

論文の内容の要旨

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

【序論】

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）。そこで細胞は、浸透圧ストレスに応答し、イオンの流出入などを積極的に変化させることで、細胞体積を維持している。このようなイオンの流出入を担うエフェクター分子に関しては多くの知見が得られているものの、特に哺乳類細胞において、いかに細胞が浸透圧ストレスを認識し、シグナルをエフェクター分子まで伝達しているのかについては不明な点が多い。

当研究室で同定された Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)は、セリン/スレオニンキナーゼの1つであり、腎臓や胃、腸管といった浸透圧変化の激しい部位に強く発現している。興味深いことにASK3は、低浸透圧ストレスによって活性化し、逆に高浸透圧ストレスによって不活性化する。つまり、ASK3は両方向性の浸透圧ストレスに対して両方向性に応答でき、細胞の浸透圧ストレス応答機構において重要な役割を担っていると推測された。その後の解析から、ASK3はキナーゼ活性依存的に、イオントランスポーターを制御するWNK-SPAK/OSR1経路を抑制していることが明らかになり、ASK3ノックアウトマウスが高血圧を呈する要因も腎臓におけるWNK-SPAK/OSR1経路の亢進に由来すると考えられている。一方、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完全に不明である。また、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未解明である。

そこで私は、本学修士課程において、哺乳類細胞を用いて、ASK3のキナーゼ活性に必須なリン酸化レベルを指標としたハイコンテンツゲノムワイドsiRNAスクリーニングを行い、高浸透圧ストレスによるASK3不活性化制御分子の網羅的な同定を試みた。その結果63個の候補分子が得られたため、本研究では、これらの候補分子の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。

【方法と結果】

1. 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

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反応であること、汎プロテインホスファターゼ阻害剤フツ化ナトリウムの処置によって抑制されることから、プロテインホスファターゼの関与が示唆されていた。一方、得られた候補分子 63 個の中でプロテインホスファターゼとして報告があるのは、Protein phosphatase 6 (PP6)の触媒サブユニット(PPP6C)のみであった。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 細胞において活性化型の ASK3 (p-ASK3) 量を確認したところ、高浸透圧による ASK3 不活性化は、PPP6C の発現抑制によって抑制された。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。

PP6 はセリン/スレオニンプロテインホスファターゼであるため、続いて PP6 が ASK3 の直接のプロテインホスファターゼである可能性を検討した。PP6 は PPP6C と制御因子である PPP6R1/2/3 や ANKRD28/44/52 と三者複合体となって機能すると考えられているため、HEK293A 細胞に PP6 の全構成サブユニットあるいは ASK3 を過剰発現し、免疫沈降法によってそれぞれを精製した後、混ぜて *in vitro* で反応させた。その結果、PPP6C の不活性型変異体(D84N)ではなく、野生型の PP6 複合体においてのみ、p-ASK3 の減弱が確認された。以上より、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は PP6 であると考えられた。

2. 高浸透圧ストレス依存的に ASK3 と PP6 の結合が増加する

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について検討した。高浸透圧ストレスによって PP6 量の顕著な増加は見られなかったため、PP6 のホスファターゼ活性が増加する可能性を検討したが、高浸透圧ストレスによって PP6 のホスファターゼ活性に変化は見られなかった。そこで、PP6 と ASK3 を HEK293A 細胞に共発現し、免疫沈降法により結合を検討したところ、p-ASK3 量と逆相関して、高浸透圧ストレス依存的に PP6 複合体と ASK3 の結合の増加が確認された。よって、高浸透圧ストレスによって PP6 と ASK3 の結合が増加することで、ASK3 不活性化は亢進することが示唆された。

3. NAMPT の酵素反応の最終産物である NAD⁺が、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に必要である

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った PP6 ではなく、NAD⁺合成経路の律速反応を触媒する Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)であった。そこで、ASK3 不活性化制御機構の全貌を解明すべく、NAMPT の関与についても検討することにした。NAMPT の特異的な阻害剤である FK866 を処置すると、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化の抑制が見られた。さらに、NAMPT の酵素反応産物である Nicotinamide mononucleotide (NMN)を添加すると、FK866 による ASK3 不活性化の抑制が解除された。なお、NMN は続く反応によって NAD⁺になるが、NAD⁺の添加でも同様であった。よって、NAMPT は酵素反応産物である NMN や NAD⁺を介して、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化に関与していると考えられた。

4. 高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化制御機構において、NAMPT は PP6 の上流で関与する

以上より、高浸透圧ストレスによる ASK3 不活性化において、PP6 と NAMPT の関与が明らかになったため、PP6 と NAMPT の関係性について検討した。NAMPT と PPP6C の単独発現抑制を比べると、スクリーニングの結果と同様、NAMPTの方がASK3不活性化の抑制効果は大きかった。ここでNAMPTとPPP6Cを共に発現抑制した場合と比べると、ASK3不活性化の更なる抑制効果は見られず、NAMPT単独発現抑制と同程度であった。さらに、ASK3とPP6の結合はFK866処置で減弱し、逆にNMNやNAD⁺添加では増強した。これらの結果より、PP6とNAMPTは独立関係にあるのではなく、NAMPTがPP6の上流でASK3不活性化に作用していることが示唆された。

5. 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

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。一方、アポトーシス時においても細胞体積の減少は早い段階から観察されることが有名であり、この時ASK1が細胞体積の回復を阻害するという報告もなされている。よって、ASK1と相互にリン酸化できるASK3の活性が高浸透圧ストレス後も維持されたなら、細胞体積の回復ができず、細胞死が誘導されるのではないかと推測し、この仮説を検証した。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ところ、PPP6Cを発現抑制した場合、有意に細胞死が亢進した。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たことから、ASK3の不活性化は細胞死抑制に必要であることが示唆された。

【まとめと考察】

現在までに、PP6は細胞周期やDNA損傷、NAMPTは代謝、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係については全く考えられていない。本研究において私は、PP6とNAMPTが高浸透圧ストレスによるASK3不活性化を制御していることを明らかにした。例えば、細胞周期の間、浸透圧ストレス後の細胞体積回復機構と同様の機構を利用して、細胞は積極的に細胞体積を変化させている可能性が示唆されており、本研究は、既存のPP6やNAMPTの役割に関して、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を示唆するものである。

また、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。これは、高浸透圧ストレス後にASK3を不活性化するようなシステムを細胞がわざわざ備えているということを意味し、ASK3の活性変化が生存と細胞死を決定する分岐点となっている可能性を推察させる。