

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18856

研究課題名(和文) 疾患治療への応用を目指した、ASK1のユビキチン化制御機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanisms of ASK1 ubiquitination for developing a new treatment strategy for ASK1-related diseases

研究代表者

平田 祐介 (Hirata, Yusuke)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10748221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス応答キナーゼASK1のユビキチン化酵素Roquin-2の新規ターゲット分子として、TLR4(細菌由来成分LPSの受容体)下流で機能するシグナル伝達分子の1つを新たに同定し、ASK1および新規ターゲット分子のユビキチン化・分解を促進することで、自然免疫応答を負に制御しているという新たな免疫制御機構を明らかにした。また、TRIM48がASK1の新規活性化因子として作用し、Roquin-2によるASK1ユビキチン化を促進することを見出し、ASK1ユビキチン化制御機構の全容解明およびASK1関連疾患治療への応用につながる重要な成果となった。

研究成果の概要(英文)：Roquin-2 is a ubiquitin ligase that ubiquitinates a stress-responsive kinase ASK1. In this study, we identified another ubiquitination target of Roquin-2 that functions in TLR4 (the receptor for a bacterial component, LPS) signaling pathway. We found that Roquin-2 promotes ubiquitin-dependent degradation of ASK1 and the newly found target molecule, and thereby negatively regulates innate immune responses. Meanwhile, we also identified another ubiquitin ligase TRIM48 as a positive regulator of ASK1 activation. TRIM48 promotes ASK1 activation, and thus facilitates ASK1 ubiquitination mediated by Roquin-2. These findings provide comprehensive understanding of the regulatory mechanisms for ASK1 ubiquitination, which will lead to the development of novel therapeutic strategies for ASK1-related diseases.

研究分野：細胞内シグナル伝達、ストレス応答、自然免疫

キーワード：ASK1 Roquin-2 TRIM48 ユビキチン化 TLR4

1. 研究開始当初の背景

Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)は、様々な物理化学的ストレスにより活性化するストレス応答キナーゼで、細胞の生死や免疫応答の制御などを司っている。ASK1 の発現量および活性は、生体内で厳密に制御されており、その制御の破綻が、様々な病態と関連していることが報告されている。特に、ASK1 シグナルの亢進と、自己免疫疾患や炎症誘導性ガンの発症との関連が示唆されている。ASK1 が関与するこれらの疾患の治療戦略として、ASK1 の発現量あるいは活性を低下させることにより、ASK1 シグナルを減弱させるという方策が考えられる。しかしながら、単純に ASK1 の発現量や活性を低下させる方法では、ASK1 シグナルが過剰に減弱することで、誘導されるべき適切な生体応答自体が阻害されてしまう。そこで、通常の ASK1 シグナル応答を損なうことなく、過剰な ASK1 シグナルの誘導を抑制することが、疾患の治療戦略の重要な指針となる。ところが、これまで同定されてきた ASK1 制御因子は、ASK1 の活性化そのものを正または負に制御する性質のものであったため、ASK1 シグナルの亢進に伴う疾患の治療戦略開発は、非常に困難であった。

2. 研究の目的

最近、ASK1 の活性制御に関わる新規制御因子として、ユビキチン化酵素 Roquin-2 および脱ユビキチン化酵素 USP9X が同定された^{1,2}。これらの分子は、活性酸素などの刺激による ASK1 の活性化依存的に、ASK1 のユビキチン付加あるいは分解反応を促進することで、ASK1 の活性化後の分解スピード・量をコントロールしている。すなわち、Roquin-2 および USP9X は、ASK1 の活性化そのものを制御するのではなく、ASK1 活性化後のシグナルの持続時間や強度を、協調して厳密に制御していることが示唆された。また最近、Roquin-2 および USP9X は、それぞれ自己免疫疾患の原因遺伝子、ガン促進因子である可能性が示唆されていることから、これらの疾患が、ASK1 シグナルの異常な亢進に伴うものであることが想定される。つまり、Roquin-2 および USP9X を介した ASK1 のユビキチン化を適切にコントロールすることで、ASK1 シグナルによる適切な生体応答自体を阻害することなく、ASK1 シグナルの亢進に伴う自己免疫疾患やガン等の疾患を効果的に治療できる可能性が見いだされた。しかし、現状では、Roquin-2 や USP9X による ASK1 活性化依存的なユビキチン化反応制御の詳細なメカニズムや、これらの ASK1 を介した自己免疫疾患やガンの発症との関連は全く不明である。

さらに、ASK1 ユビキチン化に関与するユビキチン化酵素の候補分子として Roquin-2 以外に同定していた TRIM48 については²、ASK1

ユビキチン化を促進することは明らかになっているが、その詳細な分子機構は不明であり、ASK1 関連疾患発症との関連も全くわかっていない。

そこで本研究では、上記ユビキチン化関連因子を介した ASK1 ユビキチン化の制御機構や疾患発症との関連について明らかにし、ASK1 シグナルの異常に伴う疾患の治療戦略の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) Roquin-2 に関する解析

HeLa 細胞に Flag-ASK1 (Wild-type (WT), キナーゼ活性欠損変異体) または Myc-Roquin-2 (WT, ユビキチン化酵素活性欠損変異体) をトランスフェクションした際の炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現変動について、real-time PCR 法により解析を行った。HEK293 細胞 (CD14, MD2, TLR4 を安定発現) およびマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 において、CRISPR/Cas9 法により Roquin-2 ノックアウト (KO) 細胞を作製し、LPS 刺激を行った際の MAP キナーゼ経路や NF- κ B 経路の活性化について、各種抗体を用いたウェスタンブロットによって評価した。また、その際に、シグナル活性化に伴って発現誘導される IL-6 や IL-1 などの mRNA レベルについて、real-time PCR によって評価した。Myc-Roquin-2 と TLR4 シグナル関連分子 (Flag タグ付き) の結合解析は、Flag 抗体ビーズを用いた共免疫沈降実験にて行い、Myc 抗体を用いた Western Blot により検出を行った。TLR4 シグナル関連分子 (Flag タグ付き) に対する Myc-Roquin-2 によるユビキチン化の寄与を調べるため、*in vivo* ubiquitination assay を行った。Flag 抗体ビーズを用いた免疫沈降を行い、一度 1% SDS によって変性・熱処理を加えたのちに再度免疫沈降を行ってサンプル化し、K48 型ユビキチン鎖を特異的に認識可能な抗体を用いたウェスタンブロットによって検出を行った。

(2) TRIM48 に関する解析

HEK293A 細胞に 6Myc-TRIM48 (WT, ユビキチン化酵素活性変異体) または Flag-ASK1 (WT, キナーゼ活性欠損変異体) をトランスフェクションし、*in vivo* ubiquitination assay (詳細は(1)に記載) や ASK1 リン酸化状態の評価を、各種抗体を用いたウェスタンブロットによって行った。TRIM48 のユビキチン化標的の探索を目的とし、Flag-TRIM48 に対する結合分子をプルダウン法により得たのちに、マスペクトロメトリーによって結合分子の同定を行った。TRIM48 ユビキチン化標的分子として同定した ASK1 活性制御因子 Y の発現プラスミドを作製し、TRIM48 による標的分子のユビキチン化・分解の寄与について、各種抗体を用いたウェスタンブロットによって解析を行った。分解への寄与を評価する実験では、TRIM48 発現後に翻訳阻害剤シクロヘキシミドを処置したのちに、Y の発現変動を継時

的に解析することで、分解速度を評価した。さらに、酸化ストレス応答における TRIM48 を介した ASK1 活性制御の重要性を検証するため、TRIM48 あるいは PRMT1 をノックダウンしたのちに、酸化ストレス誘導剤 Diamide を処置した際の細胞死について、LDH アッセイによって評価を行った。

4. 研究成果

(1) Roquin-2 に関する解析

Flag-ASK1 WT を発現させた HeLa 細胞では、IL-6 mRNA の有意な発現上昇が認められたが、キナーゼ活性を欠損した Flag-ASK1 発現細胞では、有意な発現上昇は認められなかった。また、Flag-ASK1 WT 発現細胞における IL-6 発現上昇は、Roquin-2 WT との共発現により有意に抑制されたが、ユビキチン化酵素活性を欠損した Roquin-2 との共発現では抑制されなかった。この結果から、Roquin-2 はユビキチンリガーゼ活性依存的に ASK1 を介した IL-6 発現上昇を負に制御していることが示唆された。

そこで次に、Roquin-2 の ASK1 を介した自然免疫応答制御の重要性について検証するため、TLR4 安定発現細胞 (アクセサリー分子 CD14, MD2 も発現) において Roquin-2 KO 細胞を作製し、LPS 刺激を行った際の、MAPK 経路や NF- κ B 経路活性化について、ウェスタンブロットによって評価を行った。LPS 刺激時には、その受容体である TLR4 活性化に伴い、活性酸素種 (ROS) 産生を介して ASK1 が活性化され、その下流では p38 が選択的に活性化を受け、IL-6 をはじめとした炎症性サイトカインが発現誘導されることが知られている³。Roquin-2 KO 細胞では、ASK1 の活性化亢進に伴う p38 活性化の増強が認められたが、JNK リン酸化や I κ B の分解の亢進が認められたことから、予想外なことに、ASK1 非依存的に活性化する JNK や NF- κ B 経路の活性化も亢進していることが明らかになった。次に、免疫系細胞でも同様の表現型が認められるか調べるため、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において Roquin-2 KO 細胞株を樹立し、LPS 刺激を行った際の MAPK 経路や NF- κ B 経路の活性化について評価したところ、HEK293 細胞の場合と同様に、p38 \cdot JNK \cdot NF- κ B 経路全ての活性化亢進が認められた。このとき、Roquin-2 KO 細胞では、シグナル活性化に伴って誘導される IL-6 や IL-1 の mRNA レベルも WT 細胞と比較して著しく上昇していた。以上の結果から、Roquin-2 は、ASK1 とともに、ASK1 以外の別の分子の活性化を抑制することで、LPS 刺激時の MAP キナーゼ経路および NF- κ B 経路の活性化、およびその下流でのサイトカイン発現誘導を負に制御していることが示唆された。そこで、Roquin-2 の標的分子を同定するため、TLR4 下流で機能する分子と Roquin-2 の結合性について網羅的に調べたところ、ある TLR4 下流分子 X を同定した。詳細な解析から、

Roquin-2 は X の K48 型ポリユビキチン化および分解を促進することで、MAPK 経路 \cdot NF κ B 経路の活性化を負に制御することが示唆された。

以上の解析から、Roquin-2 は ASK1 を介した免疫応答制御に寄与しており、LPS 刺激時の免疫応答を負に制御していることが明らかになった。さらに、Roquin-2 の新規標的分子として TLR4 下流で機能するシグナル分子 X を同定し、Roquin-2 は X についてもユビキチン化 \cdot 分解を促進することで、LPS 刺激に対する応答を負に制御することが示唆された。Roquin-2 による X のユビキチン化の詳細な分子機構については現在解析を進めているところであるが、X のユビキチン化は定常状態で起きていることが示唆されている。つまり、単純に Roquin-2 の機能を改変した場合には、ASK1 と X の両方の活性化に影響が出てしまう上に、X の機能が定常状態で影響を受けることで、その下流で活性化される MAP キナーゼ経路や NF- κ B 経路も活性化初期の段階から影響を受けることになるため、本研究の目的である「シグナル活性化後の過剰な活性化の亢進のみを選択的に制御する」という趣旨にそぐわないことになってしまう。今後の研究方針としては、ASK1 の活性化のみを選択的に制御できるよう、Roquin-2 と ASK1、X の結合様式や制御機構について詳細に明らかにする必要があり、現在引き続き解析を進めているところである。また、Roquin-2 ノックアウトマウスは出産前後に死亡してしまうため、当研究で明らかになった自然免疫と Roquin-2 の関連を個体レベルで詳細に解析することを目的として、骨髄由来細胞特異的な Roquin-2 ノックアウトマウス作製に着手し、完成間近を迎えている。本ノックアウトマウスを用いた様々な炎症疾患モデルにおいて、Roquin-2 の自然免疫応答における寄与を明らかにし、ASK1 関連疾患の治療戦略開発に向けて、今後解析を行っていく予定である。

(2) TRIM48 に関する解析

TRIM48 は、Roquin-2 とともに ASK1 ユビキチン化を促進するユビキチン化酵素としてスクリーニングによって同定した分子である²。そこで、TRIM48 が ASK1 活性化に与える影響を解析したところ、TRIM48 発現時には ASK1 の活性化が亢進し、発現抑制時には ASK1 活性化が抑制されるという結果が得られた。これらの結果は、TRIM48 が単純に ASK1 をユビキチン化することで分解を促進していると仮定すると、完全に矛盾することになるため、TRIM48 は ASK1 の活性化促進因子として作用し、TRIM48 による ASK1 ユビキチン化は、ASK1 活性化促進の結果である可能性が想定された。そこで、Roquin-2 KO 細胞に対して TRIM48 および ASK1 を発現させ、*in vivo* ubiquitination assay によって ASK1 ユビキチン化を評価したところ、Roquin-2 欠損下では、TRIM48 による ASK1 ユビキチン化が全く認められなかったことから、TRIM48 依存的な

ASK1 ユビキチン化は Roquin-2 が担っていることが示唆された。

そこで次に、TRIM48 の標的分子を明らかにするため、Flag-TRIM48 発現細胞に対してプルダウンアッセイを行い、マススペクトロメトリーによって TRIM48 の結合分子を探索した結果、既知の ASK1 活性化抑制因子 Y を同定した。in vivo ubiquitination assay により、TRIM48 WT は Y の K48 型ポリユビキチン化を促進した一方、ユビキチン化酵素活性を欠損した TRIM48 変異体は、ユビキチン化状態が変化しなかった。また、TRIM48 WT は Y の分解を促進したが、ユビキチン化酵素活性変異体は、分解に影響を与えなかった。これらの結果から、TRIM48 は Y をユビキチン化し、分解に導くことによって、ASK1 活性化を正に制御していることが示唆された。さらに、TRIM48 を介した ASK1 活性化制御機構の生理的重要性について検討を行うため、ASK1 依存的な酸化ストレス誘導性細胞死に対する TRIM48 の寄与を、ノックダウン実験によって検証した。その結果、TRIM48 ノックダウンによって Diamide (酸化ストレス誘導剤) 処置に伴う細胞死が抑制されたが、PRMT1 を同時にノックダウンすることによって、その抑制が解除された。この結果から、TRIM48 による PRMT1 発現レベルの制御が、実際に ASK1 を介した酸化ストレス応答において重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上のように、本研究では TRIM48 を新規 ASK1 活性化因子として同定し、Roquin-2 を介した ASK1 ユビキチン化を促進する機構を詳細に明らかにした。TRIM48 による ASK1 ユビキチン化の亢進作用は大変顕著であることから、Roquin-2 による ASK1 ユビキチン化を積極的に促進する何らかの機構が存在する可能性があり、現在 TRIM48 を介した ASK1 ユビキチン化の制御についてさらに詳細な解析を行うとともに、個体レベルにおけるこの制御機構の重要性について今後検証を行っていく予定である。TRIM48 を介した Roquin-2 による ASK1 ユビキチン化機構の解明は、今後 ASK1 関連疾患の治療戦略構築の上でも、重要な役割を果たすことが期待される。

< 引用文献 >

Nagai H, Noguchi T, Matsuzawa A *et al.* Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death *Mol. Cell* 36(5):805-818 (2009)
doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.016.

Maruyama T, Matsuzawa A *et al.* Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses *Sci. Signal.* 7(309):ra8 (2014)

doi: 10.1126/scisignal.2004822

Matsuzawa A, Noguchi T *et al.* ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nature Immunol.* 6(6), 587-592 (2005)
doi: 10.1038/ni1200

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Hirata Y, Takahashi M, Kudoh Y, Kawana H, Kano K, Makide K, Shinoda Y, Yabuki Y, Fukunaga K, Aoki J, Noguchi T and Matsuzawa A
Trans-fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *J. Biol. Chem.*, 292(20);8174-8185 (2017)
* 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M116.771519

Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T and Matsuzawa A
Post-translational modifications of the TAK1-TAB complex *Int. J. Mol. Sci.* 18(1), 205 (2017)
* 査読あり
doi:10.3390/ijms18010205

Noguchi T, Tsuchida M, Kogue Y, Spadini C, Hirata Y and Matsuzawa A
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor 1 (BIG1) governs the recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) signaling complexes *Int. J. Mol. Sci.* 17(11), 1869 (2016)
* 査読あり
doi:10.3390/ijms17111869

Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H and Miki H
Mg²⁺ extrusion from intestinal epithelia by CNNM protein is essential for gonadogenesis via AMPK-TORC1 signaling in *Caenorhabditis elegans* *PLoS Genet.* 12(8):e1006276. (2016) * 査読あり
doi: 10.1371/journal.pgen.1006276

[学会発表](計 10 件)

平田祐介、工藤勇氣、森下徹、野口拓也、

松沢厚
ユビキチン化修飾を介したストレス応答キナーゼ ASK1 の活性制御機構
第 39 回日本分子生物学会
2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日
パシフィコ横浜

森下徹、平田祐介、野口拓也、松沢厚
RING 型ユビキチンリガーゼ TRIM48 によるストレス応答キナーゼ ASK1 の活性制御機構の解明
第 89 回日本生化学会大会
2016 年 9 月 25 日～27 日
仙台国際センター

工藤勇氣、平田祐介、野口拓也、松沢厚
Roquin-2 による ASK1 の活性制御を介した免疫応答の調節
第 89 回日本生化学会大会
2016 年 9 月 25 日～27 日
仙台国際センター

平田祐介、工藤勇氣、野口拓也、松沢厚
Roquin-2 による ASK1 活性制御を介した免疫応答調節機構の解明
第 69 回酸化ストレス学会学術集会
2016 年 8 月 30 日～31 日
仙台国際センター

Hirata Y, Noguchi T and Matsuzawa A
Mechanisms of ROS-induced ASK1 activation regulated by ubiquitin-related enzymes
第 16 回日本 NO 学会学術集会 (第 9 回国際 NO 学会) (国際学会)
2016 年 5 月 20 日～22 日
仙台国際センター

森下徹、平田祐介、野口拓也、一條秀憲、松沢厚
RING 型ユビキチンリガーゼ TRIM48 によるストレス応答キナーゼ ASK1 の活性制御機構の解明
BMB2015
2015 年 12 月 1 日～4 日
神戸ポートアイランド

工藤勇氣、平田祐介、野口拓也、一條秀憲、松沢厚
Roquin-2 による ASK1 活性制御を介した免疫応答の調節
BMB2015
2015 年 12 月 1 日～4 日
神戸ポートアイランド

Kudoh Y, Hirata Y, Noguchi T and Matsuzawa A
Regulation of inflammatory responses through Roquin-2-mediated suppression of ASK1 activation
Pharmaceutical Science Symposium 2015 (国

際学会)
2015 年 11 月 16 日～17 日
東北大学片平さくらホール

平田祐介、森下徹、野口拓也、松沢厚
E3 リガーゼ TRIM48 による ASK1 活性化制御機構の解明
第 54 回日本薬学会東北支部大会
2015 年 9 月 26 日
岩手医科大学 矢巾キャンパス

工藤勇氣、平田祐介、野口拓也、一條秀憲、松沢厚
ユビキチンリガーゼ Roquin-2 の ASK1 活性制御を介した免疫応答調節
第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015
2015 年 9 月 12 日～13 日
千葉大学亥鼻キャンパス医学系総合研究棟

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~eisei/eisei.HP/index.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
平田 祐介 (HIRATA, Yusuke)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：10748221

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()