

低-高ナトリウム環境に両方向性かつ段階的に応答するキナーゼを手がかりとした体内ナトリウム環境センシングの分子機構解明とマクロファージにおける機能解析

名黒 功

東京大学大学院薬学系研究科

概要

我々ヒトの体液に含まれるナトリウムイオン(Na^+)は、物質の輸送や電気生理学的機能に必須であり生命維持の根幹をなす。一方で食塩の過剰な摂取は様々な疾病のリスク因子になることが疫学的に示されているが、いまだに Na^+ が生体に与える影響については分子機構が不明なものも多く残されている。

本研究では、低・高 Na^+ 環境変化で活性を両方向性に變化させることを助成研究者が発見した Apoptosis Signal-regulating Kinase 3 (ASK3) と Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK) というキナーゼに注目して、これらのキナーゼがどのようにして Na^+ 環境(浸透圧)依存的に活性變化するのか分子メカニズムを解析した。

この解析では特に ASK3 の液-液相分離(LLPS)とミトコンドリアの形態變化に注目した。さらに、これらのキナーゼはマクロファージに発現することから、 Na^+ 環境とマクロファージの機能の関係についてトランスクリプトーム解析を行った。

解析の結果、LLPS により形成される ASK3 液滴は細胞外浸透圧が高いほど小さく、数が多くなることが判明し、これは ASK3 液滴の表面積を増加させて効率よくフォスファターゼに脱リン酸化(不活性化)されることに繋がり、液滴のサイズが定量的な Na^+ 環境の感知に利用されていることが示唆された。また、細胞内に流入した Na^+ は ASK3 液滴の流動性を増加させており、この流動性も ASK3 の効率的な脱リン酸化に必要であることが明らかになった。

超解像顕微鏡による観察から高 Na^+ 刺激をすると数秒で細胞内のミトコンドリアが収縮し、膜電位の低下が始まること明らかになった。また、この際ミトコンドリア内で PDK2 が顆粒状に局在變化する様子が観察された。ミトコンドリアの代謝變化に関与する PDK の活性變化がこのミトコンドリア形態の變化に誘導される可能性がある。

マウスの腹腔マクロファージを、低・等・高 Na^+ 環境で培養して RNA-Seq による網羅的トランスクリプトーム解析を行った。発現變動した遺伝子の多くは低・高 Na^+ 環境に対して量的に逆方向に變化し、そのうち一部の遺伝子発現變化は ASK3 KO マウスのマクロファージで失われていた。マクロファージの Na^+ 環境応答が ASK3 や PDK のような両方向性の応答分子で制御されていることが示唆され、これらの分子の Na^+ 環境応答の分子機序を解明することでマクロファージの関与する Na^+ 関連疾患の理解と治療につながることを期待される。

1. 研究目的

我々ヒトの体液が多くのナトリウムイオン(Na^+)を含むことから分かるように、食塩の摂取は体内における水をはじめとする様々な物質の輸送と恒常性維持、細胞の電気生理学的機能などに必須であり、生命維持の根幹をなす。一方で食塩の過剰な摂取は循環器疾患、自己免疫疾患、ある種のがんなど、現代でも問題となる疾病のリスク因子

になることが疫学的に示されている⁽¹⁾。このように適切な量の Na^+ の重要性は広く知られるところであるが、いまだに Na^+ が生体に与える影響については分子メカニズムが不明なものも多く残されている。近年、²³Na-MRI などの発展に伴い体内の局所に Na^+ が蓄積する部位があることが明らかになってきている。食塩摂取で皮膚に Na^+ が蓄積することや、がん、感染の患部に Na^+ が蓄積して高浸透圧環境

が形成されることがわかり、感染防御、自己免疫疾患、がん免疫、免疫細胞疲弊などとの関連が明らかになりつつある⁽²⁻⁶⁾。高 Na⁺環境にさらされたマクロファージが炎症促進性のサブセット(M1 様マクロファージ)に分化しやすいことも報告され、特に免疫細胞と体内局所の Na⁺環境の関係が注目されている⁽⁷⁾。しかし、免疫細胞がこのような体内 Na⁺環境を感知して機能する分子メカニズムについては高 Na⁺環境で活性化する転写因子 NFAT5 が知られる程度にとどまる。例えば、逆の低 Na⁺環境でどのような反応が起こるか、そこではどのような分子が働くかなどは解析が進んでおらず、低・高 Na⁺環境両方の視点からの包括的な Na⁺環境の影響の理解は充分なされていない。低から高にわたる連続的な範囲の Na⁺環境感知に関わる新たな分子機構の解析は上述した病態と Na⁺の関連について理解を深め、それらに対する創薬の新たな標的分子の提案につながると期待できる。

助成研究者はこれまで細胞の浸透圧ストレス応答機構に関する研究を精力的に進めており、MAPK 経路上流分

子で細胞体積制御にも関わる Apoptosis Signal-regulating Kinase 3 (ASK3) と、糖代謝に關与する Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK) という 2 つのキナーゼが低-高 Na⁺環境に対して両方向性に応答し瞬時に活性を変化させることを独自に見出している⁽⁸⁻¹²⁾ (**Fig. 1**)。また、これらのキナーゼがマクロファージ細胞に発現し、機能制御に関与するという結果を得ている。そこで本研究では、助成研究者の独自の知見を基にこれらの 2 つのキナーゼに焦点を当て、細胞外 Na⁺環境の変化(浸透圧変化)がどのようにしてキナーゼ活性変化を誘導するか分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、これらのキナーゼの Na⁺環境応答がマクロファージのどのような機能に影響するかについて明らかにすることも目的とした (**Fig. 2**)。これらの解明により、生体が Na⁺を感知する新たな分子機構の解明と、それを基盤としたマクロファージ制御によるナトリウム関連疾患の革新的な治療法の開発につながると期待される。

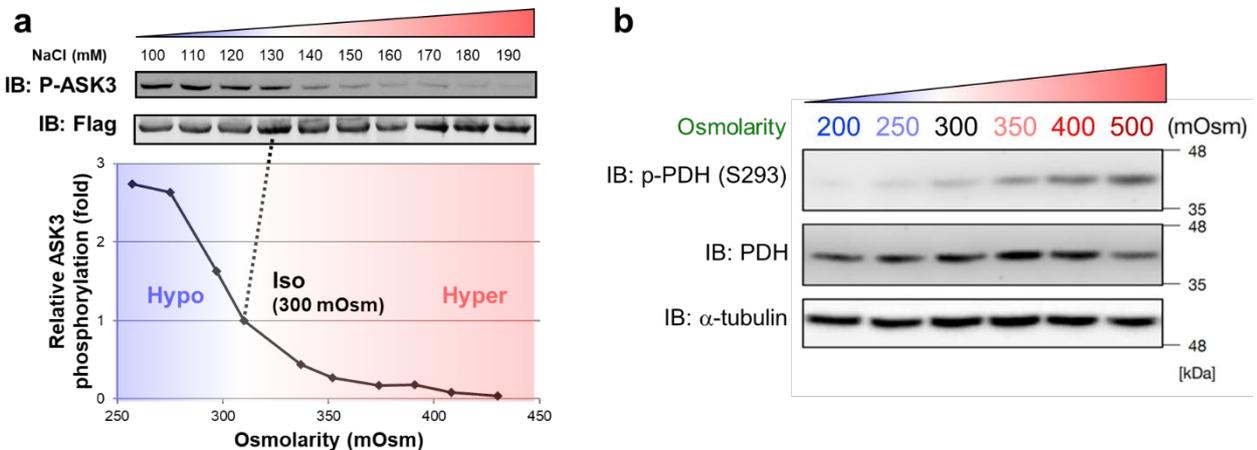


Fig 1. ASK3 (a) and PDK (b) bidirectionally respond to osmotic stress (NaCl concentration).

The kinase activity of ASK3 can be monitored by autophosphorylation. ASK3 is activated and inactivated by hypo- and hyper-osmotic stress, respectively. PDK phosphorylates PDH as a substrate. PDK is inactivated and activated by hypo- and hyper-osmotic stress, respectively. These two kinases gradually and bidirectionally change their kinase activity in response to extracellular NaCl concentration.

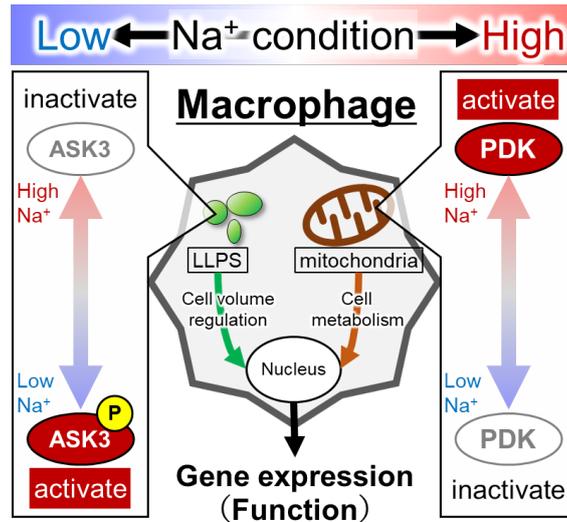


Fig 2. ASK3 and PDK are expressed in macrophage cells.

This study aims to elucidate the molecular mechanisms how ASK and PDK change their kinase activity by Na^+ conditions and their functions (gene expression) in macrophage cells.

2. 研究方法

2. 1 低-高 Na^+ 環境応答性キナーゼの活性変化メカニズムの解析

2. 1. 1 液-液相分離(LLPS)を介する ASK3 の活性制御

ASK3 は等浸透圧 (300 mOsm, NaCl 濃度 130 mM) を中心に、低浸透圧 (200 mOsm, NaCl 濃度 80 mM) から高浸透圧 (400 mOsm, NaCl 濃度 180 mM) の範囲で細胞外 Na^+ 濃度上昇に伴い段階的に脱リン酸化され活性を低下させる⁽⁸⁾ (Fig. 1)。活性変化は 2 分程度で完了する迅速なものであると同時に、同程度の速さの可逆性も持つ。これは ASK3 が細胞外 Na^+ 濃度情報を瞬時にリン酸化シグナル量に変換するトランスデューサーとして働く独特なキナーゼであることを示しており、細胞の Na^+ 環境感知という観点で重要な分子と考えられる。最近の独自の研究から細胞外 Na^+ の上昇による ASK3 の不活性化は ASK3 の LLPS による液滴形成が必要であること⁽¹⁰⁾、さらに細胞内の Na^+ が ASK3 の不活性化に至る脱リン酸化に重要であることを明らかにした。また、ハンチントン病の原因となる polyQ タンパク質をはじめ、ASK3 とは別のタンパク質の凝集体や液滴についても細胞内 Na^+ 量により流動性が変化することを明らかにした⁽¹²⁾。これらの結果は、近年注目を集めている細胞内相分離現象⁽¹³⁾において Na^+ が調節因子として機能することを強く示唆している。

そこで、本項目では ASK3 液滴をモデルとして高 Na^+ 誘導性の LLPS がキナーゼ活性を低下させるメカニズムの分子基盤を明らかにすることを目的とした。まず、ASK3 液滴が浸透圧依存的にどのような変化を示すのかについて浸透圧強度や浸透圧をかける溶質の種類との関連性を共焦点レーザー顕微鏡による観察と光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching: FRAP 法) によって詳細に観察した。さらに、液滴形成が ASK3 リン酸化状態に影響を与える分子基盤を明らかにするために、ASK3 液滴の近傍分子を近接依存性ビオチン化標識法 (TurboID) によって同定することを計画した。これらの解析によって、細胞外 Na^+ 濃度依存的に ASK3 が脱リン酸化され不活性化される分子基盤を明らかにする。

2. 1. 2 ミトコンドリアにおける PDK の活性制御機構

助成研究者は、糖代謝産物であるピルビン酸をミトコンドリア内にてアセチル CoA に変換する酵素である Pyruvate Dehydrogenase (PDH) をリン酸化により抑制する PDK もまた ASK3 と同様に低-高 Na^+ 環境に両方向性に可逆的に活性変化することを見出した (Fig. 1)。この Na^+ 環境による活性変化は、がん細胞の Warburg 効果と同様に細胞の糖代謝において好氣的解糖と OXPHOS のバランスを変化させる⁽¹¹⁾。非常に興味深いことにこの応答はミトコンドリアを細胞から単離して刺激した場合でも観察されたことから、PDK の活性変化機構はミトコンドリア内に存在

すると考えられる。一方で、一般的に活性制御因子として知られる NAD^+ , Ca^{2+} , ADP などは Na^+ 環境変化による PDK 活性変化には関与していなかったことから、現時点で PDK 活性変化機構は全く不明であり未知のメカニズムの可能性さえある。この問題にアプローチする手段として、本項目では細胞外 Na^+ 環境変化時のミトコンドリア形態および PDK, PDH の局在を超解像顕微鏡観察により検討することとした。ごく最近、個々のクリステを含めたミトコンドリアの微細形態を秒単位のリアルタイムで超解像顕微鏡観察 (STED 法) できるプローブが開発された⁽¹⁴⁾。このようなミトコンドリア微細構造を観察できる技術を活用して、 Na^+ 環境を変化させた際にミトコンドリアの形態がどのように変化するか観察する。助成研究者は高 Na^+ 条件では急激にミトコンドリア酸素消費が低下することを見出していることから⁽¹¹⁾、ミトコンドリア膜電位プローブを形態変化観察の際に組み合わせることで、形態変化と代謝変化の時間的関係性も検討する。また、PDK と基質である PDH E1 サブユニットの局在変化も超解像顕微鏡で観察する。これにより、 Na^+ 環境依存的な PDK 活性変化のメカニズムについて、これまででない時空間的解像度のミトコンドリア形態観察の情報からアプローチする。超解像顕微鏡観察の実施にあたっては、専門家であり、上記ミトコンドリアプローブを用いた研究の実績もある東京大学医学部の岡田康志先生に適宜助言や協力を受けながら解析を進めることとした。

2.2 低-高 Na^+ 環境応答性キナーゼのマクロファージにおける役割の解析

マクロファージはサイトカイン等の刺激により様々な種類に分化し多様な機能を担う。特にこのうち炎症促進性の M1 型と炎症抑制性の M2 型マクロファージのどちらのサブセットへ分極するかという点は、がんや免疫系疾患の理解に重要とされ盛んに議論されている^(15, 16)。これまでに高 Na^+ 環境で培養したマクロファージは M1 型への分化が促進されることが報告されている⁽⁷⁾。さらに、M1-M2 分極において細胞代謝の重要性が知られることから、PDK の制御とも関連は深いと考えられる⁽¹⁷⁾。そこで、RNA-Seq などトランスクリプトーム解析を手法として、マクロファージの M1-M2 分極に注目しながら Na^+ 環境がマクロファージの遺伝子発現にどのように影響するかについて解析する。この際、未だ報告のない低 Na^+ 環境までを含めた解析

を行い Na^+ 環境の影響を明らかにする。さらに、その Na^+ 環境による遺伝子発現変化において ASK3 や PDK がどのように関与するかノックアウトマウスなどを利用して解析する (Fig. 2)。

3. 研究結果

3.1 低-高 Na^+ 環境応答性キナーゼの活性変化メカニズムの解析

3.1.1 液-液相分離(LLPS)を介する ASK3 の活性制御

まず、ASK3 の相分離液滴の特性について調べるため、蛍光タンパク質である Venus を融合させた ASK3 を HEK293A 細胞に安定的に発現させた細胞株を樹立し、浸透圧の強度を変化させて 5 分後における ASK3 液滴の観察を行った (Fig. 3)。その結果、低浸透圧から等浸透圧状態では ASK3 は細胞質に分散して一様に分布していたのに対して、400 mOsm 以上の高浸透圧になると相分離による液滴を形成した。より高い浸透圧を処置した場合には ASK3 液滴はより小さな液滴を形成して数が増えるという現象が容量依存的に観察された。

次に、細胞に対して高浸透圧をかけるために培地に加える溶質について、NaCl で調整する場合と、マンニトールで調整する場合を比較した。上述の Venus-ASK3 を発現する細胞に対して、どちらも 600 mOsm の同じ高浸透圧になるように調整した培地で刺激をすると、3 分程度の早い段階での ASK3 液滴に両者で違いはほとんど見られなかったが、20 分後まで観察すると NaCl で刺激した場合の方が ASK3 液滴のサイズが大きく、数が少なくなる様子が観察された。タイムラプスによる経時的な観察により、NaCl 刺激の場合の方がマンニトール刺激に比べ形成された ASK3 液滴が細胞内でより活発かつ柔軟に動き回る結果、効率よく液滴が融合してサイズが大きく、数が少なくなることが明らかになった。この結果に基づき、それぞれの刺激の際の ASK3 液滴の流動性の違いを検討するために、FRAP 法による比較を行ったところ、ASK3 液滴の蛍光回復は NaCl 刺激の方が早く、実際に ASK3 液滴の流動性が高いことが明らかになった (Fig. 4)。NaCl 刺激とマンニトール刺激では、Na 指示薬である SBFI で測定した細胞内 Na^+ 濃度に差があること (NaCl 刺激の方が高い)、*in vitro* で形成させた ASK3 液滴に NaCl を加えると ASK3 液滴を溶解させる影響があることから、細胞内で直接 Na^+ が ASK3 液滴の流動性を増加させていることが示唆された。

助成研究者は、以前の研究から高浸透圧環境で形成される ASK3 液滴の流動性は poly(ADP-ribose) (PAR) によって維持されており、PAR 形成の阻害による ASK3 液滴の流動性低下はフォスファターゼ (PP6) による脱リン酸化の障害につながることを報告していた⁽¹⁸⁾。細胞内 Na⁺ による ASK3 液滴流動性の促進も同様に ASK3 脱リン酸化に関与するか検討した。細胞外の Na⁺ を NMDG⁺ で置換した培地では PAR 形成阻害による液滴流動性低下の際と同様に高浸透圧時の ASK3 脱リン酸化が抑制された。また、今回用いた培養細胞で高浸透圧時に細胞内への Na⁺ 流入を担うチャネルとして同定した TRPM4 を阻害剤 (9-phenanthrol) により抑制して高浸透圧時の細胞内 Na⁺ 濃度上昇を抑制した場合でも ASK3 脱リン酸化が抑制された。これらの結果から、細胞内への Na⁺ 流入も PAR と同様に高浸透圧ストレス時の ASK3 液滴の流動性の促進を介して効率的な ASK3 脱リン酸化 (不活性化) に関わることが示唆された。

PP6 による高浸透圧依存的な ASK3 脱リン酸化は、高浸透圧環境において ASK3 液滴と PP6 液滴が独立に形成さ

れ、それらが接して界面を形成することで達成される⁽¹⁸⁾。ASK3 液滴の流動性を低下させ、脱リン酸化の効率を低下させる PAR 形成阻害の際には ASK3 液滴と PP6 液滴が界面を形成しなくなる現象を報告していたが、Na⁺ の流入を 9-phenanthrol により阻害した場合もやはり ASK3 液滴と PP6 液滴の界面が消失してしまう様子が観察された。従って、細胞内 Na⁺ による ASK3 液滴の流動性促進は、PAR と同様に ASK3 と PP6 の物理的・空間的な相互作用に影響を与えて効率的な脱リン酸化を担保していると考えられる。

以上の結果から、高浸透圧環境で相分離依存的に活性低下する ASK3 の分子機序において、液滴のサイズ、大きさ、流動性など物理的な性質が重要な役割を果たしていることが明らかになった。特に PAR と同様に細胞内 Na⁺ が ASK3 液滴の流動性を促進し、PP6 液滴との適切な界面を形成することが ASK3 の脱リン酸化 (不活性化) に重要であると考えられる。

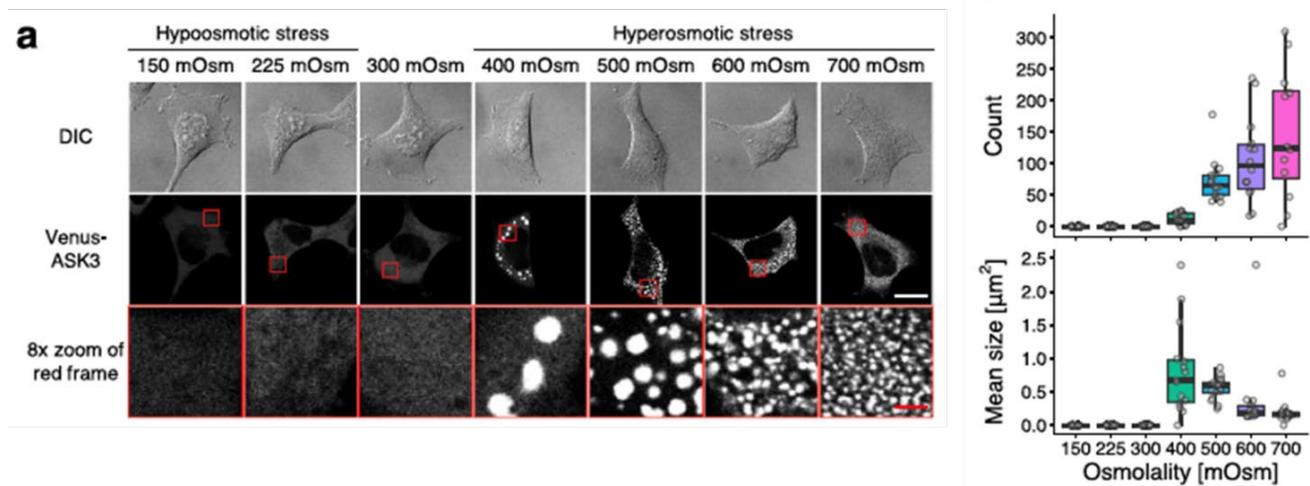


Fig 3. ASK3 condensates show dose-dependency in response to hyperosmotic stress.

a, Subcellular localization of Venus-ASK3 5 min after osmotic stress shown in above (150 – 700 mOsm).

White bar: 20 μm and red bar: 2.5 μm .

b, Boxplots of condensate number (Count) and size (Mean size) in each cell.

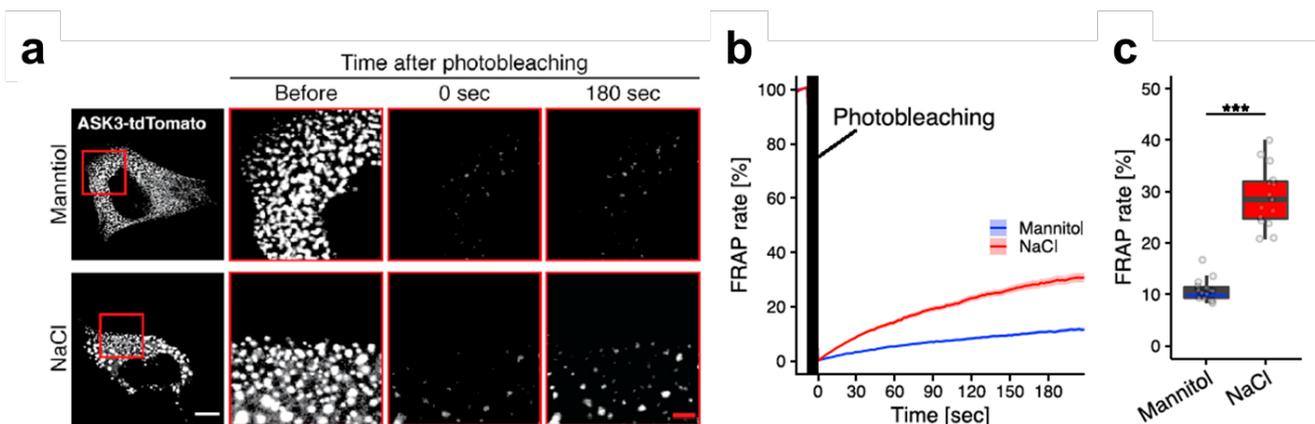


Fig 4. Liquidity of ASK3 condensates measured by FRAP assay.

- a, ASK3 condensates were formed by 600 mOsm condition by adding either mannitol or NaCl. Then, condensates were photobleached and the fluorescence recovery was monitored by a confocal microscopy. White bar: 10 mm and red bar: 2.5 mm.
- b, Boxplots of condensate number (Count) and size (Mean size) in each cell. b, A representative time course of ASK3 condensates' FRAP under mannitol (blue) and NaCl (red) condition.
- c, The boxplot of recovery ratio (%) at 180 sec under mannitol (blue) and NaCl (red) condition.

3. 1. 2 ミトコンドリアにおける PDK の活性制御機構

助成研究者は、細胞周囲の培地の Na^+ 濃度を通常に比べて低下させたり、増加させたりすると、ミトコンドリアの酸素呼吸 (OCR) が急激に両方向性に变化することを発見した (Fig. 5)。この背景に糖代謝の制御に関わる PDK の活性変化による PDH のリン酸化状態変化 (Fig. 1) があることを見つけ、さらに PDH のリン酸化変化は単離したミトコンドリアでも観察されることから、ミトコンドリアが直接周囲の Na^+ 環境を感知して代謝酵素の活性を変化させ呼吸を変化させていると考えられる⁽¹¹⁾。ミトコンドリア自体に起こる変化に PDK 活性変化の要因があるという観点から、 Na^+ 環境変化で細胞内のミトコンドリアの形態がどのように変化するか観察を行なった。

まず、通常の共焦点レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリアを MitoTracker にて染色し、リアルタイムイメージングにて経時的に観察を行なった。しかし、OCR の変化が観察される数分以内という短い刺激時間では低 Na^+ 、高 Na^+ いずれの条件においても共焦点レーザー顕微鏡で観察可能なミトコンドリアの分裂や融合などマクロな構造の変化は観察されなかった。そのため、微細な個々のミトコンド

リアの形態を十分な解像度で観察するために、超解像顕微鏡を用いた観察に切り替えた。まず、超解像のリアルタイム観察に適したミトコンドリアの染色条件の選定から行なった。いくつかの染色条件を検討した結果、蛍光タンパク質は光耐性の強い StayGold を用い、ミトコンドリアへの効率的な輸送を行うために Su9 シグナル配列を付加したタンパク質を HeLa 細胞に発現させた。また、ミトコンドリアの膜電位を測定するために tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) による同時染色を行なった。時間分解能を担保するために超解像顕微鏡としては、スピニングディスク超解像顕微鏡による観察を行なった。NaCl を 100 mM 加えることで 500 mOsm にした高浸透圧培地によりこの細胞を刺激すると、10 秒程度という非常に早い段階から個々のミトコンドリアが細くなり、体積が縮小する様子が観察された。また、TMRM による膜電位も刺激直後から徐々に低下した。膜電位の低下は、すでに見つけていた高浸透圧による OCR の低下が電子伝達系の抑制により生じていることを示唆しており、PDH リン酸化 (Fig. 1) による TCA 回路の抑制と合致する。

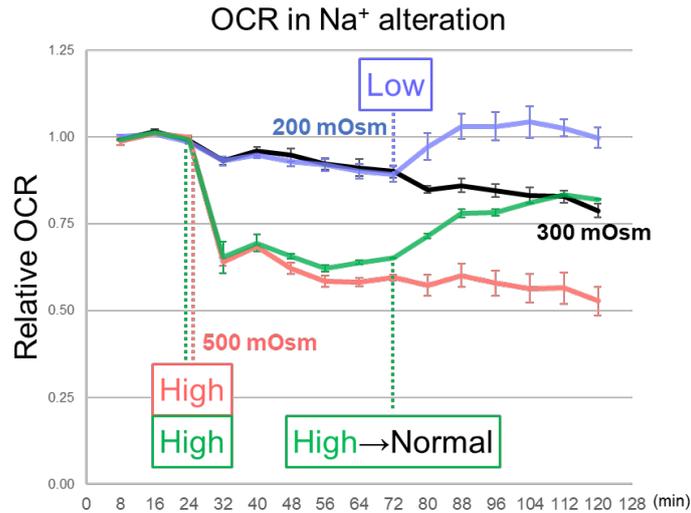


Fig 5. Mitochondrial respiration bidirectionally changes in response to Na^+ environments. High Na^+ decreases and low Na^+ increases mitochondrial oxygen consumption rate (OCR), respectively. The response is acute (within minutes) and reversible. Data was obtained each 8 min by an extracellular flux analyzer (Seahorse)

本研究で超解像顕微鏡を用いたことにより、高浸透圧刺激時に共焦点レーザー顕微鏡では観察できなかった個々のミトコンドリアの形態が、刺激後瞬時に収縮していることが明らかになった。細胞自体の体積が収縮する数秒という早い段階で、既に細胞内のオルガネラであるミトコンドリアも形態変化していることが明らかになり、この形態変化がミトコンドリア代謝変化の誘導要因になっている可能性も考えられる。

Na 環境の変化で実際にリン酸化変化している PDH E1 サブユニットタンパク質とそのキナーゼである PDK のミトコンドリア内での局在変化を検討するために、抗体染色に適したタグ配列を結合させた PDH と PDK のコンストラクトを作成した。まず、ゲノムに存在する PDK の 4 種のアイソフォーム (PDH1, 2, 3, 4) と、PDH の 3 種のアイソフォーム (PDHA1, 2, PDHB) のうち、どれが解析対象としている HeLa 細胞に発現しているかクローニングを行った結果、PDK は 4 種類全てが、PDH は PDHA1 のみがクローニングできた。さらに、タグを付加したコンストラクトを発現させた際に高浸透圧 (高 Na) 刺激で活性が促進される PDK は PDK1 と PDK2 であることが明らかになった。発現効率等を考慮し、最終的に PDK2 と PDHA1 を共発現させ、等浸透圧環境と高浸透圧環境 (刺激後 3~5 分) の細胞を固定し、超解像 STED 顕微鏡により局在を観察した。高浸透圧

環境では等浸透圧環境に比べて、PDK2 がやや顆粒状に集積の様子が観察されたが、画像解析による統計的な有意差は認められなかった。浸透圧刺激の時間が短い可能性があるため、今後刺激時間の延長などを検討する必要がある。

3. 2 低-高 Na^+ 環境応答性キナーゼのマクロファージにおける役割の解析

助成研究者はこれまで HeLa 細胞など培養細胞に高 Na^+ 刺激をした際の遺伝子発現変化について RNA-Seq などを用いて網羅的に解析してきた⁽¹⁹⁾。本研究においては、マクロファージの機能に Na^+ 環境がどのような影響を与えるか検討するために、マウスの単離腹腔マクロファージを用いて、低・等・高 Na^+ 濃度の培地で 24 時間培養した際の RNA-Seq データを取得した。この際、WT のマウスのみならず ASK3 ノックアウト (KO) マウスの腹腔マクロファージも同時に取得し、ASK3 欠損の影響も検討した (Fig. 6)。まず、WT から取得したマクロファージについて、いずれかの浸透圧環境の比較で有意に 2 倍以上変化した遺伝子を抽出したところ 211 遺伝子が得られ、興味深いことにこれらの遺伝子の多くは等浸透圧での発現量に対して高浸透圧と低浸透圧で増減の方向が逆転していた。このことは ASK3 や PDK の両方向性の活性変化と同様に遺伝子発現のレベルでも Na^+ 環境に対して両方向性の応答が

見られることを示している。また、この変化した遺伝子について GO enrichment 解析を行うと、leukocyte chemotaxis や regulation of wound healing などマクロファージの重要な機能と関連する GO がヒットし、これらの機能と Na⁺環境の関連性が想定された。さらに、これらの遺伝子について、ASK3 KO マウスから得られたマクロファージの挙動を検討すると、浸透圧応答性を失った遺伝子が複数あった (Fig. 6)。これらの結果から、ASK3 の浸透圧応答性がマクロファージの遺伝子発現変化を制御することが示唆された。

それぞれの浸透圧環境で WT と ASK3 KO の比較で有意に 2 倍以上異なる遺伝子発現を示した遺伝子群に対して GO enrichment 解析を行うと、chemotaxis がヒットしたことから、ASK3 は浸透圧依存的に免疫細胞の遊走に関わる遺伝子発現に関与すると考えられる。一方で、研究計画の時点で注目していた M1/M2 サブタイプへの分化についても遺伝子発現変化から検討したが、低・高どちらの Na⁺環境によっても一貫した一方のサブタイプへの分化の偏りは見られず、ASK3 欠損も大きな影響を与えていなかった。

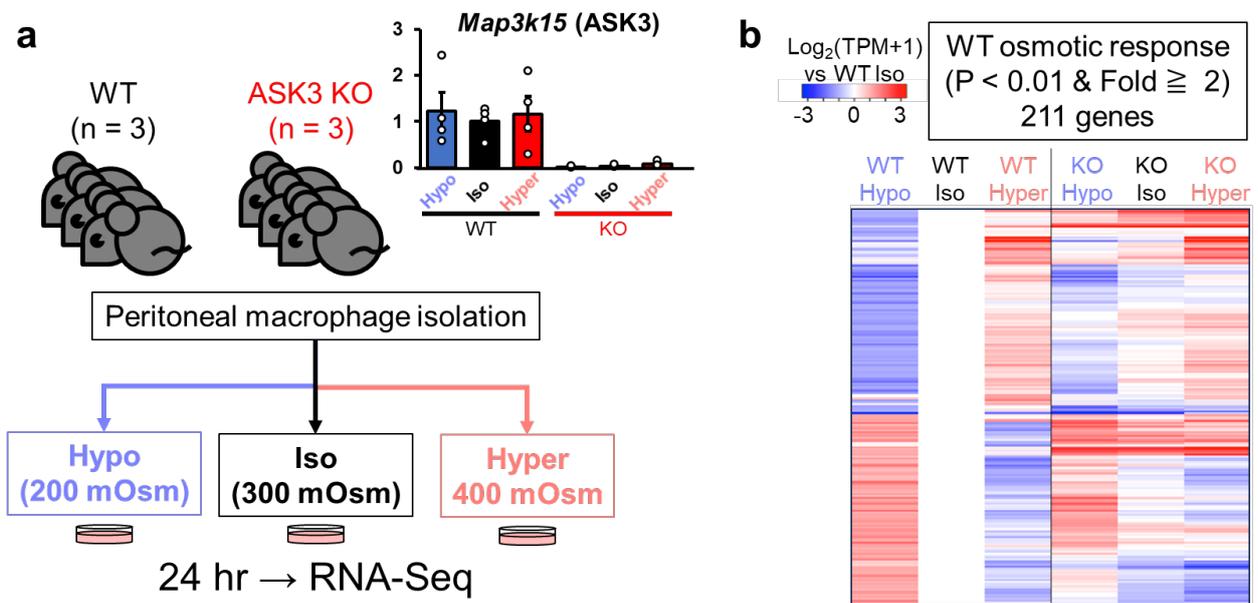


Fig 6. RNA-Seq analysis of peritoneal macrophages exposed to various Na⁺ conditions.

- Peritoneal macrophages were isolated from WT and ASK3 KO mice. The macrophages were cultured for 24 hr in hypo-, iso- and hyper-osmotic conditions (low-, normal- and high-Na⁺ conditions, respectively). Inset shows the confirmation of ASK3 mRNA deficiency in the samples of ASK3 KO mice.
- Macrophage genes that are altered by osmotic stress in WT (211 genes). Data is shown as log₂ fold change normalized by WT iso in the RNA-Seq. TPM: Transcripts per kilobase million.

4. 考察

本研究によって ASK3 と PDK という浸透圧 (Na⁺環境) に対して両方向性に活性変化するキナーゼがどのような分子機構で Na⁺環境を感知しているか手がかりとなる知見を得た。ASK3 については、Na⁺環境によって ASK3 液滴が誘導されること、細胞内の Na⁺が直接 ASK3 液滴の物性を変化させることが活性変化に関与すると考えられる (Fig. 3, 4)。PDK については、Na⁺環境でミトコンドリア形態が瞬時に変化することが関与する可能性が考えられる。本研究で得られた知見を用いてさらに研究を進めることで

より深い細胞の Na⁺環境感知のメカニズムに迫れると考えられる。

4. 1 ASK3 液滴の浸透圧強度依存性について

本研究では、ASK3 の相分離液滴について、より浸透圧が高くなればなるほど数が増え、小さくなるという知見を得た (Fig. 3)。浸透圧強度が増すほど ASK3 は脱リン酸化の程度も増加しより強く不活性化されることから (Fig. 1)、この液滴のサイズと数の変化がフォスファターゼである PP6 による脱リン酸化を効率化していると考えられる。ASK3 と PP6 が高浸透圧環境で両方とも液滴を形成して

それらが界面を形成すること⁽¹⁸⁾を考慮すると、ASK3 液滴のサイズの低下と数の増加は、PP6 液滴との界面の表面積を増やすことに繋がり、界面におけるより効率的な脱リン酸化を達成しているという仮説が考えられる。この場合、ASK3 の浸透圧強度依存的に連続的に変化するキナーゼ活性は、液滴のサイズと数という物性によって容量依存性を達成していることになり、外部環境の変化というデジタルな情報だけでなく、環境変化の量的違いを相分離液滴の物性の違いで定量的に伝達するという興味深い分子機構を示唆して考えられる。

4.2 Na⁺による ASK3 液滴の流動性促進機構について

本研究で Na⁺が以前報告した PAR⁽¹⁸⁾と同様に ASK3 液滴の流動性促進を介して ASK3 脱リン酸化(不活性化)に関わることが明らかになった。PAR に関しては、ASK3 の N 末端領域に存在する PAR 結合配列が特異的に PAR 依存的な流動性の促進に関与することを明らかにしているが⁽¹⁸⁾、Na⁺の場合は ASK3 タンパク質の特定の部位が Na⁺と結合するという知見には至っていない。ASK3 液滴に *in vitro* で Na⁺を加え流動性が増加する実験を行った際に、代わりに K⁺を処置したところ、Na⁺と同じように ASK3 液滴の流動性を増加させる知見を得た。このことから、Na⁺や K⁺のような無機イオンに関しては、物質特異的な結合というより、イオンによる静電遮蔽効果によって溶液物性環境を変化させ、全体的な液滴内の分子間相互作用を変化させて流動性に影響を与えている可能性が考えられる。

4.3 高浸透圧で低下する OCR の低下とミトコンドリア形態の変化について

本研究では、超解像顕微鏡による観察で高浸透圧(高 Na⁺)により秒単位のタイムスケールでミトコンドリア形態の収縮と膜電位低下が起こることが明らかになった。本研究以前には、高浸透圧により数分以内で PDH のリン酸化の上昇と OCR の低下が観察されることを見出していたが⁽¹¹⁾、本研究により刺激後秒単位という非常に早い段階で形態変化と代謝変化が生じていることがわかった。現時点では形態変化と代謝変化の発生がほぼ瞬間的に起こるため、形態変化と代謝変化に因果関係があるか、どちらが要因となっているかについての情報は得られていない。今後、PDH リン酸化の阻害剤などにより高浸透圧時の代謝変化を抑制した際に形態変化がどうなるかを検討することで代

謝がミトコンドリア形態に与える影響を解析したい。また、初期の収縮に限らず、高浸透圧刺激で収縮したミトコンドリア形態が回復する過程についても同様に代謝変化の関与を検討することは重要と考えられる。

本研究で高浸透圧刺激においてミトコンドリア形態の変化と膜電位の低下が秒単位で起こることが明らかになったが、これは細胞体積低下に伴う ASK3 や PP6 の液滴形成と同様に早いタイムコースである⁽¹⁸⁾。恐らく、細胞に対する浸透圧刺激は細胞体積変化に伴って細胞質の浸透圧を同方向に変化させるため、細胞内のミトコンドリアも高浸透圧環境にさらされ形態変化が誘導されると考えられる。統計的に有意でなかったものの、PDK2 が高浸透圧環境で顆粒状に集積する傾向が見られたことを考慮すると PDK の活性変化にもミトコンドリア形態変化を介する相分離現象が関与する可能性もある。

4.4 マクロファージ機能に対する Na⁺環境の影響について

本研究によって、マウスの単離腹腔マクロファージは Na⁺環境に対して両方向性の遺伝子発現変化を示すことが明らかになり、そのうちのいくつかは ASK3 に依存することが示唆された(Fig. 6)。当初の予想とは異なり、Na⁺環境変化による M1/M2 サブセット分化への影響はあまり見られなかったが、特に ASK3 が関与する Na⁺環境依存的な機能変化として免疫細胞の chemotaxis に関連する遺伝子変化が得られた。このことから、ASK3 はがんや感染など炎症の患部で形成される Na⁺環境において、マクロファージ機能を遺伝子発現のレベルで制御し、免疫細胞の動員に関与することが考えられる。

5. 今後の課題

5.1 ASK3 液滴と界面形成の意義について

本研究では Na⁺が ASK3 液滴の流動性を促進して活性変化に寄与することが明らかになった。また、ASK3 と PP6 の液滴界面という特殊な場が必要であることが示唆されている。一方で、なぜ流動性が高いと効率的に脱リン酸化されるか、液滴界面がどのような意義を持つのかについては明らかにできていない。この課題については、本研究で計画していたが実施できなかった、ASK3 液滴の近傍分子を近接依存性ビオチン化標識(TurboID)法で同定する解析⁽²⁰⁾が有効と考えられる。この解析において今回得られた細胞内 Na⁺による ASK3 液滴の物理的・空間的な制御を情報として加えることでより効果的な探索が可能になる

と考えられる。さらに、ASK3 と PP6 に split-TurboID⁽²⁰⁾の相補的コンストラクトを付加して、両者が近接化したときのみ周囲のタンパク質をビオチン化させて精製し、質量分析計で同定することで、液滴界面に存在する分子の情報も得られると期待される。

近年、浸透圧に限らず温度や pH など様々な物理化学的環境変化が細胞内相分離により感知されるという報告があることから⁽²¹⁾、これらの感知においても相分離液滴のサイズや数などの物性を介して定量的な感知がなされているかという課題は興味深い検討事項と思われる。さらに Na⁺環境変化以外で形成される液滴が、本研究で見出したように細胞内 Na⁺濃度の影響を受けるのかという課題も重要と考えられる。特に細胞内への Na⁺流入により活動電位を発生させる神経細胞や筋細胞において、細胞内液滴に対する Na⁺の関与を検討することは意義深いと考えられる。

5.2 ミトコンドリア形態変化と代謝の関連について

本研究では、高浸透圧(高 Na⁺)刺激において超解像顕微鏡によるミトコンドリア形態変化と膜電位変化の個別の観察にとどまったが、これらの因果関係を明らかにすることが今後重要である。考察で記載したように PDH のリン酸化阻害剤による形態変化の影響を検討することや、本研究では実施できなかった低 Na⁺条件における形態変化と膜電位変化の検討を行うことで、因果関係を含めたより包括的な理解が進むと期待される。

本研究で、細胞に対する高 Na⁺刺激が、細胞内のミトコンドリアを瞬時に収縮させることが明らかになった。高浸透圧刺激により細胞質も同方向に浸透圧が変化すると考えられることから、恐らくミトコンドリア以外のあらゆる細胞内オルガネラも形態変化が誘導されると考えられる。今後はミトコンドリアに限らず様々なオルガネラにおける形態変化やそれに伴う機能変化という観点で Na⁺環境刺激に対する細胞応答を捉えることが重要になるとと思われる。

近年、細胞内相分離が活発に報告され発展している一方で、オルガネラ内部における相分離現象やその機能についての解析は進んでいない。既存の超解像顕微鏡技術を用いたとしても分解能の観点からこれは非常にチャレンジングな課題と言えるが、本研究で PDK2 が高浸透圧刺激で顆粒状に集積する様子が見られたことはこの課題への研究の可能性を示していると考えられる。PDK2 や PDHA1 の局在変化について今回は 3~5 分という短時間での観察を行っ

たが、ASK3 の液滴形成の場合、高 Na⁺刺激後 15~30 分程度の時点の方が液滴の形成は明確になる。このことから、今後の検討では刺激時間を延ばしてミトコンドリア内のタンパク質の局在を改めて検討する必要があると考えられる。

5.3 Na⁺環境で誘導されるマクロファージの遺伝子発現変化について

本研究で腹腔マクロファージ細胞が低・高 Na⁺環境に対して逆方向の遺伝子発現変化を示すことが明らかになった。これは、ASK3 や PDK の活性など Na⁺環境に両方向性に応答する分子機構が遺伝子発現変化を担っていることを示唆している。骨髄由来マクロファージなど他に由来するマクロファージで同様の応答が見られるかは今後の検討課題であるが、本研究で chemotaxis に関連する遺伝子が Na⁺環境により変化した知見は、病態患部の Na⁺環境と炎症・免疫機能をつなげる上で非常に興味深い。これらの知見を基盤として、将来的には病態患部の Na⁺環境を高食塩負荷や脱水により人為的に操作したり、ASK3 KO マウスや糖代謝を変化させたマウスを利用して、体内の Na⁺環境とそれを感知する分子機構の意義について理解を深め、ナトリウム関連疾患の理解および革新的な治療法につながる研究に発展させていきたい。

6. 文献

1. Oh YS, Appel LJ, Galis ZS, Hafler DA, He J, Hernandez AL, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Report on Salt in Human Health and Sickness: Building on the Current Scientific Evidence. *Hypertension*. 2016;68(2):281–8.
2. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH 17 cells. *Nature*. 2013;496(7446):518–22.
3. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schröder A, Kopp C, Siegert I, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab*. 2015;21(3):493–501.
4. Berry MR, Mathews RJ, Ferdinand JR, Jing C, Loudon KW, Wloddek E, et al. Renal Sodium Gradient Orchestrates a Dynamic Antibacterial Defense Zone. *Cell*. 2017;170(5):860–874.e19.

5. He W, Xu J, Mu R, Li Q, Lv D lun, Huang Z, et al. High-salt diet inhibits tumour growth in mice via regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–17.
6. Tillé L, Cropp D, Charmoy M, Reichenbach P, Andreatta M, Wyss T, et al. Activation of the transcription factor NFAT5 in the tumor microenvironment enforces CD8⁺ T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2023;24(10).
7. Müller DN, Wilck N, Haase S, Kleinewietfeld M, Linker RA. Sodium in the microenvironment regulates immune responses and tissue homeostasis. Vol. 19, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2019. p. 243–54.
8. Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, et al. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. *Nat Commun.* 2012;3.
9. Watanabe K, Umeda T, Niwa K, Naguro I, Ichijo H. A PP6-ASK3 Module Coordinates the Bidirectional Cell Volume Regulation under Osmotic Stress. *Cell Rep.* 2018 Mar 13;22(11):2809–17.
10. Watanabe K, Morishita K, Zhou X, Shiizaki S, Uchiyama Y, Koike M, et al. Cells recognize osmotic stress through liquid–liquid phase separation lubricated with poly(ADP-ribose). *Nat Commun.* 2021;12(1).
11. Ikizawa T, Ikeda K, Arita M, Kitajima S, Soga T, Ichijo H, et al. Mitochondria directly sense osmotic stress to trigger rapid metabolic remodeling via regulation of pyruvate dehydrogenase phosphorylation. *J Biol Chem.* 2023 Feb 1;299(2).
12. Morishita K, Watanabe K, Naguro I, Ichijo H. Sodium ion influx regulates liquidity of biomolecular condensates in hyperosmotic stress response. *Cell Rep.* 2023 Apr 25;42(4).
13. Alberti S, Hyman AA. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. Vol. 22, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Research; 2021. p. 196–213.
14. Wang C, Taki M, Sato Y, Tamura Y, Yaginuma H, Okada Y, et al. A photostable fluorescent marker for the superresolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Aug 6;116(32):15817–22.
15. Park MD, Silvin A, Ginhoux F, Merad M. Macrophages in health and disease. *Cell.* 2022;185(23):4259–79.
16. Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(9):516–31.
17. Van den Bossche J, O’Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* 2017;38(6):395–406.
18. Watanabe K, Morishita K, Zhou X, Shiizaki S, Uchiyama Y, Koike M, et al. Cells recognize osmotic stress through liquid–liquid phase separation lubricated with poly(ADP-ribose). *Nat Commun.* 2021 Dec 1;12(1).
19. Ryuno H, Hanafusa Y, Fujisawa T, Ogawa M, Adachi H, Naguro I, et al. HES1 potentiates high salt stress response as an enhancer of NFAT5-DNA binding. *Commun Biol* 2024 71. 2024 Oct 9;7(1):1–15.
20. Cho KF, Branon TC, Udeshi ND, Myers SA, Carr SA, Ting AY. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nat Protoc* 2020 1512. 2020 Nov 2;15(12):3971–99.
21. Yoo H, Triandafillou C, Drummond DA. Cellular sensing by phase separation: Using the process, not just the products. *J Biol Chem.* 2019 May 3;294(18):7151–9.

Elucidation of the Molecular Mechanisms by Which Cells Sense Sodium Environment in the Body via Analyzing Kinases that Bidirectionally and Gradually Respond to Low- and High-Sodium Environment, and their Function in Macrophages

Isao Naguro

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Summary

Sodium ions (Na^+) are essential for humans. On the other hand, excessive intake of salt has been linked to various diseases. However, molecular mechanisms by which Na^+ affects the body are still not fully understood. In this study, I focused on two kinases, ASK3 and PDK, that we have reported they bidirectionally alter their activity in response to Na^+ environments. I analyzed the molecular mechanisms through which these kinases change their activity depending on Na^+ (osmotic) conditions. In particular, I investigated the liquid–liquid phase separation (LLPS) of ASK3 and the morphological changes of mitochondria. Additionally, since these kinases are expressed in macrophages, I conducted transcriptomic analyses to explore the relationship between Na^+ environment and macrophage functions.

The ASK3 condensates formed by LLPS became smaller and more numerous as extracellular osmolarity increased. The morphological changes increase the condensate surface area led to more efficient dephosphorylation (inactivation) by phosphatases, suggesting that the condensate morphology serves as a quantitative sensor of the Na^+ environment. Furthermore, intracellular Na^+ influx was also necessary for the efficient dephosphorylation of ASK3 through the enhancement of the fluidity of ASK3 condensates.

The super-resolution microscopy analysis revealed that stimulation with high Na^+ led to mitochondrial contraction within seconds and a decrease in membrane potential. At the same time, PDK2 within the mitochondria exhibited a granule-like redistribution. This suggests that activation of PDK, which is involved in mitochondrial metabolic changes, may be induced by the mitochondrial morphological changes.

Peritoneal macrophages from mice were cultured under low, normal, and high Na^+ conditions, and analyzed by RNA-Seq. Many genes responded in opposite directions under low and high Na^+ conditions. Among these, some gene expression changes were lost in ASK3 knockout macrophages. These findings suggest that macrophage are regulated by bidirectionally responsive molecules such as ASK3 and PDK. Elucidating the molecular mechanisms of these Na^+ -responsive molecules may lead to a better understanding and potential treatment of Na^+ -related diseases involving macrophages.