

令和元年5月24日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15086

研究課題名(和文)高浸透圧依存的非選択性カチオンチャネルの網羅的探索および同定

研究課題名(英文) Genome-wide screen-based identification of non-selective hypertonicity-induced cation channel

研究代表者

渡邊 謙吾 (Watanabe, Kengo)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任助教

研究者番号：20781727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ナメクジに塩をかければ縮むように、細胞も細胞外溶液が細胞内溶液よりも高濃度の状態(=高浸透圧ストレス)に晒されれば縮む。このままでは死ぬので、細胞は体積を回復して生き延びる。この際、細胞はそもそも高浸透圧ストレス状態を認識する必要があり、HICCというイオンを通すタンパク質をセンサーとして使うと考えられている。しかしHICCの具体的な実体は不明であった。そこで本研究では、ヒトの遺伝子情報を基に約2万ものタンパク質を1つずつ調べてHICCを構成するタンパク質の発見を試みた。結果、本期間中にHICCの実体だと証明するには至らなかったが、候補タンパク質や今後の足掛かりとなる知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液体と接している細胞は常に浸透圧ストレスに晒されるリスクがあり、浸透圧ストレスに適切に応答する仕組みは細胞が生存する上で必須の基本的なシステムの1つである。さらに細胞はこのシステムを浸透圧ストレスに対抗する時だけでなく、分裂や移動する時など体積を変化させる細胞機能時にも利用すると言われている。つまり、このシステムの異常が高血圧やがん、炎症などの疾患に関わっている可能性がある。本研究はシステムを始動させるセンサー部分に着目したものであり、本成果を足掛かりにシステムの全貌解明に向けてさらに研究を発展させることで、様々な疾患に対する創薬基盤・治療戦略の開発に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Similar to slugs poured salt on, cells shrink when the concentration of extracellular solution becomes higher than that of intracellular solution, which is called as hyperosmotic stress. If this goes on, cells die; therefore, cells recover their volume to survive. To achieve cell volume recovery, cells firstly have to recognize the state under hyperosmotic stress. It is said that the protein passing ions, called HICC, is the cellular sensor for hyperosmotic stress; however, the molecular identity of HICC remains unclear. In this study, the scientist investigated about 20,000 proteins coded on the human genome one by one to identify the components of HICC. Although he could not surely identify it during this period, he successfully obtained the candidate protein and important knowledge establishing a foothold to further researches.

研究分野：生化学・分子生物学・細胞生物学

キーワード：高浸透圧ストレス HICC ゲノムワイドsiRNAスクリーニング ASK3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞体積は細胞の最も根本的な構成要素の1つであり、定常状態から厳密に制御されている。ここで細胞内と細胞外に浸透圧差が生じると、水の流入に伴う強制的な細胞体積変化が引き起こされ、細胞にとっては甚大なストレス(=浸透圧ストレス)となる。そこで細胞は低浸透圧/高浸透圧ストレス後、イオンなどの輸送を制御して積極的に体積を元に戻す機構(regulatory volume decrease/increase; RVD/RVI)を備えている。興味深いことにRVDやRVIは、腎臓のような浸透圧変化の生じやすい部位での細胞体積制御だけでなく、細胞増殖や細胞移動、細胞死といった体積変化を伴う細胞機能においても利用されると考えられている[Hoffmann, E. K. *et al. Physiol. Rev.* 2009]。従って浸透圧ストレスの認識からRVD/RVIへと至る分子機構の解明は、高血圧やがん、炎症など、様々な疾患に対する創薬基盤・治療戦略の開発の観点からも重要な研究対象である。細胞は物質的な実体のない浸透圧ストレスを主にイオン強度や細胞膜の張力、マクロ分子の衝突といった<変化>として認識していると考えられており、細菌や酵母、植物における浸透圧ストレス認識機構は明らかにされつつある。一方、哺乳類細胞においては、ストレス受容後のシグナル伝達関連分子に関する報告があるものの、浸透圧ストレス認識の具体的な分子機構は未解明である[Zhou, X. ... Watanabe, K. *Biochim. Biophys. Acta* 2016]。

低浸透圧ストレスにおいて体積膨張で活性化するCl⁻チャンネル(volume-regulated anion channel; VRAC)の存在が1980年代に観察されて以来、VRACは低浸透圧ストレス認識分子として着目されてきた。ただ、多くの候補分子が提唱されていたものの、VRACの分子実体は長らく不明であった。しかし近年、ゲノムワイド siRNA スクリーニングによる網羅的な探索が行われ、遂にVRACの分子実体としてLRRC8が同定された[Qiu, Z. *et al. Cell* 2014; Voss, F. K. *et al. Science* 2014]。この発見はまさにブレークスルーであり、イオン強度の低下によってLRRC8自体が活性化することの解明[Syeda, R. *et al. Cell* 2016]など、VRAC研究の大きな進展に至っている。高浸透圧ストレスにおいても同様に、電気生理学・薬理学的研究によって、高浸透圧ストレス依存的に活性化する非選択性カチオンチャンネル(hypertonicity-induced cation channel; HICC)の存在が明らかになり、その活性化はRVIや細胞増殖において必要であることが示唆されてきた。よってHICCは高浸透圧ストレス認識分子として着目されているが、その候補分子がいくつか提唱されている程度で、確かな分子実体は未同定であった[Jentsch, T. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016]。HICCの真の分子実体を同定するには網羅的な探索が望まれるが、ハイスループットなHICC活性測定系は開発されていないことが障壁となっている。

一方、これまで研究代表者が研究対象としてきた apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3) は低浸透圧ストレスによってリン酸化され活性化し、高浸透圧ストレスによって脱リン酸化され不活性化する Ser/Thr キナーゼである[Naguro, I. *et al. Nat. Commun.* 2012]。また、この両方向性の活性変化は数分で生じる迅速な変化で、研究代表者によってRVDとRVIのいずれにも必要なことが証明された。つまりASK3は、浸透圧ストレス応答機構において、浸透圧センサーに非常に近い位置で浸透圧ストレスシグナルの方向性と強度の情報を読み取り、リン酸化シグナルへと変換する重要な分子だと考えられる。また研究代表者は、ASK3のキナーゼ活性を直接の指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングによって、高浸透圧ストレスによるASK3不活性化の制御分子を網羅的に探索し、直接の脱リン酸化酵素PP6の同定に成功していた[研究開始時点で投稿準備中]。ここで、高浸透圧ストレスにおいてASK3不活性化がRVIに必要なであったため、同じくRVIに必要なHICCの阻害剤を処置したところ、

ASK3不活性化の抑制が確認された。つまり、HICCの活性化がASK3の不活性化に必要なことを意味する

(図1)。そして発想を転換すればHICCの活性化をASK3の不活性化によって評価できることを意味し、さらにはASK3不活性化制御分子の探索を目的として行ったゲノムワイド siRNA スクリーニングの候補分子中にHICCも含まれている可能性が考えられた。

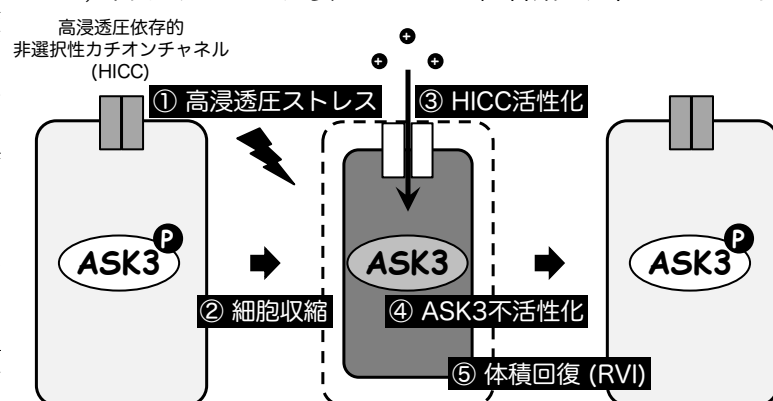


図1. 高浸透圧ストレス応答におけるHICCとASK3の関係

2. 研究の目的

本研究ではHICCの活性化をASK3の不活性化によって評価することで、未だ不明なHICCの分子実体を網羅的に探索および同定することを目的に設定した。そして、哺乳類細胞の浸透圧ストレス認識機構を解明することを通して、様々な疾患に対する創薬基盤・治療戦略の開発に資することを目指した。

3. 研究の方法

HICC の活性化を ASK3 の不活性化で評価するという発想に基づき, ASK3 のキナーゼ活性を直接の指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを活用することで HICC を同定することを全体方針とした (図 2). 具体的には, まず二次スクリーニング後の 63 個の候補分子が確かに ASK3 不活性化制御分子であることを確認し, 続いてその分子が HICC である可能性を検討していく戦略を立てた. この際, 近年急速に発展してきた CRISPR-Cas9 システムを利用したノックアウト細胞株の樹立など, 有用な方法論を積極的に導入しつ

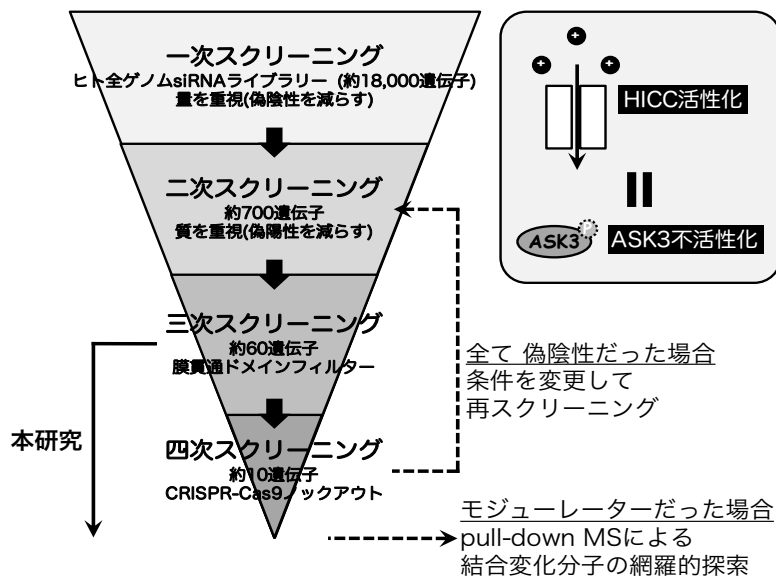


図 2. ASK3不活性化を指標としたHICCの網羅的探索

つ, 研究代表者が得意とする生化学・分子生物学的手法を駆使して, 単なる相関関係ではなく因果関係に基づいたデータによって裏付けられるように研究計画を設計した.

4. 研究成果

まずは本研究を最も効率的に進めるために, バイオインフォマティクスによって膜貫通ドメインを有すると予測される候補分子に解析対象を絞った. これは, ホールセルパッチクランプ法で HICC による電流が観測でき, HICC が細胞膜上でポアを形成する膜タンパク質だと想定されるためである. そして, 63 個の候補分子の中に膜貫通ドメインの存在が予測される分子は 11 個まで絞り込まれた. ただ, これらはあくまでスクリーニングで得られた「候補」分子であるため, 候補分子の発現量を低下させた際に高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が抑制されるか確認することで, 確かに ASK3 不活性化制御分子だと「同定」する必要がある. そこで候補分子を完全に欠損するため, 近年急速に発展してきた CRISPR-Cas9 システムを導入して, 全 11 個の HICC 候補分子に対してノックアウト細胞株の樹立を開始した. これは, RVI における ASK3 不活性化の必要性を実証した際, siRNA による発現抑制では安定したアッセイ系の確立に苦勞した研究代表者の経験に基づき, より劇的な影響が見られるようにノックアウト細胞を利用した方が良いと判断したためである. しかし途中で, 先行して進めていた既知の ASK3 不活性化制御分子のノックアウト細胞株の解析結果から, 浸透圧ストレス応答シグナルに異常が見られる事実が明らかになった. これはノックアウト細胞の樹立過程で細胞内浸透圧のセットポイントが変化してしまったことなどが原因として推察され, 通常のノックアウト細胞で本研究を続行することは不適切だという結論に至った. また, テトラサイクリンで制御可能な発現抑制細胞やノックアウト細胞など, 代替となるアッセイ系の確立を試みたが, 簡単には代替系を確立できなかった. そのため, ひとまずこれまでの研究方法に立ち返り, siRNA による発現抑制系を用いて 11 個の HICC 候補分子が確かに ASK3 不活性化制御分子であるか確認した. その結果, siRNA の条件などに改善の余地は残るものの, いずれの候補分子も ASK3 不活性化制御分子と同定することはできなかった.

ここで, 研究代表者が行ったゲノムワイド siRNA スクリーニングは, 一次スクリーニングで発現抑制効率を高くして偽陰性を減らし, 二次スクリーニングでオフターゲット効果由来の偽陽性を減らす設計であった. つまり, 発現抑制効率の悪い遺伝子が二次スクリーニングで偽陰性となった可能性は否定できない. 実際, 研究代表者は一次スクリーニング陽性・二次スクリーニング陰性の候補分子中にも ASK3 不活性化制御分子を発見している. また, 一般に膜タンパク質のターンオーバーは長いことが知られる. 従って, 686 個の一次候補分子に対して再度二次スクリーニングを行うバックアップ計画へと移行した. ここで当初の計画ではノックダウン効率を改善した条件での再スクリーニング実施を想定していたが, 既に多くの時間を費やしていたこともあり, 既知の報告を利用して候補分子を絞り込む方針に変更した. HICC は, カチオンに対する非選択性や阻害剤に対する応答など, 電気生理学・薬理学的研究の知見によって transient receptor potential channel (TRP チャンネル) との関連が示唆されてきた. そこで, 686 個の一次候補分子中で TRP チャンネルを探したところ, TRPML1 が唯一の陽性分子であった. そして, siRNA によって TRPML1 を発現抑制したところ, 確かに高浸透圧ストレスにおける ASK3 不活性化の抑制が確認された. また, ポア構成残基に変異を入れてカチオン透過性を失った TRPML1 変異体を過剰発現しても, 高浸透圧ストレスにおける ASK3 不活性化が抑制された. これは, 本研究期間中に相次いで構造レベルで証明された通り [Chen, Q. *et al.*

Nature 2017; Schmiege, P. *et al. Nature* 2017; Zhang, S. *et al. Protein Cell* 2017], TRPML1 が4量体でポアを形成するため、ドミナントネガティブ作用の結果だと考えられる。よって、TRPML1 は新規 ASK3 不活性化制御分子であることが明らかになった。ここで、TRPML1 は細胞膜上にも発現しているが、細胞膜上ではリン脂質によって不活性化されていて、むしろ主にリソソーム上で働くチャネルだと言われている [Dong, X. P. *et al. Nat. Commun.* 2010; Zhang, X. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012]. これは HICC が細胞膜上で働いていることと矛盾するよう思えるが、高浸透圧ストレス時にはリン脂質の構造や組成が変化するため、TRPML1 が HICC である可能性は否定されない。また、仮に TRPML1 が HICC ではなかった場合にも、HICC とは別に「TRPML1 が高浸透圧ストレスをリソソーム上で感知して ASK3 を不活性化に導く」つまり「細胞は浸透圧ストレスを細胞内で感知している」という非常にユニークな仮説を提唱できる可能性がある。よって、パッチクランプ法による電流測定など、今後 TRPML1 の詳細な解析を進める必要がある。

また本研究期間中に、HICC 活性化を最終的な表現型 RVI で評価する小規模な siRNA スクリーニングが行われ、HICC として δ ENaC と TRPM2, TRPM5 が同定・報告された [Koos, B. *et al. J. Physiol.* 2018]. 特に TRPM2 は、過去にもスプライシングバリエーションの TRPM2 Δ C が HICC として提唱されていた [Numata, T. *et al. J. Physiol.* 2012]. 一方、研究代表者の行ったゲノムワイド siRNA スクリーニングでは陽性条件に達しなかったものの、TRPM2 は TRPML1 に次いで2番目に影響の大きかった TRP チャネルであった。さらに、研究代表者は他のスクリーニング候補分子の解析から、生理活性物質 NAD が ASK3 不活性化に必要であることを見出していた。ここで、NAD 自体は激しい議論がされてきたものの、少なくとも NAD 代謝産物の ADP リボースは TRPM2 のアゴニストとして知られる [Perraud, A. L. *et al. Nature* 2001; Sano, Y. *et al. Science* 2001]. よって仮に HICC が TRPM2(Δ C)であれば、高浸透圧ストレス時に ADP リボースが TRPM2(Δ C)を活性化して ASK3 を不活性化を導くという非常に綺麗な仮説が立てられた。そこで TRPM2 の ASK3 不活性化への関与を検証したところ、siRNA による TRPM2 の発現抑制によって ASK3 不活性化は亢進し、TRPM2 の通常型・ Δ C 型の過剰発現いずれでも ASK3 不活性化は抑制する傾向が見られた。つまり TRPM2(Δ C) は、むしろ ASK3 の活性化分子だと解釈される。従って、確かに細胞種の違いなど検討すべき項目は残るものの、TRPM2(Δ C)は ASK3 の上流で働く HICC とは異なる可能性が示唆された。なお、Koos らの報告において陽性条件には達していないものの TRPML1 が陽性寄りの結果であったことや、NAD 関連物質の NAADP はセカンドメッセンジャーとして TRPML1 を活性化することは、今後 TRPML1 の解析を進める上で注目に値する。

以上、本研究では期間中に HICC を同定するには至らなかったものの、新規 ASK3 不活性化制御分子 TRPML1 の同定をはじめ、非常に重要な知見を得ることに成功した。従って本研究を足掛かりに浸透圧ストレス応答研究を進展させることで、創薬基盤・治療戦略開発に資することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Kasuya, G., Nakane, T., Yokoyama, T., Jia, Y., Inoue, M., Watanabe, K., Nakamura, R., Nishizawa, T., Kusakizako, T., Tsutsumi, A., Yanagisawa, H., Dohmae, N., Hattori, M., Ichijo, H., Yan, Z., Kikkawa, M., Shirouzu, M., Ishitani, R. and Nureki, O. Cryo-EM structures of the human volume-regulated anion channel LRRC8. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 797–804 (2018). DOI: 10.1038/s41594-018-0109-6 【査読有】
- (2) Watanabe, K., Umeda, T., Niwa, K., Naguro, I. and Ichijo, H. A PP6-ASK3 Module Coordinates the Bidirectional Cell Volume Regulation under Osmotic Stress. *Cell Rep.* **22**, 2809–2817 (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.045 【査読有】
- (3) Nishida, T., Hattori, K. and Watanabe, K. The regulatory and signaling mechanism of the ASK family. *Adv. Biol. Regul.* **66**, 2–22 (2017). DOI: 10.1016/j.jbior.2017.05.004 【査読有】

〔学会発表〕(計13件)

下記に主要な発表のみ記す。

- (1) 渡邊謙吾 「ASK3 and cell volume regulation: common mechanism in cellular osmotic stress response and cell death induction」東京大学 医科学研究所 国際共同利用・共同拠点事業—平成30年度 若手研究者シンポジウム, 2019年1月【招待講演】
- (2) 森下和浩, 渡邊謙吾, 一條秀憲 「ASK3 不活性化における高浸透圧ストレスセンサー候補分子 TRPML1 の機能解析」第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月
- (3) 渡邊謙吾, 一條秀憲 「ASK3 modulates cell volume under osmotic stress and beyond」第10回シグナルネットワーク研究会, 2018年6月【奨励賞受賞】
- (4) 渡邊謙吾, 名黒功, 一條秀憲 「PP6-ASK3 モジュールは浸透圧ストレス応答の重要な変換器である」2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017年12月【招待講演】

- (5) Watanabe, K., Naguro, I. and Ichijo, H. NAMPT and RNF146 regulate the bidirectional cell volume regulator, ASK3. FASEB Science Research Conferences: NAD+ Metabolism and Signaling, 2017年7月【国際学会】

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

研究内容を広く公開する目的で、下記(1)の所属研究室ホームページにて研究代表者が統括する研究グループの研究内容を紹介している。また、雑誌論文(2)の発表時には所属研究科より、下記(2)のプレスリリースが行われた。さらに雑誌論文(2)ではサイエンスとアートのコラボレーションの試みの一環として、デザイナーの荒木宏介氏に研究の視覚化を依頼し、そのデザインは掲載誌の表紙を飾った(下記(3)・(4)参照)。

- (1) 東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室ホームページ グループ紹介
<<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/html/group/WatanabeG.html>>
- (2) 東京大学大学院 薬学系研究科・薬学部 プレスリリース
<<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/topics.html?page=4&key=1521019111>>
- (3) OSMOSIS by Kosuke Araki
<<https://www.kosuke-araki.com/osmosis>>
- (4) Cell Reports Volume 22 (2018), Issue 11: On the cover
<<https://www.cell.com/cell-reports/issue?pii=S2211-1247%2817%29X0012-0>>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森下 和浩

ローマ字氏名：MORISHITA, Kazuhiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。