

博士論文

高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の
制御機構と生理学的意義の解明

渡邊謙吾

平成 26 年度博士論文

高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の
制御機構と生理学的意義の解明

東京大学大学院薬学系研究科
細胞情報学教室

平成 24 年度進学 渡邊謙吾
指導教員 一條秀憲

目次

| | |
|------|-----|
| 略語一覽 | 03 |
| 序論 | 05 |
| 図 | 11 |
| 方法 | 21 |
| 結果 | 29 |
| 考察 | 35 |
| 総括 | 45 |
| 文献 | 46 |
| 図表 | 56 |
| 謝辞 | 110 |

略語一覧

| | |
|--------------|---|
| ADPR | adenosine diphosphate ribose |
| AE | anion exchanger |
| ANKRD28 | ankyrin repeat domain 28 |
| ASK3 | apoptosis signal-regulating kinase 3 |
| AVD | apoptotic volume decrease |
| cADPR | cyclic ADP-ribose |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DNA-PK | DNA-dependent protein kinase |
| FBS | fatal bovine serum |
| H2AX | H2A histone family, member X |
| HICC | hypertonicity-induced cation channel |
| IL-1 β | interleukin-1 β |
| JNK | c-jun N-terminal kinase |
| KCC | K ⁺ -Cl ⁻ cotransporter |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| NA | nicotic acid |
| NaAD | nicotic acid adenine dinucleotide |
| NAM | nicotinamide |
| NaMN | nicotic acid mononucleotide |
| NAMPT | nicotinamide phosphoribosyltransferase |
| NCC | Na ⁺ -Cl ⁻ cotransporter |
| NHE | Na ⁺ /H ⁺ exchanger |
| NKCC | Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ cotransporter |
| NMN | nicotinamide mononucleotide |
| NMNAT | nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase |
| OSR1 | oxidative stress-responsive 1 protein |
| PAR 化 | poly(ADP-ribosyl)ation |
| PARP | poly(ADP-ribose) polymerase |
| PBEF | pre-B-cell colony-enhancing factor |
| PI | propidium iodide |
| PP2Ac | protein phosphatase 2A, catalytic subunit |
| PP6 | protein phosphatase 6 |
| PPM | metal-dependent protein phosphatase |
| PPM1A | protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A |
| PPP | phosphoprotein phosphatase |
| PPP6C | protein phosphatase 6, catalytic subunit |
| PPP6R1 | protein phosphatase 6, regulatory subunit 1 |
| PSP | protein Ser/Thr phosphatase |
| RNF146 | RING finger protein 146 |

| | |
|-------|--|
| RVD | regulatory volume decrease |
| RVI | regulatory volume increase |
| SPAK | STE20/SPS1-related proline-alanine-rich kinase |
| TAK1 | TGF- β activated kinase 1 |
| TRPM2 | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 |
| VRAC | volume-regulated anion channel |
| WNK1 | with no-lysine [K] 1 |

序論

1. 浸透圧ストレス認識と細胞体積調節

生体は日々様々な物理化学的ストレスにさらされているが、細胞レベルで適切に応答することで個体レベルでの恒常性を維持している。様々な物理化学的ストレスの中でも、細胞外液の急激な浸透圧変化は、細胞内の水の流出入に伴い、細胞体積を強制的に変化させる甚大なストレスである(=浸透圧ストレス)。例えば、高浸透圧ストレスの場合、細胞が強制的に収縮することで、イオン強度やタンパク質・核酸・脂質などマクロ分子の衝突が増加するだけでなく、転写・翻訳の抑制、DNA 損傷の増加なども生じ (Burg, M.B. *et al.* 2007)、生命活動の上で危機的状況であると言える。そのため細胞は、イオンの流出入を積極的に変化させることで、細胞内外の浸透圧差を減らし、逆方向の水の流出入を引き起こすことで細胞体積を直ちに回復しようとする (McManus, M.L. *et al.* 1995; Lang, F. *et al.* 1998; Hoffmann, E.K. *et al.* 2009)。この体積回復機構は、低浸透圧ストレス後は regulatory volume decrease (RVD)、高浸透圧ストレス後は regulatory volume increase (RVI) と呼ばれる (Fig.0-01)。ただ、イオンの流出入を行うと、イオン強度の変化によってタンパク質構造が変化したり、細胞膜電位が変化したりと、細胞にとって好ましい状況ではない。そこで細胞は、ひとまず体積を回復した後、徐々にイオンの変化をソルビトールやイノシトール、グリセロホスホコリン、ベタイン、タウリン、アミノ酸などといったオスモライトの変化に置換することで、細胞機能を定常状態に戻すが、広義にはここまでを含めて RVD・RVI と呼ぶこともある。RVD や RVI において、実際にイオンの流出入を担うエフェクター分子については、多くの知見が得られている。細胞種によって多少異なるものの、基本的には、RVD では K^+Cl^- cotransporter (KCC) や K^+ チャネル、 Cl^- チャネルによって正味として KCl が流出されるのに対し、RVI では Na^+/H^+ exchanger (NHE) や $Na^+-K^+-Cl^-$ cotransporter (NKCC) によって正味として NaCl が流入される。

一方、細胞がどのようにして浸透圧ストレスを認識しているかというセンシング機構については、細菌や酵母、植物などでは少しずつ明らかになってきたものの、特に哺乳類細胞においては不明な点が多い。浸透圧ストレスは、目に見える物質的なものではないため、強制的に引き起こされる細胞体積変化を認識していると考えられ、これは大きく分けて3種類に分類される。それは、細胞内イオン強度やイオン濃度の変化、タンパク質・核酸・脂質などマクロ分子の衝突変化、脂質二重膜の機械的・化学的変化であり、これら全てのパターンが浸透圧ストレス認識に用いられると考えられている。浸透圧ストレス認識と細胞体積調節の分野における長年の謎として、特に、低浸透圧ストレス後に活性化する volume-regulated anion channel (VRAC) と高浸透圧ストレス後に活性化する hypertonicity-induced cation channel (HICC) があげられる。これらチャネルの電気生理学的、薬理的プロファイルは非常によく調べられており、それぞれ RVD、RVI において重要であることはわかっていたが、その分子実体は長らく不明であった。しかし 2014 年、遂に genome-wide siRNA screening によって VRAC は leucine rich repeat containing 8 family, member A (LRRC8A) が分子実体であると別々のグループから同時に報告された (Qiu, Z. *et al.* 2014; Voss, F.K. *et al.* 2014)。また、HICC の方も、HepG2 細胞においては α -epithelial Na^+ channel (α -ENaC) が、HeLa 細胞においては transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (TRPM2) ΔC が分子実体であると近年報告されたが (Bondarava, M. *et al.* 2009; Numata, T. *et al.* 2012)、これらは網羅的探索によって同定された訳ではないため、以前の VRAC の報告のように、後に訂正される可能性は否定できない。ただ、いずれにせよ分子実体が報告されたことで、これからまさに VRAC や HICC の浸透圧ストレス認識や活性化に関する研究が加速し、これまで不明な点の多かった細胞の浸透圧ストレス認識からエ

フェクター分子に至る分子機構が、明らかになって行くと期待される。

また、細胞体積は生命活動の場を規定する根本的な要素であるが故に、浸透圧ストレス応答における細胞体積調節機構は、様々な生理現象にも関わることが示唆されてきている (Hoffmann, E.K. *et al.* 2009). 例えば, THP-1 マクロファージは, 細胞膨張と続く RVD によって, NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームが活性化し, カスパーゼ 1 の活性化, interleukin-1 β (IL-1 β) の放出が見られるという報告がなされたが (Compan, V. *et al.* 2012), これは細胞体積調節と炎症応答の関連を直接示す例である。また, アポトーシス時には, 初期段階から細胞収縮が観察されるが, これは RVD の機構を利用することで積極的に作り出していることが知られる (Maeno, E. *et al.* 2000). 他にも, 細胞移動 (Schwab, A. *et al.* 2012) や細胞増殖 (Pedersen, S.F. *et al.* 2013) などとの関わりが示唆されており, 浸透圧ストレス認識から細胞体積調節までの分子機構を明らかにすることは, 他の生理現象の分子機構まで明らかにする可能性がある。

2. Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)

Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3) は, ASK1 とのホモロジー解析によって, ヒト及びマウスの X 染色体上にコードされていることが明らかになった (Naguro, I. *et al.* 2012). ASK3 は ASK1 との相同性が非常に高く, セリン/スレオニンキナーゼドメインの相同性は 87% にもなる (Fig.0-02A). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 15 (MAP3K15) という別名の通り, ストレス応答性 MAPK 経路の最上流に位置し, 他の MAP3K と同様, MAP2K を介して, 下流の p38 や c-jun N-terminal kinase (JNK) を活性化できる。また, ASK1 同様, 活性ループ中の 2 番目のスレオニンのリン酸化がキナーゼ活性に必須であり (Fig.0-02B), このスレオニンのリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化 ASK 抗体によってリン酸化レベルを検出すれば, キナーゼ活性測定の代わりにとすることができる (Tobieme, K. *et al.* 2002).

一方, ASK1 とは異なり, ASK3 は mRNA レベル・タンパク質レベル共に, 胃や腎臓に多く発現するという特徴的な発現パターンを示す (Fig.0-03). 特に腎臓は, 血液から老廃物を濾過して排泄すると同時に, 個体の体液量調節を担う重要な組織であるが, この機能は 200 mOsm/kg H₂O から 1200 mOsm/kg H₂O にまで至る浸透圧差を積極的に生み出すことで可能となる。ただ同時に, 大きな浸透圧変化の生じ得る部位でもあるため, ASK3 の浸透圧ストレスに対する応答が検討された。すると, ASK1 は低浸透圧ストレス, 高浸透圧ストレスのいずれでも活性化したのに対し, ASK3 は低浸透圧ストレスで活性化し, 高浸透圧ストレスで不活性化した (Fig.0-04A). つまり, ASK3 は両方向性の浸透圧ストレスに対して両方向に応答できることになり, 数分という非常に迅速な応答, かつ, 約 20 mOsm/kg H₂O という差を認識する鋭敏な応答, かつ, 可逆的な応答である点も踏まえると, 細胞の浸透圧ストレス認識機構においてコンバーターのような役割を担っていると推測された (Fig.0-04B).

その後の解析から, ASK3 は, KCC や NKCC, Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC) といったイオントランスポーターを制御する STE20/SPS1-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) と oxidative stress-responsive 1 protein (OSR1) の上流分子である with no-lysine [K] 1 (WNK1) をキナーゼ活性依存的に負に制御することが明らかになった (Naguro, I. *et al.* 2012; Fig.0-05). この WNK1 は偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子として知られ, 病気における WNK1 変異は, 腎臓において SPAK/OSR1 の過剰活性化を引き起こし, 続く NCC や NKCC の過剰活性化, 塩の再吸収の亢進, 水の再吸収の亢進によって体液量が増加することで, 高血圧症状を引き起こすと解釈されている。よって, WNK1-SPAK/OSR1 経路を負に制御する ASK3 がノックアウトされたなら, 同様の表現型が得られると想定されるが, 確かに ASK3 ノックアウトマウスは, 高週齢や高食塩食負荷の状況下で, 野生型よりも高血圧を呈し, ASK3 が個体の体液量調節において重要であることが示された (Naguro, I. *et al.*

2012). ただ, 細胞レベルでの生理学的意義は示せておらず, 特に高浸透圧ストレスにおいては, なぜ定常状態よりも敢えて ASK3 活性が下がらなければならないのか, その生理学的意義は明らかになっていない (Fig.0-06).

また, 細胞が浸透圧ストレスを認識して ASK3 のユニークな活性変化へと至る制御機構については, ほぼ何もわかっていない (Fig.0-06). かつて, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には何らかのタンパク質ホスファターゼの関与が示唆されたことから, そのタンパク質ホスファターゼを同定する目的で, *Drosophila* S2 細胞においてホスファターゼに絞った RNAi スクリーニングが行われた (梅田剛, 平成 21 年度). しかし, 最終的に得られた protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1A (PPM1A)や PPM1B は, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化への関与はほとんどなく, 低浸透圧ストレスによって活性化した ASK3 を脱活性化させるようなタンパク質ホスファターゼであったため, 結局, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構は未解明のままであった.

3. 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御分子の網羅的探索

そこで, 未登録のタンパク質ホスファターゼに ASK3 が不活性化されていた可能性, *Drosophila* と哺乳類では ASK3 不活性化を担うタンパク質ホスファターゼが異なっていた可能性, ASK3 不活性化制御分子の網羅的な同定の可能性, 哺乳類細胞の普遍的な浸透圧ストレス認識分子同定の可能性を踏まえ, 私は修士課程で, 哺乳類細胞においてゲノムワイドに拡張した siRNA スクリーニングを行った (渡邊謙吾, 平成 23 年度; 渡邊謙吾ら, 2014 年).

まず, ASK3 の活性をハイスループットに検出するため, 抗リン酸化 ASK 抗体による蛍光免疫染色を用いて, マイクロウェルプレート上で直接 ASK3 活性を測定するアッセイ系を構築した (Fig.0-07). この時, ハイコンテント解析を適用し, 1 細胞ごとに ASK3 活性を算出することで (Fig.0-08), 検出感度・精度共に高いアッセイ系が構築できた (Z' -factor > 0.6). その後, 実際にヒトのゲノムワイド siRNA ライブラリー (約 18,000 遺伝子) に対して, 高浸透圧ストレス後の ASK3 不活性化が抑制されることを指標として, 構築したアッセイ系によるハイコンテントゲノムワイド siRNA スクリーニングを行った (Fig.0-09). その結果, 686 個の候補分子が得られたが, 1 遺伝子当たり異なる 4 つの siRNA を混ぜたプールの siRNA を用いて発現抑制効率を高めたため, オフターゲット由来の偽陽性も多く含まれていると考えられた. そこで, アッセイ系は同一のまま, 1 遺伝子当たり異なる 4 つの siRNA を異なるウェルに用意して, redundant siRNA activity (RSA)解析 (König, R. *et al.* 2007)を適用した二次スクリーニングを行った結果, 63 個の候補分子にまで絞り込まれた (Fig.0-10).

4. Protein phosphatase 6 (PP6)

63 個の候補分子の中には, 唯一のタンパク質ホスファターゼとして protein phosphatase 6 (PP6) の触媒サブユニット protein phosphatase 6, catalytic subunit (PPP6C)が含まれていた.

ヒトの細胞のタンパク質において, リン酸化されているアミノ酸残基は 86.4%がセリン, 11.8%がスレオニン, 1.8%がチロシンだと言われており (Olsen, J.V. *et al.* 2006), ヒトのタンパク質キナーゼとして, セリン/スレオニンキナーゼが 428 個, チロシンキナーゼが 90 個存在すると言われている (Johnson, S.A. and Hunter, T). 一方, タンパク質ホスファターゼは, チロシンホスファターゼ (protein Tyr phosphatase; PTP)が 107 個あるのに対し (Alonso, A, *et al.* 2004), セリン/スレオニンホスファターゼ (protein Ser/Thr phosphatase; PSP)はわずか 30 個程度しかない. 明らかに PSP の数が少ないが, 多くの PSP は, 複数の調節分子と組み合わせの異なるホロ酵素を形成することで特異性の幅を持たせている (Shi, Y. 2009). PSP は, phosphoprotein phosphatase (PPP), metal-dependent protein phosphatase (PPM), aspartate-based phosphatase の 3 つのファミリーから

構成され、さらに PPP は protein phosphatase 1 (PP1), PP2A, PP2B (=カルシニューリン), PP4, PP5, PP6, PP7 の 7 種類に分かれる (PP7 は植物においてのみ存在). 名前とは裏腹に, PPM だけでなく PPP も水分子を活性化させるためには 2 つの金属イオンが必要であり, PPP の触媒中心には金属イオンを適切に配位するためのアスパラギン酸 2 つ, アスパラギン 1 つ, ヒスチジン 3 つが高度に保存されている. PPP の中でも, PP2A と PP4, PP6 の触媒サブユニットは非常に似ており, PP2A がメジャーであることから, PP2A に比べて PP4 と PP6 に関する分子レベルでの報告は少なく, 同じような制御を受けていると想定されることが多い. 実際, 不活性化状態の protein phosphatase 2A, catalytic subunit (PP2Ac) は $\alpha 4$ によって分解から守られ, 適切な量に維持されているが, $\alpha 4$ は PPP4C や PPP6C の安定性にも関わると知られる (Kong, M. *et al.* 2009). また, PP2Ac は, 細胞内では A サブユニットとのヘテロダイマーによるコア酵素か, A サブユニット・B サブユニットとのヘテロトリマーによるホロ酵素として存在するが, PP6 も PPP6C が protein phosphatase 6, regulatory subunit 1 (PPP6R1), PPP6R2, PPP6R3 や ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), ANKRD44, ANKRD52 といった制御分子とのホロ酵素で機能すると提唱されており (Stefansson, B. *et al.* 2008), PP4 も R1 と R2 といった独自の制御分子とコア酵素を作っているため (Cohen, P.T. *et al.* 2005), ホロ酵素形成段階も同じような制御を受けている可能性がある. しかし, 例えば TGF- β activated kinase 1 (TAK1) に対して, 細胞種や刺激の違いで PP6 が制御したり (Kajino, T. *et al.* 2006), PP2A が制御したりと (Kim, S.I. *et al.* 2008), 細胞内ではきちんと使い分けがなされており, PP2A からの類推ではなく, PP4 や PP6 に着目した報告が徐々に増えてくると予想される.

PP6 の触媒サブユニット PPP6C は, 酵母から哺乳類に至るまで広く保存されており, 元々出芽酵母における Sit4 のオルソログだと報告された (Bastians, H. and Ponstingl, H. 1996). Sit4 の欠損によって見られる G1 期から S 期への移行停止がヒトの PPP6C で回復したことから, DNA 損傷時に DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) 活性化や H2A histone family, member X (H2AX) の脱リン酸化を制御することや (Mi, J. *et al.* 2009; Douglas, P. *et al.* 2010; Zhong, J. *et al.* 2011), Aurora A の脱リン酸化によって紡錘体形成の制御に関わること (Zeng, K. *et al.* 2010) など, ヒトにおいても DNA 修復や細胞周期における役割が中心に報告されている. 実際, 10% 前後のメラノーマにおいて, PPP6C に変異が見られることが報告され (Hodis, E. *et al.* 2012; Krauthammer, M. *et al.* 2012), これらの PPP6C 変異体は, 少なくとも Aurora A の過剰リン酸化, 染色体の不安定化などを引き起こすことで, メラノーマ発達のドライバーとなっていると考えられる (Hammond, D. *et al.* 2013; Gold, H.L. *et al.* 2014). DNA 関連以外では, ASK3 と同じ MAP3K の 1 つである TAK1 (別名 MAP3K7) に関する報告 (Kajino, T. *et al.* 2006, Broglie, P. *et al.* 2010) や, Hippo 経路や E-cadherin に関する報告 (Couzens, A.L. *et al.* 2013; Ohama, T. *et al.* 2013), 細胞死に関する報告 (MacKeigan, J. *et al.* 2005; Kajihara, R. *et al.* 2014) など, いくつか散見される. しかし, PPP6C の直接の基質としてデータが示されているのは, 結局 Aurora A (Zeng, K. *et al.* 2010) と H2AX (Zhong, J. *et al.* 2011) ぐらいであり, 今後の更なる検討が期待されている.

5. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)

63 個の候補分子の中で最も影響の強いものとして nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) が得られた. NAD は生体内の酸化還元反応における補酵素として非常に重要な分子である. その生体内の合成方法には, トリプトファンから合成する *de novo* 経路と, NAD の分解産物の nicotinamide (NAM) から再利用するサルベージ経路の 2 つがあるが, 哺乳類では, 肝臓でわずかに *de novo* 経路が使われているだけで, ほとんどはサルベージ経路が使われる. このサルベージ経路は, 酵母や *C. elegans*, *Drosophila* といった無脊椎動物では, NAM \rightarrow nicotinic acid (NA) \rightarrow nicotinic acid

mononucleotide (NaMN) → nicotinic acid adenine dinucleotide (NaAD) → NAD の 4 つの反応を経て合成されるのに対し、脊椎動物では、NAM → nicotinamide mononucleotide (NMN) → NAD の 2 つの反応だけで合成される。脊椎動物にも NA → NaMN → NaAD → NAD という合成経路は存在するが、NAM を NA に変換する nicotinamidase を有しておらず、代わりに NAMPT を有しているため、ニコチンアミド骨格を維持したまま合成してしまう (Revollo, J.R., *et al.* 2004). NMN から NAD へと変換する nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) は、核局在の NMNAT1、ゴルジ体 (細胞質側) 局在の NMNAT2、ミトコンドリア局在の NMNAT3 の 3 種類がヒトにおいて存在するが (Berger, F. *et al.* 2005; Lau, C. *et al.* 2010), サルベージ経路の律速段階は NAMPT の方である (Revollo, J.R., *et al.* 2004).

NAMPT は、元々前駆 B 細胞の成熟を強める推定上のサイトカイン pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF) として同定され (Samal, B., *et al.* 1994), その後、NAD 生合成に関わる NAMPT であることが明らかになった (Rongvaux, A. *et al.* 2002). しかし、その後も好中球のアポトーシスを抑制するサイトカインのような作用を持つという報告がされ (Jia, S.H. *et al.* 2004), さらにインスリンのような作用を持つ新規アディポカイン visfatin であるという報告までされた (Fukuhara, A. *et al.* 2005). このインスリン様作用を持つというのは議論となり、結局再現性の問題で撤回される始末となったが、NAMPT は古典的な ER-ゴルジによる分泌経路に寄らずに分泌され (Tanaka, M. *et al.* 2007), extracellular NAMPT (eNAMPT) として全身での NMN 合成に働くことが明らかになり、最近では、この NMN の作用がインスリン分泌に影響を与えていると考えられている (Revollo, J.R., *et al.* 2007; Yoshino, J. *et al.* 2011).

細胞外だけでなく、intracellular NAMPT (iNAMPT) も重要である。例えば、NAMPT の転写は clock circadian regulator (CLOCK) と brain-muscle Arnt-like protein 1 (BMAL1) の制御を受け、その発現量が 1 日周期で変動し、NAD 量も変動させる。一方、概日リズムに重要な CLOCK のヒストンアセチル化とバランスを取っているヒストンデアセチル化酵素 sirtuin 1 (SIRT1) は、酵素活性に NAD⁺ を必要とすることから、それがフィードバックとなって NAMPT は概日リズムを制御していることが報告された (Nakahara, Y. *et al.* 2009; Ramsey, K.M. *et al.* 2009). また、がん細胞は、増殖率、エネルギーの必要性、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) や sirtuin といった NAD 消費酵素活性が高いため、NAD の要求性が高いことで知られる (Galli, U., *et al.* 2013). そこで、NAMPT 特異的阻害剤 FK866 を抗がん剤として用いる戦略が考えられており、実際に臨床研究中である (von Heideman, A. *et al.* 2010). 他にも NAD は、DNA 修復に重要な poly(ADP-ribose)ylation (PAR 化) や、カルシウムチャネルのアゴニストとして働く adenosine diphosphate ribose (ADPR) や cyclic ADP-ribose (cADPR), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) などの材料でもあり、様々な生理現象に関わるのは想像に難くない。ただ、これだけ幅広い分野で研究されていても、浸透圧ストレスと NAMPT の関連性に関しては、報告がない。

6. 本研究の目的と成果

以上のように、細胞が浸透圧ストレスを認識して ASK3 の活性変化へと至る制御機構は不明であり、高浸透圧ストレスによって定常状態よりも敢えて ASK3 の活性が下がることの生理学的意義も不明であった。そこで、ハイコンテンツゲノムワイド siRNA スクリーニングで得られた、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御候補分子 63 個を基に、詳細な解析を行うことで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御機構と生理学的意義の解明を目指した。その結果、本研究によって、スクリーニングで得られた唯一のプロテインホスファターゼであった PP6 が、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を担う直接のホスファターゼであることが明らかになった。また、スクリーニングで

最も顕著な陽性であった NAMPT は NMN や NAD を介して ASK3 不活性化を亢進していることが明らかになった。そして、高浸透圧ストレスによって ASK3 が不活性化するのは、細胞死を回避し、恒常性を維持するためであることも明らかになった。

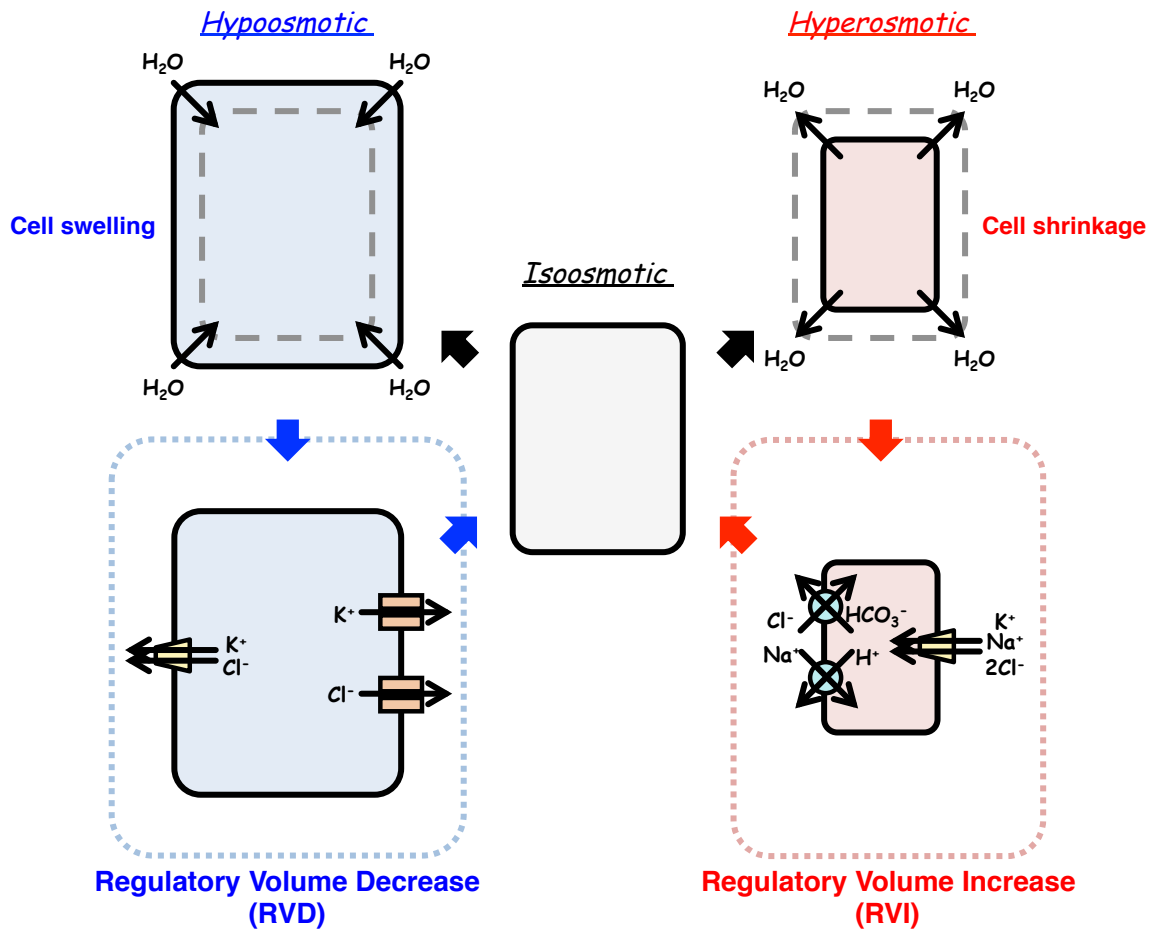


Fig.0-1 浸透圧ストレス後の細胞体積回復機構

浸透圧ストレスによる水の流出入に伴い、細胞体積は強制的に変化させられる。そこで細胞は、イオンの流出入を積極的に変化させることで、細胞内外の浸透圧差を減らし、逆方向の水の流出入を引き起こすことで細胞体積を直ちに回復しようとする機構を有する。この体積回復機構は、低浸透圧ストレス後は regulatory volume decrease (RVD)、高浸透圧ストレス後は regulatory volume increase (RVI)と呼ばれる。

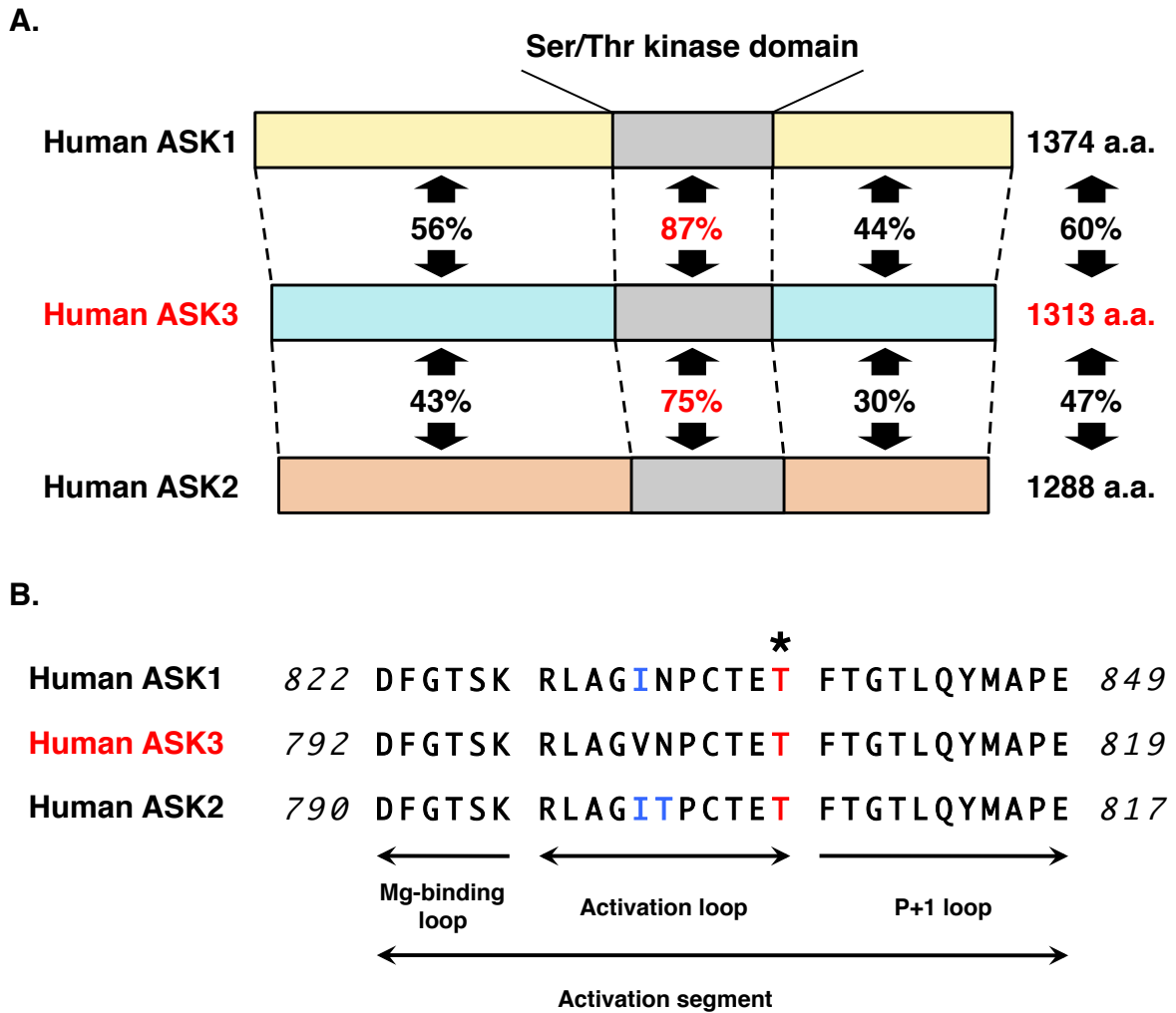


Fig.0-2 Apoptosis signal-regulating kinase (ASK)ファミリー

(A) ASK3 と ASK1, ASK2 とのアミノ酸相同性. ASK3 は ASK1 や ASK2 と高い相同性を有し, 特に ASK1 との相同性が高い. (B) ASK ファミリーの活性ループのアミノ酸配列. ASK3 (ASK1, ASK2) の活性には, 活性ループ中の 2 番目の Thr808 (Thr838, Thr806) のリン酸化が必須であると知られる.

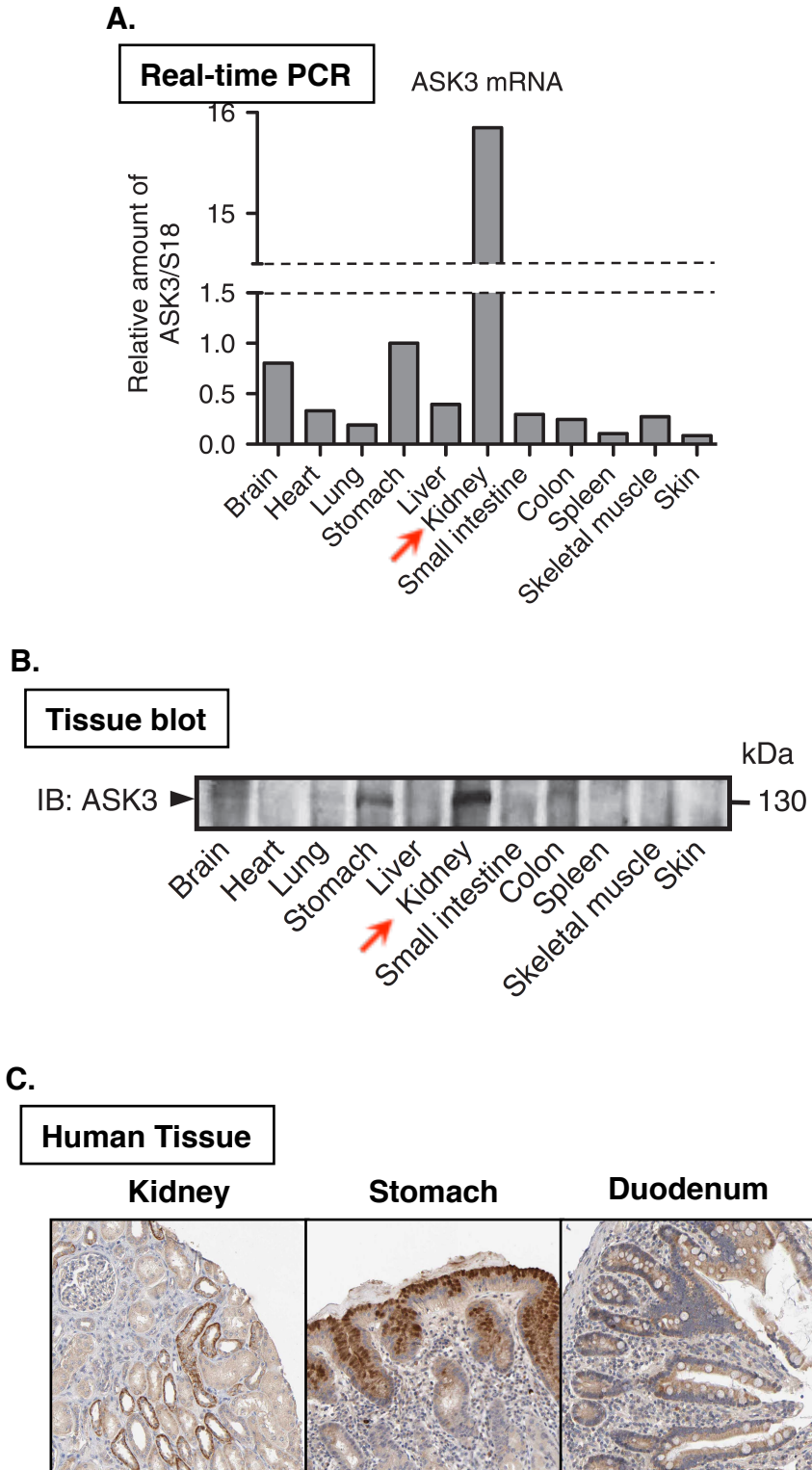


Fig.0-3 ASK3 の発現部位

(A) 各組織における ASK3 の mRNA 量. 特に腎臓に多く発現する. (B) 各組織における ASK3 のタンパク質量. 特に, 腎臓や胃に多く発現する. (C) ヒトの組織免疫染色. 青色はヘマトキシリン染色, 茶色は ASK3 抗体による染色. ASK3 は管腔側に強く発現している. (A & B)は Naguro, I., *et al.* 2012, (C)は Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org)より抜粋.

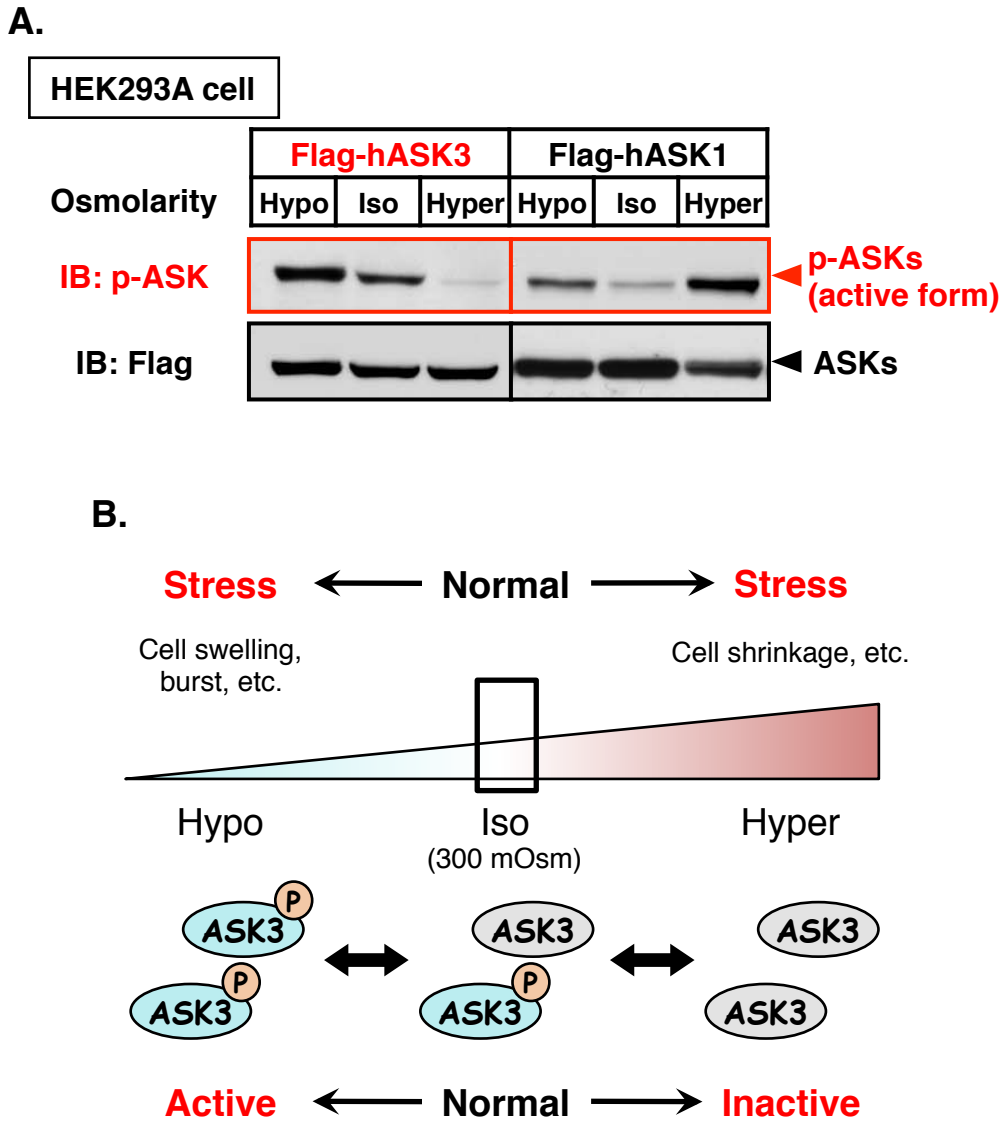


Fig.0-4 浸透圧ストレスと ASK3 活性

(A) ASK3 の活性変化. ASK1・ASK3 を過剰発現した HEK293A 細胞に、各浸透圧刺激を 10 分間行い、ASK1・ASK3 のキナーゼ活性に必須な Thr838・Thr808 のリン酸化検出抗体 p-ASK を用いて、ASK1・ASK3 の活性レベル検出した。ASK3 は、浸透圧ストレスに対して、両方向性に応答する。(B) 浸透圧ストレスと ASK3 活性の概念図。定常状態より高くなっても低くなってもストレスとなる両方向性の浸透圧ストレスに対して、ASK3 は両方向性に応答できる。

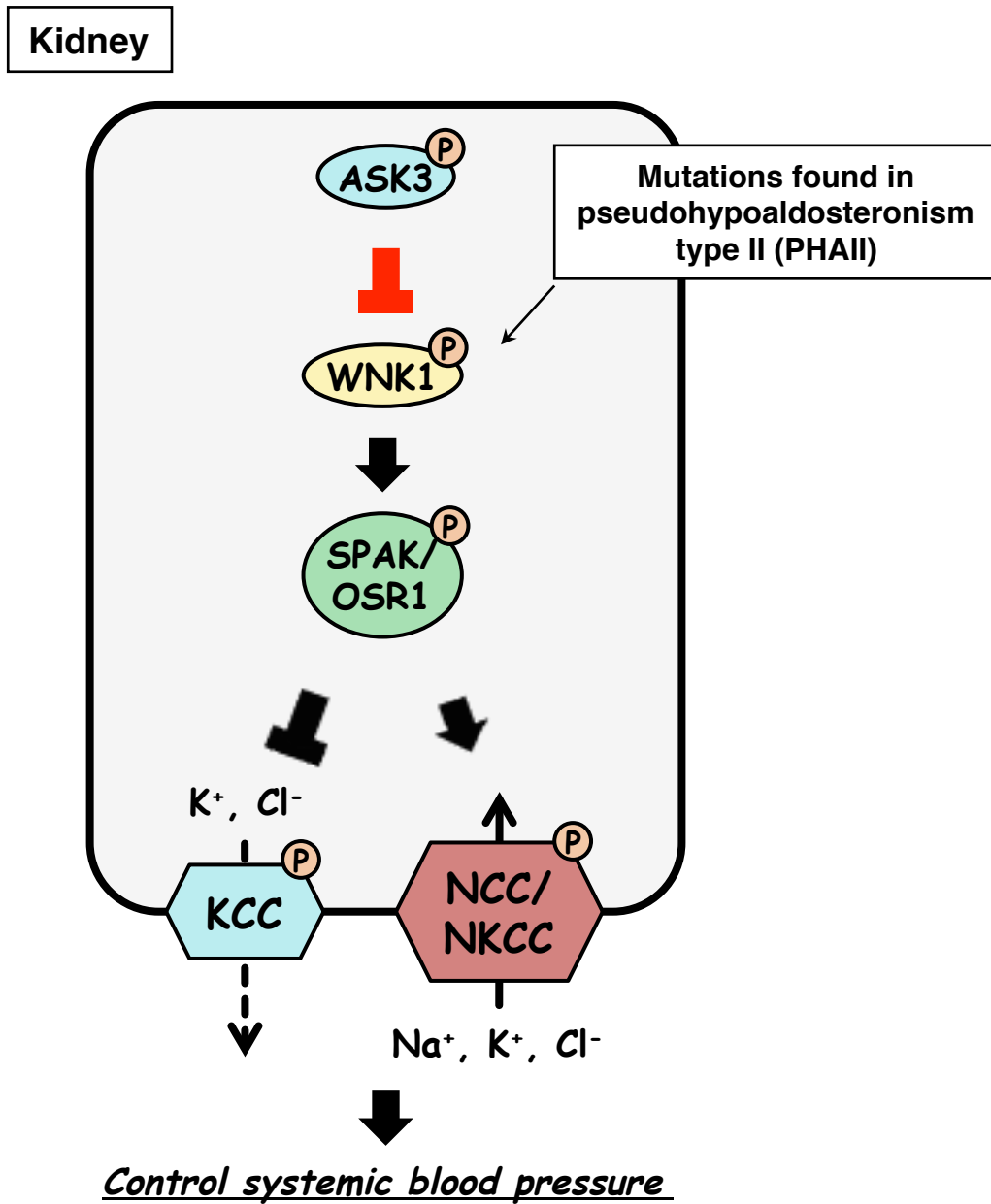


Fig.0-5 ASK3-WNK1-SPAK/OSR1 経路による血圧調節モデル

ASK3 は WNK1-SPAK/OSR1 経路をキナーゼ活性依存的に負に制御し, KCC の不活性化や NCC・NKCC の活性化を介して, 塩の再吸収, つまり水の再吸収を調節することで, 個体の体液量調節に関わると考えられている (Naguro, I. et al. 2012).

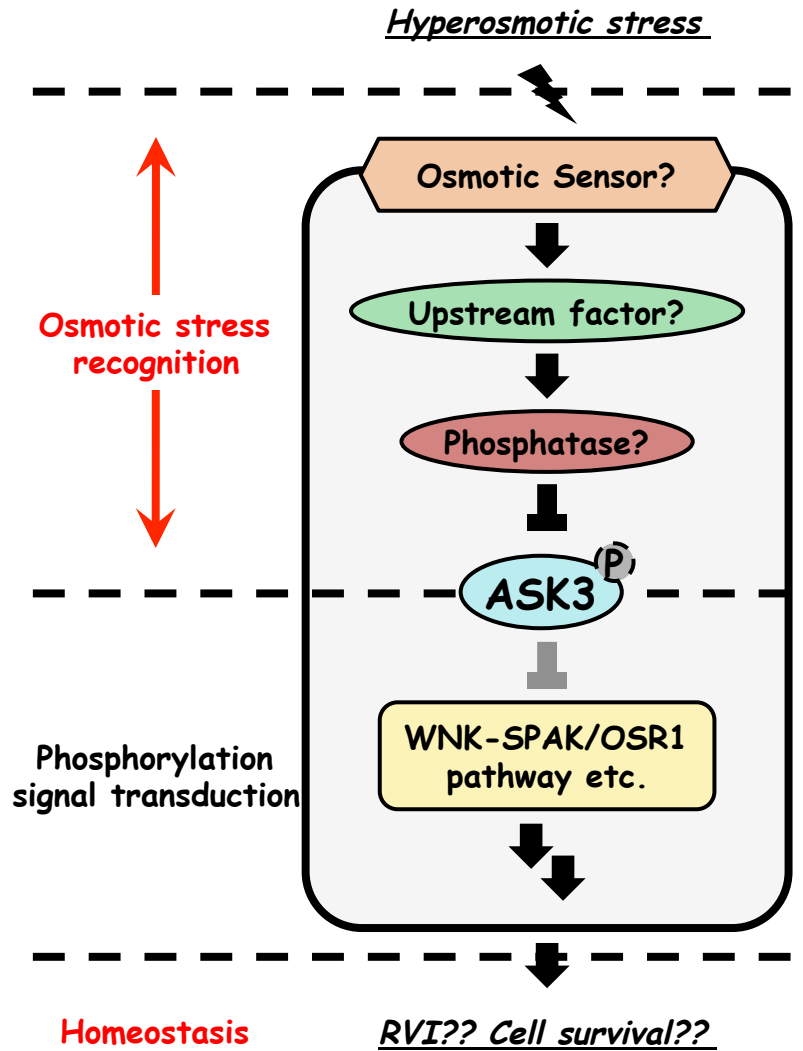


Fig.0-6 本研究の目的

細胞が高浸透圧ストレスを認識し、どのようにして ASK3 を不活性化するのか、ほぼ全くわかっていない。また、高浸透圧ストレスによって、なぜ定常状態よりも敢えて ASK3 活性が下がらなければならないのか、その生理学的意義は明らかになっていない。そこで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御機構と生理学的意義の解明を本研究の目的とした。

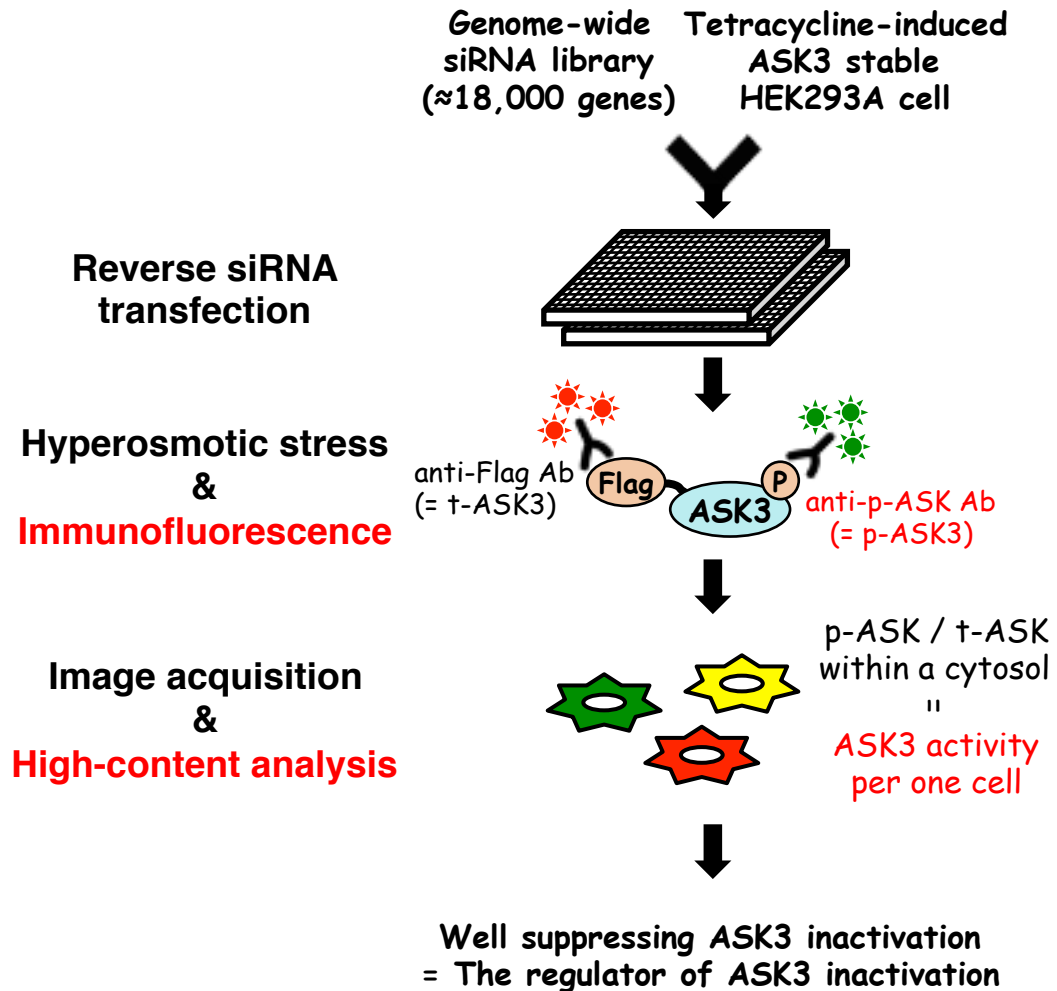


Fig.0-7 ゲノムワイド siRNA スクリーニングのアッセイ系

各 siRNA を 384 ウェルプレート上に予め分注しておき、リバーストランスフェクションによって発現抑制を行い、浸透圧刺激後、抗リン酸化 ASK 抗体による蛍光免疫染色を行って、イメージアナライザーにて画像を取得・解析した。プレート上で ASK3 活性を直接測定することでハイスループットなアッセイが可能となった。

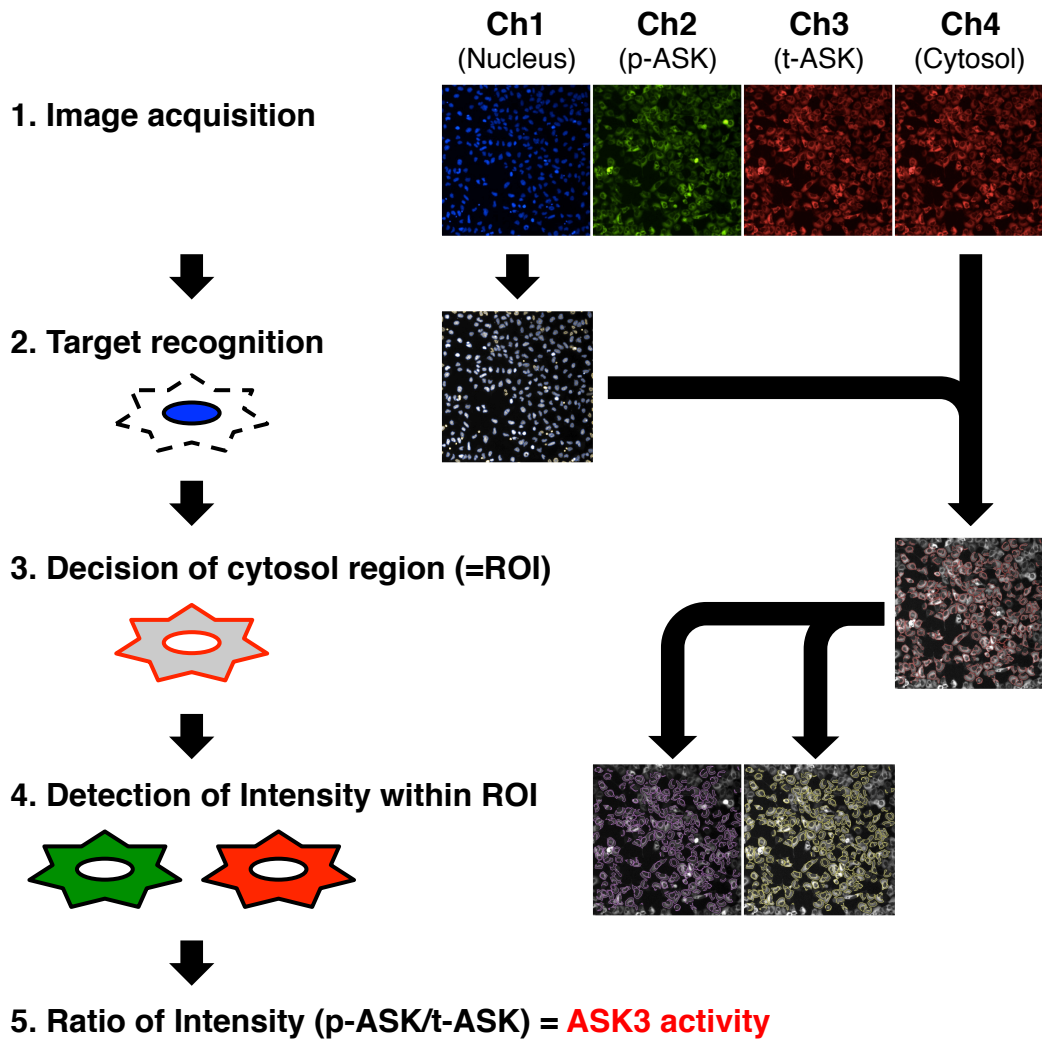
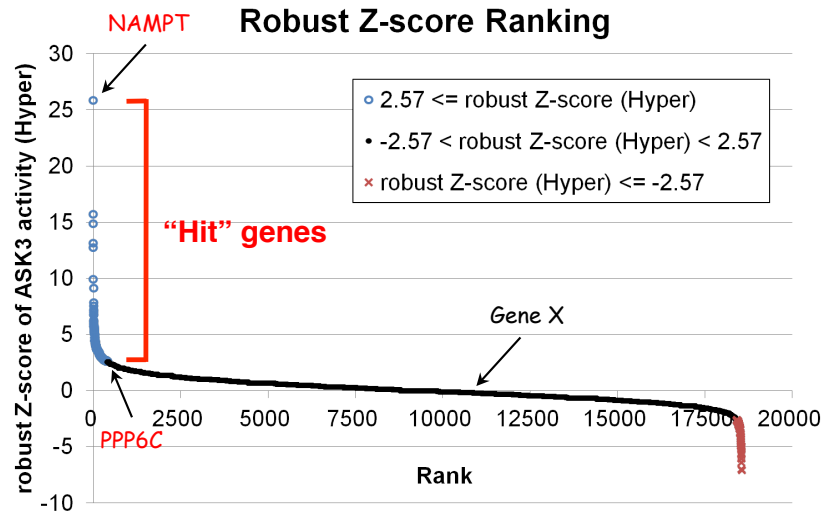


Fig.0-8 ハイコンテンツ解析による ASK3 活性測定アルゴリズム

まず、核・リン酸化 ASK3・トータル ASK3・細胞質の画像を撮影する。次に核の画像を基に、各細胞をターゲットとして認識させる。続いて、細胞質の画像から、各ターゲットの細胞領域 (region of interest; ROI) を決定する。そして、リン酸化 ASK3 とトータルの ASK3 の画像から、ROI 内の蛍光強度を 1 細胞毎に測定する。最終的にその比をとれば、1 細胞当たりの ASK3 活性が測定できたことになる。

A.



$$\text{robust Z - score} \equiv \frac{x - \text{median}}{1.4826 \times \text{MAD}} \quad \text{MAD} \equiv \text{median}_i(|x_i - \text{median}_j(x_j)|)$$

B.

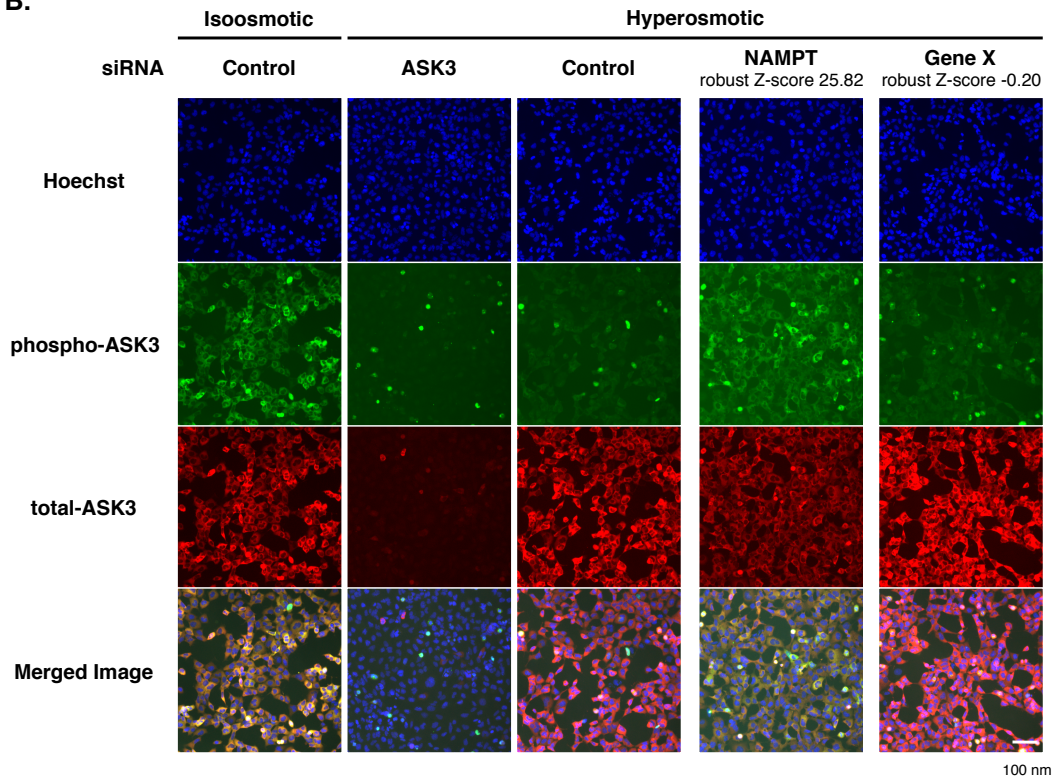


Fig.0-9 ハイコンテンツゲノムワイド siRNA スクリーニングの結果の例

(A) スクリーニングにおける全ウェルの ASK3 活性。プレート間変動を robust-Z score で標準化したケースを示す。Robust-Z score が高い程、ASK3 不活性化の抑制効果大きいことを意味する。(B) 実際の蛍光免疫染色画像の例。Robust-Z score が高い NAMPT は等浸透圧ストレス時に匹敵する程、p-ASK3 の蛍光強度が増強していることが確認できた。修士論文 (渡邊謙吾, 平成 23 年度) より抜粋。

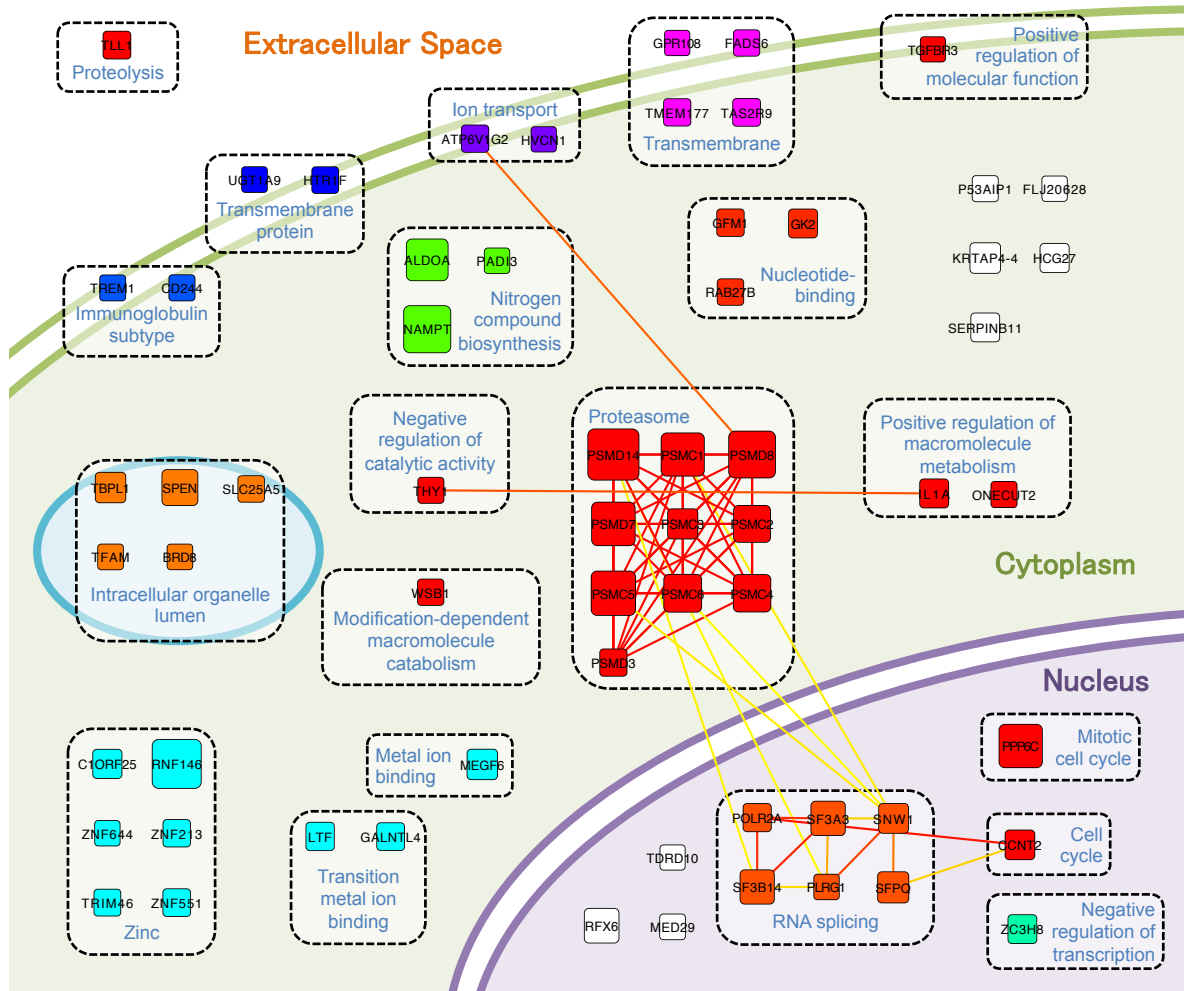


Fig.0-10 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御分子の 63 個の候補遺伝子

二次スクリーニングの結果得られた 63 個の候補遺伝子に対して、オントロジー解析・ネットワーク解析を行ったまとめの例 (Mercer, J. *et al.* 2012). 各 63 候補遺伝子は丸四角で描かれ、その大きさが大きい程、二次スクリーニングで ASK3 不活性化への抑制効果が大きかったことを示す。また、各遺伝子は、DAVID データベースによって最も上位に来たクラスターに割り振っており、細胞内のおおよその位置に配置されている。そして、遺伝子間の線は、STRING データベースにおける関連性を示しており、色が赤色である程、関連性が高いことを示す。ASK3 不活性化は非常に素早い応答であることから、予想通り既存のパスウェイが得られることはなかったが、プロテアソームの 19S 調節ユニットが特異的に得られたことは注目に値し、今後の検討課題の 1 つである。また、転写・翻訳関連だけでなく、細胞膜近傍に存在するような分子も得られており、その後の解析が期待できる候補分子が得られたと考えられる。

方法

1. 細胞培養

HEK293A 細胞, A549 細胞は, 10 v/v% fetal bovine serum (FBS; biowest), 100 units/mL ペニシリン G カリウム (PG; 明治製菓)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) high glucose で, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

HeLa 細胞は, 10 v/v% FBS, 100 units/mL PG を含む DMEM low glucose で, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

テトラサイクリン誘導性 Flag-hASK3 恒常発現 HEK293A 細胞は, 以前当研究室で樹立したものを使用した (梅田剛, 平成 21 年度). 培養には, 10 v/v% FBS, 2.5 μg/mL Blasticidin (Invitrogen), 50 μg/mL Zeocin (Invitrogen)を含む DMEM high glucose で, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。また, 発現誘導は, アッセイに用いる 24 時間前に, 1 μg/mL テトラサイクリンを添加して行った。

2. 遺伝子導入

遺伝子導入用試薬 PEI-MAX (Polysciences)と各細胞の培地と同じ DMEM (PG, FBS 未含有)を用いて, Invitrogen が Lipofectamine 2000 Reagent 用に提供しているプロトコールに従い, トランスフェクション試薬を調製し, 細胞に添加した。発現誘導がかかるまで 24~48 時間培養した。

3. 遺伝子抑制

siRNA の場合は, siRNA 導入用試薬 Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen)と OPTI-MEM (GIBCO)を用いて, Invitrogen が提供しているフォワードトランスフェクションあるいはリバーストランスフェクションのプロトコールに従い, トランスフェクション試薬を調製し, 細胞に添加した。発現抑制がされるまで 48~72 時間培養した。

shRNA の場合は, 過剰発現と同様に, トランスフェクション試薬を細胞に導入し, 48 時間後に 1 μg/mL Puromycin (GIBCO)含有培地へと培地交換して, さらにセレクションのために 72 時間培養した。

4. プラスミド

以下のプラスミドは, 当研究室の plasmid library に存在するものを使用した。

Flag-hASK3: #292 Flag-hASK3 in pcDNA3/GW

HA-hASK3: #298 HA-hASK3 in pcDNA3/GW

GFP-hASK3: #1672 GFP-hASK3 in pcDNA4

Flag-hASK3(T808A): #337 Flag-hASK3(T808A) in pcDNA3/GW

以下のプラスミドは, 山口大学獣医薬理学教室 大浜剛准教授より分与して頂いたプラスミドを鋳型に以下のプライマーを用いて再クローニングし, *EcoRI* と *XhoI* で切断して, 3'-Flag-pcDNA3/GW または 5'-Flag-pcDNA3/GW ヘライゲーションした。また, 配列を CEQ2000 (Beckman Couter)で確認後, 適宜 3'-HA-pcDNA3/GW, 3'-Venus-pcDNA3/GW, 5'-YFP-pcDNA3/GW へ乗せ変えた。

[HA₃-hPPP6C]

大浜剛准教授より分与して頂いたプラスミドをそのまま利用した。

[hPPP6C-Flag, hPPP6C-HA, hPPP6C-Venus]

プライマー1: 5'-GCGAATTCACCGCCATGGCGCCGCTAGACCTG-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGAAGGAAATATGGCGTTGTC-3'

[hPPP6C(D84N)-HA]

プライマー1: 5'-GCGAATTCACCGCCATGGCGCCGCTAGACCTG-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGAAGGAAATATGGCGTTGTC-3'

[Flag-hPPP6R1, YFP-hPPP6R1]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTTTGGAAGTTTGACCTGC-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGCTATTGGGAGCCTGGGGAT-3'

[Flag-hPPP6R2, YFP-hPPP6R2]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTCTGGAAGTTTGACTTGAA-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGTCACACTGGGCCATTTAAGG-3'

[Flag-hPPP6R3, YFP-hPPP6R3]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTTTGGAATTTGATCTTCA-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGTCATACAGGGCCATTCAGT-3'

以下のプラスミドは、HEK293A 細胞の cDNA から、以下のプライマーを用いてクローニングし、5'-Flag-pcDNA3/GW ヘライゲーションした。配列を CEQ2000 で確認後、適宜 5'-HA-pcDNA3/GW、5'-YFP-pcDNA3/GW へ乗せ変えた。

[Flag-hANKRD28, YFP-hANKRD28]

以下のプライマー1 とプライマー2、プライマー3 とプライマー4 でクローニングしたものをそれぞれ *EcoRI* と *BamHI*、*BamHI* と *NotI* で切断して、3点ライゲーションを行った

プライマー1: 5'-CCGAATTCGCGTTCCTCAAACCTCCGTGACC-3'

プライマー2: 5'-ACGGATCCCTGGATTTGCATCG-3'

プライマー3: 5'-CAGGGATCCGTGATAAGCAAGG-3'

プライマー4: 5'-GGGCGGCCGCTCAGTAGGTCTCAGAATCGGAGTC-3'

[Flag-hANKRD44, YFP-hANKRD44]

以下のプライマー1 とプライマー2、プライマー3 とプライマー4 でクローニングしたものをそれぞれ *EcoRI* と *XbaI*、*XbaI* と *XhoI* で切断して、3点ライゲーションを行った

プライマー1: 5'-CCGAATTCGCAGTGCTCAAACCTCACCGACCAG-3'

プライマー2: 5'-ACTCTAGACATAGTGTGGCTTCC-3'

プライマー3: 5'-TGTCTAGAGTTTCTGCTTCAAATG-3'

プライマー4: 5'-GGCTCGAGTCATTCTTCTTTTTGTACAGCGGTTCC-3'

[Flag-hANKRD52, HA-hANKRD52, YFP-hANKRD52]

以下のプライマー1 とプライマー2、プライマー3 とプライマー4 でクローニングしたものをそれぞれ *EcoRI* と *HindIII*、*HindIII* と *XhoI* で切断して、3点ライゲーションを行った

プライマー1: 5'-CCGAATTCGGGATCCTCAGCATCACGGACCAG-3'

プライマー2: 5'-AGAAGCTTACGACAACAGTCAGAG-3'

プライマー3: 5'-CGTAAGCTTCTTTCCTCAGGTCAG-3'

プライマー4: 5'-GGCTCGAGCTACTCAGAGTAGCAGCCATCTAAC-3'

[Flag-hNAMPT]

以下のプライマー1 とプライマー2 でクローニングしたものを *EcoRI* と *XhoI* で切断して、ライゲーションを行った。

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGAATCCTGCGGCAGAAG-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGCTAATGATGTGCTGCTTCCAG-3'

以下のプラスミドは、野生型の Flag-hNAMPT in pcDNA3/GW を鋳型として、QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene)のプロトコルを用いて作製した。使用したプライマーは以下の通りである。

[Flag-hNAMPT(S199D)]

プライマー1: 5'-GGCTACAGAGGAGTCgaTTCCCAAGAGACTGCT-3'

プライマー2: 5'-AGCAGTCTCTTGGGAAtcGACTCCTCTGTAGCC-3'

[Flag-hNAMPT(S200D)]

プライマー1: 5'-TACAGAGGAGTCTCTgaCCAAGAGACTGCTGGC-3'

プライマー2: 5'-GCCAGCAGTCTCTTGGtcAGAGACTCCTCTGTA-3'

以下のプラスミドは、野生型の Flag-hPPP6Rs in pcDNA3/GW を鋳型として、QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene)のプロトコルを用いて作製した。使用したプライマーは以下の通りである。

[Flag-hPPP6R1 ΔC (1-519)]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTTTGGAAGTTTGACCTGC-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGTCACACCATGTTCTTCTTGTGGTC-3'

[Flag-hPPP6R2 ΔC (1-532)]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTCTGGAAGTTTGACTTGAA-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGTCACACAGTGTTCCTGCGGTTTC-3'

[Flag-hPPP6R3 ΔC (1-513)]

プライマー1: 5'-GCGAATTCATGTTTTGAAATTTGATCTTCA-3'

プライマー2: 5'-GCCTCGAGTCATACCGTTCCTTCTTGTAGTTTC-3'

hASK3-tdTomato は当研究室の名黒功講師が作製したものを分与して頂いた。

5. siRNA

用いた Stealth siRNA (Invitrogen)の配列は以下の通りである (sense 配列のみ記載)。

[Control siRNA]

Negative Control Medium GC Duplex #2: 配列非公開

Negative Control Medium GC Duplex #3 (A549 細胞の場合): 配列非公開

[hPPP6C siRNA #1]

#306: GACUACGUUUGUGACCUCCUCUUAG

[hPPP6C siRNA #2]

#675: GCAGCUUUAUAGAUGAGCAGAUUU

[hPPP5C siRNA]

#8415: カタログ#HSS108415

[hNAMPT siRNA #1]

#349: CCACCGACUCCUACAAGGUUACUCA

[hNAMPT siRNA #2]

#1674: GAUCUUCUCCAUACUGUCUUAAGA

[hASK3 siRNA #1]

#2711: GAGAGGGUUCUUAAGGCAGGUGAA

[hASK3 siRNA #2]

#3279: CGGAUUUCAGGAUGCCGUAAAUAAA

[hWnk1 siRNA]

#6103: CAGCUGAGCUCAAAGAGCCUUCCTA

[hPPM1A siRNA]

#8328: GCAUGCAAGGCUGGCGUGUUGAAAU

用いた ON-TARGETplus siRNA (Dharmacon)の配列は以下の通りである (sense 配列のみ記載).

[hNAMPT siRNA #1]

J-004581-05: GGUAAGAAGUUUCCUGUUA

[hNAMPT siRNA #2]

J-004581-06: CAAAUUGGAUUGAGACUUA

[hNAMPT siRNA #3]

J-004581-07: UAACUUAGAUGGUCUGGAA

[hNAMPT siRNA #4]

J-004581-08: CAAGCAAAGUUUAUUCUA

[hRNF146 siRNA #1]

J-007080-05: GGACGUCGCAGGAAGAUUA

[hRNF146 siRNA #2]

J-007080-06: GGAUGUAUCUGCAGUUGUU

[hRNF146 siRNA #3]

J-007080-07: GAUGGACAGUGCACAGUAA

[hRNF146 siRNA #4]

J-007080-08: CCGUAAACCUAGCAAGAGA

6. shRNA

当研究室にて丸山順一博士 (現・東京医科歯科大学病態代謝解析学分野 助教)によって作製された pENTR201-H1MCS に、以下の shRNA 配列を *Clal* と *XhoI* でライゲーションした後、同じく丸山博士によって作製された pSuperior.puro_DEST(w/o H1)に、Gateway cloning technology (Invitrogen) による LR 反応を用いて乗せ変えることで作製した。

[Luciferase shRNA]

top 鎖: cgatGTGtGCTGtTGGTGCCAgCCCgTGTGCTGTCCGGTTGGCACCAGCAGCG
CACttttttC

bottom 鎖: TCGAGaaaaaaGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCGGACAGCACACGGGcTGG
CACCAaCAGCaCACat

[PPP6R1 shRNA #1]: #386

top 鎖: cgatGtATCCTCATtAACCGtAAGAGTGTGCTGTCTCTTGCgGTTGATGAGG
ATGcTttttttC

bottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCATCCTCATCAACCGCAAGAGGACAGCACACTCTTaCG
GTTaATGAGGATaCat

[PPP6R1 shRNA #2]: #1816

top 鎖: cgatGtCAACCTACTTGAGgTATGtGTGTGCTGTCCGCATATCTCAAGTAGG
TTGGcTttttttC

bottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCCAACCTACTTGAGATATGCGGACAGCACACaCATAc
CTCAAGTAGGTTGaCat

[PPP6R2 shRNA #1]: #75

top 鎖: cgatGGAGTTgATGGATGgAGATGgGTGTGCTGTCCTCATCTTCATCCATTA
ACTCCttttttCbottom 鎖: TCGAGaaaaaaGGAGTTAATGGATGAAGATGAGGACAGCACACcCATCTc
CATCCATcAACTCCat

[PPP6R2 shRNA #2]: #1161

top 鎖: cgatGtACTTctAAGTGGAACTgTGGTGTGCTGTCCCATAGTTCCACTTGGGA
AGTGcTTTTttCbottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCACTTCCAAGTGGAACTATGGGACAGCACACCAcAGTT
CCACTTaGAAGTaCat

[PPP6R3 shRNA #1]: #151

top 鎖: cgatGtAGAATGTCTtGAAGATTTgGTGTGCTGTCTAAATCTTCGAGACATT
CTGcTTTTttCbottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCAGAATGTCTCGAAGATTTAGGACAGCACACcAAATC
TTCaAGACATTCTaCat

[PPP6R3 shRNA #2]: #2408

top 鎖: cgatGtCTCACTGTAGgTGCCAAGgGTGTGCTGTCTCTTGGCATCTACAGTG
AGGcTTTTttCbottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCCTCACTGTAGATGCCAAGAGGACAGCACACcCTTGGC
AcCTACAGTGAGaCat

[ANKRD52 shRNA]: #863

top 鎖: cgatGtTTGGAGCTgCTGGTTgATAGTGTGCTGTCTATTAACCAGTAGCTCC
AAGcTTTTttCbottom 鎖: TCGAGaaaaaaGCTTGGAGCTACTGGTTAATAGGACAGCACACTATcAAC
CAGcAGCTCCAAaCat

7. 抗体・試薬

イムノプロットの一次抗体として、抗 Flag 抗体 (1E6; Wako), 抗 HA 抗体 (3F10; Roche), 抗 GFP 抗体 (1E4; MBL), 抗 actin 抗体 (AC40; Sigma), 抗 α -tubulin 抗体 (YL1/2; Santa Cruz), 抗 PPP6C 抗体 (A300-844A; Bethyl Laboratories), 抗 PPP5C 抗体 (611020; BD Transduction Laboratories), 抗 PPM1A 抗体 (p6c7; Santa Cruz), 抗 ANKRD52 抗体 (A302-372A; Bethyl Laboratories), 抗 PBEF 抗体 (A300-372A; Bethyl Laboratories), 抗 WNK1 抗体 (A301-515A; Bethyl Laboratories), 抗 OSR1 抗体 (M01; Abnova), 抗リン酸化 p38 抗体 (Cell Signaling), 抗 p38 抗体 (C-20-G; Santa Cruz), 抗リン酸化 JNK 抗体 (Cell Signaling), 抗リン酸化 Aurora A 抗体 (Thr288; Cell Signaling), 抗 β -catenin 抗体 (610154; BD Transduction Laboratories). 抗 CCNB1 抗体 (GNS1; Santa Cruz). 抗 hASK3 抗体 (hC4-1-1-6; 当研究室作製), 抗リン酸化 SPAK/OSR1 抗体 (p-SPAK/OSR1; 当研究室作製), 抗リン酸化 ASK 抗体 (p-ASK; 当研究室作製)を用いた。

また、イムノプロットの二次抗体としては、HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Cell Signaling), HRP 標識抗 rat IgG 抗体 (Cell Signaling), HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling)を用いた。

プロテアソーム活性阻害剤 MG132 (Enzo Life Science), NAMPT 特異的阻害剤 FK866 (Sigma), NMNATs 阻害剤 Gallotannin (Sigma), HICC 阻害剤 Flufenamate (東京化成), 汎 TRP チャネル阻害剤 SKF96365, イオンキレーター-BAPTA-AM (B035; Dojindo)は、使用する 1,000 倍の濃度に DMSO

(Sigma)で溶解させた。汎プロテインホスファターゼ阻害剤 NaF (Sigma)は、使用する細胞の培地で使用直前に溶解させた。NMN (Sigma), NAD⁺ (Sigma), NADH (Sigma)は、使用する 100 倍の濃度に純粋で溶解した。

8. 浸透圧刺激

培地を等浸透圧バッファー (約 300 mOsm/kg H₂O, pH 7.4; 130 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 20 mM mannitol, 10 mM glucose), 高浸透圧バッファー (約 400 mOsm/kg H₂O, pH 7.4; 130 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 120 mM mannitol, 10 mM glucose), 高浸透圧バッファー (約 500 mOsm/kg H₂O, pH 7.4; 130 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 220 mM mannitol, 10 mM glucose) 低浸透圧バッファー (約 200 mOsm/kg H₂O, pH 7.4; 90 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose) に置換し、常温で 10 min 静置した。また、300 mOsm から 800 mOsm まで 100 mOsm 単位の浸透圧 buffer は、等浸透圧バッファーと高浸透圧バッファー (約 800 mOsm/kg H₂O, pH 7.4; 130 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 520 mM mannitol, 10 mM glucose)の混合比を変えることで作製した。

高浸透圧培地は、DMEM low glucose (PG, FBS なし)に 250 mM NaCl, 500 mM mannitol, 500 mM sorbitol のいずれかを十分に溶解させ、フィルター処理(0.22 μm; Millipore)を行い、それを DMEM low glucose (PG, FBS なし)と混合し、10 v/v% FBS を添加することで、適宜目的の浸透圧に調製した。刺激は、培地交換後に 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

カルシウム・マグネシウムフリーの高浸透圧バッファーは、PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄)に mannitol を加えることで作製した。

Flufenamate や SKF96365 の阻害剤, EDTA や EGTA のイオンキレーターの同時処置は、予め最終濃度になるように各浸透圧バッファーと混合しておき、そのバッファーと置換することで行った。

9. イムノプロット

24 ウェルプレートにおいて、過剰発現した分子を検出する場合は 200 μL/well, 内在性分子を検出する場合は 100 μL/well の IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 w/v% sodium deoxycholate, 1 v/v% Triton-X 100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μg/mL leupeptin; 内在性分子のリン酸化を検出する際には PhosSTOP (Roche), または phosphatase inhibitor cocktail (8 mM NaF, 12 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1.2 mM Na₂MoO₄, 5 μM cantharidin, 2 mM imidazole)を更に添加)に置換し、4°Cで 20 分以上溶解した。この細胞溶解液を回収し、15,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心した後、上清 50 μL を等量の 2×SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 w/v% bromophenol blue, 36 v/v% glycerol, 4 w/v% sodium dodecyl sulfate, 10 mM dithiothreitol)と混合し、98°Cで 3 分間煮沸してサンプル化した。なお、Dharmacon の siRNA を用いる際は、96 ウェルプレートにて IP lysis buffer 60 μL/well で溶解した。

このサンプル化したタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)によって分離し、セミドライ式のプロッターによって BioTrace polyvinylidene difluoride membrane (0.45 μm; Pall)あるいは Fluorotrans W membrane (0.2 μm; Pall)へと転写した。

転写後、メンブレンを 5 w/v% スキムミルク (雪印)を含む TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.05 v/v% Tween 20)に浸し、室温で 2 時間程度ブロッキングした。その後、TBS-T で洗浄し、1st antibody dilution buffer (TBS-T に 5 w/v% bovine serum albumin (BSA; 岩井化学)と 0.1

w/v% NaN_3 を添加)で希釈した一次抗体と 4℃で一晩以上反応させた。その後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、5 w/v% スキムミルクを含む TBS-T で希釈した二次抗体と常温で 1 時間反応させた。そして、TBS-T で 1 時間洗浄して、enhanced chemiluminescence (ECL) システム (GE Healthcare) を用いて検出した。

10. 免疫沈降法

12 ウェルプレートにおいて、IP lysis buffer 400 $\mu\text{L}/\text{well}$ で細胞溶解・遠心後、上清に抗 Flag 抗体ビーズ (anti-DYKDDDDK tag antibody beads; Wako) を加え、30~120 分間 4℃で反応させた。その後、ビーズを Washing buffer for IP 1 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 w/v% sodium deoxycholate, 1 v/v% Triton-X 100, 0.2 w/v% sodium dodecyl sulfate) で 2 回洗浄後、IP lysis buffer でさらに 1 回洗浄して、最終的に 2×SDS sample buffer を加えてサンプル化した。

11. *In vitro* ホスファターゼアッセイ

PP6 の精製は、まず、10 cm dish 2 枚分の細胞を PP6 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 v/v% Triton-X 100, 1 mM DTT, 500 μM MnCl_2 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin) 1 mL で溶解し、scrape して回収後、遠心の上清に抗 Flag 抗体ビーズ (M2-agarose affinity gel; Sigma) を加え、180 分間 4℃で反応させた。その後、ビーズを PP6 lysis buffer で 3 回洗浄後、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1xFlag peptide (F3290; Sigma) in PP6 lysis buffer で PP6 を溶出させた。

ASK3 の精製は、細胞溶解前に 50 mM NaF を 37℃, 5% CO_2 条件で 30 分間前処置しておき、10 cm dish 1 枚分の細胞を PP6 substrate lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 v/v% Triton-X 100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, phosphatase inhibitor cocktail) 1 mL で溶解し、scrape して回収後、遠心の上清に抗 HA 抗体 (12CA5; Roche) を加え、60 分間 4℃で反応させた。そして、ProG ビーズ (Protein G Sepharose 4 Fast Flow; Amersham Biosciences) を加え、さらに 120 分間 4℃で反応後、ビーズを PP6 lysis buffer で 3 回洗浄した。

リン酸化ペプチドを基質として反応させる場合、Ser/Thr phosphatase assay system (Promega) を使用した。具体的には、まず、精製した PP6 とリン酸化ペプチド RRA(pT)VA を混ぜ、30℃で軽く震盪させながら反応させた。15 分後、モリブデン酸溶液を加えて反応を止め、リンモリブデン酸発色に由来する 650 nm の吸光度を測定することで、検量線から遊離したリン酸量を測定した。

ASK3 を基質として反応させる場合、精製した PP6 と精製した ASK3 ビーズを混ぜ、30℃で軽く震盪させながら反応させ、2 時間後、2×SDS sample buffer (dithiothreitol は 20 mM に増加) を添加してサンプル化した。

12. NAD 量測定

Amplite Fluorimetric NAD/NADH assay kit (AAT Bioquest) を使用した。具体的には、IP lysis buffer によって細胞溶解・遠心後、上清と Amplite Fluorimetric NAD/NADH assay kit の反応液を混ぜ、遮光室温で 15 分反応後、蛍光プレートリーダー (infinite M200 Pro; Tecan) を用いて Ex: 540 nm, Em: 590 nm で蛍光を 15 分毎に 2 時間経時測定した。そして、検量線とサンプルの蛍光強度を用いて、サンプルの NAD^+ +NADH の濃度を算出した。

13. PI 染色による細胞死アッセイ

まず、24 ウェルプレートに播種した HeLa 細胞に各 siRNA (30 nM) をフォワードトランスフェクシ

ョンにて導入した。24 時間後、トリプシン処理により細胞を浮遊させ、96 ウェルプレートに 2,500 cells/well で播種し直した。さらに 24 時間後、等浸透圧培地・高浸透圧培地に交換することで浸透圧ストレスを開始した。そして、48 時間後、1/1k Hoechst33342 (Dojindo)と 1/1k propidium iodide (PI; Dojindo)含有培地に交換し、37°C, 5% CO₂条件で 30 分間染色した。最終的に、PBS に置換してイメージアナライザー (Cellomics ArrayScan VTI; Thermo Scientific)で画像を取得した。

取得した画像へのハイコンテンツ解析には、Cell Health Profiling を用いた。具体的には Hoechst 33342 のシグナルから細胞を規定し、細胞毎に PI のシグナルを割り当てた。つまり、Hoechst33342 陽性で全細胞数を算出し、その中で PI 陽性であるターゲットを死細胞として測定したことになる。そして、Cell Death を $[\text{PI 陽性細胞数}] / [\text{Hoechst33342 陽性細胞数}]$ で定義し、Number of cells は $[\text{サンプルの全細胞数}] / [\text{siRNA 未導入の等浸透圧培養サンプル群の全細胞数}]$ で表した。

14. 細胞周期同調

シングルチミジンブロック法を用いて S 期同調した。具体的には、テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞に各 siRNA をフォワードトランスフェクションし、12 時間後に 2 mM thymidine (Sigma)を加え、24 時間以上培養させることで S 期同調させた。チミジン除去は、各タイムコースでチミジンを含まない培地に交換することで行った、

15. ライブセルイメージング

1 w/v% gelatin (ナカライテスク) in PBS でコートした 35 mm ガラスボトムディッシュ (松波)に、HEK293A 細胞を播種し、適宜遺伝子導入を行った。実験では、等浸透圧バッファー 2 mL に置換して室温 10 分間以上経ってから、タイムラプスをスタートさせた。等浸透圧状態の画像を数枚取得後、1 mL 抜き取り、2 倍の濃度の高浸透圧バッファー 1 mL を添加することで高浸透圧ストレスをかけ、引き続き撮影させた。

観察には、共焦点蛍光顕微鏡 (LSM510 META; Carl Zeiss)を用い、Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC の対物レンズを使用した。また、Venus/YFP, tdTomato はそれぞれ Argon/2 レーザー (488 nm), HeNe1 レーザー (543 nm)で励起し、505-530 nm, 560-610 nm の検出域で蛍光を検出した。

16. 細胞活性測定

まず、24 ウェルプレートに播種した HeLa 細胞に各 siRNA (30 nM)をフォワードトランスフェクションにて導入した。24 時間後、トリプシン処理により細胞を浮遊させ、96 ウェルプレートに 2,500 cells/well で播種し直した。さらに 24 時間後、等浸透圧培地・高浸透圧培地に交換することで浸透圧ストレスを開始した。そして 48 時間後、5 w/w% Cell counting kit 8 (Dojindo) in 培地 50 uL/well に置換して、37°C, 5% CO₂条件で培養し、2 時間後の 450 nm の吸光度を測定した (実際には 1 時間後から 1 時間毎に推移を経時測定した)。Cell viability は $[\text{サンプルの吸光度}] / [\text{siRNA 未導入の等浸透圧サンプル群の吸光度}]$ で定義した。

17. スクリーニングにおける ASK3 活性のヒートマップ

作製にはオープンソースの Cytoscape を用いた。まず、酵素反応のネットワークを描き、スクリーニングの結果を読み込ませ、適宜配色・レイアウトを変更することで作製した。

18. 統計処理

データは MEANS ± S.E.M. で示した。検定には統計ソフト R を使用し、説明文に示した検定を行った。

結果

1. PPP6C は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御に必要である

高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は、数分という非常に素早い応答であり、自然に起きる加水分解ではなく、積極的に脱リン酸化する機構が存在すると推察される (Naguro, I. *et al.* 2012). 一方、ASK1 の活性制御機構において、リン酸化修飾のみならず、ユビキチン-プロテアソーム系による制御も関わっていることを踏まえれば (Nagai, H. *et al.* 2009; Maruyama, T. *et al.* 2014), 確かに高浸透圧ストレスによって活性化型の ASK3 の量を積極的に分解しているような可能性も考えられる。しかし、プロテアソーム活性阻害剤である MG132 処置によっても、高浸透圧ストレス依存的に ASK3 の量が増えたり、不活性化が抑制したりすることはなかった (Fig.01). ここで、汎プロテインホスファターゼ阻害剤である NaF 処置では、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が確認されたことから (梅田剛, 平成 21 年度), 高浸透圧ストレス時に ASK3 はプロテインホスファターゼによって脱リン酸化されることが強く示唆されていた。

一方、ハイコンテントゲノムワイド siRNA スクリーニングで得られた 63 個の候補分子を調べてみると、プロテインホスファターゼとして報告があるのは PP6 の触媒サブユニット PPP6C のみであった (Fig.0-10). そこでまず、PP6 の高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化への関与について検討することにした。

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、PPP6C を発現抑制すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が確認できた (Fig.02). この時、ASK1 のプロテインホスファターゼとして知られる PPP5C の発現抑制では (Morita, K. *et al.* 2001), ASK3 不活性化の抑制が見られなかったことから、ASK3 不活性化への関与は PP6 特異的であると考えられた。

続いて、HeLa 細胞において、内在性の ASK に対する影響を確認したところ、PPP6C の発現抑制によって、内在性の ASK 活性が上昇した (Fig.03). これは、HeLa 細胞に限らず、HEK293A 細胞や A549 細胞においても同様に見られた (Sup.Fig.01). ここで、ASK3 はキナーゼ活性依存的に WNK1-SPAK/OSR1 経路を負に制御しているため (Naguro, I. *et al.* 2012), 高浸透圧ストレス下でも ASK3 活性が維持された場合、高浸透圧ストレスによる WNK1-SPAK/OSR1 経路の活性化が抑制されると想定されるが、確かに PPP6C の発現抑制によって OSR1 活性化の抑制まで確認された (Fig.03; Sup.Fig.01). この PPP6C 発現抑制による OSR1 活性化の抑制は、ASK3 をさらに発現抑制すると、ASK3 単独の発現抑制同様、逆に OSR1 活性化が亢進することから、確かに ASK3 を介していることが示唆される (Fig.04). また、高浸透圧ストレスによる p38 の活性化は Rac-MEKK3-MKK3 を介すると知られているが (Uhlík, M.T. *et al.* 2003), ASK3 は MAP3K であるため、PPP6C の発現抑制は ASK3 活性の上昇を介して p38 の過剰活性化を引き起こすことも確認された。

以上より、PPP6C は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御に必要であることが示された。

2. PP6 は ASK3 を不活性化する

続いて逆に、PPP6C の過剰発現が高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進できるか検討した。しかし、PPP6C の単独過剰発現では、細胞毒性が生じ始める程 PPP6C を発現させても ASK3 を不活性化できなかった (Sup.Fig.02). ここで PPP6C は、PPP6R1/2/3 や ANKRD28/44/52 といった制御分子とヘテロ複合体を形成することでホロ酵素となっていることが提唱されている (Stefansson, B. *et al.* 2008). そこで、PPP6C と PPP6R3 による PP6 コア酵素を過剰発現したところ、PP6 コア酵素は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進した (Fig.05). ここで、PPP6R3 の単独過剰発

現でも ASK3 不活性化の亢進はわずかに見られたが、単独過剰発現では ASK3 を不活性化しなかった PPP6C との共発現の方が不活性化亢進は顕著であったことから、内在性の PPP6C とコア酵素を形成した影響だと推察される。また、PPP6C の不活性化型変異体として知られる D84N の過剰発現では (Kajino, T. *et al.* 2006), 逆に高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が抑制された。これは、内在性の PP6 と競合して、ドミナントネガティブ効果が現れたものだと考えられる。よって、PP6 コア酵素は ASK3 を不活性化することが示された。

3. PP6 は ASK3 の直接のプロテインホスファターゼである

さらに、PP6 はセリン/スレオニンホスファターゼに分類されるため、ASK3 の活性に必須な Thr808 のリン酸化を直接脱リン酸化する可能性を検討した。HEK293A 細胞に PP6 あるいは ASK3 を過剰発現し、免疫沈降法によってそれぞれ精製した後に混ぜて *in vitro* で反応させたところ、不活性化型変異体 D84N の PP6 では脱リン酸化せず、野生型の PP6 においてのみ ASK3 の脱リン酸化が見られた (Fig.06)。以上より、PP6 は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の直接のプロテインホスファターゼであると考えられた。

4. 高浸透圧ストレスによって PP6 の脱リン酸化能や ASK3 の被脱リン酸化は増加しない

次に、PP6 はどのように高浸透圧ストレス後に ASK3 不活性化を亢進させているのかという疑問が生じる。高浸透圧ストレスによって PPP6C 量の顕著な増加は見られないこと (Fig.03; Sup.Fig.01), 高浸透圧による ASK3 不活性化にはプロテアソーム活性が必要ないことから (Fig.01), 高浸透圧ストレスによって PP6 の絶対量が急激に増加することで ASK3 不活性化を亢進させている可能性は低いと推察される。そこで、高浸透圧ストレスによって PP6 のホスファターゼ活性が増加する可能性を検討したところ、高浸透圧ストレス後に精製した PP6 と等浸透圧状態で精製した PP6 は、リン酸化スレオニンペプチドに対する脱リン酸化能が同程度であった (Sup.Fig.03)。これは、基質を ASK3 に変えても同じであった (Fig.07)。さらにこの時、PP6 側ではなく、ASK3 側の被脱リン酸化能が高浸透圧ストレスによって増加する可能性についても検討したが、高浸透圧ストレス後に精製した ASK3 と等浸透圧状態で精製した ASK3 は、PP6 によって同程度脱リン酸化された。

5. 高浸透圧ストレスの強度依存的に ASK3 と PP6 の結合が増加する

そこで今度は、高浸透圧ストレスによって ASK3 と PP6 の結合が増加する可能性を検討した。HEK293A 細胞に PP6 コア酵素 (PPP6C + PPP6R3) と ASK3 を共発現し、ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量を確認したところ、高浸透圧ストレスの強度依存的に、共免疫沈降される PP6 コア酵素の量が増加した (Fig.08)。この時、ASK3 と PP6 の結合は ASK3 の活性と完全に逆相関していた。また、高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合増加の時間推移を確認したところ、高浸透圧ストレスから数分で、ASK3 と PP6 コア酵素の結合の増加が見られ、5 分後以降にはほぼ一定となった (Fig.09)。ここでも、ASK3 と PP6 の結合は、ASK3 の不活性化とほぼ同じタイムコースで逆相関するように推移していた。以上より、PP6 は高浸透圧ストレス後に ASK3 との結合を増加させることで、ASK3 不活性化を亢進している可能性が示唆された。

6. NAMPT は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御に必要である

一方、予想外なことに、スクリーニングにおいて最も顕著な陽性分子は、直接のプロテインホスファターゼである PP6 ではなく、NAMPT であった (Fig.0-09)。NAMPT は、NAD 合成経路の律速段階の反応を触媒する酵素であるが (Revollo, J.R. *et al.* 2004), NAMPT・NAD と高浸透圧ストレス・ASK

との関連性については全く知られていない。そこで、ASK3 不活性化制御機構の全貌を解明すべく、NAMPT の高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化への関与についても検討することにした。

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、NAMPT を発現抑制すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が確認できた (Fig.10)。ここで、各 siRNA による NAMPT の発現抑制効率と ASK3 不活性化抑制効率が理想通り相関している点は言及に値する。

また、HEK293A 細胞において、内在性の ASK に対する影響も確認したところ、NAMPT の発現抑制によって、内在性の ASK 活性が上昇した (Fig.11)。そして、PPP6C の時と同様に、NAMPT の発現抑制で OSR1 の活性化の抑制も確認された。これら NAMPT 発現抑制の内在性 ASK への影響は、A549 細胞においても同様に見られたが (Sup.Fig.04)、HeLa 細胞ではあまり見られず (Data not shown)、細胞種に依存する可能性が示唆された。

7. NAMPT は、酵素活性依存的に、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進させる

続いて逆に、NAMPT の過剰発現が高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進できるか検討したところ、NAMPT との共発現によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の亢進が見られた (Fig.12)。また、NAMPT は二量体化することで酵素活性を有することが知られているが (Revollo, J.R. *et al.* 2007b)、二量体化の部分抑制変異体である S199D の過剰発現では ASK3 不活性化亢進の程度は野生型よりも弱くなった。そして、二量体化の完全抑制変異体である S200D の過剰発現では ASK3 不活性化の亢進は見られなかった。よって、NAMPT は、酵素活性依存的に、高浸透圧 ASK3 不活性化を亢進させることが示唆された。

NAMPT 特異的阻害剤として FK866 が広く用いられているため (Hasmann, M. and Schemainda, I. 2003)、この酵素活性の必要性についても確認した。FK866 を 3 時間以上前処置すると、NAMPT の発現抑制と同様に、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が確認された (Fig.13)。また、内在性の ASK に対する影響も、NAMPT の発現抑制と同様に、FK866 の前処置は ASK 活性を上昇させ、OSR1 活性化を抑制した (Fig.14)。

以上より、NAMPT は、酵素活性依存的に、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を正に制御していることが示された。

8. NAMPT の量変化は細胞内 NAD 量と正に相関する

それでは、NAMPT はどのように高浸透圧ストレス後に ASK3 不活性化を亢進させているのかという疑問が続いて生じる。ここで、細胞膜を透過可能な構造にも関わらず、FK866 による ASK3 不活性化の抑制には比較的長時間の前処置が必要であった (Fig.13)。つまり、高浸透圧ストレスによって NAMPT の活性が上昇することで ASK3 不活性化を亢進している可能性は低いと推察される。むしろ、この処置時間は、細胞内 NAD 量に影響を与えるタイムコースとほぼ一致する (Hasmann, M. and Schemainda, I. 2003; Pittelli, M. *et al.* 2010)。また、通常、過剰発現によって下流の分子への影響が検出できるのは、直接作用する分子か、シグナル伝達経路上のボトルネックとなっている分子に限られるが、NAMPT の過剰発現では ASK3 不活性化の亢進が検出できた (Fig.12)。そして、現在までに NAMPT の脱リン酸化能は疎か、ASK3 との結合は確認されておらず、NAMPT が ASK3 不活性化に直接作用する可能性は低いと想定される。よって、NAMPT が NAD 合成経路の律速反応を担う酵素であることも踏まえると、NAMPT の量変化によって NAD 量が変化し、ASK3 不活性化に関与している可能性が高いと予想された。

そこでまず、NAMPT の量変化によって、実際に NAD 量が変化しているか確認したところ、NAMPT の発現抑制によって NAD ($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$) 量の減少が確認された (Fig.15A & B)。また逆に、NAMPT

の過剰発現によって NAD 量の増加が確認され (Fig.15C & D), 確かに NAMPT の量変化は NAD 量を正に変化させることが確認された。

9. NAD が高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に必要である

続いて実際に、直接の NAMPT 反応産物である NMN の高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化への必要性について検討した。FK866 によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたところで、さらに NMN を添加すると、その抑制が解除された (Fig.16)。この時、NMN 単独添加により、NAMPT の過剰発現同様、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の亢進まで確認された。よって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御において、NAMPT の酵素活性は NMN 生成のために必要であったことが示された。

NAD 合成経路において、NMN は NMNAT により NAD へと変換される。この NMNAT には、核局在の NMNAT1、ゴルジ体 (細胞質側)局在の NMNAT2、ミトコンドリア局在の NMNAT3 の 3 種類がヒトにおいて存在するが (Berger, F. *et al.* 2005; Lau, C. *et al.* 2010), 全ての NMNATs の阻害剤として Gallotannin が知られている、そこで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、NMNATs 活性の必要性について検討した。Gallotannin の *in vitro* での NMNAT1/2/3 に対する IC₅₀ はそれぞれ 10/55/2 μM であるが (Berger, F. *et al.* 2005), 100 μM の Gallotannin によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が抑制された (Fig.17)。つまり、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御において、NMN は続く NMNATs の酵素反応のために必要であったことが示唆された。

そして、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、最終産物である NAD の必要性について検討した。FK866 によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたところで、さらに NAD⁺ を添加すると、NMN と同様にその抑制が解除された (Fig.18)。この時、NAD⁺ 単独添加でも、やはり NMN と同様に、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進した。ここで、NAD⁺ は酸化還元電位に従って一定の NAD⁺/NADH 比をとるが、1 mM の NAD⁺ 添加が細胞外・細胞内の酸化還元状態を変える程影響を与えるとは想定し難い。しかし、NAD⁺ が還元剤として働くこと、酸化ストレスが ASK1 の代表的な活性因子であることを踏まえると (Saitoh, M. *et al.* 1998), NAD⁺ 添加は定常状態における ROS を除去することで ASK3 活性を下げた可能性も想定できる。そのため逆に、酸化剤として働く NADH を添加したが、NMN, NAD⁺ と同様の結果が得られたことから (Fig.18), 酸化還元による作用を見ていた可能性は低いと考えられる。なお、既存の報告では細胞外に NMN や NAD を添加する際、100 μM で用いられることが多いが (Revello, J.R. *et al.* 2007b; Billington, R.A. *et al.* 2008; Yoshino, J. *et al.* 2011), HEK293 細胞における NAD 濃度は 365 μM 程度であると見積もられていることから (Yang, H. *et al.* 2007), 生理条件からかけ離れている訳ではない。

以上より、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化における NAMPT の作用は NAD を介していることが示された。

10. 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、NAMPT は PP6 の上流に位置する

ここまでで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御において、NAMPT と PP6 の関与が明らかになったため、この 2 分子の関係性について検討した。PPP6C の単独発現抑制よりも NAMPT の単独発現抑制の方が、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制効果は強かった (Fig.19)。これは、スクリーニングと一致する結果である。そして、NAMPT と PPP6C の共発現抑制では、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の更なる抑制効果は見られず、NAMPT の単独発現抑制の場合と同程度であった。これは、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、NAMPT と PP6 が独立している可能性は低いことを示唆し、PP6 が ASK3 の直接のプロテインホスファターゼであったことを踏まえ

ると、NAMPT が PP6 の上流に位置することを示唆する。

ただ、PPP6C の発現抑制効果が悪いという可能性を考慮すると、PP6の方が NAMPT よりも上流である仮説も考えられる。そこで、NAMPT・PP6 の発現抑制と過剰発現を組み合わせ、別の角度からも検討した。PP6の方が NAMPT よりも上流である仮説は、Fig.19の結果より、PP6 から NAMPT 経路以外の経路は存在しないケースにしか成り立たない。つまり、NAMPT を発現抑制した状態で、PP6 を過剰発現しても ASK3 不活性化には影響を与えることができないことになる。しかし、NAMPT の発現抑制による ASK3 不活性化の抑制は、PP6 の過剰発現によって減弱した (Fig.20; 右 4 レーン参照)。よって、NAMPT が PP6 の上流に位置すると考えられる。また、PPP6C の発現抑制による ASK3 不活性化の抑制も、NAMPT の過剰発現によって減弱した (Fig.20; 左 4 レーン参照)。これは、NAMPT は PP6 経路以外の経路でも ASK3 不活性化に関与していることを示唆する。

11. NAMPT は高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合増加に正に作用する

さらに、PP6 は高浸透圧ストレス後に ASK3 との結合を増加させることで、ASK3 不活性化を亢進している可能性が示唆されたため、PP6 よりも上流で働く NAMPT は、結合にも影響を与えるか確認した。NAMPT 特異的阻害剤 FK866 によって、ASK3 と PP6 コア酵素の結合がわずかに減少した (Fig.21)。この時、FK866 によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制も確認された。逆に、NAMPT の直接の反応産物 NMN、続く反応で生じる NAD^+ 、 NADH を添加すると、高浸透圧ストレス時の ASK3 と PP6 の結合がわずかに増加した (Fig.22)。この時、 $\text{NMN} \cdot \text{NAD}^+ \cdot \text{NADH}$ によって ASK3 の活性は減少していた。よって、NAMPT は NAD を介して高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合増加に正に作用することが示唆された。

なお、念のため、NAMPT が PP6 の脱リン酸化能や ASK3 の被脱リン酸化能を増加させている可能性を検討したが、FK866 処置後に精製した PP6 と未処置で精製した PP6 は、ASK3 に対する脱リン酸化能が同程度であった (Sup.Fig.05)。また、FK866 処置後に精製した ASK3 と未処置で精製した ASK3 も、PP6 によって同程度脱リン酸化された。従って、PP6 の脱リン酸化能や ASK3 の被脱リン酸化能の増加ではなく、PP6 と ASK3 の結合の増加によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は達成されている可能性が支持される。

12. 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制は、細胞死を引き起こす

ここまで高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御機構について解析してきたが、そもそも定常状態よりも敢えて ASK3 活性が下がることの生理学的意義は未解明であった。これは、高浸透圧ストレス下においても ASK3 の活性を高い状態に維持する手段がなかったためである。実際、ASK3 のキナーゼ活性に必須なリン酸化部位は Thr808 や Thr812 であるため (Tobiume, K. *et al.* 2002; Naguro, I. *et al.* 2012)、アスパラギン酸・グルタミン酸に置換した変異体を全通り作製したが、ASK3 の恒常活性変異体は得られなかった (Data not shown)。しかし、本研究によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を担う上流分子が得られたため、これらの分子を発現抑制することで、高浸透圧ストレスにおいても ASK3 の活性を高い状態にすることが可能となった。そこで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の生理学的意義について検討することにした。

高浸透圧ストレスによる ASK3 の不活性化は、数分という非常に早い応答であることから (Naguro, I. *et al.* 2012)、高浸透圧ストレスに対する細胞応答の中でも、早い現象に重要であると推測される。細胞は、高浸透圧ストレスにさらされると強制的に収縮してしまうが、すぐに体積を回復しようとする (Burg, M.B. *et al.* 2007; Hoffmann, E.K. *et al.* 2009)。この機構は RVI と呼ばれ、主に NHEs や NKCCs によって NaCl を細胞内に取り込むことで達成される。ここで NKCC1 は、HeLa 細胞において

WNK1-OSR1 経路によるリン酸化で制御される (Moriguchi, T. *et al.* 2005; Anselmo, A.N. *et al.* 2006). よって, WNK1-SPAK/OSR1 経路を負に制御している ASK3 の活性が高浸透圧ストレス下でも高い状態であると, OSR1 の活性化が抑制されてしまい (Fig.03 & 04), NKCC1 の活性化抑制, RVI の抑制, つまり細胞収縮の持続につながると推測される. 一方, 細胞収縮の持続は, アポトーシスの初期段階でも観察されるが, これは apoptotic volume decrease (AVD) と呼ばれ, アポトーシスの必要条件であることが知られる (Maeno, E. *et al.* 2000). さらに, 高浸透圧ストレス時に RVI が阻害されるとアポトーシスが誘導されること (Maeno, E. *et al.* 2006), ROS によるアポトーシス誘導時には ASK1 が RVI を抑制していることが報告されている (Subramanyam, M. *et al.* 2010). 以上より, 高浸透圧ストレス下においても ASK3 の活性が高い状態であると, 細胞収縮の持続, そして細胞死が引き起こされるという仮説が立てられる (Fig.23).

そこで, この仮説を検証するため, HeLa 細胞に高浸透圧ストレスを処置し, PI 陽性を指標に細胞死を評価した. PPP6C の発現抑制によって高浸透圧ストレス下の ASK3 活性を高い状態にすると, 細胞死が有意に亢進した (Fig.24A & B). ここにさらに ASK3 を発現抑制すると, 細胞死亢進が有意に抑制された. 一方, 等浸透圧状態で培養した場合は, PPP6C の発現抑制によって, 有意な細胞死亢進, 細胞数低下がみられなかった (Fig.24D). 従って, 高浸透圧ストレス下で ASK3 が不活性化するのは, 細胞死を回避し, 恒常性を維持するためであることが示唆された.

考察

1. PP6 による ASK3 不活性化制御

これまで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、何らかのプロテインホスファターゼが積極的に脱リン酸化している可能性は示唆されていたが (Fig.01; 梅田剛, 平成 21 年度; Naguro, I. *et al.* 2012), その正体は不明であった。しかし、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の制御分子をゲノムワイド siRNA スクリーニングで網羅的に探索した先行研究 (渡邊謙吾, 平成 23 年度) と本研究によって、PP6 が高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を直接担っていることが明らかになった。ここで、かつて当研究室において、*Drosophila* の S2 細胞を利用してホスファターゼに絞った RNAi スクリーニングを行ったが、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を担うプロテインホスファターゼは得られなかった (梅田剛, 平成 21 年度)。*Drosophila* では PPV が PPP6C のオルソログとして知られており (Bastians, H. and Ponstingl, H. 1996), 酵母における Sit4 の機能オルソログでもあることから (Mann, D.J. *et al.* 1993), 当時 PPV が得られなかったことは矛盾するようにも思える。この理由として主に 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、S2 細胞内でも本当は PPV が ASK3 を不活性化していたが、スクリーニング条件によって同定できなかった可能性である。これは、用いた PPV の dsRNA の発現抑制効率が悪かった可能性だけでなく、後に述べるように、発現抑制効率の悪い細胞の方が増殖速度が速く、ASK3 不活性化の抑制がマスクされてしまった可能性も含まれる。他にも、蛍光免疫染色画像にハイコンテンツ解析を適用した検出系に比べてイムノプロットによる検出感度が悪く、ASK3 不活性化の抑制が検出できなかった可能性 (渡邊謙吾, 平成 23 年度), ダイナミックレンジを広げる目的で一度低浸透圧にしてから高浸透圧にしたことで、高浸透圧ストレスにおけるプロテインホスファターゼが検出しにくくなっていた可能性などがある。2 つ目は、S2 細胞内では PPV が ASK3 を不活性化していなかった可能性である。*Drosophila* には ASK3 は保存されておらず、さらに ASK ファミリー分子として唯一保存されている DASK1 は高浸透圧ストレスによって活性化する。ただ、興味深いことに、S2 細胞に発現させたヒトの ASK3 は高浸透圧ストレスによって不活性化されたため、高浸透圧ストレスによって活性が増加するプロテインホスファターゼの存在などを予想して、RNAi が容易に行える S2 細胞が用いられた (梅田剛, 平成 21 年度)。浸透圧変化は非常に根本的なストレスであるため、S2 細胞も浸透圧ストレスに対する応答機構を備えているはずではあるが、結果として、ASK3 と関連を持ったプロテインホスファターゼ自身まで保存されていなかった可能性が考えられる。むしろ第 5 項で後述するように、高浸透圧ストレスによって ASK3 が脱リン酸化され易くなる機構が保存されていて、プロテインホスファターゼは何でも良かったのかもしれない。

なお、スクリーニングにおける解析結果では、PPP6C の siRNA による ASK3 不活性化の抑制効果は非常に小さく (Fig.0-9; Sup.Fig.06), 検出系をイムノプロットに変えても当初は抑制効果がわずかであった。そこで、PP6 が細胞周期の調節に重要であることから (Bastians, H. and Ponstingl, H. 1996; Zeng, K. *et al.* 2010), ノックダウン効率の悪い細胞が増えて抑制効果がマスクされている可能性を念頭に、スクリーニング時よりも播種時の細胞数を多くするなどの条件検討を行うことで改善した。一方、細胞周期に関わるということは、PPP6C の発現抑制によって、細胞周期の分布パターンが変わり、単に高浸透圧ストレスに応答しにくい細胞が多い集団になっている可能性など、細胞周期の影響が疑われる。そこで、チミジン処置により細胞を S 期同調させ、チミジン除去後の高浸透圧ストレスに対する応答性を確認した。その結果、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の程度は細胞周期によって変動するものの、いずれの細胞周期においても高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が見られた (Sup.Fig.07)。また、同様の細胞周期依存性を保ちながら、PPP6C 発現抑制による ASK3 不活

性化の抑制も見られた。よって、PPP6C の発現抑制による ASK3 不活性化の抑制は、PP6 の細胞周期への影響が原因ではないことが示唆された。

また、過剰発現した ASK3 に対しては PP6 が高浸透圧ストレスでのみ働いたのに対し (Fig.02)、内在性の ASK に対しては PP6 が定常状態でも働いたように見えることは (Fig.03)、結果が一致しないようにも思える。しかし、ASK1 が自己リン酸化するのと同様に (Tobiume, K. *et al.* 2002)、ASK3 も自己リン酸化できるため、過剰発現の系では定常状態における自己リン酸化を上回る程、内在性の PP6 が脱リン酸化できなかったと解釈できる。つまり、PP6 は定常状態でも ASK3 を不活性化していると想定される。すると今度は、PP6 は恒常的に ASK3 に働いているプロテインホスファターゼであって、高浸透圧ストレスとは無関係である可能性を疑うこともできる。しかし、定常状態は活性化機構と不活性化機構の平衡がとれた状態であるとも考えられ、むしろ浸透圧ストレスは両方向性のストレスであり、ASK3 が迅速かつ可逆的に両方向に应答できることを踏まえると、この方がシステムとして都合が良いと言える。実際、PP6 に限らず、NAMPT の発現抑制でも定常状態の ASK 活性を増加させたことから (Fig.11)、定常状態は活性化機構と不活性化機構の平衡状態であると推察される。一方、PPP6C を発現抑制した状態でも ASK の不活性化自体が見られたことについては (Fig.03)、PP6 が高浸透圧ストレスとは無関係である可能性を高めてしまう。ただ、PPP6C の発現抑制が完全ではないこと、NAMPT 下流で PP6 を経由しない ASK3 不活性化制御機構の存在が示唆されたこと (Fig.20)、そして、高浸透圧ストレスに应答して ASK3 と PP6 の結合が増加したこと (Fig.08) から、PP6 は高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を担うプロテインホスファターゼであると考えられる。

本研究では、細胞レベルにおける解析のみであり、腎臓に存在する ASK3 も PP6 によって不活性化されるとは限らない。しかし、PPP6C の発現抑制による内在性 ASK の活性上昇は、細胞種に関係なく見られたことから (Fig.03 & Sup.Fig.01)、腎臓の尿細管管腔側上皮細胞においても PP6 が ASK3 の不活性化を担っている可能性は十分推測できる。さらに、最近、淡水で生活していたイトヨを海水で 1 ヶ月間飼育して、腎臓で発現が変化する遺伝子を RNA-Seq にて網羅的に探索したところ、海水に適応すると ASK3 が有意に減少することが報告された (Wang, G. *et al.* 2014)。これは、海水では体内から水が排出されてしまうため、ASK3 の発現を抑制することで、WNK1-SPAK/OSR1 経路を活性化して塩の再吸収亢進、すなわち水の再吸収を亢進し、少しでも水の排出を抑制する仕組みであると解釈できる。ここで注目すべきことに、報告中では全く触れられていなかったが、海水に適応すると有意に発現が増加する遺伝子の中に、PP6 の制御分子である PPP6R2 と ANKRD52 が含まれていた。確かに、有意に変化する遺伝子として 1,844 遺伝子もの数が掲載されていたが、全遺伝子数を約 18,000 遺伝子とした場合、PP6 の構成分子 7 遺伝子 (PPP6C, PPP6R1/2/3, ANKRD28/44/52) の割合は 7/18,000 で、約 1,800 遺伝子中に 2 遺伝子存在したことは約 3 倍濃縮されたということである。よって、発現変化方向が一致しているということも考慮すると、PP6 の発現を上げることで、ASK3 活性を低下させ、さらに水の再吸収亢進が有利になるように適応していると解釈でき、腎臓内においても PP6 による ASK3 不活性化機構が存在すること、そして PP6 と ASK3 をまとめて mRNA レベルで調節する機構が存在することを推察させる。

2. PP6 制御分子の必要性

生体内にセリン/スレオニンキナーゼが約 400 種類あるのに対して、セリン/スレオニンホスファターゼは約 30 種類しか存在しないため、プロテインホスファターゼは触媒サブユニットと複数の調節サブユニットによる組み合わせによって基質特異性を生み出していると考えられており (Shi, Y. 2009)、PP6 も PPP6C が PPP6R1/2/3 や ANKRD28/44/52 といった制御分子とヘテロ複合体を形成することで機能すると提唱されている (Stefansson, B. *et al.* 2008)。実際、PPP6R3 ではなく

PPP6R1 の発現抑制でのみ TNF α に対する I κ B ε 分解亢進が見られること (Stefansson, B. and Brautigan, D.L. 2006), PPP6R3 ではなく PPP6R1 の発現抑制でのみ電離放射線刺激による DNA-PK 活性化の抑制が見られること (Mi, J. *et al.* 2009), ANKRD28/44 の発現抑制では核の形態異常が見られるが ANKRD52 の発現抑制では見られないこと (Zeng, K. *et al.* 2010)から、それぞれ役割の異なる PP6 ホロ酵素が存在していることが示唆されている。しかし、IL-1 による TAK1 のリン酸化を PP6 が負に制御している報告 (Kajino, T. *et al.* 2006)や、BCR クロスリンク時の Bcl-xL のリン酸化を PP6 が負に制御している報告 (Kajihara, R. *et al.* 2014)など、PP6 の過剰発現による影響を見る場合、触媒サブユニット PPP6C の単独発現で影響が見られている。これは PP2A など他のプロテインホスファターゼの報告でも見られることではあるが、基質特異性を失った人為産物を見ているリスクが非常に高くなると思われる。一方、ASK3 の場合、むしろ PPP6C 単独過剰発現では ASK3 の不活性化が見られず (Sup.Fig.02), 制御分子の PPP6R3 との共発現によって初めて ASK3 の不活性化が見られた (Fig.05)。確かに、制御分子まで過剰発現しなければ不活性化が見えない方が人為産物であると主張することもできるかもしれないが、PPP6R3 の単独過剰発現によって ASK3 不活性化亢進が見えていることは内在性の PP6 構成分子の量は PPP6Rs に対して PPP6C の方が過剰に存在することを示唆し、Fig.05 は基質特異性がきちんと反映された実験であると考えられる。なお、ASK3 不活性化に対しては PPP6C の不活性化型変異体 D84N がドミナントネガティブ効果を示したのに対し (Fig.05), Kajino らは D84N の過剰発現で IL-1 による TAK1 の過剰活性化が見えておらず (Kajino, T. *et al.* 2006), 基質によって内在性の PPP6C の寄与度が異なり、異なる PP6 ホロ酵素が使用されていることを推測させる。

一方、ゲノムワイド siRNA スクリーニングでは PPP6Rs は陽性とならなかった。この理由としては、主に 2 つ考えられる。1 つ目は、制御分子間の冗長性による可能性である。実際、ASK3 の不活性化亢進は、PPP6R1/2/3 のいずれの PP6 コア酵素を過剰発現しても見られた (Sup.Fig.08)。2 つ目は、発現抑制効率が悪かった可能性である。スクリーニングの条件では、PPP6C も顕著な陽性として得られていなかった。また、発現抑制効率は確認できていないが、少なくとも過剰発現レベルのタンパク質を発現抑制できる配列の shRNA を用いて (Sup.Fig.09A), PPP6Rs の発現抑制による ASK3 不活性化への影響を検討したところ、少なくとも PPP6R3 の shRNA では 2 種類とも高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた (Sup.Fig.09B)。よって、PPP6Rs も高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に必要であると推察される。特に、PPP6R3 と共発現した場合、PPP6C の劇的な増加が見られたことから (Fig.05), PP2A のような複雑なホロ酵素合成・分解機構が存在し (Hombauer, H. *et al.* 2007; Kong, M. *et al.* 2009), PPP6Rs は PPP6C の安定化に必要であると推測される。

また、ゲノムワイド siRNA スクリーニングでは ANKRD28/44 も陽性でなかったが、ANKRD52 についてはそもそも siRNA ライブラリー中に含まれていなかった。ここで ANKRD52 は、発現抑制で核の形態異常が観察されない唯一の PP6 構成分子であり (Zeng, K. *et al.* 2010), 他との違いを生み出している可能性がある。そして、ANKRD52 は、PP6 コア酵素同様、ASK3 との結合が高浸透圧ストレスによって増加することを発見した (Sup.Fig.10)。さらに、ASK3 は高浸透圧ストレスによって粒状の局在を示すが (渡邊謙吾, 平成 23 年度), ANKRD52 も高浸透圧ストレスによって粒状の局在を示し、ASK3 と完全に共局在することも明らかになった (Sup.Fig.11)。この高浸透圧ストレスによる局在変化は、ANKRDs では見られるが、PPP6C や PPP6Rs では見られず、全構成分子を過剰発現すると PPP6C や PPP6Rs も ASK3 と共局在するようになったことから (Sup.Tab.01), ASK3 との結合において ANKRDs が重要な役割を担っている可能性が推測された。なお、免疫沈降実験では高浸透圧ストレス依存的な PP6 コア酵素と ASK3 の結合増加が見られたのに対し (Fig.08), 蛍光観察実験では PP6 コア酵素と ASK3 の共局在は見られず、ANKRDs をさらに共発現することで初めて共局在が見ら

れたが (Sup.Tab.01), PP6 コア酵素の過剰発現では ANKRDs と結合していない成分が存在し, その成分由来のシグナルに埋もれて蛍光観察実験では検出できなかったと解釈できる. 一方で, ANKRDs の ASK3 不活性化に対する必要性に疑問を投げかけるデータも得られている. まず, ANKRDs を過剰発現しても ASK3 不活性化の亢進が見られなかった (Sup.Fig.12). これは内在性の ANKRDs 量が他の構成分子よりも多いと考えれば釈明はできる. また, shRNA によって ANKRD52 を発現抑制した場合に, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られなかった (Sup.Fig.09). この時, 観察された ANKRD52 の発現減少は ASK3 不活性化に影響を与える程十分でない可能性, 他の ANKRDs との冗長性が存在する可能性を仮定すれば反論はできる. さらに, ANKRDs と結合できない PPP6Rs Δ C 変異体による PP6 コア酵素でも ASK3 不活性化が見られた (Sup.Fig.13; Stefansson, B. *et al.* 2008). これを説明するには Dr. Hammond らが立てたモデルの様に (Hammond, D. *et al.* 2013), PPP6C を介しても ANKRDs が結合できている可能性を仮定すれば保留可能である. 以上より, ASK3 不活性化における ANKRDs の必要性は未だ不明である.

3. 結合変化による活性制御機構

本研究において, 高浸透圧ストレスによって ASK3 と PP6 の結合が増加することで, ASK3 は不活性化される可能性が示唆された (Fig.08 & 09). しかし, 酵素と基質の関係で結合の増加が見えるのはやや疑問である. なぜなら, 一般に酵素が基質と結合すれば瞬時に反応すると考えられるため, たとえ高浸透圧ストレスによって ASK3 と PP6 の結合が増加しても, すぐに結合は解離してしまい, 結合の増加を免疫沈降法で検出できないと思われるからだ. それにも関わらず結合の増加が見えたということは, 結合は脱リン酸化反応とは独立している可能性を推察させる. 実際, ASK3 の自己リン酸化による活性化を瞬時に抑えるために, 高浸透圧ストレス下では ASK3 と PP6 が結合してスタンバイの状態にあるのは合理的かもしれない. また, PPP6C の不活性化型変異体 D84N による PP6 コア酵素と ASK3 の結合も野生型と同程度であったことは (Sup.Fig.14), 脱リン酸化反応と結合の独立性を示唆する.

一方, ASK3 と PP6 の結合増加と ASK3 不活性化の逆相関があるデータしか示せていないため, 逆に, 不活性化した ASK3 に PP6 が結合しているという可能性も考えられる. しかし, この可能性が正しい場合, ASK3 の不活性化型変異体 T808A と PP6 の結合は, 野生型よりも強くなると予想されるが, PP6 との結合は野生型と T808A の場合でほぼ同じであり (Sup.Fig.15), 不活性化後に結合している可能性は低いと考えられた.

結局, ASK3 と PP6 の結合ができない状態で ASK3 不活性化が起きないということを示さなければ, 最終的に結論付けることはできない. しかし, PP6 と ASK3 は広範に結合部位があるのか, 現在までに PP6 と結合する ASK3 の領域や, 逆に ASK3 と結合する PP6 の領域も特定できておらず, 未だ示す手段が得られていない. ただ, もし本当に結合の増加が ASK3 不活性化を担っているのであれば, 創薬を考える上で非常に重要な知見であると考えられる. なぜなら, 様々な分子と酵素-基質の関係にあるキナーゼやホスファターゼの場合, 活性阻害ではなく, 結合阻害をターゲットにする方が特異性を出す上で優れた戦略であると考えられるためである. 実際, ASK ファミリー分子の相同性は非常に高く, ASK1 の阻害剤として作られた K811 は (Hayakawa, Y. *et al.* 2012), ASK3 の活性も阻害してしまう. しかし, PP6 との結合は ASK1 よりも ASK3 の方が強く見られたことから (Sup.Fig.16), ASK3 と PP6 の結合阻害剤は ASK3 の特異的な活性化剤となり得る. 例えば, 高週齢の ASK3 ノックアウトマウスが野生型よりも高血圧症状を呈するデータが (Naguro, I. *et al.* 2012), ASK3 活性低下の蓄積で高血圧になることを意味するのであれば, このような結合阻害剤は, チャンネルを直接阻害する既存の利尿薬とは異なるメカニズムの新規高血圧治療薬となり得るだろう.

4. NAMPT・NAD による ASK3 不活性化制御

NAMPT は NAD 合成経路の律速段階反応を担うため(Revollo, J.R. *et al.* 2004), 代謝・炎症・がんといった非常に広い分野で注目されている (Garten, A. *et al.* 2009, Galli, M. *et al.* 2010). しかし, 浸透圧ストレスという非常に根本的なストレスとの関連については全く考えられておらず, 本研究が初めて NAMPT の高浸透圧ストレスにおける関連を示唆することになる. これはまさに, ゲノムワイド siRNA スクリーニングで網羅的に探索した成果であると言える.

そして, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には, NAMPT 自身ではなく, NAD が重要な役割を担っていた (Fig.18). ここで, NAMPT 発現抑制の内在性 ASK への影響は, HEK293A 細胞や A549 細胞においては見られたが (Fig.11 & Sup.Fig.04), HeLa 細胞ではあまり見られず (Data not shown), 細胞種に依存する可能性が示唆された. これは, ASK3 不活性化機構に NAD が必要な細胞種と不要な細胞種が存在しているというよりも, 細胞種によって NAD 合成経路における NAMPT の寄与度の違いが要因だと考えられる. 実際, NAMPT 発現抑制時の NAD 量を HeLa 細胞においても測定したが, HEK293A 細胞のように(Fig.15A & B), NAD 量の低下は見られなかった (Data not shown). この要因として, HEK293A 細胞と HeLa 細胞のタンパク量を比べた時, アクチン量に対する NAMPT 量は HeLa の方が多いことから (Data not shown), HeLa 細胞では NAD 合成量に影響を与える程発現抑制できていなかった可能性がある. また, 哺乳類における NAD 合成経路では NAMPT を介するサルベージ経路がメインだが, 肝臓では *de novo* 合成経路も利用されているため (Revollo, J.R. *et al.* 2007), 実は HeLa 細胞は *de novo* 合成経路も使用しているのかもしれない.

さて, NAD によって ASK3 不活性化が制御されるということは (Fig.18), 高浸透圧ストレスによって NAD 量は増えることが想定される. そこで実際に, 浸透圧ストレス後の NAD 量を測定したが, 浸透圧ストレスによる NAD 量の変化は見られなかった (Sup.Fig.17A & B). ただ, 高浸透圧ストレスによって細胞が収縮することを踏まえると, NAD 濃度としては増加すると考えられる (Sup.Fig.17C). この仮説が正しい場合, 細胞は高浸透圧ストレスを NAD 濃度変化に変換していることを意味し, 根本的な生理活性物質を用いて根本的なストレスに対してシンプルに応答するのは合理的であるかもしれない. なお, ASK3 不活性化の抑制に必要な FK866 の処置時間から (Sup.Fig.13), NAMPT 活性が高浸透圧ストレスで急激に上がることは想定し難いが, NAD 量が一定であるというデータは同時に, NAD を分解する酵素の活性も不変であることを想定させる.

一方, 細胞内の NMN や NAD を増加させる目的で細胞外に NMN や NAD を添加する方法は, 既存の報告で用いられているものの (Revello, J.R. *et al.* 2007b; Yoshino, J. *et al.* 2011), 実際にどのようにして細胞外の NMN や NAD が細胞内に移行しているのかはわかっていない (Stein, L.R. and Imai, S. 2012). 特に, 細胞外の NAD や NMN は nicotinamide riboside (NR)にまで分解されてから細胞内に入り, 再度リン酸化されて NMN になるという報告もあり (Nikiforov, A. *et al.* 2011), 細胞外の NMN や NAD によって ASK3 不活性化が亢進したのは (Fig.16 & 18), 単純に細胞内 NMN や NAD の増加による影響ではない可能性がある点は留意する必要がある.

すると, NAD が ASK3 不活性化に必要であることを示唆する上で, NMNATs 阻害剤 Gallotannin によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたことが重要になるが (Fig.17), Gallotannin は NMNATs だけでなく, poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)の阻害剤としても知られる (Ying, W. and Swanson, R.A. 2000; Rapizzi, E. *et al.* 2004). 実際, NAMPT が NAD 合成経路の律速段階を担うにも関わらず, FK866 処置よりも Gallotannin 処置の方が短時間で ASK3 不活性化の抑制が見られた (Fig.13). よって, PAR の半減期が 1 分程度と非常に短いと言われていることから (Rapizzi, E. *et al.* 2004), PARG 阻害の影響も反映している可能性には留意する必要がある.

5. ASK3 不活性化制御機構における NAD の作用点

本研究によって、NAMPT が PP6 を介して ASK3 不活性化を制御していることが示され (Fig.19 & 20), さらに NAD が ASK3 と PP6 の結合を制御していることが示された (Fig.21 & 22). しかし、今まで NAMPT・NAD と PP6 の関連は想定されておらず、NAD がどのようにして ASK3 と PP6 の結合を制御しているかは不明のままである。この可能性を考察する上で、まず NAMPT が PP6 以外の経路でも ASK3 不活性化を制御している点について考えてみる。PP6 が ASK3 の直接のプロテインホスファターゼであることから (Fig.06), 他の経路においても ASK3 の直前には何らかのプロテインホスファターゼが存在すると想定されるが、これまでに ASK3 の直接のプロテインホスファターゼとして知られるのは PPM1A/B のみである (梅田剛, 平成 21 年度)。そこで、PPM1A と PP6 の関係性について検討したところ、高浸透圧ストレスを 500 mOsm に強くすると、PPP6C の発現抑制による ASK3 不活性化抑制効果は弱くなるが (Fig.19), ほぼ ASK3 不活性化を抑制できない PPM1A の発現抑制よりは (梅田剛, 平成 21 年度), 強かった (Sup.Fig.18)。そして、PPP6C と PPM1A を共に発現抑制すると ASK3 不活性化の抑制効果が増強した。これは、PPM1A と PPM1B を共に発現抑制しても更なる ASK3 不活性化抑制効果が見えなかったことと対照的であり (梅田剛, 平成 21 年度), NAMPT から ASK3 不活性化に至る別経路として少なくとも PPM1A が存在すると推察される。ここで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化への寄与の低い PPM1A は、共免疫沈降実験によって ASK3 との結合を検出することが非常に困難であり (梅田剛, 平成 21 年度), ここでも結合力と不活性化能力に相関がある点は言及に値するだろう。つまり、NAMPT・NAD は、PP6 と PPM1A の ASK3 との結合を制御していると仮定できそうだが、PP6 と PPM1A は構造があまり似ていない (Shi, Y. 2009)。よって、NAMPT・NAD は、ホスファターゼ側ではなく、ASK3 側の結合能力に作用している可能性が高いと推察される。実際、この仮説であれば、S2 細胞においても ASK3 が高浸透圧ストレスによって不活性化できたのは (梅田剛, 平成 21 年度), NAD 濃度上昇によって何らかの形で ASK3 側の被脱リン酸化能が上がり、ASK3 との親和性の高いプロテインホスファターゼが脱リン酸化を行ったと説明できる。

さて、上記の仮説を仮定すると、NAD の作用点として魅力的な仮説が導かれる。まず、スクリーニングにおいて、NAMPT に次ぐ程顕著な陽性分子として RING finger protein 146 (RNF146) という E3 リガーゼが得られていた。実際、RNF146 の発現抑制効率は確認できていないものの、RNF146 を発現抑制すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が確認された (Sup.Fig.19)。RNF146 は、グルタミン酸の興奮毒性において parthanatos を抑制することで神経保護的に働いたり、Axin や Tankyrase をユビキチン化することで Wnt シグナルを正に制御したり、DNA 損傷時に多くの PAR 化されたタンパク質と結合して細胞生存や DNA 損傷に働いたり、Cherubism の原因遺伝子 3BP をユビキチン化したりすることが 2011 年に一気に報告された (Andrabi, S.A. *et al.* 2011; Zhang, Y. *et al.* 2011; Calow, M.G. *et al.* 2011; Kang, H.C. *et al.* 2011; Levaot, N. *et al.* 2011)。この流行を作ったのは、RNF146 が基質の PAR 化を認識して結合し、ユビキチン化するというユニークな基質認識機構に由来する。ここで、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構における関連可能性を考えると、NAMPT・NAD が PAR 化において必須である点に気付き、次のような制御機構が推測される (Sup.Fig.20); 高浸透圧ストレスによって NAD 濃度が上昇すると、上記の仮説より ASK3 あるいは ASK3 結合分子が PAR 化される。この PAR 化を RNF146 は認識・結合して、PAR 化された ASK3 あるいは ASK3 結合分子をポリユビキチン化する。ここで、PPP6C はポリユビキチンと結合することが報告されているため (Broglie, P. *et al.* 2010), このユビキチン化によって PP6 と ASK3 の結合が上昇し、ASK3 が不活性化される。この仮説であれば、高浸透圧ストレスによって ASK3 の被脱リン酸化能が上昇しなかった点も (Fig.07), 半減期の短い PAR (Rapizzi, E. *et al.* 2004) やポリユビキチンの分解を抑制していなかったために、上昇した被脱リン酸化能の効果が精製中に消失してしまい、観

察されなかったと説明できる。一方、この仮説では NAD を ASK3 あるいは ASK3 結合分子に PAR 化する PARP が必要であるが、スクリーニングにおいてはいずれも陰性であり (Sup.Fig.21), 冗長性などを想定することになる。

一方、NAD の作用点を全く別の視点から眺めてみると、他にも魅力的な仮説が考えられる。高浸透圧ストレスによる ASK3 の不活性化の応答性の速さから (Naguro, I. *et al.* 2012), ASK3 の不活性化は浸透圧ストレス応答の中でも早いイベントである、細胞体積の回復 RVI に関与していると仮定するのは自然である。ここで、電気生理学の分野において、高浸透圧ストレスによって活性化する非選択的カチオンチャンネル HICC の存在が確認され、HICC の阻害は RVI を抑制することがわかっていたが (Wehner, F. *et al.* 2003), その分子実体は長らく謎であった。しかし 2012 年、遂に HeLa 細胞における HICC の分子実体は TRPM2 の ΔC スプライシングバリエントであると報告された (Numata, T. *et al.* 2012)。この TRPM2 は、温度や pH など様々な刺激に対してセンサーとして働く TRP チャネルファミリーに属するカチオンチャンネルであるが (Ramsey, I.S. *et al.* 2006; Venkatachalam, K. and Montell, C. 2007), C 端側に ADPR 加水分解酵素活性を持つ NUDT9H ドメインを有する点が特徴的で、NAD の分解産物である ADPR によって活性化される (Perraud, A.L. *et al.* 2001; Sano, Y. *et al.* 2001)。一方、Sano らは NAD も TRPM2 のアゴニストとして働くと主張したのに対し、Perraud らは働かないと主張し、その後も、NUDT9H ドメインに NAD が直接結合して活性化するという報告がなされる一方で (Hara, Y. *et al.* 2002), 市販の NAD には ADPR が混入しているという報告がなされるなど (Kolisek, M. *et al.* 2005), NAD が TRPM2 のアゴニストであるかは未だ論争中である。しかし、いずれにせよ NAD は分解されて ADPR になるため、次のような制御機構が推測される (Sup.Fig.22); 高浸透圧ストレスによって NAD 濃度あるいは ADPR 濃度が上昇すると、HICC である TRPM2 ΔC を活性化する。その後、何らかの形で ASK3 と PP6 の結合が上昇し、ASK3 が不活性化される。この仮説では TRPM2 が必須になるが、スクリーニングにおいて TRPM2 は陽性にわずかに届かずに陰性となっていた。ここで、TRPM2 のような膜タンパク質はターンオーバーが長く、siRNA による 48 時間の発現抑制では、十分に発現減少ができなかった可能性は十分考えられる。また、HICC の阻害剤として知られる Flufenamate を処置すると (Wehner, F. *et al.* 2003), 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたことから (Sup.Fig.23), ASK3 不活性化制御機構において HICC の活性化が必要だと示唆される。さらに、TRP チャネルの汎阻害剤として知られる SKF96365 を処置しても、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたことから (Sup.Fig.23), ASK3 不活性化制御機構において TRP チャネルの活性化も必要だと示唆される。その上、HICC や TRPM2 ΔC のカルシウム透過性はかなり低く (Wehner, F. *et al.* 2003; Numata, T. *et al.* 2012), HICC 活性化後の応答に細胞外カルシウム流入は必要ないと考えられているが、カルシウムを含まない高浸透圧バッファーによっても ASK3 は不活性化できたこと (Sup.Fig.24), 高浸透圧バッファー中のカルシウムをキレートした場合でも ASK3 は不活性化できたことから (Sup.Fig.25), 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には細胞外カルシウム流入を必要としないことが示唆された。一方、当研究室の丹羽國祥氏 (平成 26 年度博士後期課程進学) によって、細胞内カルシウムのキレート剤 BAPTA-AM は、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を抑制することが発見されていたが (Sup.Fig.25), TRPM2 の活性化に細胞内カルシウムが必要であると知られている (McHugh, D. *et al.* 2003)。以上より、高浸透圧ストレスによって HICC, つまり TRPM2 ΔC が活性化することで ASK3 が不活性化できるという仮説と一致する状況証拠が得られていると言える。但し、この仮説の場合、HICC や TRPM2 から活性化した後どうやって PP6 と ASK3 の結合を上昇させるかということについては、さらなる情報とアイデアが必要になる。

6. 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の生理学的意義

高浸透圧ストレスにさらされると、細胞は強制的に収縮してしまうため、細胞体積を回復する機構 RVI を有する (Burg, M.B. *et al.* 2007; Hoffmann, E.K. *et al.* 2009). この RVI においては、主に anion exchanger (AE) と共役した NHEs や NKCCs といったエフェクター分子を活性化させることで細胞内に NaCl を取り込み、水の流入に伴って細胞体積を回復する。一方、この時、HICC も活性化するが、この HICC の阻害は RVI を抑制することが知られる (Wehner, F. *et al.* 2003). 前項の通り、高浸透圧ストレスによる ASK3 の不活性化において HICC の活性化が必要であることが示唆され (Sup.Fig.23), 高浸透圧ストレス時に HICC が阻害されて起きる RVI の抑制は ASK3 活性の高い状態であることが要因である可能性が推察される。実際、HeLa 細胞において高浸透圧ストレス時にも ASK3 活性が高かった場合、WNK1-OSR1 経路の活性化が抑制され、それにより NKCC1 の活性化が阻害 (Moriguchi, T. *et al.* 2005; Anselmo, A.N. *et al.* 2006), 最終的に RVI が抑制されるというシグナル伝達経路が具体的に推察できる。また最近、WNK1 を阻害することで RVI が抑制されるという報告までなされた (Zhu, W. *et al.* 2014; Roy, A. *et al.* 2014). それ故、ASK3 不活性化を抑制した時に RVI が抑制されるか検討しようと試みてきた。しかし、細胞が細い穴に通る際の電気抵抗から細胞体積を測るコールター法や前方散乱光による細胞体積測定法では、既存の報告通り、体積をきちんと測定できなかった。そこで、細胞を蛍光タンパク質で規定し、共焦点顕微鏡で z-stack した画像から三次元構築することで細胞体積を測定する系を構築したが、体積測定自体は理論値と一致したものの、RVI のように見える細胞体積の増加が Flufenamate で抑制されず、未だ確固たるアッセイ系が得られていない。一方、細胞透過性の高い尿素によって高浸透圧ストレスをかけると、細胞収縮後、尿素が細胞内に入ることによって体積も自然に戻ることを利用して (Ford, P. *et al.* 2005), 細胞体積と ASK3 活性に相関があることが示唆されている (梅田剛, 平成 21 年度). よって、RVI が生じているなら、細胞体積が回復し ASK3 の不活性化も元に戻ると推測されるが、確かに長時間高浸透圧培地で培養すると、内在性 ASK の活性が等浸透圧培地と同程度に回復した (Sup.Fig.26). これは 2 時間後でも ASK3 が不活性化したままであったデータと異なるが (Naguro, I. *et al.* 2012), 内在性の ASK をモニターしている点、浸透圧バッファーではなく、FBS の入った高浸透圧培地を用いている点が必要である。よって、RVI は起きていない条件であると考えられ、今後も細胞体積検出系側の改善に取り組む必要がある。

一方、細胞体積調節と細胞死は密接な関係にあることが知られている。例えば、高浸透圧ストレスによって胸腺リンパ細胞はアポトーシスで死ぬが、HeLa 細胞や COS 細胞は死なず、体積回復機構の有無が生死を分けていると考えられ (Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. 1996), その後実際に、RVI を阻害すると HeLa 細胞でも高浸透圧ストレスによってアポトーシスが誘導されることが示された (Maeno, E. *et al.* 2006). また、アポトーシスの際に観察される細胞収縮の持続 AVD は、アポトーシスに必要であり、低浸透圧後の体積回復 RVD の機構を利用することで積極的に達成している (Maeno, E. *et al.* 2000), アポトーシス誘導後に HICC を活性化させると RVI によって、アポトーシスから回避できることが明らかになった (Numata, T. *et al.* 2008). このことはアポトーシスを適切に行うには RVI を阻害しておく必要がある可能性を想定させるが、その後、ASK1 が Akt1 を阻害することでアポトーシス時の RVI を抑制していることが報告された (Subramanyam, M. *et al.* 2010). ここで、ASK1 による Akt1 阻害からイオントランスポーターに至るシグナル伝達経路は不明であるのに対し、前述の仮説の通り、活性化した ASK3 は WNK1-OSR1 経路を不活性化することで NKCC1 の活性化を抑制するという具体的な経路が想定できる。また、ASK3 の方が浸透圧ストレス・体積調節変化に相関して両方向性に活性変化できること (梅田剛, 平成 21 年度; Naguro, I. *et al.* 2012), ASK1 と ASK3 は相互にリン酸化できること (小林夕美恵, 平成 16 年度) を踏まえると、アポトーシス時に RVI を抑制しているのは ASK1 ではなく ASK3 である方が合理的であるように思える。実際、

PPP6C の発現抑制によって高浸透圧ストレス下でも ASK3 の活性が高い状態にすると (Fig.03), 細胞死は亢進することが明らかになったが (Fig.24), 驚くべきことに, 同一の系で ASK1 を発現抑制しても, PPP6C の発現抑制による細胞死亢進がキャンセルできない傾向が現在までに得られてきている (Data not shown). なお, 前述の通り, 実際に細胞体積の測定はできていないが, HeLa 細胞において高浸透圧ストレスで細胞死が誘導されたということは, 上記の既存の報告を踏まえると, 高浸透圧ストレス下で ASK3 活性が維持された時に RVI の抑制も起きている可能性を強く示唆する.

さて, 本研究によって, 高浸透圧ストレス下で ASK3 が不活性化するのは, 細胞死を回避し, 恒常性を維持するためであることが明らかになった, そして上述の考察の通り, 恐らく RVI を達成し, 恒常性を維持するためでもあると推測される. ここで, 高浸透圧ストレスに応答して RVI を達成する目的だけであれば, 細胞は WNK1 や SPAK/OSR1 だけ有しておけば良いように思える. しかし, 不活性化に失敗すれば, RVI ができず, 細胞死を誘導してしまうような危険な分子 ASK3 をわざわざ有しているということは, RVI が達成できなかった場合に細胞死を誘導できるオプションを敢えて有していることを意味する. ここで, 細胞が高浸透圧ストレスを受けると, 細胞収縮によるイオン強度・マクロ分子の増加が生じるだけでなく, 転写・翻訳の抑制, DNA 損傷, 細胞周期の停止, ミトコンドリアの脱分極など甚大な影響を及ぼす. 従って, 速やかに RVI を行えなかった細胞は周囲の細胞にまで悪影響を及ぼす可能性が高く, 積極的に細胞死を誘導できた方が, 個体としての恒常性を維持する上では有利だと考えられる. すなわち, "apoptosis signal-regulating kinase"である ASK3 の活性変化が, 細胞体積調節を通じて生存と細胞死を決定する分岐点となっている可能性が推察される.

7. PP6 や NAMPT における発展可能性

現在までに, PP6 は細胞周期や DNA 損傷, NAMPT は代謝や概日リズム, 老化, がん, 炎症などに関する報告が主であり, 浸透圧ストレスとの関連については全く考えられていない. しかし, 浸透圧ストレス応答による体積調節は, 細胞体積という最も根本的な要素であるが故に, 様々な生理現象に関わることが知られる (Hoffmann, E.K. *et al.* 2009). 例えば, 細胞移動において, 前方では NHE1 や NKCC1 など RVI に関わるイオントランスポーターによってイオンを取り込み, 水の流入に伴って進行方向に細胞を膨らませるのに対し, 反対に後方では VRAC など RVD に関わるチャネルがイオンを排出し, 水の流出に伴って進行方向に細胞を縮ませることで, 全体として細胞が移動するという興味深いモデルが提唱されている (Schwab, A. *et al.* 2012). 他にも, 細胞周期において細胞は体積を変化させなければならず, 詳細はよくわかっていないが, 一般に細胞増殖は低浸透圧による膨張で亢進し, 高浸透圧による収縮で抑制される (Pedersen, S.F. *et al.* 2013). よって, PPP6C を発現抑制した細胞では双極紡錘体形成の遅延が見られるが (Zeng, K. *et al.* 2010), 他にも ASK3 活性の亢進により WNK1-OSR1-NKCC1 活性が低下し, 細胞が収縮することで細胞周期が遅くなっている可能性など, 既存の PP6 や NAMPT の機能に関して, 浸透圧ストレス・細胞体積調節・ASK3 といった新たな視点からの理解の必要性が示唆される.

実際, 細胞増殖と細胞体積については, 本研究でも, 高浸透圧培地で培養すると等浸透圧培地よりも細胞数が明らかに低下していた (Fig.24C & E). また, 高浸透圧ストレス群内でも, PPP6C 発現抑制で細胞数が有意に低くなったが (Fig.24C), これは細胞死によって細胞数が少なくなった可能性と同時に, ASK3 活性が高い状態であるために WNK1-OSR1-NKCC1 活性が低下して, より細胞が収縮しているために細胞増殖が抑制された可能性も類推される. 特に, 等浸透圧培地では細胞死が検出されなかったにも関わらず (Fig.24D), PPP6C 発現抑制によって細胞数が少ない傾向にあった理由としては考え易い (Fig.24E). なお, 定常状態で生存に必要なキナーゼ・ホスファターゼを探索した siRNA スクリーニングにおいて, 発現抑制でアポトーシスが誘導されたプロテインホスファターゼの中に

PPP6C が陽性となっていたが (MacKeigan, J.P. *et al.* 2005), 等浸透圧培地では PPP6C 発現抑制群でも細胞死は見られなかった (Fig.24D). この相違は, 恐らく細胞死の検出系が異なるためだと考えられ, 実際, 等浸透圧培地でも PPP6C の発現抑制では細胞数の少ない傾向が見られ (Fig.24E), パイアビリティは有意に低下していた (Sup.Fig.28).

総括

本研究において私は、

- ・ ゲノムワイド siRNA スクリーニングによって同定された唯一のプロテインホスファターゼであった PP6 が、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を担う直接のプロテインホスファターゼであることを明らかにした。
- ・ 高浸透圧ストレスによって、PP6 の活性が上昇するのではなく、ASK3 との結合が上昇することで、ASK3 の不活性化が達成されている可能性を見出した。
- ・ ゲノムワイド siRNA スクリーニングで最も顕著な陽性分子であった NAMPT は、その反応産物である NMN や NAD を介して、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を制御することを明らかにした。
- ・ 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構において、PP6 と NAMPT は独立して作用するのではなく、NAMPT は ASK3 と PP6 の結合に正に作用することが明らかになった。
- ・ 高浸透圧ストレスによって ASK3 が不活性化するのは、細胞死を回避し、恒常性を維持するためであることが明らかになった。

本研究によって、今まで不明であった ASK3 不活性化の制御機構の一端が明らかになった (Fig.25)。ただ、検討しなければならないことはまだ多く残っている。例えば、本当に ASK3 と PP6 の結合が増加することで ASK3 不活性化が亢進しているのか、結合ができない変異体で確認することが必要である。また、技術的な問題によって、ASK3 と PP6 の結合は内在性レベルで確認できておらず、実験系を改善しなければならない。

また、NAD がどこに作用して、ASK3 不活性化を引き起こしているのか、という点は ASK3 不活性化制御機構解明の上でも最も大きなポイントである。実際、もし RNF146 を介する仮説が正しいならば、(Sup.Fig.20)、根本的な生理活性物質である NAD の濃度変化が根本的な高浸透圧ストレスのセンサーを担っていることを提唱することになる。さらに、RNF146 による PAR 化認識は、基質を分解するためでなく、シグナル伝達のためでもあることまで提唱することになる。一方、HICC である TRPM2 ΔC を介する仮説が正しいならば (Sup.Fig.22)、HICC から細胞体積に至るシグナル伝達経路の主要部分の多くが明らかにされることになる。

他にも、当研究室の芝本絵理香氏 (平成 26 年度薬学部薬学科卒業見込) によって、ASK3 のプルダウンアッセイ法や酵母ツーハイブリッド法により同定された ASK3 の新規結合タンパク質 SUGT1 と CACYBP は、ASK3 を不活性化することが明らかになった (芝本絵理香, 平成 26 年度)。注目すべきことに、プルダウンアッセイ法などによって結合分子を同定した報告において、PPP6R2 が CACYBP と結合する(近くに存在する)というデータが示されており (Couzens, A.L. *et al.* 2013), CACYBP/SUGT1 を PP6 や NAD との関連も含めて検討して行く必要があるだろう。

そして、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を抑制すると、RVI の抑制が見られる可能性は非常に高い状況にも関わらず、細胞体積・RVI を測定する系が構築できていない。既に様々な手を尽くしているが、測定系さえ構築できれば、かなり有望な仮説なので、今後も測定系構築に努めたい。同時に、細胞体積調節は様々な生理学的現象に関わるため、細胞移動など、他の生理学的な現象における ASK3 の役割も検討して行きたい。

文献

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711 (2004).

Andrabi, S.A., Kang, H.C., Haince, J.F., Lee, Y.I., Zhang, J., Chi, Z., West, A.B., Koehler, R.C., Poirier, G.G., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. *Nat. Med.* **17**, 692-699 (2011).

Anselmo, A.N., Earnest, S., Chen, W., Juang, Y.C., Kim, S.C., Zhao, Y. and Cobb, M.H. WNK1 and OSR1 regulate the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10883-10888 (2006)

Bastians, H. and Ponstingl, H. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J. Cell Sci.* **109**, 2865-2874 (1996).

Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M. and Ziegler, M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J. Biol. Chem.* **280**, 36334-36341 (2005).

Billington, R.A., Travelli, C., Ercolano, E., Galli, U., Roman, C.B., Grolla, A.A., Canonico, P.L., Condorelli, F., Genazzani, A.A. Characterization of NAD uptake in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 6367-6374 (2008).

Bondarava, M., Li, T., Endl, E. and Wehner, F. α -ENaC is a functional element of the hypertonicity-induced cation channel in HepG2 cells and it mediates proliferation. *Pflugers Arch.* **458**, 675-687 (2009).

Bortner, C.D. and Cidlowski, J.A. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **271**, C950-C961 (1996).

Brogie, P., Matsumoto, K., Akira, S., Brautigan, D.L. and Ninomiya-Tsuji, J. Transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 2333-2339 (2010).

Burg, M.B., Ferraris, J.D. and Dmitrieva, N.I. Cellular response to hyperosmotic stresses.

Physiol.Rev. **87**, 1441-1474 (2007).

Callow, M.G., Tran, H., Phu, L., Lau, T., Lee, J., Sandoval, W.N., Liu, P.S., Bheddah, S., Tao, J., Lill, J.R., Hongo, J.A., Davis, D., Kirkpatrick, D.S., Polakis, P. and Costa, M. Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling. *PLoS One* **6**, e22595 (2011).

Cohen, P.T., Philp, A, and Vázquez-Martin, C. Protein phosphatase 4--from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* **579**, 3278-3286 (2005).

Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazán, E., Reimers, D., Mulero, V. and Pelegrín, P. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* **37**, 487-500 (2012).

Couzens, A.L., Knight, J.D., Kean, M.J., Teo, G., Weiss, A., Dunham, W.H., Lin, Z.Y., Bagshaw, R.D., Sicheri, F., Pawson, T., Wrana, J.L., Choi, H. and Gingras, A.C. *Sci. Signal.* **6**, rs15 (2013).

Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B., Xu, X. and Lees-Miller, S.P. Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1368-1381 (2010)

Ford, P., Rivarola, V., Chara, O., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Farman, N., Parisi, M. and Capurro, C. Volume regulation in cortical collecting duct cells: role of AQP2. *Biol. Cell* **97**, 687-697 (2005).

Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y. and Shimomura, I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **307**, 426-430 (2005).

Gallí, M., Van Gool, F., Rongvaux, A., Andris, F. and Leo, O. The nicotinamide phosphoribosyltransferase: a molecular link between metabolism, inflammation, and cancer. *Cancer Res.* **70**, 8-11 (2010).

Galli, U., Travelli, C., Massarotti, A., Fakhfour, G., Rahimian, R., Tron, G.C., Genazzani, A.A. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 6279-6296 (2013).

Garten, A., Petzold, S., Körner, A., Imai, S. and Kiess, W. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 130-138 (2009).

Gold, H.L., Wengrod, J., de Miera, E.V., Wang, D., Fleming, N., Sikkema, L., Kirchhoff, T.,

Hochman, T., Goldberg, J.D., Osman, I. and Gardner, L.B. PP6C hotspot mutations in melanoma display sensitivity to Aurora kinase inhibition. *Mol. Cancer Res.* **12**, 433-439 (2014).

Hammond, D., Zeng, K., Espert, A., Bastos, R.N., Baron, R.D., Gruneberg, U. and Barr, F.A. Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J. Cell Sci.* **126**, 3429-3440 (2013).

Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K. and Mori, Y. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell* **9**, 163-173 (2002).

Hasmann, M. and Schemainda, I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* **63**, 7436-7442 (2003).

Hayakawa, Y., Hirata, Y., Sakitani, K., Nakagawa, H., Nakata, W., Kinoshita, H., Takahashi, R., Takeda, K., Ichijo, H., Maeda, S. and Koike, K. Apoptosis signal-regulating kinase-1 inhibitor as a potent therapeutic drug for the treatment of gastric cancer. *Cancer Sci.* **103**, 2181-2185 (2012).

Hodis, E., Watson, I.R., Kryukov, G.V., Arold, S.T., Imielinski, M., Theurillat, J.P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A.H., Lawrence, M.S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R.C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D.L., Stenke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J.E., Davies, M.A., Gershenwald, J.E., Wagner, S.N., Hoon, D.S., Schadendorf, D., Lander, E.S., Gabriel, S.B., Getz, G., Garraway, L.A. and Chin, L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251-263 (2012).

Hoffmann, E.K., Lambert, I.H. and Pedersen, S.F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* **89**, 193-277 (2009).

Hombauer, H., Weismann, D., Mudrak, I., Stanzel, C., Fellner, T., Lackner, D.H. and Ogris, E. Generation of active protein phosphatase 2A is coupled to holoenzyme assembly. *PLoS Biol.* **5**, e155 (2007).

Jia, S.H., Li, Y., Parodo, J., Kapus, A., Fan, L., Rotstein, O.D. and Marshall, J.C. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J. Clin. Invest.* **113**, 1318-1327 (2004).

Johnson, S.A. and Hunter, T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat. Methods* **2**, 17-25 (2005).

- Kajihara, R., Sakamoto, H., Tanabe, K., Takemoto, K., Tasaki, M., Ando, Y. and Inui, S. Protein phosphatase 6 controls BCR-induced apoptosis of WEHI-231 cells by regulating ubiquitination of Bcl-xL. *J. Immunol.* **192**, 5720-5729 (2014).
- Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D.L., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 39891-39896 (2006).
- Kang, H.C., Lee, Y.I., Shin, J.H., Andrabi, S.A., Chi, Z., Gagné, J.P., Lee, Y., Ko, H.S., Lee, B.D., Poirier, G.G., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14103-14108 (2011).
- Kim, S.I., Kwak, J.H., Wang, L. and Choi, M.E. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of transforming growth factor-beta1-induced TAK1 activation in mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 10753-10763 (2008).
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A. and Penner, R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol. Cell* **18**, 61-69 (2005).
- Kong, M., Ditsworth, D., Lindsten, T. and Thompson, C.B. $\alpha 4$ is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol. Cell* **36**, 51-60 (2009).
- König, R., Chiang, C.Y., Tu, B.P., Yan, S.F., DeJesus, P.D., Romero, A., Bergauer, T., Orth, A., Krueger, U., Zhou, Y., Chanda, S.K. A probability-based approach for the analysis of large-scale RNAi screens. *Nat. Methods* **4**, 847-849 (2007).
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B.H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J.P., Cheng, E., Davis, M.J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E.C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H.M., Brash, D.E., Stern, D.F., Materin, M.A., Lo, R.S., Mane, S., Ma, S., Kidd, K.K., Hayward, N.K., Lifton, R.P., Schlessinger, J., Boggon, T.J. and Halaban, R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006-1014 (2012).
- Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**, 247-306 (1998).
- Lau, C., Dölle, C., Gossmann, T.I., Agledal, L., Niere, M. and Ziegler, M. Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *J. Biol. Chem.* **285**, 18868-18876 (2010).
- Levaot, N., Voytyuk, O., Dimitriou, I., Sircoulomb, F., Chandrakumar, A., Deckert, M.,

- Krzyzanowski, P.M., Scotter, A., Gu, S., Janmohamed, S., Cong, F., Simoncic, P.D., Ueki, Y., La Rose, J. and Rottapel, R. *Cell* **147**, 1324-1339 (2011).
- MacKeigan, J.P., Murphy, L.O. and Blenis, J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat. Cell Biol.* **7**, 591-600 (2005).
- Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A. and Okada, Y., Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9487-9492 (2000).
- Maeno, E., Takahashi, N. and Okada, Y. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Lett.* **580**, 6513-6517 (2006).
- Mann, D.J., Dombradi, V. and Cohen, P.T. *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *EMBO J.* **12**, 4833-4842 (1993).
- Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Roquin-2 promotes ubiquitin-mediated degradation of ASK1 to regulate stress responses. *Sci. Signal.* **7**, ra8 (2014).
- McHugh, D., Flemming, R., Xu, S.Z., Perraud, A.L. and Beech, D.J. Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 11002-11006 (2003).
- McManus, M.L., Churchwell, K.B. and Strange, K. Regulation of cell volume in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1260-1266 (1995).
- Mercer, J., Snijder, B., Sacher, R., Burkard, C., Bleck, C.K., Stahlberg, H., Pelkmans, L., Helenius, A. RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection. *Cell Rep.* **2**, 1036-1047 (2012).
- Mi, J., Dziegielewska, J., Bolesta, E., Brautigan, D.L. and Larner, J.M. Activation of DNA-PK by ionizing radiation is mediated by protein phosphatase 6. *PLoS One* **4**, e4395 (2009).
- Moriguchi, T., Urushiyama, S., Hisamoto, N., Iemura, S., Uchida, S., Natsume, T., Matsumoto, K. and Shibuya, H. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J. Biol. Chem.* **280**, 42685-42693 (2005).
- Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H.

Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* **20**, 6028-6036 (2001).

Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuzawa, A. and Ichijo, H. Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Mol. Cell* **36**, 805-818 (2009).

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).

Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M. and Sassone-Corsi, P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **324**, 654-657 (2009).

Nikiforov, A., Dölle, C., Niere, M. and Ziegler, M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J. Biol. Chem.* **286**, 21767-21778 (2011).

Numata, T., Sato, K., Okada, Y. and Wehner, F. Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. *Apoptosis* **13**, 895-903 (2008).

Numata, T., Sato, K., Christmann, J., Marx, R., Mori, Y., Okada, Y. and Wehner, F. The ΔC splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J. Physiol.* **590**, 1121-1138 (2012).

Ohama, T., Wang, L., Griner, E.M. and Brautigan, D.L. Protein Ser/Thr phosphatase-6 is required for maintenance of E-cadherin at adherens junctions. *BMC Cell Biol.* **14**, 42 (2013).

Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648 (2006).

Pedersen, S.F., Hoffmann, E.K. and Novak, I. Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer. *Front. Physiol.* **4**, 233 (2013).

Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P. and Scharenberg, A.M. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595-599 (2001)

Pittelli, M., Formentini, L., Faraco, G., Lapucci, A., Rapizzi, E., Cialdai, F., Romano, G., Moneti, G.,

- Moroni, F. and Chiarugi, A. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *J. Biol. Chem.* **285**, 34106-34114 (2010).
- 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).
- Ramsey, I.S., Delling, M. and Clapham, D.E. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 619-647 (2006).
- Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., Takahashi, J.S., Imai, S. and Bass, J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science* **324**, 651-654 (2009).
- Rapizzi, E., Fossati, S., Moroni, F. and Chiarugi, A. Inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase by gallotannin selectively up-regulates expression of proinflammatory genes. *Mol. Pharmacol.* **66**, 890-898 (2004).
- Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 50754-50763 (2004).
- Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**, 164-170 (2007a).
- Revollo, J.R., Körner, A., Mills, K.F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A., Dasgupta, B., Sasaki, Y., Wolberger, C., Townsend, R.R., Milbrandt, J., Kiess, W. and Imai, S. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.* **6**, 363-375 (2007b).
- Rongvaux, A., Shea, R.J., Mulks, M.H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O. and Andris, F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3225-3234 (2002).
- Roy, A., Goodman, J.H., Begum, G., Donnelly, B.F., Pittman, G., Weinman, E.J., Sun, D., Subramanya, A.R. Generation of WNK1 knockout cell lines by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **In press** (2014).
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono,

K. and Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596-2606 (1998).

Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S. and McNiece, I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1431-1437 (1994).

Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H. and Furuichi, K. *Science* **293**, 1327-1330 (2001).

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J. and Stock, C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol. Rev.* **92**, 1865-1913 (2012).

Shi, Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **139**, 468-484 (2009).

Stefansson, B. and Brautigan, D.L. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4-associated protein domain targets I κ B ϵ . *J. Biol. Chem.* **281**, 22624-22634 (2006).

Stefansson, B., Ohama, T., Daugherty, A.E. and Brautigan, D.L. Protein phosphatase 6 regulatory subunits composed of ankyrin repeat domains. *Biochemistry* **47**, 1442-1451 (2008).

Stein, L.R. and Imai, S. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 420-428 (2012).

Subramanyam, M., Takahashi, N., Hasegawa, Y., Mohri, T. and Okada, Y. Inhibition of protein kinase Akt1 by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1) is involved in apoptotic inhibition of regulatory volume increase. *J. Biol. Chem.* **285**, 6109-6117 (2010).

Tanaka, M., Nozaki, M., Fukuhara, A., Segawa, K., Aoki, N., Matsuda, M., Komuro, R. and Shimomura, I. Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 194-201 (2007).

Tobiume, K., Saitoh, H. and Ichijo, H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell. Physiol.* **191**, 95-104 (2002).

Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L. and Johnson, G.L. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 1104-1110 (2003).

- Venkatachalam, K. and Montell, C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 387-417 (2007).
- von Heideman, A., Berglund, A., Larsson, R., Nygren, P. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**, 1165-1172 (2010).
- Voss, F.K., Ullrich, F., Münch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., von Kries, J.P., Stauber, T. and Jentsch, T.J. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* **344**, 634-638 (2014).
- Wang, G., Yang, E., Smith, K.J., Zeng, Y., Ji, G., Connon, R., Fangue, N.A. and Cai, J.J. Gene expression responses of threespine stickleback to salinity: implications for salt-sensitive hypertension. *Front. Genet.* **5**, 312 (2014).
- Wehner, F., Shimizu, T., Sabirov, R. and Okada, Y. Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett.* **551**, 20-24 (2003).
- Yang, H., Yang, T., Baur, J.A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J.J., Lamming, D.W., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A.A., Sinclair, D.A. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* **130**, 1095-1107 (2007).
- Ying, W. and Swanson, R.A. The poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor gallotannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport* **11**, 1385-1388 (2000).
- Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J. and Imai, S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* **14**, 528-536 (2011).
- Zeng, K., Bastos, R.N., Barr, F.A. and Gruneberg, U. Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J. Cell Biol.* **191**, 1315-1332 (2010).
- Zhang, Y., Liu, S., Mickanin, C., Feng, Y., Charlat, O., Michaud, G.A., Schirle, M., Shi, X., Hild, M., Bauer, A., Myer, V.E., Finan, P.M., Porter, J.A., Huang, S.M. and Cong, F. RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat. Cell. Biol.* **13**, 623-629 (2011).
- Zhong, J., Liao, J., Liu, X., Wang, P., Liu, J., Hou, W., Zhu, B., Yao, L., Wang, J., Li, J., Stark, J.M., Xie, Y. and Xu, X. Protein phosphatase PP6 is required for homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10**, 1411-1419 (2011).

Zhu, W., Begum, G., Pointer, K., Clark, P.A., Yang, S.S., Lin, S.H., Kahle, K.T., Kuo, J.S. and Sun, D. WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration. *Mol. Cancer* **13**, 31 (2014).

梅田剛. 浸透圧ストレスにおける ASK3 の活性制御機構と新たな生理機能の解析. 博士論文, 東京大学 (平成 21 年度).

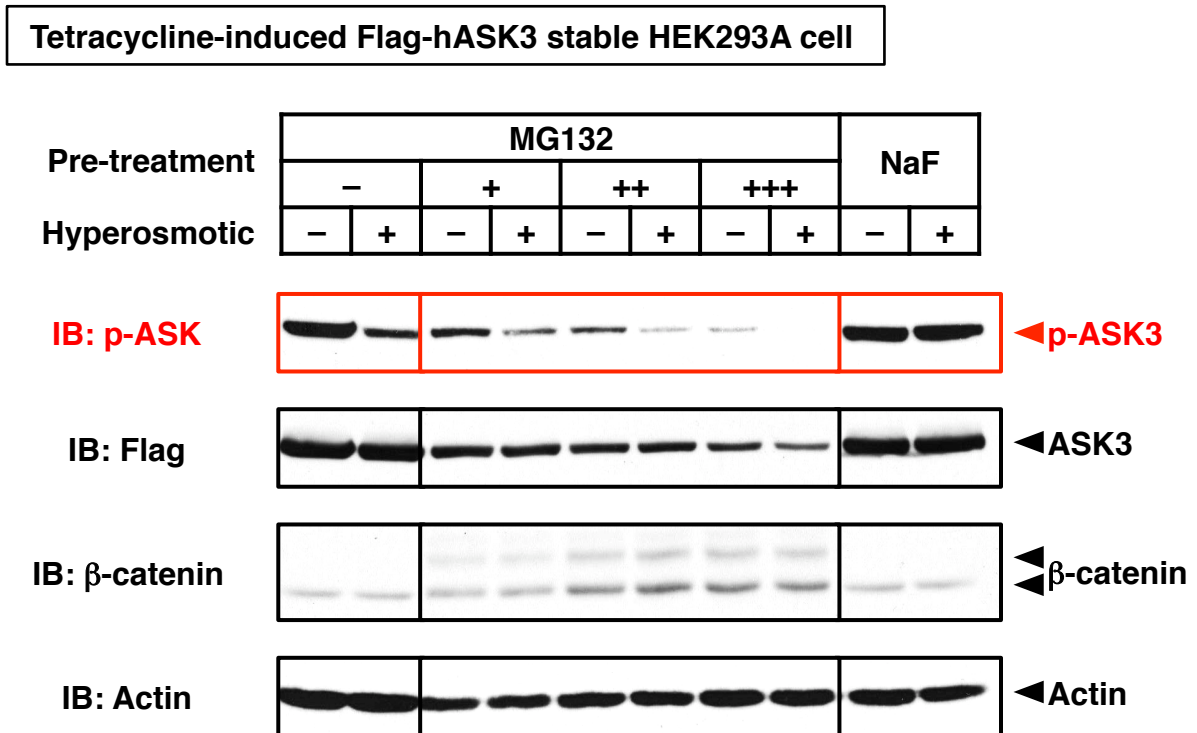
小林夕美恵, 新規 ASK1 相同分子 ASK3 の機能解析. 修士論文, 東京大学 (平成 16 年度).

芝本絵理香, 浸透圧ストレス応答分子 ASK3 の結合タンパク質 SGT1 および CACYBP の機能解析. 卒業論文, 東京大学 (平成 26 年度).

渡邊謙吾. High-content genome-wide RNAi screening による高浸透圧ストレス依存的な ASK3 不活性化制御因子の網羅的探索および解析. 修士論文, 東京大学 (平成 23 年度).

渡邊謙吾, 名黒功, 一條秀憲. ハイコンテンツゲノムワイド siRNA スクリーニングによるシグナル伝達研究への応用. *実験医学*, **32**, 1405-1410 (2014).

図表



**Fig.01 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、プロテアソーム活性ではなく、
プロテインホスファターゼ活性が必要である**

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、プロテアソーム活性阻害剤 MG132 を 24 時間前処置、あるいは、汎プロテインホスファターゼ阻害剤 NaF を 30 分間前処置し、浸透圧刺激を行った。MG132 処置によって確かに β-catenin の量が増えているところで、高浸透圧ストレス依存的に ASK3 の量が増加したり、不活性化が抑制したりすることはなかった。一方、NaF 処置によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が抑制された。MG132: -/+ / ++ / +++ = 0/0.625/1.25/2.5 μM (1% DMSO), 24 時間。NaF: 50 mM, 30 分間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

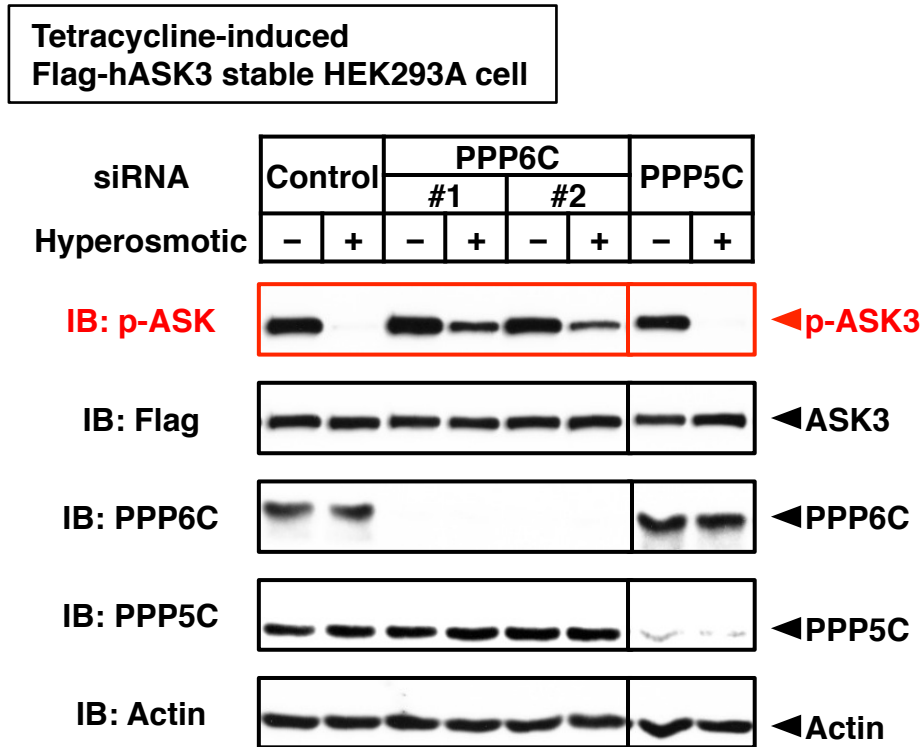


Fig.02 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には, PPP5C ではなく PPP6C が必要である
 テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において, 各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し, 浸透圧刺激を行った. PPP6C の発現抑制によって, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたが, PPP5C の発現抑制では見られなかった. siRNA: 10 nM, 48 時間. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.

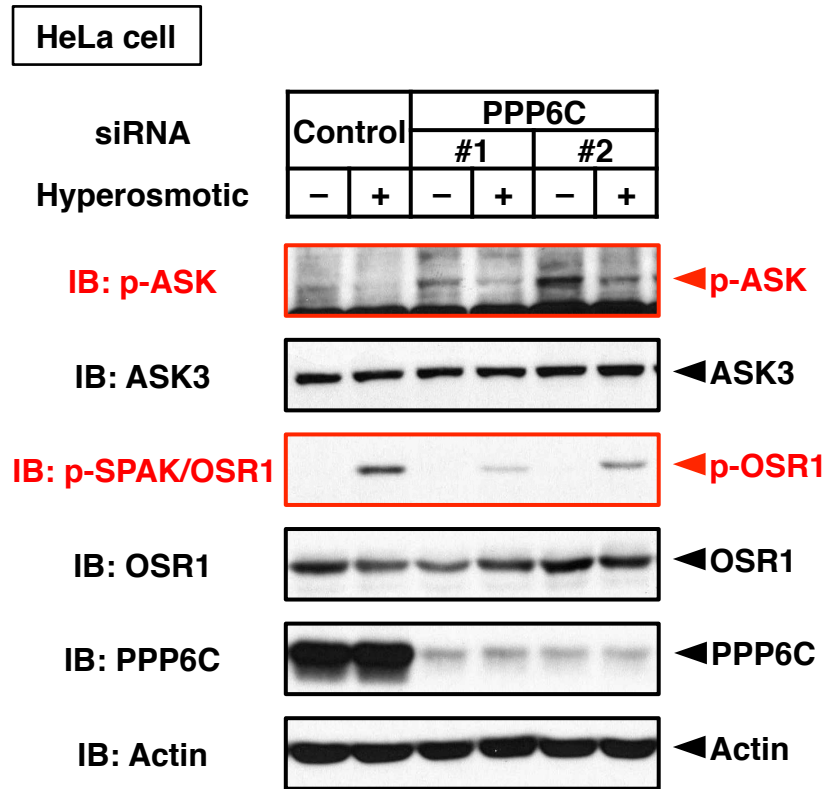


Fig.03 高浸透圧ストレス下の ASK 活性の抑制には, PPP6C が必要である

HeLa 細胞において, 各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し, 浸透圧刺激を行った. PPP6C の発現抑制によって, 内在性の ASK 活性が上昇した. また, PPP6C の発現抑制によって, OSR1 リン酸化 (活性化) の抑制も確認された. siRNA: 10 nM, 48 時間. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.

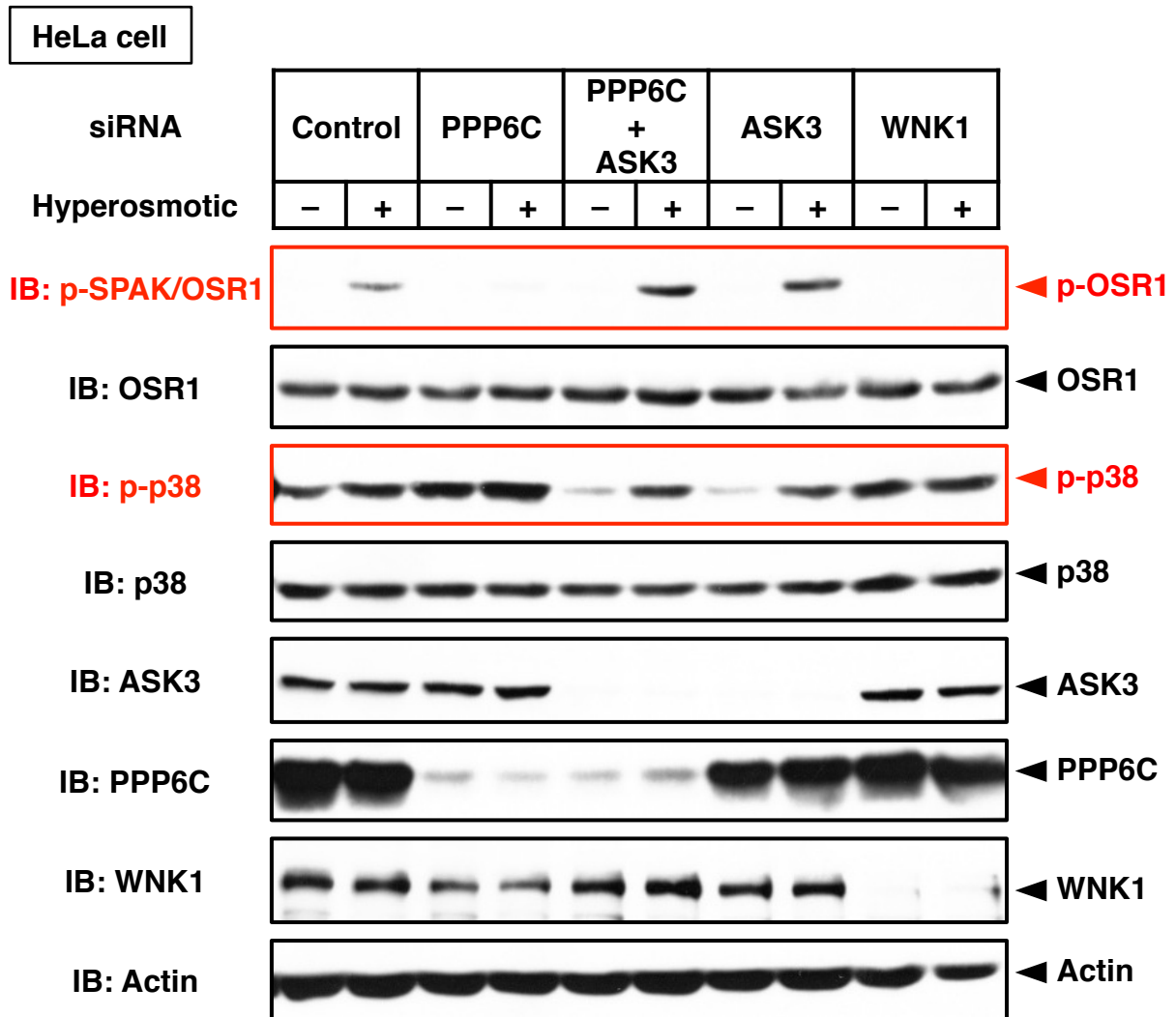


Fig.04 PPP6C 発現抑制による OSR1 活性化の抑制・p38 活性の増強は ASK3 を介する

HeLa 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、浸透圧刺激を行った。PPP6C の発現抑制によって、高浸透圧ストレスによる OSR1 活性化の抑制と、p38 活性の増強が見られた。さらに ASK3 と共に発現抑制すると、ASK3 単独の発現抑制同様、高浸透圧ストレスによる OSR1 活性化の亢進と、p38 活性の減弱が見られた。siRNA: 10 nM, 48 時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

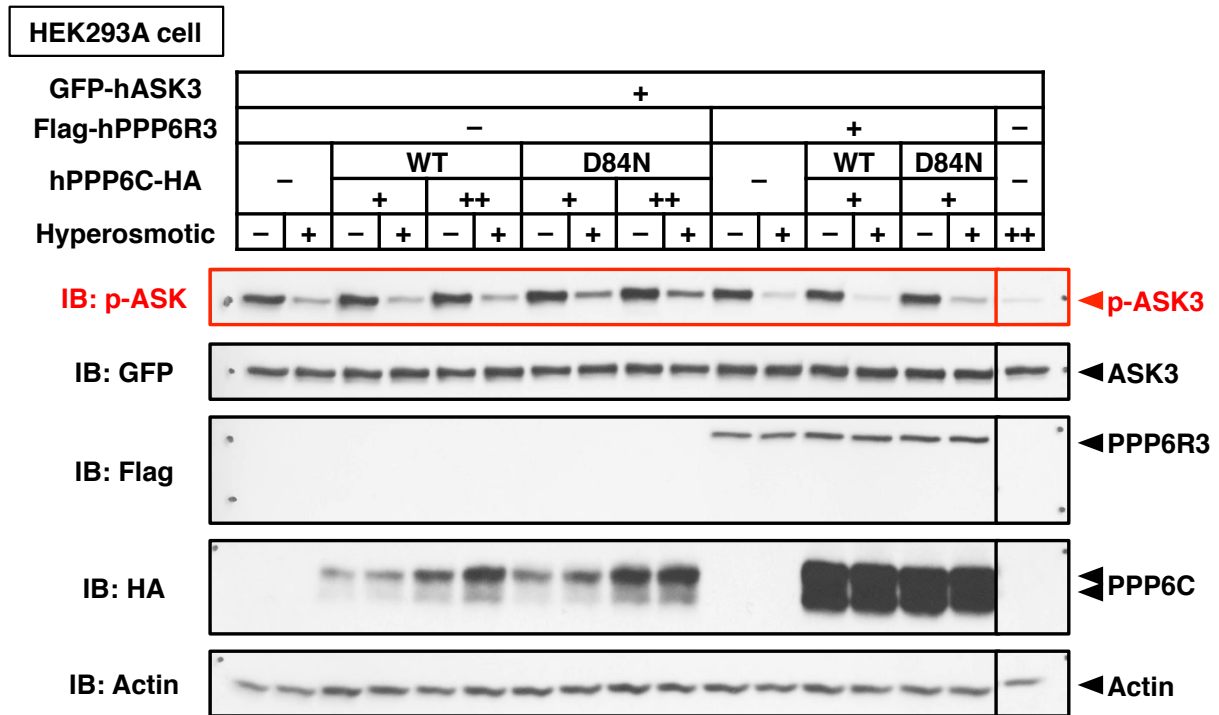


Fig.05 PP6 コア酵素の過剰発現によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進する
 HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った。PPP6C 単独過剰発現ではなく、PP6 コア酵素 (PPP6C + PPP6R3) を過剰発現すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進した。一方、PPP6C の不活性化型変異体 D84N との共発現では、ドミナントネガティブ効果が見られた。Hyperosmotic: -/+ / ++ = 300 mOsm / 400 mOsm / 500 mOsm, 10 分間。

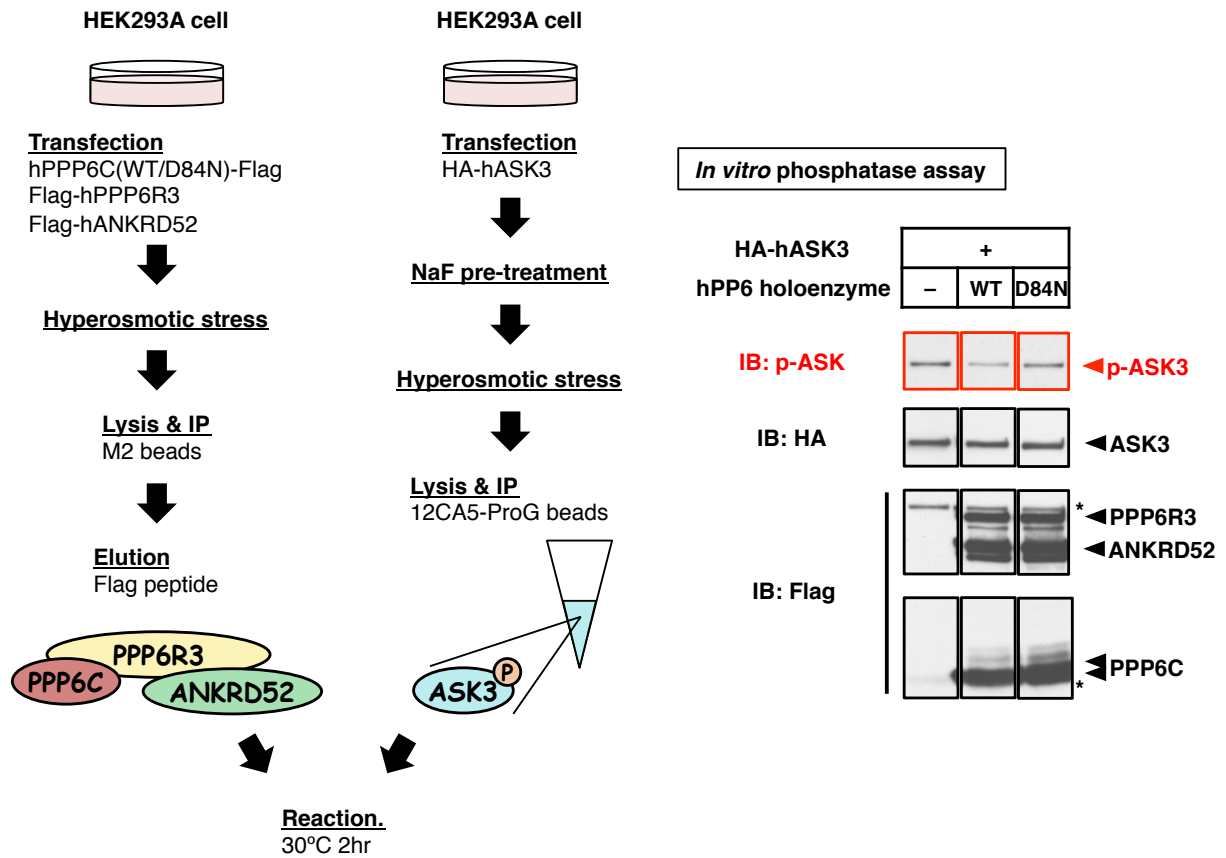


Fig.06 PP6 は ASK3 の直接のプロテインホスファターゼである

HEK293A 細胞において過剰発現した PP6 と ASK3 をそれぞれ免疫沈降法にて精製し、混ぜて *in vitro* で反応させた。不活性化型変異体 D84N の PP6 ではなく、野生型の PP6 でのみ、ASK3 の脱リン酸化が見られた。

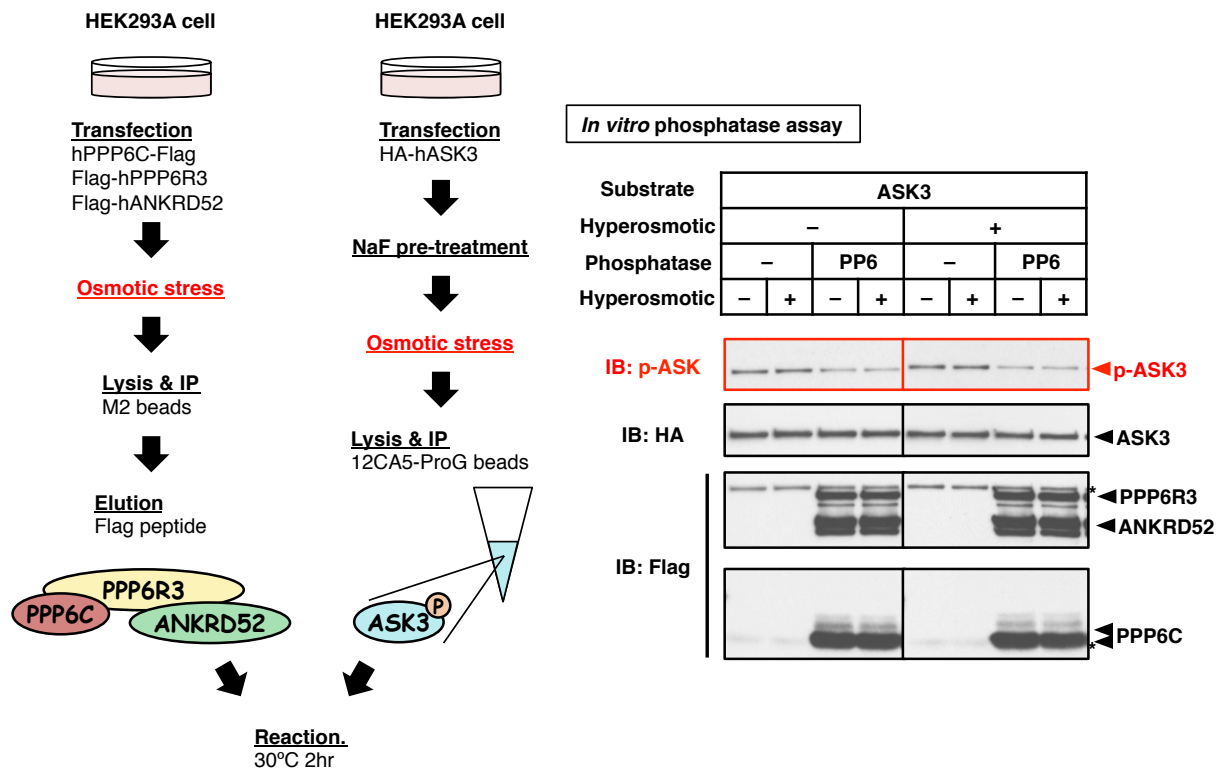


Fig.07 高浸透圧ストレスによって PP6 の脱リン酸化能や ASK3 の被脱リン酸化能は増加しない

HEK293A 細胞において過剰発現した PP6 と ASK3 をそれぞれ免疫沈降法にて精製し、混ぜて *in vitro* で反応させた。この際、細胞溶解前に浸透圧刺激を行った。高浸透圧ストレス後に精製した PP6 と等浸透圧状態で精製した PP6 は、同程度に ASK3 を脱リン酸化した。また、高浸透圧ストレス後に精製した ASK3 と等浸透圧状態で精製した ASK3 は、同程度に PP6 に脱リン酸化された。

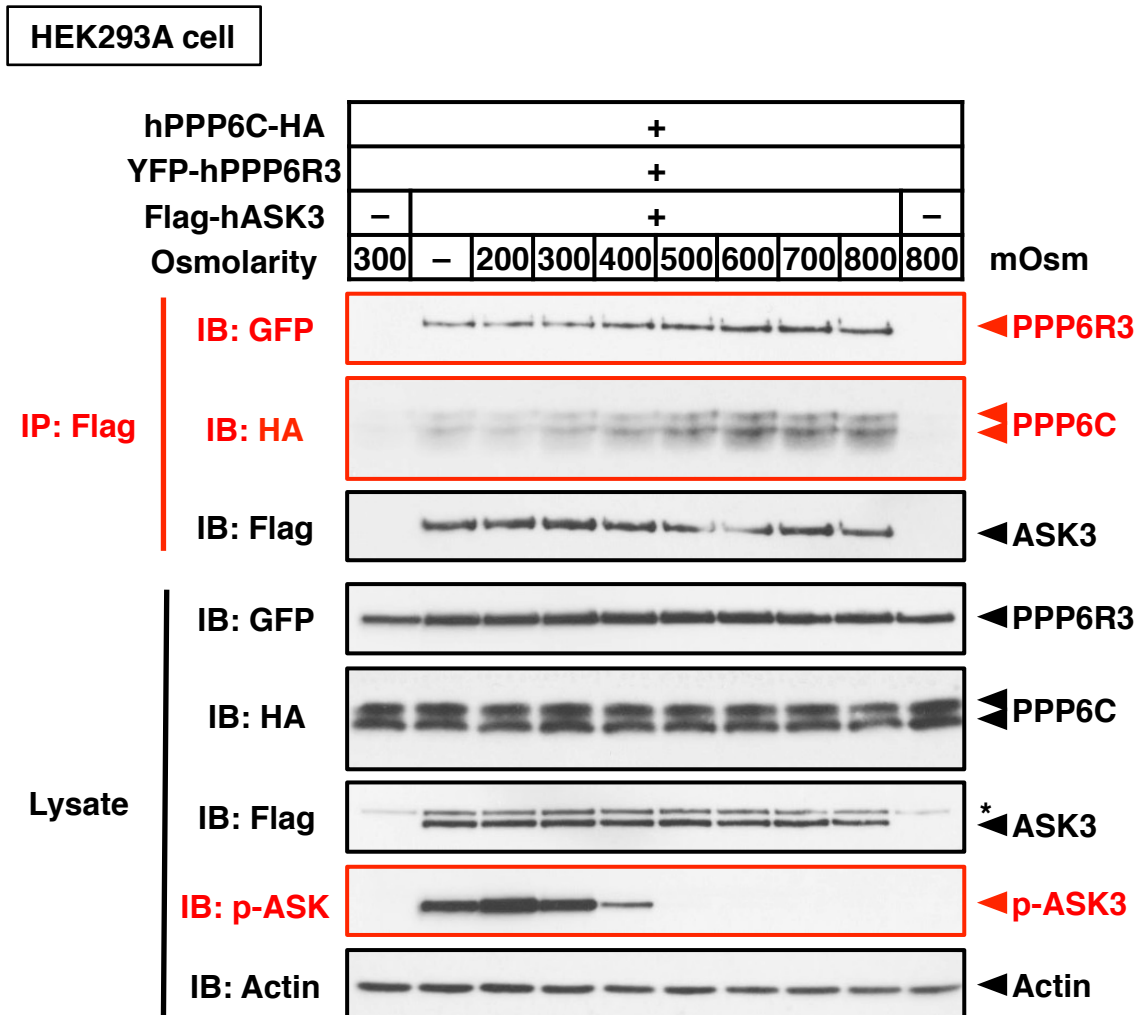


Fig.08 高浸透圧ストレスの強度依存的に ASK3 と PP6 の結合が増加する

HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った後、ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した。高浸透圧ストレスの強度依存的に ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量が増加した。この時、ASK3 と PP6 の結合は、ASK3 の活性と逆相関していた。Osmolarity: 各浸透圧, 10 分間。

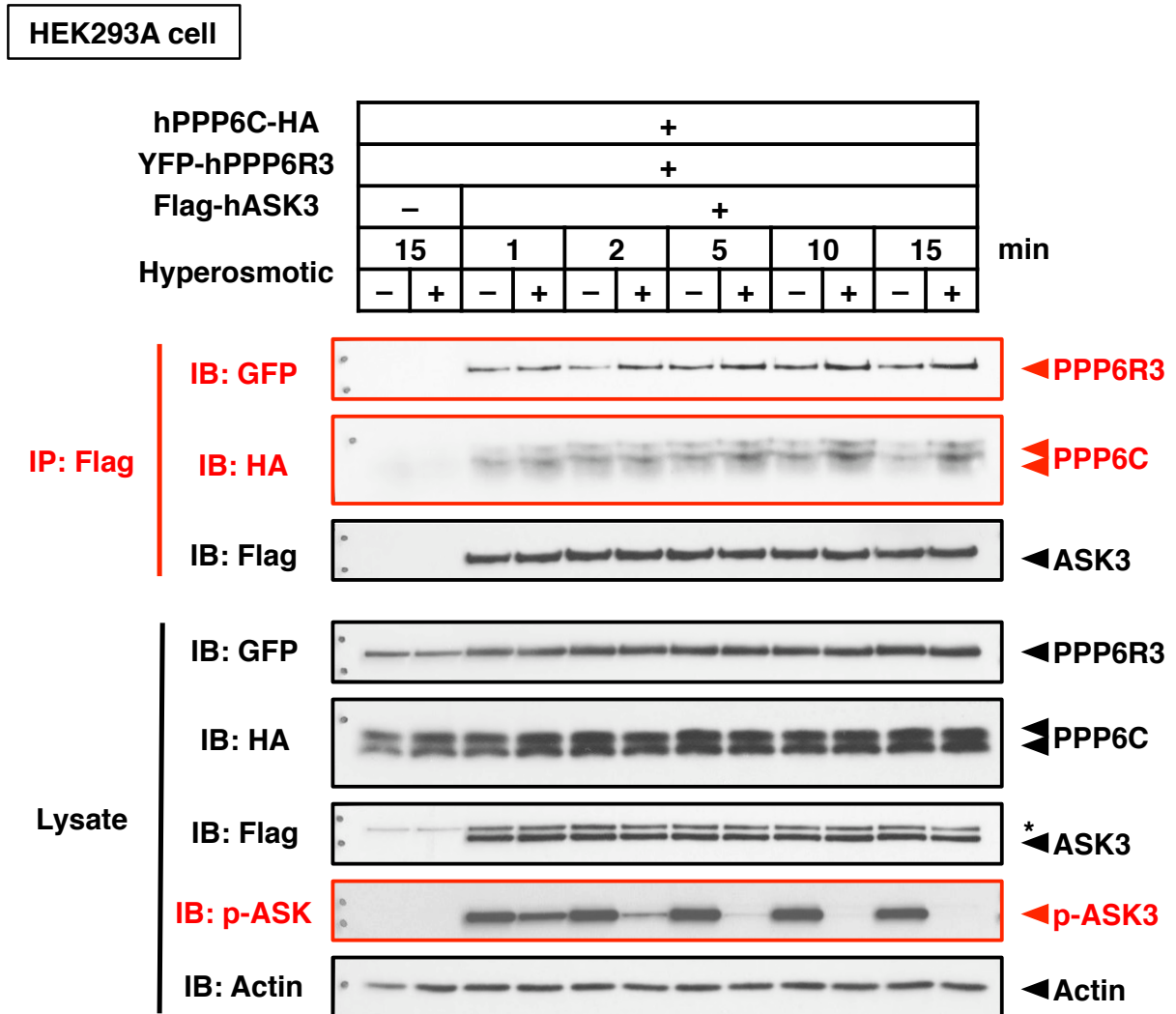


Fig.09 高浸透圧ストレス後、数分で ASK3 と PP6 の結合は増加する

HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った後、ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した。高浸透圧ストレスから数分で、ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量の増加が見られ、5 分後以降にはほぼ一定となった。この時、ASK3 と PP6 の結合は、ASK3 の不活性化とほぼ同じタイムコースで推移していた。Hyperosmotic: 500 mOsm, 各時間。

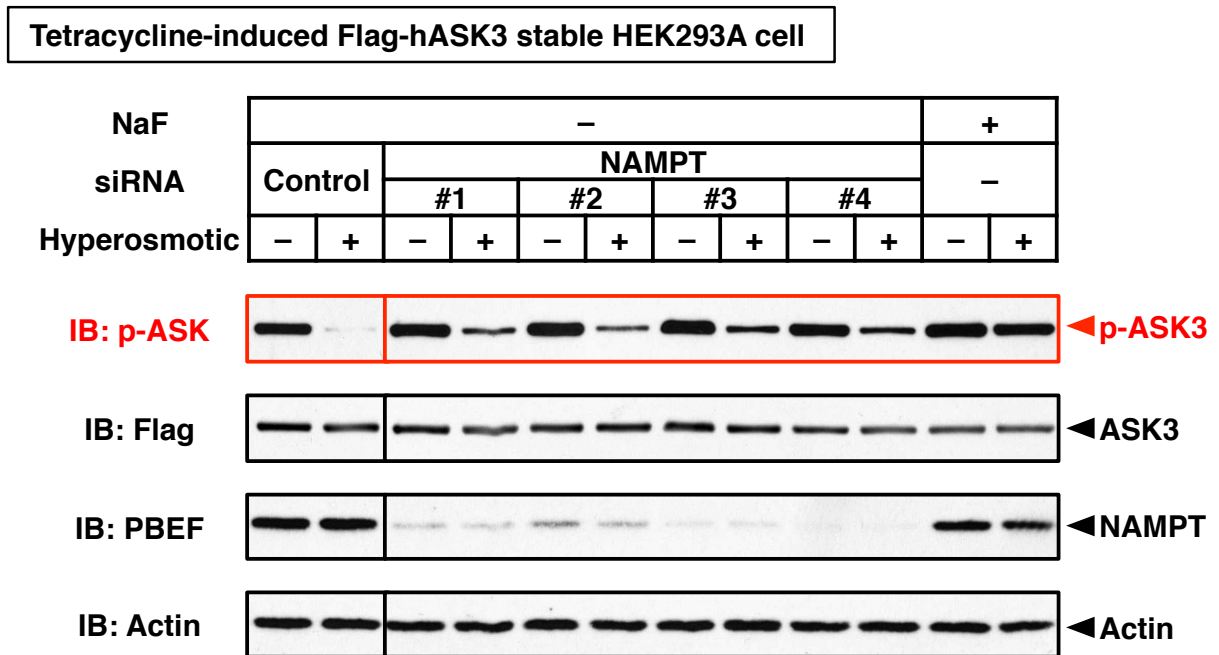


Fig.10 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、NAMPT が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、各 siRNA をリバーストランスフェクションにて導入し、浸透圧刺激を行った。NAMPT の発現抑制によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた。NaF: 50 mM, 30 分間前処置。siRNA: Dharmacon ON-TARGETplus, 10 nM, 48 時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

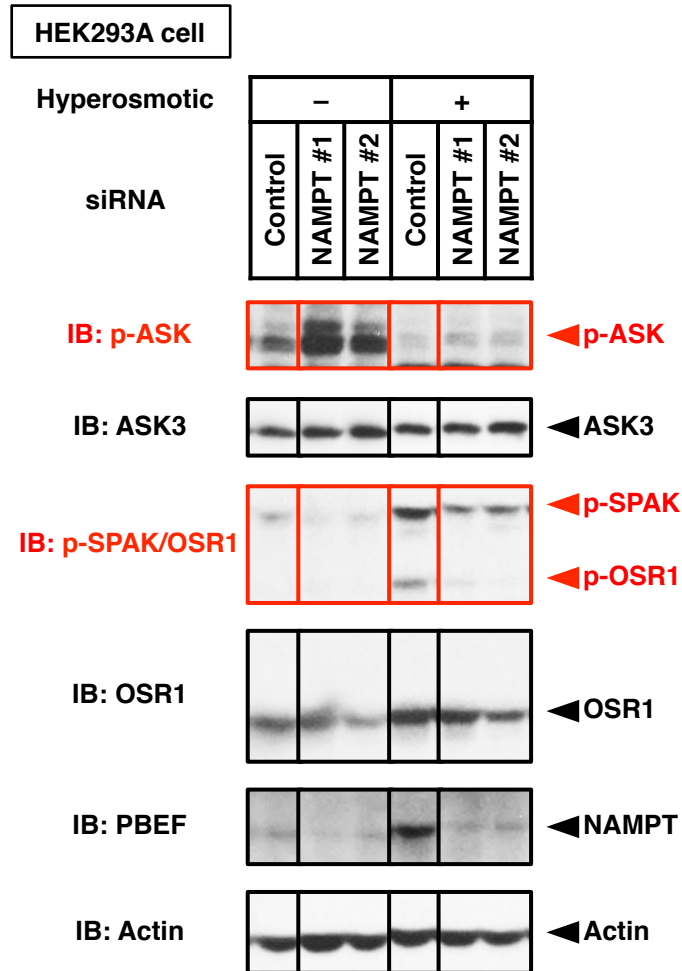


Fig.11 高浸透圧ストレス下の ASK 活性の抑制には、NAMPT が必要である

HEK293A 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、浸透圧刺激を行った。NAMPT の発現抑制によって、内在性の ASK 活性が上昇した。また、NAMPT の発現抑制によって、OSR1 リン酸化 (活性化) の抑制も確認された。siRNA: 10 nM, 48 時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

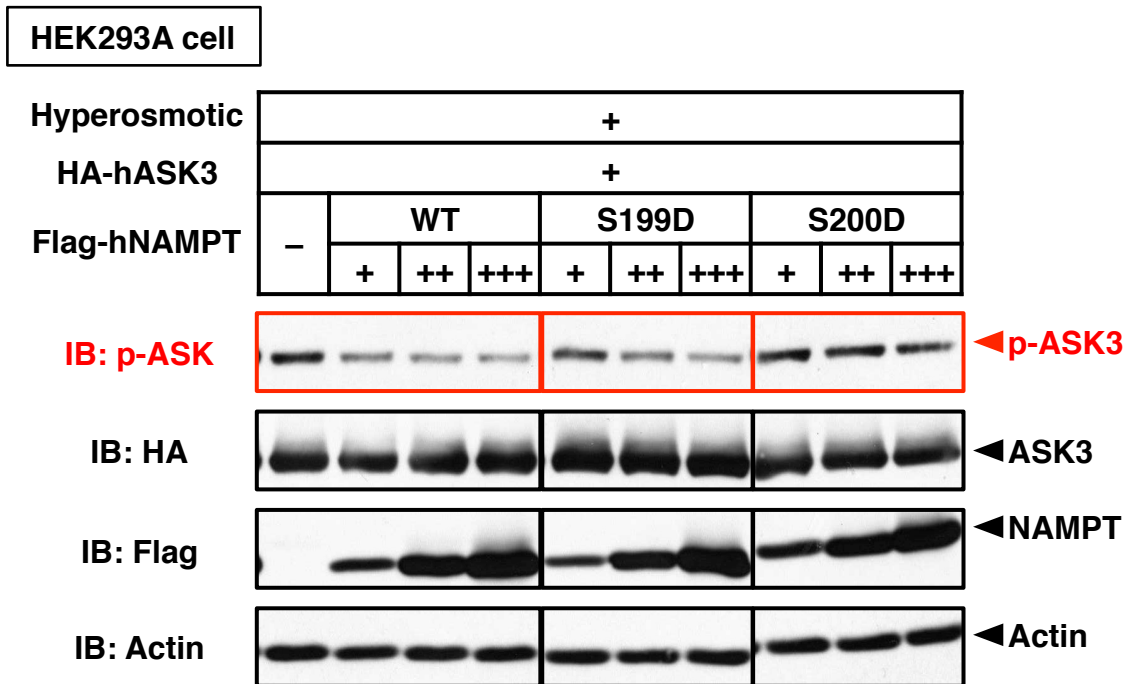


Fig.12 NAMPT の過剰発現によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進する

HEK293A 細胞において、ASK3・NAMPT を過剰発現し、浸透圧刺激を行った。NAMPT の過剰発現によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進した。一方、NAMPT 二量体化の部分抑制変異体である S199D の過剰発現では ASK3 不活性化の亢進効果は弱くなり、NAMPT 二量体化の完全抑制変異体である S200D の過剰発現では ASK3 不活性化の亢進は見られなかった。Hyperosmotic: + = 400 mOsm, 10 分間。

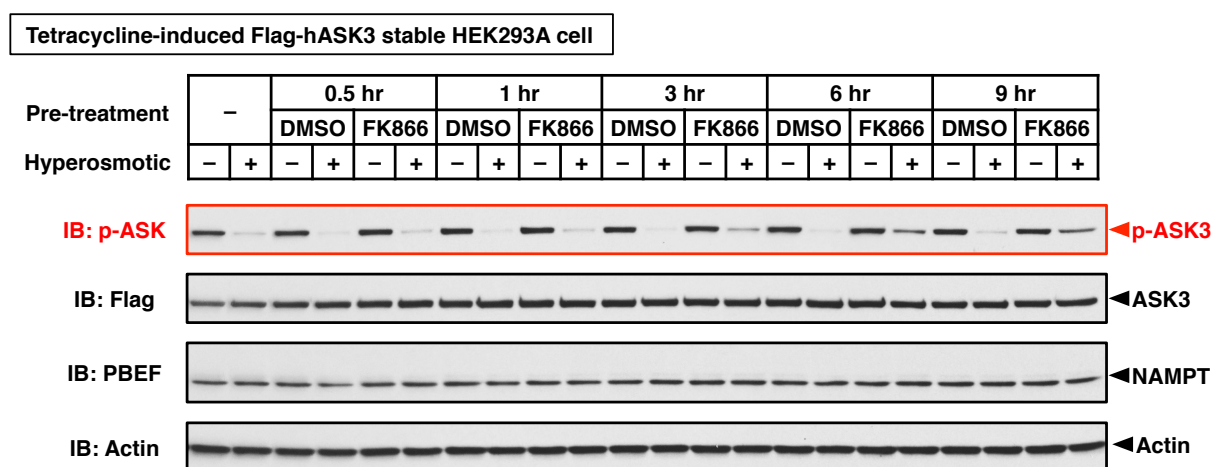


Fig.13 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、NAMPT 活性が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、NAMPT 特異的阻害剤 FK866 を前処置し、浸透圧刺激を行った。FK866 を比較的長時間前処置すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた。FK866: 10 nM (1% DMSO), 各時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

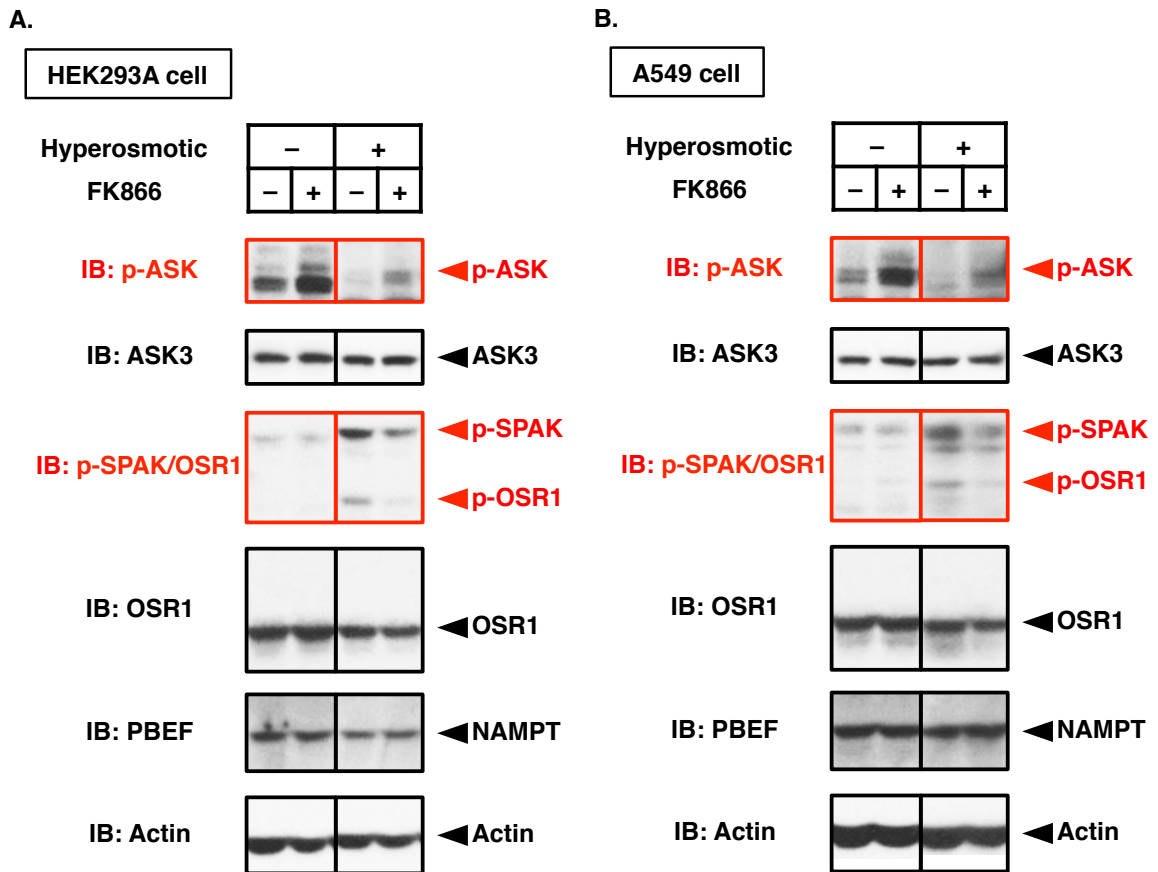


Fig.14 高浸透圧ストレス下の ASK 活性の抑制には、NAMPT 活性が必要である

HEK293A 細胞(A), A549 細胞(B)において, NAMPT 特異的阻害剤 FK866 を前処置し, 浸透圧刺激を行った. FK866 前処置によって, 内在性の ASK 活性が上昇した. また, FK866 前処置によって OSR1 活性化の抑制も確認された. FK866: 10 nM (1% DMSO), 6 時間. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.

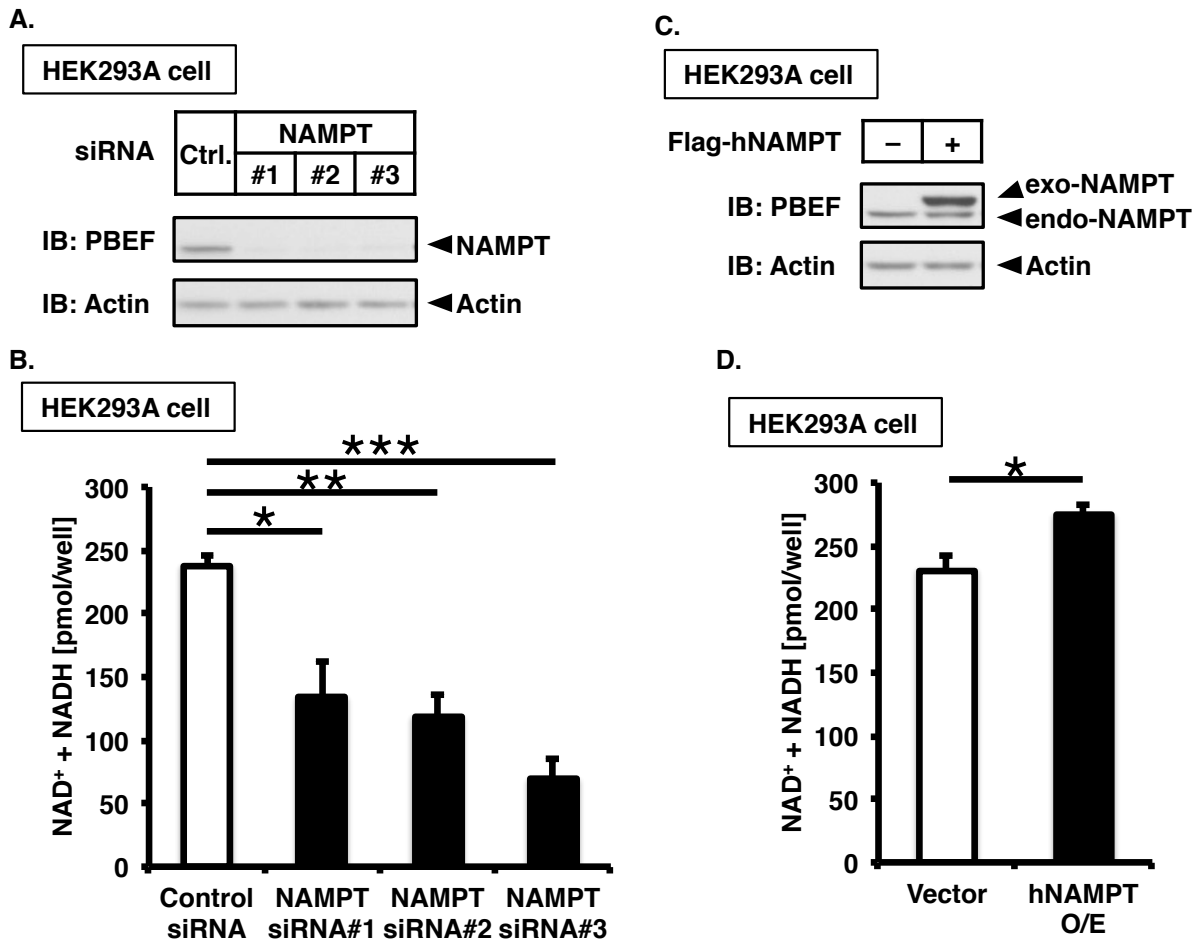


Fig.15 NAMPT の量変化は細胞内 NAD 量と正に相関する

(A & B) HEK293A 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、60 時間後に細胞を溶解した。(C & D) HEK293A 細胞において、過剰発現し、30 時間後に細胞を溶解した。(B & D) 細胞溶解液から、酵素反応を利用した赤色蛍光による検出キットによって NAD (NAD⁺ + NADH) 量を測定した。NAMPT の発現抑制によって NAD 量は減少し、逆に NAMPT の過剰発現によって NAD 量は増加した。siRNA: 10 nM, 60 時間。数値は MEAN ± S.E.M., N=3。(B) One-way ANOVA, followed by Dunnett's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。(D) Two-tailed t-test (* $P < 0.05$)

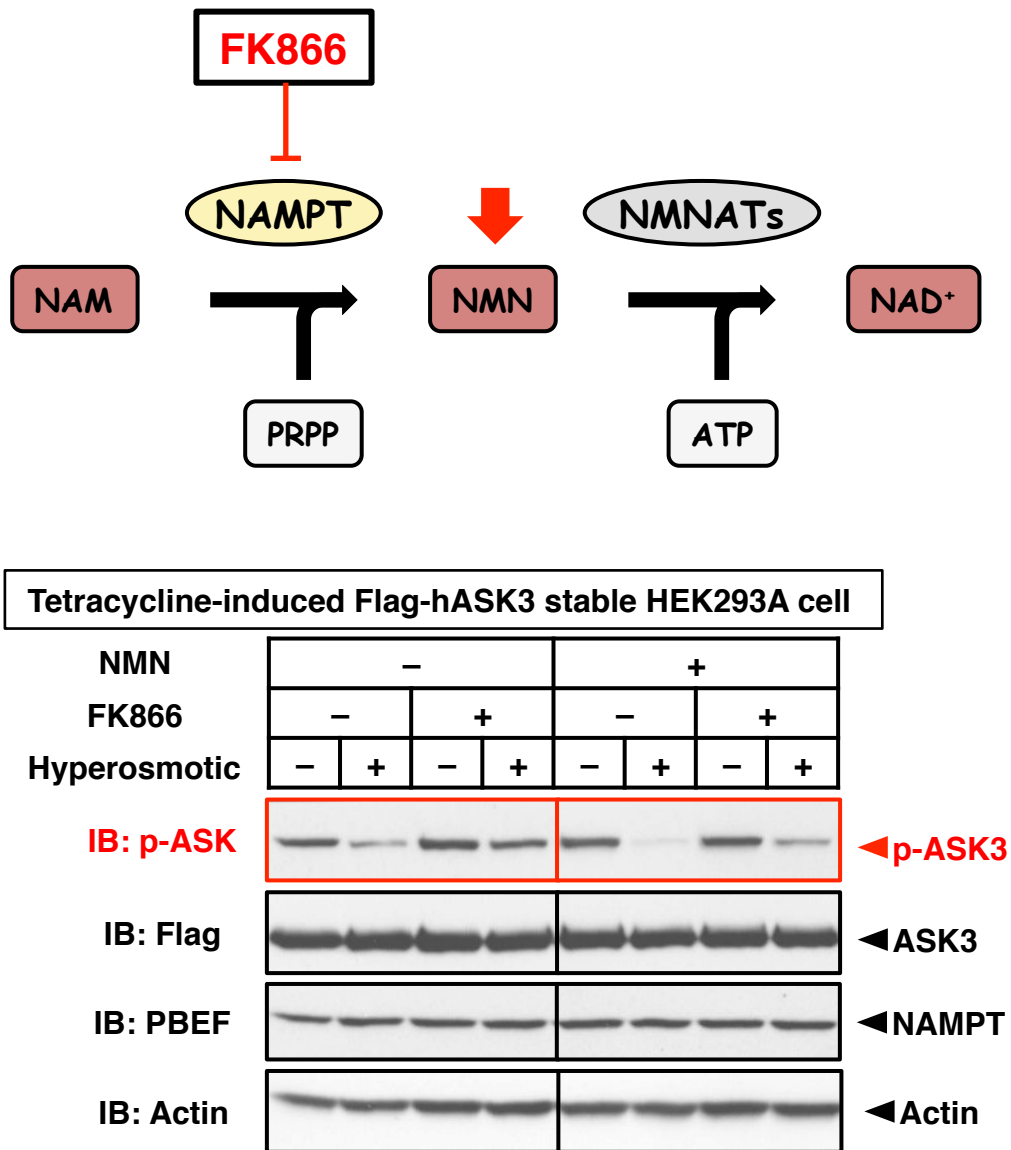


Fig.16 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、NMN が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、FK866・NMN を前処置し、浸透圧刺激を行った。FK866 によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたところで、さらに NMN を添加すると、その抑制が解除された。また、NMN 単独添加は、NAMPT の過剰発現と同様、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進した。FK866: 10 nM (1 % DMSO), 6 時間前処置。NMN: 1 mM, 6 時間前処置。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

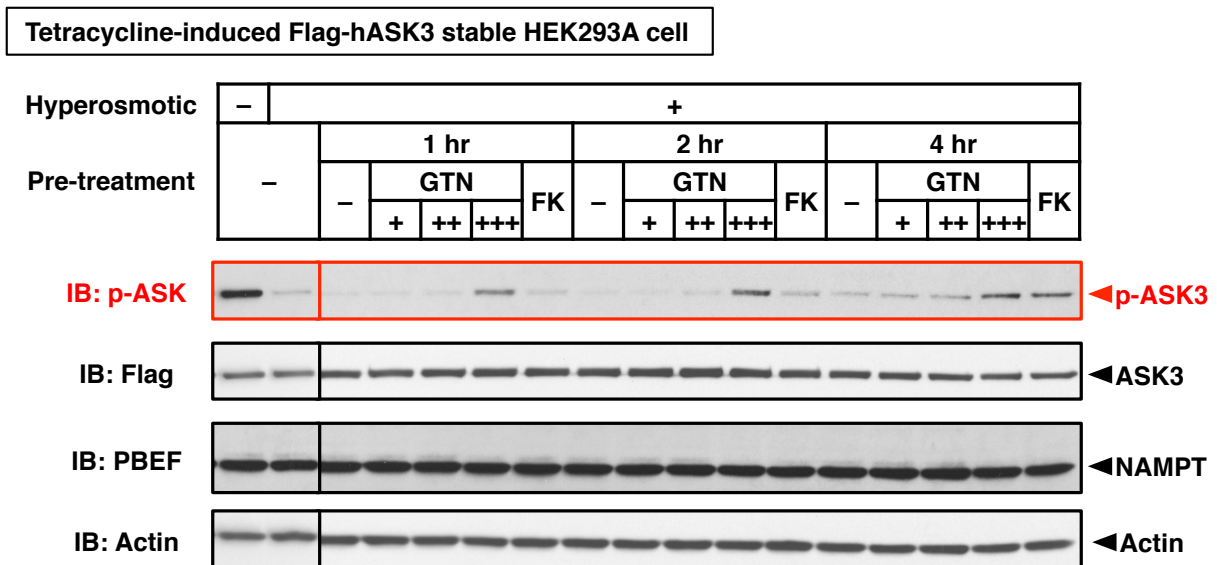
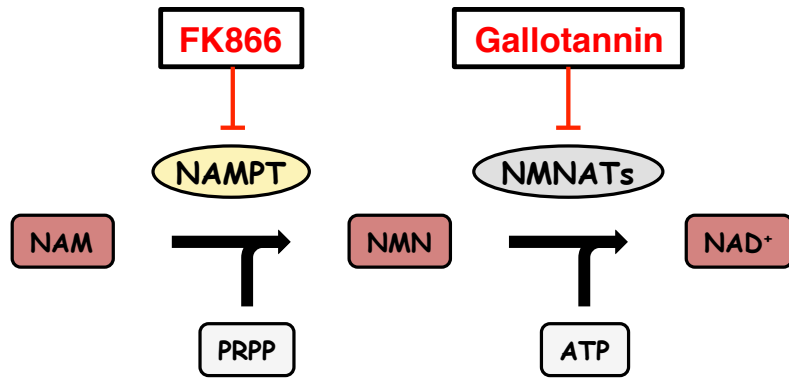


Fig.17 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には, NMNAT 活性が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において, NAMPT 特異的阻害剤 FK866・NMNATs 阻害剤 Gallotannin を前処置し, 浸透圧刺激を行った. 100 mM Gallotannin によって, FK866 よりも早く, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた. GTN: +/++/+++ = 1/10/100 μM Gallotannin (1 % DMSO), 各時間前処置. FK: 10 nM FK866 (1 % DMSO), 各時間前処置. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.

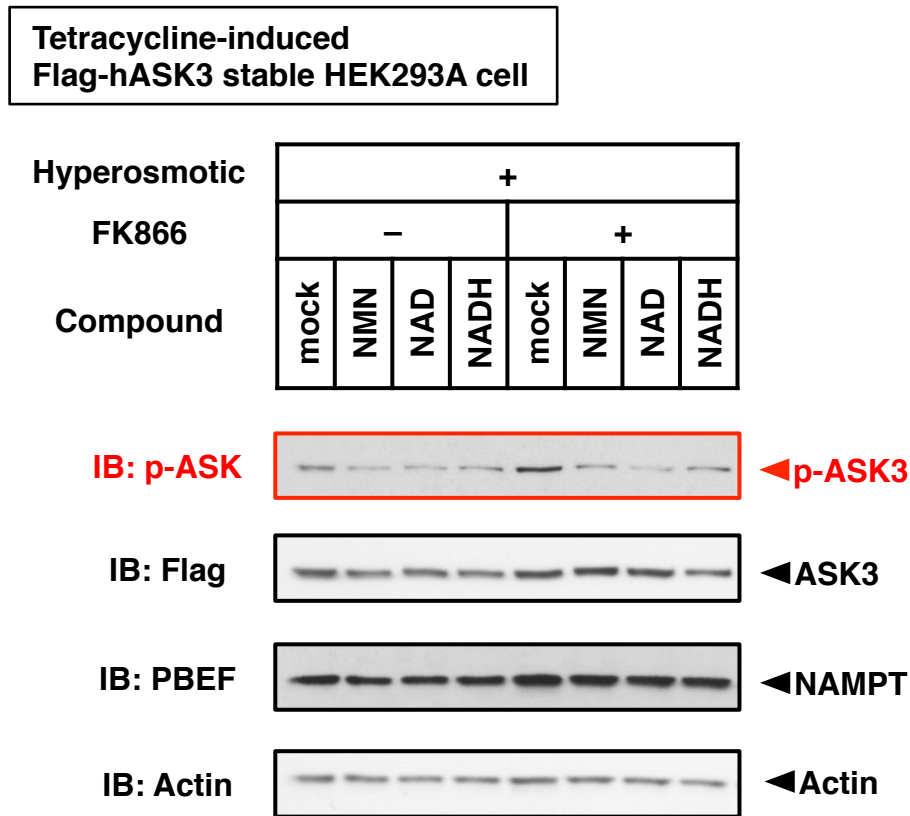


Fig.18 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、NAD が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、FK866・NMN・NAD⁺・NADH を前処置し、浸透圧刺激を行った。FK866 によって高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られたところで、さらに NAD⁺や NADH を添加すると、NMN と同様にその抑制が解除された。また、NAD⁺や NADH 単独添加は、NMN と同様に高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進した。
 FK866: 10 nM (1 % DMSO), 3 時間前処置。NMN, NAD⁺, NADH: 1 mM, 3 時間前処置。
 Hyperosmotic: 400 mOsm, 10 分間。

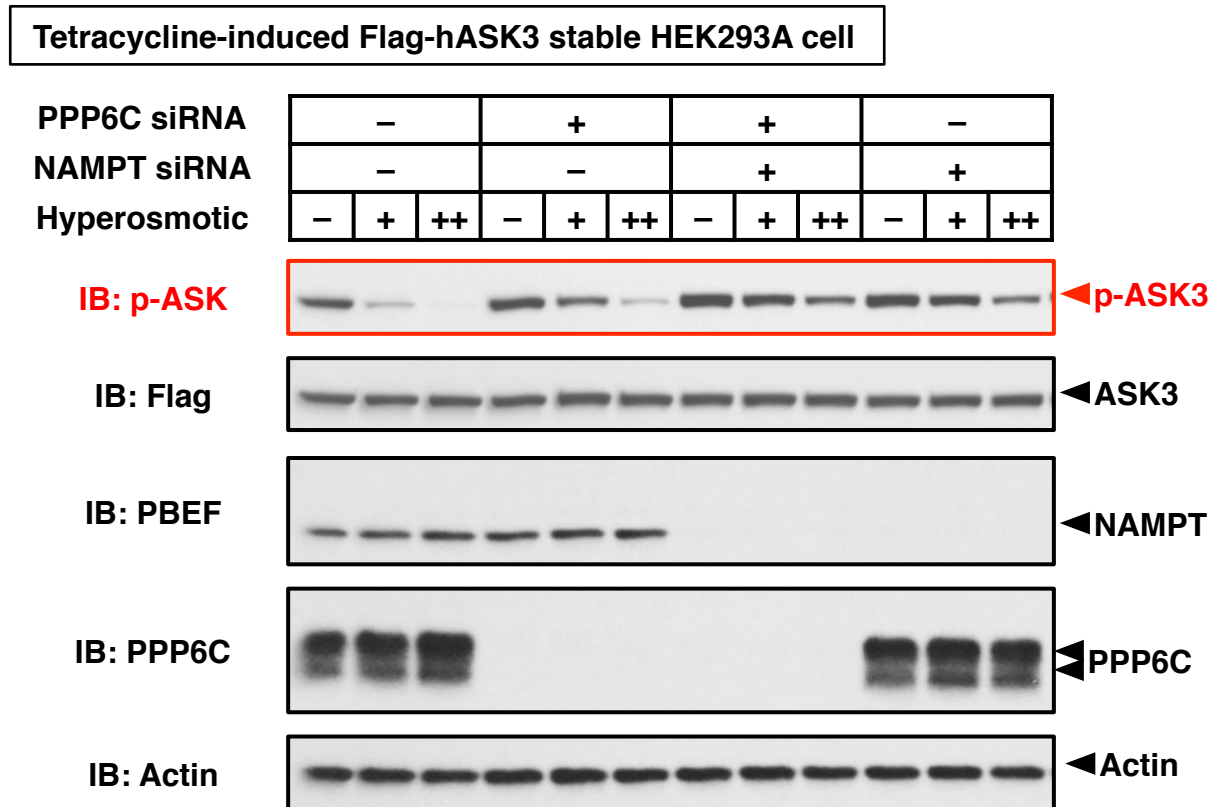


Fig.19 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において, NAMPT は PP6 の上流に位置するテトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において, 各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し, 浸透圧刺激を行った. スクリーニング同様, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制効果は, NAMPT の発現抑制の方が PPP6C の発現抑制よりも強かった. そして, NAMPT と PPP6C を両方発現抑制した場合は, NAMPT の単独発現抑制の場合と同程度にしか, 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られなかった. siRNA: 10 nM, 60 時間. Hyperosmotic: -/+/+ = 300 mOsm/400 mOsm/500 mOsm, 10 分間.

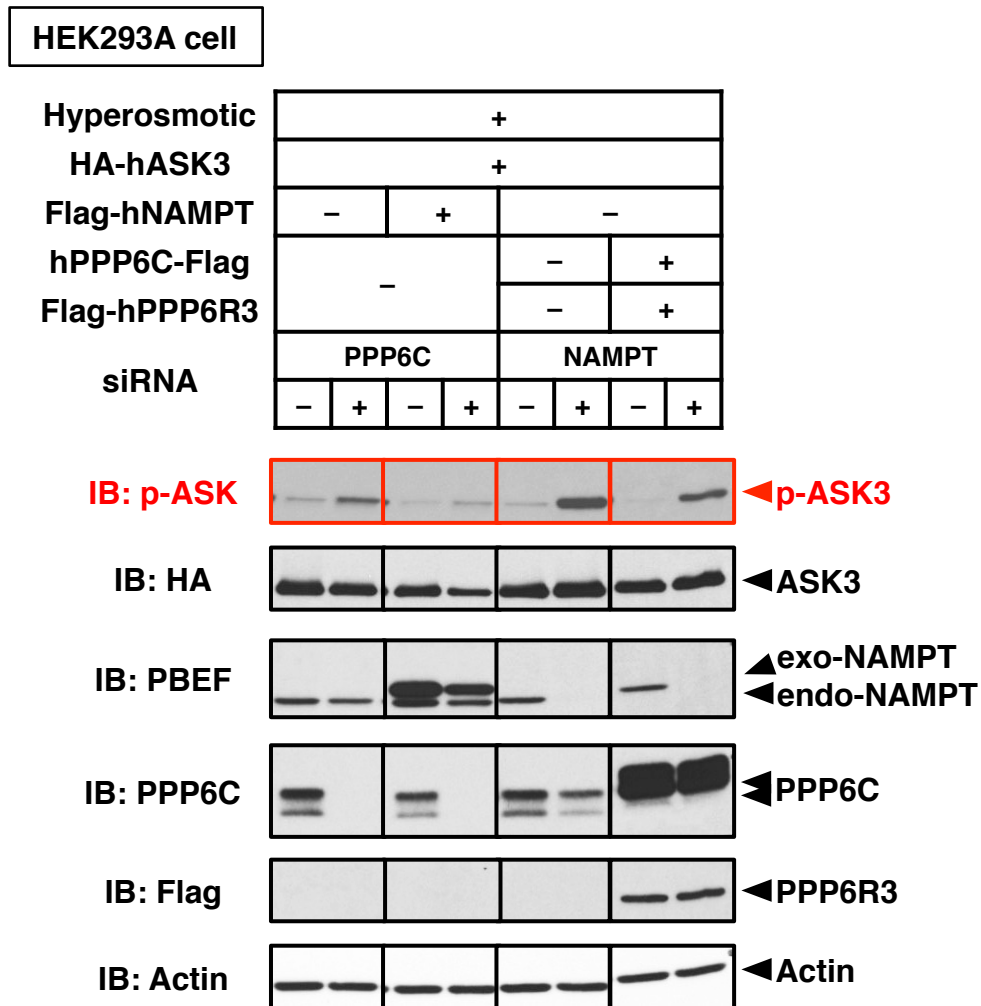


Fig.20 NAMPT は PP6 と未知の経路を介して ASK3 不活性化に関わる

HEK293A 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、さらに 24 時間後に ASK3・NAMPT・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現した後、浸透圧刺激を行った。NAMPT の発現抑制による高浸透圧ストレス下の ASK3 不活性化抑制は、PPP6 の過剰発現によって減弱した (右 4 レーン)。また、PPP6C の発現抑制による高浸透圧ストレス下の ASK3 不活性化抑制は、NAMPT の過剰発現によって減弱した (左 4 レーン)。siRNA: 10 nM, 60 時間。過剰発現: 36 時間。Hyperosmotic: 400 mOsm, 10 分間。

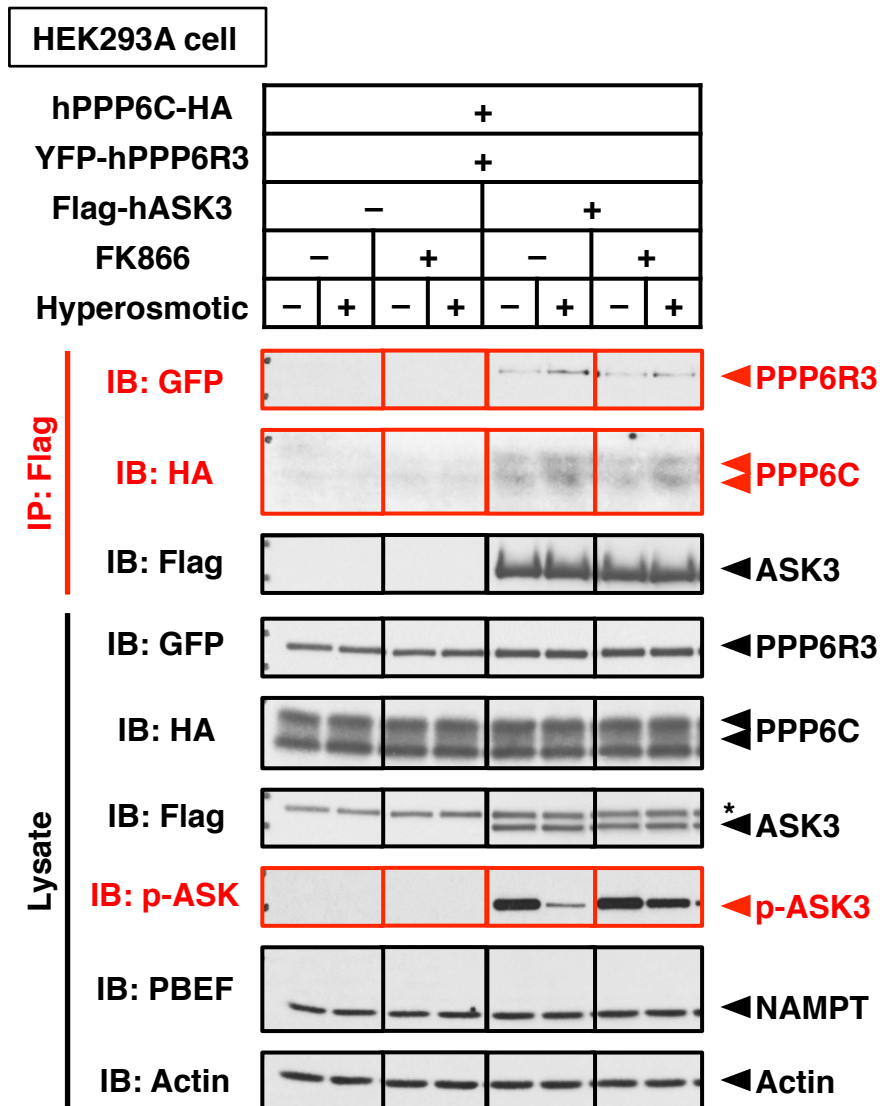


Fig.21 高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合に NAMPT 活性は必要である

HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、FK866 を前処置して浸透圧刺激を行った後、ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した。FK866 によって、ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量がわずかに減少した。この時、FK866 によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制も確認された。FK866: 1 μ M, 12 時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

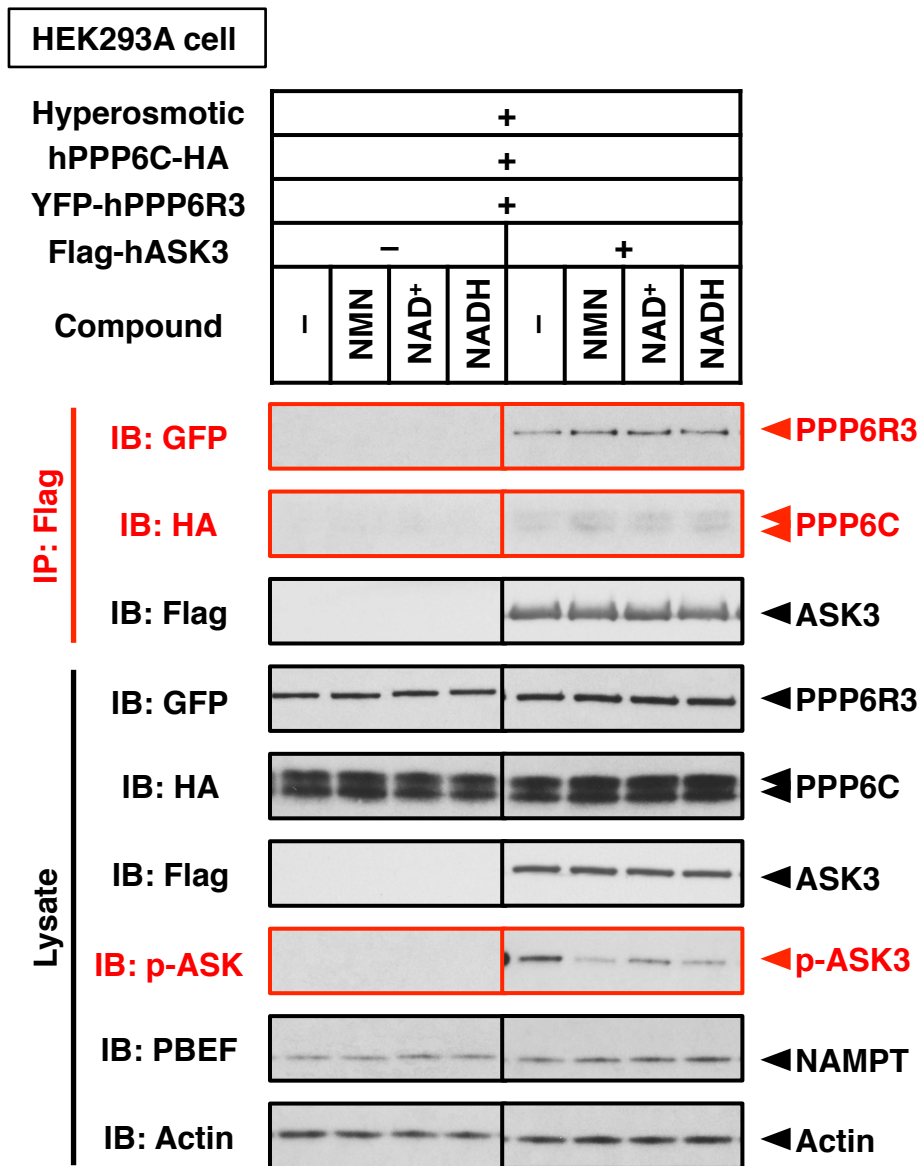


Fig.22 NMN・NAD⁺・NADH は高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合を亢進する
 HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、NMN・NAD⁺・NADH を前処置して浸透圧刺激を行った後、ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した。高浸透圧ストレス時に ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量が、NMN・NAD⁺・NADH によってわずかに増加した。この時、NMN・NAD⁺・NADH によって ASK3 の活性は減少していた。NMN・NAD⁺・NADH: 1 mM, 12 時間。
 Hyperosmotic: 400 mOsm, 10 分間。

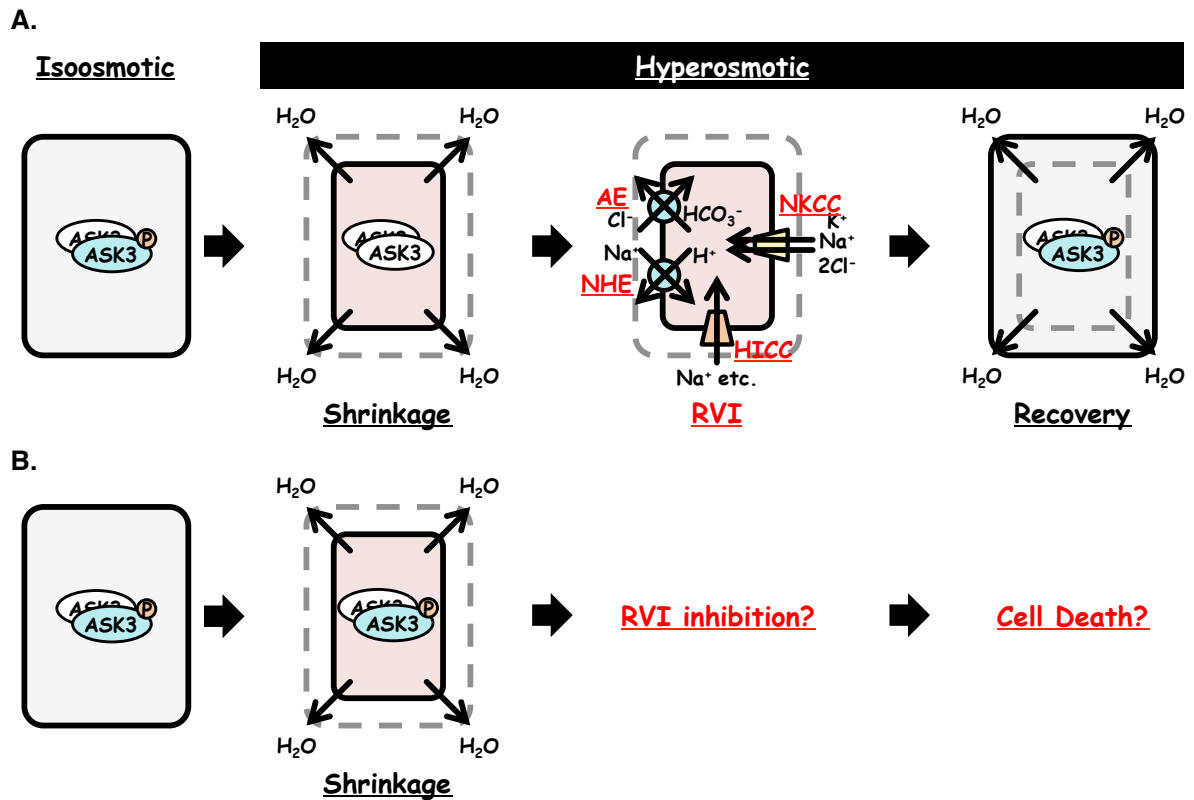


Fig.23 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の生理学的意義

(A) 正常な状態. 細胞は、高浸透圧ストレスにさらされると、水の流出入に伴い強制的に収縮してしまうが、AE と共役した NHE や NKCC を活性化させ、NaCl を細胞内に取り込むことで細胞体積を回復する機構 (RVI)を有する. この時、高浸透圧ストレス依存的に活性化する非選択的カチオンチャネル (HICC)の存在が知られており、HICC の活性化が RVI において重要であるとされる. (B) 高浸透圧ストレス後も ASK3 活性が高い場合. ASK3 が WNK1-SPAK/OSR1-NKCC 経路の活性化を抑制し、収縮状態の持続を引き起こす結果、最終的に細胞死が誘導されると推測される.

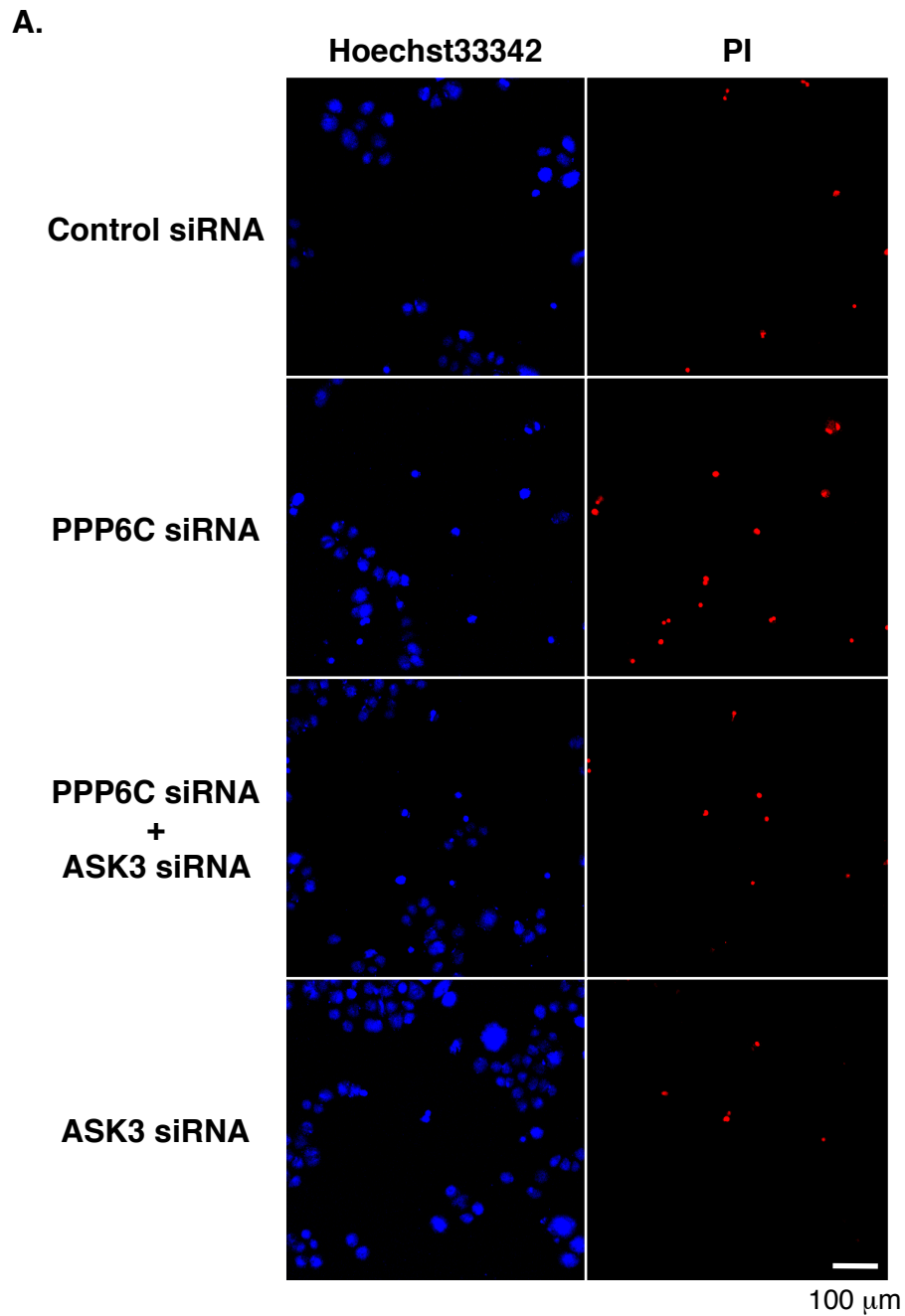


Fig.24 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制は，細胞死を引き起こす

(A) HeLa 細胞において，各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入してから 24 時間後，同一細胞数ずつ播種し直し，さらに 24 時間後に等浸透圧・高浸透圧の培地に交換した．48 時間培養後，Hoechst33342，PI で染色し，イメージアナライザーにて画像を取得した．高浸透圧の培地で培養したサンプルの画像例．

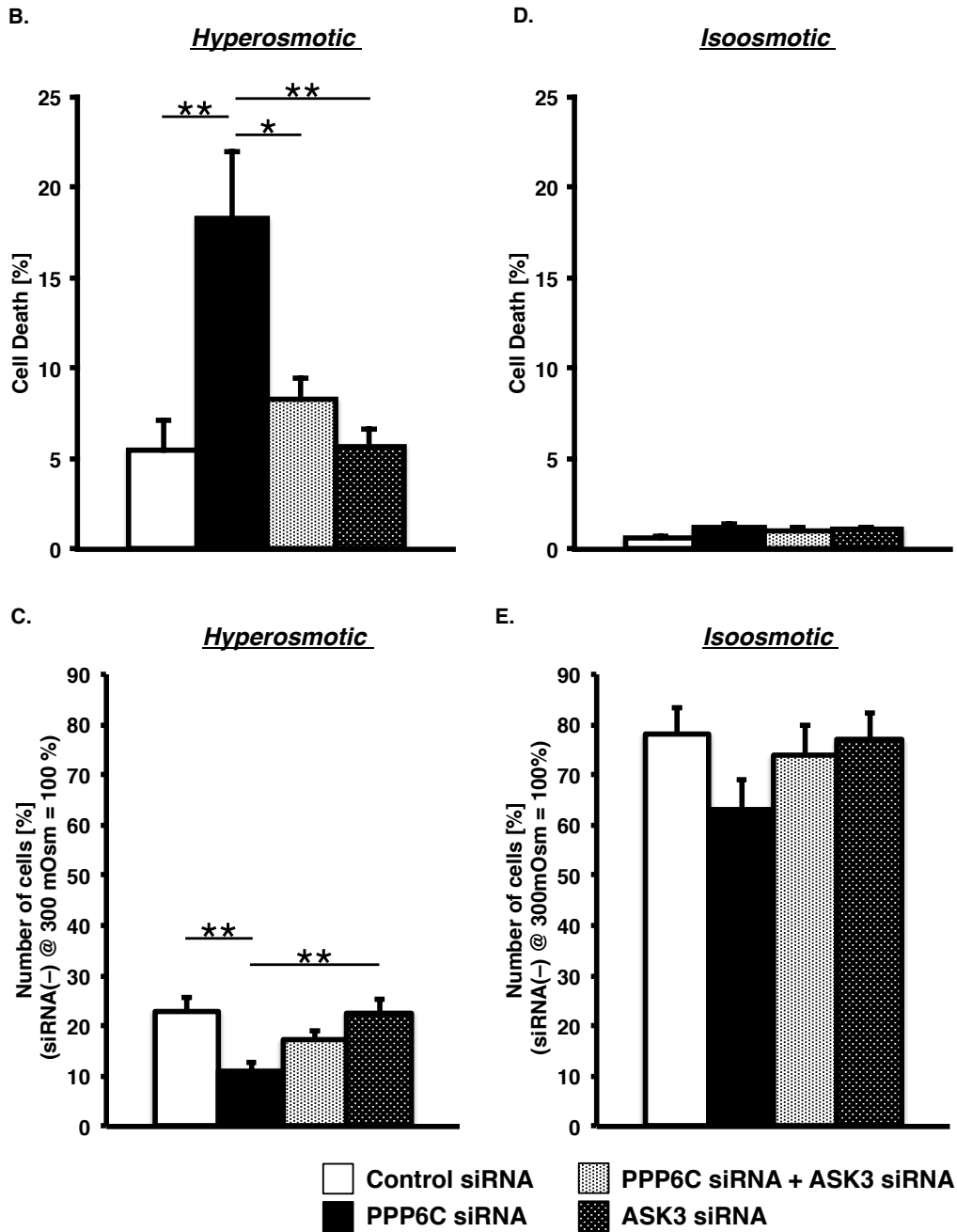


Fig.24 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制は、細胞死を引き起こす

(B & C) (A)の画像にハイコンテンツ解析を適用し、Hoechst 33342 陽性で全細胞数を規定し、その中でPI陽性であるターゲットを死細胞としてカウントした。Cell Deathは死細胞の割合(B), Number of cellsは siRNA 未導入の等浸透圧培養サンプル群の全細胞数に対する割合(C)と定義した。PPP6Cの発現抑制によって高浸透圧ストレス下の ASK3 活性を高い状態にすると、細胞死が有意に亢進し、細胞数も有意に低下した。ここにさらに ASK3 を発現抑制すると、細胞死亢進が有意に抑制され、細胞数低下は回復傾向にあった。(D & E) 等浸透圧の培地で培養した場合の画像に、(B & C)と同様にしてハイコンテンツ解析を適用した。等浸透圧状態では PPP6C の発現抑制によって、有意な細胞死亢進や細胞数低下が見られなかった。siRNA: 30 nM. Hyperosmotic: 600 mOsm by mannitol. 数値は MEAN ± S.E.M., N=10. One-way ANOVA, followed by Tukey's HSD (* P < 0.05, ** P < 0.01).

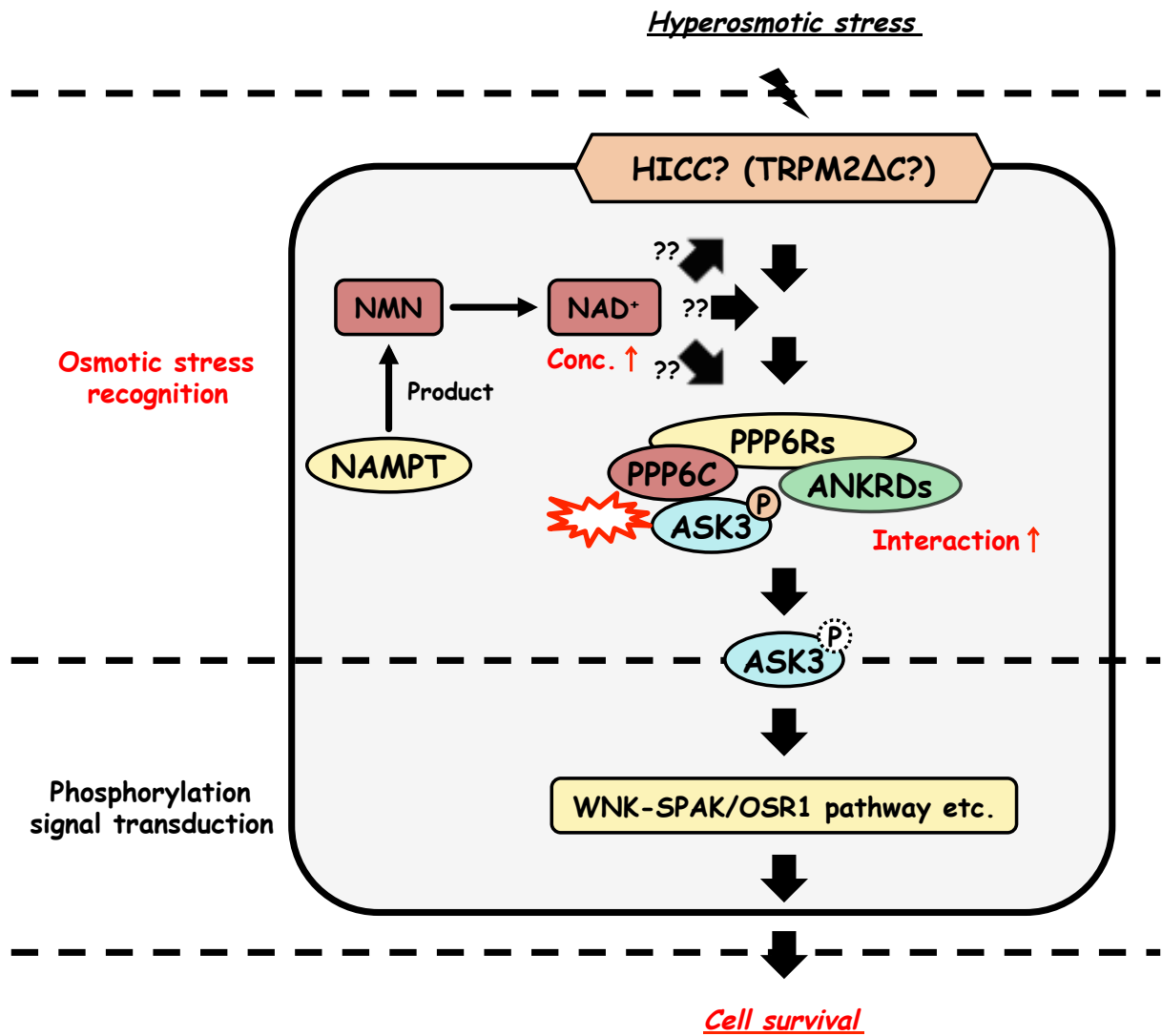
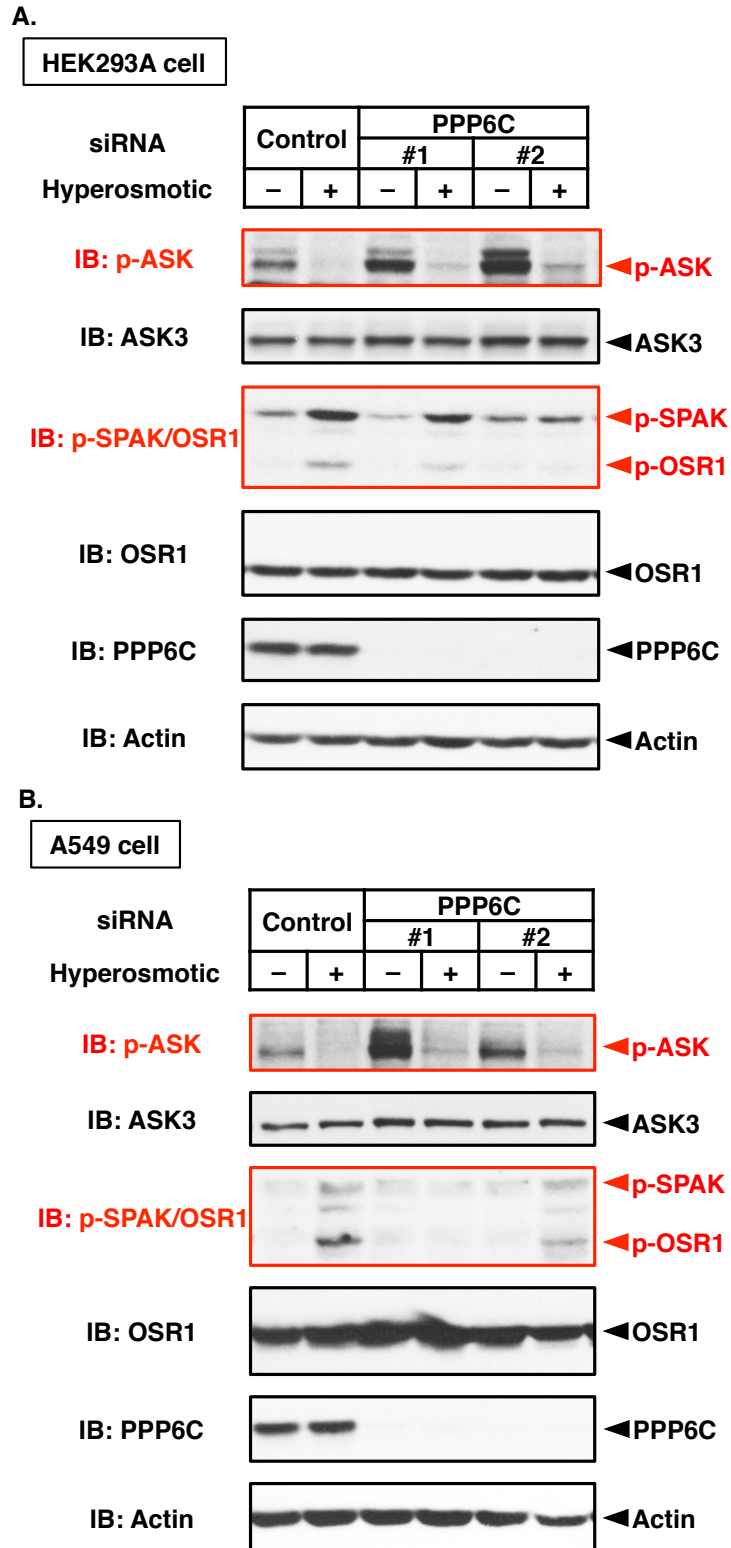
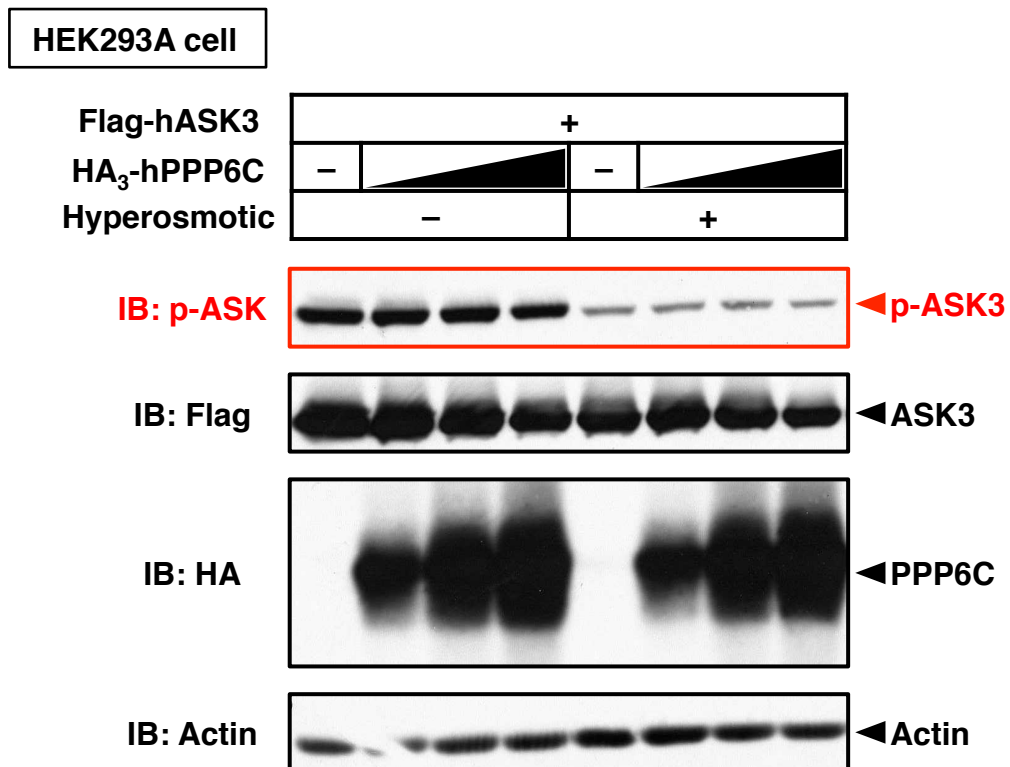


Fig.25 まとめ

本文参照.

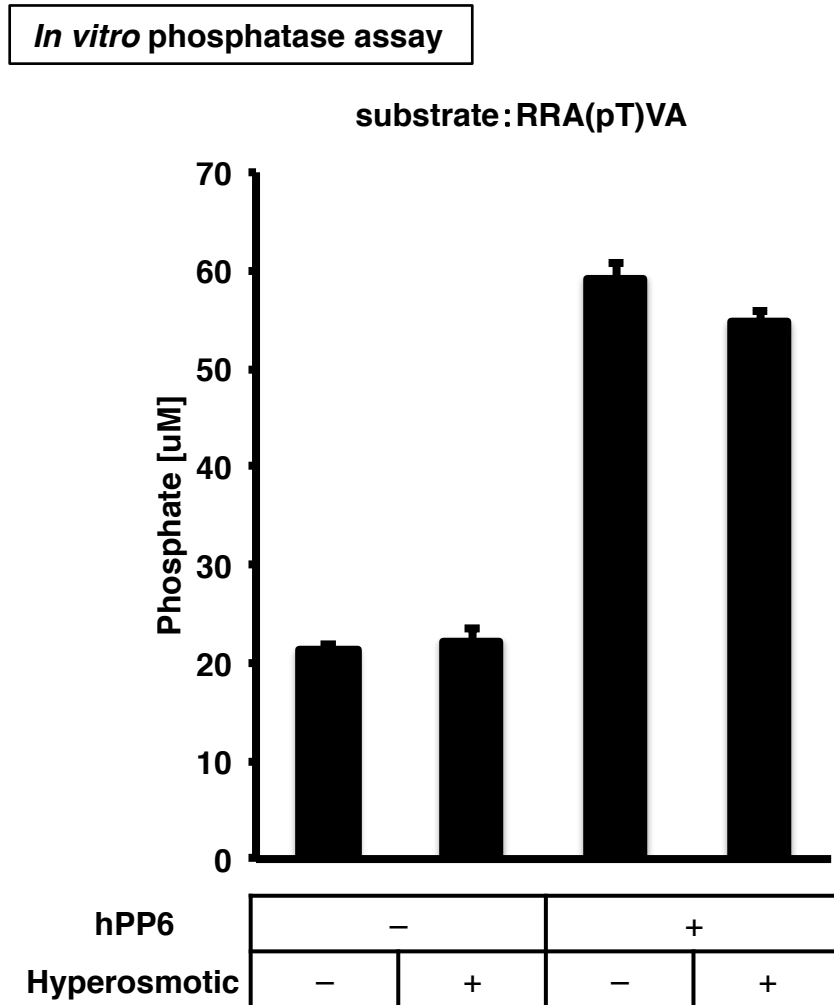


Sup.Fig.01 高浸透圧ストレス下の ASK 活性抑制への PPP6C の必要性は細胞種に依存しない
 HEK293A 細胞(A), A549 細胞(B)において, 各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し, 浸透圧刺激を行った. HeLa 細胞同様, PPP6C の発現抑制によって, 内在性の ASK 活性が上昇した. また, この時内在性の ASK 活性上昇レベルに相関して, OSR1 活性化の抑制も確認された. siRNA: 10 nM, 48 時間. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.



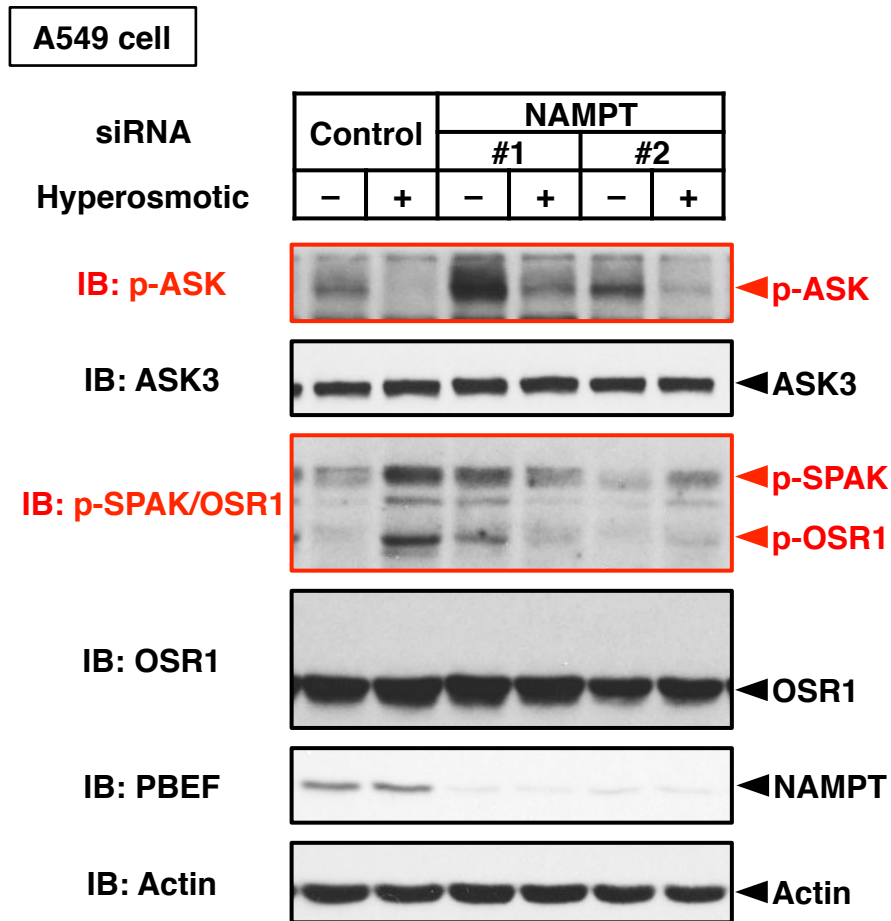
Sup.Fig.02 PPP6C の単独過剰発現では ASK3 を不活性化しない

HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C を過剰発現し、浸透圧刺激を行った。PPP6C を過剰発現させても、ASK3 を不活性化しなかった。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。



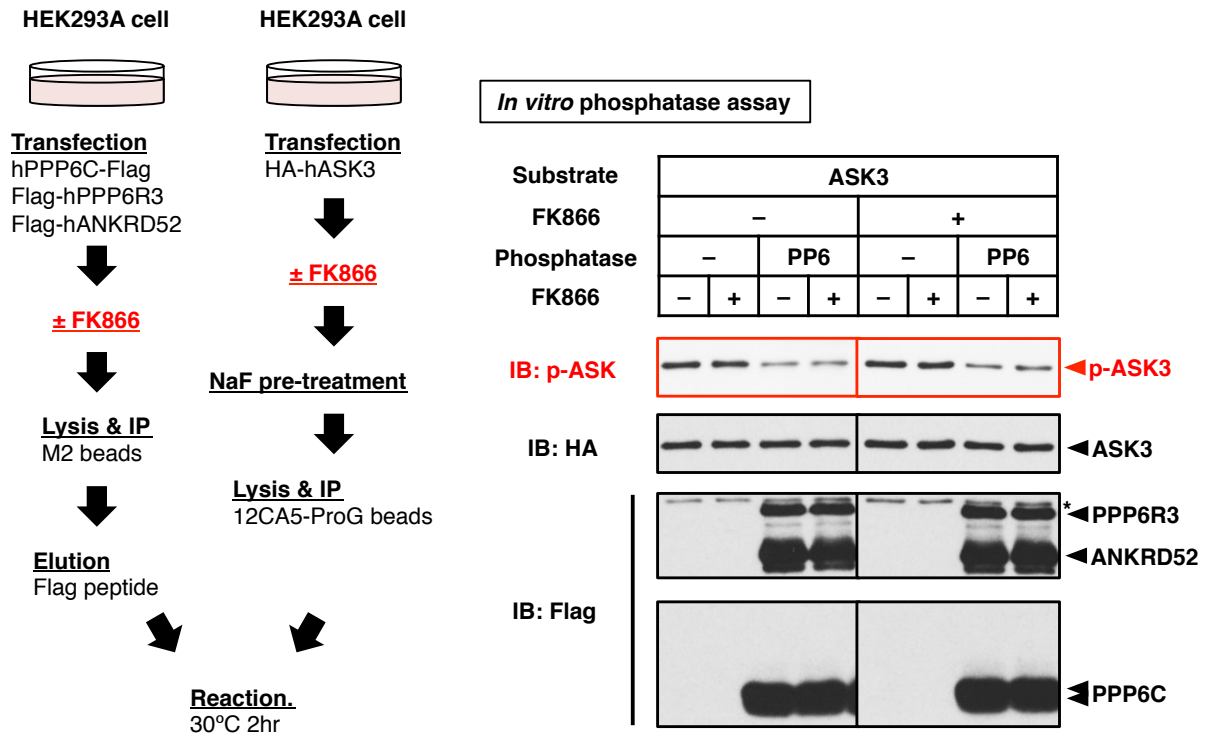
Sup.Fig.03 高浸透圧ストレスによって PP6 の脱リン酸化能は増加しない

PP6 を過剰発現した HEK293A 細胞に、浸透圧刺激を行った後、免疫沈降法にて精製し、リン酸化スレオニンペプチド (RRA(pT)VA) と混ぜて *in vitro* で反応させた。高浸透圧ストレス後に精製した PP6 と等浸透圧状態で精製した PP6 の脱リン酸化能は同程度であった。数値は MEAN ± S.E.M., N=3.



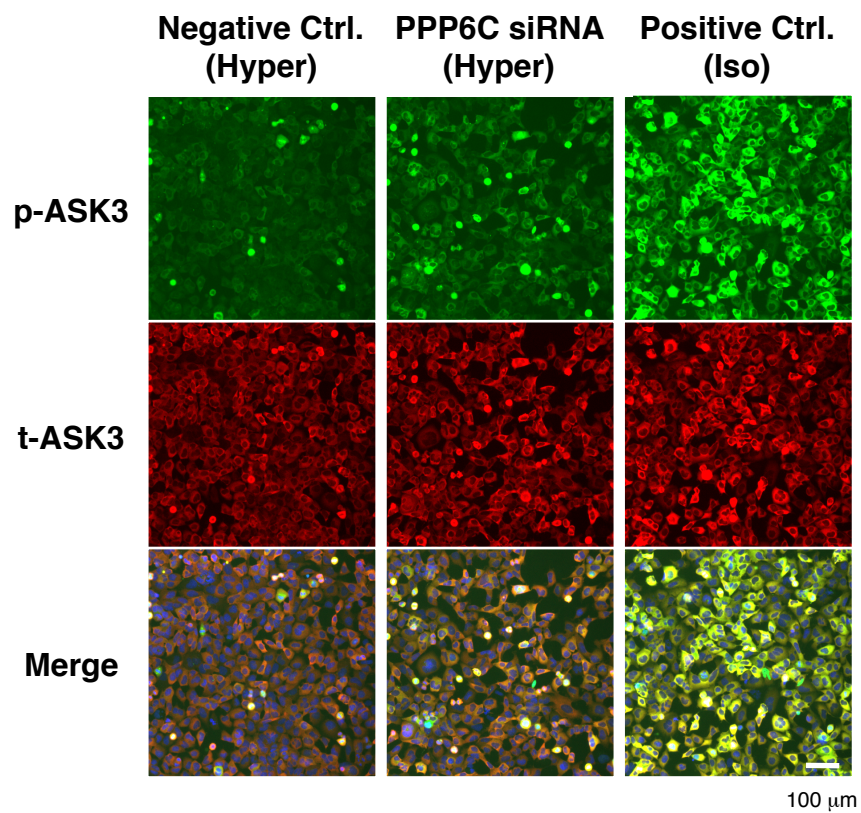
Sup.Fig.04 高浸透圧ストレス下の ASK 活性の抑制には, NAMPT が必要である

A549 細胞において, 各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し, 浸透圧刺激を行った. HEK293A 細胞同様, NAMPT の発現抑制によって, 内在性の ASK 活性が上昇した. また, NAMPT の発現抑制によって, OSR1 リン酸化 (活性化) の抑制も確認された. siRNA: 10 nM, 48 時間. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.



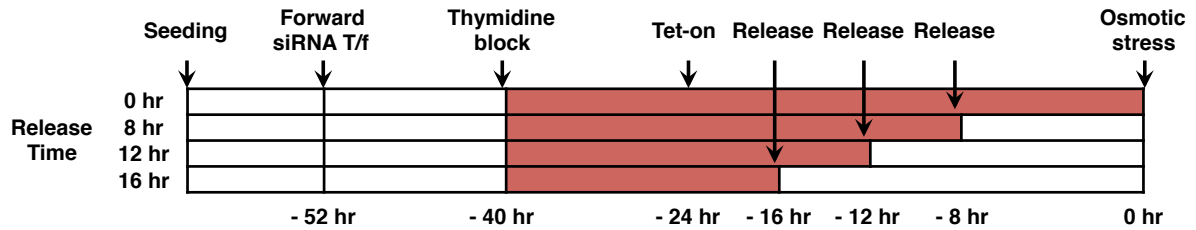
Sup.Fig.05 PP6 の脱リン酸化能や ASK3 の被脱リン酸化能は NAMPT 活性の阻害によって減少しない

HEK293A 細胞において過剰発現した PP6 と ASK3 をそれぞれ免疫沈降法にて精製し、混ぜて *in vitro* で反応させた。この際、細胞溶解前に NAMPT 特異的阻害剤 FK866 を処置した。FK866 処置後に精製した PP6 と未処置で精製した PP6 は、同程度に ASK3 を脱リン酸化した。また、FK866 処置後に精製した ASK3 と未処置で精製した ASK3 は、同程度に PP6 に脱リン酸化された。

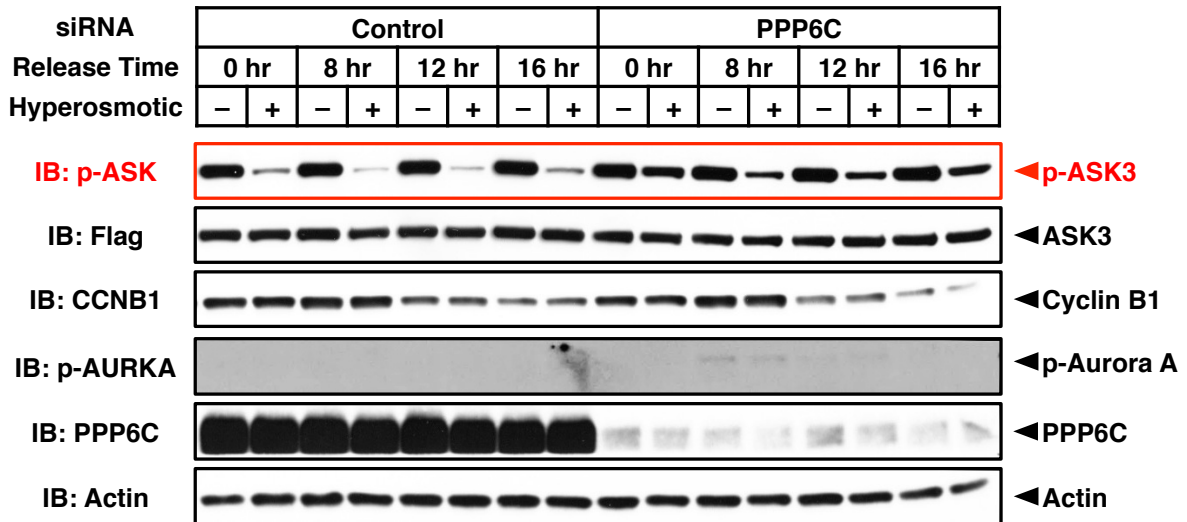


Sup.Fig.06 スクリーニングにおいて PPP6C は弱い陽性分子であった

二次スクリーニングにおける実際の画像例. PPP6C siRNA によって, 確かに高浸透圧ストレス時よりもリン酸化 ASK3 の蛍光強度は高くなっていたが, 等浸透圧状態と比べるとかなり弱かった.

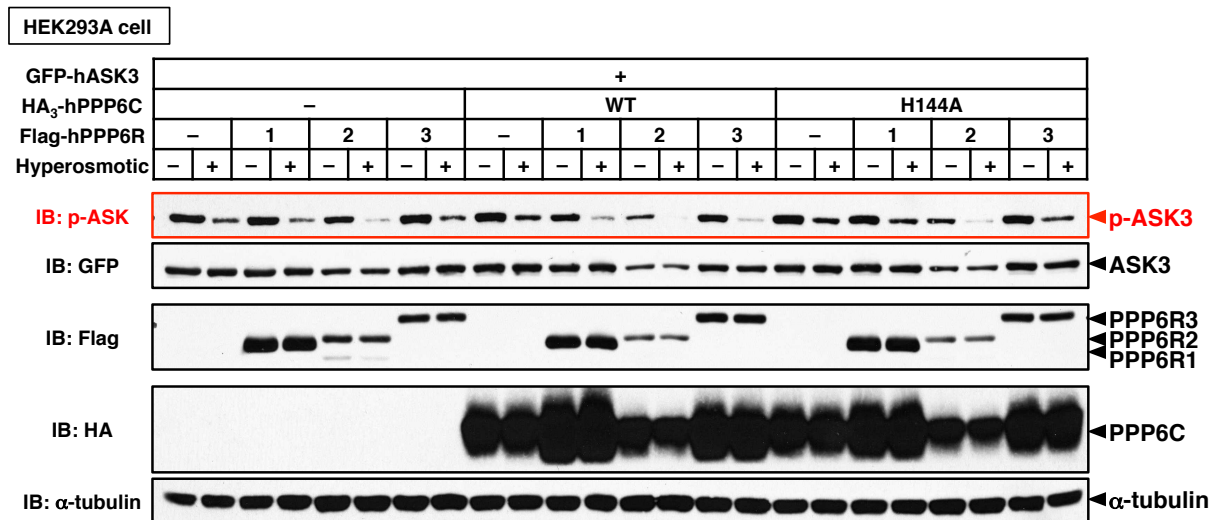


Tetracycline-induced Flag-hASK3 stable HEK293A cell



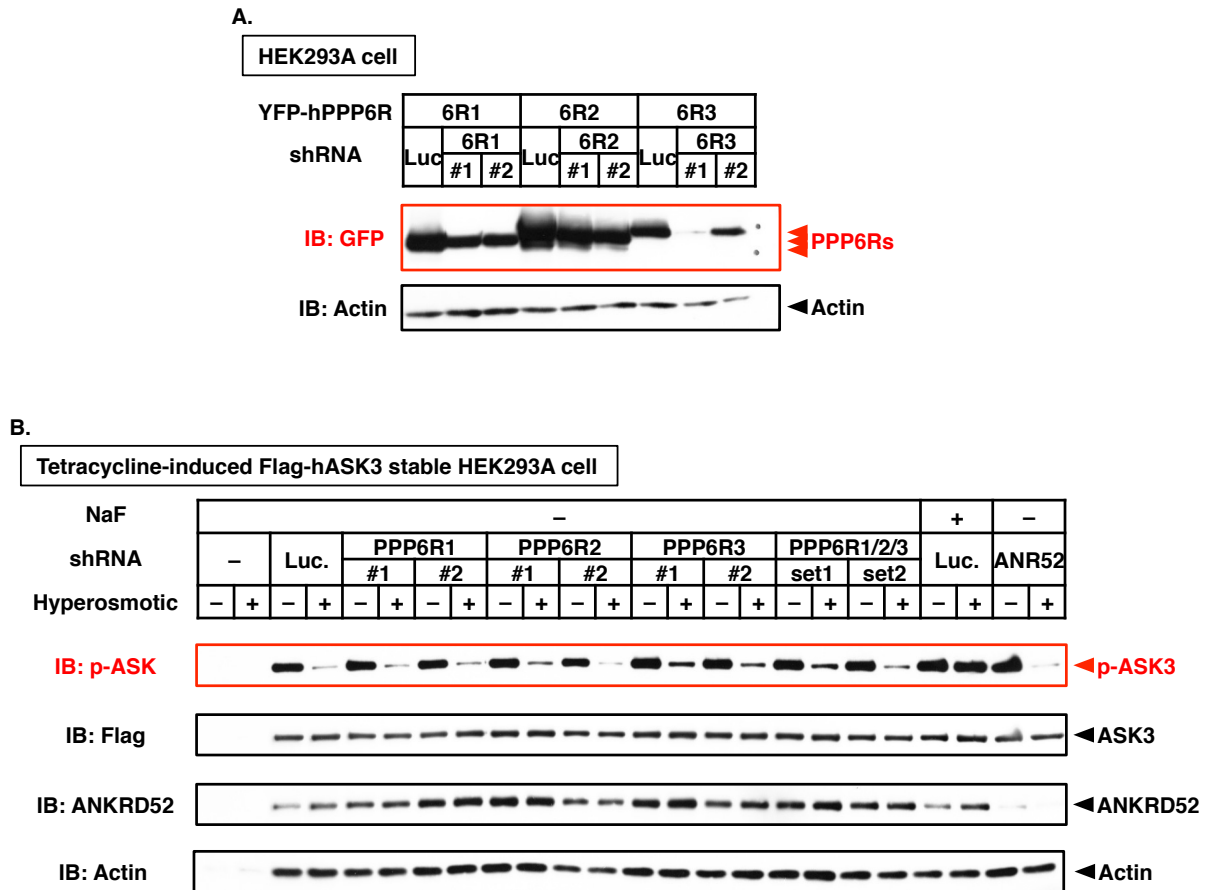
Sup.Fig.07 PPP6C の発現抑制による ASK3 不活性化の抑制は、PPP6C の細胞周期への影響が原因ではなかった

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、チミジン処置によって S 期で同調させた後、チミジンを除くことで細胞周期を再開させ、最終的に浸透圧刺激を行った。Cyclin B1 がチミジン除去 8 時間で増え、その後減っていることから、チミジン除去 0 時間は S 期、8 時間は M 期、12 時間・16 時間は G1・G0 期になっていると想定される。この時、いずれの細胞周期においても、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が見られ、PPP6C の発現抑制による ASK3 不活性化の抑制も見られた。siRNA: 10 nM, 52 時間。チミジン処置: 2 mM, ≥ 24 時間。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

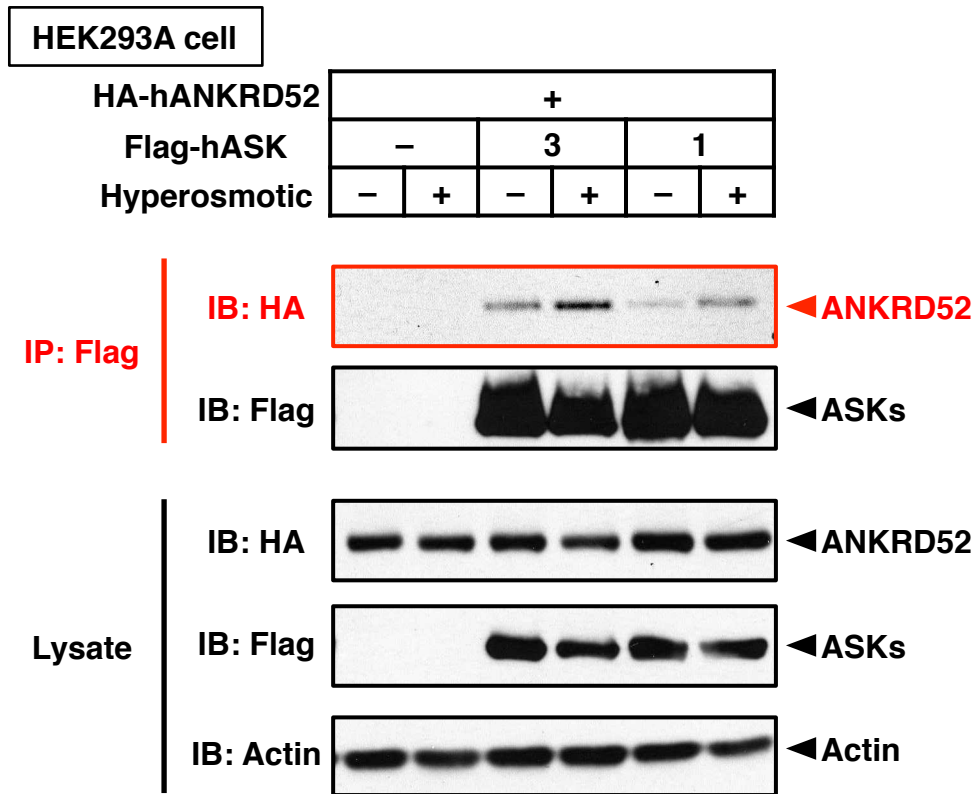


Sup.Fig.08 いずれの PPP6R から成る PP6 コア酵素の過剰発現でも高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進する

HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R1/2/3 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った。いずれの PPP6R による PP6 コア酵素を過剰発現しても、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進した。また、他の PPP6C の不活性化型変異体である H144A との共発現でも、D84N 同様、ドミナントネガティブ効果が見られた。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。

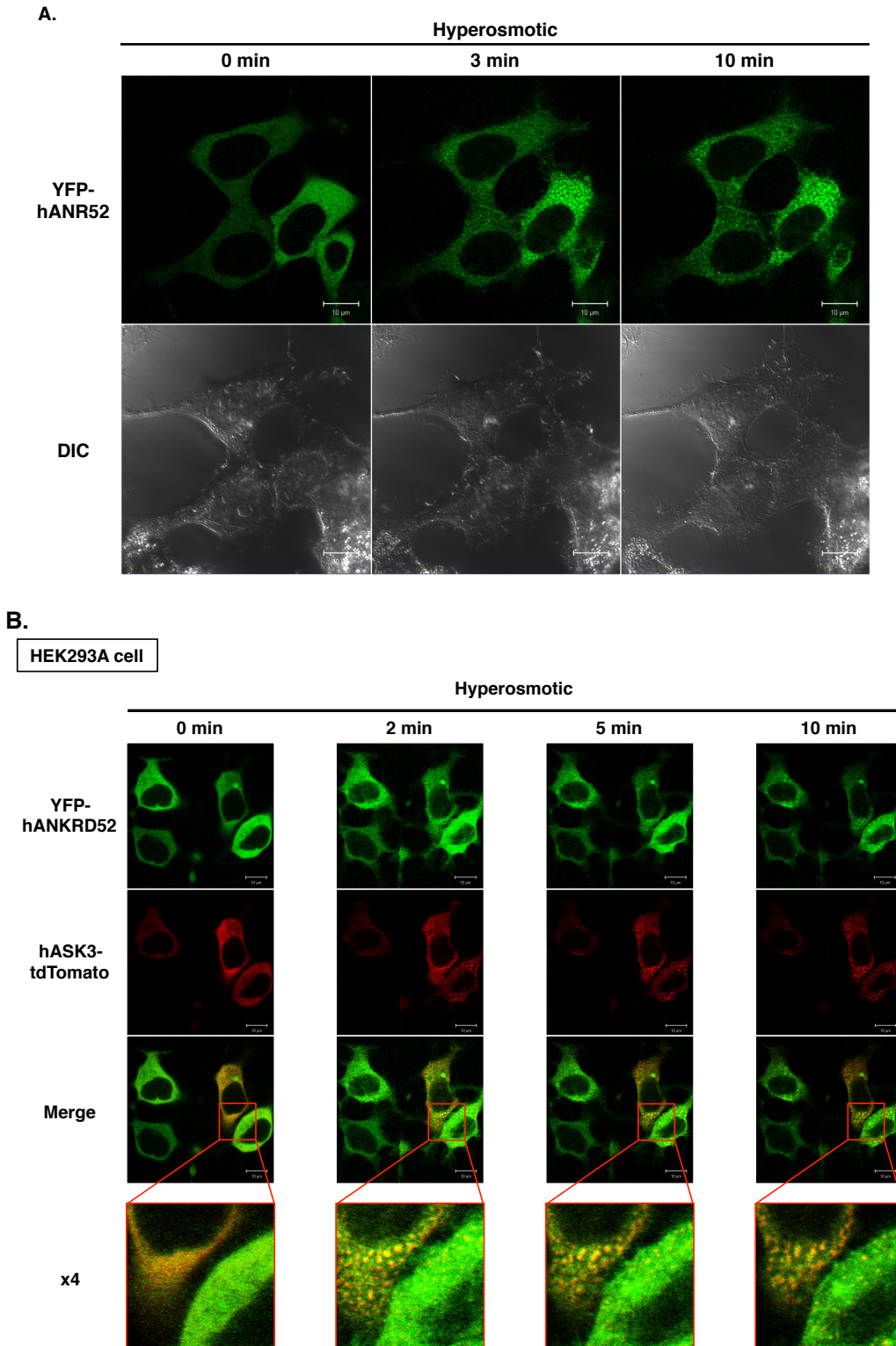


Sup.Fig.09 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に、少なくとも PPP6R3 は必要である
(A) HEK293A 細胞において、YFP タグの PPP6Rs とそれぞれの shRNA を共にトランスフェクションし、72 時間後に細胞を溶解してサンプル化した。いずれの shRNA も、わずかではあるが過剰発現レベルのターゲットを発現抑制できた。**(B)** テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、各 shRNA をリバーストランスフェクションにて導入し、puromycin でセレクション後、浸透圧刺激を行った。少なくとも ANKRD52 の発現抑制が確認できるところで、PPP6R3 の shRNA では高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた。NaF: 50 mM, 30 分間前処置。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。



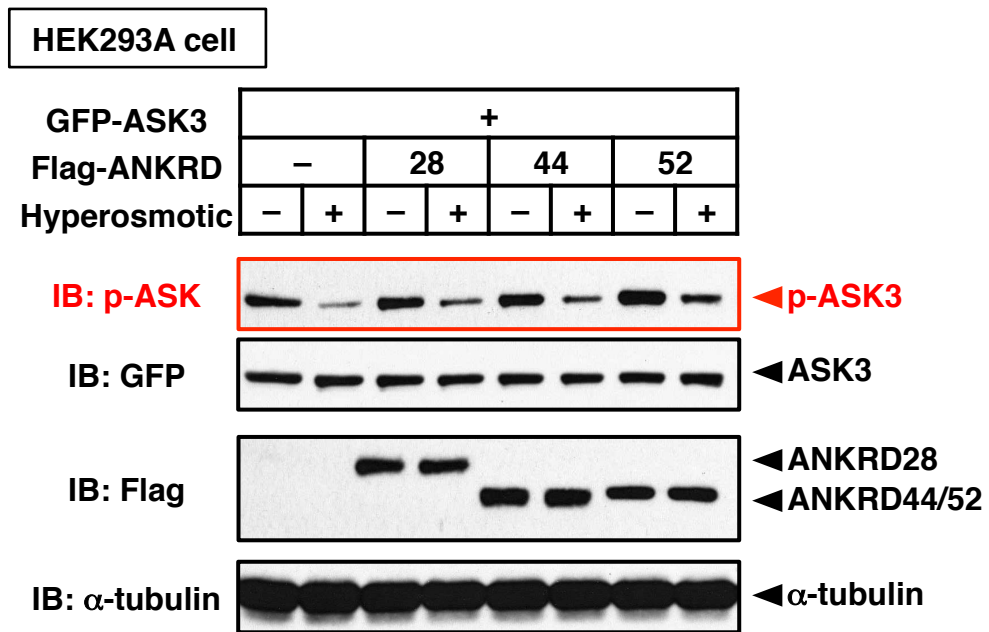
Sup.Fig.10 高浸透圧ストレスによって ANKRD52 と ASK3 の結合が増加する

HEK293A 細胞において、ASK3・ASK1・ANKRD52 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った後、ASK を Flag タグにて免疫沈降した。高浸透圧ストレスによって ASK3 と共免疫沈降される ANKRD52 の量が増加した。また、ASK1 よりも ASK3 と ANKRD52 の結合の方が強かった。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/500 mOsm, 10 分間。

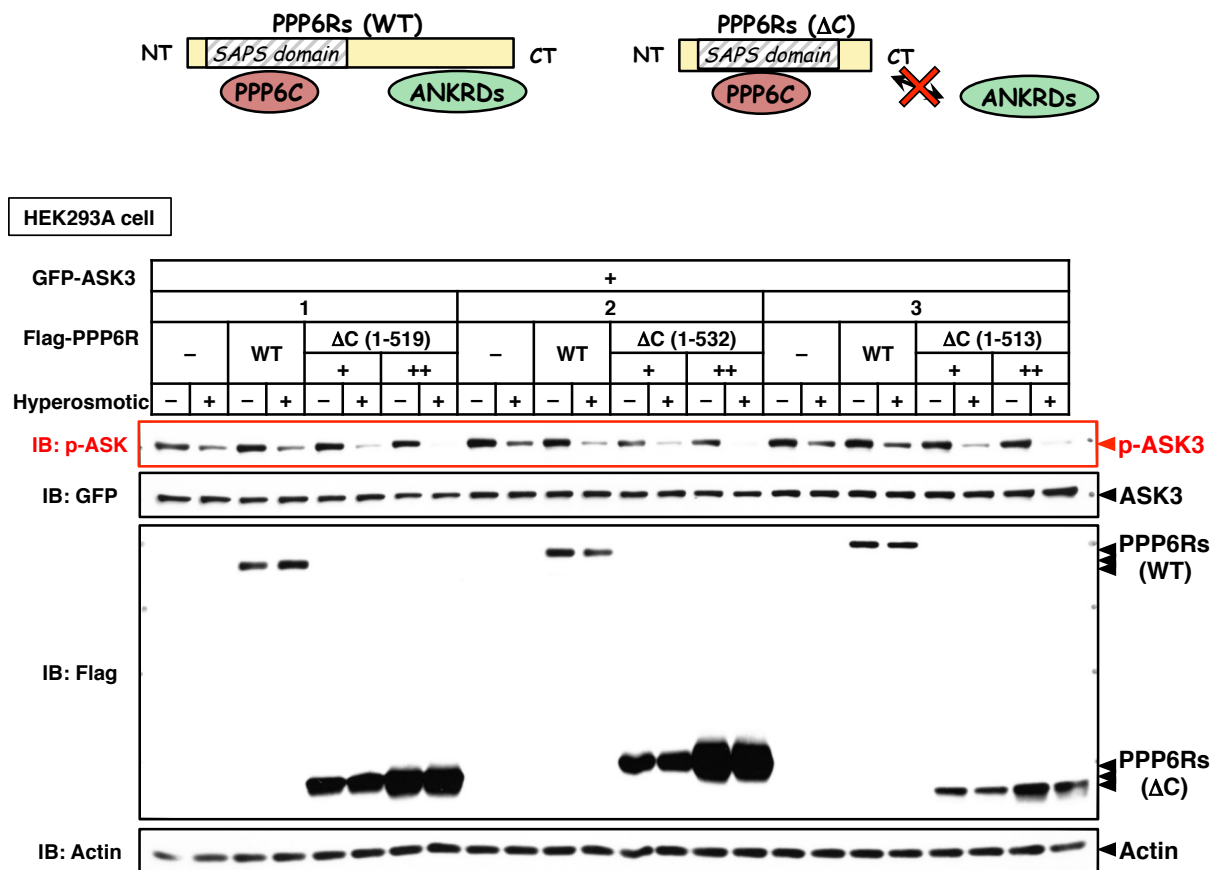


Sup.Fig.11 高浸透圧ストレスによって ANKRD52 と ASK3 は共局在する

(A) HEK293A 細胞において、ANKRD52 を過剰発現し、共焦点顕微鏡下で観察しながら、浸透圧刺激を行った。高浸透圧ストレス依存的に ANKRD52 は、細胞質内に粒状の局在を示した。(B) HEK293A 細胞において、ASK3・ANKRD52 を過剰発現し、共焦点顕微鏡下で観察しながら、浸透圧刺激を行った。高浸透圧ストレス依存的に ASK3 と ANKRD52 は共局在した。Hyperosmotic: 500 mOsm.

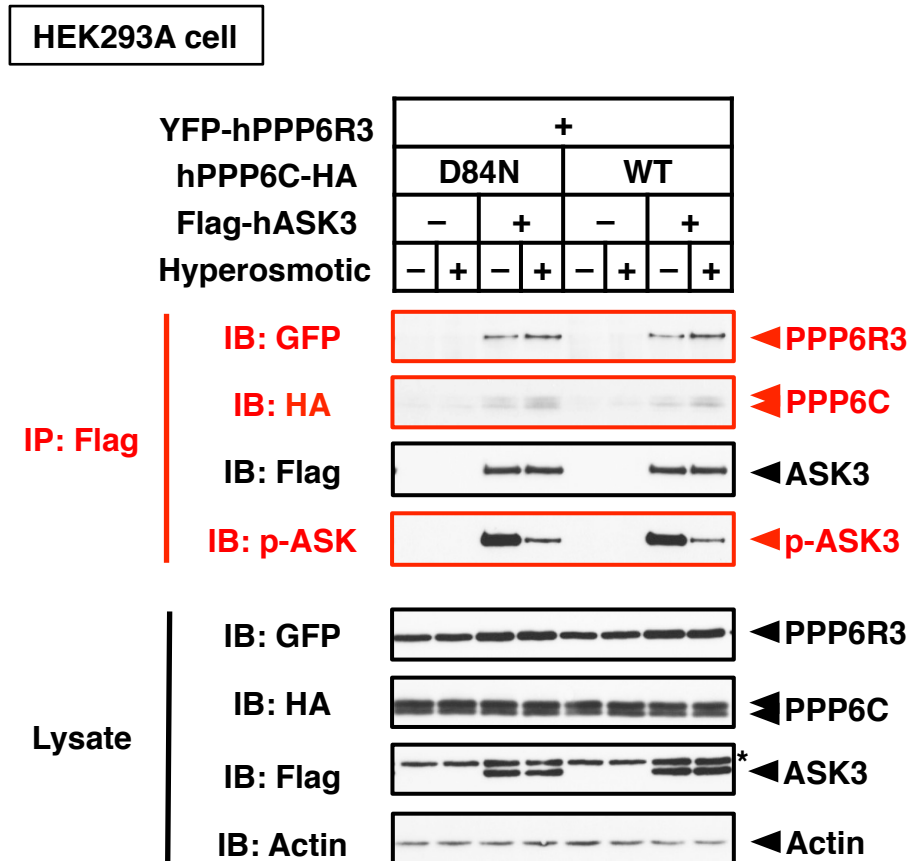


Sup.Fig.12 ANKRDs の過剰発現では高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は亢進しない
 HEK293A 細胞において, ASK3・ANKRDs を過剰発現し, 浸透圧刺激を行った. ANKRDs を過剰発現させても, ASK3 を不活性化しなかった. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.



Sup.Fig.13 ANKRDs と結合できない PPP6Rs Δ C の過剰発現でも高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を亢進する

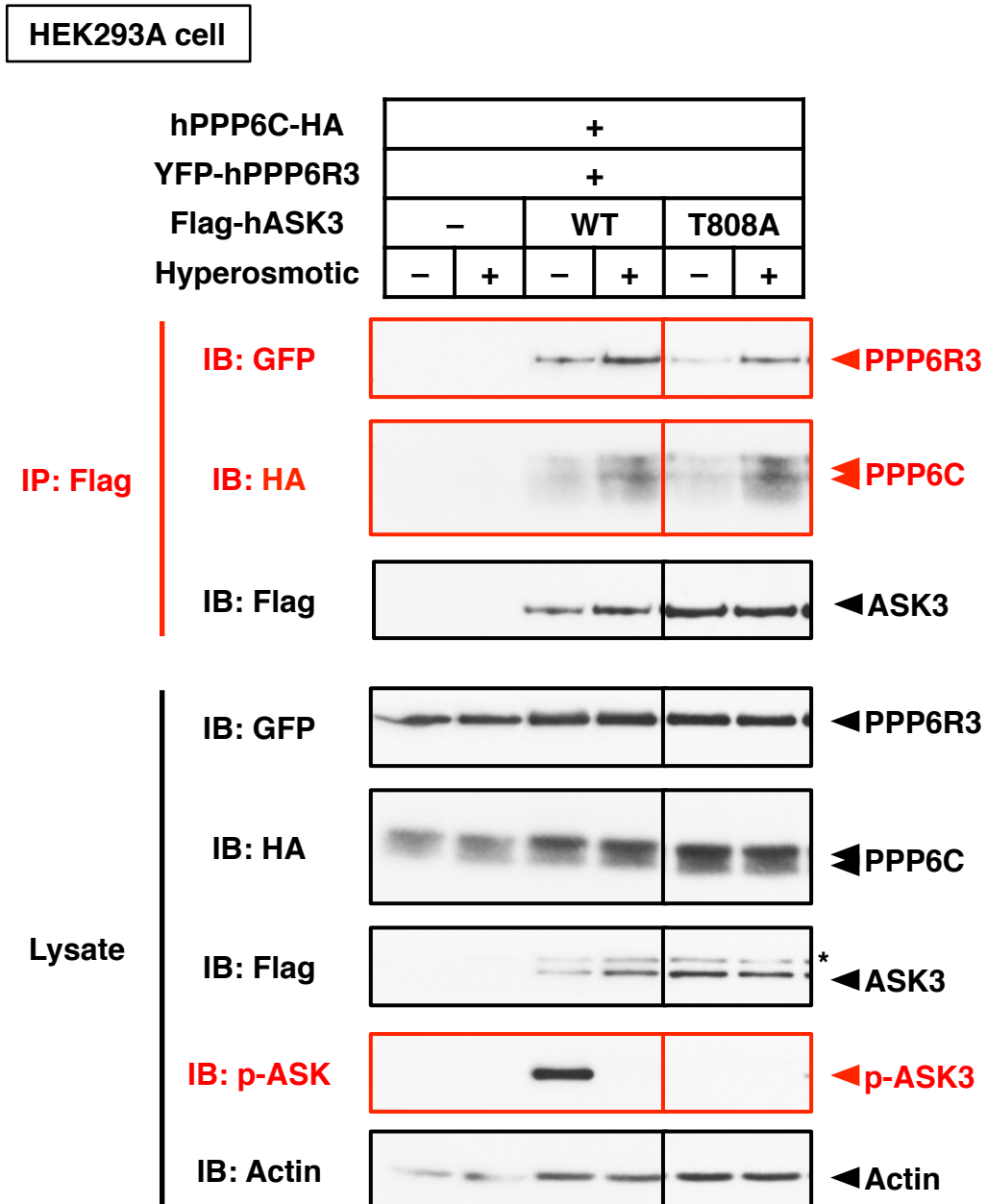
HEK293A 細胞において, ASK3・PPP6Rs・PPP6Rs Δ C を過剰発現し, 浸透圧刺激を行った. ANKRDs と結合できない PPP6Rs Δ C の単独過剰発現でも, ASK3 不活性化を亢進した. Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間.



Sup.Fig.14 高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合には PPP6C 活性は不要である

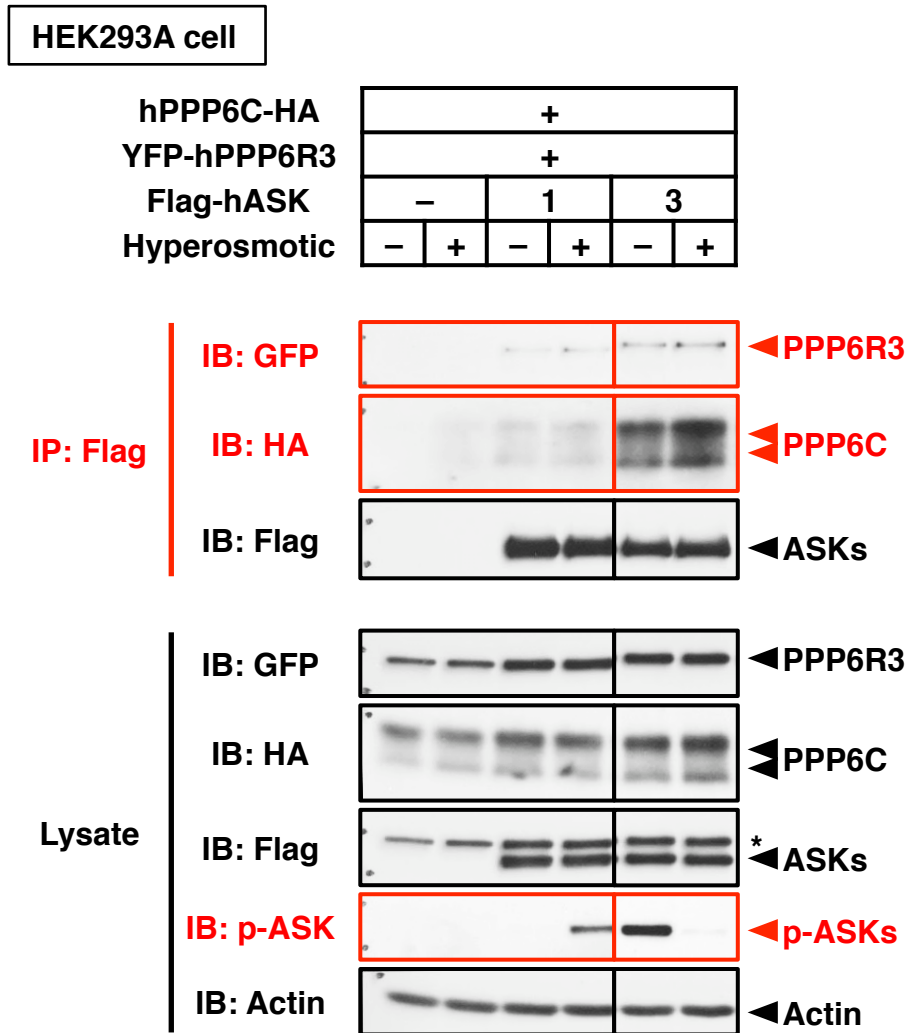
HEK293A 細胞において, ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し, 浸透圧刺激を行った後, ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した. ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量は, PPP6C が不活性化型変異体 D84N の場合でも, 野生型と同程度であった. なお, わずかではあるが, D84N との共発現では, ASK3 不活性化に対してドミナントネガティブ効果が確認できている点は Fig.05 と一致する.

Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/500 mOsm, 10 分間.



Sup.Fig.15 高浸透圧ストレスによる ASK3 と PP6 の結合には ASK3 活性は不要である

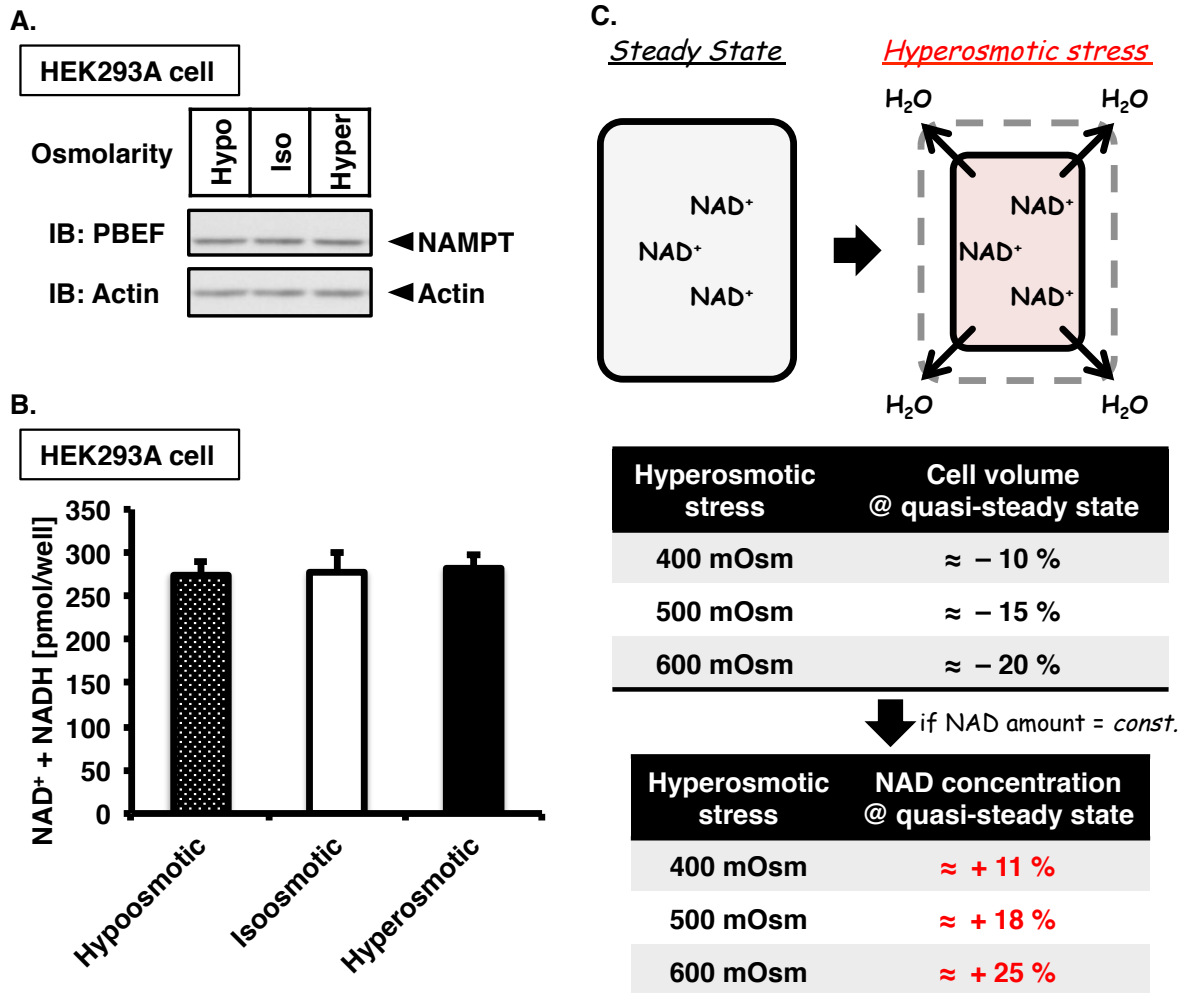
HEK293A 細胞において、ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し、浸透圧刺激を行った後、ASK3 を Flag タグにて免疫沈降した。ASK3 と共免疫沈降される PP6 コア酵素の量は、ASK3 が不活性化型変異体 T808A の場合でも、野生型とほぼ同程度であった。Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/500 mOsm, 10 分間。



Sup.Fig.16 ASK1 よりも ASK3 の方が PP6 と強く結合する

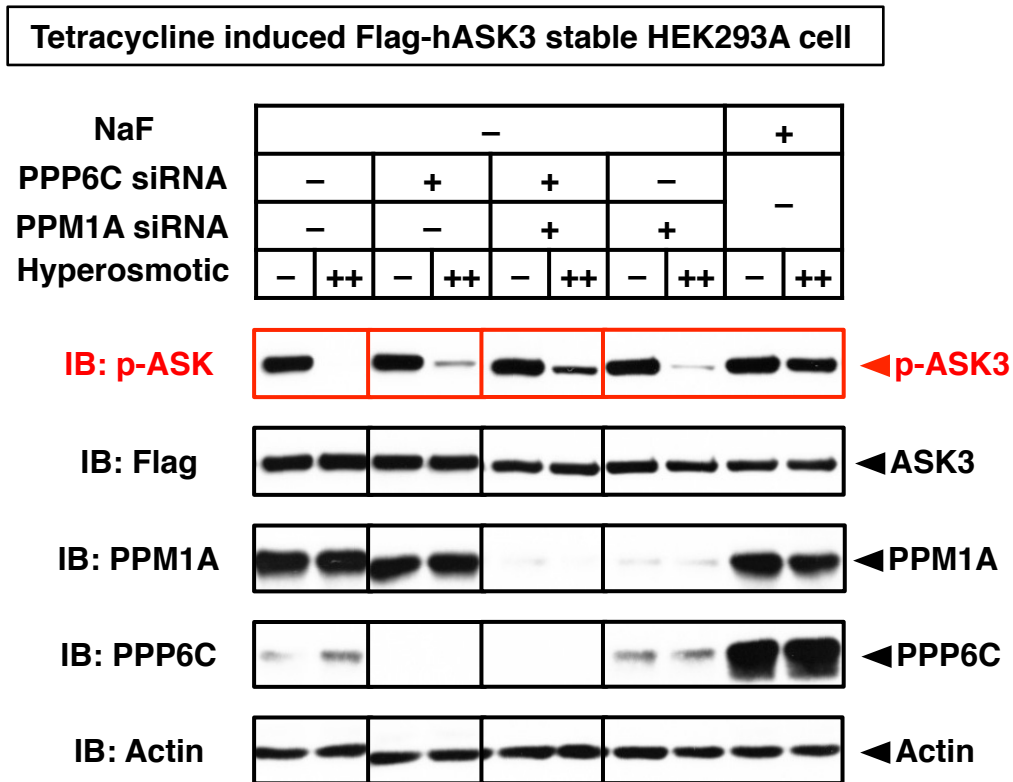
HEK293A 細胞において, ASK1・ASK3・PPP6C・PPP6R3 を過剰発現し, 浸透圧刺激を行った後, ASK を Flag タグにて免疫沈降した. 高浸透圧ストレスの強度依存的に ASK3 と共免疫沈降される PPP6 コア酵素の量が増加した. また, ASK1 よりも ASK3 と PPP6 コア酵素の結合の方が強かった.

Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/500 mOsm, 10 分間.



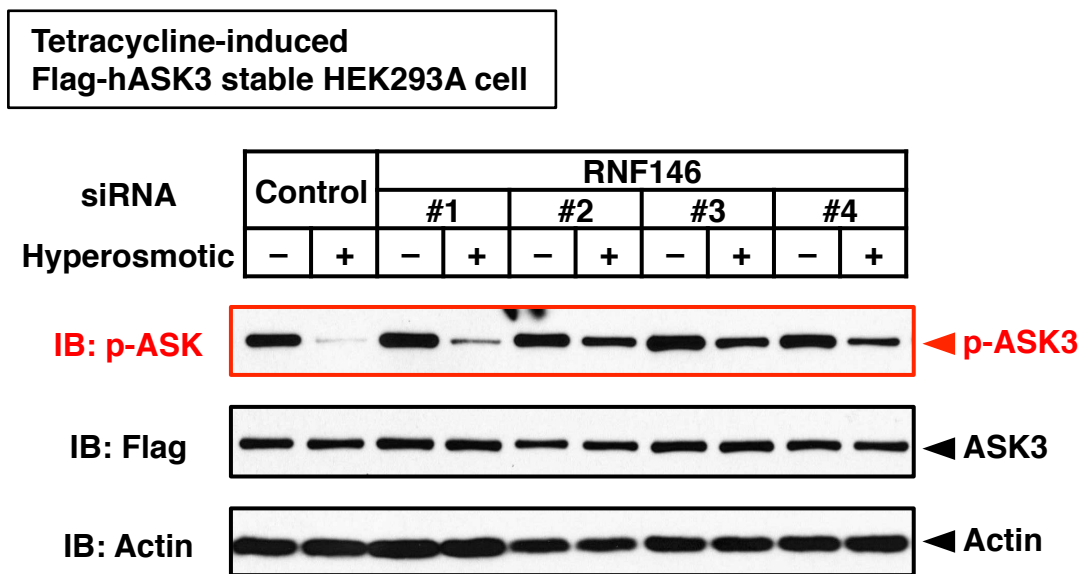
Sup.Fig.17 浸透圧ストレスによって NAD 濃度は増加する

(A & B) HEK293A 細胞に、浸透圧刺激を行い、細胞を溶解した。(A) 細胞溶解液から、酵素反応を利用した赤色蛍光による検出キットによって NAD (NAD⁺ + NADH) 量を測定した。浸透圧ストレスによって NAD 量は変化しなかった。数値は MEAN ± S.E.M., N=3。(C) 高浸透圧ストレス後の準平衡状態における NAD 濃度変化量の概算値。高浸透圧ストレスによって細胞体積は強制的に収縮するため、NAD 量が一定であるなら、NAD 濃度は増加することになる。

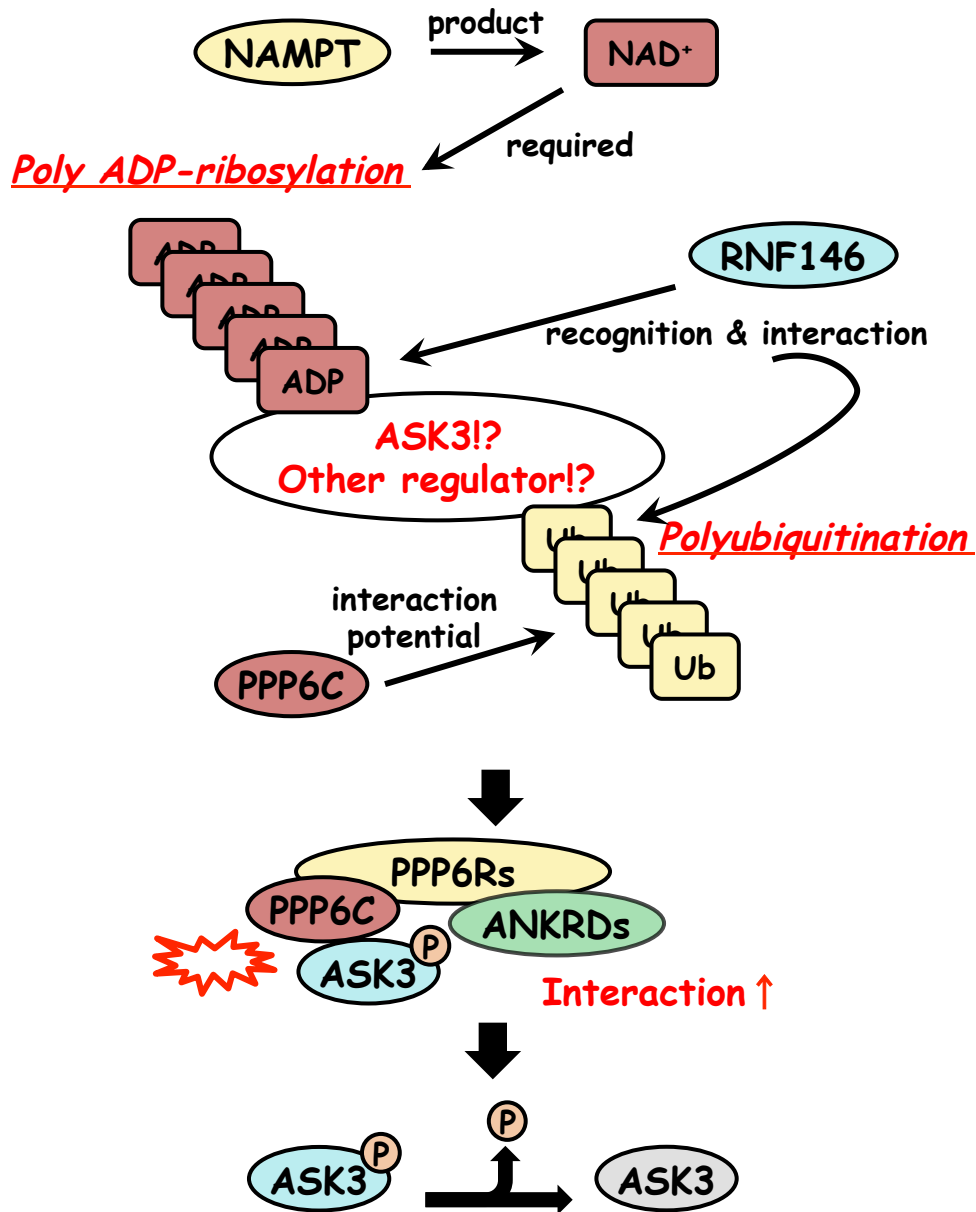


Sup.Fig.18 強い高浸透圧ストレス時には PPM1A の寄与も大きくなる

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入し、浸透圧刺激を行った。高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制効果は、PPP6C の発現抑制の方が PPM1A の発現抑制よりも強かった。そして、PPP6C と PPM1A を両方発現抑制した場合は、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が増強した。NaF: 50 mM, 30 分間前処置。siRNA: 10 nM, 60 時間。Hyperosmotic: -/++ = 300 mOsm/500 mOsm, 10 min

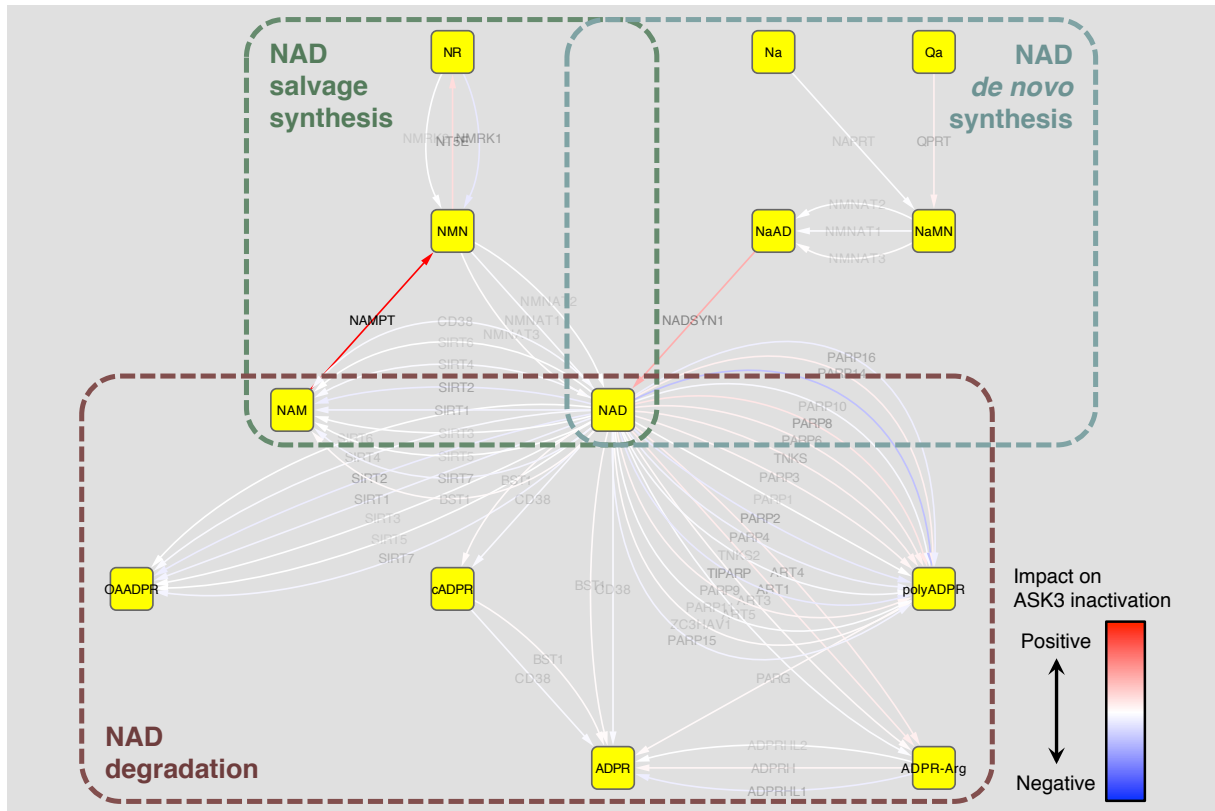


Sup.Fig.19 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、RNF146 が必要である
 テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、各 siRNA をリバーストランスフェクションにて導入し、浸透圧刺激を行った。RNF146 の発現抑制によって、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた。siRNA: Dharmacon ON-TARGETplus, 10 nM, 48 時間。
 Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。



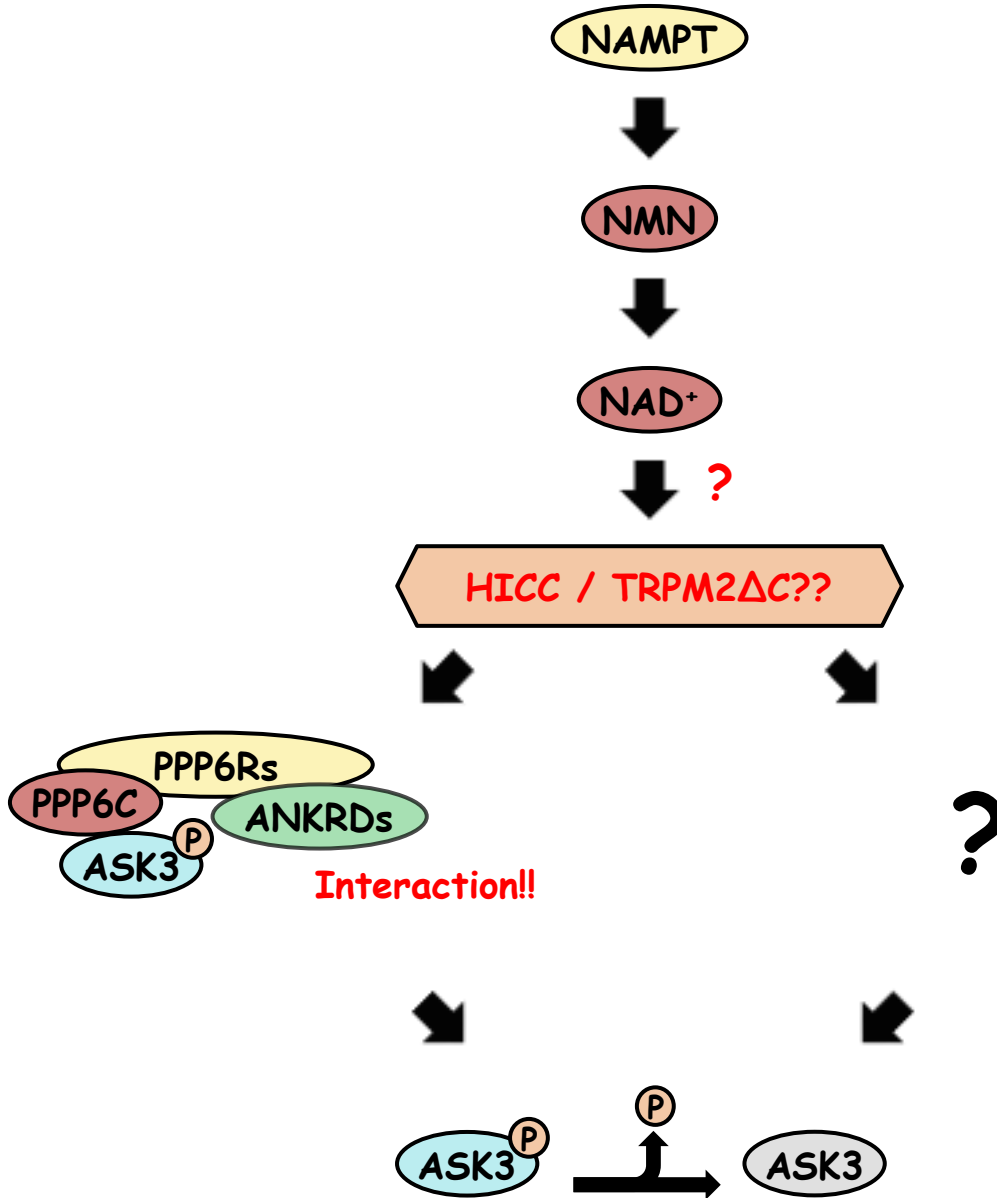
Sup.Fig.20 NAD の作用点の仮説①

NAMPT に由来する NAD 濃度が高浸透圧ストレスによって上昇すると、ASK3 (あるいは ASK3 の結合分子) が PAR 化される。この PAR 化を認識した RNF146 が ASK3 (あるいは ASK3 の結合分子) をポリユビキチン化する。PPP6C はポリユビキチンと結合する能力を有するため、このユビキチン化によって PP6 と ASK3 の結合が上昇し、ASK3 が不活性化される。



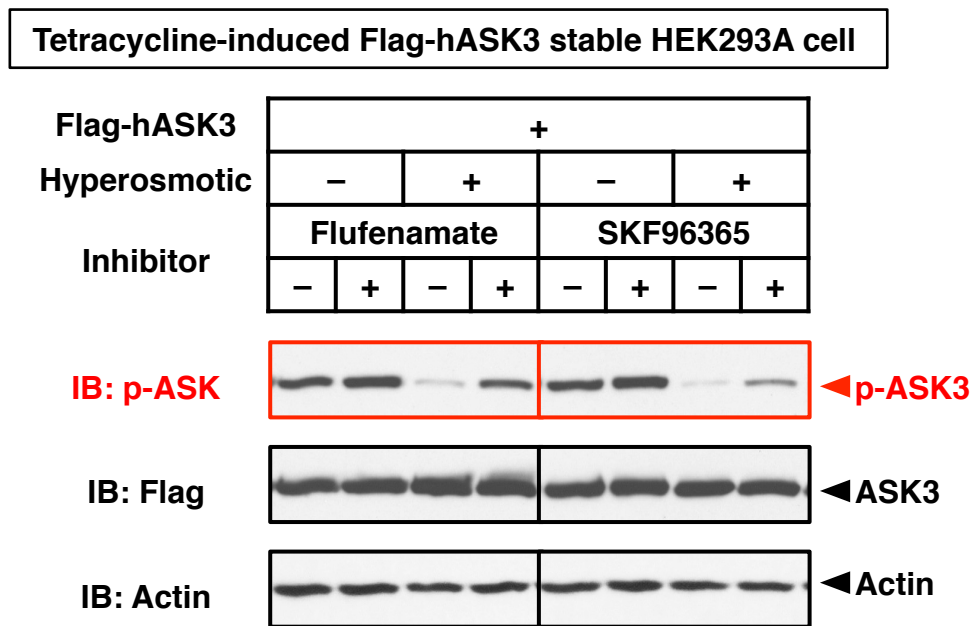
Sup.Fig.21 スクリーニングにおいて NAD 関連分子はほとんど完全に陰性であった

NAD 関連遺伝子の一次スクリーニングにおける ASK3 活性のヒートマップ。各黄色いノードは NAD 合成・分解関連低分子化合物を示し、それらを結ぶ矢印は反応経路を示す。矢印の近傍に記載されているのが反応を担う酵素であり、色は一次スクリーニングによる ASK3 活性の B スコアを値の高いものを赤、低いものを青として示してある。つまり、赤い矢印の反応が抑制されると ASK3 不活性化が抑制されることになる。NAMPT 以外には NaAD から NAD へと反応させる NADSYN1 が陽性 (B スコアが 2.78)である以外は、ほとんど完全に陰性であった。



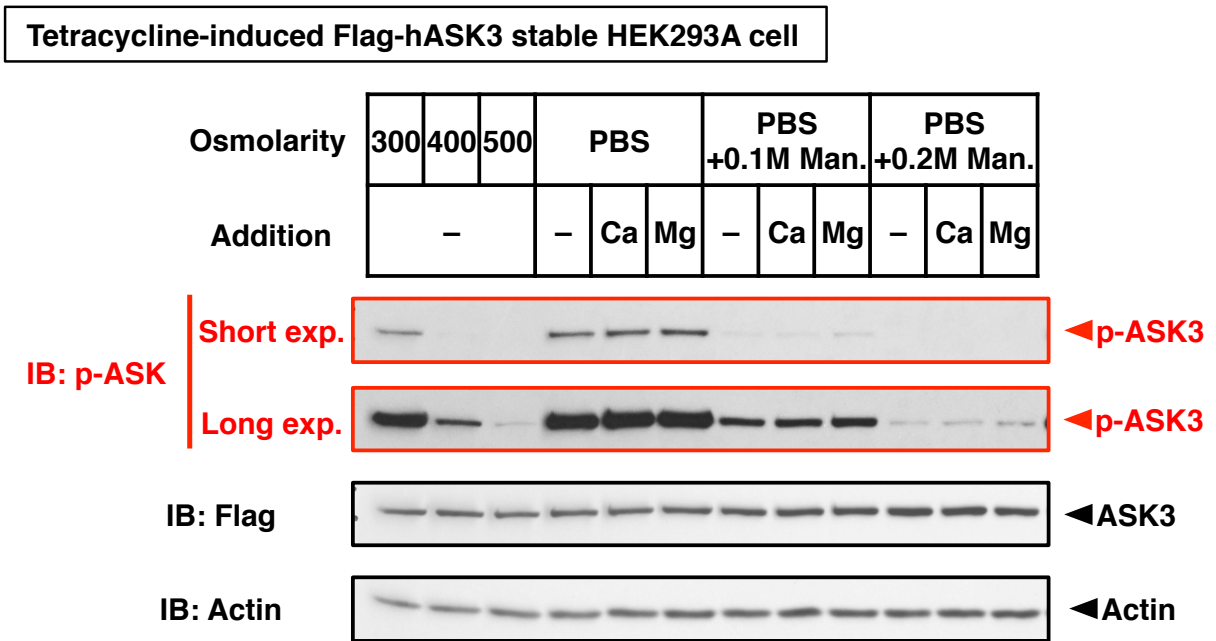
Sup.Fig.22 NAD の作用点の仮説②

NAMPT に由来する NAD 濃度が高浸透圧ストレスによって上昇すると、HICC である TRPM2 Δ C を活性化する。その後、何らかの形で ASK3 と PP6 の結合が上昇し、ASK3 が不活性化される。



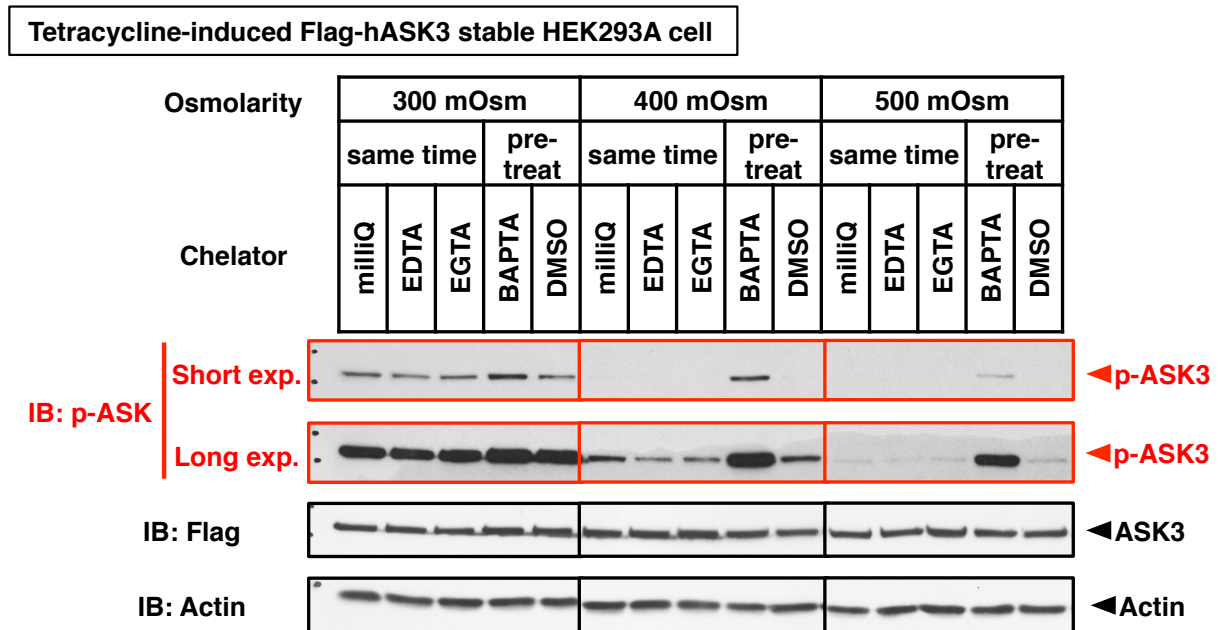
Sup.Fig.23 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、HICC や TRP チャンネルの活性化が必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、HICC 阻害剤 Flufenamate, 汎 TRP チャンネル阻害剤 SKF96365 を浸透圧刺激と同時に処置した。Flufenamate, SKF96365 のいずれも、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化を抑制した。Flufenamate: 300 μ M (1% DMSO). SKF96365: 100 μ M (1% DMSO). Hyperosmotic: -/+ = 300 mOsm/400 mOsm, 10 分間。



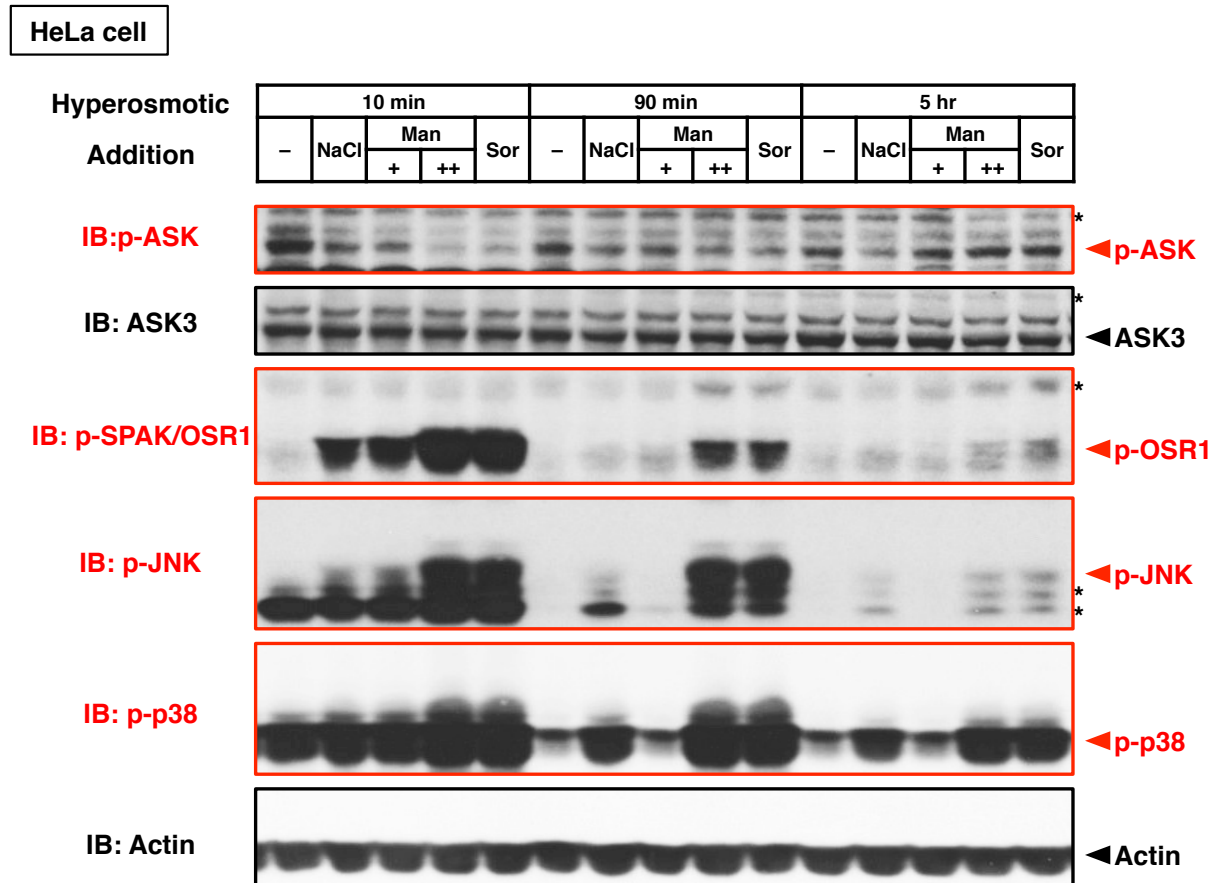
Sup.Fig.24 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化には、細胞外カルシウムは必要ない

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、細胞外カルシウム・細胞外マグネシウムのない状態で、高浸透圧ストレスを行った。細胞外にカルシウム・マグネシウムのない状態でも高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は観察された。Ca, Mg: 2 mM. PBS: 300 mOsm; PBS + 0.1 M Man.: 400 mOsm; PBS + 0.2 M Man.: 500 mOsm, 10 分間。



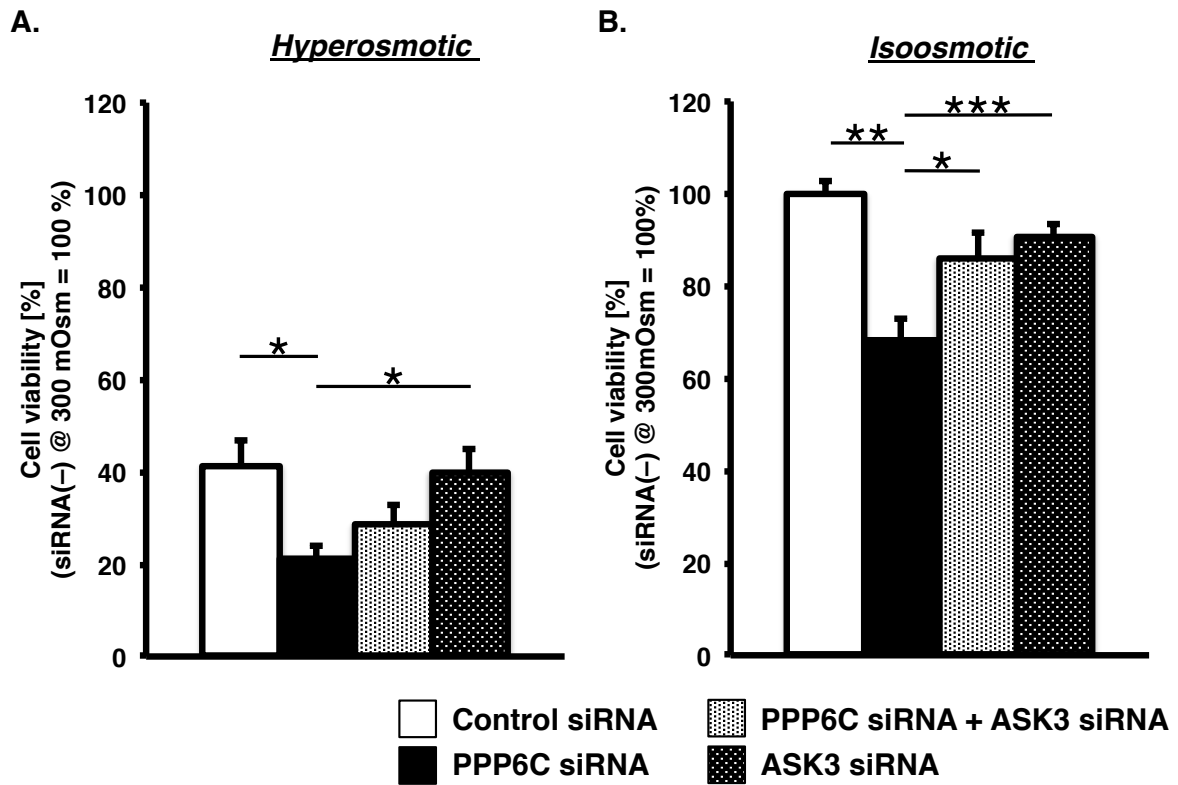
Sup.Fig.25 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に、細胞内カルシウムが必要である

テトラサイクリン誘導性の ASK3 恒常発現 HEK293A 細胞において、細胞内外のカルシウムをキレートした状態で、高浸透圧ストレスを行った。細胞外カルシウムをキレートしても高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化は観察されたのに対し、BAPTA-AM で細胞内カルシウムをキレートすると高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化が抑制された。EDTA, EGTA: 5 mM. BAPTA: 20 μ M BAPTA-AM (1 % DMSO), 30 分間前処置。



Sup.Fig.26 長時間の高浸透圧ストレスでは ASK3 不活性化は回復する

HeLa 細胞において、NaCl・マンニトール・ソルビトールを添加した高浸透圧培地に交換し、培養後、細胞を溶解・サンプル化した。10 分後にはいずれの高浸透圧培地によっても強度依存的に ASK3 不活性化、OSR1・JNK・p38 活性化は見られたが、時間が経つにつれ、マンニトールやソルビトール添加培地では等浸透圧培地と同程度のリン酸化レベルに収束していく様子が見られた。一方、NaCl 添加培地では、ASK3 不活性化はそのまま維持され、OSR1・JNK・p38 の収束も、より強い高浸透圧である 300 mM のマンニトールやソルビトール添加培地のよう遅かった。NaCl: 75 mM in culture medium. Man: +/++ = 150 mM/300 mM mannitol in culture medium. Sor: 300 mM sorbitol in culture medium.



Sup.Fig.27 ASK3 活性の上昇は細胞の生存活性を低下させる

HeLa 細胞において、各 siRNA をフォワードトランスフェクションにて導入してから 24 時間後、同一細胞数ずつ播種し直し、さらに 24 時間後に等浸透圧(A)・高浸透圧(B)の培地に交換した。48 時間培養後、Cell counting kit 8 を添加し、2 時間培養後に吸光度を測定した。Cell viability は siRNA 未導入の等浸透圧培養サンプル群の吸光度に対する割合と定義した。PPP6C の発現抑制によって ASK3 活性を高い状態にすると、細胞活性が有意に低下した。ここにさらに ASK3 を発現抑制すると、等浸透圧では細胞活性低下が有意に抑制され、高浸透圧ストレスでは細胞活性低下が抑制される傾向があった。siRNA: 30 nM. Hyperosmotic: 600 mOsm by mannitol. 数値は MEAN ± S.E.M., N=7. One-way ANOVA, followed by Tukey's HSD (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Sup.Tab.01 高浸透圧ストレスによる PP6 の細胞内局在変化

| PPP6C | PPP6R1 | PPP6R2 | PPP6R3 | ANKRD28 | ANKRD44 | ANKRD52 | 高浸透圧ストレスにより 粒状の局在をしめすか？ | hASK3-tdTomatoを共発現すると ASK3と共局在するか？ | |
|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------------------------|---------------------------------------|---|
| Venus | | | | | | | → | × | × |
| | YFP | | | | | | → | × | × |
| | | YFP | | | | | → | × | × |
| | | | YFP | | | | → | × | × |
| | | | | YFP | | | → | ○ | ○ |
| | | | | | YFP | | → | ○ | ○ |
| | | | | | | YFP | → | ○ | ○ |
| Venus | | | Flag | | | | → | × | × |
| Flag | | | Venus | | | | → | × | × |
| Venus | | | Flag | | | Flag | → | ○ | ○ |
| Flag | | | Venus | | | Flag | → | ○ | ○ |

HEK293A 細胞に、各組み合わせで PP6 のサブユニットを過剰発現し、共焦点顕微鏡下で Venus/YFP のシグナルを観察しながら、高浸透圧刺激 (500 mOsm) を行って、その後の局在変化を観察した。また、さらに ASK3-tdTomato と共発現した場合にも、同様に、Venus/YFP と tdTomato のシグナルが共局在するか観察した (Cf. Sup.Fig.11)。

謝辞

本博士論文は、筆者が東京大学 大学院薬学系研究科 薬科学専攻 博士後期課程在学中に細胞情報学教室において行った研究をまとめたものです。

本研究にあたり、研究全般にわたって終始ご指導して下さると同時に、本論文の審査委員主査として、本論文を審査して下さったのみならず、研究者として成長できる素晴らしい研究環境を与えて下さいました

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 一條秀憲 教授
に深く感謝申し上げます。

本論文の審査委員副査として、ご多用の中、本論文をご精読頂き、貴重なご助言を下さいました
東京大学 大学院薬学系研究科 生理化学教室 堅田利明 教授

同 遺伝学教室 三浦正幸 教授

同 分子薬物動態学教室 楠原洋之 教授

同 薬品作用学教室 池谷裕二 教授

に深く感謝申し上げます。

東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院「ライフイノベーションを先導するリーダー養成プログラム」(GPLLI)の学位指導教員として、ご多用の中、本論文をご精読頂き、異分野の観点から貴重なご助言を下さいました

東京大学 大学院医学系研究科 代謝栄養病態学(糖尿病・代謝内科) 門脇孝 教授

同 窪田直人 准教授

に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、ご自身の貴重な時間を割いてまで、詳細なご助言、丁寧なご指導を下さると同時に、日々のディスカッションを通して研究者としての論理的思考力を高めて下さいました

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 名黒功 講師

に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、欠かすことのできない先行研究をなされ、ASK3 恒常発現株の樹立ならびにハイコンテンツ解析を確立して下さいると同時に、研究の基本をご指導して下さいました

梅田剛 博士

に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、ご自身の経験を基に、様々な観点から貴重なご助言を下さいました

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 細胞制御学教室 武田弘資 教授

宮崎大学 医学部 機能生化学分野 西頭英起 教授

東北大学 大学院薬学系研究科 衛生化学分野 松沢厚 教授

Univ. of Cambridge (U.K.) 関根悠介 博士

Whitehead Institute for Biomedical Research (MIT; U.S.A.) 丸山剛 博士

東京大学 大学院薬学系研究科 ワンストップ創薬共用ファシリティセンター 藤澤貴央 特任助教
東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 関根(村上)史織 助教

同 服部一輝 特任助教

同 本間謙吾 特任助教

に深く感謝申し上げます。

本研究のスクリーニング遂行にあたり、siRNA の分注や機器の使用を快諾して下さると共に、低分子化合物スクリーニングのエキスパートとして貴重なご助言を下さいました

東京大学 創薬オープンイノベーションセンター 岡部隆義 特任教授

に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、欠かすことのできないツールである抗リン酸化 ASK3 抗体(PA41)を作製して下さると共に、具体的なお助言を下さいました

東京医科歯科大学 病態代謝解析学分野 丸山順一 助教

に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、PP6 のプラスミドを分与して下さいました

山口大学 獣医薬理学教室 大浜剛 准教授

に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご自身の研究で多用な中、ご助言下さいました、

名黒グループ 神山美樹 さん、椎崎繁 くん、丹羽國祥 くん、河原崎陽介 くん、芝本絵理香 さん、花房雄介 くん、町田俊也 くん、石川万葉 さん、西田卓人 くん

に深く感謝申し上げます。

また、研究生活を様々な面から支えて下さいました

東京大学 大学院薬学研究科 細胞情報学教室 巽圭子 学術支援専門職員

同教室の皆様

に深く感謝申し上げます。

最後に、家族をはじめ、今まで支えて下さった全ての方々に深く感謝申し上げます。