

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390064

研究課題名(和文) WNKシグナルによる発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of WNK signaling in development

研究代表者

澁谷 浩司(Hiroshi, Shibuya)

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) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：セリン/スレオニンキナーゼWNK1及びWNK4は偽性低アルドステロン症II型(PHAI)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同定された。新たなWNKシグナルに關与する因子の探索を行い、解析を進めた。

ショウジョウバエのWNKの解析から、WNKシグナル経路の新たな下流因子としてAwhを単離し、そのほ乳類の相同因子Lhx8が進化的にも高度に保存されているWNK Lhx8/Awhという新規のシグナル伝達経路の存在を見出した。さらに、このWNKシグナル伝達経路が神経分化に關与しているという新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：WNK kinase family is conserved among many species and regulates SPAK/OSR1 and ion co-transporters. Some mutations in human WNK1 or WNK4 are associated with Pseudohypoaldosteronism type II, a form of hypertension. Here, we identify a new target gene in WNK signaling, Arrowhead and Lhx8, which is a mammalian homologue of Drosophila Arrowhead. In Drosophila, WNK was shown to genetically interact with Arrowhead. In Wnk1 knockout mice, levels of Lhx8 expression were reduced. Ectopic expression of WNK1, WNK4 or Osr1 in mammalian cells induced the expression of the Lhx8. Moreover, neural specification was inhibited by the knockdown of both Wnk1 and Wnk4 or Lhx8. Drosophila WNK mutant caused defects in axon guidance during embryogenesis. These results suggest that WNK signaling is involved in the morphological and neural development via Lhx8/Arrowhead.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：WNK PHAI ショウジョウバエ Lhx8/Awh 細胞内シグナル 神経分化 標的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

偽性低アルドステロン症 (PHA) は、特定疾患にも指定されている難病で型と型に分けられ、型の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。PHA 型の原因遺伝子として、プロテインキナーゼ WNK1 および WNK4 が同定され、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。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。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、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から、PHA 型の発症機構における WNK4 の重要性を明らかにした。

一方、WNK1 欠損マウスは胚性致死であることが示され、我々もこれを確認している。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、WNK1 の機能は、腎臓において 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、PHA 型の患者において歯や骨の発育不全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、PHA 型の発症機構解明の観点でも重要と考えられる。当研究室は、新たな WNK シグナルの研究を進めることにおいて、研究成果、実験材料、実験技術のいずれにおいても世界的に優位な位置を占めている。WNK ファミリー遺伝子は、線虫からショウジョウバエ、ほ乳類、植物に至るまで多細胞生物に広く保存されていることから、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを利用した系を新たに導入した。これらは早期の胎生致死のため機能解析が極めて難しい WNK 遺伝子ノックアウトマウスより有利であると考えられる。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、さらには WNK 遺伝子欠損マウスと野生型マウスとのマイクロアレイ解析から WNK が Lhx8 遺伝子の発現に関わることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

単離したショウジョウバエの WNK 相同遺伝子の遺伝学的解析 (突然変異体や異所発現系を用いた機能解析) を通じて、結合因子として単離した MAPK や標的遺伝子としての単離できた Lhx8 との関係性を明らかにし、発生・分化における新たな WNK シグナルの機能を特定する。また、様々な変異を導入した

WNK の異所発現系の構築及び解析を進め、WNK の機能から関連することが予測されるシグナル伝達系との遺伝学的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、これらの因子に加え、WNK 結合因子として単離した MAPK について初期発生時期での機能解析を進めることにより、さらに新たな WNK シグナル系が明らかにできると考えている。最終的には、これらの WNK シグナル系と他のシグナル系とのクロストーク解析することで、これまで単純に WNK1 SPAK/OSR1 共輸送体というシグナル系にしか注目していなかった WNK シグナルのより広範囲、詳細な解析を進める。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ WNK の変異体及び異所発現系の解析

これまでに作製してきたショウジョウバエ WNK 突然変異体及び異所発現系ショウジョウバエを用いた WNK の機能解析を、以下のように詳細に行う。突然変異体を用いたモザイク解析を行い、成虫における表現系を解析する。特に、翅の発生過程は、これまでに様々な解析がなされ、多くのシグナル伝達経路が関わっていることが知られているため、翅における表現型を中心に、関連する機能を持つ遺伝子群の発現の変化を、成虫原基において解析し、WNK の機能を予測した。また、関連する機能を持つ遺伝子群の突然変異体との相互作用を解析し、シグナル伝達経路内での位置づけを行った。

(2) ショウジョウバエ Awh(Lhx8) の解析
標的遺伝子である Lhx8 のショウジョウバエ相同遺伝子 Awh の変異体は既に報告されていることから、これらを手に入れた。WNK 変異体とのかけ合わせにより遺伝学的解析を進め、相互作用を明らかにした。

(3) SPAK/OSR1 相同遺伝子 Fray との相互作用の解析

ショウジョウバエ SPAK/OSR1 相同遺伝子である Fray と WNK との相互作用の可能性を確かめるため、WNK, Fray の二重変異体と、WNK, Fray の単独変異体の表現型とを比較し、相互作用の有無を含め、解析した。また、ショウジョウバエ Awh との遺伝学的相互作用についても解析を進め、これら分子間の上下関係を明らかにする。

(4) WNK と Lhx8 の機能解析

培養細胞系を用い、上記遺伝学的解析から明らかになった仲介分子の生化学的解析を進め、WNK と Lhx8 分子間のシグナル系を確立した。

(5) 標的遺伝子 Lhx8 の解析

培養細胞系を用い、WNK を活性化できる浸透圧刺激により Lhx 遺伝子の発現を検討した結果、発現誘導できることを明らかにしていた。これを踏まえ、WNK, SPAK/OSR1 等で Lhx8 遺伝子の発現が誘導できるかを検討した。

4. 研究成果

セリン/スレオニンキナーゼ WNK (with no lysine(K)) ファミリーは、線虫・ショウジョウバエからほ乳類に至るまで保存されており、ほ乳類には4つのWNKファミリー分子が存在する。その内、WNK1及びWNK4は偽性低アルドステロン症II型(PHAI1)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同定されている。当研究室において、WNK SPAK/OSR1 Na,K,Cl 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、その制御異常がPHAI1で見られる高血圧症の発症原因の一つになっていることを示すことができた。しかしながら、このシグナル経路の制御異常が、PHAI1で見られる他の病態、歯や骨の発育不全や精神発達遅延などの原因とは考えにくく、他のシグナル経路の存在が予想された。そこで我々は、新たにショウジョウバエを用いて、WNKと相互作用する因子の探索を行うことにし、解析を行っている。

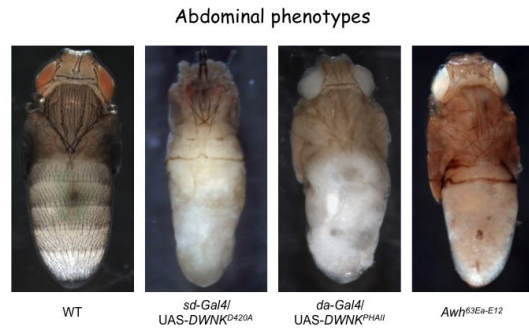
(1) WNKシグナル伝達経路の進化的保存

ショウジョウバエのWNK(DWNK)及びその下流因子の相同因子であるFrayが、ほ乳類のWNK及びOSR1と同様の相互作用を持つかを調べたところ、DWNK及びFrayも培養細胞中で相互作用し、DWNKはFrayをリン酸化していた。また、DWNK及びFray、ほ乳類のWNK1及びOSR1の異所発現系を用いて、翅後部に異所的に発現させたところ、全ての発現系において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観察された。以上のことから、WNK OSR1というシグナル伝達経路は、ショウジョウバエでも保存されている経路であることが予測された。当研究室による、マウスや線虫における結果と合わせて考えると、WNKシグナル伝達経路は進化的に広く保存されていると考えられた。

(2) 下流転写因子

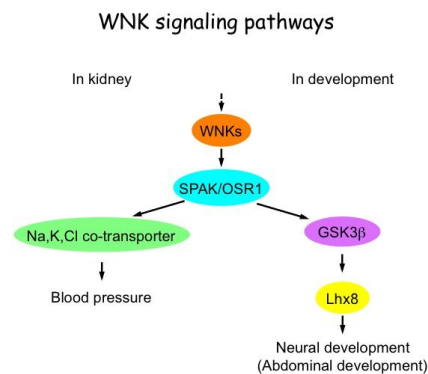
DWNK変異体のモザイク解析、及び、Dominant Negativeとして機能するキナーゼ不活性型DWNKを腹部で異所発現させると、腹部形成不全という表現型が観察された。Arrowhead(Awh)変異体が同様の表現型を示すことから、AwhとDWNKとの遺伝的相互作用が予想された。キナーゼ不活性型DWNKとAwhを腹部で異所的に共発現させると、キナーゼ不活性型DWNKによる表現型が回復したことから、さらにDWNK変異体の表現型がAwhの異所発現により回復したことから、AwhがDWNKの下流で機能する因子であることが予測された。また、胚期において、DWNK変異体では、腹部原基でのAwhの発現が消失していた。以上の結果から、AwhはDWNKの下流で機能している遺伝子であると考えられた。

また、AwhはLhx8として脊椎動物においても高度に保存されている。NIH3T3細胞を用い、WNKシグナル伝達経路とLhx8の関係を調べたところ、高浸透圧刺激によりLhx8の発現が経時的に上昇していた。この条件下で、siRNA



を用いて、WNK1及びWNK4の双方をノックダウンすると、Lhx8の発現上昇が見られなかった。また、WNK1、WNK4、さらには下流因子であるOSR1の強制発現において、Lhx8の発現上昇が見られた。以上の結果から、Lhx8は、ほ乳類においてWNKシグナル伝達経路の標的因子であることが分かった。また、Lhx8はアセチルコリン性神経の分化に関わっていることから、Neuro2A細胞を用いて、WNKシグナル伝達経路との関連を解析した。Lhx8の発現が、Neuro2A細胞の分化に伴い、誘導されていたが、WNK1及びWNK4の双方をノックダウンすると、Lhx8の発現が誘導されず、Neuro2A細胞においてもLhx8はWNKシグナル伝達経路の下流因子として機能していた。また、WNK1及びWNK4の双方のノックダウンにより、分化に伴う神経突起の伸長が抑えられるという表現型が見られ、さらにはアセチルコリン性神経の分化マーカーの発現も抑制されていた。このことは、WNKシグナル伝達経路が、神経分化にも関与しているという新たな発見であった。また、PHAI1の患者において高血圧以外にも見られる精神発達遅延という症状を考慮すると、WNKシグナル伝達経路は、Lhx8を介して、発症に関与する可能性を示唆する初めての結果である。

このように、WNKシグナル伝達経路は、線虫からショウジョウバエ、ほ乳類に至るまで広く保存されたシグナル伝達経路であり、発生



及び分化の様々な過程において関与が明らかになってきた。しかしながら、WNKの活性化機構、シグナル伝達経路の詳細な機構などはまだ未解明であり、今後も解析を続けていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Goto, T., Sato, A., Shimizu, M., Adachi, S., Satoh, K., Iemura, S., Natsume, T. and Shibuya, H. (2013). IQGAP1 protein regulates nuclear localization of β -catenin via importin- β 5 in Wnt signaling. **J Biol Chem.** 288, 36351-36360. 査読有

Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK Signaling Is Involved in Neural Development via Lhx8/Awh Expression. **PLoS One** 8, e55301. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0055301.

Shimizu, M., Goto, T., Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK4 is an essential effector of anterior formation in FGF signaling. **Genes Cells** 18, 442-449. 査読有

DOI: 10.1111/gtc.12048.

Goto, T., Sato, A., Shimizu, M., Adachi, S., Satoh, K., Iemura, S., Natsume, T. and Shibuya, H. (2013). IQGAP1 functions as a modulator of Dishevelled nuclear localization in Wnt signaling. **PLoS One** 8, e60865. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0060865.

DOI: 10.1074/jbc.M113.520528.

Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A. and Matsumoto, K. (2011). Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. **Nat Commun.** 2, 158. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

後藤利保、佐藤淳、足立俊吾、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司 IQGAP1 による β -catenin の核内移行の調節機構の解析 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸、ポスター発表

澁谷浩司 Wnt シグナルにおける DVL と β -catenin の核移行制御 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月、横浜、シンポジウム

佐藤淳、澁谷浩司 A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月、福岡、口頭発表及びポスター発表

佐藤淳、澁谷浩司 A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜、口頭発表及びポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)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

(2)連携研究者

佐藤 淳 (SATO, Atsushi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：30451925

後藤 利保 (GOTO, Toshiyasu)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：00517518