

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 片桐 一美

Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) ファミリーの一員である Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は、酸化ストレスをはじめとする多様な刺激に応答し、アポトーシスや炎症性サイトカイン産生などの生理応答を誘導する。ASK1 欠損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、虚血性疾患や心疾患など種々の疾患の原因の 1 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。

これまで当研究室では、活性酸素種 (ROS) によって誘導される ASK1 活性化の分子機構の解明を試みてきた。ASK1 は定常状態において抗酸化蛋白質である Thioredoxin (Trx) と直接結合することで、その活性が負に制御されている。ROS によって Trx が酸化型となると、その構造変化によって ASK1 から解離し、抑制効果が解除される。さらに最近の知見により、過酸化水素刺激によって活性化した ASK1 がユビキチン化を受け、プロテアソーム依存的に分解される機構が明らかとなった。このユビキチン鎖は、刺激依存的に ASK1 と結合する脱ユビキチン化酵素 Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked (USP9X) によって脱ユビキチン化される。一方、USP9X とは逆に ASK1 のユビキチン化を担うユビキチンリガーゼ (E3) は未同定のままである。USP9X との結合部位を欠損させた ASK1- $\Delta$ GG 変異体は野生型に比べて分解を受けやすい。当研究室では、蛍光蛋白質を融合させた ASK1- $\Delta$ GG 変異体をテトラサイクリン依存的に発現する HEK293A 細胞を樹立し、ASK1- $\Delta$ GG 変異体の細胞内での分解を画像解析により定量することが可能な評価系を構築した。この系を用いて、ユビキチン関連遺伝子を対象とした siRNA ライブラリーより ASK1- $\Delta$ GG 変異体の分解を促進する遺伝子をスクリーニングした結果、4 つの候補遺伝子が同定された。

申請者は、同定された 4 つの候補遺伝子について、過酸化水素刺激依存的な内在性 ASK1 の活性化に対する影響を検討した結果、他の候補遺伝子の発現抑制によって実際に活性化型 ASK1 の量 (P-ASK) が増えるのに対し、Tripartite motif containing 48 (TRIM48) を発現抑制した場合のみ、刺激後の活性化型 ASK1 の量が減少することを見出した。TRIM48 が属する TRIM ファミリー蛋白質は、ヒトやマウスで 60 種類程度同定されており、分子構造的な特徴として、基本的に

共通した 3 つのドメイン (RING ドメイン、B-box ドメイン、Coiled-coil ドメイン) を有している。RING ドメインは E3 活性を持つことが分かっているが、TRIM48 が ASK1 の活性化に依存した分解を検出する評価系で同定されたことを考えると、TRIM48 は ASK1 のユビキチン化分解を直接制御するのではなく、ASK1 の活性化を促進する因子として機能している可能性が考えられた。本研究は、ASK1 の新規活性化因子としての TRIM48 の機能解析を通して、ASK1 の新たな活性制御分子機構の解明を目的として行われたものである。以下に本研究から得られた主要な知見をまとめた。

1. TRIM48 の発現抑制で定常状態及び酸化ストレス下における ASK1 のキナーゼ活性が抑制される
2. TRIM48 は RING ドメイン依存的に ASK1 の活性化とそれに続く K48 型ポリユビキチン化を誘導する
3. TRIM48 は RING ドメイン依存的に Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) 分子上の K48 型ポリユビキチン鎖形成を亢進する
4. TRIM48 の発現抑制によって、酸化ストレス依存的な ASK1-Trx 複合体の解離が抑制される
5. TRIM48 は PRMT1 を介して酸化剤 Diamide によって誘導される細胞死を促進する

本研究において、TRIM48 が ASK1 の新たな活性化因子として機能する可能性が見出された。さらに、TRIM48 による ASK1 の活性化分子機構として、ASK1 とその抑制因子である Trx との複合体の酸化ストレス依存的な解離を促進することが示唆された。つまり、TRIM48 の持つ役割としては、ASK1 の酸化ストレスに対する応答性を増強させることが考えられる。また、TRIM48 は RING ドメイン依存的に ASK1 を活性化することから、E3 として機能することが予想される。申請者は TRIM48 の基質の候補として PRMT1 を見出した。PRMT1 は、他の研究グループにより ASK1 を直接メチル化することで Trx との結合能を増強することが報告されている。以上のことから、TRIM48 は PRMT1 を直接ユビキチン化し、その分解を促進することで間接的に ASK1 のメチル化を制御している機構が予想される。本研究により、これまで Trx の酸化還元状態のみで説明されていた ASK1 の酸化ストレス依存的活性化機構に対して、TRIM48 という因子が ASK1 側の質的变化を制御することによっても Trx との結合能が制御されるモデルを提唱するに至った点において非常に意義深いと考えられる。

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。