

発表番号 62 (0534)

細胞の容積調節性 NaCl 摂取制御機構とアポトーシス時に おけるその抑制機構の解明

高橋 信之 (自然科学研究機構生理学研究所)

清水 貴浩 (自然科学研究機構生理学研究所)

井上 華 (自然科学研究機構生理学研究所)

細胞は、様々な細胞外高浸透圧ストレスにさらされている。それにも関わらず、それらは常にほぼ一定の細胞容積を維持している。これは、細胞外高浸透圧条件下での容積縮小後に、NaCl 取込とそれに伴う水の流入による調節性細胞容積増大 (regulatory volume increase: RVI) と呼ばれる容積調節能を細胞が持っていることによる。この NaCl 取込を介した RVI は、細胞の生存に必須であり、RVI に関与する NaCl トランスポータを阻害すると、高浸透圧条件下で RVI が起こらず、アポトーシスが引き起こされる。そこで細胞外高浸透圧刺激がどのようにして NaCl 取込を介する RVI を起こすのかを明らかにする目的で、まず RVI 誘導シグナルの解析を、各種リン酸化酵素阻害剤を用いて行った。様々なリン酸化酵素阻害剤の中で、Akt の活性化を抑制する阻害剤が RVI を抑制した。高浸透圧条件下で Akt はリン酸化されることで活性化されていることから、HeLa 細胞での RVI は、高浸透圧条件により活性化された Akt が NaCl トランスポータを介した NaCl 取込を促進させて

達成されることが示唆された。

この NaCl 取込による RVI は、持続的な細胞容積の減少が起こるアポトーシス刺激により抑制される。そこで、その RVI の抑制メカニズムを明らかにするため、以下の実験を行った。酸化ストレスによりアポトーシスを誘導すると、高浸透圧条件下での NaCl 取込を介した RVI が抑制されたが、各種活性酸素種 (ROS) スカベンジャーを共存させると、RVI は抑制されなかった。したがって酸化ストレスによる RVI 抑制に ROS が関与していると考えられた。そこで ROS により活性化される ASK1 というアポトーシス誘導に重要なリン酸化酵素に着目し、その変異体を細胞に導入すると、酸化ストレスで抑制されていた高浸透圧刺激による Akt の活性化および NaCl 取込を介した RVI が回復した。これらの結果より、酸化ストレスで生じた ROS が ASK1 を活性化し、この活性化 ASK1 が本来、高浸透圧刺激で活性化される Akt を抑制し、NaCl 取込に伴う RVI を阻害していることが示唆された。

助成番号 0534

細胞の容積調節性 NaCl 摂取制御機構とアポトーシス時における その抑制機構の解明

高橋 信之 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所細胞器官研究系)
清水 貴浩 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所細胞器官研究系)
井上 華 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所細胞器官研究系)

研究目的

細胞容積制御機構は、細胞内外の浸透圧環境の変化に伴う細胞容積変化に対する応答として、細胞の生存に必須の生理的調節機構である。生体内では、継続的に塩類などの浸透圧形成に関わる物質の濃度変化が生じており、細胞は常にその変化に起因した浸透圧ストレスにさらされている。そうした浸透圧ストレスを引き起こす物質として塩化ナトリウム(NaCl)は極めて重要であり、その細胞内外濃度は、摂食後など生理的変化だけでなく、腎機能不全や虚血などの病的状況下でも大きく変動することが知られている。さらに NaCl は、浸透圧ストレスを引き起こす物質であるだけでなく、その浸透圧ストレスに対する細胞容積制御機構にも関与する。細胞が高い塩濃度などの高浸透圧条件下に置かれると、細胞内外の浸透圧差により、細胞内より水が流出し、細胞容積が減少する。しかしその細胞容積減少を刺激として、 Na^+/H^+ exchanger (NHE) や $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (anion exchanger; AE) といった様々なイオントランスポーターが並列的に活性化されることで、塩の細胞内への取込、それに伴う水の流入を引き起こし、細胞容積をもとの状態へと増大させる。この現象は、調節性細胞容積増大(RVI; regulatory volume increase)と呼ばれているが、この RVI の際に細胞内へ取り込まれる塩が NaCl である。このように、NaCl の細胞内外での動態は、浸透圧ストレス形成だけでなく、その後の細胞容積制御機構においても重要な要因となっている。しかし細胞容積の減少が、どのようにして NHE や AE といった NaCl トランスポーターを活性化するのかについては、現時点でも謎のままである。この RVI における NaCl 動態変化は、細胞生理学的に極めて重要な研究対象であるため、細胞容積減少による NaCl トランスポーター活性化を介した RVI 誘導制御メカニズムの解明を本研究の第一の目的とする。

一方、生体内での細胞容積の減少は、細胞内外の浸透圧変化によるものだけでなく、正常な形態形成だけでなく、様々な病態下でも観察される「アポトーシス」と呼ばれるプログラム細胞死でも起こりうる。このアポトーシス性

細胞容積減少(AVD; apoptotic volume decrease)と呼ばれる細胞の萎縮は、本来、細胞容積が増大した場合に活性化される容積感受性クロライドチャンネル(VSOR)の容積変化を伴わない活性化を介していることが明らかにされている^[1]。さらに VSOR に対するブロッカーは AVD だけでなくアポトーシスそのものも抑制できること(上皮・神経・リンパ系細胞^[2]、心筋細胞^[3])から、AVD はアポトーシスに必要不可欠な現象であるといえる。この AVD は細胞容積の明らかな減少であり、本来、容積減少によって活性化される RVI が起こるはずである。しかし AVD 発生時においてはこの RVI が抑制されることで細胞容積の減少が維持されることを私達は予備的に確認している。つまりアポトーシス刺激は、「VSOR 活性化による AVD の誘導」だけでなく、通常は細胞容積減少により誘導される「RVI をもたらず NaCl 摂取機構の抑制」を引き起こすと考えられる。しかしアポトーシス時に、どのようにして RVI をもたらず NaCl 摂取機構が抑制されているのかについては全く不明である。この RVI の抑制はアポトーシスに必須であるため、そのメカニズムの解明は、様々な病態下で起こるアポトーシスをコントロールすることにつながると考えられる。そうしたアポトーシスのコントロールにより、アポトーシス性細胞死に起因した疾患(虚血性の心疾患や脳神経疾患)を治療するための新たな方法の確立が可能となるはずである。そこで、AVD における RVI 容積調節性 NaCl 摂取機構抑制メカニズムの解明を本研究の第二の目的とする。

方法

1. RVI 誘導に関与する高浸透圧誘導性細胞内シグナル伝達系の探索

これまでの研究で、高浸透圧刺激により様々な細胞内情報伝達系が活性化され、そうした高浸透圧誘導性細胞内シグナルが高浸透圧条件下における細胞機能の調節に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。そこで、高浸透圧刺激による RVI 誘導メカニズムを解明するため、高 NaCl 濃度などの高浸透圧刺激により細胞

容積が減少した場合に活性化される細胞内情報伝達系、特にタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)に着目し、それら阻害剤を添加することで容積減少後の RVI に変化が生じるかどうかを検討する。予備的実験では、用いた阻害剤の中で、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K)とその情報伝達系の下流に位置する Akt/PKB というキナーゼに対する阻害剤が有意に RVI を抑制した。したがって、この PI3K・Akt/PKB シグナル経路を中心に、RVI 誘導への関与を検討する。

2. アポトーシス刺激による RVI 抑制メカニズムの解析

高浸透圧刺激で活性化される Akt が、どのようにしてアポトーシス刺激により抑制されるのかを明らかにするため、アポトーシス誘導時に産生される活性酸素種(ROS)に着目する。ROS は様々なアポトーシス刺激でその産生が誘導され、AVD における VSOR 活性化にも関与することが明らかにされている[1]。また ROS は様々な細胞内情報伝達系をも同時に活性化する。そこで ROS の影響を検討するため、ROS スカベンジャーの添加や ROS により活性化される細胞内情報伝達系の阻害剤添加などで Akt/PKB の活性化や RVI 誘導性 NaCl トランスポータ活性の変化が起こりうるかどうか調べる。予備的実験では、ROS により活性化されるキナーゼである ASK1 が Akt/PKB の活性制御に関与する可能性を示唆するデータが得られている。この ASK1 の dominant-negative 変異体を用いて Akt/PKB の活性化や RVI 容積調節性 NaCl 摂取の誘導にどのような変化が生じるかを検討する。

結果

1. RVI 誘導に関与する高浸透圧誘導性細胞内シグナル伝達系の探索

これまでに、高浸透圧刺激で様々なキナーゼが活性化されることが報告されている。そうした高浸透圧刺激誘導性キナーゼには、MAP キナーゼをリン酸化するキナーゼである MEK1・MEK2 やストレス誘導性キナーゼとして知られている JNK・p38MAPK、増殖因子などの生存シグナルにより活性化される PI3K・Akt/PKB などが含まれている。そこでまず、MEK、JNK、p38MAPK、PI3K それぞれに対する阻害剤を添加し、高浸透圧条件下における NaCl 摂取がどのように変化するかを、NaCl 摂取により生じる細胞容積変化(RVI)を指標に検討した(Fig.1)。

HeLa 細胞を 90 分間、各種阻害剤を含む高浸透圧(450 mOsm)の緩衝液中に置き、細胞容積を測定した。MEK 阻害剤(10 μ M U0126)、JNK 阻害剤(20 μ M SP600125)、p38 MAPK 阻害剤(10 μ M SB208530)の添加は、いずれも RVI には影響はなく、細胞はコントロールと同様に NaCl 摂取を介した RVI を起こした。したがって、MEK、JNK および p38 MAPK は、RVI をもたらす高浸透圧誘導性 NaCl 摂取機構の誘導に関与しないことが示唆された。しかし PI3K 阻害剤である wortmannin (20 μ M)や LY294002 (20 μ M)の添加により、RVI は有意に抑制された。PI3K は Akt/PKB の上流のキナーゼであり、Akt/PKB もまた高浸透圧刺激で活性化されることが他の細胞系で報告されていることから、次に Akt/PKB 阻害剤

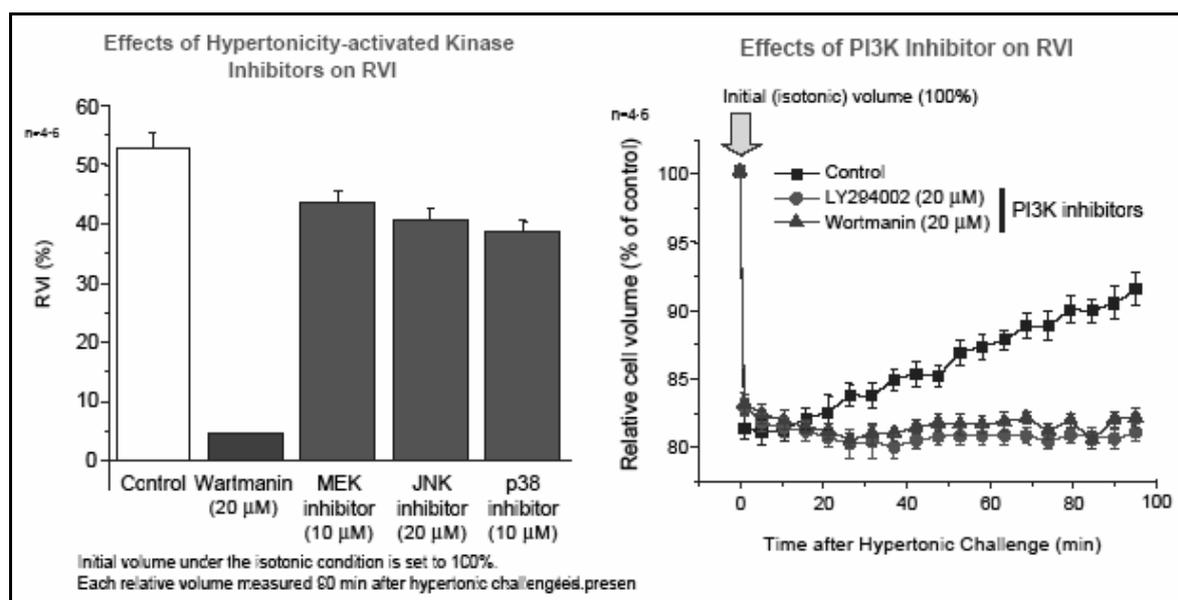


Fig. 1 Effects of various kinase inhibitors on RVI.

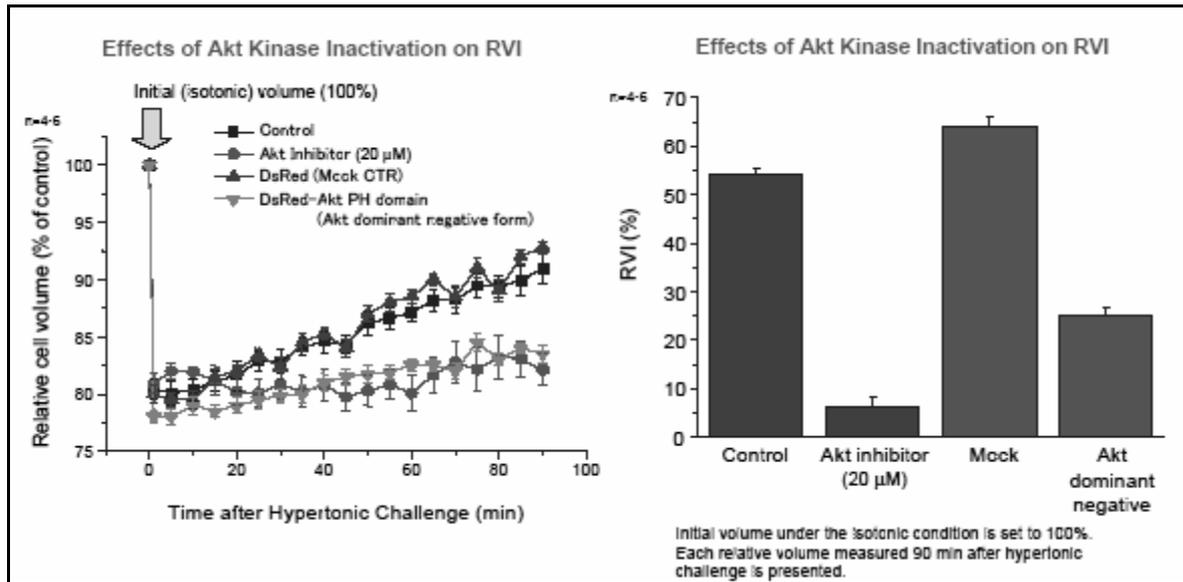
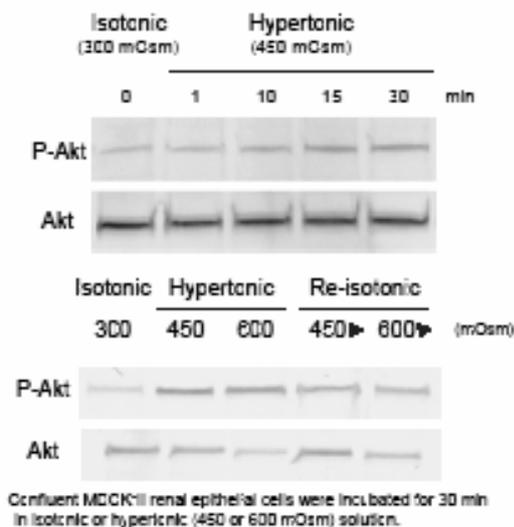


Fig. 2 Effects of an Akt/PKB inhibitor and a dominant negative form on RVI.

の添加および Akt/PKB の活性化されない変異体 (Akt-DN; dominant negative)の導入が、RVI にどのような作用を示すか検討した (Fig. 2)。

Akt/PKB 阻害剤と不活性な Akt/PKB 変異体はいずれも、RVI を抑制した。PI3K により活性化された Akt/PKB が RVI を誘導する NaCl トランスポータの活性化に関与していると考えられた。実際に、Akt/PKB 活性化の指標である Akt/PKB そのもののリン酸化レベルは、時間依存的に高浸透圧刺激により上昇した (Fig. 3)。

Activation of Akt Kinase by Hypertonic Stimulation



Confluent MDCK-II renal epithelial cells were incubated for 30 min in isotonic or hypertonic (450 or 600 mOsm) solution.

Fig. 3 Activation of Akt/PKB by hypertonicity.

前述の通り、Akt/PKB は、増殖因子などにより活性化されるキナーゼで、細胞の生存に必須であることが知られており、アポトーシス誘導時に抑制されることも報告されていた。したがって、アポトーシス刺激により Akt/PKB が抑制されると、その Akt/PKB 活性が必要な NaCl 摂取機構 (RVI) が抑制されることが予想された。そこで次に、RVI をもたらず NaCl 摂取のアポトーシス誘導時における抑制機構の解析を検討した。

2. アポトーシス刺激による RVI 抑制メカニズムの解析

まずアポトーシス刺激により高浸透圧誘導性の NaCl 摂取が抑制されるかどうかを、NaCl 摂取に伴う細胞容積変化 (RVI) を指標に検討した (Fig. 4)。アポトーシス刺激としては、ミトコンドリアの機能阻害を引き起こすスタウロsporin (STS) やロテノン (ROT) といった活性酸素種 (ROS) の産生をもたらすことが知られている酸化ストレス刺激を用いた。

コントロールの細胞が高浸透圧刺激前の 90% 程度まで容積が回復するにもかかわらず、高浸透圧刺激の前に 2 時間、アポトーシス刺激を施した細胞では、細胞容積の回復がまったく認められなかった。したがって、これらアポトーシス刺激は、高浸透圧により誘導される NaCl 摂取と、それに伴う細胞容積の回復 (RVI) を抑制していると考えられた。高浸透圧刺激で誘導される Akt/PKB のリン酸化が、過酸化水素添加によって抑制されたことから (Fig. 5)、アポトーシス刺激による NaCl 摂取と RVI の抑制は、本来、高浸透圧刺激により活性化される Akt/PKB の不活性化を介している可能性が考えられた。この抑制

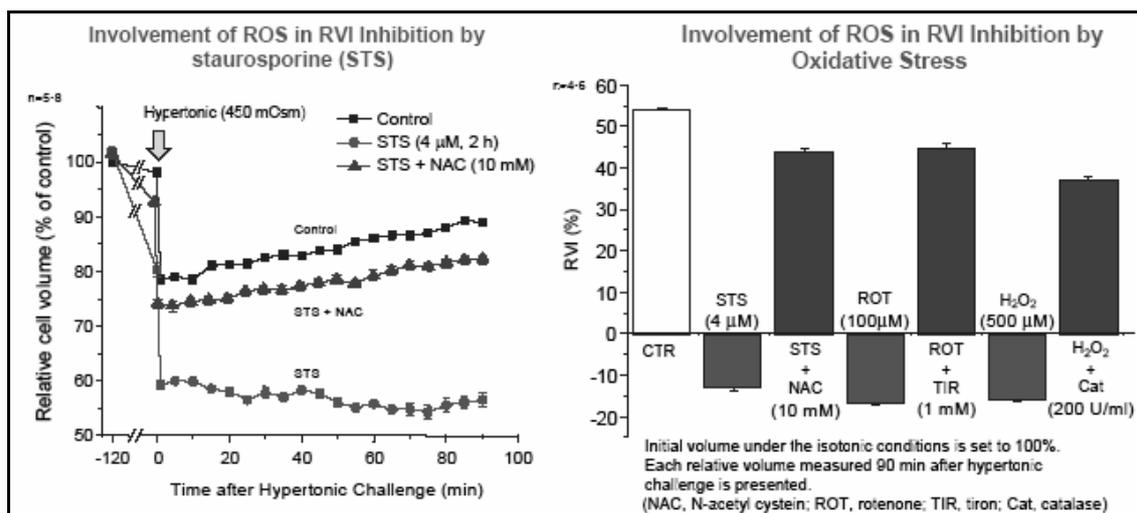


Fig. 4 Inhibition of RVI by oxidative stresses and restoration of the RVI inhibition by ROS scavengers.

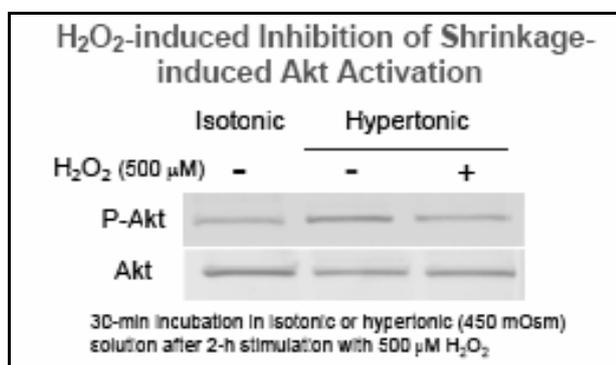


Fig. 5 Inhibition of hypertonicity-induced Akt/PKB activation by oxidative stress.

は、活性酸素種(ROS)スカベンジャーであるN-アセチルシステイン(NAC)や tiron (TIR)、カタラーゼ(Cat)を各種アポトーシス刺激時にそれぞれ添加することで解除された。このことは、これらアポトーシスを誘導する酸化ストレスによるNaCl 摂取とRVIの抑制に、ROSが重要な役割を担っていることを示唆する。つまり、ROSにより活性化される情報伝達系が、Akt/PKBの不活性化をもたらし、NaCl 摂取とRVIの抑制を引き起こすと考えられた。

そこでROSで活性化され、アポトーシス誘導にも関与していることが知られているアポトーシスシグナルキナーゼ1(ASK1)に着目した。ASK1は、酸化ストレス誘導性アポトーシスを初めとして、TNF-αやFasリガンドなどのデスレセプターを介したもので様々なアポトーシスに関与していることが報告されている。HeLa細胞でも、スタウロスポリンや過酸化水素の添加によってASK1が活性化される(Fig. 6: ASK1の活性化も、Akt/PKBの場合と同様

に、リン酸化されることを必要とするため、ASK1のリン酸化レベルを調べることで、その活性化レベルを検討することが可能である)。さらにASK1の活性を抑えるため、キナーゼ活性を消失させたASK1変異体(ASK1-KD)を過剰発現させたHeLa細胞では、過酸化水素添加によるAkt/PKBの活性化抑制が解除され、高浸透圧刺激によるリン酸化レベルの上昇が観察された。さらにASK1変異体の過剰発現は、過酸化水素添加によるNaCl 摂取を介したRVIの抑制を解除した(Fig. 7)。これらの結果は、ASK1がアポトーシス刺激によるNaCl 摂取を介したRVIの抑制に関与していることを示唆している。

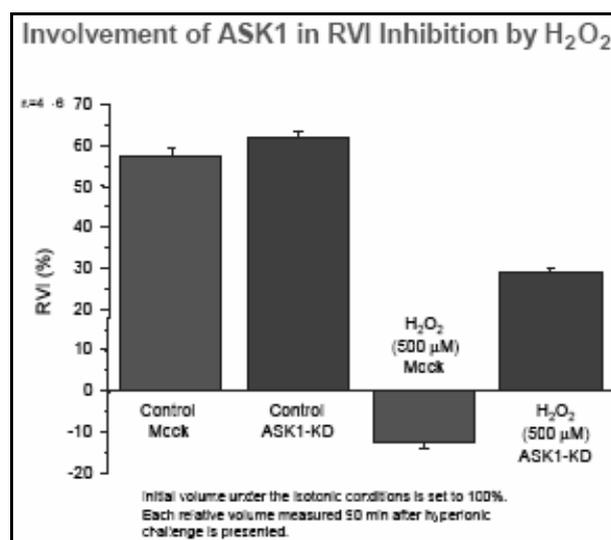


Fig. 6 Involvement of ASK1 in the oxidative stress-induced inhibition of Akt/PKB activation.

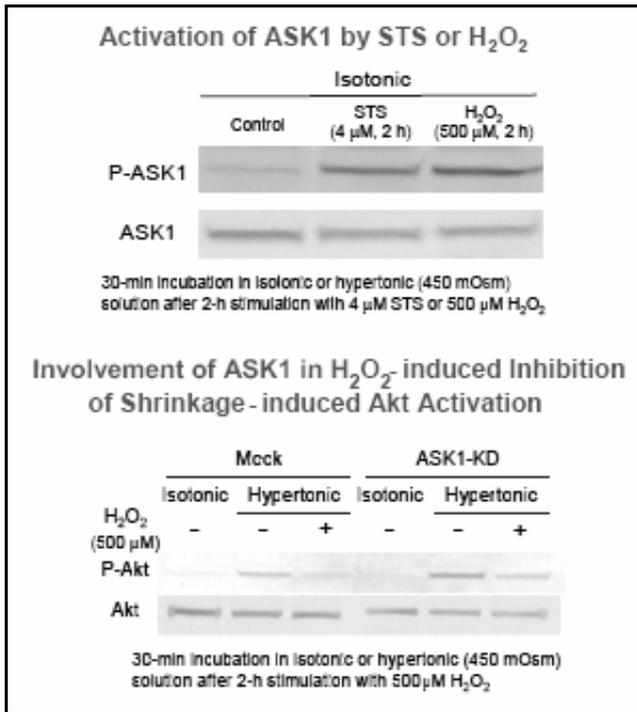


Fig. 7 Restoration of the RVI inhibition by expression of ASK1 mutant.

考察

RVI 誘導に関与する高浸透圧誘導性細胞内シグナル伝達系の探索については、阻害剤や変異体を用いた実験により、PI3K・Akt/PKB シグナル経路、特に Akt/PKB の活性化が大変、重要であることが明らかとなった。RVI は、高浸透圧刺激により細胞容積が減少することに対する細胞応答であり、細胞の生存に必要である[2, 3]。本研究で使用した HeLa 細胞を高浸透圧刺激する際に、NaCl トランスポーター(NHE1 や AE2) の阻害剤を添加して RVI を阻害し、細胞容積を減少させたままにすると、カスパーゼ活性が上昇し、やがて細胞はアポトーシスを起こして死んでしまう。このように細胞の生存に必要な RVI が、同様に細胞の増殖・生存に必須であるとされる Akt/PKB シグナルによって誘導されることは理にかなっており、Akt/PKB シグナルが細胞の増殖や運動を促すだけでなく、細胞容積も調節することで、細胞の生存維持を担っていることが示唆される。Akt/PKB シグナルは、他の細胞系でイオンチャネルやイオントランスポーターの局在を変化させることが報告されており、細胞内イオンバランスの調節に対しても重要なシグナルであると考えられる。

アポトーシス刺激による RVI 抑制メカニズムの解析については、本研究で初めて ASK1 が細胞容積制御に関与することが示された。ASK1 の活性を抑えることで、過酸化水素添加などのアポトーシス刺激により抑制されて

いた Akt/PKB の活性が回復し、その結果、NaCl トランスポーターが活性化され、NaCl 摂取を介した RVI が起こったと考えられる (Fig. 8)。

ASK1 は様々なアポトーシス刺激で活性化されるため、ASK1 が細胞容積の縮小で活性化される Akt/PKB を抑制することにより RVI を阻害することは、アポトーシスを実行するためにきわめて重要である。したがって、RVI をもたらず NaCl 摂取を誘導する Akt/PKB の活性化と、RVI を抑制してアポトーシスを誘導する ASK1 の活性化とのバランスが、細胞の生死を決定する上で、きわめて重要な因子であると考えられる。

Possible mechanism of regulatory volume increase (RVI) and inhibition of RVI by apoptotic signals

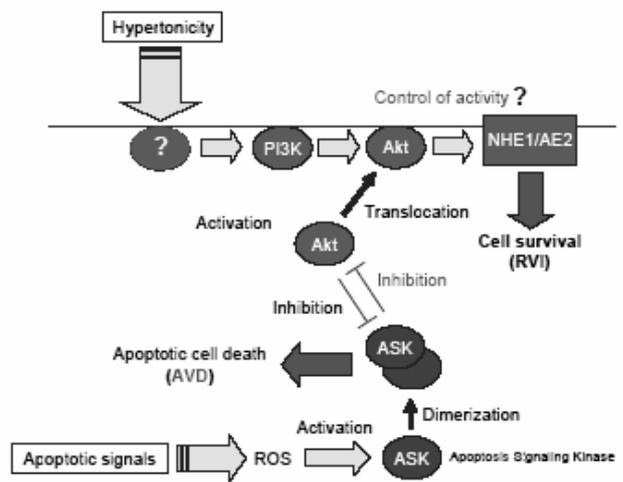


Fig. 8 A model of regulation in NaCl absorption (RVI) by hypertonicity and apoptotic stimulations.

今後の課題

まず Akt/PKB シグナルが NaCl トランスポーターをどのようにして制御しているのかを明らかにする必要がある。NaCl トランスポーターである NHE1 や AE2 は、様々なキナーゼにより直接、リン酸化されることが報告されている一方、多様な調節タンパク質と相互作用することで様々な制御を受けていることも知られている。高浸透圧条件下における NaCl 摂取のメカニズムの解明のためには、Akt/PKB シグナルが、何をリン酸化することで NaCl トランスポーターの活性化をもたらすか詳細に検討することは大変、重要である。さらに ASK1 による Akt/PKB シグナルの抑制を介した NaCl 摂取の阻害作用について、ASK1 が Akt/PKB 活性をどのようにして抑制しているのか明らかにすることが必要である。このメカニズムが明らかとなれば、酸化ストレスなどのアポトーシス刺激による NaCl 摂取

阻害を回復させることで、細胞死を阻害する薬剤の開発にもつながり、細胞生理学的な意味だけでなく、臨床医学的な意味においても重要であると考えられる。

文 献

- [1] Shimizu, T., Numata, T. and Okada, Y. (2004) A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. PNAS, 101, 6770-6773.
- [2] Maeno, E., Ishizaki, Y., Kaneseke, T., Hazama, A. and

Okada, Y. (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. PNAS, 97, 9487-9492.

- [3] Takahashi, N., Wang, X., Tanabe, S., Uramoto, H., Jishage, K., Uchida, S., Sasaki, S. and Okada, Y. (2005) ClC-3-independent sensitivity of apoptosis to Cl⁻ channel blockers in mouse cardiomyocytes. Cell. Physiol. Biochem., 15, 263-270.

0534

Analysis of volume-dependent cellular NaCl absorption and inhibition of the absorption during apoptotic cell death.

Nobuyuki Takahashi, Takahiro Shimizu, Hana Inoue
Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences

Summary

Almost cells show cell volume recovery from shrinkage induced by extracellular hypertonicity (regulatory volume increase; RVI), in which water molecules inflow into cytosol following to NaCl absorption. However, under apoptotic conditions, cell volume persistently decreases without RVI. This indicates that RVI is inhibited under apoptotic conditions. Therefore, followed experiments were performed to answer to questions, “How is RVI via NaCl absorption induced by hypertonicity ?” and “How is RVI via NaCl absorption inhibited by apoptotic stimuli ?”

RVI via NaCl absorption of human epithelial cells, HeLa cells, was significantly inhibited by Akt inhibitor under hypertonic conditions. Moreover, exogenous expression of Akt dominant negative form also inhibited the RVI of HeLa cells. Akt was phosphorylated by hypertonicity in HeLa cells. This phosphorylation of Akt was inhibited by various apoptotic stimuli such as either application of staurosporine, H₂O₂, or TNF- α , which can induce apoptosis and suppress RVI in HeLa cells. Next, to elucidate molecular mechanism of RVI inhibition by apoptotic stimuli, we examined the involvement of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), which is activated by apoptotic stimuli described above. Overexpression of ASK1 kinase dead mutant restored the Akt phosphorylation and RVI under apoptotic conditions.

Thus, it is possible that Akt is activated by hypertonicity to induces volume-dependent NaCl absorption (RVI) in HeLa cells and that the activation of Akt is inhibited by ASK1 activated by various apoptotic stimuli so that persistent cell shrinkage occurs without the volume-dependent NaCl absorption to cause apoptotic cell death.