

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02569

研究課題名(和文) 体内浸透圧環境の働く場と応答機構の解析によるosmo-physiologyの解明

研究課題名(英文) Elucidation of osmo-physiology through analysis where and how osmotic circumstance functions in the body

研究代表者

名黒 功 (Naguro, Isao)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：80401222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体と体内に存在する浸透圧環境の関わりについて、分子レベルの解析を行うことで、ASK3の関わるシグナル伝達、NFAT5の制御する遺伝子発現、細胞代謝という視点において新たな知見を得た。本研究の結果は、近年特に注目されている浸透圧環境と免疫細胞の関係性を説明する分子基盤になることが期待されるとともに、浸透圧という物理量をどのように生体が感知し、生理応答に利用しているかという点について新たな知見を与えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特に哺乳類細胞では、浸透圧という物理量がどのような分子メカニズムで感知され、生理応答につながるか未解明な部分が残されているが、本研究によりリン酸化シグナル伝達、遺伝子発現、細胞代謝という複数の階層における浸透圧応答メカニズムが明らかになった。近年、高食塩食は高血圧のみならず、自己免疫疾患など炎症性疾患の増悪要因になることがわかりつつあるが、本研究の結果は、高食塩食のような体内浸透圧環境が変化するストレスが生体にどのように影響を与えるか理解し、薬などにより悪影響を取り除くための基盤的知見になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, I investigated the importance of osmotic environment for organisms in a viewpoint of molecular biology and found several new molecular mechanisms that govern ASK3 signaling, gene expression via NFAT5 and cellular metabolism in osmotic stress conditions. These our results will contribute to figure out the molecular basis by which cells recognize and respond to osmotic stress, and help to link osmotic environment to immune cell regulation in certain inflammatory diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：Osmo-physiology 浸透圧 ASK3 LLPS NFAT5 細胞代謝 マクロファージ

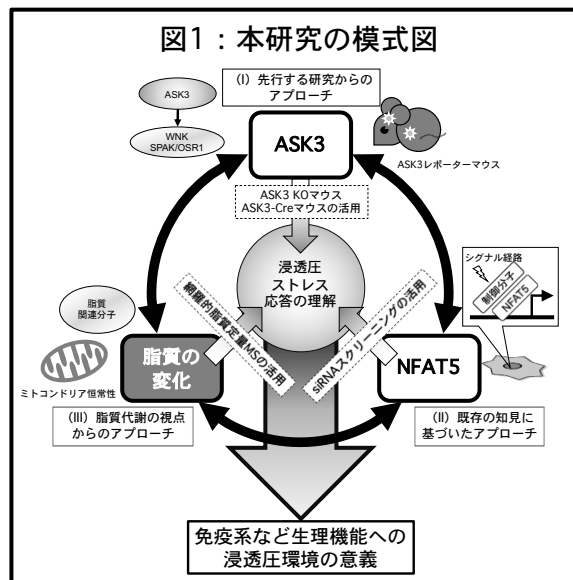
1. 研究開始当初の背景

生体は紫外線、熱、活性酸素、浸透圧など様々な内外の環境変化(ストレス)にさらされながら生きています。一般的にストレスは細胞の機能を障害し、様々な疾患の病因になるものとして、消去もしくは対抗すべき“問題”として捉えられ、細胞がストレスに抵抗する分子機構の研究が盛んになされています。一方で、酸化ストレスなどでは同じストレスが細胞にとって自らが置かれた状況を把握し、ストレスへの抵抗とは別の行動を起こす“手がかり”として積極的に利用される局面も存在する。本研究の解析対象である浸透圧は臓器ごとにある程度異なることが知られている。尿を作り出す腎臓内の浸透圧勾配は有名な例であるが、脾臓、胸腺などの免疫系組織、肝臓では血漿に比べて明らかに浸透圧が高い[Go *et al.*, *PNAS*, 2004]。さらに、高食塩食や細菌感染などで組織の浸透圧が生理的に変化することも明らかになっている[Wiig *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2013; Jantsch *et al.*, *Cell Metabol.*, 2015]。近年、体内の変化する浸透圧環境による免疫細胞の分化・活性の制御も取りざたされていることも考慮すると、「浸透圧の情報を介して制御される生理機能 (osmo-physiology) にはどのようなものがあるか?」、それは「体のどこで、どのような分子機構で達成されているのか?」、「その分子機構の人為的操作で疾患の症状緩和などの介入ができるか?」という学術的問いが顕現してくる。研究代表者は、ASK3 という浸透圧応答性キナーゼを世界に先駆けて発見し、細胞の浸透圧ストレス応答における分子機構の研究を進めていた。そこで、これまで培ってきた生体の浸透圧応答機構に関する独自の知見を手掛かりにして、上記の問いに対して、独創的な視点からアプローチするべく本研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答機構の理解を分子レベルで深化させ、そのシステムが体内で働く場と役割を解析することで、浸透圧ストレス環境と免疫細胞の関わりなど、生理的な浸透圧ストレスが担う生理・病理学的現象 (osmo-physiology) を理解することである。将来的にはそれらの情報を活用して、浸透圧に関わる個体の生理機構への人為的な介入による疾患の治療・改善を目指す。

本研究では、(1) ASK3 という世界に先駆けて研究代表者が独自に解析を進めているキナーゼ、(2) NFAT5 という浸透圧応答と免疫細胞制御での重要性が知られている分子、(3) 浸透圧ストレスにおける脂質分子の挙動、という 3 つの視点から osmo-physiology の理解を目指す(図 1)。個々の解析を深化させることに加えて、これらの相互関係も解析することで、新たな浸透圧応答機構の解明が期待できる。



3. 研究の方法

本研究では、以下に記す(1)-(3)の 3 つの視点から生体内の浸透圧環境に対する応答分子機構の解明に取り組んだ(図 1)。

(1) 浸透圧ストレス応答性キナーゼ ASK3 の機能する場と役割の解析

研究代表者を中心に同定し、世界に先駆けて解析を行った ASK3 というキナーゼは、細胞が低浸透圧にさらされると細胞内でリン酸化され活性化し、逆に高浸透圧では脱リン酸化され不活性化するという浸透圧ストレスに対して独特な両方向性の応答を示す [Naguro *et al.*, *Nat. Commun.*, 2012; 名黒, *生化学*, 2017]。研究代表者は、ASK3 が浸透圧ストレス時の p38 MAPK の活性制御、および細胞のイオン輸送を担う WNK-SPAK/OSR1 経路の制御を担うことを明らかにし、ASK3 ノックアウト(KO) マウスは腎尿細管におけるこの経路の制御不全により高血圧症を示すことを明らかにした[Naguro *et al.*, *Nat. Commun.*, 2012; Maruyama *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016]。

本研究では、既に解析した腎臓以外で ASK3 が働く組織に注目した。数年前、ASK3 プロモーター下流で Cre タンパク質を発現するマウスにより、ASK3 の特徴的な脳内発現分布を利用した海馬 CA2 領域特異的なイメージング解析がなされた[Kohara *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2014]。研究代表者は共同研究により、この ASK3-Cre マウスの分与を受け、Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現する R26R-RG マウス [Shioi *et al.*, *Genesis*, 2011]との掛け合わせを行った。本研究では、このレポーターマウスの各臓器の蛍光から、ASK3 を介した浸透圧応答が機能する“場(細胞・組織)”を 1 細胞レベルのスケールで特定し

た。この際、CUBICなど組織透明化技術も用いた。また、その“場”に基づいて、その部位でのASK3の機能について解析した。特にASK3欠損マウスで観察される急性臓器炎症との関連性について着目した。

(2) 高浸透圧によるNFAT5制御の分子機構解析

NFAT5は高浸透圧ストレス応答に必須の遺伝子発現を担う主要な転写因子であることが古くから知られていたが[Chris *et al.*, *J. Mol. Signal.*, 2013]、近年相次いでTh17細胞の分化やマクロファージの活性化にも関与することが報告され、免疫制御の観点から注目を浴びている。重要なことに、生体内の上皮細胞、免疫系細胞内のNFAT5活性は、腎臓に存在する高Na⁺環境[Berry *et al.*, *Cell*, 2017]、感染で上昇する皮膚のNa⁺濃度[Jantsch *et al.*, *Cell Metabol.*, 2015]、高食塩食で起こる体内の浸透圧上昇[Kleinewietgeld *et al.*, *Nature*, 2013; Wiig *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2013]に促進され、感染抵抗性や自己免疫疾患、高血圧症など生理・病理的局面上に関与することが報告されている。このように生理的浸透圧環境におけるNFAT5の重要性が盛んに研究される中、浸透圧によるNFAT5の転写活性制御がどのような分子機構で達成されるのか未だ不明な点が多く残されていた。

研究代表者らはNFAT5に蛍光タンパク質を融合させ、ハイコンテントイメージアナライザーで検出することで、NFAT5の核移行の定量的測定系を確立した。さらに、これまで構築してきたsiRNAスクリーニングの技術[名黒, *実験医学増刊*, 2015; Koizumi *et al.*, *Elife*, 2016]を融合させ、高浸透圧によるNFAT5の核内移行に必要な遺伝子を全ゲノムスケール(約18,000遺伝子)で探索した。得られたヒット遺伝子群にパスウェイ解析を行った結果、これまで関係性の報告がない経路の遺伝子が多く含まれるという知見を得ていた。本研究では、新たに見出したこの経路とNFAT5の高浸透圧下での関係性について解析し、浸透圧ストレス受容からNFAT5依存的遺伝子発現までの分子機構の解明を目指した。また、新たに見出した経路が、NFAT5を介する免疫細胞制御に関与するか遺伝子発現に着目して解析した。

(3) 浸透圧ストレスで変化する代謝物の解析

研究代表者は共同研究により、低・等・高浸透圧の3条件におけるHeLa細胞内のノンターゲット脂質定量解析を行い、高浸透圧を負荷した細胞では、15分という短時間の間にミトコンドリアに関係する脂質関連分子が5-7倍まで増加することを見出した。本研究では、どのようなメカニズムでこの脂質の変化が起こるかについてミトコンドリア呼吸の測定により解析した。さらに、細胞外フラックスアナライザーを用いた解析から、高浸透圧ストレスは、脂質代謝だけでなく、糖代謝にも影響する知見が得られたことから、共同研究により、網羅的メタボローム解析を用いた細胞代謝物の変化を測定し、その変化を起こす分子メカニズムについて解析を行った。また、免疫細胞制御において、細胞代謝の変化は重要な要素であることから、免疫系の細胞でもこのような変化が見られるか検討した。

4. 研究成果

(1) 浸透圧ストレス応答性キナーゼASK3の機能する場と役割の解析

ASK3プロモーター下流で蛍光タンパクを発現するマウスの脳について透明化技術を応用して解析を行ったところ、蛍光の検出される構造的特徴からASK3が脳の脈絡叢上皮細胞に発現することを見出した。さらに組織ウェスタンブロットにより、ASK3ノックアウトマウスでは脈絡叢におけるASK3の発現が消失していることも確かめられた。また、この他にも脾臓、肺などいくつかの臓器で蛍光シグナルが観察され、細胞の形態からこれらの組織ではマクロファージでASK3が発現していることが示唆された。さらに、腹腔マクロファージを単離してウェスタンブロットにより解析した結果、やはり、ASK3がマクロファージに発現していることが確認できた。これまでASK3の主な発現部位は腎臓のみが知られていたため、新たな発現部位の同定により、これらの組織におけるASK3の機能の解析が可能となった。また、これらの部位・細胞での浸透圧環境の重要性について研究する手がかりになると考えられる。この結果を受けて、脈絡叢細胞の細胞株や単離脈絡叢におけるASK3の浸透圧応答と、その下流分子の挙動について解析を行った。基本的には腎臓で報告したシグナル伝達経路が脈絡叢でも保存されている結果を得ており、イオンや水輸送にASK3が関与することが想定される。さらに、WTとASK3 KOマウス由来の脈絡叢について、RNA-seqを行い遺伝子発現について比較した。脈絡叢の機能として知られる、脳脊髄液産生、血液-脳脊髄液関門、脳内免疫機構に関わる遺伝子の変化を確認した。これらの機能変化で影響を受けると想定される多発性硬化症モデル(EAEモデル)におけるASK3 KOマウスの表現型解析を進めている。マクロファージでのASK3の発現は、既に得られていた他の急性臓器炎症モデルで観察されるASK3欠損の影響の原因の説明になる可能性が考えられる。また、細胞レベルでのASK3の浸透圧応答メカニズムについても解析を進め、高浸透圧依存的な細胞体積収縮が細胞内でASK3の液液相分離(LLPS)を引き起こすことを見出し、このLLPSで誘導されるASK3凝集体の性状の制御がASK3の浸透圧応答に重要であることを明らかにした[Watanabe *et al.*, *Nat. Commun.*, 2021]。

(2) 高浸透圧によるNFAT5制御の分子機構解析

NFAT5の核内移行を制御する遺伝子のゲノムワイドsiRNAスクリーニングで得られた分子の

1 つについて詳細に解析を進めた。この分子の過剰発現、またはノックダウンによって、高浸透圧ストレス時に NFAT5 依存的に誘導される遺伝子発現がそれぞれ促進、抑制されることが確かめられた。また、この分子が属するシグナル伝達経路の上流因子を過剰発現させた場合も、NFAT5 依存的な遺伝子発現が促進されたことから、高浸透圧ストレス時に NFAT5 を制御する新たなシグナル伝達経路を見出した。マイクロアレイ解析の結果から、NFAT5 が高浸透圧時に制御する多数の遺伝子発現のうち、着目した分子に影響を受けるものは約 46%程度であり、本研究で発見した経路が一様に NFAT5 依存的な遺伝子発現を制御するわけではないという興味深い知見を得た。着目した分子が NFAT5 による遺伝子発現をどのような分子メカニズムで変化させているか解析を進めた結果、この分子は高浸透圧依存的に細胞内発現量が増加し、ゲノム上の NFAT5 結合配列近傍に自身も結合することで、転写因子である NFAT5 のリクルートを促進させ、遺伝子発現を促進させることを見出した。これは当該分子の欠損により NFAT5 のリクルートが低下することでも確かめられた。以上の解析は HeLa 細胞を用いて行ったが、マウスから単離した腹腔マクロファージでもこの分子の高浸透圧依存的な誘導が見られることや、単球由来細胞株である THP-1 細胞における NFAT5 依存的な遺伝子発現もこの分子の欠損で低下することから、マクロファージ系の免疫細胞でも保存された機構であると考えられる。以上の結果から、特に免疫細胞の高浸透圧応答において注目されている NFAT5 について、新たなシグナル伝達経路との関係と制御メカニズムを明らかにした。

(3) 浸透圧ストレスで変化する代謝物の解析

研究代表者が見出した、高浸透圧ストレスで増加する脂質関連分子は、ミトコンドリアの脂肪酸代謝 (β 酸化) との関連が知られていたため、細胞外フラックスアナライザーや、 β 酸化活性の測定を行ったところ、高浸透圧ストレスで β 酸化活性が低下し、脂質由来のミトコンドリア呼吸が抑制されることを見出した。さらに、この解析の過程で、高浸透圧ストレスが糖代謝にも影響することが示唆されたため、共同研究によりメタボローム解析を行った。代謝物の変化のパターンから、糖代謝のどの段階が影響を受けているか考察し、その段階の制御に重要な酵素の活性が高浸透圧依存的に変化することを明らかにした。その酵素の阻害剤を用いて、高浸透圧ストレスで起こる代謝変化を阻害すると、細胞死が促進されることがわかり、高浸透圧ストレス時に細胞が代謝を変化させることが生存に重要であることが示唆された。

以上、(1) ~ (3) の研究により、浸透圧環境の働く体内の場に関する洞察と、浸透圧環境がリン酸化シグナル、遺伝子発現、細胞代謝に与える影響について新たな知見を得た。それぞれの研究に含まれる因子の相互関係については、少なくとも ASK3 の欠損によって、NFAT5 による遺伝子発現や細胞代謝への影響は見られなかったことから、浸透圧ストレス応答においては独立に複数のシグナル伝達機構が機能していると考えられる。今後、本研究で得られた知見について、免疫細胞の機能や炎症性疾患との関連性をさらに詳細に解析することで、浸透圧が関連する疾患の創薬や新たな治療法の開発につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Watanabe, K., Morishita, K., Zhou, X., Siizaki, S., Uchiyama, Y., Koike, M., Naguro, I., and Ichijo, H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cells recognize osmotic stress through liquid-liquid phase separation lubricated with poly(ADP-ribose)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-21614-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kojima, K., Ichijo, H. Naguro, I.	4. 巻 169
2. 論文標題 Molecular functions of ASK family in diseases caused by stress-induced inflammation and apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 395-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida-Ishihara, S., Akiyama, M., Furusawa, K., Naguro, I., Ryuno, H., Sushida, T., Ishihara, S. and Haga, H.	4. 巻 133
2. 論文標題 Osmotic gradients induce stable dome morphogenesis on extracellular matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs243865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.243865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang, Y., Naguro, I. and Herr, A.	4. 巻 58
2. 論文標題 In situ single-cell western blot on adherent cell culture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed. Engl.	6. 最初と最後の頁 13929-13934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201906920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森下 和浩、渡邊 謙吾、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 TRPM4は細胞内液滴の流動性制御を介してASK3不活性化に寄与する
3. 学会等名 第19回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム（薬学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立野 浩輝、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 高浸透圧環境におけるストレス応答および 免疫応答に対する新規NFAT5制御分子HES1の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生澤 孟志、名黒 功、池田 和貴、有田 誠、一條 秀憲
2. 発表標題 高浸透圧ストレスにより起きる 代謝リプログラミングとその生理的意義
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Isao Naguro, Hidenori Ichijo
2. 発表標題 Signaling mechanisms and physiological roles of osmotic stress response
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 名黒 功、生澤 孟志
2. 発表標題 浸透圧ストレスに誘導される細胞代謝の変化
3. 学会等名 第5回メカノバイオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名黒功、立野浩輝、一條秀憲
2. 発表標題 NFAT5の高浸透圧応答性を促進するHes1の同定
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 哺乳類細胞における浸透圧ストレスシグナリングの解明とその役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊謙吾、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 相分離が高浸透圧ストレス下でのPP6によるASK3不活性化を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立野浩輝、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 高浸透圧環境におけるストレス応答および免疫応答に対する新規NFAT5制御分子HES1の機能解析
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立野浩輝、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 高浸透圧環境におけるストレス応答および免疫応答に対する新規NFAT5制御分子HES1の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関口雅子、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘導性肝障害 (AILF) におけるストレス応答キナーゼASK3の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生澤孟志、名黒功、池田和貴、有田誠、一條秀憲
2. 発表標題 高浸透圧ストレスは細胞のミトコンドリア呼吸に関わる代謝を変化させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Ryuno, Isao Naguro, Hidenori Ichijo
2. 発表標題 Analysis of HES1 as a Novel Regulator of NFAT5 under Hyper-Osmotic Stress
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference (The Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function Conference) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立野 浩輝、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 新規NFAT5核内移行制御因子HES1の同定と高浸透圧環境における機能
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 周 翔宇、渡邊 謙吾、森下 和浩、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 プロテアソーム依存的なASK3の不活性化による高浸透圧ストレス応答の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石原(石田)すみれ、秋山 正和、古澤 和也、名黒 功、立野 浩輝、須志田 隆道、石原 誠一郎、芳賀 永
2. 発表標題 浸透圧勾配が引き起こす上皮細胞シートのドーム形成
3. 学会等名 2018年度日本生物物理学会北海道支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名黒 功、立野 浩輝
2. 発表標題 シングルセルウェスタン法を用いた細胞の浸透圧ストレス応答の解析
3. 学会等名 第4回メカノバイオロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名黒 功、立野 浩輝、一條 秀憲
2. 発表標題 NFAT5の高浸透圧応答性を促進するHes1の同定
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html</p> <p>東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 グループ紹介 http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/html/group/naguroG.html</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California Berkeley			