

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460355

研究課題名(和文)リン酸化シグナルによるアポトーシスの時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the phospho-dependent mechanisms of apoptosis induction

研究代表者

野口 拓也 (Noguchi, Takuya)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20431893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Fas/CD95 誘導性アポトーシスに関与するキナーゼを探索するためにキナーゼ特異的なRNAiスクリーニングを行い、Fas 誘導性アポトーシスを正に制御する新たなキナーゼを8種類同定した。同定されたキナーゼはそれぞれノックアウト細胞を作成し、Fas誘導性アポトーシスの必要性およびその役割を解析した。なかでも、スクリーニングで同定されたキナーゼの一つであるSTK11は、アポトーシス誘導に促進的に機能する脱ユビキチン化酵素CYLDをリン酸化制御することでアポトーシス誘導を制御していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：We identified eight candidate kinases whose down-regulation protected against Fas ligand-induced apoptosis. At first, we established knockout cells lacking each kinase, and examined the requirement for apoptosis and their functions in apoptosis. Notably we have demonstrated that STK11 participates in the control of death receptor-mediated signals through phosphorylation of CYLD, a deubiquitinating enzyme that regulates both pro- and anti-apoptotic activities of the death receptors via targeting RIPK1. These results reveal STK11 as a novel modulator of pro- and anti-apoptotic signals emanating from the death receptors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Apoptosis Kinase FasL

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスは不要な細胞を除去するために引き起こされるプログラム細胞死の様式であり、細胞の分裂や分化・増殖と同様に生理的な細胞活動と捉えられている。また、アポトーシスの異常は、癌、自己免疫疾患、神経変性疾患など幅広い疾患と密接に関わっていることから、各々の疾患における病態を解明する上でアポトーシスの制御機構を解明することは極めて重要であると考えられ、その機構の一端を遺伝学的手法によって解明した功績に対しては2002年にノーベル医学生理学賞が授与されるに至った。アポトーシスは狭義にはカスパーゼ (Caspase) 依存的な細胞死のことを指し、アポトーシスの誘導機構の研究はカスパーゼの制御機構に焦点が当てられてきた。その結果、アポトーシスの研究が国内外問わず盛んに行われ、現在ではカスパーゼの活性化経路および活性化制御分子の全容が明らかになりつつある。アポトーシスがこれほど盛んに研究されてきた背景には、先述した通りその制御シグナルの破綻が多くの疾患と密接に関連していることが挙げられ、アポトーシスの制御機構に基づいた新たな治療法の確立が望まれている。しかしながら、アポトーシス関連分子を標的とした疾患治療薬の開発は未だ途上の段階にあり、今後さらにアポトーシス誘導分子の詳細な活性化調節機構を解明して行くことが必要とされている。

## 2. 研究の目的

申請者は、キノーム (キナーゼ) 特異的な siRNA ライブラリーを用いてヒトに発現しているすべてのキナーゼとその関連分子を個別にノックダウンすることで、それぞれのキナーゼのアポトーシスへの関与を検討した。その結果、8種類のキナーゼにおいて、それぞれをノックダウンすると Fas 誘導性アポトーシスに著しく抵抗を示したことから、これらのキナーゼがアポトーシスの誘導を正に制御していることが示唆された。また、これらのキナーゼは Fas リガンドのみならず TNF や TRAIL が誘導するアポトーシスにも促進的に機能することから、これらのキナーゼはデスリガンドが誘導するアポトーシスに共通した制御因子であることが示唆されている。本研究はこれらの知見を基にして、デスレセプターを介したアポトーシス誘導機構におけるリン酸化シグナル伝達経路のネットワークを明らかにし、疾患治療薬開発の分子基盤となるような基礎研究を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

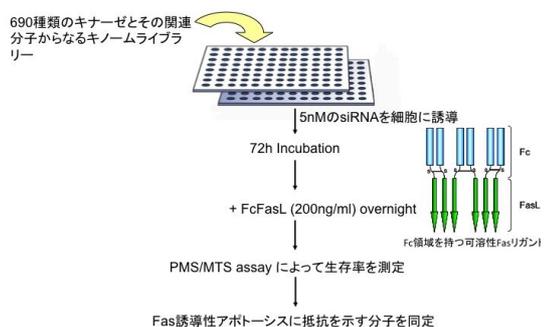
スクリーニングで同定したキナーゼそれぞれにおいて、CRISPR-Cas9 システムを用いる

ことでノックアウト細胞を作成し、アポトーシス誘導における機能的役割を解析してきた。また、質量分析計を用いたリン酸化ペプチドの解析を行い、リン酸化基質の探索や被リン酸化サイトの同定を行ってきた。

## 4. 研究成果

### (1) Fas/CD95 誘導性アポトーシスに関するキナーゼの探索

Fas/CD95 誘導性アポトーシスに関するキナーゼを探索するためにキナーゼ特異的な RNAi スクリーニングを行い、Fas 誘導性アポトーシスを正に制御する新たなキナーゼ群の同定を試みた (下図)。



その結果、8種類のキナーゼが Fas 誘導性アポトーシスを正に制御していることが示唆された。また、これら8種類のキナーゼのうち、STK11を除く7種類のキナーゼにおいては、その機能に関する報告がほとんどなされていなかった (この7種類のキナーゼにおいては、新規性を保守するため、論文・学会等では未公表であるため、便宜的にキナーゼ A-G として記載する)。

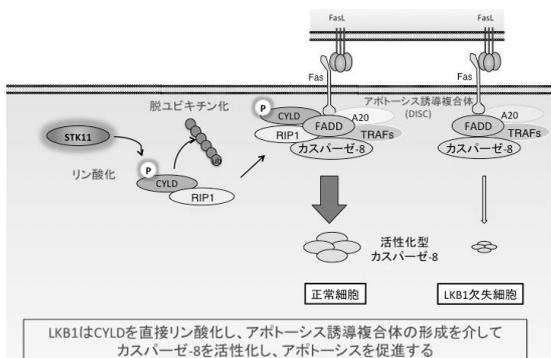
### (2) 機能未知の7つのキナーゼの解析

7種類のキナーゼに関しては、それぞれのキナーゼ分子の特性から解析を行ってきた。その結果、これらのキナーゼ群が Fas 誘導性アポトーシスに必須の分子である FADD や RIPK1 と関連があることがわかってきた。キナーゼ A は定常状態で FADD と相互作用していることから、FADD や FADD 制御因子の機能調節に関与している可能性が示唆された。また、キナーゼ B は Fas リガンドの存在化で RIP1 と結合することから、RIPK1 の機能調節に関与していることが示唆された。さらに、キナーゼ C はアポトーシス実行因子とされるカスパーゼ-3 と結合することから、アポトーシスの実行に関与していることも示唆された。これらのキナーゼに関しては、CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウト細胞を作成し、Fas 誘導性アポトーシスにおける必要性を確認することができた。キナーゼ活性が必要かど

うかは、今後の再構築実験によって明らかになることが予想されている。

### (3) Fas 誘導性アポトーシスにおける癌抑制 STK11 の役割の解明

(1) で述べたスクリーニングにより STK11 が Fas 誘導性アポトーシスを性に制御していることが示唆された。STK11 は、過誤腫性ポリープが多発するポイツィエーガー症候群の原因遺伝子とされるセリン/スレオニンキナーゼであり、様々な孤発性癌においてその変異体が見いだされていることから、癌抑制遺伝子であると考えられている。STK11 の癌抑制機構としては、癌抑制遺伝子である p53 や AMPK のリン酸化制御機構が挙げられるが、我々はアポトーシス制御という STK11 の新たな役割を発見し、それが STK11 の癌抑制機構として機能していると考えている。デスリガンドと呼ばれる TNF や Fas リガンド、および腫瘍選択的アポトーシス増強因子 TRAIL は、受容体直下にアポトーシス誘導複合体 (DISC : death-inducing signaling complex) を形成し、カスパーゼ-8 の活性化を介してアポトーシスを誘導するが、我々は STK11 が脱ユビキチン化酵素 CYLD のリン酸化を介して DISC 形成を制御し、アポトーシスを促進させる役割があることを明らかにした。さらに、質量分析計を用いたリン酸化ペプチドの解析を行った結果、STK11 は CYLD の N 末端領域をリン酸化することを明らかにし、このリン酸化によって CYLD の機能が制御されていることを突き止めた (下図)。



### (4) 今後の展望

本研究は、これまでほとんど手が付けられていなかったアポトーシス誘導におけるリン酸化シグナル伝達経路に着目し、これを切り口にしたアポトーシス実行因子の活性調節機構解明を目指してきた。本研究の遂行により、Fas 誘導性アポトーシスにおけるリン酸化シグナルの重要性が明らかになり、今後、解析途中のキナーゼの役割を明らかにできれば、Fas 誘導性アポトーシスにおけるリン酸化シグナルのネットワークが解明される

ことが期待できる。また、Fas 誘導性アポトーシスの異常は様々な疾患と関わりがあることから、このネットワークからアポトーシス誘導機構における創薬の新たな作用点が見いだされる可能性がある。ゆえに、本研究で得られた結果は単にアポトーシス誘導機構の理解を深めるだけでなく、癌や自己免疫疾患、神経変性疾患などの細胞死の異常と密接に関連する疾患を克服するための創薬開発における分子基盤となりうる。

### 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 1 件)

Tristan, C.A., Ramos, A., Shahani, N., Emiliani, F.E., Nakajima, H., Noeh, C.C., Kato, Y., Takeuchi, T., Noguchi, T., Kadowaki, H., Sedlak, T.W., Ishizuka, K., Ichijo, H. and Sawa, A.  
Role of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) as an activator of the GAPDH-Siah1 Stress-Signaling Cascade.  
*J. Biol. Chem.* 290(56-649), 2015.  
doi: 10.1074/jbc.M114. 査読有

[学会発表](計 7 件)

土田芽衣、野口拓也、平田祐介、松沢厚、ゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いたアポトーシス調節キナーゼの探索、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー、2015 年 09 月 17 日、神戸学院大学ポートアイランドキャンパス (神戸)

野口拓也、Fas 感受性を調節するキナーゼ群の探索、第 81 回生化学会東北支部会、2015 年 05 月 09 日、東北大学片平さくらホール (仙台)

熊澤琢也、野口拓也、徳永文稔、Involvement of STK11 in TNF-induced cell death、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会館 (京都)

野口拓也、癌抑制遺伝子 STK11 による細胞死制御機構、秋田大学 連携 第 3 回 生体情報研究シンポジウム ~ グローバル COE プログラム「生体調節シグナルの統合的研究」の新展開 ~ (招待講演) 2014 年 08 月 07 日、秋田キャッスルホテル (秋田)

野口拓也、癌抑制遺伝子 STK11 による TNF シグナル制御機構、群馬大学院理工学府・生体調節研究所 第 19 回 生命科学セミナー (招待講演) 2014 年 07 月 25、群馬大学昭和キャンパス (前橋)

野口拓也、癌抑制遺伝子 STK11/STK11 による  
デスレセプターシグナルの制御機構、新学  
術領域修飾シグナル第 2 回若手ワークショ  
ップ、2013 年 10 月 23 日、伊香保温泉森秋旅  
館（渋川）

野口拓也、デスレセプターを介したアポト  
ーシスにおける癌抑制遺伝子 STK11 の関与、  
第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 03  
日、神戸国際展示場 1 号館 1 階（神戸）

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

野口 拓也（Takuya Noguchi）  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：20431893

##### (2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：