

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞体積調節機構における mGluR5-ASK3 シグナル伝達経路の解明

氏名 丹羽 國祥

### [序論]

細胞は、様々な生理的局面に対して自身の細胞体積を適切に調節しなければならない。細胞内外の浸透圧差の変化により生じる急速な細胞体積の強制的変化に対して、細胞は、膨張・収縮した細胞体積を元の体積に戻す機構を誘導する。この細胞体積調節機構は、細胞膜上に存在するイオンチャネルやイオントランスポーターを介したイオンやタウリンなどのオスモライトの輸送によって担われており、細胞膨張時の regulatory volume decrease (RVD)機構と、細胞収縮時の regulatory volume increase (RVI)機構に分類される。特に RVD 機構は単なる細胞体積の回復だけではなく、細胞死、炎症、そして神経活動の興奮性に関与することが提唱されており、細胞体積調節機構の生理学的有意性は極めて高いといえる。しかしながら、細胞体積センサー分子の分子実体をはじめとして、エフェクター分子に至るまでのシグナル伝達機構の詳細は未解明のままである。

当研究室で同定された apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)は、腎臓において顕著に発現しているセリン/スレオニンキナーゼである。ASK3 は急速な細胞体積変化を誘導する細胞外浸透圧変化に対して、低浸透圧環境下ではリン酸化されて活性化し、一方で、高浸透圧環境下では脱リン酸化されて不活性化するという両方向性の活性変化を示す。また、ASK3 は KCC や NKCC といったイオントランスポーターの活性を調節する WNK1-SPAK/OSR1 経路を ASK3 活性依存的に負に制御することが明らかとなっている。しかしながら、未だ浸透圧応答における ASK3 の生理的意義は不明である。

本研究においては、ASK3 が低浸透圧誘導性 RVD に寄与することを明らかにし、ASK3 の上流解析を通して、細胞体積変化の感知から体積回復に至るまでの一連のシグナル伝達機構の全貌解明にアプローチした。

### [方法・結果]

#### RVD エフェクター分子 VRAC の活性化に ASK3 は必要である

細胞膨張を引き起こす低浸透圧環境下において細胞は、主要な RVD エフェクター分子の一つである volume-regulated anion channel (VRAC)を活性化させ、Cl<sup>-</sup>やオスモライトを細胞外に放出することで、水を排出する RVD 機構を誘導する。ここで、浸透圧変化に対する ASK3 の迅速な応答性を考慮し、低浸透圧時の VRAC の活性化に対する ASK3 の影響を YFP-quenching assay で評価した。

YFP-quenching assay は VRAC の高い透過性を利用し、ハロゲン感受性 YFP 恒常発現細胞を I<sup>-</sup>含有低浸透圧溶液にさらすことで、VRAC の活性化を細胞内 YFP 蛍光強度の消光によって評価することができる。VRAC 阻害剤である carbenoxolone (CBX)によって YFP 蛍光強度の消光の抑制が確認される

ところで、ASK3 発現抑制細胞において YFP 蛍光強度の消光が顕著に抑制された。このことから ASK3 は低浸透圧時の VRAC の活性化に必要であることが示唆された。

### **ASK3 は低浸透圧誘導性 RVD に寄与する**

低浸透圧環境下において VRAC の活性化に ASK3 が必要であること、また ASK3 が制御する WNK1-SPAK/OSR1 経路は KCC 活性を調節することが報告されていることから、ASK3 は低浸透圧誘導性 RVD において重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、細胞体積に依存して蛍光強度が変化するというカルセインの特性を利用した細胞体積測定系を構築し、ASK3 の RVD に対する寄与を評価した。control siRNA 処置細胞において低浸透圧刺激における細胞膨張とその後の RVD 機構による細胞体積の回復が見られる一方で、ASK3 siRNA 処置細胞における RVD 誘導は有意に低下した。

### **RVD 制御分子 ASK3 の活性化を指標にしたゲノムワイド siRNA スクリーニングによる mGluR5 の同定**

ASK3 が RVD に関与していることが強く示唆されたことから、ASK3 の低浸透圧刺激依存的な活性化を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことで、細胞体積膨張のセンシングメカニズムの解明を試みた。具体的には約 18,000 遺伝子を対象とするゲノムワイド siRNA ライブラリーを用い、ASK3 の活性化の指標である 808 番目のスレオニンのリン酸化を蛍光免疫染色によって定量することで、ASK3 の低浸透圧依存的な活性化を減弱させた遺伝子を網羅的に同定した。ここで、低浸透圧などの機械的刺激を感知できる膜タンパク質は細胞体積センサーの候補分子として考えられている。そこで、これらの ASK3 活性化候補遺伝子群から膜貫通領域を少なくとも一つ有するという条件を満たす遺伝子を探索したところ、唯一の陽性遺伝子として metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) を同定した。

### **mGluR5 は ASK3 の上流制御分子である**

mGluR5 は主に神経細胞における報告が多数であるが、RT-PCR とウェスタンブロットの結果より HEK293A 細胞においても mGluR5 は発現していることが明らかとなった。また ASK3 の低浸透圧依存的な活性化における mGluR5 の必要性を再検討するために、mGluR5 のネガティブアロステリックモジュレーターである MPEP により評価した。ここで、MPEP を処置した HEK293A 細胞及び SH-SY5Y 細胞において低浸透圧依存的な ASK3 の活性化は減弱したことから、siRNA スクリーニングの妥当性が立証された。一方で、mGluR5 を過剰発現した HEK293A 細胞に mGluR5 アゴニストである (S)-3,5-DHPG を処置したところ、内在性 ASK3 の活性化が確認された。

### **mGluR5 は低浸透圧環境下で活性化する**

mGluR5 は神経伝達物質であるグルタミン酸によって活性化する GPCR であり、これまでの報告において mGluR5 が浸透圧刺激や伸張といった機械的刺激に対して感受性であるという報告はない。そ

ここで、mGluR5 が低浸透圧刺激で活性化する可能性を検討するために、活性化型 GPCR に対して  $\beta$ -arrestin の結合が増強する性質を利用した。具体的には mGluR5 と  $\beta$ -arrestin1 を共発現した HEK293A 細胞に低浸透圧刺激を 5 分間行い、免疫沈降したところ、低浸透圧刺激依存的に mGluR5 と  $\beta$ -arrestin1 の結合の増強が確認された。この結果から、mGluR5 は低浸透圧環境下において活性化することが示唆された。

#### [考察・総括]

本研究において、ASK3 は VRAC 活性を制御し、低浸透圧誘導性 RVD に寄与することを明らかにした。さらに RVD 制御分子 ASK3 の活性化を指標にしてゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことにより、ASK3 制御分子として mGluR5 を同定した。mGluR5 は RVD 制御分子である ASK3 の活性を制御することから、mGluR5 もまた RVD において重要な役割を果たしていることが示唆される。例えば、mGluR5-ASK3 シグナル伝達経路は、神経細胞膨張時に細胞体積調節機構を介して神経保護作用を発揮している可能性が考えられる。また、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸による mGluR5-ASK3 シグナル伝達経路は、適切なイオン濃度勾配の形成機構の解明に新たな洞察をもたらすと推察される。