

# 生体の浸透圧ストレスの受容・応答機構の解明

東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室  
名黒 功

## 1. はじめに 目的 背景

生物は、生活する環境における様々な変化（ストレス）にさらされながら暮らしており、紫外線、化学物質、温度変化、浸透圧変化などの物理化学的ストレスを受けると、それらに対抗、または適応するための応答を引き起こし、恒常性を維持することで生存を可能にしている。このストレス応答は、細胞に存在するタンパク質を中心としたストレス応答性分子により担われていることがこれまでの研究から明らかにされており、さらに近年、これら分子の欠損や変異によるストレス応答の破綻は、がん、炎症、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た。そのため、生体の物理化学的ストレスに対する受容・応答機構を細胞内の分子メカニズムのレベルで理解することは、基礎研究的な側面の他に、現代において治療が十分でない病態の理解や新規創薬ターゲット分子の提案にも重要であるといえる。

本研究で解析対象とする生体の浸透圧ストレス応答システムに関しても、最近、様々な病態の発症、増悪に関与する例が相次いで報告されている。例えば、浸透圧に応答し活性化するWNK-SPAK/OSR1経路というキナーゼカスケードが、腎臓の尿細管においてNa-Cl共輸送体などの制御を介してイオンの再吸収を調節し、全身の血圧制御に関与することが示された (Kahle *et al. Annu. Rev. Physiol.*, 70, (2008))。実際に、この経路に含まれるWNKキナーゼの遺伝子変異によりヒトで遺伝性高血圧症が発症することも知られている (Wilson *et al. Science*, 293, (2001))。また、高浸透圧にさらされた細胞で発現増加・活性化し、高浸透圧ストレス環境に適応するために必須の遺伝子発現を担う転写因子であるNFAT5が、過剰な食塩摂取により活性化し、T細胞の一種である $T_H17$ 細胞分化を促して、マウスにおける多発性硬化症モデルの症状の増悪に関与するという報告もなされた (Kleinewietfeld *et al. Nature*, 496, (2013))。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の実体として同定されたLRRC8Aは、B細胞の発達不全の結果、 $\gamma$ グロブリン欠損症となる遺伝病の原因遺伝子であることも明らかにされた (Qiu *et al. Cell*, 157, (2014))。これらの知見は、細胞レベルで浸透圧ストレスに応答する分子が個体レベルで高血圧や免疫系疾患に関与することを示しており、ヒトにおける浸透圧ストレス受容・応答の分子メカニズムを明らかにすることで、これらの疾患に対する画期的な創薬ターゲットを提示できる可能性を期待させる。しかしながら、これまで哺乳類細胞においては、浸透圧ストレスがどのような分子により認識され、上記の様な浸透圧応答性分子の制御がなされているか、具体的な分子メカニズムは殆ど明らかにされていない。

我々は、これまでに低浸透圧ストレスで活性化し、高浸透圧ストレスで逆に不活性化するという非常にユニークな浸透圧応答性を持つApoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)というキナーゼを同定し研究を行ってきた。その過程で、ASK3は前述した血圧制御に関与するWNK-SPAK/OSR1経路を活性依存的に抑制すること、また、そのためASK3ノックアウトマウスが高血圧症を呈することを明らかにしている (Naguro *et al. Nat. Commun.*, 3, (2012))。本研究の目的は、我々が世界に先駆けて解析を行っているこのASK3という浸透圧応答性キナーゼに焦点を当て、ASK3を介する細胞内シグナル伝達経路の全貌を解明することで、生体の浸透圧ストレスに対する受容・応答メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。特に、浸透圧ストレスを直接感知するセンサー分子の同定を念頭に解析を行い、浸透圧ストレスの関与する病態の理解と治療に新しい知見を提供することを目指して研究を行った。

## 2. 方法

本研究では、I)ASK3の特徴的な浸透圧応答を指標とした全ゲノムスケールのsiRNAスクリーニングと、II)分子特異的クロスリンカーによるASK3結合分子の同定という、2つのアプローチによりASK3を介する細胞の浸透圧ストレス応答経路の分子実体に迫った。

I)に関しては、当研究室に配備されていたヒトの全ゲノムワイド（約18000遺伝子）のsiRNAラ

イブラリーを利用した。原理的には、個々のsiRNAを処置した細胞について、浸透圧ストレス依存的なASK3活性変化を検出し、活性変化が失われたものをASK3の制御因子として選択する。これらの遺伝子は、細胞の浸透圧ストレスの受容からASK3活性変化までのシグナル伝達を担うものではなく、細胞の浸透圧センサー分子を含むASK3上流因子ということになる。我々は独自に作製した特異的抗リン酸化ASK抗体（P-ASK抗体）を用いた細胞免疫染色で、ヒト培養細胞株（HEK293A）においてASK3の浸透圧ストレス依存的な活性変化を感度よくモニターできる検出法を既に開発していた。この検出法を応用して、全ゲノムスケールという大規模スクリーニングに耐えるハイスループット性、および客観的定量性を満たすシステムを構築した。具体的には、384ウェルプレートにて作製した細胞免疫染色サンプルをハイコンテンツアナリシスが可能な自動イメージアナライザー（ArrayScan）により解析することで、染色されたリン酸化ASK3のシグナル強度からASK3活性を自動的・客観的に数値化することに成功した。この1次スクリーニングの後、候補遺伝子を絞り込むため1遺伝子に対して複数の配列のsiRNAを用いた2次スクリーニングを行い、得られたASK3制御因子についてさらに解析を行った。

II)に関して、ASK3はゲル濾過などを用いたこれまでの解析で、定常状態から1 MDaを越える高分子量複合体を形成していることが明らかになっていた。また、ASK3は定常状態では細胞質に一樣に分散しているが、高浸透圧ストレス下で顆粒状に集積するという局在変化を示すため、浸透圧ストレス依存的に相互作用分子が変化することも予想された。そこで、浸透圧ストレスをかけた細胞内で紫外線照射特異的にASK3と相互作用分子間にクロスリンク反応を起こし、ASK3に共有結合してきた相互作用分子を質量分析計（MS）により同定することにした。ここで、一般的なクロスリンカーは近くに存在するあらゆる組み合わせの分子を結合させてしまうため特異性が低いと考え、ASK3の限られた近傍だけで、しかもASK3とだけクロスリンク反応を起こす方法を採用した。HaloTagというタグタンパク質は、特異的な低分子化合物（Haloリガンド）とのみ自発的に共有結合を形成する。このHaloTagをASK3の融合タンパクとして発現させ、処置するリガンドの先端に紫外線依存的にクロスリンク反応の起こる置換基を導入した。これにより、ASK3にだけクロスリンカーの一端を固定でき、紫外線照射時にはASK3近傍でのみクロスリンク反応を起こせる。この方法を用いて、浸透圧依存的にASK3に結合する分子の探索を行った。

### 3. 結果 研究成果

I)に関しては、自動イメージアナライザーによる細胞免疫染色を利用したASK3活性測定系を用い、高浸透圧ストレスによるASK3不活性化をアウトプットとして、約18000遺伝子について1次スクリーニングを完遂した。スクリーニングの精度の指標であるZ'-factorは0.2を越え、優良な解析ができたと考えられた。結果としてこの時点で約700遺伝子を高浸透圧ストレスによるASK3不活性化制御因子として同定した。さらに2次スクリーニングにおいて、これらの候補に対してsiRNAの配列を4種類にして同様の測定法で解析を行い、再現性、配列特異性（オフターゲットの否定）などを確かめて最終的に63遺伝子をポジティブヒットとした。今回は、ポジティブヒットのうち、直接ASK3不活性化に関与する可能性の高いフォスファターゼと、スクリーニングにおいて特にASK3不活性化に影響の大きかったNAD合成に関わる酵素についてより深く解析を進めた。これらの遺伝子のsiRNAによるノックダウンは細胞免疫染色だけでなく、イムノブロットを用いた解析でも顕著にASK3不活性化を減弱させることが確認でき、逆に過剰発現することでASK3不活性化を促進した。また、フォスファターゼについては、*in vitro*の解析でASK3の活性に必須のリン酸化部位を直接脱リン酸化することが確かめられ、本スクリーニングで得られた遺伝子が、確かにASK3制御因子であることが明らかになり、スクリーニングの妥当性が確認できた。同定したフォスファターゼは高浸透圧依存的にASK3と結合を増強することを見出し、高浸透圧依存的にASK3が不活性化する分子メカニズムについて明らかになった。また、このフォスファターゼとASK3との結合に、細胞内NAD濃度が関わることを示唆する結果が得られ、今回注目したNAD合成関連酵素がフォスファターゼとASK3の結合を制御する結果も得られたため、スクリーニングで得られたヒット遺伝子間の相互関係まで明らかにすることができた。さらに、これら2つの遺伝子のノックダウンはASK3の不活性化を抑制すると同時に、ASK3が制御するWNK-SPAK/OSR1経路の活性にも影響することが確かめられたため、本スクリーニングは血圧制御に関与するASK3-WNK-SPAK/OSR1経路の新たな制御因子を同定したという点でも意義深い。

II)に関しては、ASK3に融合させるHaloTagの位置や、Haloリガンドにつける光反応基を様々なパターンで検討し、クロスリンク後のサンプルをSDS-PAGEで泳動してバンドパターンを比較すると、複数のパターンの組み合わせでそれぞれ個別のASK3相互作用分子とASK3をクロスリンクできることを示唆するデータが得られた。特に、ASK3のN末端にHaloTagを融合させ、光反応基としてフェニルアジド基を利用した組み合わせでは、浸透圧ストレスを変化させるとSDS-PAGEで得られるバンドパターンが変化したことから、浸透圧依存的に相互作用が変化する分子をクロスリンク

できていると考えられた。以上の結果から、ASK3は細胞内で複数の相互作用分子と複合体を形成しており、浸透圧ストレス依存的に相互作用分子を変化させることが示唆された。現在、高浸透圧ストレス特異的に検出される相互作用分子のバンドに着目し、同定を目指してMSによる解析を進めている。

#### 4. 考察 まとめ

本研究で行った解析により、哺乳類細胞の浸透圧ストレス応答の一つであるASK3の活性変化の分子基盤について新たな知見が得られた。I)で同定したASK3制御因子群については、63個全てのヒット遺伝子に関する詳細な解析は未だ不十分であるが、この中には高浸透圧を始めに受容して、細胞応答へ繋げる浸透圧センサー分子も含まれていると期待できる。今回、詳細に解析したフォスファターゼとNAD合成経路の酵素については、ASK3の制御を介してWNK-SPAK/OSR1経路の活性を変化させることが確かめられたことから、これらの遺伝子がASK3-WNK-SPAK/OSR1経路を介して個体の血圧制御に関与すると予想できる。同様に考えて、今回得られたスクリーニングの全てのヒット遺伝子が高血圧症治療薬の新たなターゲットとして提言できる可能性がある。今後、他の遺伝子のASK3制御に対する関与について明らかにすることで、高浸透圧ストレスがASK3活性変化につながる細胞内シグナル伝達の全貌を明らかに出来ると考えている。また、今回検討した高浸透圧ストレスに対し、逆の低浸透圧ストレスによるASK3活性化についても既に全ゲノムワイドのスクリーニングを実施、完遂しており、低浸透圧ストレスの細胞内シグナル伝達経路も明らかにする予定である。これらの結果を合わせて考えることにより、細胞が浸透圧ストレスという両方向性のストレスに対してどのようなシステムを備えて対応しているか分子レベルで明らかにできると考えている。

II)の解析においては未だ具体的な結合分子の同定には至っていないが、ASK3が浸透圧依存的に相互作用分子を変化させることを示唆する結果を得た。今後、MSによる解析で高浸透圧依存的に現れる相互作用分子を始め、現在観察できている全てのASK3相互作用分子を同定することで、ASK3が浸透圧ストレスに応答して活性を変化させる際に重要な分子の同定ができると期待できる。この結果をI)のスクリーニングで得られた分子のリストと比較し、総合的に考察することでASK3の浸透圧応答メカニズムが効率的に明らかにできると考えている。

本研究で同定したASK3関連分子は、ASK3を介する血圧調節に関与する可能性が考えられ、高血圧症治療の新たなターゲットになることが期待できる。さらに、ASK3制御因子のうち、最上流で浸透圧受容を担うセンサー分子が特定できれば、序論で挙げたNFAT5やLRRC8Aなど、他の浸透圧ストレス応答分子の制御に関わる可能性も十分考えられる。そのため、本研究で同定した分子群についてASK3との関連だけでなく、細胞の浸透圧ストレス応答全体というより広い視点で解析することで、浸透圧ストレスが関与する様々な病態の理解と治療に貢献できると考えている。

#### 5. 発表論文、参考文献

Qiu, Z., Dubin, A. E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., Miraglia, L. J., Reinhardt, J., Orth, A. P. and Patapoutian, A. Swell1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*, 157, 447-458 (2014)

Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana H., Yosef, N., Linker, R. A., Muller, D. N. and Hafler, D. A. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496, 518-522 (2013)

Naguro, I., Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat. Commun.*, 3, 1285 (2012)

Kahle, K. T., Ring, A. M. and Lifton, R. P. Molecular physiology of the WNK kinases. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 329-355 (2008)

Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., Feely, M. P., Dussol, B., Beriand, Y., Unwin, R. J., Mayan, H., Simon D. B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X. and Lifton, R. P. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science*, 293, 1107-1112 (2001)