

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06165

研究課題名(和文) WNKによるWntシグナル制御と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) 3,200,000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/HSN2シグナルにおいてGSK3 β や転写因子Lhx8との関係や、HSANII患者で報告されているHSN2変異体を用いた解析から神経分化における役割を詳細に明らかにし、これらのシグナル系によるHSANII発症機構を明らかにした。また、XenopusのE3 ligaseであるMaeA.5による β -カテニン分解制御について解析を進め、canonical Wntシグナル伝達の新たな抑制機構、それに関連する胚発生機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでHSANII原因遺伝子WNKによる、その発症分子機構は全く知られていなかった。本研究により、HSANII患者で報告されているHSN2変異体を用いた解析からWNK/HSN2シグナルにおけるGSK3 β や転写因子Lhx8の神経分化における役割を明らかにすることができた。この発見は、なぜWNK/HSN2変異がHSANII発症を引き起こすのか、その分子機構を示すものである。一方で、Xenopusを用いた胚発生機構の研究からWntシグナルに対するWNKとそのE3 ligaseの関係を明らかにした。これら本研究成果はWNK分子の多様な疾患に対する役割を示す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)：To elucidate the function of WNK in the nervous system, we have analyzed the regulatory mechanism of Wnt signaling by WNK. To clarified in detail the relationship and the role between GSK3 β and the transcription factor, Lhx8 in neuronal differentiation, we performed the analysis using HSN2 mutants reported in HSANII patients. We have elucidated the mechanism of HSANII pathogenesis by these signaling molecules. S, We have also revealed a new mechanism of repression by Xenopus E3 ligase, MaeA.5 in canonical Wnt signaling and in embryonic development.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：WNK Wntシグナル HSANII WNK/HSN2 GSK3

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 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、この経路が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 の発生および神経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。我々は、新たな WNK シグナルの研究を進めることにおいて、これまでにショウジョウバエの WNK 相同遺伝子欠損変異体を樹立し、遺伝学的解析を進め、WNK が Lhx8 遺伝子の発現を介して神経分化に関わることを明らかにし、また、FGF シグナルの下流で WNK4 が頭部形成に関与することを世界で初めて明らかにした (Sato and Shibuya, PLoS One 2013; Shimizu et al., Genes Cells 2013)。さらに、WNK 分子が Wnt シグナル分子である β -catenin の分解制御に関わることを明らかにした (Sato et al., Com. Biol. 2020)。Wnt シグナルは発生をはじめ、多くの疾患発症に関わり、神経分化にも深く関わっていることは広く知られている。

2. 研究の目的

Wnt シグナルにおける destruction complex は主に APC、Axin、Dvl、GSK3 に加え、E3 ligase である Trcp 等の因子群で形成されることが知られている。我々は GSK3 が WNK の結合因子であること、WNK タンパクの消失により β -catenin が GID complex により分解促進されることを明らかにしているが、Wnt シグナルにおける destruction complex と WNK-GID complex との関係は不明となっている。これらの関係をより詳細に明らかにし、特に神経細胞分化に焦点をあて、WNK シグナルと Wnt シグナルとの相互作用を解明する。一方、アフリカツメガエルの系を利用して、神経系組織発生時期での機能解析を進めることにより、Wnt シグナルと WNK シグナル系による神経発生での役割を *in vivo* で明らかにする。また、これらシグナル研究を進めることにより詳細な HSAN の発症機構解明に結びつけ、新たな疾患モデルの作成へも通じる研究とすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) -catenin タンパク分解機構の解析

-catenin タンパクの分解には GSK3 によるリン酸化制御が知られている。我々は WNK 分子が -catenin タンパクの分解に関与することから、destruction complex と WNK 分子、GID complex との関係を生化学的手法を駆使して、これらの関係を解析した。

2) アフリカツメガエル WNK、GSK3 および他の destruction complex 遺伝子の機能解析

アフリカツメガエル初期発生において Wnt シグナルは頭部形成に関与することが知られている。WNK、GSK3、他の Wnt シグナル因子の遺伝子に対する Morpholino antisense oligonucleotides (MO)により、これら遺伝子を特異的にノックダウンし、表現系の観察(特に頭部形成) 神経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。

3) WNK1/HSN2 遺伝子の神経系における機能解明

WNK1 遺伝子には神経特異的に発現するアイソフォーム WNK1/HSN2 が存在し、WNK1/HSN2の変異は遺伝性感覚自律ニューロパチー 型(HSAN)と呼ばれる神経障害を引き起こす。これまで本疾患の患者において多くの変異体が報告されているが、その機能および発症機構は全く分かっていない。そこで、実際の患者で報告されている WNK1/HSN2 変異体の生化学的機能および神経分化に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) HSN2変異体がHSN2および/またはWNK1経路のGSK3 を介して神経分化の調節不全を引き起こす (Sci. Rep., 2022)

WNK1/HSN2遺伝子は神経特異的のサブタイプであり、その変異により遺伝性知覚ニューロパチー (HSANII) の原因遺伝子となる。しかしながら、その発症機構は不明となっていることから、WNK1/HSN2遺伝子の神経系における機能を解明するため、解析を進めた。

HSN2がoxidative stress responsive kinase 1 (OSR1)の活性化とglycogen synthase kinase 3 (GSK3)を介して神経分化を調節していることを見出した。また、HSN2-OSR1およびHSN2-GSK3 シグナル伝達は、コリン作動性神経機能の重要な調節因子であるLIM homeobox 8 (Lhx8)遺伝子の発現を誘導した。これらのことはWNK1と同様にHSN2-OSR1/GSK3 -LHX8経路が神経分化にとって重要であることを示している。さらに、HSANII患者で報告されているHSN2変異体を用いた解析により、STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase (SPAK) およびOSR1の活性化とLHX8遺伝子の発現誘導が抑制されることを見出した。興味深いことに、HSN2変異体は、野生型HSN2とGSK3 の間の相互作用を防ぐことによって神経分化を抑制していることがわかった。これらの結果は、HSN2変異体がHSN2および/またはWNK1経路のGSK3 を介して神経分化の調節不全を引き起こすことを示している。

(2) Xenopus胚発生におけるGID complexの機能解明 (Dev. Growth Dif., 2023)

アフリカツメガエル (Xenopus) のE3 ligaseであるMaeA.Sによる -カテニン分解制御について解析を進めた。その結果、MaeA.Sによる -カテニンのタンパク質の減少が転写レベルではなく、翻訳後の分解によって起こること、MaeA.Sは初期発生において、 -カテニンタンパク質の分解を介して過剰なWnt活性を抑制する遺伝子として機能し、主に頭部形成に関与していること、MaeA.Sが初期発生において頭部形成に必須な遺伝子であること

と、Maealによる β -カテニンの分解が既知の4つのリジン残基以外のリジン残基のユビキチン化を介して起こっている可能性を明らかにした。このmaealによる β -カテニン分解機構のさらなる研究は、canonical Wntシグナル伝達の新たな抑制機構、それに関連する胚発生機構や癌の抑制機構の解明に貢献すると考えられた。

(3) WntシグナルにおけるE3 ligasesの役割解明

WNKによる β -catenin分子の分解機構を既知のWntシグナルと比較するため、E3 ligase分子に焦点をあて、研究を進めた。WNKの制御下で働くE3 ligase (MAEA) とWntシグナル制御に関与するとされるE3 ligase (β -Trcp)、それぞれのノックダウン実験を行い、Wnt刺激下におけるMAEAの重要性を明らかにできた。一方でWntシグナルではGSK3 分子との関係性についても検討した。その結果、Wnt刺激に呼応したGSK3 によるMAEAに対する制御を確認できた。今後、E3 ligase ノックアウト細胞を樹立し、より詳細な分子機構に関する研究を重点的に進め、WNK遺伝子の神経分化における役割を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1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 Goto Toshiyasu, Michiue Tatsuo, Shibuya Hiroshi	4. 巻 64
2. 論文標題 <i>ccr7</i> affects both morphogenesis and differentiation during early <i>Xenopus</i> embryogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 254 ~ 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12790	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 Shimizu Masahiro, Shibuya Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 WNK1/HSN2 mediates neurite outgrowth and differentiation via a OSR1/GSK3 -LHX8 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20271-y	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 Goto Toshiyasu, Shibuya Hiroshi	4. 巻 65
2. 論文標題 <i>maea</i> affects head formation through ? catenin degradation during early <i>Xenopus laevis</i> development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 29 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12828	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 Goto Toshiyasu, Michiue Tatsuo, Shibuya Hiroshi	4. 巻 65
2. 論文標題 <i>ccl19</i> and <i>ccl21</i> affect cell movements and <i>Xenopus</i> differentiation in early development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 175 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12847	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 Shimizu Masahiro、Shibuya Hiroshi、Tanaka Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced O-GlcNAc modification induced by the RAS/MAPK/CDK1 pathway is required for SOX2 protein expression and generation of cancer stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06916-y	査読の有無 有
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 後藤利保、道上達男、澁谷浩司
2. 発表標題 ccr7 affects both morphogenesis and differentiation during early Xenopus embryogenesis.
3. 学会等名 第93回日本動物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 幹容、澁谷浩司、田中信之
2. 発表標題 SOX2の発現とがん幹細胞の発生には、RAS/MAPK/CDK1経路によって誘導されるO-GlcNAc修飾の増大が必要である
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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

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
---------	---------