

助成番号 0638

高濃度 NaCl 高浸透圧条件下における細胞内 NaCl 動態変化に関与するシグナル伝達経路の網羅的解析

高橋 信之, 清水 貴浩, 井上 華

自然科学研究機構生理学研究所細胞器官研究系

概要 ほとんどの細胞は、高浸透圧条件下で引き起こされる細胞容積の減少に対して、調節性細胞容積増大 (regulatory volume increase; RVI) と呼ばれる細胞容積の回復を示す。この RVI では、イオントランスポーターを介した NaCl の取込に引き続き起こる水分子の細胞内への流入が起こる。しかしアポトーシス刺激を受けた細胞では、NaCl 取込による RVI が起こらず、細胞容積が持続的に減少する。この持続的細胞容積の減少では、NaCl 取込を介した RVI が抑制されている可能性が考えられる。昨年度の本助成研究において、助成研究者らは、ヒト上皮由来 HeLa 細胞で、高浸透圧刺激で活性化される Akt が、RVI をもたらす NaCl 取込に必須であること、およびアポトーシス刺激で活性化される ASK が、Akt 不活性化を介して、持続的な細胞容積減少を引き起こすことを明らかにした。そこで本年度は、高浸透圧刺激によりどのようにして Akt が活性化されるのかについて、二次元電気泳動法を用いたリン酸化タンパク質の解析を試みた。また高浸透圧条件下で RVI をもたらす NaCl 取込の重要性を明らかにするため、高浸透圧条件下で NaCl 取込を起こさない細胞を用いた検討も行った。

リン酸化タンパク質を二次元電気泳動で解析する方法の確立を試みたが、全タンパク質を用いた場合、解析可能なデータが得られなかったため、リン酸化タンパク質を精製し、二次元電気泳動を行うことで、効率良くリン酸化タンパク質を解析することが可能となった。現在、質量分析器を用いて、高浸透圧条件下での NaCl 取込に必要なタンパク質リン酸化を同定中である。一方、イオントランスポーターに対するブロッカーを用いて RVI をもたらす NaCl 取込を阻害すると、HeLa 細胞は高浸透圧刺激のみでアポトーシスを起こした。また NHE1 を発現していない PS120 という細胞も、高浸透圧条件下で NaCl の取込が出来ずにアポトーシスを起こすが、外来性に NHE1 を発現させて NaCl 取込が可能になると、高浸透圧刺激によるアポトーシスが抑制された。これらの結果は、高浸透圧条件下での NaCl 取込が、細胞の生存に必須であることを示唆している。

1. 研究目的

塩化ナトリウム (NaCl) は浸透圧ストレスを引き起こす物質として極めて重要であり、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。例えば、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^+ exchangers (NHE) や $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers (anion exchangers: 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、NaCl 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) と呼ばれており、この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生理的に極めて重要である。しかし細胞容積の減少が、どのようにして HNE 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、これまで全く不明であった。しかし、2005 年度の本研究助成により、この RVI における NaCl 動態変化が、高浸透圧刺激により活性化されるタンパク質リン酸化酵素 Akt により引き起こされることを明らかにした。Akt は、NaCl もしくはマンニトール添加による高浸透圧刺激でリン酸化を受けて活性化された。また Akt 阻害剤の添加あるいは不活性型 Akt 変異体の過剰発現で Akt の活性を抑えることにより、高浸透圧条件下での NaCl 取込増によ

る RVI が有意に抑制された。これらの結果は、高浸透圧条件下で起こる NaCl 取込 (RVI) に Akt 活性が必要であることを示唆している。しかし、この細胞外高浸透圧刺激による Akt の活性化がどのようにして起こるのかについては依然、謎のままである。これは、高浸透圧条件下での NaCl 動態変化を理解する上で、解決すべき重要な問題である。そこで、高濃度 NaCl による高浸透圧条件下での NaCl 取込増 (RVI) を引き起こす Akt 活性化メカニズムの解明を 2006 年度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、細胞内外の浸透圧が変化する状況だけでなく、アポトーシスと呼ばれる細胞死を誘導した場合にも観察される。この場合の細胞容積の減少は、アポトーシス性細胞容積減少 (AVD: apoptotic volume decrease) と呼ばれており、容積感受性クロライドチャンネル (VSOR) などのイオンチャンネルの活性化により引き起こされる (文献 1)。この AVD を VSOR ブロッカーなどで抑制すると、アポトーシスそのものも抑制できることから、持続的細胞容積減少である AVD はアポトーシスに必要不可欠な現象であるといえる (文献 2)。通常は持続的な容積減少に続いて RVI が誘導されるが、スタウロスポリン (STS) 添加による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、「RVI を実現する細胞内への NaCl 取込の抑制」も引き起こすことを 2005 年度の研究において明らかにした。さらに、このアポトーシスに必須である RVI の抑制が、アポトーシスシグナル調節キナーゼ (ASK) の活性化に起因することを示した。このアポトーシス刺激で活性化された ASK により、上述の高浸透圧刺激による Akt の活性化が抑制され、NaCl 取込を介した RVI が阻害されるのである。しかし、活性化 ASK がどのようにして Akt 活性を抑制するのか、すなわち NaCl 取込を促進させる Akt シグナル経路と NaCl 吸収を阻害する ASK シグナル経路とのクロストークメカニズムは明らかとなっていない。したがって、アポトーシス誘導条件下での Akt シグナル経路と ASK シグナル経路とのクロストークの全貌を明らかにすることは、生体内での生理的な細胞 NaCl 動態調節のメカニズムの解明につながると期待される。また ASK はアポトーシス刺激だけでなく、酸化ストレスやデスレセプター活性化などの様々なアポトーシス刺激により活性化されるため、STS 以外のアポトーシス刺激でも ASK を介して RVI の抑制が起こるのかという点は未だ不明である。そこで、ASK シグナルを介した NaCl 取込を介した RVI の抑制メカニズムの一般性の確認と NaCl の動態を調節する

二つのシグナル経路 (Akt シグナルと ASK シグナル) の相互作用の解明を 2006 年度研究の第二の目的とする。

さらにアポトーシス刺激による RVI の阻害は、アポトーシス性細胞死にどのような意義があるのか明らかではない。アポトーシス誘導時の AVD を阻害することでアポトーシスそのものが阻害されることから、細胞容積の調節は細胞の生存にきわめて重要であることが予想される。そこで高浸透圧条件下での NaCl 取込に關与するイオントランスポータを発現していない細胞を使い、高浸透圧条件下での NaCl 取込を介した細胞容積調節を持つ細胞の生存における重要性を解明することを第三の目的とする。

2. 実験方法

2.1 高浸透圧刺激により活性化されるタンパク質リン酸化カスケードの解明

一般的に Akt はリン酸化を受けて活性化されるため、高濃度 NaCl による高浸透圧条件下での Akt の活性化には、さらに上流のタンパク質リン酸化経路 (リン酸化カスケード) が存在するはずである。そこで、高浸透圧により活性化される Akt シグナル経路を含め、どのようなシグナルが高浸透圧により活性化されるかを明らかにするために、高濃度 NaCl 添加による高浸透圧刺激処理をした HeLa 細胞の全タンパク質を二次元電気泳動で展開し、全タンパク質を検出する蛍光試薬 (SYPRO Ruby)、またリン酸化タンパク質のみを染色する蛍光試薬 (Pro-Q Diamond) での染色により、高浸透圧刺激でリン酸化を受けるタンパク質を網羅的に解析する。コントロールとしての等浸透圧条件下での細胞タンパク質サンプルと高濃度 NaCl による高浸透圧処理をした細胞タンパク質サンプルのリン酸化パターンを比較することで、高浸透圧によって活性化されるタンパク質の網羅的な解析を試みる。また高浸透圧刺激を行う HeLa 細胞に不活性化型 Akt 変異体を遺伝子導入し、Akt の下流がリン酸化を受けないようにすることで、高浸透圧刺激によりリン酸化を受けるタンパク質の中で、Akt の上流に位置するか、下流に位置するか、もしくは Akt シグナル経路とは別の経路であるかも明らかにすることが可能である。具体的には、高浸透圧刺激により様々なタンパク質リン酸化経路が活性化されると予想されるが、不活性化型 Akt 変異体を導入した細胞でリン酸化変化が生じなくなったタンパク質は Akt シグナル経路の中でも Akt より下流に位置すると考えられる。リン酸化が変化しないタンパク質は、Akt よりも上流かもしくは別のシグナル経路と予想される。高浸透圧刺

激によりリン酸化を受けるタンパク質は、ゲルから切り出し、プロテアーゼ消化した後、マスペクトル解析によってアミノ酸配列およびその配列を基にしたデータベース検索によって cDNA 配列を決定する。同定された高浸透圧条件下でリン酸化されるタンパク質は、PCR 法でクローニング後、*in vitro* リン酸化アッセイにより、高浸透圧刺激で活性化されるタンパク質リン酸化カスケードのどこに位置するかを特定する。このようにして高濃度 NaCl 高浸透圧刺激で活性化されるシグナル経路の網羅的解析を行い、NaCl 動態変化に関与する Akt の活性化メカニズムを解明する。この手法を用いることによって、どのようにして Akt が活性化されるかが明らかとなるだけでなく、最も上流に位置するタンパク質、すなわち細胞外の高濃度 NaCl をセンスする分子 (NaCl センサー分子) の同定も可能であると考えられる。

2.2 ASKシグナル経路とAktシグナル経路のクロストークの *in vitro* 解析

クロストークの解析では、上述の高濃度 NaCl 高浸透圧刺激により活性化されるタンパク質リン酸化カスケードの解析の場合と同様に、Akt が活性化される高浸透圧条件下で、ASK を活性化するアポトーシス刺激や酸化ストレスをかけた HeLa 細胞の全タンパク質を二次元電気泳動で展開して、リン酸化されるタンパク質を網羅的に解析する。HeLa 細胞には、野生型 ASK と不活性型 ASK 変異体をそれぞれ導入し、二つのリン酸化タンパク質パターンを比較することで、ASK シグナル経路に関与するタンパク質リン酸化変化を同定する。同定されたタンパク質のアミノ酸配列および cDNA 配列の決定は、同様にマスペクトル解析ならびにデータベース検索により行う。

2.3 高浸透圧条件下での細胞の生存における NaCl 取込を介した細胞容積調節の重要性の解明

まず HeLa 細胞で NaCl 取込に関与するイオントランスポータのブロッカーを用いて、NaCl 取込を介した RVI を阻害した場合に細胞の生存率がどのような影響を受けるか検討する。NaCl 取込に関与するイオントランスポータが発現していない PS120 細胞は、高浸透圧刺激のみでアポトーシスを起こすが、この PS120 に、NaCl 取込に関与するイオントランスポータを強制発現させ、高浸透圧条件下で NaCl 取込が可能になった場合の細胞死を検討する。

3. 結果と考察

3.1 高浸透圧刺激による RVI 誘導メカニズムの解析

HeLa 細胞において、高浸透圧刺激でどのようなタンパク質がリン酸化されるかを検討するため、HeLa 細胞のタンパク質サンプルを二次元電気泳動にかけた (図 1)。細胞のタンパク質サンプル調整法は、NaCl 取込に関与するイオンチャンネルやトランスポータを解析するため、可能な限り膜タンパク質が可溶化されやすい条件を検討した。多くの条件を試みたが、RIPA バッファーで可溶化し、チオ乳酸を含む膨潤化溶液で、CHAPS を用いて再可溶化するという方法を用いた。最終的に採用したタンパク質サンプル調整法および二次元電気泳動の各ステップは下記の通りである。

- (1) 60 分高浸透圧刺激した HeLa 細胞を RIPA バッファーでタンパク質を抽出
- (2) 核酸や脂質を取り除くため、10% TCA/アセトンでタンパク質のみを沈殿

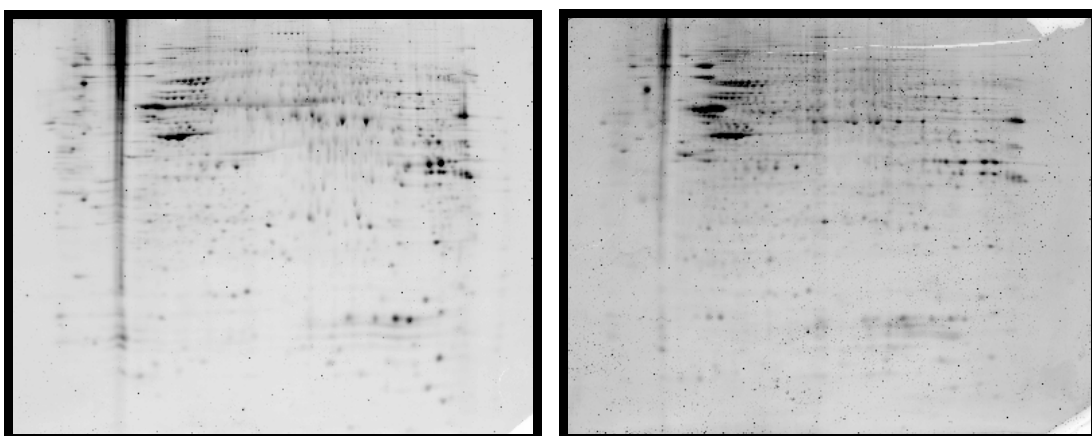


図1 HeLa 細胞全タンパク質の二次元電気泳動
(左)コントロール(等浸透圧) (右)高浸透圧刺激

- (3) 膨潤化溶液 (7 M 尿酸・2 M チオ尿酸・2% CHAPS) で再可溶化
- (4) pH 3-10 の pH 勾配を持つゲルストリップで等電点電気泳動
- (5) 4-20 % グラジエントゲルを使った SDS-PAGE で展開
- (6) 全タンパク質を検出する SYPRO Ruby で染色した。

染色パターンは、蛍光イメージアナライザー Typhoon9410 で検出した。コントロールとして等浸透圧条件下で調製した HeLa 細胞タンパク質サンプルを同様に二次元電気泳動し、そのタンパク質スポットパターンを高浸透圧刺激した HeLa 細胞タンパク質サンプルのパターンと比較した。リン酸化タンパク質は、分子量がほぼそのまま、マイナス電荷を持ったリン酸基が付加されることで等電点がプラス側へシフトすることで検出を試みた。ゲル間のタンパク質スポットの比較は、Image Master 2D Platinum (GE Healthcare 社) を利用した。

コントロールの等浸透圧条件下で調製した HeLa 細胞のタンパク質サンプル 1 mg を 24 cm の長さの等電点ゲルストリップ (pH 3-10) で等電点電気泳動を行い、25 X 20 cm のゲルで SDS-PAGE により添加すると、約 1,400 のタンパク質スポットが検出された。しかしスポットの数が多く、またハウスキーピング的なタンパク質スポットが大きく、微量しか存在しないタンパク質の検出を困難にした。さらに細胞を高浸透圧刺激したりタンパク質サンプルの調製をしたりする際の微妙な条件の違いによって、タンパク質のリン酸化が大きく変化することが明らかとなった。そこで、20 ~ 30 枚のゲル画像データをデータベース化し、コントロールサンプルと高浸透圧刺激サンプルとでそれぞれ平均的な画像データを作成することにした (ゲル画像データの平

均化)。しかしこの方法は多くの労力と時間がかかるため、現在、まだ解析結果を得られておらず、解析を進行中である。

そこで次にリン酸化タンパク質だけを検出出来る蛍光試薬である ProQ Diamond を用いた。スポット採取のための参照データを取る目的で、ProQ Diamond で染色後、全タンパク質を検出する SYPRO Ruby で染色した。高浸透圧刺激をかけた HeLa 細胞のタンパク質サンプルとコントロールとなる等浸透圧条件下で調製した HeLa 細胞のタンパク質サンプルをそれぞれ二次元電気泳動にかけ (各サンプル 1 mg, 24 cm pH 3-10 等電点ストリップゲル, 25 X 20 cm SDS-PAGE ゲル), ProQ Diamond で染色されるリン酸化タンパク質のスポットを解析した。しかし残念ながら、ProQ Diamond で染色されるタンパク質スポットの数が極端に少なく、高浸透圧刺激で誘導されるリン酸化・脱リン酸化を同定することは出来なかった。ゲルに添加するタンパク質量や染色操作といった条件を変えて試みたが、改善は見られなかった。同様にリン酸化タンパク質だけを検出する目的で、抗リン酸化セリン抗体や抗リン酸化スレオニン抗体、抗リン酸化チロシン抗体を使ったリン酸化タンパク質のウエスタンブロッティングを試みた。しかし ProQ Diamond の場合と同様に、検出されるタンパク質スポットの数が極端に少なく、解析に用いることが出来なかった。原因の一つとして、リン酸化されたタンパク質の絶対量が、非リン酸化タンパク質の量に比べて少ないことが考えられた。しかし今回、等電点電気泳動に用いた 1 mg のタンパク質は、等電点ゲルストリップに添加できる最大量に近く、これ以上、タンパク質量を増やすことは、等電点電気泳動でのスポットティングに悪影響が及ぶと考えられた。

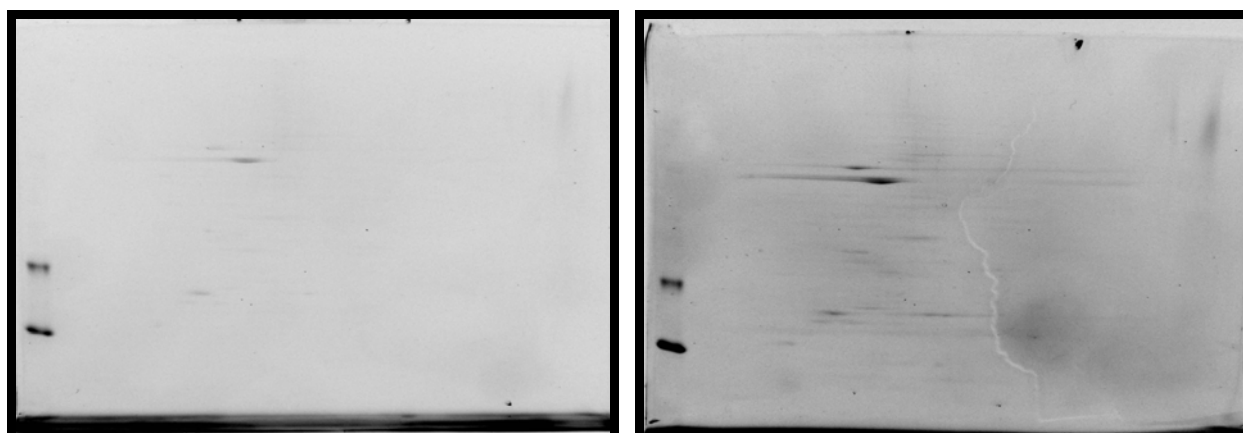


図2 ProQ Diamond によるリン酸化タンパク質の染色 (左)コントロール(等浸透圧) (右)高浸透圧刺激

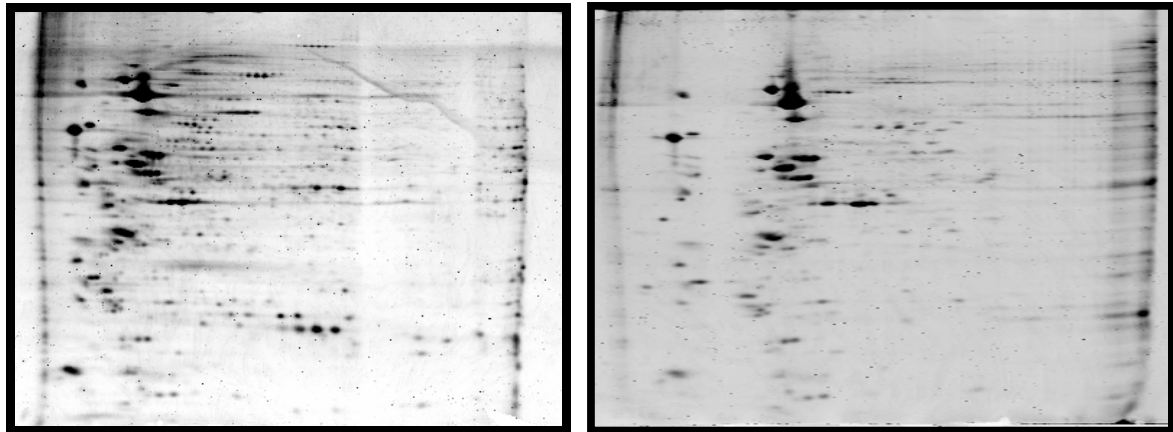


図3 リン酸化タンパク質精製後の二次元電気泳動
(左)コントロール(等浸透圧) (右)高浸透圧刺激

そこで次にリン酸化タンパク質の絶対量を増やす目的で、まず HeLa 細胞のタンパク質からリン酸化されたタンパク質だけを精製した後、二次元電気泳動を行う方法を試みた。リン酸化タンパク質の精製は、Invitrogen 社製のリン酸化タンパク質精製キットを用いた。コントロールサンプルである等浸透圧条件下で調製した HeLa 細胞のタンパク質サンプルと高浸透圧刺激を 30 分かけたタンパク質サンプルから、キットを使いリン酸化タンパク質を精製後、各 1 mg を 24 cm 等電点ゲルストリップ (pH 3-10) を用いて等電点電気泳動で分離し、25 X 20 cm SDS-PAGE ゲルで展開した。その後、全タンパク質を検出する SYPRO Ruby で各ゲルを染色した。

その結果、図 3 に示すように、効率良くタンパク質スポットを検出できた。本方法により検出されるタンパク質スポットはすべてリン酸化を受けたタンパク質であることが予想される。しかし、実験毎に微妙なスポットティングの変化が認められるため、SYPRO Ruby 染色法による全タンパク質の検出実験と同様に、複数枚のゲル画像データを平均化する必要がある、現在、解析中である。

3.2 アポトーシス刺激による RVI 抑制メカニズムの解析

Akt と ASK のクロストークに関しては、前述の二次元電気泳動法によるリン酸化タンパク質の網羅的検討が必要であったため、解析が進んでおらず、高浸透圧刺激によるリン酸化タンパク質の解析と同様に、現在、各種アポトーシス刺激を施した HeLa 細胞から精製したリン酸化タンパク質を用いた実験を進めている。

3.3 高浸透圧条件下での細胞の生存における NaCl 取込の重要性の解明

前年度の本助成研究において、スタウロスポリン (STS)

のような酸化ストレスを引き起こすアポトーシス刺激により、高浸透圧条件下での RVI が阻害されることを明らかにした (図 4A)。

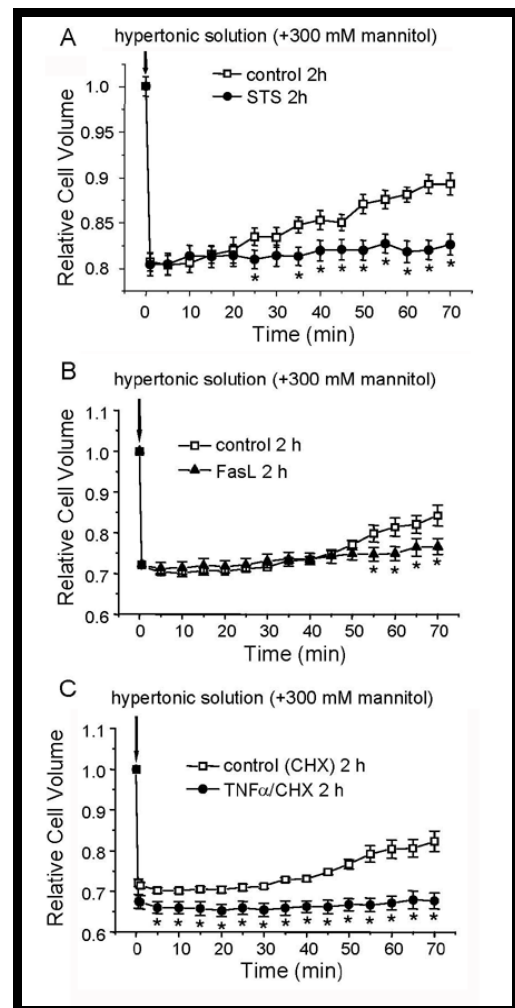


図4 アポトーシス刺激による NaCl 取込の阻害

このような RVI の抑制は、TNF- α や Fas リガンド (FasL) のようなデスレセプターを介したアポトーシス刺激においても、観察されるかどうか検討した (図 4B, 4C)。HeLa 細胞を 5 μ g/ml TNF- α あるいは FasL を加えて 2 時間インキュベートした後、それらアポトーシス誘導剤を洗浄し、高浸透圧条件下 (450 mOsm) に移した。アポトーシス刺激していないコントロール細胞では、細胞容積が、高浸透圧刺激後 70 分で刺激前の 80~90% 程度まで回復した。一方、TNF- α (図 4B) もしくは FasL (図 4C) を加えて 2 時間インキュベートしていた細胞では、高浸透圧刺激後の細胞容積の回復が観察されなかった。このことから、アポトーシス刺激による RVI をもたらす NaCl 取込の阻害は、STS や H₂O₂ のような酸化ストレス性の刺激だけでなく、TNF- α や FasL のようなデスレセプターを介した刺激によっても生じる一般的な現象であることが示唆される。

次に高浸透圧条件下で NaCl 取込を介した RVI を起こす HeLa 細胞で、NaCl 取込が阻害された場合にどのような影響があるかを検討するため、NaCl 取込を行うイオントランスポータの阻害剤を添加した。高浸透圧条件下 (450 mOsm) で Na イオン取込に関与する NHE に対する阻害剤であるアミロライド、もしくは Cl イオン取込に関与する AE に対する阻害剤である DIDS をそれぞれ添加すると、HeLa 細胞への NaCl 取込が阻害され、RVI が見られなくなる。アミロライドと DIDS を同時に添加すると、RVI が見られず (図 5A)、HeLa 細胞への NaCl の取込は完全に阻害されていると考えられる。

このときアポトーシス性細胞死の指標であるカスパーゼ 3 の活性を調べると、NaCl 取込が阻害されているアミロライドと DIDS の共添加によりカスパーゼ 3 が有意に活性化されていた (図 5B)。すなわち、RVI をもたらす NaCl 取込が阻害されることにより、高浸透圧刺激のみでアポトーシスが引き起こされると考えられる。このことから、RVI をもたらす NaCl 取込は、高浸透圧条件下での細胞の生存に必要であり、阻害された場合、アポトーシス性細胞死が引き起こされることが示された。

この高浸透圧条件下における RVI をもたらす NaCl 取込の重要性を確認するため、NHE1 が発現しておらず、NaCl 取込が出来ない細胞の高浸透圧条件下での生存率を検討した。PS120 細胞は、Na イオン取込に関与する NHE1 を発現しておらず、高浸透圧条件下で NaCl 取込を介した RVI を示さないことが既に報告されている。しかし、この PS120 細胞に NHE1 の発現ベクターを導入し、外来

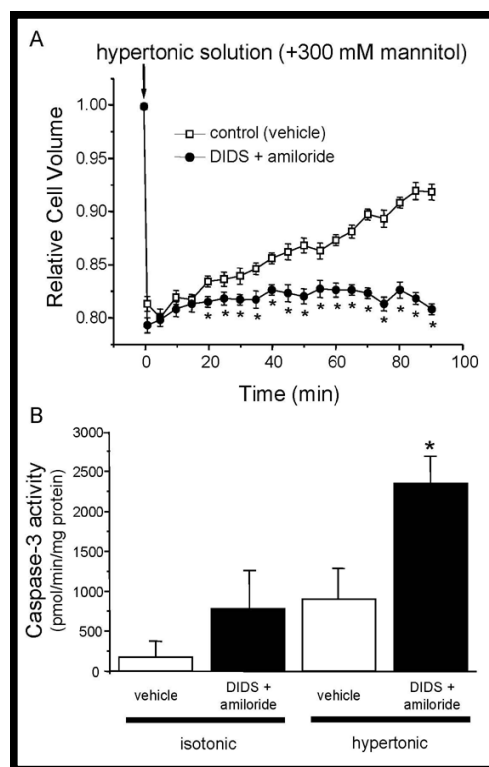


図 5 NaCl 取込阻害によるアポトーシスの誘導

性に NHE1 を発現させると、高浸透圧条件下で RVI が誘導されるようになる。この際、細胞の生存率を、ミトコンドリア活性を指標としたアッセイで検討すると、コントロールの細胞では、高浸透圧刺激のみで細胞生存率の低下が認められる (図 6A)。

一方、NHE1 発現ベクターを導入した PS120/NHE1 細胞では、高浸透圧条件下のみでは生存率が低下しない。このことは、高浸透圧条件下での NaCl 取込を介した RVI が細胞の生存に必須であることを示唆している。さらにアポトーシス性細胞死の指標であるカスパーゼ 3 の活性を調べると、コントロールベクターを導入した PS120 細胞では、RVI をもたらす NaCl 取込が起こらないためにカスパーゼ 3 の活性化が認められるが (図 7A)、外来性に NHE1 を発現させた細胞 (PS120/NHE1 細胞) では、NaCl 取込により RVI が誘導されるため、高浸透圧刺激によるカスパーゼ 3 の活性化が抑制される (図 7B)。これらの結果は、イオントランスポータが発現していないために高浸透圧条件下で NaCl 取込が起こらない細胞では、特別なアポトーシス刺激がなくともアポトーシスが誘導されること、ならびにそういった細胞に NaCl 取込に関与するイオントランスポータを外来性に発現させて RVI をもたらす NaCl 取込を起こす

と、高浸透圧刺激によるアポトーシスが阻害されることを示す。したがって、高浸透圧上結果で RVI をもたらす NaCl 取込は、細胞生存にきわめて重要であることが強く示唆される。

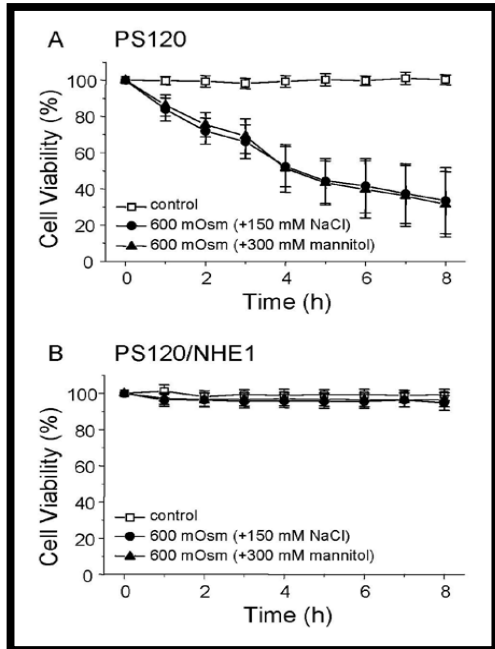


図6 外来性 NHE1 発現による生存率の回復

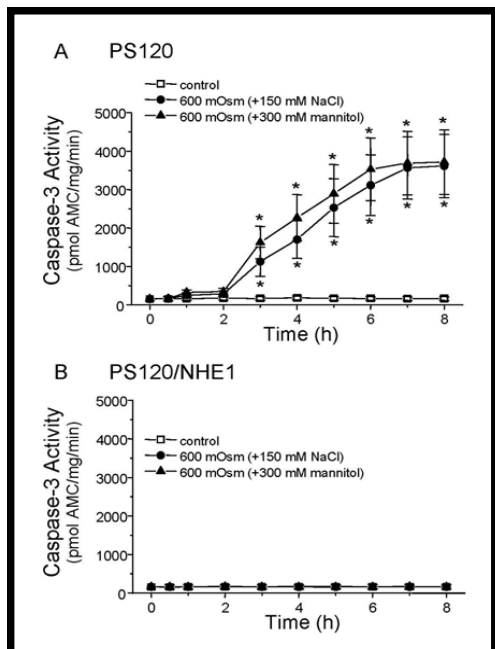


図7 外来性 NHE1 発現によるアポトーシスの抑制

以上の結果より、アポトーシス刺激により RVI をもたらす NaCl 取込が阻害されることに加え、NaCl 取込が起こらない細胞では高浸透圧刺激だけでアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。また、そのような細胞に NaCl 取込に参与するイオントランスポータを発現させることで、アポトーシスの阻害が起こることから、高浸透圧条件下における RVI をもたらす NaCl 取込は、細胞の生存にとりきわめて重要であることが示された。以上の結果は、平成 18 年度助成研究の成果として論文に発表済である(文献 3)。

4. 今後の展開

リン酸化タンパク質の二次元電気泳動による網羅的解析法の確立に時間がかかったため、NaCl 取込に参与する Akt と ASK のクロストークに関する検討が期間内にまったく出来なかった。現在、リン酸化タンパク質を精製することにより、効率的にタンパク質のリン酸化・脱リン酸化が解析可能になったため、早急に ASK に関するリン酸化タンパク質の解析を試みる。RVI をもたらす NaCl 取込を阻害するとアポトーシスが誘導されることから、NaCl 取込が阻害された場合のシグナル伝達系の解明も、高浸透圧条件下での正常な細胞機能の理解に重要であると考えられる。したがって、NaCl 取込が阻害された場合のリン酸化タンパク質の解析も検討すべき重要な研究課題であると考えらる。

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., Kaneseki, 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] Maeno, E.*, Takahashi, N.* and Okada, Y. (2006) Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. FEBS Lett., 580, 6513-6517. (* equal to contributions)

No. 0638

Exhaustive Analysis of Signal Transduction Involved in Mobilization of Intracellular NaCl Changed by Hypertonicity

Nobuyuki Takahashi, Takahiro Shimizu, Hana Inoue

Department of Cell Physiology, National Institute of Physiological Sciences

Summary

Almost cells show regulatory volume increase (RVI), cell volume recovery from shrinkage induced under extracellular hypertonic conditions. In RVI, water inflows into cells following to NaCl absorption through ion transporters such as Na⁺/H⁺ exchangers (NHE). However, under apoptotic conditions, cell volume persistently decreases without RVI. The sustained cell shrinkage is a major hallmark of apoptotic cell death. This suggests that RVI should be inhibited to induce apoptotic cell death. In previous work, it has been indicated that Akt activated by extracellular hypertonicity is indispensable for RVI (NaCl absorption) and that ASK, which is activated by apoptotic stimuli, inhibits Akt activation to suppress RVI under hypertonic conditions. Next questions are “How is Akt activated by hypertonicity to induce NaCl absorption and inhibited by ASK under apoptotic conditions?” and “How is NaCl absorption to induce RVI important for cell survival?”

To detect protein phosphorylation induced by hypertonicity, 2-dimensional electrophoresis of hypertonicity-treated and control HeLa cell protein samples were performed. After purification of phospho-proteins, many proteins were newly phosphorylated by hypertonicity. Now identification of these phospho-proteins was tried by using mass spectrometry. On the other hand, when RVI was inhibited by combined application of NHE and anion exchanger blockers, hypertonic stress induced prolonged shrinkage followed by caspase-3 activation in HeLa cells. Hypertonicity also induced apoptosis in NHE1-deficient PS120 fibroblasts, which lack the RVI response. When RVI was restored by transfection of these cells with NHE1, hypertonicity-induced apoptosis was completely prevented. Thus, it is concluded that RVI dysfunction is indispensable for the persistence of AVD and induction of apoptosis.