

## 自己評価報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：12602  
研究種目：基盤研究（A）  
研究期間：2008～2012  
課題番号：20249047  
研究課題名（和文） 腎臓膜輸送体を制御する新規細胞内刺激伝達系の解明  
研究課題名（英文） The role of WNK kinases in the regulation of renal transporters and channels.  
研究代表者  
内田 信一（UCHIDA SINICHI）  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：50262184

研究分野：腎臓内科学

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：膜輸送体、WNK キナーゼ、腎臓、遺伝子改変動物

## 1. 研究計画の概要

生体における体液恒常性維持において腎臓は主要な役割を担っている。その機構が達成されるためには、生体の置かれた環境が変化した時、いかにしてそのシグナルがそれぞれのイオンや溶質の尿細管での輸送をつかさどる膜輸送体に伝わり、その機能を調節しているかを明らかにしなくてはならない。本研究課題では、最近ヒトの遺伝性高血圧症「偽性低アルドステロン症 II 型（PHAII）」の原因遺伝子であることが判明した WNK キナーゼについて検討する。我々は PHAII モデルマウスの作成により、WNK キナーゼが OSR1/SPAK キナーゼを介して、腎臓での Na-Cl 共輸送体をリン酸化により制御していることを明らかにした (*Cell Metab* 2007)。研究計画は全体を通して大きく以下の 4 つに分けられる。

- 1) WNK4 からのシグナル伝達系を各種ノックアウトマウスを使用し検討する研究。
- 2) WNK キナーゼ周辺の分子ネットワークを WNK 結合蛋白を単離して明らかにする研究。
- 3) WNK4 ないしその下流の OSR1/SPAK キナーゼの活性化因子を解明する研究。
- 4) WNK4 以外の WNK、特に PHAII を同様に引き起こす WNK1 の役割を解明する研究。

## 2. 研究の進捗状況

1) について。PHAII モデルマウスである WNK4(D561A) ノックインマウスを WNK からのシグナルを受け付けられないミスセンス変異を導入した OSR1 および SPAK ノックインマウスと交配し、トリプルノックインマウスを作成し、変異 WNK4 からのシグナルの経路が当初推定した OSR1 及び SPAK であるのかを生体内で確認する事を試みた。その結果、OSR1 およ

び SPAK の変異の数が WNK4 ノックインマウス内で増える毎に NCC のリン酸化は低下し、それに伴い高血圧等の PHAII の形質が改善された。また、OSR1 ヘテロ・SPAK ホモノックインという生存できる最大限の変異を持つマウスでは、NCC のリン酸化は完全に消失しており、NCC の生体内でのリン酸化はこれらのリン酸化酵素に完全に依存していることを明らかにした (*JCS in press*)。

また、WNK4 の hypomorphic mice の作成に成功し、WNK4 が WNK-OSR1/SPAK-NCC 系に対して正の制御因子である事を、生体内で証明した (*Hum Mol Genet* 2009)。

2) について。酵母 two-hybrid 法により PHAII の変異が集中する WNK4 のドメインに結合する蛋白の同定を行った。その結果変異により結合が変化する蛋白をいくつか同定し、その結合が WNK4 キナーゼの機能とどう関わるかを検討中である。

3) について。WNK-OSR1/SPAK-NCC 系を制御する液性因子としてアルドステロンを同定した (*Kidney Int* 2008)。その後、アンギオテンシン II (*BBRC* 2010)、バゾプレシン (*AJP Renal* 2010) もこの系を制御する事、また液性因子以外には、食事の K 摂取量、細胞外の K 濃度が WNK キナーゼ活性を制御する事 (*AJP Renal* 2009, *CEN* 2010) を明らかにした。

4) について。WNK3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、現在解析中である。WNK1 については、コンディショナルノックアウトマウス作成よりは、既存のジーントラップによるヘテロノックアウトマウスを研究協力者 (Prof. Dario Alessi in Dundee Univ. in UK) から得ることができ、WNK1 が腎臓での WNK-OSR1/SPAK-NCC 系に関与しているかについて解析を行っている。

### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

WNK-OSR1/SPAK-NCC 系自体の生体内での存在を、他の遺伝子改変マウスとの交配にて証明し(JCS in press)、上流の制御因子の更なる同定もすみ、ロックアウトマウスの作成(Hum Mol Genet 2009 など)および解析も順調であるため。

### 4. 今後の研究の推進方策

1) WNK3 および WNK4 コンディショナルロックアウトマウスを作成中であるので、これらマウスの解析により、腎臓ないし、他臓器における WNK3, WNK4 の役割を確定する。その他、キナーゼにはキナーゼ活性依存性の機能と非依存性の機能があり、キナーゼ活性のない WNK4 のロックインマウスを作成し、ロックアウトマウスと比較においてキナーゼ活性依存性の機能を明らかにする。

2) インスリンが WNK-OSR1/SPAK-NCC 系の制御因子である可能性があり、その確認およびインスリンから WNK キナーゼまでのシグナル伝達経路を明らかにし、高インスリン血症時の食塩感受性高血圧の発症機構に関与するかどうかが検討する。

3) WNK の OSR1/SPAK 以外の基質を探索する。

### 5. 代表的な研究成果

#### 【雑誌論文】(計7件)

Uchida S. Pathophysiological roles of WNK kinases in the kidney. *Pflugers Arch.* 460: 695-702, 2010.

Eto K, Noda Y, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. *J. Biol. Chem.* 285:40777-84, 2010.

Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S. Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393:844-8, 2010.

Vallon V, Schroth J, Lang F, Kuhl D, Uchida S. Expression and phosphorylation of the Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter NCC in vivo is regulated by dietary salt, potassium, and SGK1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 297:704-12, 2009.

Yui N, Okutsu R, Sohara E, Rai T, Ohta A, Noda Y, Sasaki S, Uchida S. FAPP2 is required for aquaporin-2 apical sorting at trans-Golgi network in polarized MDCK cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:1389-1396, 2009.

Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, Lin SH, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum. Mol. Genet.* 18:3978-86, 2009. 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.* 74:1403-9, 2008. Okutsu R, Rai T, Kikuchi A, Ohno M, Uchida K, Sasaki S, Uchida S. AKAP220 colocalizes with AQP2 in the inner medullary collecting ducts. *Kidney Int.* 74:1429-33, 2008.

#### 【学会発表】(計6件)

内田信一. 腎臓での NaCl および K 出納調節における WNK キナーゼの役割. 第 87 回日本生理学会大会, 盛岡, 2010 年 5 月.

内田信一. シンポジウム 輸送体研究の新展開:新しい解析技術による創薬標的の実体と病態の解明. 疾患起因性変異ノックインマウスの解析による腎臓の水・電解質輸送機構の解明. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009 年 3 月.

内田信一. 教育講演 WNK キナーゼによる腎臓での新たな塩分出納調節機構. 第 44 回日本小児腎臓病学会学術総会, 東京, 2009 年 6 月.

内田信一. シンポジウム トランスポーター研究のパラダイムシフト:ヒトシステムの理解を目指して.ヒト遺伝性高血圧症原因遺伝子の機能解析から明らかになった腎臓での新たな NaCl 出納調節系. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月. 内田信一. WNK キナーゼの腎尿管における役割. 第 31 回腎臓セミナー, 東京, 2009 年 8 月.

Uchida S. Basic and Clinical Science Symposium, "Transport regulation by phosphorylation" Phosphorylation-dependent regulation of NCC by WNKs. The 41<sup>st</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November, 2008.

#### 【図書】(計2件)

Uchida S, Sasaki S. Neural roles of CLC chloride channels. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology.* 3rd Edition. pp559-563, Editor: Abel Lajha, Springer, 2009.

太田哲人、内田信一. 電解質輸送体の調節機構についての新たな進展 Annual Review 腎臓 2010, pp245-250, 中外医学社、2010.

#### 【産業財産権】

出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

#### 【その他】

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>