

助成番号 0733

## 高濃度 NaCl 条件下における NaCl 取込に関与するリン酸化タンパク質の網羅的解析

高橋 信之<sup>1</sup>, 長谷川 裕一<sup>2</sup><sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科, <sup>2</sup>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、高濃度 NaCl 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。しかしこの NaCl 取込を介した RVI がどのようなメカニズムで引き起こされるかについては不明な点が多い。昨年度まで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、高濃度 NaCl 刺激で活性化されるタンパク質リン酸化酵素である Akt が、RVI をもたらす NaCl 取込に必須であることを明らかにし、高濃度 NaCl 条件下におけるタンパク質リン酸化の重要性を示した。そこで本年度は、高濃度 NaCl 刺激によりどのようなタンパク質がリン酸化を受けるかということを明らかにするため、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引き続き試みた。また高濃度 NaCl 条件下で活性化される Akt について、さらに詳細な検討も行った。

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ことを昨年度、報告した。その結果、アクチン結合タンパク質である ERM タンパク質が高濃度 NaCl 刺激によりリン酸化されることを明らかにした。現在、リン酸化を受けない ERM タンパク質変異体などを用いて、ERM タンパク質の NaCl 取込に対する関与を検討中である。一方、複数存在する Akt アイソフォームの中で Akt1 が実際に HeLa 細胞における NaCl 取込に関与していることを RNAi を用いた実験により明らかにした。また Akt 阻害剤は高濃度 NaCl 条件下で NaCl 取込を介した RVI を阻害するが、実際に NaCl 取込に関与するイオントランスポータの活性が Akt 活性により変化するかどうかを明らかにするため、細胞内 pH をモニターすることで、高濃度 NaCl 条件下における Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体の活性を検討した。その結果、Akt 阻害剤により高濃度 NaCl 刺激で活性化された NHE が抑制されることが明らかになった。

以上の結果により、高濃度 NaCl 条件下では、Akt や ERM を含む様々なタンパク質のリン酸化が起こること、ならびにリン酸化された活性化 Akt が NaCl 取込に関与するイオントランスポータの活性を変化させることが示された。

## 1. 研究目的

体液中の NaCl 濃度の上昇は、腎臓における再吸収機構の破綻やホルモンバランスの変調などの病的条件下だけでなく、一時的ではあるものの、食塩の過剰摂取など生理的条件下でも起こる体内環境変化である。この高濃度 NaCl は、細胞機能に様々な影響を与える浸透圧ストレスであり、様々な疾患と深く関連していることが知られている。したがって、高濃度 NaCl に対する細胞の応答を明らかに

することは、病態生理学的にも細胞生理学的にも、きわめて重要な研究課題である。これまで、高濃度 NaCl に細胞がさらされた場合、短期的には、様々なタンパク質のリン酸化状態が変化することや浸透圧差による細胞収縮に対して細胞容積を戻そうとする調節性細胞容積増大 (Regulatory volume increase: RVI) が誘導されること、また長期的には、細胞外高浸透圧により活性化された転写調節因子により遺伝子発現パターンが変化すること、特に浸

透圧調節物質の取込・産生機構に関与するタンパク質遺伝子群が誘導されることなどが報告されている。

こうした高濃度 NaCl に対する細胞応答の中で、RVI は、ほとんどすべての細胞が持っている普遍的な容積調節機構であり、高浸透圧条件により収縮した細胞容積を、NaCl 取込により細胞内浸透圧を上昇させることで元の大きさまで増大させるシステムである。この NaCl 取込を介した RVI は、遺伝子発現調節に先立って起こる速い応答であり、高濃度 NaCl のような高浸透圧条件下では、極めて重要である。というのも、平成18年度の本助成研究において我々が明らかにしたように、RVI が阻害されると高浸透圧刺激のみで、アポトーシス性細胞死が誘導されるためである (Maeno *et al.*, 2006 FEBS Lett.)。すなわち RVI は、高濃度 NaCl という高浸透圧環境において細胞が生存するために必須の細胞機能である。しかし、これまでの RVI に関する研究は、緩衝液組成や NaCl 濃度などの実験条件が統一されていないため、比較検討することが困難であった。特に高濃度 NaCl により調節を受けるタンパク質リン酸化シグナルに関しては、複数の報告があるものの、それらシグナル経路が NaCl 取込を介した RVI にどのように関与しているか、またシグナル間でどのようなクロストークが存在するのかなどについては全く明らかにされていない。さらに平成17年度本助成研究報告会で述べたように、HeLa 細胞では高濃度 NaCl により Akt というタンパク質リン酸化酵素が活性化され、NaCl 取込を介した RVI が誘導される (論文投稿中) が、一方で Akt 非依存的に NaCl 取込が起こる細胞系も報告されている。これは RVI をもたらす NaCl 取込誘導メカニズムを構成するリン酸化シグナルに細胞特異性が存在している可能性を示唆している。高濃度 NaCl 条件における NaCl 取込という細胞応答は、その破綻によって細胞死が引き起こされることから、様々な疾患に関連していることが予想される。そのため、RVI をもたらす NaCl 取込に関与するシグナル経路を明らかにすることは、生物学的基礎研究だけでなく、医学的にも極めて重要であると考えられる。

そこで、高濃度 NaCl に対するより普遍的な細胞応答を明らかにするため、高濃度 NaCl 刺激により誘導されるタンパク質リン酸化を指標にして、そのリン酸化パターンの変化を、プロテオミクスの手法を用いて網羅的に解析すると共に、それらリン酸化シグナルが RVI をもたらす NaCl 取込

にどのように関与しているか明らかにすることを本申請研究の目的とする。

## 2. 研究方針

まず、高濃度 NaCl 刺激により引き起こされるタンパク質リン酸化パターンの変化を二次元電気泳動法により検出し、リン酸化パターンが変化するタンパク質をマスマスペクトロメトリー法により同定する。このような網羅的解析の後、同定された各々のタンパク質について、高濃度 NaCl 条件下で起こる NaCl 取込を介した RVI に、どのように寄与しているかを、リン酸化部位の点変異や RNAi 法によるノックダウンによって明らかにする。

### 2.1 高濃度 NaCl 条件下におけるタンパク質リン酸化の網羅的解析

リン酸化タンパク質は、そのリン酸基が持つ大きな負電荷のために等電点が変わるため、この等電点電気泳動での移動度が酸性側へシフトする。そのため、次に適切なアクリルアミド濃度のゲルで電気泳動することにより、リン酸化タンパク質は、分子量がそのまま等電点だけが酸性側へシフトしたスポットとして同定可能となる。高濃度 NaCl により、どのようなタンパク質がリン酸化・脱リン酸化されるのか、二次元電気泳動法ならびにタンパク質量分析法を用いた網羅的解析によって同定を試みる。通常、細胞外シグナルによりリン酸化が変化するタンパク質は、全細胞タンパク質の数%であるとの報告があり、高濃度 NaCl でリン酸化状態が変化するタンパク質も同様に、ごくわずかであることが予想されるため、二次元電気泳動を行う前に、(1)IMAC (金属キレートクロマトグラフィー) によるリン酸化タンパク質の精製法、(2)リン酸化タンパク質とのみ結合する蛍光色素 (Pro-Q Diamond) による染色法、(3)ディフェレンシャルディスプレイ法の一つである DIGE 法 (異なる蛍光色素でラベルされた二つのタンパク質サンプルを1枚のゲルで二次元電気泳動することで、サンプル間での比較を容易にする手法) といった方法を単独もしくは組み合わせで、タンパク質リン酸化パターン変化の検出の感度・効率を上げる。現在、細胞生理学実験で広く利用されている HeLa 細胞を使い、既にリン酸化タンパク質検出のための実験系を確立しつつあり、いくつかのタンパク質のリン酸化が HeLa 細胞で高濃度 NaCl 刺激により変化するという予備的データを得ている。HeLa 細胞以外にも、代表的な

線維芽細胞株であるNIH3T3や腎上皮細胞のモデルであるMDCK細胞、腸管上皮細胞として使われているCaco-2細胞なども検討する予定である。このような解析によって同定されたリン酸化タンパク質は、マスマスペクトロメリーを用いて、部分アミノ酸配列を決定し、データベース検索によってどのようなタンパク質かを決定し、その遺伝子情報を得る。

## 2.2 同定されたリン酸化タンパク質のNaCl取込を介したRVIにおける機能解析

HPLCによるリン酸化ペプチドマッピング法やデータベース検索により得られたアミノ酸配列や遺伝子情報からの予測によって、実際に細胞内でリン酸化を受けるアミノ酸部位を決定する。次に、そのリン酸化部位に、遺伝子工学的手法によって、リン酸化を受けないような点変異を導入する。これら点変異導入タンパク質をHeLa細胞に導入して、RVIをもたらすNaCl取込がどのような影響を受けるか、高濃度NaCl条件下での細胞容積をモニターすることで検討する。またRNAiによるノックダウン法を用いて、高濃度NaClによりリン酸化を受けるタンパク質そのものの発現を低下させることで、NaCl取込を介したRVIにどのような影響が生じるかも検討を行う。同定されたタンパク質が、タンパク質リン酸化酵素や脱リン酸化酵素などの酵素である場合、酵素活性に必要なアミノ酸残基に点変異を導入することでドミナントネガティブ作用(内在性の野生型タンパク質の活性を阻害する作用)を示す不活性変異体を作成し、細胞に強制発現することで、その酵素の機能を検討する。そのような不活性変異体を導入した細胞のタンパク質サンプルを使って、それら酵素の基質の同定も試みる。このよ

うなリン酸化タンパク質の同定・解析により、高濃度NaCl条件下でのタンパク質リン酸化を介した細胞内シグナル伝達系を明らかにし、さらにそのタンパク質のRVIをもたらすNaCl取込における機能を解析することで、細胞が高濃度NaClをどのように感知し、どのようにしてNaCl取込を介したRVIという細胞応答を引き起こすのかを明らかにする。

## 3. 結果と考察

### 3.1 高濃度NaCl条件下におけるタンパク質リン酸化の網羅的解析

前年度の助成研究において、高濃度NaCl条件下でリン酸化もしくは脱リン酸化を受けるタンパク質を網羅的に解析するため、等浸透圧条件下のHeLa細胞タンパク質をコントロールとして、高濃度NaCl刺激を行ったHeLa細胞の全タンパク質を二次元電気泳動により比較検討を行った。しかし、通常、リン酸化タンパク質は全細胞タンパク質のごくわずかな割合でしか存在しないため、全細胞タンパク質を用いた二次元電気泳動では、リン酸化タンパク質およびその変化を検出することがきわめて困難であった。そこで、リン酸化タンパク質を効率的に解析する手法を確立するため、細胞タンパク質の分画化(細胞膜・核・細胞質など)や狭いpH範囲(pH 3-6, pH 6-9, pH 5-6など)での等電点電気泳動など、複数の手法を試みた結果、リン酸化タンパク質だけを精製する金属キレートカラムを用いて、リン酸化タンパク質を濃縮し、そのサンプルを二次元電気泳動法により展開することで、効率良くリン酸化タンパク質の解析が可能であることを明らかにした(図1)。

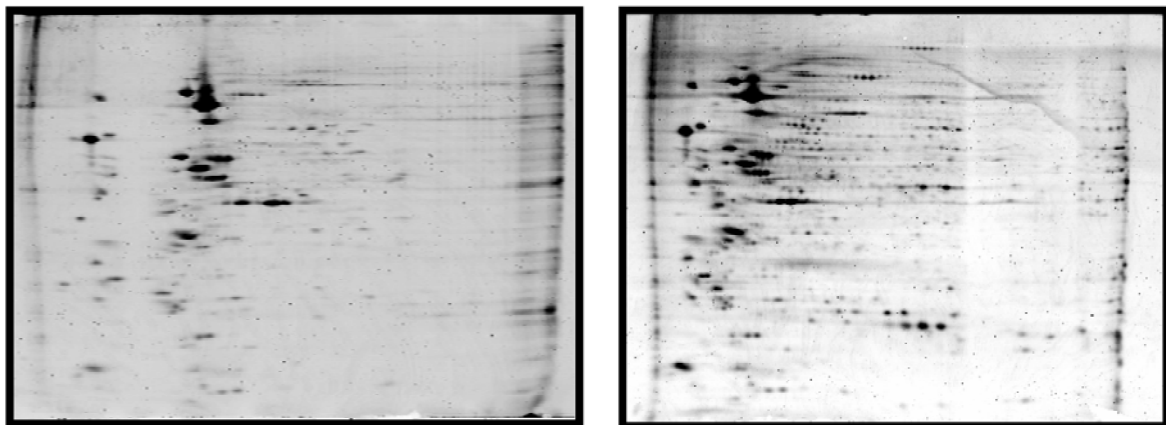


図1. リン酸化タンパク質精製後の二次元電気泳動 (左) コントロール(等浸透圧) (右) 高浸透圧刺激

このリン酸化タンパク質精製では、Invitrogen 社製のリン酸化タンパク質精製キットを利用したが、このキットでは金属イオンをキレートしたビーズ(改変 IMAC)を用いたカラムによって、リン酸化タンパク質が精製される。具体的には、コントロールである等浸透圧条件下の HeLa 細胞と 30 分の高濃度 NaCl 刺激を行った HeLa 細胞(いずれも 10 cm デイッシュにて培養)とから、細胞溶解バッファーによりタンパク質を抽出した。次に、専用バッファーにより平衡化した金属イオンキレートカラムにそれぞれのタンパク質抽出液を流し、洗浄バッファーにより 2 回洗浄した。最後に、溶出バッファーでカラムに結合したリン酸化タンパク質を溶出し、メタノール沈殿法によって精製リン酸化タンパク質を濃縮した。適当量の等電点電気泳動バッファーに溶解し、タンパク質濃度を定量後、1 mg のタンパク質を 24 cm の pH 3-10 範囲の等電点電気泳動用ストリップゲルで等電点の違いに従い展開し、24 X 20 cm の SDS-PAGE ゲルで分子量の違いにより展開した。このとき展開されるタンパク質はすべてリン酸化タンパク質であるので、全タンパク質を可視化する SYPRO-Ruby 染色でタンパク質スポットの検出を行った。またコントロールのサンプルと高濃度 NaCl 条件下のサンプルにおけるタンパク質スポットの比較・定量解析は、島津社製のプロテオーム解析専用ソフトを利用した。

解析の結果、複数のタンパク質のリン酸化が変化していることが明らかとなったが、その中でもアクチン結合タンパク質である ERM タンパク質が高濃度 NaCl 条件下でリン酸化を受けていることが明らかとなった。ERM タンパク質とは、アミノ酸配列が類似したエズリン、ラディキシン、モエシンの 3 種類のタンパク質があり、数 kDa の分子量の違いでウエスタンブロットリング法により、区別することが可能である。この ERM タンパク質のリン酸化フォームのみを検出する特異的な抗体を用いて、高濃度 NaCl 条件下での ERM

タンパク質のリン酸化を検討したところ、時間依存的にリン酸化が亢進していた(図 2)。ERM の中でもエズリン(最も分子量が大きい)が強くリン酸化された。

この ERM タンパク質については以前、リン酸化による活性化で  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体(NHE)の活性を調節するという報告があったため、高濃度 NaCl 刺激による NaCl 取込においても ERM タンパク質の関与が予想された。上記抗リン酸化 ERM 抗体が認識する部位は、ERM タンパク質の C 末端領域に存在するスレオニン残基であるため、そのスレオニン残基のアラニン変異体(リン酸化を受けなくなる)を用いて、高濃度 NaCl 条件下における NHE 活性および NaCl 取込を介した細胞容積増大について、現在、検討を進めている。

### 3. 2 同定されたリン酸化タンパク質の NaCl 取込を介した RVI における機能解析

これまで明らかにした高濃度 NaCl 刺激によりリン酸化を受けるタンパク質リン酸化酵素 Akt には三つのアイソフォームが存在しており、組織・細胞によって発現パターンが異なること、またアイソフォームにより機能が異なっていることがそれぞれ報告されている。そこで高濃度 NaCl 条件下での NaCl 取込にどの Akt アイソフォームが関与するかを明らかにすることを目的に、各アイソフォーム特異的な干渉 RNA (siRNA)を用いて NaCl 取込を介した細胞容積増大に対する影響を検討した。本研究に用いた HeLa 細胞では、RT-PCR による検討の結果、三つのアイソフォームの中で Akt1 と Akt2 が発現し、Akt3 は発現していないことが明らかとなった(データ示さず)。そこでまずヒト Akt1 と Akt2 に対する siRNA を HeLa 細胞に導入し、24 時間後、siRNA による Akt タンパク質ノックダウンの効率をウエスタンブロットリング法で検討した。その結果、各 siRNA の導入により、アイソフォーム特異的にノックダウンされることが

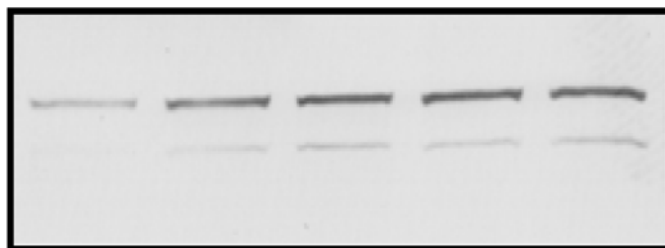


図 2. 高濃度 NaCl 条件下における ERM タンパク質リン酸化の、抗リン酸化 ERM 抗体を用いた検討

明らかとなった(データ示さず)。この HeLa 細胞を用いて、高濃度 NaCl 条件下での NaCl 取込を介した細胞容積増大を検討したところ、Akt1 を特異的にノックダウンした細胞で細胞容積増大、すなわち NaCl 取込が阻害された(図3)。以上の結果より、高濃度 NaCl 条件下における NaCl 取込を介した細胞容積増大には、Akt1 が重要な役割を担っていることが強く示唆された。がん細胞において、Akt1 は細胞生存活性を持ち、Akt2 は細胞増殖活性を持っているとの報告もあり、高濃度 NaCl 条件下での NaCl 取込による細胞容積増大は、細胞の生存にとって極めて重要であることから、Akt1 がこの NaCl 取込に関与していることは理にかなっていると考えられる。

さらに高濃度 NaCl 条件下における NaCl 取込における Akt の役割について、詳細に検討するため、この高濃度 NaCl 条件下での Akt 活性が実際に NaCl 取込に関与するイオントランスポータの活性に影響しうかどうかを検討し

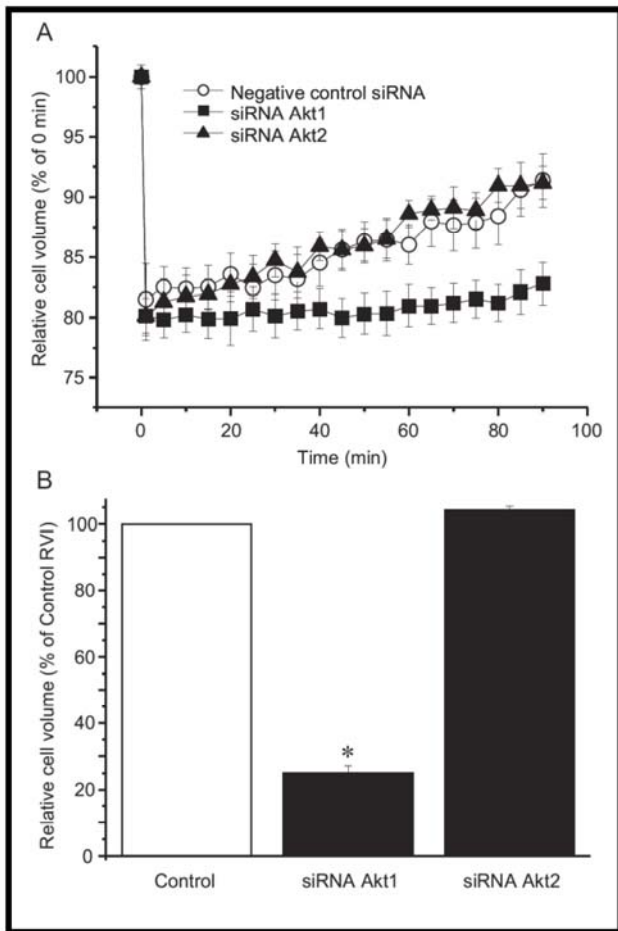


図3. RNAiを用いたAktアイソフォームのNaCl取込に対する関与についての検討

た。高濃度 NaCl 刺激による NaCl 取込に関与するイオントランスポータは、各種阻害剤を用いた実験から Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体(NHE)とCl<sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 交換輸送体(AE)であることが明らかとなった(データ示さず)。NHE 阻害剤であるアミロライドおよびAE阻害剤であるDIDSを添加すると、高濃度 NaCl 条件下での NaCl 取込を介した細胞容積増大が有意に阻害された。実際にこれらイオントランスポータの遺伝子発現をRT-PCRで検討したところ、複数のアイソフォームのうち、それぞれNHE1とAE2であることが示された(図4)。他の細胞系で NaCl 取込に関与していることが報告されているトランスポータの発現はRT-PCRで確認されたものの、それらの阻害剤では NaCl 取込を介した細胞容積増大は抑制されなかった(データ示さず)。

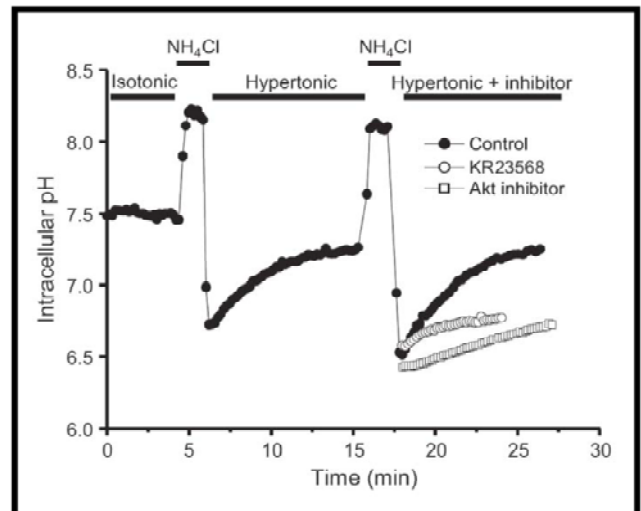


図4. 細胞内 pH 測定による NHE 活性化に対する Akt 活性の検討

これまでの報告から、AEよりもNHEの活性が様々な因子により制御されていると予想されたため、次に HeLa 細胞で NHE 活性を検討する実験系の構築を試みた。細胞外液の二酸化炭素を除くことにより、AEの活性を完全に阻害することが可能であるため、高濃度 NaCl および二酸化炭素なしの条件下では、NHEのみが活性化されることになる。このとき NHE は Na イオンを細胞内に取込み、代わりにプロトン細胞外へ排出するため、細胞内 pH が上昇する。したがって、この条件下では、細胞内 pH をモニターすることで、NHE 活性を測定することが可能となる。そこで、細胞内 pH をモニターするため、HeLa 細胞に pH 指示

蛍光試薬である BCECF を取り込ませ、二酸化炭素を含まないバッファーでインキュベートし、BCECF の蛍光強度が安定した後、高濃度 NaCl 刺激を行った。その結果、高濃度 NaCl 刺激による BCECF の蛍光強度変化に基づく細胞内 pH 変化は観測された(データは示さず)。しかし、その変化率が小さく、より高感度の実験系が必要と考えられた。そこで、NHE を活性化する一般的な手法として用いられている NH<sub>3</sub>Cl 刺激を利用し、ある程度の NHE 活性化状態のもと、高濃度 NaCl 刺激の作用を検討することとした。20 mM NH<sub>3</sub>Cl で HeLa 細胞を短時間処理した後、NH<sub>3</sub>Cl を洗い流すことで細胞内 pH が酸性化する。この細胞内酸性化によって NHE が活性化され、細胞内プロトン細胞外へ放出することで細胞内 pH を中性に維持しようとする(図 4)。この NH<sub>3</sub>Cl を洗い流す際に高濃度 NaCl 刺激を行うと、細胞内 pH の回復が早まった。このとき、NHE 阻害剤であるアミロライドを添加すると、細胞内 pH 回復が抑制されたため、この細胞内 pH 回復過程に NHE が関与していることが確認された。同じ条件で、高濃度 NaCl 刺激時に Akt 阻害剤を添加すると、ほぼ完全に細胞内 pH の回復が抑制された。このことは、高濃度 NaCl 刺激による NHE 活性化には Akt 活性が必須であることを示唆している。また3. 1の

実験で明らかになった ERM タンパク質はリン酸化による活性化で NHE に直接、結合し、活性化することが知られているため、ERM タンパク質が高濃度 NaCl 条件下で Akt によりリン酸化を受ける可能性が考えられる。

#### 4. 今後の展開

本研究において、アクチン結合タンパク質である ERM タンパク質が高濃度 NaCl 条件下でリン酸化を受けることが明らかとなったため、この ERM タンパク質が高濃度 NaCl 条件下における NaCl 取込を介した細胞容積増大に関与する可能性について検討する。また ERM のリン酸化による活性化が、Akt を介した NaCl 取込に関与するかどうかについても、リン酸化を受けない変異体などを利用し、詳細な検討を行う予定である。

#### 文 献

1. 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. 0733

## Exhaustive Analysis of Protein Phosphorylation Involved in NaCl Uptake under High Concentration of NaCl

Nobuyuki Takahashi<sup>1</sup>, Yuichi Hasegawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University

<sup>2</sup>Department of Cell Physiology, National Institute of Physiological Sciences

### Summary

Under the conditions of high concentration of NaCl, almost cells show regulatory volume increase (RVI), which is cell volume recovery from shrinkage, through NaCl uptake. Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers (NHE) is involved in the volume change through NaCl uptake. However, molecular mechanism of the NHE activation is unknown. In previous work, it has been indicated that Akt protein kinase activated by extracellular high concentration of NaCl is indispensable for RVI through NaCl uptake. In this study, we tried to identify other proteins phosphorylated by high concentration of NaCl and performed more detail investigation about Akt involvement in the NaCl uptake-dependent volume change under high concentration of NaCl.

To detect protein phosphorylation induced in the presence of high concentration of NaCl, 2-dimensional electrophoresis were performed. After purification of phospho-proteins, many proteins were newly phosphorylated under high concentration of NaCl. Of them, ERM proteins, a family of actin binding protein, was identified as proteins phosphorylated by high concentration of NaCl. Now characterization of the proteins was tried by using non-phosphorylated mutants. On the other hand, using RNAi method, it has been elucidated that Akt1 is involved in NaCl uptake in high concentration of NaCl. Moreover, intracellular pH imaging revealed that NHE activity is actually induced by Akt activity under NaCl high concentration conditions. Thus, it is concluded that many proteins are phosphorylated by high concentration of NaCl and that Akt activity is responsible for NHE activation by high NaCl concentration to induce NaCl uptake in HeLa cells.