

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04643

研究課題名(和文) 哺乳類細胞における浸透圧ストレス受容・応答機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of sensing and responding mechanisms for osmotic stress in mammalian cells

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、細胞の浸透圧ストレス応答を担う分子が血圧や炎症や免疫の制御にも関与する知見が得られてきている一方で、哺乳類細胞における浸透圧ストレスの受容・シグナル伝達の分子機構は未だ不明な点が多い。本研究ではASK3とNFAT5という2つの浸透圧応答分子に着目して、ゲノムワイドsiRNAスクリーニングや分子特異的クロスリンク法などの独自の技術を活用することで、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答における、新たなシグナル伝達機構の分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, molecules that function in cellular osmotic stress response have been reported to be involved in the regulation of blood pressure, inflammation and immune system. However, the precise molecular mechanism for sensing and transducing osmotic stress in mammalian cells still remains to be elucidated. In this project, we focused on ASK3 and NFAT5, two molecules responding to osmotic stress. With original methodologies, such as genome-wide siRNA screens and specific cross-linking technology, we have elucidated new molecular mechanisms regulating osmotic stress response in mammalian cells.

研究分野：物理化学的ストレスの細胞内シグナル伝達機構

キーワード：浸透圧ストレス ASK3 NFAT5 ゲノムワイドsiRNAスクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含むあらゆる生物は生活環境から紫外線、化学物質、温度変化、浸透圧変化(電解質・水分の変動)など様々な物理化学的ストレス(環境的変動)を受けているが、これらのストレスに適切に応答するシステムを備えることで環境変化に適応し生存を可能にしている。これまでの研究から個体レベルのストレス応答システムの実体は個々の細胞に存在する様々なストレス応答性分子を介するシグナル伝達に起因することが明らかにされ、さらに、このストレス応答の分子メカニズムの破綻が、がん、高血圧、糖尿病など環境因子を要因とする様々な病気の原因になることも明らかになってきている。

近年、細胞内で浸透圧ストレス応答を担うタンパク質が全身血圧や腎機能の健全性を保つと同時に、炎症や免疫細胞の成熟の制御を介して自己免疫疾患や免疫不全などの病態に関与することが相次いで報告されている。細胞が高浸透圧ストレスに適応する際に必須の遺伝子発現を担う NFAT5 という浸透圧応答性転写因子の機能を欠損したマウスでは、腎臓での不全が観察されるとともに、リンパ球である T 細胞や B 細胞の分化・増殖の欠陥も見られる。また、高食塩食により自己免疫疾患の症状が増悪する原因としても NFAT5 による T 細胞の活性化が関与することが報告されている。さらに、低浸透圧ストレス時の細胞体積調節を担うイオンチャネルとして同定された LRRC8A の変異が B 細胞の遺伝的 γ グロブリン欠損症の原因となることも報告された。このような知見は、生体が浸透圧ストレス応答を利用して免疫システムの調節を行っていることを示唆しており、これらのシグナル伝達の分子基盤解明により新たな視点から炎症や免疫疾患の制御が可能になると期待される。しかし、哺乳類細胞における浸透圧ストレスの受容・シグナル伝達の分子機構は未解明な部分も多く十分な解析がなされていない。

研究代表者は、近年 Apoptosis Signal-regulating Kinase 3 (ASK3) という新規のキナーゼを同定し、ASK3 が浸透圧ストレスに非常に特徴的な応答性(低浸透圧ストレスで活性化、高浸透圧ストレスで不活性化)を示すこと、腎臓において水とイオンの再吸収に関わるシグナル伝達経路を制御し、ASK3 ノックアウトマウスは高血圧症状を呈することを報告した。この独自の知見から ASK3 が哺乳類細胞の浸透圧ストレスの受容・応答メカニズムにおいて重要な働きをする分子と考え、ASK3 の担う浸透圧シグナル伝達経路を解析することで、哺乳類細胞における浸透圧ストレス応答の新たな分子基盤の解明を目指した。また、研究代表者がこれまで構築してきたゲノムワイド siRNA スクリーニング技術を ASK3 の解析のみならず、浸透圧応答分子として近年注目されている NFAT5 の解析にも用いることで、未だ不明

な点が残されている浸透圧ストレスが NFAT5 を活性化する分子メカニズムの解明も試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答に関わる分子として、ASK3 と NFAT5 という二つのタンパク質に注目し、浸透圧ストレスがこれらの分子の活性を変化させる分子基盤を明らかにすることで、これまで未解明であった細胞が浸透圧に応答する分子基盤を明らかにすることを目的とする。また、解析の過程において研究代表者が構築してきたゲノムワイド siRNA スクリーニングや、分子特異的クロスリンク法という新しい技術の有用性と妥当性の検証も行う。最終的には浸透圧ストレスの関与が報告されている血圧制御や免疫系の制御という観点において、明らかにした浸透圧に対するシグナル伝達機構の生理的意義の検討を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究においては、ASK3 の浸透圧ストレス依存的なリン酸化変化(低浸透圧でのリン酸化、高浸透圧での脱リン酸化)、および NFAT5 の高浸透圧依存的な核内移行を指標にゲノムワイド siRNA スクリーニングを行い、網羅的にそれぞれの浸透圧応答に必要な遺伝子群を同定した。ASK3 については、リン酸化特異的抗体を用いた細胞免疫染色により ASK3 のリン酸化程度を検出し、画像データをハイコンテントイメージアナライザーにより客観的かつハイスループットに定量化するシステムを利用した。NFAT5 については、蛍光タンパク質タグを付加した NFAT5 プローブについて、細胞質と核内の局在割合をやはりハイコンテントイメージアナライザーで客観的かつハイスループットに定量化した。

ASK3 は通常状態では細胞質に一樣に分布するが、高浸透圧ストレス下では細胞質において凝集し顆粒状の塊(ASK3 顆粒)を形成するというダイナミックな局在変化を示す。これは高浸透圧依存的に ASK3 が何らかの分子複合体を形成していることを示唆すると考えられる。この ASK3 顆粒に含まれる分子を同定するために、ASK3 近傍でのみ働く紫外線照射依存的なクロスリンカーを利用した。ASK3 に Halo タグというタンパク質を融合させ、このタグに特異的に結合する低分子化合物に紫外線でクロスリンク反応が起こる機能的側鎖を付加したものを加えると、化合物に結合した ASK3 の近傍でのみ ASK3 とのクロスリンク反応を引き起こせる。この後 ASK3 を免疫沈降して結合したタンパク質を質量分析計(MS)で同定した。また、高浸透圧刺激で形成される ASK3 顆粒はある程度の大きさを持つため、これを直接遠心分離で単離し、質量分析計で顆粒に含まれるタンパク質の同定も行った。

#### 4. 研究成果

##### ① ASK3 のリン酸化を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニング

ASK3 に関するゲノムワイド siRNA スクリーニングを低浸透圧ストレスでのリン酸化、高浸透圧での脱リン酸化を指標に実施した。高浸透圧ストレスにおける脱リン酸化の程度は比較的効率的に起こり、等浸透圧状態と比較して十分な差が観察され、スクリーニング系の感度の指標となる Z'ファクターについて十分な値が得られ、単純な高浸透圧刺激でスクリーニングの実施が可能だった。一方で、低浸透圧刺激による ASK3 のリン酸化はバラツキも大きく、等浸透圧状態と比べた Z'ファクターの値が十分でなかったため、一度高浸透圧刺激を行ったのちに低浸透圧刺激を行うことで、リン酸化程度のウィンドウを広げることにより妥当性のある 1 次スクリーニング系を構築できた。

(1) まず、高浸透圧ストレスのスクリーニングについて記載する。1 次スクリーニング結果のうち、統計的に選出した ASK3 脱リン酸化を制御する候補遺伝子約 700 遺伝子について、異なる配列を持つ個別の siRNA を 1 遺伝子に対して 4 種類処置し、オフターゲット効果などによる偽陽性を除く 2 次スクリーニングを行った。少なくとも 2 種類以上の siRNA で効果のあった遺伝子として約 60 種類まで絞り込んだ。この候補遺伝子群の中には予想外の代謝物の代謝経路に関与する遺伝子や、タンパク質分解系に関与する遺伝子が含まれるなど、既存の知見では想定できなかった ASK3 制御因子が得られた。実際に、その後の詳細な検討によってこれらの遺伝子が ASK3 のリン酸化制御に関与することに加えて、以前代表研究者が明らかにしていた ASK3 がリン酸化活性依存的に制御を行う WNK-SPAK/OSR1 経路にも影響を与えることが確認でき、本スクリーニングが妥当なものであることが確認できた。

これらの候補遺伝子のうち、特に脱リン酸化酵素である Protein Phosphatase 6 (PP6) に焦点を当てて、詳細な解析を行った。PP6 は共免疫沈降法により ASK3 と直接結合し、*in vitro* 脱リン酸化の解析から ASK3 の活性に必要なリン酸化部位を直接脱リン酸化することが明らかになった。さらに、浸透圧刺激を段階的に高くしていくと、PP6 と ASK3 の結合が浸透圧依存的に増加することを見出し、高浸透圧依存的に ASK3 が脱リン酸化される分子メカニズムの重要な分子基盤が解明された。PP6 のノックダウンにより高浸透圧でも ASK3 が脱リン酸化されない状況を作ると、高浸透圧時に起こる細胞収縮からの細胞体積回復が障害されると同時に細胞死が促進されることも明らかになった。このように、ASK3 制御因子として PP6 を同定したことで、高浸透圧で ASK3 が脱リン酸化される意義に関しても明らかになり論文により

報告した。今後、スクリーニングで見つかった代謝物の代謝経路に関わる分子や、タンパク質分解系と ASK3-PP6 の関係を解析することで、高浸透圧の受容から ASK3 の活性制御に至る分子基盤がより詳しく理解できると考えられる。

(2) 低浸透圧ストレスのスクリーニングに関しては、HEK293A 細胞と HeLa 細胞という 2 種類の細胞株を用いて 1 次スクリーニングを行い、両方で共通する候補遺伝子を選出する戦略をとった。これにより低浸透圧依存的な ASK3 のリン酸化に関与するものとして約 90 種類の候補遺伝子を絞り込んだ。この中にはリン脂質代謝や膜輸送に関与する遺伝子群などが得られており、低浸透圧ストレスと細胞膜の関連が想定された。

得られた候補遺伝子のうち、細胞膜に存在し、低浸透圧ストレスの感知において機能する可能性のある分子として、ある G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に注目した。この受容体は、特異的な組織におけるリガンドによる活性化に関する研究は報告されていたが、浸透圧との関連は全く報告されていなかった。現時点では、HEK293A 細胞にこの遺伝子が発現していることを確認し、低浸透圧ストレスによりこの受容体が活性化することを示唆する結果を得ている。スクリーニングで得られた他の遺伝子群とこの GPCR の関連性などを解析することで低浸透圧ストレスの受容メカニズムが明らかになると考えている。

##### ② 分子特異的クロスリンカーを用いた ASK3 複合体の解析

「研究の方法」で記載した分子特異的クロスリンカーを用いて高浸透圧ストレスで形成される ASK3 顆粒に含まれる複合体の同定を行った。低・等・高それぞれの浸透圧状態においてクロスリンクを行い、ASK3 を免疫沈降し SDS-PAGE で解析したところ、高浸透圧のみで観察されるバンドを見出した。高浸透圧ストレスで形成される ASK3 顆粒に含まれる分子と考えられたため、このバンドに含まれるタンパク質を MS により同定した。クロスリンク後に免疫沈降した ASK3 から切り離す処置も行ったが、結合分子として得られたものは最終的に ASK3 自身のみだった。高浸透圧ストレスで ASK3 が凝集し、オリゴマーを形成することを示唆する結果ではあり技術の妥当性はある程度確認できたが、ASK3 複合体に含まれる他のタンパク質を得るためには、クロスリンカーの長さを伸ばすことや MS の感度を上げるなどが必要と考えられた。

一方で、計画当初は予定していなかった、ASK3 顆粒を直接細胞から分離する方法を開発して顆粒に含まれるタンパク質同定を行った。一般的な細胞溶解液を用いると細胞内で形成された ASK3 顆粒は溶解してしまうが、特殊な溶解液を加えると、ASK3 顆粒を保つ

たまま細胞を溶解させられ、遠心分離により ASK3 顆粒を濃縮できることを見出した。取り出した ASK3 顆粒を免疫沈降法により精製し、MS により解析したところ、シャペロン分子複合体を同定した。解析の結果、このシャペロン分子は高浸透圧下での ASK3 の構造の健全性を保ち、それによって高浸透圧ストレスにおける ASK3 脱リン酸化の程度が影響を受けることが示唆された。今後、このシャペロンを含めて、MS 解析で得られた複合体に含まれる分子と ASK3 の関連をより深く解析することで高浸透圧ストレスにより形成される ASK3 顆粒の生理的意義に迫れると考えている。

### ③ NFAT5 の核内移行を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニング

NFAT5 に関するゲノムワイド siRNA スクリーニングでは、高浸透圧ストレス依存的な NFAT5 プロブの核内局在割合を指標としたが、これは、等浸透圧状態や、既に NFAT5 の核内移行に必要であることが報告されている Abl1 のノックダウンの場合と比較した時の Z'ファクターが十分良好な値になり、感度の高い系であることがわかった。実際に 1 次スクリーニングを行い、上述の既知の制御因子である Abl1 のノックダウンよりも影響の大きかった約 1300 遺伝子を候補遺伝子とした。非常に数が多かったため、候補遺伝子のリストに対してバイオインフォマクスを利用してパスイ解析などを行ったところ、ASK3 の高浸透圧ストレスのスクリーニングで触れた代謝物の代謝経路に関わる遺伝子群が得られ、高浸透圧ストレス応答においてこの代謝物が ASK3 と NFAT5 の経路で共通に利用されている可能性が考えられた。

この経路のほかにも、一連のシグナル伝達経路に含まれる遺伝子群が集中して候補に含まれていたため、そのシグナル伝達経路の最下流のエフェクター分子に着目して解析を進めた。この分子のノックダウンにより、内在性の NFAT5 の核内移行が抑制されるとともに、NFAT5 依存的な遺伝子発現が抑制された。また逆に、この分子の過剰発現により NFAT5 の核局在割合が増加し、遺伝子発現が促進された。さらに、この分子の上流因子の過剰発現によっても同様の影響が観察されたことから、スクリーニングから同定された新たなシグナル伝達経路を介して NFAT5 の核移行が制御されることが明らかになった。今後、このシグナル伝達経路が NFAT5 の制御を介して免疫系の細胞の成熟や分化に関与するかについて解析を進める予定である。

### ④ ASK3 の制御するシグナル伝達について

ASK3 は低浸透圧で活性化するが、HEK293A 細胞においては、この活性化は MAPK である p38 の活性化に必要なこと

とを見出した。また、p38 は下流の MAPKAPK を活性化することで最終的にこれまで報告のなかった WNK4 のセリン残基が低浸透圧によりリン酸化されることを明らかにし論文で報告した。すでに報告していた WNK1 に加えて WNK4 と ASK3 の関連を示唆する結果であり、今後 ASK3 と WNK ファミリーとの関連についてより深く解析するにあたり手がかりとなる情報である。

共同研究において、浸透圧ストレスにより細胞内の時計遺伝子の発現周期の変化やリセットが起こることが明らかになった。興味深いことに、周期の変化は低浸透圧ストレスと高浸透圧ストレスでそれぞれ短周期化、長周期化と ASK3 の浸透圧応答のように両方向性を持っていた。また、この浸透圧ストレスによる周期の変化やリセットは ASK1, 2, 3 全ての ASK ファミリー分子を欠損すると失われることから ASK 依存的に浸透圧による時計遺伝子の調節が行われていることを見出し論文にて報告した。今後、それぞれの ASK 分子の関与の程度の検討も必要であるが、ストレスと時計遺伝子の関連を解析する上で新たな手掛かりが得られたと考えられる。

### 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 11 件)

- ① Imamura, K., Yoshitane, H., Hattori, K., Yamaguchi, M., Yoshida, K., Okubo, T., Naguro, I., Ichijo, H. and Fukada, Y. ASK family kinases mediate cellular stress and redox signaling to circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115, 3646-3651. (2018) (査読有) doi: 10.1073/pnas.1719298115.
- 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). (査読有) doi: 10.1016/j.celrep..2018.02.045.
- ③ 名黒 功 両方向性の浸透圧ストレスを統御する ASK3 の研究 *生化学*, 89, 230-240 (2017) (査読有) . doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890230.
- ④ Zhou, X., Naguro, I., Ichijo, H. and Watanabe, K. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1860, 2037-2052 (2016). (査読有)

doi: 10.1016/j.bbagen.2016.05.032.

- ⑤ Maruyama, J., Kobayashi, Y., Umeda, T., Vandewalle, A., Ichijo, H. and **Naguro, I.**  
Osmotic stress induces the phosphorylation of WNK4 Ser575 via the p38MAPK-MK pathway.  
*Sci. Rep.*, 6, 18710 (2016). (査読有)  
doi: 10.1038/srep18710

[学会発表] (計 32 件)

- ① 名黒 功、小原 圭吾、一條 秀憲  
レポーターマウスを用いた浸透圧応答性キナーゼ ASK3 の組織発現分布の解析、ConBio2017 (2017)
- ② 名黒 功  
両方向性の浸透圧ストレスを統御する ASK3 の研究、第 89 回日本生化学会大会 (2016)
- ③ 名黒 功、一條 秀憲  
浸透圧ストレス応答性キナーゼ ASK3 のシグナル伝達と生理的役割、第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

[図書] (計 2 件)

- ① Ichijo, H. and **Naguro, I.** (Guest Editors)  
Elsevier, *Advances in Biological Regulation*  
“ASK family kinases and stress response in physiology and pathology” (2017).  
総ページ数 90
- ② 名黒 功  
羊土社、*実験医学増刊 “知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015”* (2015).  
総ページ数 214 (169-175)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~toxicol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

名黒 功 (NAGURO, Isao)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：80401222