

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659033

研究課題名（和文）脂質代謝酵素がストレス応答を制御する新規機構の解析

研究課題名（英文） Involvement of lipid-metabolizing enzymes in stress response

研究代表者 一條 秀憲 (ICHIJO HIDENORI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00242206

研究成果の概要（和文）：ASK ファミリーシグナルを解析する目的で、線虫におけるゲノムワイドスクリーニングを行った結果、55 個の ASK ファミリー活性化候補因子を単離した。それらの分子に対して、神経細胞の分化、自然免疫応答、酸化ストレス応答などを中心とした解析を行った。また、既知の p38 活性化経路との相対的な関係について解析を行った結果、遺伝子 X が ASK1 の上流活性化因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： To analyze ASK family-dependent stress signaling, we identified 55 candidate ASK activator candidates by a genome-wide RNAi screening in *C. elegans*. Those candidates were further analyzed in the context of neuronal differentiation, innate immunity and oxidative stress response. Finally, we identified gene X as an activator of ASK1 by comparing it with known p38 signaling components.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ASK1、脂質、ストレス応答、シグナル伝達、線虫、緑膿菌感染、MAP キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は環境ストレスに応答するため、細胞内シグナル伝達経路を適切に機能させる必要があり、この応答機構の破綻は環境因子や内在性因子を要因とする様々な病態の原因にもなる。そのようなシグナル伝達経路の一つに、酵母より哺乳類まで進化的に高度に保存された mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経

路がある。MAPK 経路は主要な 3 つの経路から構成されるが、そのうち 2 つの経路(JNK ならびに p38 経路)は、ストレス応答性 MAPK 経路とも呼ばれ、様々なストレス刺激により活性化され、ストレスに対する細胞応答を調節する。MAPK 経路の構成因子はモデル生物として頻用される線虫 *C. elegans* においても高く保存されており、線虫を用いたストレス応答性 MAPK

経路の研究がわれわれを含めた国内外のいくつかのグループで進められている。われわれは線虫での知見をもとに、細菌やウイルス感染に対する初期の迅速な生体防御機構である自然免疫機構におけるストレス応答性 MAPK 経路が、線虫と同様に哺乳類においても機能することを示した(Matsuzawa et al., 2005 *Nat. Immunol.*)が、これは線虫がストレス応答機構を解析するための有用なツールであることを示す証左であるとわれわれは考えている。

これまでわれわれは、様々なストレスに対して鋭敏に反応して活性化する p38 に注目し、その活性化状態を生きた線虫の個体において可視化できる系を構築し、p38 の活性化に必要なシグナル分子群を、ゲノムワイドスクリーニングにより同定してきた。これまでに線虫における全遺伝子の 86%に相当する 16,757 クローンのスクリーニングを行った結果、55 の候補因子を単離した。脂質代謝酵素 X はこのスクリーニングで単離された候補因子の一つである。脂質代謝酵素 X は、とある生体膜脂質から、セカンドメッセンジャーとして広く用いられる脂質 Y を生合成することがこれまでに報告されている

## 2. 研究の目的

生体は、酸化ストレス、紫外線、細菌感染をはじめとする様々な環境ストレスに暴露されている。これらストレスの多くはがんや炎症をはじめとする多くの疾患の発症あるいは病態に関わっていると考えられる。われわれは近年、線虫 *C. elegans* を用いたゲノムワイドスクリーニングにより、ストレス応答性キナーゼである ASK-p38 経路を活性化し得る分子群を探索した。本研究では、新たに候補因子として同定したものの一つである脂質代謝酵素 X にターゲットを絞り、生体膜脂質が

担う新たなストレス応答の機構について解析を行う。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度においては、線虫において脂質代謝酵素 X の遺伝学的位置づけを明らかとし、後に行う哺乳類培養細胞系における解析への情報を収集する。続いて平成 24 年度においては、当研究室で確立している MAP キナーゼ経路活性の評価系を駆使し、脂質代謝酵素 X の哺乳類オルソログおよび想定される産物である脂質 Y が MAP キナーゼ経路をどのような機構で活性化するかを、生化学的な観点から解析する。

### <平成 23 年度：線虫における脂質代謝酵素 X の遺伝学的解析>

線虫における脂質代謝酵素 X の機能を、主にスクリーニングに用いたレポーターを指標として解析する。指標はレポーター線虫の蛍光強度（線虫 p38 活性依存的に転写誘導される遺伝子のプロモーター下流に GFP をもつ）を用いる。

(1)脂質代謝酵素 X 欠失変異体の単離および表現型解析：線虫における脂質代謝酵素 X の欠失変異体は機能解析において必須であるが、現在までに酵素ドメインを欠失する変異体は単離されていないため、紫外線とテトラメチルスルホン酸を組み合わせた UV/TMP 法を用いることで、欠失変異体を単離する。

単離した欠失変異体に関しては、表現型に関する情報を収集する。表現型に関しては、以下の 2 種類の観点から解析を行う。

1) 線虫 p38 欠失変異体と共通する表現型：これまでに報告されている神経細胞の分化、自然免疫応答、酸化ストレス応答などを中心とした解析を行う。

2) 脂質代謝と関連した表現型：脂質代謝酵素 X の欠失変異体においては脂質 Y の量が著しく減弱していることが想定される。成長遅延や胚性致死率などに関する基本的な表現型を確認する。

**(2)脂質代謝酵素Xの線虫における遺伝学的解析**：まずは線虫における脂質代謝酵素 X と MAP キナーゼ経路との間の遺伝学的相互作用を、スクリーニングに用いたレポーターを指標として解析する。われわれはすでに線虫の NSY-1- PMK- 1 経路（哺乳類での ASK1-p38 経路に相当する）を構成する分子の各種変異体を所有しているため、それらの変異体との遺伝学的相互関係を調べることで、既知の p38 活性化経路との相対的な関係についての情報を得る。遺伝学的相互作用の解析には以下の手法を用いる。

- ・脂質代謝酵素 X 強制発現株と MAP キナーゼ変異体との掛けあわせ
- ・脂質代謝酵素 X 欠失変異体と MAP キナーゼ強制発現株との掛けあわせ

また線虫個体のイムノブロットを用いて、脂質代謝酵素 X 欠失変異体における定常状態およびストレス刺激時での NSY-1 および PMK-1 活性を評価する。NSY-1 活性の評価のため、NSY-1 に対するモノクローナル抗体をラットリンパ節法により作製する。

以上の情報から、脂質代謝酵素 X が NSY-1-PMK-1 経路の上流で機能するというデータを収集する。

**(3)脂質代謝酵素 X 欠失変異体における脂質成分解析**：脂質代謝酵素 X の欠失変異体における脂質成分を解析することで、想定される産物である脂質 Y や、他の生体脂質の変動を確認する。

#### **<平成 24 年度：哺乳類細胞における脂質代謝酵素 X および脂質 Y による MAP キナーゼ経路活性化機構の解析>**

**(1)脂質代謝酵素 X の機能評価**：脂質代謝酵素 X の遺伝子情報をもとに、哺乳類(マウス、ヒト)におけるオルソログの cDNA をクローニングする。得られた cDNA を哺乳類培養細胞へ導入し強制発現させる、また脂質 Y を哺

乳類培養細胞に直接投与することで、p38 の活性化に対する作用や、MAPK 経路の最上流である各種 MAP3K の活性化および結合の有無について検討する。また、内在性分子を検出するため、当研究室で確立されているラットリンパ節法によるモノクローナル抗体の作製を行う。

**(2)MAP キナーゼ経路活性化機構の解析**：(1)において解析した各種 MAP3K のうち活性化が想定されるものに関しては、他の MAP3K との配列の相同性から活性制御に重要なリン酸化制御部位をある程度予想できると考えている。このような予想リン酸化部位に変異を導入したものを発現させたり、細胞に過剰発現させた分子を回収し LC-MS/MS を用いた質量分析を行ったりすることで、リン酸化部位を同定し、p38 経路活性化機構について知見を得る。

**(3)脂質代謝酵素 X の RNAi による応答ストレスの解析**：脂質代謝酵素 X がどのようなストレスに応答して p38 経路を活性化しうる因子であるかについて siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより培養細胞系で検討する。着目する刺激に関してはこれまでのわれわれの ASK1, ASK2, ASK3 および線虫オルソログ NSY-1 の解析により得られた知見をもとに、酸化ストレス、小胞体ストレス、DNA 傷害、浸透圧ストレス、無酸素などから検討する。実験を行うにあたっては、(1)において作成したモノクローナル抗体により、脂質代謝酵素 X のノックダウン効率を評価する。ノックダウン実験による p38 活性化の減弱がみられた刺激に関しては、ノックダウンと同時に脂質 Y を投与することによるレスキュー実験を行う。またモノクローナル抗体によりマウス組織染色を行うことで、どのような組織・部位で発現しているかの検討を行い、生理機能についての情報を得る。

#### 4. 研究成果

われわれは、様々なストレスに対して鋭敏に応答して活性化するp38に注目し、その活性化状態を生きた線虫の個体において可視化できる系を構築し、p38の活性化に必要なシグナル分子群を、ゲノムワイドスクリーニングにより同定してきた。線虫における全遺伝子の86%に相当する16,757クローンのスクリーニングを行った結果、55の候補因子を単離した。脂質代謝酵素Xはこのスクリーニングで単離された候補因子の一つである。線虫における脂質代謝酵素Xの機能を主にスクリーニングに用いたレポーターを指標として解析した。指標はレポーター線虫の蛍光強度（線虫p38活性依存的に転写誘導される遺伝子のプロモーター下流にGFPをもつ）を用いた。線虫における脂質代謝酵素Xの欠失変異体は機能解析において必須であるが、これまでに酵素ドメインを欠失する変異体は単離されていないため、紫外線とテトラメチルスルホン酸を組み合わせたUV/TMP法を用いることで、欠失変異体を単離した。単離した欠失変異体に関しては、表現型に関する情報を収集した。表現型に関しては、線虫p38欠失変異体と共通する表現型、これまでに報告されている神経細胞の分化、自然免疫応答、酸化ストレス応答などを中心とした解析を行った。

また、われわれはすでに線虫のNSY-1&#8211;PMK-1経路（哺乳類でのASK1&#8211;p38経路に相当する）を構成する分子の各種変異体を所有していたため、それらの変異体との遺伝学的相互関係を調べることで、既知のp38活性化経路との相対的な関係について解析を行った結果、XがNSY-1の上流活性化因子であることを明らかにした。今後は哺乳動物におけるシグナルの保存性ならびに機能の解析が重要と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 22 件）全て査読有

1. Yamaguchi, K., Takeda, K., Kadowaki, H., Ueda, I., Namba, Y., Ouchi, Y., Nishitoh, H. and **Ichijo, H.** Involvement of ASK1-p38 pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic  $\beta$  cell exhaustion. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 3656-3663 (2013). doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.029
2. Tasaki, T., \*Yamada, S., Guo, X., Tanimoto, A., Wang, K-T., Nabeshima, A., Kitada, S., Noguchi H., Kimura, S., Shimajiri, S., Kohno, K., **Ichijo, H.** and Sasaguri, Y. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 deficiency attenuates vascular injury-induced neointimal hyperplasia by suppressing apoptosis in smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, 182, 597-609 (2013). doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.008
3. Shiizaki, S., Naguro, I. and **Ichijo, H.** Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv. Biol. Regul.*, (review article), 53, 135-144 (2013). doi: 10.1016/j.jbior.2012.09.006
4. Katome, T., Namekata, K., Guo, X., Semba, K., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C., **Ichijo, H.**, Mitamura, Y. and Harada, T. Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury. *Cell Death Differ.*, 20, 270-280 (2013). doi:10.1038/cdd.2012.122
5. Naguro, I., Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K. and **Ichijo, H.** ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.*, 2012;3:1285. doi: 10.1038/ncomms2283 (2012).
6. Hayakawa, Y., Hirata, Y., Sakitani, K., Nakagawa, H., Nakata, W., Kinoshita, H., Takahashi, R., Takeda, K., **Ichijo, H.**, Maeda, S. and Koike, K. Apoptosis signal-regulating kinase-1 inhibitor as a potent therapeutic drug for the treatment of gastric cancer. *Cancer Sci.*, 103, 2181-2185 (2012). doi: 10.1111/cas.12024
7. Sekine, Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Sono, N., Iemura, S., Natsume, T., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K. and **Ichijo, H.** The

- kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5.  
*Mol. Cell*, 48, 692-704, (2012).  
doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.018
8. Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., Takeda, K. and **Ichijo, H.** Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5.  
*J. Biol. Chem.*, 287, 34635-34645 (2012).  
doi: 10.1074/jbc.M112.357509
  9. Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K. and **Ichijo, H.** Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signalling pathways.  
*Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci.*, (review article), 88, 434-453 (2012).  
doi: 10.2183/pjab.88.434
  10. Kanamaru, Y., Sekine S., **Ichijo, H.** and Takeda, K. The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses.  
*J. Signal Transduc.* (review article), 2012, 12 (2012), doi:10.1155/2012/931215
  11. Lin, F.R., Huang, S.Y., Hung, K.H., Su, S.T., Chung, C.H., Matsuzawa, A., Hsiao, M., **Ichijo, H.** and Lin, K.I. ASK1 promotes apoptosis of normal and malignant plasma cells.  
*Blood*, 120, 1039-1047 (2012).  
doi:10.1182/blood-2011-12-399808
  12. Soga, M., Matsuzawa, A., **Ichijo, H.** Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway.  
*Int. J. Cell Biol.*, (review article), 2012, 439587 (2012). doi:10.1155/2012/439587.
  13. Fujisawa, T., Homma, K., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Tsuburaya, N., Naguro, I., Matsuzawa, A., Takeda, K., Takahashi, Y., Goto, J., Tsuji, S., Nishitoh, H. and **Ichijo, H.** A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants.  
*Ann. Neurol.*, 72, 739-749 (2012).  
doi:10.1002/ana.23668.
  14. Nako, H., Kataoka, K., Koibuchi, N., Dong, Y.F., Toyama, K., Yamamoto, E., Yasuda, O., **Ichijo, H.**, Ogawa, H. and Mitsuyama, S.H. Novel mechanism of angiotensin II-induced cardiac injury in hypertensive rats: the critical role of ASK1.  
*Hypertens. Res.*, 35, 194-200 (2012).  
doi: 10.1038/hr.2011.175
  15. Ishida, Y., Sekine, Y., Oguchi, H., Chihara, T., Miura, M., **Ichijo, H.** and Takeda, K. Prevention of apoptosis by mitochondrial phosphatase PGAM5 in the mushroom body is crucial for heat shock resistance in *Drosophila melanogaster*.  
*PLoS ONE*, 7: e30265 (2012).  
doi: 10.1371/journal.pone.0030265
  16. Lee, K.W., Zhao, X., Im, J.Y., Grosso, H., Jang, W.H., Chan, T.W., Sonsalla, P.K., German, D.C., **Ichijo, H.**, Junn, E., and Mouradian, M.M. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Mediates MPTP Toxicity and Regulates Glial Activation.  
*PLoS ONE*, 7: e29935 (2012).  
doi: 10.1371/journal.pone.0029935
  17. Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., **Ichijo, H.**, Mori, K. and Tschoop, J. ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway.  
*Cell Death & Disease*, 3:e261. (2012).  
doi: 10.1038/cddis.2011.132
  18. Makena, P.S., Gorantla, V.K., Ghosh, M.C., Bezawada, L., Kandasamy, K., Balazs, L., Luellen, C.L., Thompson, K.E., Parthasarathi, K., **Ichijo, H.**, Waters, C.M. and Sinclair, S.E. Deletion of apoptosis signal regulating kinase-1 prevents ventilator-induced lung injury in mice.  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 46, 461-469 (2011). doi: 10.1165/rcmb.2011-0234OC
  19. Dosal, R.G., Horan, K.A., Rahbek, S.H., **Ichijo, H.**, Chen, Z.J., Mielal, J.J., Hartmann, R., Paludan, S.R. HSV infection induces production of ROS, which potentiate signaling from pattern recognition receptors: role for S-glutathionylation of TRAF3 and 6.  
*PLoS Pathogens*, 7, e1002250, (2011).  
doi:10.1371/journal.ppat.1002250
  20. Yamada, S., Ding, Y., Tanimoto, A., Wang, K.Y., Guo, X., Li, Z., Tasaki, T., Nabesima, A., Murata, Y., Shimajiri, S., Kohno, K., **Ichijo, H.** and Sasaguri, Y. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Deficiency Accelerates Hyperlipidemia-Induced Atheromatous Plaques via Suppression of Macrophage Apoptosis.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31, 1555-1564 (2011).  
doi: 10.1161/ATVBAHA.111.227140
  21. Sekine, Y., Takagahara, S., Hatanaka, R., Watanabe, T., Oguchi, H., Noguchi, T., Naguro, I., Kobayashi, K., Tsunoda, M., Funatsu, T., Nomura, H., Toyoda, T., Matsuki, N., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K., and **Ichijo, H.** p38 MAP kinase regulates the expression of genes in the dopamine synthesis pathway through phosphorylation of NR4A nuclear receptors.  
*J. Cell Sci.* 124, 3006-3016 (2011).  
doi: 10.1242/jcs.085902

22. Nakagawa, H., Hirata, Y., Takeda, K., Hayakawa, Y., Sato, T., Kinoshita, H., Sakamoto, K., Nakata, W., Hikiba, Y., Omata, M., Yoshida, H., Koike, K. **Ichijo, H.** and Maeda, S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated MAPK. *Hepatology*, 54, 185-195 (2011). doi: 10.1002/hep.24357

〔学会発表〕（計 9 件）

1. **Ichijo, H.**, Sekine, Y. Redox control of cell death, 第 85 回日本生化学会大会, H24.12.14-16, 福岡.
2. **Ichijo, H.** ASK Family Kinases in Stress Response and Disease, The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences "On the Frontiers of Chemical Biology", H24.12.3-4, 東京.
3. **Ichijo, H.** SOD1 as a molecular switch to initiate the homeostatic ER stress response, The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling" TGF- $\beta$  Family: Signal Network and Tumor Microenvironment, H24.10.29-30, 東京.
4. **Ichijo, H.** SOD1 as a molecular switch to initiate homeostatic ER stress response under conditions of zinc deficiency, 第 33 回内藤コンファレンス, H24.6.26-29, 札幌.
5. **一條秀憲**, ALS 発症のメカニズム, 第 5 回東京アンチエイジングアカデミー, 東京.
6. **一條秀憲**, 本間謙吾, 亜鉛枯渇時に働く小胞体ストレス誘導スイッチとしての SOD1 の新規機能, 日本薬学会第 132 年会, H24.3.28-31, 札幌.
7. Homma, K., Yamaguchi, N., Fujisawa, T., Nishitoh, H., **Ichijo, H.**, SOD1 as a molecular switch to initiate the homeostatic ER stress response under conditions of zinc deficiency, The International Society for Zinc Biology (ISZB) 2012 Conference, H24.1.15-19, Novotel, St.Kilda Australia.
8. **Ichijo, H.**, Stress signaling in cell death, inflammation and disease, The 23th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, H23.10.6-7, Seoul, Korea.
9. **一條秀憲**, 本間謙吾, 藤澤貴央, 西頭英起, 亜鉛枯渇による SOD1-Derlin-1 結合を介した小胞体ストレスの生理的意義, 第 22 回日本微量元素学会学術集会, H23.7.1-2, 京都.

〔その他〕

- Fujisawa et al. *Ann. Neurol.* の紹介
- *Nature Reviews Neurology* 8, 414 (2012) の RESEARCH HIGHLIGHTS で Common conformational change identified in toxic SOD1 mutants—a novel diagnostic marker for ALS として紹介された。
  - 2012.8.23 化学工業日報「ALS発症機構を解明—変異たん白が神経死関与—」
- Naguro et al. *Nat. Commun.* の紹介
- *F1000 Prime* Article Recommendations (by Chou-Long Huang) に紹介された。
  - *Renin Academy Japan Online* トピックスとして紹介された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一條秀憲 (ICHIJO HIDENORI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00242206