

論文の内容の要旨

ASK1 活性化因子としての Kelch リポートタンパク質 KLHDC10 の機能解析

関根 悠介

【序論】

ストレス応答性 MAP キナーゼ経路は酵母からヒトに至るまで種を超えて高度に保存された細胞内シグナル伝達経路であり、細胞内外の環境変化に応じて活性化し、適切な細胞応答を誘導することで生体の恒常性を維持している。ASK1 は MAP3K ファミリーに属し、酸化ストレスや小胞体ストレス等によって活性化され、JNK および p38 MAP キナーゼ経路を活性化して、アポトーシスをはじめとする多様なストレス応答を引き起こす。これまで、生体における生理的・病的ストレス応答における ASK1 シグナルの重要性が明らかとなってきた一方で、ストレス刺激による ASK1 活性化の分子レベルでのメカニズムについては未解明の部分が残されている。そこで私は、このメカニズムの解明を目的として、修士課程においてショウジョウバエを用いた遺伝学的アプローチから ASK1 の上流で機能する新たな活性制御因子の探索を行った。ショウジョウバエ ASK1 (DASK1) の N 末端を欠損させた変異体 (DASK1^N) をハエの背側中央領域に異所性に発現させると、ショウジョウバエ p38 (Dp38) 経路依存的なメラニンの蓄積が観察される (Fig.1)。この表現型を ASK1-p38 経路活性化の指標としてとらえ、内在性遺伝子の強制発現が可能なショウジョウバエ変異体ライブラリーを用いて、メラニン蓄積を誘導できる遺伝子のスクリーニングを行った。

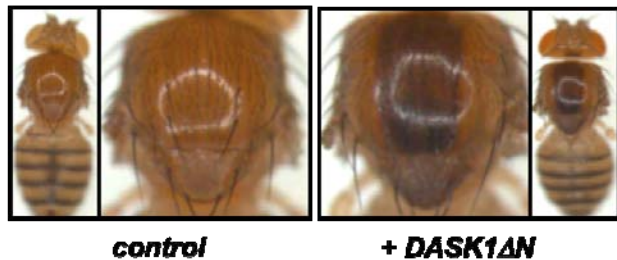


Fig. 1 ショウジョウバエ背側中央領域においてDASK1 Δ Nを異所性発現することで誘導されるメラニン蓄積の表現型

その結果、機能未知分子 Slim およびそのヒトオルソログ KLHDC10 を ASK1 の新規活性化因子として同定した。さらに博士課程において、Slim/KLHDC10 の分子機能ならびにストレス刺激依存的な ASK1 活性化における Slim/KLHDC10 の役割について解析を行い、Slim/KLHDC10 が Cul2 を中心としたユビキチンリガー複合体における基質認識タンパク質でありながら、ASK1 の活性化に対してはリガー複合体非依存的に機能していることを明らかにした。

【方法と結果】

SlimとdTraf2-DASK1-Dp38 経路の遺伝学的相互作用解析

ショウジョウバエ背側中央領域における Slim の異所性発現によるメラニン蓄積の表現型を指標に、Slim と ASK1-MAP キナーゼ経路のシグナルコンポーネントとの遺伝学的相互作用解析を行った。Slim 発現によるメラニン蓄積は、DASK1 および Dp38 経路の MAP2K である dMKK3 や dMKK4 のノックダウン、Dp38a ドミナントネガティブ体 (Dp38a^{DN}) の共発現によって抑制された。一方、DASK1^N 発現によるメラニン蓄積

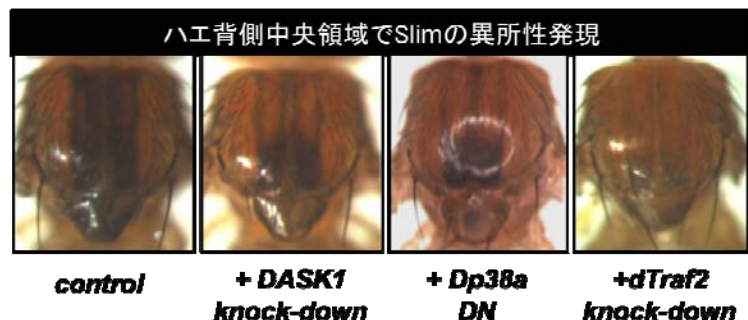


Fig. 2 SlimとdTraf2-DASK1-Dp38経路の遺伝学的相互作用解析

に対して Slim のノックダウンは影響を与えなかったことから、Slim は遺伝学的に DASK1 の上流に位置することが示された。また、ASK1 の活性化因子である TRAF6 のショウジョウバエオルソログ dTraf2 のノックダウンによっても、Slim 発現によるメラニン蓄積が顕著に抑制されたことから、この表現型は dTraf2-DASK1-Dp38 経路依存的であることが示唆された (Fig. 2)。

Slim/KLHDC10 は Cul2-RING E3 リガーゼ複合体の基質認識タンパク質である

Slim および KLHDC10 はどちらも全く機能未知の分子であったが、一次構造上大部分がタンパク質間相互作用に重要な Kelch リピートドメインからなるという特徴をもっている。そこで、HEK293 細胞に Flag-KLHDC10 を発現させ、プルダウン法により結合分子の同定を試みた。その結果、KLHDC10 の結合分子として、巨大複合体型ユビキチン E3 リガーゼである Cul2-RING E3 Ligase 複合体 (CRL2 複合体) の構成因子群が得られた。

CRL2 複合体は足場タンパク質 Cul-2 を中心とした複合体として、基質をユビキチン化することで分解に導く (Fig. 3A)。近年、Kelch リピートドメインを持つ複数の分子が、CRL 複合体の基質特異性を決定する基質認識タンパク質であることが報告された。

これら分子とのアミノ酸配列比較から、KLHDC10 の C 末端領域に基質認識タンパク質と Cul2 やアダプター分子 Elongin C との結合に重要なコンセンサス配列が存在することがわかった。そこで、この配列を欠損させた変異体 (KLHDC10 BC) や配列内に点変異を導入した変異体 (KLHDC10A409P) を作製し、野生型 KLHDC10 とともに、Cul2 との結合を共免疫沈降法によって検討した。その結果、野生型 KLHDC10 と Cul2 との結合は検出されたが、変異体では検出されなかった (Fig. 3B)。よって、KLHDC10 が Cul2 複合体の基質認識タンパク質であることが明らかとなった。また、Slim も共発現したショウジョウバエ Cul2 (dCul2) と結合すること、さらに C 末端領域のコンセンサス配列を欠損させた変異体 (Slim BC) では、共発現させたショウジョウバエ Elongin C (dElongin C) との結合が検出されなくなることを確認した (Fig. 4A)。よって Slim/KLHDC10 は種を超えて保存された CRL2 複合体の基質認識タンパク質であることが示唆された。

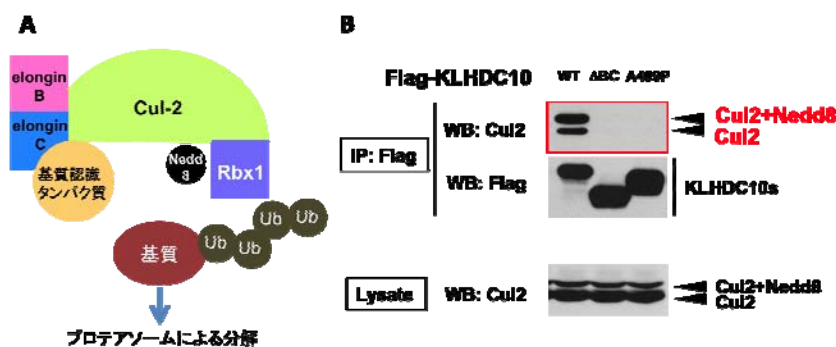


Fig. 3 KLHDC10 は CRL2 複合体の基質認識タンパク質である
A) Cul2-RING E3 Ligase (CRL2) 複合体の模式図
B) KLHDC10 と Cul2 の結合

Slim/KLHDC10 は CRL2 複合体非依存的に ASK1 を活性化する

Slim/KLHDC10 が ASK1 を活性化するメカニズムとして、CRL2-KLHDC10 複合体として何らかの基質のユビキチン化・分解を介

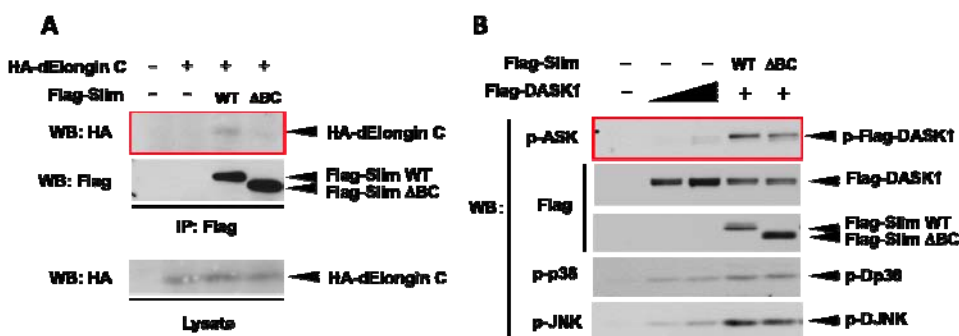


Fig. 4 Slim は CRL2 複合体との結合非依存的に DASK1 を活性化する
A) Slim WT および Slim ABC の dElongin C との結合能
B) Slim WT および Slim ABC の DASK1 に対する活性化能

したメカニズムを想定し、CRL2 複合体としての ASK1 活性化に対する影響を検討した。野生型 Slim と dElongin C と結合出来ない変異体 Slim BC をそれぞれ DASK1 と共発現させ、ウェスタンブロット解析により DASK1 に対する活性化能を検討したところ、予想に反してどちらも DASK1 を活性化した (Fig. 4B)。よって、Slim/KLHDC10 が CRL2 複合体としての機能とは非依存的に ASK1 を活性化していることが示唆された。また、ハエ背側中央領域でのメラニン蓄積を指標に検討を行ったところ、dCul2 のノックダウンによってメラニン蓄積が誘導された (Fig. 5A)。また、S2 細胞で dCul2 をノックダウンすると、Slim のタンパク質量の増加が検出された (Fig. 5B)。これらの結果は、CRL2 複合体自身が基質認識タンパク質である Slim/KLHDC10 を分解し、ASK1 シグナルに対してはむしろ抑制的に働くことを示唆している。

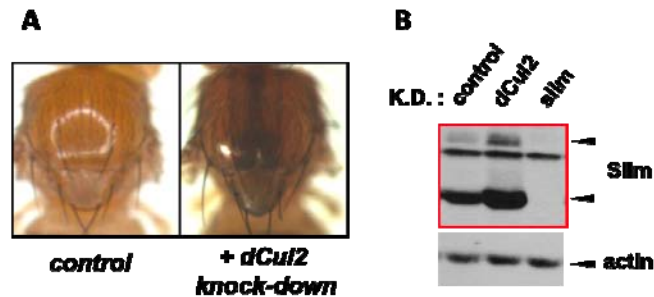


Fig. 5 CRL2複合体のメラニン蓄積に対する影響
 A) ショウジョウバエ背側中央領域でのdCul2ノックダウンによるメラニン蓄積
 B) S2細胞でのdCul2ノックダウンによるSlimの発現量増加

KLHDC10 は酸化ストレス依存的なASK1 の活性化に必要である

ストレス刺激依存的な ASK1 の活性化に対する KLHDC10 の必要性の検討を行った。過酸化水素刺激は TRAF6 依存的な ASK1 の活性化を誘導する。そこで、Neuro2A 細胞において KLHDC10 をノックダウンし、過酸化水素刺激を行ったところ、ASK1 および p38 の活性化の減弱が認められた (Fig. 6)。よって、KLHDC10 は酸化ストレス依存的な ASK1-p38 経路の活性化に必要であることが示唆された。

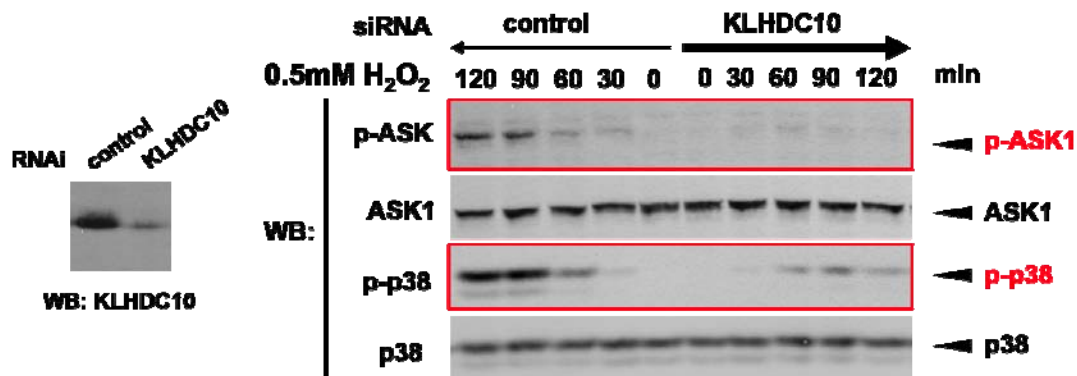


Fig. 6 KLHDC10は過酸化水素刺激依存的なASK1-p38経路の活性化に必要である

【まとめと考察】

本研究において私は、機能未知分子 Slim/KLHDC10 が CRL2 複合体の基質認識タンパク質であること、しかしながら ASK1 活性化因子として機能する場合は CRL2 複合体非依存的であることを明らかにした。CRL 複合体においては基質だけでなく、基質認識タンパク質も CRL 複合体自身によって分解されることが知られており、KLHDC10 も CRL2 複合体依存的に分解されていると考えられる。一方、KLHDC10 は過酸化水素刺激依存的な ASK1-p38 経路の活性化に必要であった。これらの結果は、本来 E3 リガーゼ複合体の構成因子としてタンパク質分解に働く Slim/KLHDC10 が、酸化ストレス状況下などにおいてはシグナルメディエーターとして機能する可能性を提示している。今後は、ストレス刺激依存的に Slim/KLHDC10 が ASK1 シグナルの活性制御因子にスイッチする分子機構ならびにその生理的意義についてさらに検討を進めていきたいと考えている。