妨げる TRAF2/6 結合ペプチドが同定され、そのペプチドの過剰発現により ASK1 の活性化が阻害されるという新たな知見が見出された。

本研究から得られた知見は、ROS というストレス刺激がリン酸化シグナルへと変換される ASK1 複合体の、酸化ストレス受容認識とシグナル変換の分子機構の理解をさらに深めており、新規性、獨創性に富むものである。さらに、ASK1 を分子標的とした今後の創薬研究に貢献する新規 ASK1 活性阻害薬創出の足掛かりとなる知見を示したという点に関しても高く評価される。以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値するものと判定した。