

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650061

研究課題名(和文) ASKAマウスを用いたケミカルジェネティクスによる生体内在性結合タンパク質分離法

研究課題名(英文) A novel purification method for endogenous protein using ASKA technique

## 研究代表者

一條 秀憲 (Ichijo, Hidenori)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00242206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス応答性のリン酸化酵素であるASK1は、各種結合分子と機能的複合体を形成することによって、あらゆる刺激に応答し、多様な生理応答を導く。本研究においては、新規化合物プルダウン系を構築することにより、様々な種類の細胞におけるASK1複合体構成因子の同定に成功した。ASK1経路は各種細胞でそれぞれ異なる機能を発揮することから、今回同定した新規因子の情報をもとに、それぞれの細胞種における特異的な作用機構を明らかにしていきたい。

研究成果の概要(英文)：ASK1 forms a huge complex with various molecules to sense wide variety of stresses and induce a diverse array of physiological responses. In this study, we established novel pull-down assay system for purifying ASK1 complex from a variety of tissues/cells, and we obtained dozens of novel components of ASK1 complex. Since ASK1 has different roles in different tissues/cells, we are going to elucidate how ASK1 modulates diverse kinds of stress responses in each tissue/cell.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：ASK1 化合物プルダウン シグナル複合体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は日々様々なストレス環境下にさらされているため、その恒常性を保つべく多様な応答機構が備えられている。その中の一つに Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路があり、MAP3K、MAP2K、MAPK の三段階のリン酸化反応によって構成される。当研究室が同定した ASK ファミリータンパクは MAP3K に属するリン酸化酵素であり、その活性化メカニズムをはじめとして、これまで数多くの解析が為されてきた。ASK ファミリーに属する ASK1 は、酸化ストレスに強く応答することが明らかとなっており、その結果細胞死を誘導する。このストレス応答経路は細胞種を選ばず、ある程度普遍的な機構であると我々は考えている。

ASK1 の組織発現分布を検討すると各種組織に普遍的に発現していることが見て取れる。どの部位においても同様の機能を ASK1 が発揮している可能性だけでなく、各組織、各細胞種に特異的な機能を ASK1 が発揮している可能性も考えられた。実際マクロファージにおいては、菌体構成成分である LPS 処置により ASK1 が活性化し、サイトカイン産生を促進することが分かっており、敗血症モデルにおいて ASK1 欠損マウスは生存率が顕著に増加するという表現型を示す [1]。運動神経細胞においては、何らかのストレスにより活性化した ASK1 が運動神経細胞死を誘導することが示唆されており、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) との関与も明らかとなっている [2]。

このように ASK1 は個体のあらゆる場面で多様な生理応答を導くことが明らかとなってきたが、それぞれの場所でどのようなシステムで ASK1 が機能しているかについての知見は数少ない。

[1] Nature Immunology 6, 587–592 (2005)

[2] Genes Dev. 22, 1451–1464 (2008)

## 2. 研究の目的

一般的にシグナル伝達分子やその制御因子は機能的複合体を形成することで、活性化のタイミングや生理応答の特異性を制御する。ASK1 も例外ではなく、巨大複合体を形成していることがゲルろ過カラムクロマトグラフィーの実験結果により得られている。

上述した通り、ASK1 は様々な生理応答を導くことがこれまでの研究により明らかとなっているが、ASK1 がどのようにして多様なシグナル伝達を誘導するのか、その指向性の制御機構はほとんど不明である。

そのため本研究においては、フォワードケミカルジェネティクスの複合体精製法を確立することにより、各細胞種および各組織特異的な ASK1 複合体の精製を行い、新たな複合体構成因子の同定を目的とした。さらには、新規に同定された因子と ASK1 との関わりを詳細に解析することによって、ASK1 のシグナル指向性制御メカニズムの解明も研究目的に設定した。

## 3. 研究の方法

本研究では、Shokat 法を応用することで各細胞種特異的な内在性 ASK1 複合体構成因子同定のための精製系を構築する。内在性 ASK1 のリソースとしては、AS-ASK1 変異体ノックインマウス由来の組織および細胞を用いることとする。

基本的な方針としては、AS-ASK1 に特異的に結合する ATP アナログを合成展開することによって、担体と結合することを可能とし、この担体結合型 ATP アナログを用いて ASK1 複合体を精製する。最終的には ATP アナログとの競合阻害によって ASK1 複合体を溶出する。さらに、精製した ASK1 複合体を含む溶出画分を LC-MS/MS の系に供し、溶液に含まれるタンパク質を同定する。質量分析系による解析によって同定された ASK1 複合体構成因子は、その後分子生物学的な手法によって、ASK1 との結合、ASK1 活性化への影響などを詳細に検討する。

本研究の遂行にあたり、重要な点は以下の通りである。

- 1) ASK1 複合体精製系の確立
  - a) 担体に結合可能な ATP アナログの合成展開
  - b) ATP アナログ誘導体と担体との結合反応の条件設定
  - c) ATP アナログ-担体に結合した ASK1 複合体の溶出条件設定
  - d) 各種細胞系の単離法の確立
- 2) 質量分析系による新規因子の同定
- 3) 新規同定分子の分子生物学的解析

## 4. 研究成果

1) ASK1 複合体精製系の確立  
ASK1 のキナーゼドメインの結晶構造は過去に報告されている [3]。そのデータを根拠に考えると、ATP アナログに直接担体を結合させる方法では、ATP アナログがキナーゼドメインに結合できないことが予想された。そのため、ATP アナログにリンカーを付加した上で担体に結合させることを試みた。ATP アナログの改変は共同研究により進めた。

異なる長さのリンカーを付加した複数の ATP アナログを担体に結合させ、それぞれの担体と ASK1 との親和性の検討を行った。その際に、ATP アナログと担体を効率良く反応させる条件の検討も行っている。数多くの条件検討の結果、高効率に ASK1 複合体をプルダウンするシステムを構築することに成功した。

さらに、ASK1 複合体が結合した担体から、ASK1 複合体を溶出する条件も複数検討した結果、ATP アナログを大量に添加することによって競合的に溶出する系を採用するに至った。

また、AS-ASK1 複合体のリソースとなる初代培養細胞の系構築も行った。その結果、腹腔マクロファージやケラチノサイトをはじめ、複数の初代培養細胞を AS-ASK1 プルダウン系に適用できる環境が整った。

## 2) 質量分析系による新規因子の同定

あらゆる細胞種を用いた化合物プルダウン系の構築に成功したため、まずは腹腔マクロファージおよび褐色脂肪細胞を用いた解析に着手した。いずれの細胞も解析に用いるに十分な量の細胞を採ることができ、且つ、十分な量の ASK1 複合体を精製することができた。

本法によって精製された ASK1 複合体を含む溶液は、共同研究者の手によって LC-MS/MS 解析が為され、複数の複合体構成因子候補を同定することに成功した。驚くべきことに、今回同定された因子のほとんどは、これまで HEK293A 細胞などの培養細胞系を用いて同定された複合体構成因子と異なるものであった。すなわち、本化合物プルダウン系の構築の結果、新たに数十もの ASK1 複合体構成因子候補を同定することができたと言える。

## 3) 新規同定分子の分子生物学的解析

質量分析系を用いた解析によって新規に同定された ASK1 複合体構成因子候補が実際に ASK1 と結合するかどうか、培養細胞系を用いた分子生物学的な解析を行った。その結果、注目した 2 分子に関してはいずれも共免疫沈降実験による結合が確認された。今後は、これら新規結合分子が ASK1 に対してどのような作用を及ぼしているか、ASK1 のシグナル指向性という観点からさらなる解析を進めていきたい。

[3] Structure 15, 1215–1226 (2007)

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 17 件 ) 全て査読有

1. Watanabe, T., Sekine, S., Naguro, I., Sekine, Y. and Ichijo, H. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1(ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. **J. Biol. Chem.**, 290, 10791-10803 (2015). doi: 10.1074/jbc.M114.623280
2. 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, 56-64 (2015). doi: 10.1074/jbc.M114.596205
3. Sekine, S. and Ichijo, H. Mitochondrial proteolysis: Its emerging roles in stress responses. **B.B.A.** 1850, 274-280 (2015). doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.012
4. Galluzzi, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 **Cell Death Differ.**, (review article), 22, 58-73 (2015).
5. Lee, K.-W., Woo, J.-M., Im, J.-Y., Park, E.-S., He, L., Ichijo, H., Junn, E. and Mouradian M. M. Apoptosis Signal Regulating Kinase 1 Modulates the Phenotype of  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. **Neurobiol. Aging**, 36,519-526 (2015). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.034.
6. Eaton, G.J., Zhang, Q.S., Diallo, C., Matuszawa, A., Ichijo, H., Steinbeck, M.J. and Freeman, T.A. Inhibition of Apoptosis Signal- Regulating Kinase 1 Enhances Endochondral Bone Formation by Increasing Chondrocyte Survival. **Cell Death & Dis.**, 5, e1522 (2014). doi: 10.1038/cddis.2014.480
7. Okada, M., Matsuzawa, A., Yoshimura, A. and Ichijo, H. Lysosome rupture-activated TAK1- JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation. **J. Biol. Chem.**, 289, 32926-32936 (2014). doi: 10.1074/jbc.M114.579961
8. Mosallanejad, K., Sekine, Y., Ishikura- Kinoshita, S., Kumagai, K., Nagano, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Naguro, I. and Ichijo, H. The DEAH-Box RNA Helicase DHX15 activates NF- $\kappa$ B and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses. **Sci. Signal.**, 7, ra40 (2014). doi: 10.1126/scisignal.2004841
9. Mizukami, J. Sato, T., Camps, M., Ji, H., Rueckle, T., Swinnen, D., Tsuboi, R., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK1 promotes the contact hypersensitivity response through IL-17 production. **Sci. Rep.**, 4, 4714 (2014). doi:10.1038/srep04714
10. Kawarazaki, Y., Ichijo, H. and Naguro, I. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) as a therapeutic target. **Expert Opin. Ther. Tar.** (review article), 18, 651-664 (2014). doi:10.1517/14728222.2014.896903.
11. Noguchi, H., Yamada, S., Nabeshima, A., Guo, X., Tanimoto, A., Wang, K.Y., Kitada, S., Tasaki, T., Takama, T., Shimajiri, S., Horlad, H., Komohara, Y., Izumi, H., Kohno, K., Ichijo, H. and Sasaguri, Y. Depletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 prevents bile duct ligation-induced necroinflammation and subsequent peribiliary fibrosis. **Am. J. Pathol.**, 184, 644-661 (2014). doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.030
12. Matsui, H., Fukuno, N., Kanda, Y., Kantoh, Y., Chida, T., Nagaura, Y., Suzuki, O., Nishitoh, H., Takeda, K., Ichijo, H., Sawada, Y., Sasaki, K., Kobayashi, T. and Tamura, S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. **J. Biol. Chem.**, 289, 6438-6450 (2014). doi: 10.1074/jbc.M113.536300

13. Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. **Sci. Signal.**, 7, ra8 (2014). doi:10.1126/scisignal.2004822.
14. Toyama, K., Koibuchi, N., Uekawa, K., Hasegawa, Y., Kataoka, K., Katayama, T., Sueta, D., Jie Ma, M., Nakagawa, T., Yasuda, O., Tomimoto, H., Ichijo, H., Ogawa, H. and Kim-Mitsuyama, S. Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 is a novel target molecule for cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 34, 616-625 (2014). doi:10.1161/ATVBAHA.113.302440
15. Takada, E., Furuhashi, M., Nakae, S., Ichijo, H., Sudo, K. and Mizuguchi, J. Requirement of apoptosis-inducing kinase 1 for the induction of bronchial asthma following stimulation with ovalbumin. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 162, 104-114 (2013). doi: 10.1159/000353240
16. Homma, K., Fujisawa, T., Tsuburaya, N., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Takeda, K., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Naguro, I., and Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. **Mol. Cell**, 52, 75-86 (2013). doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.038
17. Puckett, M.C., Goldman, E.H., Cockrell, L.M., Huang, B., Kasinski, A.L., Du, Y., Wang, C.Y., Lin, A., Ichijo, H., Khuri, F. and Fu, H. Integration of the Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated stress signaling with the Akt/PKB-IκB kinase cascade. **Mol. Cell. Biol.**, 33, 2252-2259 (2013). doi: 10.1128/MCB.00047-13
- [学会発表] (計130件)
1. Soga, M., Hattori, K., Ichijo, H.: Identification of ASK1 signalosome components in brown adipocytes using novel chemical technique, Keystone symposia, 2015.3.22-27, British Columbia, Canada
2. 一條秀憲:小胞体ストレスと神経細胞死, 第9回臨床ストレス応答学会大会, 2014.11.1-2, 岡山
3. 一條秀憲:ミトコンドリアストレスシグナルの機能解析, 第87回日本生化学会大会, 2014.10.15-18, 京都
4. Homma, K., Ichijo, H.: SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under conditions of zinc deficiency, The 4th International ISZB Meeting, 2014.9.14-19, CA, USA
5. 一條秀憲:細胞死のレドックス制御における新たなパラダイム, 第67回日本酸化ストレス学会学術集会, 2014.9.4-5, 京都
6. Naguro, I., Kamiyama, M., Ichijo, H.: Oxidative stress-activated kinase ASK1 is involved in the tumorigenesis and tumor metastasis, Gordon Res. Conf., 2014.7.20-25, Girona, Spain
7. Hattori, K., Ishikawa, H., Naguro, I., Ichijo, H.: Cold stress induces cell death through the activation of ASK1-p38 pathway, Gordon Res. Conf., 2014.7.20-25, Girona, Spain
8. 一條秀憲:ストレスシグナルから見た ALS, 第35回日本肥満学会, 2014.6.11, 宮崎
9. Ichijo, H.: Ubiquitin-dependent regulation of ASK1 stress signaling in cell death. 2014 KSBMB Annual Meeting, 2014.5.14-16, Seoul, Korea
10. Hattori, K., Naguro, I., Ichijo, H.: ASK1 regulates brown adipocyte differentiation, Keystone Symposia Conf., 2014.1.12-17, Vancouver, British Columbia
11. Ichijo, H.; Stress Signaling in Cell Death and Disease, The 8th Japan-Korea conference on cellular signalling for young scientists, 2013.11.6-7, 福岡
12. 一條秀憲:レドックス場としての ASK1 シグナル複合体と細胞死, 第86回日本生化学会大会, 2013.9.11-13, 横浜
13. Kawarazaki, Y., Naguro, I., Ichijo, H.: A genome-wide RNAi screening for regulators of the ASK-p38 pathway using *C. elegans*, Gordon Res. Conf., 2013.7.28-8.2, China
14. Niwa, K., Naguro, I., Ichijo, H.: A genome-wide siRNA screen for, Gordon Res. Conf., 2013.7.28-8.2, China
15. Shiizaki, S., Naguro, I., Ichijo, H.: Search for the osmotic stress-specific components of ASK3 complex by HaloTag technology, Gordon Res. Conf., 2013.7.28-8.2, China
16. Ichijo, H.; Regulation of cell death signals by ubiquitination and deubiquitination, The 35th Naito Conference The Ubiquitin- proteasome system-, 2013.7.9-12, 札幌
17. Tsuburaya, N., Homma, K., Fujisawa, T., Ichijo, H.: Time resolved fluorescence-based screening assay for identification of chemical compounds that inhibit the interaction between ALS-related SOD1 Mutants and Derlin-1, RICT2013, Nice, France
18. Naguro, I., Ichijo, H., Kamiyama, M.: Ask1 is involved in tumor metastasis in lung metastasis model through regulation of platelet functions, Next-Gen Kinase Inhibitors, 2013.6.17-19, Boston, USA
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