

ASK1(Apoptosis signal-regulating kinase 1)は、MAPKKK (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase) 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。しかし、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。

本研究は、ASK1の酸化ストレス依存的結合分子として同定した脱ユビキチン化酵素USP9XによるASK1の活性制御機構について解析を行ったものである。以下に本研究から得られた主要な知見をまとめた。

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

ASK1とUSP9Xの結合は、ASK1の活性化状態に相関し、一方で、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。これらから、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。

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が含まれていることが見出された。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^{GG})、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との結合が見られなかった。これらのことから、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。

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^{GG}, 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。

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^{GG}の活

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^{GG}で見られる活性型 ASK1 量の低下が、部分的にはあるが回復した。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。この結果から、活性化された ASK1 がネガティブフィードバックとしてユビキチン化・分解されていることが示唆された。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 ASK1²⁷⁷ 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明らかとなった。

さらに、ASK1 部分欠損変異体を用いて ASK1 のユビキチン化部位の同定を試みた。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、ユビキチン化に必要な十分な領域であった。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。以上から、この領域のリジン残基がユビキチン化されていることが示唆された。

次に、ASK1 のユビキチン化と分解における USP9X の役割を検討した。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明らかにした。また、この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が明らかとなった。さらに、ASK1^{GG} 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。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、RNAi 法による USP9X の発現抑制系において検討した。その結果、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。

以上のことから、USP9X は、活性型 ASK1 の安定化を介して、酸化ストレスによる 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。

本研究において、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が見出された。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が明らかとなった。また、このシステムが、酸化ストレス下において、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が明らかとなった。脱ユビキチン化酵素の基質が GG モチーフを持ち、脱ユビキチン化酵素をリクルートすることで安定化される例は、本研究が初めての知見であり、非常に独創性、新規性の高いものである。

また、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、本研究により、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。