

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590883
 研究課題名（和文） WNKキナーゼの解析による高血圧発症機序の解明と治療戦略
 研究課題名（英文） Analysis of WNK kinases and the molecular pathophysiology of hypertension

研究代表者
 頼 建光 (RAI TATEMITSU)
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号：80334431

研究成果の概要：

高血圧を示す遺伝性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子 WNK キナーゼの解析を通じて、腎臓において WNK - OSR, SPAK - NCC リン酸化シグナル伝達系という新規の血圧調節系が存在することを発見した。この系は塩分の摂取量の増減に応じて腎臓遠位尿細管での塩分再吸収を調節することで血圧を上下させる。さらにこの系の破綻が原因となった高血圧の発症機序も明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：WNK キナーゼ、偽性低アルドステロン症 II 型、ノックインマウス、ノックアウトマウス、Na-Cl 共輸送体、OSR1、SPAK、高血圧

1. 研究開始当初の背景

(1) 偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) は高血圧、高カリウム血症、アシドーシスなどを主症状とする難治性遺伝性疾患である。2001 年にその原因遺伝子として、WNK キナーゼ (WNK1, WNK4) が同定された。WNK キナーゼは serine-threonine protein kinase の一種であるが、その生理機能は研究開始当初まったく不明であった。

(2) これまで腎臓で明らかにされてきた遺伝性の血圧異常症 (Liddle 症候群、Gitelman 症候群、Bartter 症候群) の原因はいずれも腎臓尿細管のイオンチャネルの変異であったが、WNK キナーゼはリン酸化酵素である点が非常に注目された。すなわち、PHAII の分子学的発症機所を解明し、WNK キナーゼの生理的役割を明らかにすることは、生体の血圧調節にかかわる新たな刺激伝達系の発見と高血圧の発症機所の解明につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は高血圧を示す遺伝性疾患であるドステロン症 II 型 (PHAI) の原因遺伝子 WNK キナーゼの解析を通じ、腎臓でのイオン輸送の新たな調節系を解明し、高血圧の発症機所を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞を用いた強制発現系での WNK キナーゼの機能解析。
- (2) 疾患起因性変異を WNK4 遺伝子に組み込んだノックインマウスの作製と解析。
- (3) WNK4 ノックアウトマウスの作製と解析。

4. 研究成果

- (1) 培養細胞を用いた強制発現系での WNK4 機能解析。

すでに我々は、培養尿細管上皮細胞 (MDCKII 細胞) において、WNK4 を安定発現させると、変異型 WNK4 は細胞間クロライド透過性を亢進させることを見いだしていた。また tight junction の構成タンパクの1つである claudin 4 が WNK4 によりリン酸化され、さらに、変異型 WNK4 により claudin 4 のリン酸化の度合いが増強されることを発見した。そこで、PHAI のもう1つの責任タンパクである WNK1 の細胞間クロライド輸送と claudin 4 に及ぼす影響を、MDCKII 細胞において検討した。その結果、WNK1 の過剰発現が、変異型 WNK4 同様、細胞間クロライド透過性と claudin 4 リン酸化を亢進させることが示された。(雑誌論文①)

- (2) 疾患起因性変異を WNK4 遺伝子に組み込んだノックインマウスの作製と解析。

PHAI の生体内での病態生理と WNK4 の機能について調べるために、疾患起因性 WNK4 変異タンパクをノックインしたマウスを作製した。ノックインマウスは高血圧、高カリウム血症、代謝性アシドーシスを呈し PHAI の形質を発現しており、PHAI 疾患モデルマウスの作製に成功した。このマウスにおいて腎臓遠位尿細管における Na-C1 共輸送体 (NCC) の発現とリン酸化が亢進していた。さらに、このマウスにおいて二つのキナーゼ OSR1 と SPAK1 のリン酸化の亢進も見られた。これらのことから PHAI の病因は変異 WNK4 による OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系の亢進による塩分再吸収増加であると考えられた。(図1、雑誌論文④)

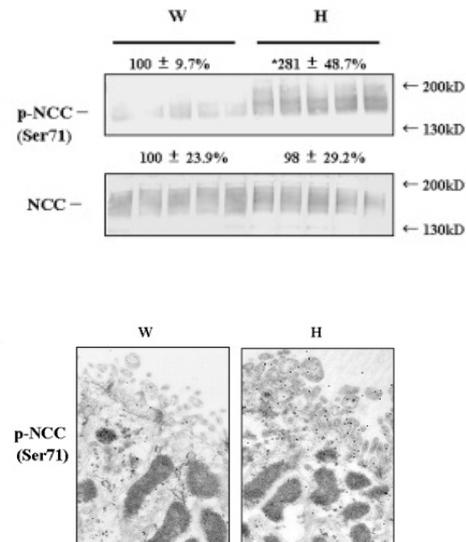


図1. Wnk4(D561A/+) ノックインマウスにおけるリン酸化 NCC の発現増加と、尿細管細胞の頂側膜への局在

引き続き WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系の生理的意義につき検討した。野生型マウスに低塩分食を投与したところ、OSR1/SPAK-NCC のリン酸化は亢進し、この変化はスピロラクトン投与にて消失した。逆に高塩分食投与では OSR1/SPAK-NCC のリン酸化は抑制され、この変化はアルドステロン投与にて消失した。このことから WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系はアルドステロンの下流にある新規の effector 系であることが示された (図2、雑誌論文⑥)。

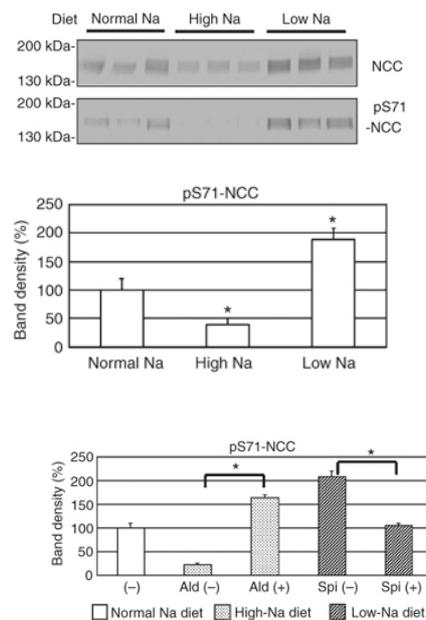


図2. 塩分摂取量に応じたリン酸化 NCC の発現量の変化とアルドステロンによる制御

(3) WNK4 ノックアウトマウスの作製と解析。

WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系における WNK4 の生理的役割を解明さらに WNK4 ノックアウトマウスを作製して解析を行った。ノックアウトマウスでは、低血圧と NaCl 再吸収の低下がみられた。このことから野生型 WNK4 は NCC による塩分の再吸収を活性化していることが示された。(図3、現在投稿中)

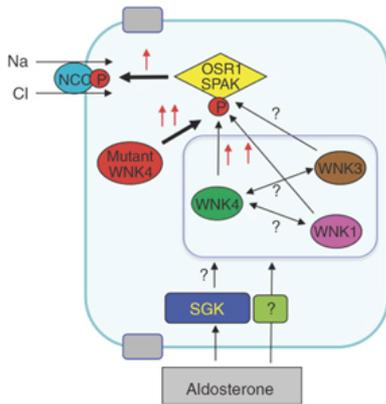


図 3. 遠位尿細管細胞における WNK4-OSR1 / SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系

このように WNK4 を中心とした新規血圧調節系の実態につき、多くの注目すべき成果が得られ、現在も研究が進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ohta A, Yang SS, Rai T, Chiga M, Sasaki S, Uchida S. Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Oct 20;349(2):804-8. 査読あり
- ② Sohara E, Rai T, Yang SS, Uchida K, Nitta K, Horita S, Ohno M, Harada A, Sasaki S, Uchida S. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused

by an aquaporin 2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep

19;103(38):14217-22. 査読あり

- ③ Suzuki T, Rai T, Hayama A, Sohara E, Suda S, Itoh T, Sasaki S, Uchida S. Intracellular localization of ClC chloride channels and their ability to form hetero-oligomers. *J Cell Physiol.* 2006 Mar;206(3):792-8. 査読あり
- ④ Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin SH, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab.* 2007 May;5(5):331-44. 査読あり
- ⑤ Tajima M, Hayama A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(4):858-64. 査読あり
- ⑥ Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int.* 2008; 74: 1403 - 1409. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 太田哲人, 頼建光, 他 3 名. WNK1 遺伝子の強発現により細胞間の chloride 透過性は亢進し、claudin4 はリン酸化が増加する. 第 49 回日本腎臓学会学術総会、東京、2006 年 6 月.
- ② 太田哲人, 頼建光, 他 3 名. WNK1 発現

- MDCKII 細胞における paracellular の Cl 透過性と claudin4 に関する検討. 第 12 回分子腎臓研究会、東京、2006 年 9 月.
- ③ Yang S, Rai T, 他 11 名. Generation and analysis of *Wnk4*^{D561A/+} knock-in mice. ISN - Nature Genetics Forefronts Symposium on Nephrogenetics: from Development to Physiology, Danvers USA, March 2007.
- ④ Yang S, Rai T, 他 11 名. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a *Wnk4*^{D561A/+} knock-in mouse model. 第 50 回日本腎臓学会学術総会、浜松、2007 年 5 月.
- ⑤ Rai T, 他 12 名. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: analysis of a *Wnk4*^{D561A/+} knock-in mice. 第 13 回分子腎臓研究会、東京、2007 年 9 月.
- ⑥ 千賀宗子、頼建光、他 5 名. Na-Cl 共輸送体 (NCC) のリン酸化は WNK4-OSR1 / SPAK-NCC リン酸化刺激伝達系を介し経口 NaCl 摂取量により制御される. 第 51 回日本腎臓学会学術総会、福岡、2008 年 5 月.
- ⑦ 内藤省太郎、頼建光、他 4 名. 低浸透圧ストレスは OSR1 / SPAK を持続的にリン酸化する. 第 51 回日本腎臓学会学術総会、福岡、2008 年 5 月.
- ⑧ 太田哲人、頼建光、他 6 名. WNK4 ノックアウトマウス、作製と解析. 第 14 回分子腎臓研究会、東京、2008 年 9 月.
- ⑨ Akihito Ohta, Tatemitsu Rai, 他 6 名. Targeted Disruption of the *Wnk4* Gene Reduced the Phosphorylation of OSR/SPAK and Na-Cl Cotransporter in Mice. Renal Week 2008, Philadelphia,

November, 2008.

- ⑩ Shotaro Naito, Tatemitsu Rai, 他 5 名. WNK1 Activity to OSR1 in COS Cells Is Regulated Not by Hypotonicity but by Low Chloride. Renal Week 2008, Philadelphia, November, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

頼 建光 (RAI TATEMITSU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 80334431

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者