

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790249  
 研究課題名（和文） PHA2型原因遺伝子WNKのショウジョウバエ相同遺伝子の解析  
 研究課題名（英文） The analysis of *Drosophila* WNK, the causative gene of PHA2.  
 研究代表者  
 佐藤 淳（SATO ATSUSHI）  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教  
 研究者番号：30451925

研究成果の概要（和文）：WNK1 及び WNK4 は、偽性低アルドステロン症 II 型（PHAII）と呼ばれる遺伝性疾患の原因遺伝子である。既に、WNK シグナル伝達経路の制御異常が PHAII で見られる高血圧症の発症原因であることが知られているが、身体の奇形や精神発達遅延などの他の病態の発症メカニズムはいまだ解明されていない。そこで、ショウジョウバエを用い、WNK と相互作用する因子の探索を行った結果、新たに WNK の下流で機能する転写因子を単離し、その機能の解析を行った。これらの研究を通して、発症メカニズムの解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：WNK1 and WNK4 have been linked to a hereditary form of human hypertension known as Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII). We identified that the malfunction of this regulation caused PHAII in mouse. However, this misregulation cannot cause all of pathological conditions of PHAII, such as a mental retardation, dental abnormalities and impaired growth. We started to look for the other interacting factor(s) of WNK using *Drosophila melanogaster*, and found the transcription factor, which worked at the downstream of WNK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学・分子病態学

キーワード：WNK、偽性低アルドステイン症、ショウジョウバエ（モデル生物）

## 1. 研究開始当初の背景

偽性低アルドステロン症 (pseudohypoaldosteronism : PHA) は、特

定疾患にも指定されている難病で、その患者は高カリウム血、低ナトリウム血、高レニン血、腎臓からの塩類喪失などの症状から、ア

ルドステロンの分泌不全が疑われるが、実際には血中のアルドステロン濃度は低下していないことから名付けられた。PHAはI型とII型に分けられるが、II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、歯や骨の発育不全、精神発達遅延、身体の奇形を伴う。PHAI型の詳細な発症原因はいまだ特定されていないが、腎臓におけるカリウムの排泄障害によるものが多いと考えられている。PHAI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 (Wilson et al., *Science*, 293: 1107-1112, 2001)、WNK4 が腎臓で塩化ナトリウムの再吸収およびカリウムの排泄を調節するメカニズムも明らかになった (Kahle et al., *Nature Genetics*, 35: 372-376, 2003)。当研究室では、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.*, 280: 42685-42693, 2005)。この経路は、線虫でも進化的に保存されていることが示された (Hisamoto et al., *EMBO Report*, 9:70-75, 2008; Choe and Strange, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293:C915-927, 2007)。また、PHAI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、PHAI型と同様の症状を発症し、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から、PHAI型の発症機構における WNK4 の重要性が確かめられた (Laloti et al., *Nature Genetics*, 38: 1124-1132, 2006; Yang et al., *Cell Metabolism*, 5:331-344, 2007)。

## 2. 研究の目的

WNK1 欠損マウスは胚性致死であることが示され (Zambrowicz et al., *PNAS*, 100: 14109-14114, 2003)、また、WNK1 欠損線虫においても2令幼虫期で致死となることが確認されており (Hisamoto et al., *EMBO Report*, 9:70-75, 2008)、WNK1 の機能は、SPAK/OSR1 経路の制御をするのみではなく、発生・分化にも大きく関与していることが推定された。さらに、PHAI型の患者において歯や骨の発育不全、精神発達遅延などが見られることから、WNK の発生・分化に関わる機能を解析することは、発症機構解明の観点でも重要と考えられる。以上のことから、WNK の発生・形態形成における機能の解明と、PHAI型の発症機構の解明に迫るため、更なる WNK の相互作用因子の同定も含めた

WNK シグナル伝達経路全体の包括的な解明を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

ショウジョウバエにおいて、WNK 相同遺伝子は1つしか存在しない。この遺伝子を DWNK と名付け、DWNK の機能を解析するため、以下のような方法を用いた。

### (1) DWNK 変異体の単離

DWNK 遺伝子近傍にトランスポゾンの一つである P 因子が挿入した系統から、P 因子の再転移の際のゲノム欠損を利用し、DWNK の突然変異系統を単離することを試みた。P 因子の転移酵素をコードする遺伝子をゲノム中に持つハエと目的の P 因子を持つハエを掛け合わせることで、P 因子の再転移を促した。P 因子のマーカの欠如、致死性、DWNK 遺伝子近傍の欠損系統との相補性試験を行い、いくつかの致死系統を得た。PCR、Southern hybridization 等を用いて、欠損領域を決定し、DWNK 欠損変異体を得ることができた。

### (2) モザイク解析

酵母の酵素である Flipase (Flp) とその認識配列である FRT を利用することで、染色体組換えを人為的に起こし、致死変異体の発生分化における表現型を確認できる。DWNK の得られた変異体を用いて、FRT 配列を持つハエと組換えを起こさせることで、DWNK 変異及び FRT 配列の両方を持つハエを作製する。マーカ (GFP 等) と FRT 配列を持つハエを掛け合わせ、Flp を供給することで組換えを誘導し、成虫における表現型、成虫原基におけるマーカ遺伝子の発現の解析を行った。

### (3) DWNK 異所発現系の構築及び強制発現

野生型 DWNK 及びキナーゼ不活性型変異を導入した DWNK、PHAI と同様の変異を導入した DWNK の UAS-Gal4 システムを利用できる異所発現系を構築した。UAS 配列の下流に cDNA をつないだ DNA 断片を P 因子の認識配列部位内に挿入されたコンストラクトを作製し、このコンストラクトと P 因子の転移酵素をコードした DNA と共に、ショウジョウバエの卵に微量注入することで、形質転換体を得た。得られた形質転換体は、微量注入したコンストラクトの異所発現系として、翅特異的、後部領域特異的、神経特異的、上皮組織特異的などの、様々な Gal4 システムと掛け合わせ、成虫での表現型を解析した。

### (4) 培養細胞を用いた解析

#### ①強制発現

CMV プロモーター配列の下流に cDNA くないだコンストラクトを作製し、そのコンストラクトを NIH3T3 細胞に導入することで、強制発現を行い、下流因子の発現、リン酸化などを Western Blotting、RT-PCR 等を用いて解析した。

#### ②siRNA によるノックダウン

siRNA を NIH3T3 細胞に導入することにより、Wnk1 及び Wnk4 を knock-down し、下流因子の発現、リン酸化などを、Western Blotting、RT-PCR 等を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) *DWNK* cDNA の単離

ショウジョウバエのゲノム中には、Wnk 相同遺伝子は 1 つしか存在せず、CG7177 というコンピュータープログラムによる予測遺伝子であった。そこで、実際に発現している *DWNK* を単離するため、成虫原基から単離した RNA を用いて、RT-PCR 及び 5' RACE、3' RACE を行って、*DWNK* 遺伝子の全長を決定した。その結果、*DWNK* はキナーゼ部位では高い相同性を示すものの、C 末などその他の領域では、ほとんど相同領域がなかった。

#### (2) *DWNK* 突然変異体の単離

*DWNK* 遺伝子近傍にはトランスポゾンの一つである P 因子が挿入した系統がいくつか存在し、その中でも EY10165 系統は *DWNK* 遺伝子の 5' UTR 内に挿入している。このことを利用し、我々は EY10165 系統の P 因子を再転移させることで、*DWNK* の突然変異系統を単離することを試み、いくつかの致死系統を得た。PCR 及び Southern hybridization を行い、ゲノムの欠損領域を特定した結果、得られた致死系統の 1 つである EY18 系統が、*DWNK* の null 変異体であった。

#### (3) *DWNK* 突然変異体の解析

(2) で得られた *DWNK*[EY18] は、3 令幼虫期前に致死であった。そこで、この系統の胚を、Peripheral Nervous System を特異的に染める抗体で染色し、神経系の表現型を観察した結果、Axon の伸長欠損、もしくは伸長方向の誘導異常が起きていると推測された。このことは、*DWNK* が、神経の発生、分化に対して、何らかの機能を持っていることを示唆するものである。

また、形態形成における *DWNK* の機能を解析するため、*DWNK* 変異体を用いたモザイク解析を行った。その結果、翅の周辺部に

存在する wing margin と呼ばれる感覚毛の欠損や、背中の感覚毛である剛毛の欠損、腹部領域の発生不全などの表現型が観察され、*DWNK* が形態形成においても、何らかの機能をもっていることが推測された。

#### (4) Wnk シグナル伝達経路の進化的保存

野生型 *DWNK* と共に、ヒトの Wnk1、及びその下流遺伝子であるマウス OSR1、さらには OSR1 のショウジョウバエ相同遺伝子 Fray (Leiserson, et. al., Neuron 28:793-806, 2000) の異所発現系を構築した。*hh-Gal4* により翅後部に発現させたところ、wing vein と呼ばれる翅の支持組織の異所的形成という表現型が、全ての発現系で観察できたことから、Wnk→OSR1 というシグナル伝達経路は、ショウジョウバエからヒトまで広く保存されている経路であることが予測された。また、OSR1/Fray はリン酸化酵素をコードする遺伝子であり、両方が同じ表現型を示したことは、リン酸化酵素の基質も保存されていると考えられることから、その下流もまた保存されていると推測された。

#### (5) 改変型 *DWNK* の異所発現

キナーゼ不活性型 *DWNK* の異所発現系を構築し、様々な Gal4 系統と掛けあわせ、その表現型を解析した。キナーゼ不活性 *DWNK* では、Dominant-Negative として作用するためか、多くの Gal4 系統との掛けあわせで致死となったが、翅特異的に発現させた結果、wing margin の欠損などの表現型が得られ、突然変異体を用いたモザイク解析の結果とも一致するものであった。

#### (6) 下流転写因子

*DWNK* 突然変異体のモザイク解析により、成虫の腹部形成不全という表現型が得られた。そこで、Dominant Negative として機能していると考えられる、キナーゼ不活性型 *DWNK* を腹部で強制発現させると、同様に腹部形成不全という表現型を得た。この腹部形成不全という表現型は、ある転写因子 X をコードする遺伝子の突然変異体の表現型と同じであり、このことから転写因子 X と Wnk とが遺伝的相互作用していることが予想された。そこで、この転写因子 X の異所発現系を構築し、キナーゼ不活性型 *DWNK* と同時に共発現させると、キナーゼ不活性型 *DWNK* による表現型が回復した。このことから、転写因子 X は Wnk シグナル伝達経路の下流で機能している遺伝子であると考えられる。

#### (7) 下流転写因子のほ乳類相同遺伝子

転写因子 X は、ヒト及びマウスにおいても保存されている。マウスにおいて、転写因子

Xは口腔部の形成やアセチルコリン作動性神経の発生において重要な機能を果たしていることが知られている。PHAIの患者において歯や骨の発育不全や精神発達遅延などの症状が現れることを考えると、非常に重要な因子である可能性が高い。そこで、NIH-3T3細胞を用い、ほ乳類における、WNKシグナル伝達経路と転写因子Xの関係調べた。WNKは高浸透圧刺激により活性化されることが知られている。そこで、高浸透圧刺激下での転写因子Xの発現をRT-PCRにより解析したところ、高浸透圧刺激により転写因子Xの発現が上昇することが分かった。この条件下で、siRNAを用いて、PHAIの原因遺伝子であるWNK1及びWNK4の双方をノックダウンすると、転写因子Xの発現が活性化されないため、確かにWNKシグナルにより転写因子Xが活性化されることが確認できた。

以上のように、

PHAI型DWNKを外胚葉系の組織全体に発現させたところ、腹部の発生が進行していないという表現型を得た。この表現型はある転写因子をコードする遺伝子Xの変異体と同様の表現型であった。そのマウスの相同遺伝子では、口蓋の形成やアセチルコリン作動性神経の発生において重要な機能を果たしていることが知られている。PHAIの患者において歯や骨の形成不全や精神発達遅延などの症状が現れることを考えると、WNKの新たなシグナル経路の存在を推定させる。

#### 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)

(1) Sato, A., Ohnishi, E., Goto, T. (these three author contributed equally), Kim, M-S., Iemura, S., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. (2010). Nemo-Like Kinase, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 30: 675-683.

[学会発表] (計3件)

(1) Atsushi Sato. Characterization and functional analysis of the Drosophila Corin Protein. The 9<sup>th</sup> Japanese Drosophila Research Conference, 2009年7月6日～8日, 掛川

(2) Atsushi Sato. Characterization of CRD protein Corin. 50<sup>th</sup> Annual Drosophila

Research Conference, 2009年3月4日～8日, Chicago, USA

(3) 佐藤 淳, CRDタンパク質 Corin の機能解析。第31回日本分子生物学会年会 (BMB2008)、2008年12月9日、神戸

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

佐藤 淳 (SATO ATSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号：30451925

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし