

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570179

研究課題名（和文） 疾患と初期発生に関わる WNK キナーゼシグナル経路構成因子の同定と制御機構の解析

研究課題名（英文） The identification of signal components and analysis of the regulatory mechanisms of WNK protein kinases, the essential genes for early development and pathogenesis of hereditary form of hypertension

研究代表者

森口 徹生 (MORIGUCHI TETSUO)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・助教

研究者番号：40323571

研究成果の概要（和文）：WNK キナーゼファミリーは、多細胞生物間で保存されているセリン／スレオニンキナーゼファミリーである。WNK1 および WNK4 は、ある遺伝性の高血圧症の原因遺伝子として見いだされており、また、WNK1 遺伝子の欠損した生物は発生途上で死に至る。したがって、WNK キナーゼの正確な制御機構を明らかにすることは、器官形成や疾患の機構を理解するのに重要である。本研究において、WNK キナーゼの制御に関与する様々な分子が明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：WNK kinase family that has been recently identified serine-threonine protein kinase family conserved among several multicellular organisms. There are four human WNK family members, and mutations in two of them, WNK1 and WNK4, have been linked to a hereditary form of human hypertension. Moreover, the disruption of the WNK1 gene caused death of organisms. Therefore, the elucidation of WNK signaling network is important upon clarifying the mechanism of morphogenesis, organogenesis and disease. In this research, new interacting factors of WNK were identified by biochemical, molecular biology, and genetic techniques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：WNK、シグナル伝達、疾患、発生、がん

1. 研究開始当初の背景

WNK キナーゼは、多くのプロテインキナーゼで保存されているキナーゼサブドメイン II のリジン残基が存在しないことからその名が付けられた多細胞生物に普遍的に存在するセリン/スレオニンキナーゼである。哺乳類には四つのファミリー分子が存在し、そのうち WNK1 と WNK4 の二つが、偽性低アルドステロン症 II 型と呼ばれる常染色体優性遺伝性の高血圧症の原因遺伝子として海外のグループにより同定された。我々は、WNK キナーゼの標的分子として SPAK/OSR1 というプロテインキナーゼを同定し、さらに SPAK/OSR1 は腎臓に発現するイオン共輸送体 (NCC, NKCC) を標的にすることを見いだした (Moriguchi et al., JBC 280: 42685-42693, 2005)。さらに偽性低アルドステロン症 II 型モデルマウスの研究から、WNK→SPAK/OSR1→共輸送体というシグナル伝達経路の亢進がおこっており、WNK シグナル経路の制御異常が発症機構の一因であることを示唆した (Yang et al., Cell Metab. 5, 331-344)。しかしながら、WNK キナーゼがどのように SPAK/OSR1 を活性化するかを含め、制御機構についてはまだ未解明の部分が多く残されていた。

一方、WNK1 ノックアウトマウスの解析から、WNK1 ホモ欠損個体では腎臓形成が始まるかなり以前に致死になることも見いだしており、腎臓以外での重要な機能が予想されていた。

2. 研究の目的

生化学的・分子生物学的な解析から WNK シグナル経路の制御に関わる新たな因子を探索するとともに、モデル生物を用いた遺伝学的な解析と合わせて、疾患・初期発生の制御機構を個体レベルでも明らかにすることを目

的とする。

3. 研究の方法

1) WNK シグナル制御因子の同定

① WNK1-4 および SPAK, OSR1 各々の分子に flag-tag を付加して HEK293 細胞で過剰発現させ、それぞれの flag-tag 免疫沈降物中に含まれる因子を質量分析法により同定する。この手法で得られた分子について、WNK あるいは SPAK/OSR1 の制御に関わる可能性について培養細胞を用いた実験等により調べる。

② *WNK1* ホモ欠損マウスが致死になる時期の一日前のマウス胚から mRNA を調整し、マイクロアレイ解析により発現に差のみられる遺伝子を同定する。

③ 遺伝学を駆使できる線虫には、WNK ホモログが一つ、SPAK/OSR1 のホモログが一つ存在する。線虫の WNK-1 の機能を欠失した *wnk-1* 変異体は発生途中で停止することを見いだしている。この *wnk-1* 変異体のサブレッサー変異体の取得ならびに原因遺伝子の同定を行う。

2) マウスを用いた疾患・初期発生制御機構の解析

WNK キナーゼによるリン酸化部位である OSR1 の 325 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換した OSR1 (S325D) を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスが偽性低アルドステロン症 II 型の症状を示すか調べる。また、この OSR1 トランスジェニックマウスと *WNK1* ノックアウトマウスを掛け合わせ、その表現型を調べることで初期発生過程における WNK1 と OSR1 の関係についても検討する。

4. 研究成果

1) WNK ファミリー、SPAK/OSR1 結合因子の同

定

質量分析を用いた解析から、WNK1 の結合因子として SPAK, OSR1 以外に他のファミリー分子である WNK3, WNK4 が結合候補因子として同定された。培養細胞中において、WNK1 は他の三つのファミリー分子である WNK2, WNK3, WNK4 と結合すること、この結合は C 末側に存在する coiled-coil 領域を介して行われていることを明らかにした。

また、SPAK, OSR1 の結合因子として、既に結合が明らかになっている WNK ファミリーおよび基質であることが既に明らかになっている共輸送体以外にカゼインキナーゼ CK2alpha が同定された。培養細胞を用いた実験から、SPAK/OSR1 と CK2alpha は細胞内で確かに結合が見られること、さらに CK2alpha は SPAK/OSR1 の C 末領域を基質とし、それはラット SPAK の 394 番目のセリン残基であることが明らかになった。また、CK2alpha によるリン酸化は線虫の系においても認められることから、このメカニズムは種を超えて保存されている可能性が示唆された。

他にもいくつかの因子が得られており、今後の解析により新たなメカニズムが見いだされることが期待される。また、flag-tag 免疫沈降物中に含まれる分子の質量分析による解析という手法により、結合因子ならびにプロテインキナーゼの基質の同定が高い精度で可能であることも明らかになった。

2) マイクロアレイ解析

胎生期 9.5 日の *WNK1* ホモ欠損マウス胚と野生型のマウス胚から mRNA を調整し、マイクロアレイ解析 (GeneChip, affymetrix 社) を行った。発現量が二倍以上、あるいは半分以下になる遺伝子がそれぞれ 20 以上見いだされた。致死の原因と明らかに思われるものは見いだせなかったが、いくつかの候補遺伝

子については解析を継続中である。

3) 線虫 *wnk-1* 変異体のサプレッサー変異取得

線虫 *wnk-1* 変異体を EMS 処理し、L1~L2 期発生停止が回復することを指標にスクリーニングしたところ、六つのサプレッサー変異体を得た。詳細な遺伝子マッピングについては名古屋大学大学院理学研究科の松本邦弘教授、久本直毅准教授のもとで引き続き行われる予定である。

4) OSR1 トランスジェニックマウスの解析

OSR1 (S325D) を恒常的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型を調べたが、高血圧症の優位な症状は見られなかった。マウス B6 系統にバッククロスした *WNK1* ヘテロノックアウトにも明らかな血圧の変化は見られなかったことから、系統の違いによって表現型が異なる可能性も考えられる。一方、*WNK1* ノックアウトマウスと OSR1 過剰発現マウスを交配させ、マウス発生過程について解析した。*WNK1* のホモ欠損個体は通常胎生 9.5~11.5 日目で発生が停止し吸収されてしまうが、OSR1 過剰発現により、12.5~13.5 日まで発生が進行することが認められた (図)。このことから、OSR1 キナーゼは、腎臓におけるイオン調節のみならずマウス発生過程においても WNK キナーゼの重要なエフェクターとして機能することが示された。

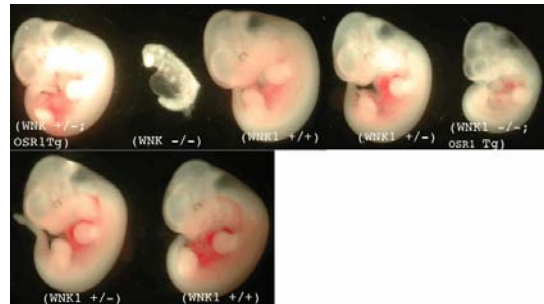


図 11.5 日胚の比較

WNT1 ホモ欠損個体は9.5日胚から発生が停止し、既に吸収されてしまうものが多いが、OSR1 の過剰発現により発生の進行が認められる。

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1件)

Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J, Involvement of LKB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Human Lung Cancer Cells, Lung Cancer, 査読有, vol. 70, 2011, pp.136-145

[学会発表] (計3件)

① 森口徹生、KRAS/LKB1 変異による肺腺がん細胞の EMT とがん幹細胞マーカーの発現誘導、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸

② 森口徹生、Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、横浜

③ Roy BC et al, LKB1 inactivation triggers EMT through the induction of transcriptional repressor ZEB1 in human lung cancer, BMB2008, 2008 年 12 月 9 日、10 日、神戸

[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]

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-mcb/index_j.html

<http://www.proteo.ehime-u.ac.jp/section/07.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森口 徹生 (MORIGUCHI TETSUO)

愛媛大学・プロテオ医学研究センター・助教

研究者番号：40323571