

論文の内容の要旨

脱ユビキチン化酵素 USP9X による 活性型 ASK1 安定化機構の解明

永井 宏彰

【序論】

ASK1(Apoptosis Signal-regulating Kinase 1)は、MAPKKK ファミリーの一員であり、酸化ストレスや小胞体ストレスなど、細胞内外の様々なストレスにより活性化される。活性化された ASK1 は、JNK 経路および p38 MAP キナーゼ経路を選択的に活性化し、細胞死などの多様な生理応答を誘導する。ASK1 ノックアウトマウスを用いた実験などから、ASK1 を介する酸化ストレス誘導性細胞死が、虚血性疾患や神経変性疾患など種々の疾患の原因のひとつとなっていることが示唆されている。それ故、酸化ストレスによる ASK1 の活性化がどのように制御されているかを理解することは、それら疾患の発症メカニズムを明らかにするだけでなく、疾患の克服にも繋がるものと期待される。ASK1 の活性化が惹起される分子機構に関しては、チオレドキシシンや TRAF2 および TRAF6 による制御などが明らかにされ、その詳細が分かってきた。その一方で、ASK1 の活性化状態の維持あるいは終結の機構については未だ不明な点が多く残されている。

私は修士課程において、新規の酸化ストレス依存的 ASK1 結合分子として脱ユビキチン化酵素 USP9X を同定し、一方で ASK1 が酸化ストレス依存的にユビキチン化されることを見出していた。しかしながら、ASK1 のユビキチン化の意義や、これに対する USP9X の機能、生理的役割は不明であった。博士課程において私は、USP9X が ASK1 の C 末端にある GG モチーフを介して活性型 ASK1 と選択的に結合することを見出した。また、脱ユビキチン化酵素 USP9X は、活性型 ASK1 を脱ユビキチン化することで安定化させ、ASK1 の活性を維持していることを見出した。またこのシステムは、酸化ストレス誘導性 p38/JNK 経路の活性化と細胞死に重要であることを明らかにした。

【 方法と結果 】

1. USP9X は ASK1 のキナーゼ活性および GG モチーフ依存的に結合する

まず、ASK1 と USP9X の結合メカニズムの詳細を検討した。両者の結合は、ASK1 の活性化状態に相関していた。また、ASK1 キナーゼ不活性型変異体 ASK1^{K709M} では、結合が大きく減弱した。以上のことから、USP9X は、活性化された ASK1 に選択的に結合することが示唆された。

次に、ASK1 における USP9X の結合領域を解析した結果、ASK1 の最 C 末端領域 80 アミノ酸 (1295-1374) が結合に必要なかつ十分な領域であることが明らかとなった (Fig. 1A)。

さらに興味深いことに、この領域に、ユビキチン最 C 末端の 6 アミノ酸と同様の配列、¹³⁵²LRLRGG¹³⁵⁷ を見出した (Fig. 1A)。一般的に、脱ユビキチン化酵素がユビキチンを認識する際には、ユビキチンの GG

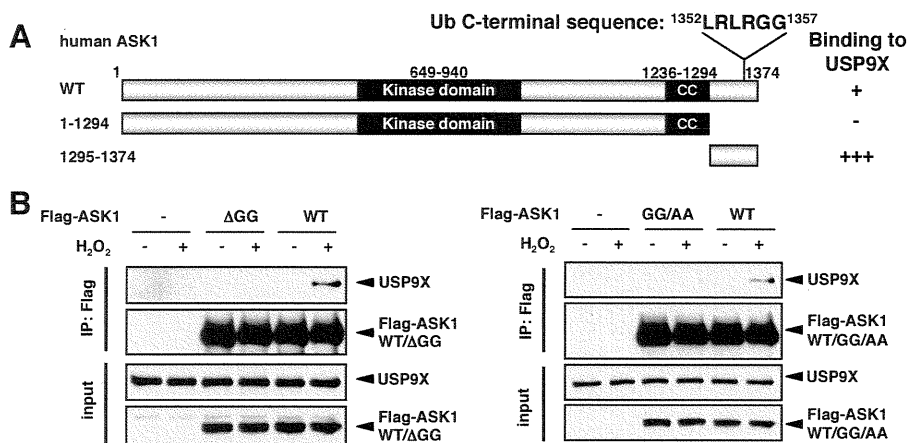


Figure 1. ASK1におけるUSP9Xの結合モチーフの同定

(A) ASK1におけるUSP9X結合領域の絞り込み

(B) ASK1のGG motifはUSP9Xとの結合に必要である

モチーフが重要であることが知られている。そこで、USP9XがASK1のGGモチーフを介してASK1を認識している可能性を考え、GGモチーフを欠損した変異体(ASK1^{ΔGG})、あるいはアラニン残基に置換した変異体(ASK1^{GG/AA})を作製し、USP9Xとの結合を検討した。その結果、野生型ASK1と比較して、いずれの変異体もUSP9Xとの結合が見られず、両者の結合にASK1のGGのモチーフが必須であることが明らかとなった (Fig. 1B)。

2. USP9X は活性型 ASK1 の維持に必要である

次に、酸化ストレスによるASK1の活性化におけるUSP9Xの役割を検討した。まず、前述のASK1変異体(ASK1^{ΔGG}, ASK1^{GG/AA})の活性化状態を、抗リン酸化ASK1抗体を用いてモニターした。その結果、過酸化水素刺激により誘導される活性型ASK1の量が、いずれの変異体においても著しく減少していた。また、RNA interference (RNAi)法によるUSP9Xの発現抑制によっても、ASK1のタンパク量の減少に伴って、内在性の活性型ASK1の量は減少した (Fig. 2A)。

USP9Xは基質タンパク質のいくつかを安定化することが知られていることから、ASK1^{ΔGG}の活

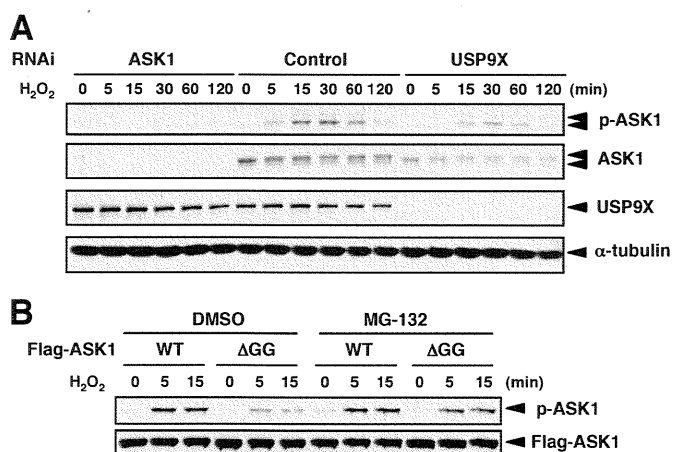


Figure 2. USP9Xは活性型ASK1の維持に必要である

(A) USP9X発現抑制による内在性活性型ASK1量の低下

(B) ASK1^{ΔGG}の活性化型ASK1量低下のMG132による回復

活性型 ASK1 の量低下が、プロテアソームによるタンパク質分解による可能性を考えた。そこでプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いたところ、ASK1^{AGG} で見られる活性型 ASK1 量の低下が、部分的にはあるが回復することを見出した(Fig. 2B)。これらの結果から、USP9X は、ASK1 の活性化状態の維持に必要であり、そのメカニズムとしては、USP9X が活性型 ASK1 のプロテアソームによる分解を抑制している可能性が考えられた。

3. USP9X は活性化型 ASK1 のユビキチン-プロテアソーム系による分解を抑制する

そこで、ASK1 活性制御におけるユビキチン-プロテアソーム系の関与について詳細に検討した。まず、ASK1 が酸化ストレス下においてプロテアソーム依存的に分解されることを見出した。また、内在性 ASK1 の活性が下がってくる 30 分以降において、内在性 ASK1 が過酸化水素刺激依存的にユビキチン化されることを明らかにした。さらに、このユビキチン化には、ASK1 のキナーゼ活性が必要であることが分かった。また、恒常活性化型変異体である ASK1^{A277} では、ユビキチン化・分解ともに亢進していたことから、活性化された ASK1 が分解されることが示唆された。

次に、ASK1 の分解における USP9X の役割を検討した。その結果、GG モチーフ欠損あるいは USP9X の発現抑制によって、ASK1 の分解が亢進することを見出した(Fig. 3)。

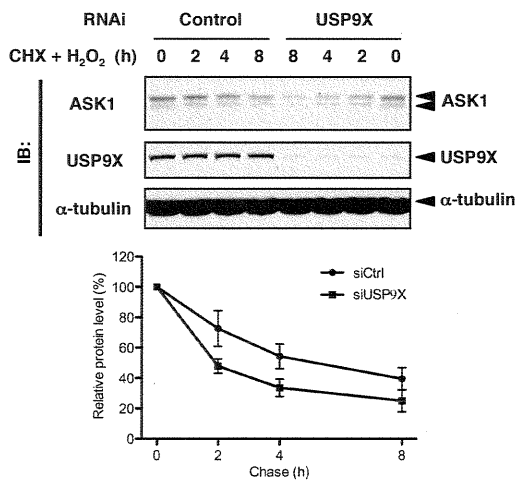


Figure 3. USP9XはASK1の安定化に必要

次に、ASK1 のユビキチン化部位を決定した。その結果、ASK1 のキナーゼドメインと coiled-coil ドメインの間の領域(956-1235)がユビキチン化に十分であった。一方、この領域に含まれる 15 個のリジン残基全てをアルギニン残基に置換した変異体 ASK1^{15KR} ではユビキチン化が減弱することを明らかにした(Fig. 4A)。以上から、この領域がユビキチン化されていることが示唆された。

また、分解の亢進に一致して、GG モチーフ欠損あるいは USP9X の発現抑制によって、ASK1 のユビキチン化が亢進することを見出した(Fig. 4B)。さらに、ASK1^{AGG} の亢進したユビキチン化は、前述の 15KR 変異の導入によってキャンセルされた(Fig. 4B)。また、USP9X が *in vitro* において、ASK1 に対して脱ユビキチン化酵素活性を有することを見出した。これらの結果から、USP9X は、酸化ストレス下において、活性型 ASK1 に対して、C 末端のユビキチン化サイトをターゲットに、脱ユビキチン化酵素として機能し、活性型 ASK1 の分解を抑制していることが示唆された。

4. USP9X は酸化ストレス誘導性 p38/JNK 経路活性化および細胞死に必要である

USP9X による活性型 ASK1 安定化の細胞応答における意義を明らかにするため、過酸化水素による MAP キナーゼ経路の活性化および細胞死を、USP9X の発現抑制系において検討した。その

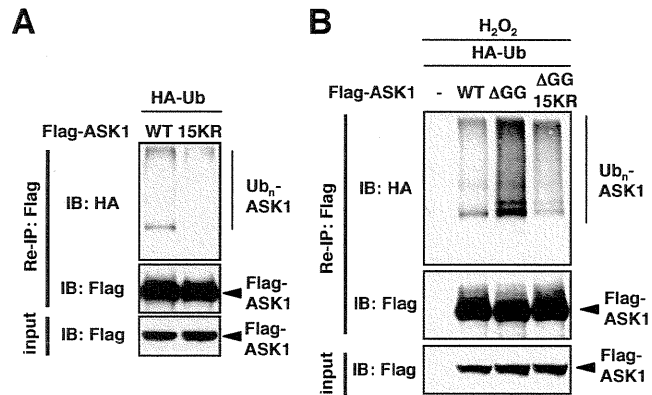


Figure 4. USP9XはASK1の脱ユビキチン化酵素である

(A) ASK1のユビキチン化部位の決定

(B) ASK1^{AGG}のユビキチン化の亢進と15KR変異によるキャンセル

結果、p38/JNK 経路の活性化および細胞死が、ASK1 の発現抑制と同程度減弱することを見出した。これらの結果から、USP9X が酸化ストレス誘導性 MAP キナーゼ経路の活性化と細胞死に必要であることが示唆された。

さらに生体における USP9X の機能を明らかにするために USP9X ノックアウトマウスの作出を試みた。しかしながら、現在までのところ、germline transmission が確認できておらず、USP9X ノックアウトマウス個体は得られていない。Usp9x 遺伝子は X 染色体上にコードされており、ES 細胞はオス由来であることから、相同組み換えを起こした embryonic stem (ES) 細胞は、USP9X ノックアウトとなる。このことは、ES 細胞の genotyping および immunoblotting によって確認した。そこで、樹立できた USP9X ノックアウト ES 細胞を用いて、解析を行った。その結果、RNAi 法で得られた実験結果に一致して、USP9X ノックアウト ES 細胞では、過酸化水素による JNK 経路の活性化および細胞死が減弱していた (Fig. 5A and 5B)。

以上のことから、USP9X は酸化ストレス下において、活性型 ASK1 の安定化を介して、MAP キナーゼの活性化および細胞死に必要であることが明らかとなった。

【まとめ・考察】

本研究において私は、ASK1 がその C 末端に、ユビキチン様の GG モチーフを持つことを見出した。脱ユビキチン化酵素 USP9X は、この GG モチーフを介して活性型 ASK1 と結合し、活性型 ASK1 を脱ユビキチン化すること

で、ユビキチン・プロテアソーム系による分解から活性型 ASK1 を回避させ、ASK1 の活性化状態を維持していることを見出した。また、このシステムは、ASK1-MAP キナーゼ経路シグナルの維持を保証し、細胞死の誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Fig. 6)。これまで、ASK1 の活性制御機構は、リン酸化・脱リン酸化による“直接的”な制御が中心的に捉えられてきたが、今回の結果により、ユビキチン化・脱ユビキチン化による活性型 ASK1 の安定性制御による“間接的”な制御も、ASK1 活性制御機構において重要であることを提唱するに至った。

今後は、ASK1 の分解を担う E3 ユビキチンリガーゼの同定することで、ASK1 のユビキチン化および分解の分子メカニズムを解明していきたい。また、USP9X ノックアウトマウスの作出を引き続き行い、USP9X-ASK1 システムの生体における役割、特に ASK1 関連疾患における病態生理学的役割に着目し、検討していきたい。

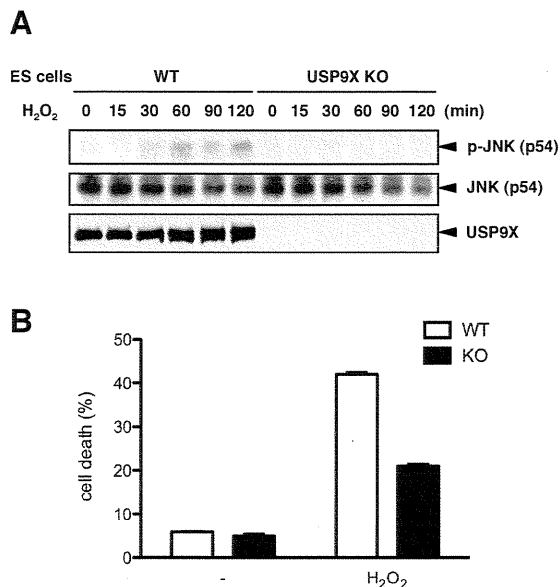


Figure 5. USP9XノックアウトES細胞の解析
(A) USP9X KO ES細胞ではJNKの活性化が減弱する
(B) USP9X KO ES細胞では細胞死が抑制される

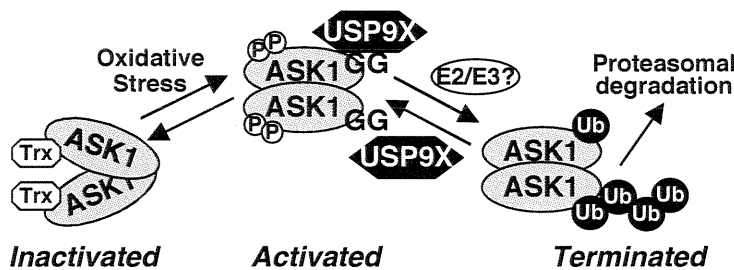


Figure 6. ASK1活性制御におけるUSP9Xの役割