

博士論文（要約）

高浸透圧ストレスで形成される ASK3 グラニュールにおける  
HSP70 の役割の解析

椎崎 繁

## 【序論】

当研究室でストレス応答性 MAP キナーゼ経路を構成する分子として新たに同定された Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3) は腎臓のような生体内でも浸透圧変化の大きい部位に強く発現しており、低浸透圧ストレス下でリン酸化され活性化する一方、高浸透圧ストレス下では脱リン酸化され不活性化するという特徴的な活性変化を示す。この活性変化は浸透圧負荷時の細胞内のイオンの輸送を調節する WNK1-SPAK/OSR1 経路を制御することが当研究室より報告されている。一方、浸透圧ストレス下での ASK3 の細胞内局在を確認したところ、ASK3 は低浸透圧や定常状態では細胞質に拡散して存在しているが、高浸透圧ストレスに応じて数分でグラニュール(ASK3 グラニュール)を形成することが観察された (図 1)。このグラニュールへの局在変化は等浸透圧に戻すと解除される可逆的な局在変化であった。ASK3 の活性変化も同様に迅速かつ可逆的に起こるため、ASK3 グラニュールの形成・解除が ASK3 を介するシグナル伝達に何らかの役割を担っている可能性を考えた。そこで、本研究では ASK3 グラニュール構成因子を解析することで、ASK3 を介する細胞の浸透圧ストレス応答におけるグラニュールの役割を解明することを目的とした。

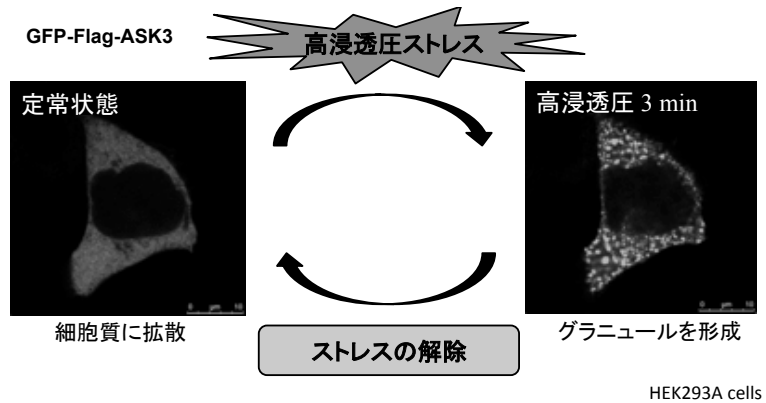


図1 ASK3は高浸透圧ストレスに応じて迅速かつ可逆的にグラニュールを形成する

## 【方法・結果】

### 1. ASK3 グラニュールの詳細な局在の検討

ASK3 グラニュールが既知の細胞内構造体と共局在すれば、その構造体の情報から ASK3 グラニュールの構成因子と機能を推測できると考えた。そこで、ミトコンドリアを始めとした細胞内小器官、ストレスグラニュールや P-body といった既知の細胞内構造体や細胞内輸送小胞のマーカーによる共局在性の検討を共焦点レーザー顕微鏡により行ったが、ASK3 グラニュールと局在が一致するものは見出せなかった。さらに、共同研究によって高浸透圧ストレス下の ASK3 グラニュールの電子顕微鏡観察を行なったところ、ASK3 グラニュールは脂質膜を含まない構造体として観察され、共局在する細胞内小器官などは観察されなかった。以上の結果から、局在の観察による方法では ASK3 グラニュールの構成因子および機能を推測することは難しく、ASK3 グラニュールは新規細胞内構造体であることが示唆された。

### 2. ASK3 グラニュール構成タンパク質として HSP70 を同定した

次に、ASK3 グラニュール構成タンパク質を質量分析計により同定し、構成タンパク質の機能解析から ASK3 グラニュールの役割を解明することを考えた。そこで、ASK3 グラニュールの構造を保ったまま細胞から回収し精製後、質量分析計による解析を行うことにした。ここで ASK3 グラニュールが非常に壊れやすい性質を持っており、通常の細胞溶解条件では細胞溶解と同時に ASK3 グラニュールが壊れてしまうという問題があったが、細胞溶解液の条件を検討した結果、Bovine Serum Albumin (BSA)を添加した細胞溶解液を用いることで ASK3 グラニュールを壊さずに細胞溶解を起こせること

を発見した。この細胞溶解液を用い単離した ASK3 グラニュールに対して免疫沈降を行ない、顕微鏡により観察したところ、ビーズ上に ASK3 グラニュールが形と大きさを保った状態で免疫沈降されていることが確認できた。この方法を用い、高浸透圧 1 時間における ASK3 グラニュールを単離・精製し、共同研究により質量分析計で構成タンパク質の同定を行なったところ、

344 タンパク質が検出された。このうち、シャペロン活性をもつ Heat Shock Protein 70 (HSP70) と、HSP70 の機能を補助するタンパク質として知られる BCL2-associated athanogene 2 (BAG2) が高いスコアで同定されていた。このことから HSP70 複合体が ASK3 グラニュール構成タンパク質であることが示唆された。活性本体である HSP70 に注目し、蛍光タグをつけた HSP70 と ASK3 を細胞に発現し、ライブセルイメージングを行なって局在を観察したところ、高浸透圧で ASK3 と HSP70 がグラニュール状に共局在する様子が観察された (図 2)。また、グラニュールを壊さない条件で ASK3 抗体による免疫沈降を行なったところ、ビーズ上に ASK3 と HSP70 が共存するグラニュールが観察された。以上の結果から HSP70 が ASK3 グラニュール構成タンパク質であることが示された。

### 3. HSP70 は高浸透圧で ASK3 の構造維持にはたらく

HSP70 のシャペロン活性が ASK3 に与える影響を調べるため、HSP70 阻害剤を処置した状態でイムノブロットを行なったところ、阻害剤処置によって長時間の高浸透圧で検出される ASK3 量が減少することが確認された (図 3A)。検出される ASK3 が減少した原因として、ASK3 の分解が亢進している可能性と、ASK3 が不溶化している可能性が考えられた。そこで、不溶性画分の ASK3 の量を確認したところ、高浸透圧で阻害剤を処置すると不溶化する ASK3 が増えることが確認された (図 3 B)。この結果から、HSP70 阻害により高浸透圧下で ASK3 タンパク質が変性していくことが考えられた。阻害剤処置時の ASK3 の局在を観察したところ、高浸透圧で ASK3 グラニュール自体は形成されており、形や大きさに大きな異常は見られなかった。ところが、30 分の高浸透圧刺激により ASK3 グラニ

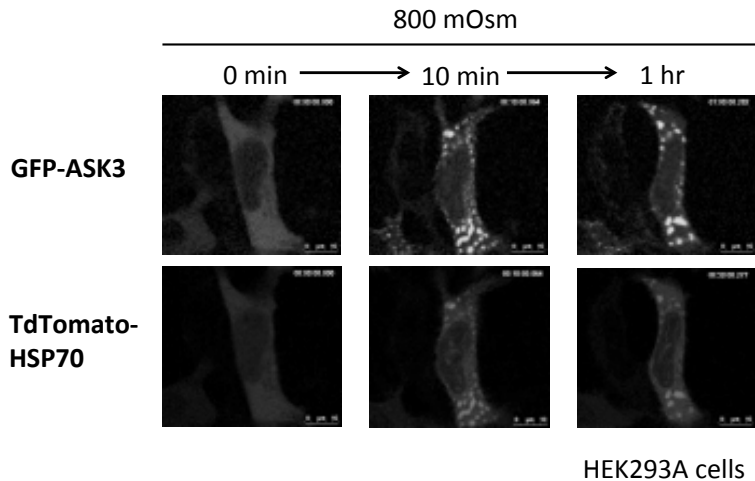


図2 ASK3とHSP70は高浸透圧でグラニュール状に共局在する

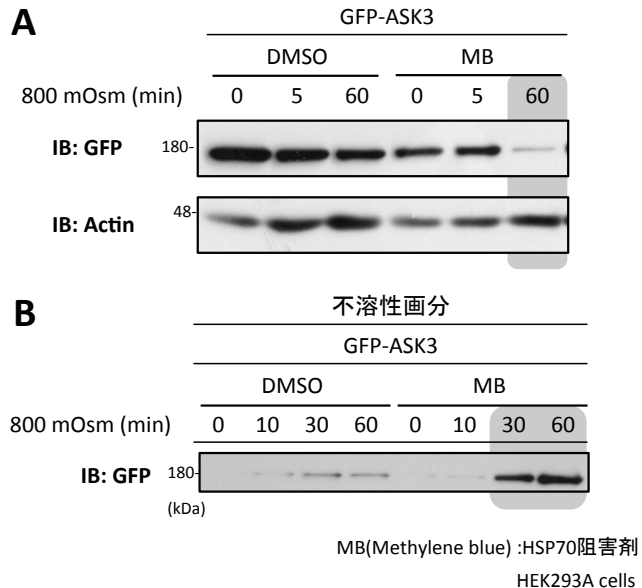


図3 HSP70の阻害は高浸透圧で不溶性化するASK3を増加させる

ユールを形成させた後に低浸透圧刺激を加えると、通常は ASK3 グラニュールが解除され細胞質に拡散した状態に戻るのに対し、阻害剤を処置しておくとも ASK3 グラニュールが解除されず凝集したままだった(図 4)。以上の結果より、HSP70 は高浸透圧ストレスにより異常な構造をとった ASK3 を正常な構造に戻す働きを持つことが示唆された。

#### 4. HSP70 の阻害により ASK3 の脱リン酸化が抑制される

HSP70 が高浸透圧による ASK3 の活性変化に影響を与えるか調べるため、阻害剤処置下での ASK3 のリン酸化の程度を検討したところ、通常は高浸透圧で ASK3 が速やかに脱リン酸化されるのに対し、阻害剤処置によって ASK3 の脱リン酸化が抑制された(図 5)。この結果から、HSP70 が高浸透圧で ASK3 を正常な構造に保ち、ASK3 の脱リン酸化を可能にする役割を持つことが示唆された。

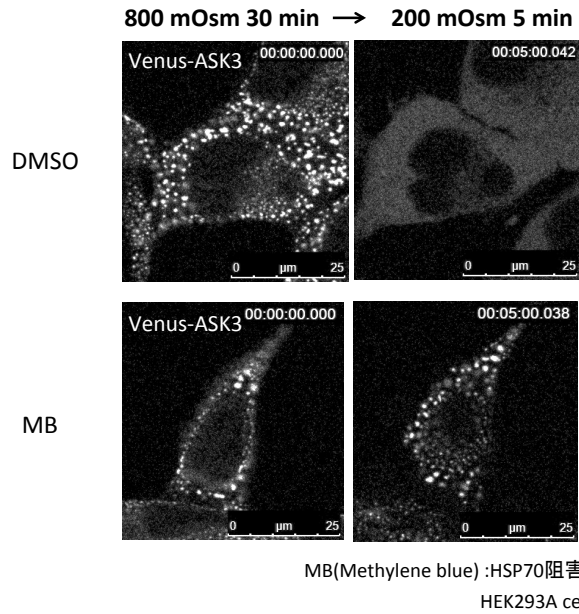


図4 HSP70の阻害によりASK3グラニュールの可逆性が失われる

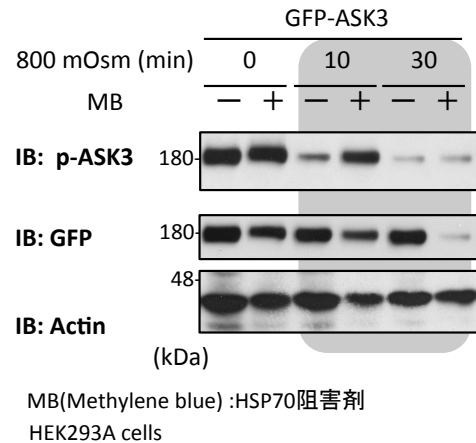


図5 HSP70の阻害によりASK3の脱リン酸化が抑制される

#### 【結論・考察】

本研究において、ASK3 グラニュールの構成タンパク質として新たに HSP70 を同定した。さらに、HSP70 が高浸透圧ストレス下において ASK3 の構造を正常に保つと同時に ASK3 の脱リン酸化を可能にしていることが示唆された。ASK3 グラニュールの役割として、同じ場所に HSP70 と ASK3 が集まることで HSP70 による ASK3 のリフォールディング反応を効率的に起こすことが考えられる。今後より詳細な HSP70 による ASK3 制御機構を明らかにすると同時に、HSP70 の阻害が ASK3 を介する細胞の浸透圧ストレス応答に与える影響を調べることで、ASK3 グラニュールの役割について詳細に迫ることができると考えられる。