

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06208

研究課題名(和文) WNK-Wntシグナルによる神経分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of neural differentiation in Wnt signaling by WNK.

研究代表者

澁谷 浩司 (Shibuya, Hiroshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30261324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：WNKの神経系における機能を解明するため、WNKによるWntシグナル制御機構の解析を進め、WNKがE3 ligaseであるMAEAと結合することが示され、WNKがMAEAと  $\beta$ -cateninの結合を阻害することで分解複合体GIDによる分解を抑制することを明らかにした。さらにWntシグナルに対するWNK阻害剤の効果を調べたところ、 $\beta$ -cateninのユビキチン化と分解を誘導し、Wnt標的遺伝子の発現を抑制すること、WNK阻害剤は毒性が低く、 $\beta$ -cateninの分解を介して効率的に大腸がんの形成を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでWNKによるWntシグナル分子  $\beta$ -cateninの分解制御機構は全く知られていなかった。本研究により  $\beta$ -cateninの新規結合分子を発見し、WNKが  $\beta$ -cateninのユビキチン化を阻害することで  $\beta$ -cateninの分解を抑制し、Wntシグナルを制御することを見出した。またWNK阻害剤の投与によりWntシグナルの抑制を介して大腸がん形成を抑えることができたことから、WNKが新たな抗がん剤の標的分子となると期待された。さらに、Wntシグナルの異常な活性化ががん以外の疾患においても観察される現象であることから、本研究成果は多様な疾患に対する非常に有用な知見となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the function of WNK in the nervous system, we proceeded with the analysis of the Wnt signaling mechanism by WNK, and it was shown that WNK binds to MAEA, which is an E3 ligase, and WNK inhibits the binding between MAEA and  $\beta$ -catenin. It was clarified that the decomposition by the decomposition complex GID was suppressed. Furthermore, when the effect of the WNK inhibitor on the Wnt signal was investigated, it induced ubiquitination and degradation of  $\beta$ -catenin, suppressed the expression of the Wnt target gene, and the WNK inhibitor was less toxic and degraded  $\beta$ -catenin. It was clarified that it efficiently suppresses the formation of colorectal cancer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：WNK Wntシグナル 神経分化  $\beta$ -catenin GID complex

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

偽性低アルドステロン症 (pseudohypoaldosteronism: PHA) 型は主に 10 から 20 歳代で発症し、主要な所見は低レニン性高血圧症である。PHA 型は常染色体優性の遺伝形式を取ることが知られており、原因遺伝子としてプロテインキナーゼ WNK1 および WNK4 が同定された (Wilson et al., Science, 293: 1107-1112, 2001)。我々は WNK1 結合因子として STE20 様プロテインキナーゼ SPAK/OSR1 を同定し、生体内において WNK1 SPAK/OSR1 共輸送体というシグナル伝達経路が存在することを示した (Moriguchi et al., J. Biol. Chem., 2005)。また、この経路は、線虫でも進化的に保存されていることを示し (Hisamoto et al., EMBO Rep., 2008)、PHA 型と同様の変異を持つ WNK4 を強制発現するトランスジェニックマウスが PHA 型と同様の症状を発症し、腎臓における SPAK/OSR1 による共輸送体の制御が発症に重要な役割を果たしていることを示したことにより、PHA 型の発症機構における WNK シグナルの重要性を明らかにした (Yang et al., Cell Metabolism, 2007)。

一方、WNK1 遺伝子は遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー (HSAN) II 型の原因遺伝子でもあることが示され (Shekarabi et al., J. Clin. Inv., 2008)、WNK の発生・分化に関わる機能を解析することは、HSAN 型の発症機構解明の観点でも重要と考えられる。しかしながら、世界的に WNK の機能解析は腎臓における WNK に関する研究が数多く報告されるばかりで発生・分化に関する報告はほとんどなされていないことに加え、シグナル伝達機構という観点では我々が発表した WNK1 SPAK/OSR1 共輸送体からなる展開、及び WNK シグナルにより Lhx8 遺伝子の発現が誘導され、神経分化に関与すること (Sato and Shibuya, 2013) 以外の報告は皆無であった。

### 2. 研究の目的

これまでの解析から WNK や結合因子 GSK3 が Wnt シグナルに関与すること、そして  $\beta$ -catenin の分解に関わる初期データとして掴んでいた。これらの因子について、アフリカツメガエル胚を用い、異所発現系や特定遺伝子のノックダウンなどを駆使し、Wnt シグナルに焦点をあてた機能解析を進める。一方で主に培養細胞系を用いた生化学的解析を進め、分子レベルでの関係を詳細に明らかにする。これらの実験を通して、発生・組織形成、特に神経組織における WNK シグナルの新たな機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル WNK、GSK3 および MAPK 遺伝子の機能解析および生化学的解析 アフリカツメガエル WNK、GSK3、MAPK および Wnt シグナル因子の遺伝子を特異的にノックダウンし、表現系の観察、マーカー遺伝子の挙動を調べ、これら遺伝子の上下関係を検討した。また、アフリカツメガエル胚もしくは培養細胞を用い、細胞内局在の検出、免疫沈降法による結合実験、in vitro kinase assay によるリン酸化能の検出、標的遺伝子の発現検討等を行った。また、リン酸化部位を特定することによる機能解析との相関関係を明らかにするべく、アフリカツメガエル胚を用いた系により解析を進めた。

(2)  $\beta$ -catenin タンパク分解機構の解析 様々な  $\beta$ -catenin タンパクの欠失変異体や点変異体を作製し、WNK シグナルと  $\beta$ -catenin タンパク分解に関与する領域または部位を特定した。これらの部位のリン酸化部位またはユビキチン化部位から候補分子を選択し、相互作用を明らか

にした。候補分子としては、これまでにWNKやSPAK/OSR1結合因子をMASS解析から得られたキナーゼに絞り、進め、WNKシグナルとWntシグナルとの関係に絞った解析、検討を進め、Wnt-WNKシグナルの確立を目指した。 \_

#### 4. 研究成果

##### (1) WNKはWntシグナルを正に制御する。

WntシグナルにおけるWNKの機能を調べるため、HEK293T細胞のWNK1及びWNK4(WNK1/4)をsiRNAによりノックダウンしたところ、Wnt標的遺伝子の発現減少が確認され、WNKがWntシグナルを正に制御することが示された。そこで $\beta$ -cateninのタンパク質を解析すると、WNK1/4のノックダウンにより $\beta$ -cateninの分解がみられた。Wntシグナルにおいて $\beta$ -cateninを分解するE3リガーゼとしてTrCPが広く知られている。そこでWNK1/4のノックダウンによる $\beta$ -cateninの分解がTrCPを介しているか調べたところ、興味深いことにそうではないことが示された。したがって、TrCPではない別のE3リガーゼによる制御が推測される。そこで、これまでに報告されている $\beta$ -catenin分解に関与するE3リガーゼSIAH1やSHPRHとの関連を調べたが、これらのE3リガーゼもWNKによる $\beta$ -catenin制御には関与しないことが明らかとなった。

##### (2) WNKはGID複合体を介して $\beta$ -cateninのタンパク質を制御する。

以前、当研究室ではGIDと呼ばれるE3リガーゼ複合体の構成因子であるWDR26が $\beta$ -cateninの分解に重要なことを報告した。そこでGIDを構成するE3リガーゼMAEA及びRMND5Aをノックダウンしたところ、WNK1/4のノックダウンによる $\beta$ -cateninの分解が抑制された。また、解析を進めると、WNKがMAEAと結合することが示され、WNKがMAEAと $\beta$ -cateninの結合を阻害することでGIDによる分解を抑制することが明らかとなった。

##### (3) WNK阻害剤はWntシグナルを阻害することで、大腸がんの発生を抑制する。

近年、WNK阻害剤としてSTOCKS2S-26016(26016)が報告された。そこで、Wntシグナルに対するこの阻害剤の効果を調べたところ、 $\beta$ -cateninのコピキチン化と分解を誘導し、Wnt標的遺伝子の発現を抑制することがわかった。さらに26016の誘導体である#13の効果も検証したところ、26016と同様の結果が得られた。したがって、これらのWNK阻害剤はWntシグナルの阻害剤としても機能することが明らかとなった。

$\beta$ -cateninの分解を誘導する化合物は大腸がん形成を抑制する効果が期待できることから、大腸がんに対する26016と#13の効果を解析した。大腸がん細胞をそれぞれの阻害剤で処理したところ、26016は細胞死を誘導し、#13は細胞増殖を抑制することがわかった。そこで大腸がん細胞を皮下移植したヌードマウスにそれぞれの阻害剤を投与し抗腫瘍効果を検証したところ、驚いたことに26016を投与したマウスでは抗腫瘍効果が確認されず、ほとんどのマウスが死んでしまった。おそらく26016は抗腫瘍効果よりも毒性が勝ってしまったと考えられる。一方、#13を投与したマウスでは投与量依存的に腫瘍の大きさが縮小し、致命的な毒性も示さなかった。また、#13を投与したマウスから腫瘍を回収し $\beta$ -cateninの発現量を調べると、#13の投与量依存的に発現が減少していることが明らかとなった。以上の結果から、WNK阻害剤#13は毒性が低く、 $\beta$ -cateninの分解を介して効率的に大腸がんの形成を抑制すると示唆された。

本研究により、WNKがGID複合体と $\beta$ -cateninの結合を阻害することで $\beta$ -cateninの安定化を誘導し、Wntシグナルを正に制御することが明らかとなった。またWNK阻害剤がWntシグナル

の阻害剤としても機能し、大腸がん形成を効率的に抑制することを示した。したがって、  
catenin の新規制御因子として、WNK ががん治療の新たな標的となることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Atsushi, Shibuya Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ functions as a positive effector in the WNK signaling pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0193204	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Atsushi, Shimizu Masahiro, Goto Toshiyasu, Masuno Hiroyuki, Kagechika Hiroyuki, Tanaka Nobuyuki, Shibuya Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 WNK regulates Wnt signalling and $\beta$ -Catenin levels by interfering with the interaction between $\beta$ -Catenin and GID	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01386-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Michiru Nishita, Koki Kamizaki, Ikumi Nishikaku, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Ror1 signaling through Dvl and Rif promotes invasion of lung adenocarcinoma cells.
3. 学会等名 ASCB（米国細胞生物学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Sato, Hiroshi Shibuya
2. 発表標題 GSK3 $\beta$ functions as a positive effector in WNK signaling pathway.
3. 学会等名 The 13rd Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤淳、澁谷浩司
2. 発表標題 GSK3 functions as a positive effector in WNK signaling pathway
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiru Nishita, Ikumi Nishikaku, Eri Yoshida, Koki Kamizaki, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Ror1 promotes invasion of lung adenocarcinoma cells through small GTPase Rif -mediated filopodia formation
3. 学会等名 ASCB (米国細胞生物学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michiru Nishita, Ikumi Nishikaku, Eri Yoshida, Hiroshi Shibuya, Kunio Matsumoto, and Yasuhiro Minami
2. 発表標題 Rif small GTPase mediates Ror1 signaling to induce filopodia formation and invasion of lung adenocarcinoma cells.
3. 学会等名 日本細胞生物学会・日本発生生物学会合同年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	後藤 利保  (Goto Toshiyasu)  (00517518)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授    (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 淳  (Sato Atsushi)  (30451925)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教    (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関