

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460386

研究課題名(和文) PHA2、HSAN2Aの原因遺伝子であるWNKの神経系における機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of WNK in neural system, which is a causative gene of PHAII and HSAN2A

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・助教

研究者番号：30451925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：進化的に高度に保存されているWNKは、偽性低アルドステロン症II型(PHAII)及び遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチータイプ2A型(HSAN2A)の原因遺伝子であるが、神経系における発症機構は未だ明らかではない。そこで、WNKの神経系における機能の解明を試みた。ショウジョウバエを用いた新規相互作用因子の探索から、神経分化において重要なNotchシグナル伝達経路が、WNKと相互作用することを見出した。マウスの神経芽細胞腫由来の培養細胞においても、WNKがNotchシグナル伝達経路を正に制御していたことから、より詳細な制御機構の解明を行い、PHAII及びHSAN2Aの発症機構の解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：WNK is Ser/Thr kinases and is conserved among many species. In human, WNK is known as a causative gene of Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) and Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2A (HSAN2A). However, pathogenic mechanisms of both diseases are still unknown. For analyzing these, I started the functional analysis of WNK in neural system. From the screening of new interacting factor(s) of WNK using Drosophila, I found that WNK was involved in Notch signaling pathway, which played very important roles of the neural development. In the neural cultured cells, WNK positively regulated Notch signaling pathway. For studying the detail pathogenic mechanisms, I started more detail analysis of this interaction between WNK and Notch signaling pathway.

研究分野：分子発生遺伝学

キーワード：WNK 偽性低アルドステロン症II型 遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチータイプ2A型

1. 研究開始当初の背景

Ser/Thr キナーゼ WNK (With No Lysine) 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進化的に高度に保存されたキナーゼファミリーであり、ほ乳類では4種類の WNK が存在する。近年、特定疾患にも指定されている偽性低アルドステロン症 (pseudohypoaldosteronism) II 型 (PHAI) の原因遺伝子として、WNK1 および WNK4 が単離された (Wilson et al., Science, 293:1107-12, 2001)。PHAI 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、精神発達遅延などを伴う。高血圧症に関しては、当研究室を含むいくつかの研究室から、WNK1 SPAK/OSR1 Na,K,Cl 共輸送体というシグナル伝達経路が存在し、この制御機構の異常が腎臓でのナトリウムの再吸収、カリウムの排泄に重要なことが示され、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は PHAI 型と同様の高血圧症を示したことから、WNK による SPAK/OSR1 を介した共輸送体の制御が発症に重要であることが分かっている (Kahle et al., Nature Genetics, 35:372-6, 2003; Moriguchi et al., J. Biol. Chem., 280:42685-93, 2005; Lalioti et al., Nature Genetics, 38:1124-32, 2006; Yang et al., Cell Metabolism, 5:331-44, 2007)。

一方、精神発達遅延等の他の病態に関しては、発症機構が何も分かっていた。そこで、我々は、ショウジョウバエ WNK (DWNK) を用いた解析から、WNK1/WNK4/DWNK SPAK/OSR1/Fray Lhx8/Awh という、進化的に高度に保存された WNK シグナル伝達経路を見出し、この伝達経路がアセチルコリン性神経の分化に非常に重要な働きをしていることを示した (Sato and Shibuya, PLoS One, 8:e55301, 2013)。Lhx8 は、アセチルコリン性神経の分化のみならず、口蓋部の形成にも非常に重要な働きをしていることから、WNK が歯や骨の発育不全、精神発達遅延等の高血圧症以外の病態にも関与していることを示す、初めての結果であった。

また、遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー (hereditary sensory and autonomic neuropathy: HSAN) タイプ 2A 型 (HSAN2A) の原因遺伝子として単離されていた HSN2 遺伝子が、WNK1 のスプライシング多型であることが明らかになり (Lafreniere et al., Am. J. Hum. Genet., 74:1064-73, 2004; Shekarabi et al., J. Clin. Invest., 118:2496-505, 2008)、詳細な発症機構の解明にはいまだに至っていないながらも、WNK1 が HSAN2A の原因遺伝子でもあることが明らかになった。また、PHAI における WNK の変異が機能獲得型であったのに対し、HSAN2A においては機能欠

失型であったことから、同じ遺伝子が原因であるにも関わらず、違う病態が現れていることが明らかになった。さらに、PHAI も HSAN2A も共に、神経系への関与が見られることから、WNK が神経系で重要な機能を持っていることが容易に想像できる。前述の通り、我々は、Lhx8 を介した WNK の神経分化への関与を明らかにしており、その制御機構の詳細を解明することで、PHAI 及び HSAN2A の発症機構の解明に迫りたいと考えている。

2. 研究の目的

偽性低アルドステロン症 型及び遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチータイプ 2A 型の発症機構の解明のために、WNK の神経系における機能解析を行う。特に、神経分化に重要な Notch シグナル伝達経路が、WNK シグナル伝達経路と相互作用する可能性を示す結果を得ていたことから、その制御機構の詳細を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

WNK シグナル伝達経路の機能を探索するため、神経芽細胞種由来の培養細胞である Neuro2A 細胞を用いて、実験を行うと共に、ショウジョウバエを用いた新規 WNK 関連因子のスクリーニングを行うために、以下のような方法を用いた。

(1) 培養細胞系を用いた解析

siRNA を用いたノックダウン
培養細胞に siRNA を導入することにより、様々な遺伝子を 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。

強制発現

CMV プロモーター配列の下流に cDNA がないダコンストラクトを作製し、そのコンストラクトを培養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。

免疫沈降

目的の2種のタンパク質を強制発現させた細胞の細胞抽出液に、目的タンパク質に付与した分子タグの抗体を用いて、免疫沈降を行った。分子タグには、Flag、Myc、HA、T7などを適宜使用し、それに対応する抗体を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降により得られたサンプルは、Western blottingを行い、それぞれの抗体を用いて、検出した。

(2) ショウジョウバエを用いたスクリーニング

ショウジョウバエへの突然変異導入試薬として、Ethyl methanesulfonate (EMS)を用いた。羽化後3日の雄の成虫20匹を、6時間、飢餓状態においた後、1%スクロース溶液にとかしたEMSを16時間、食べさせた。その後、未交尾の雌20匹と交配することで、変異の入った精子をなるべく多く回収し、次世代の成虫を用いて、スクリーニングを行った。

4. 研究成果

WNKの神経細胞での機能を特定するために、ショウジョウバエを用いて、遺伝的相互作用する因子の探索を行っていた。その結果、Notchシグナル伝達経路に関わる因子が複数得られたことから、WNKシグナル伝達経路とNotchシグナル伝達経路が相互作用する可能性が考えられた。Notchシグナル伝達経路は、神経分解において、非常に重要な機能を果たしているシグナル伝達経路であり、そのシグナル伝達経路をWNKシグナル伝達経路が制御しているのであれば、その機構を解明することで、PHAI1及びHSAN2Aの発症機構の解明にも繋がると考えられる。そこで、この相互作用の詳細を解明すべく、研究を行った。

(1) WNKシグナル伝達経路とNotchシグナル伝達経路の相互作用

エピスタシスアッセイ

Notchの構成的活性化型であるNICDを、Neuro2A細胞にて、強制発現させることで、Notchシグナル伝達経路が活性化し、Hes5やHeyLなどの下流遺伝子の発現が上昇する。このような条件下にあるNeuro2A細胞に対して、WNK1及びWNK4のsiRNAを用いて、ノックダウンした。その結果、NICDにより活性化されていた下流遺伝子が、WNKのノックダウンにより、再度抑制されていた。また、WNK1の強制発現させることで、Notchシグナル伝達経路の下流因子の発現を活性化することができたことから、WNKは、Notch

WNKとNotchシグナル伝達経路の相互作用

	Neuro2A cells				
	pRK5		NICD		
Control siRNA	+	-	+	-	
siWnk1+siWnk4	-	+	-	+	
	[Western blot bands]				Hes5
	[Western blot bands]				HeyL
	[Western blot bands]				N
	[Western blot bands]				Wnk1
	[Western blot bands]				Wnk4
	[Western blot bands]				GAPDH

シグナル伝達経路の正の制御因子として機能していることが推測できた。

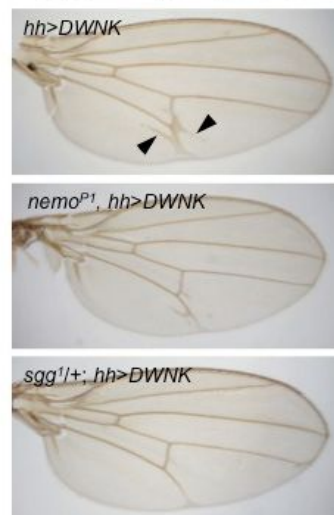
Notchシグナル伝達経路の構成因子とWNKの相互作用

NICDによる活性化を、WNKのノックダウンにより抑制できたことから、WNKは、Notchシグナル伝達経路の構成因子の内、細胞内因子に作用することで、シグナルを制御していると考えられた。そこで、Notchシグナル伝達経路の構成因子の内、細胞内に存在する、NICD、MAMAL1及びRBPjとWNKが複合体を形成するかを調べてみた。強制発現させた細胞から、免疫沈降を行ったが、構成因子のいずれとも、WNKは複合体を形成していなかった。

(2) ショウジョウバエを用いた新規相互作用因子の探索

ショウジョウバエのWNKであるDWNKを翅の後部領域のみで異所的に発現させると、5番目の翅脈の周辺に、異所的な翅脈が形成される(下図の黒矢印参照)。この表現型は、WNKに関連する因子の変異と掛け合わせると、異所的な翅脈の形成が抑制させることを見出していた(Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK Signaling Is Involved in Neural Development via *Lhx8/Awh* Expression. *PLoS One*, **8**: e55301. doi: 10.1371/journal.pone.0055301)。そこで、この抑制を指標に、EMSでゲノムにランダムに変異を挿入することで、スクリーニングを行った。

新規WNK相互作用因子



1次スクリーニングにより、176系統の抑制系統を得たが、2次スクリーニングを行い、偽陽性を排除したところ、合計26系統の抑制系統を得ることができた。その中でも、最も表現型の抑制度が強かった2系統を優先して、原因遺伝子の探索を行ったところ、

nemO (ほ乳類の NLK の相同遺伝子)及び *sgg* (ほ乳類の GSK3 の相同遺伝子)を得た(上図参照)。双方共に、Notch シグナル伝達経路の制御因子であることが知られていたことから、WNK-NLK もしくは WNK-GSK3 という相互作用により、Notch シグナル伝達経路を制御している可能性が考えられた。

(3) WNK 及び NLK

WNK と NLK の相互作用

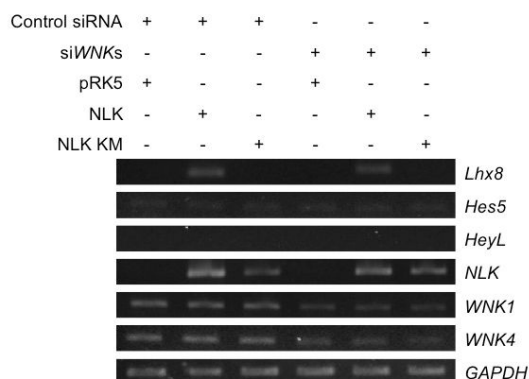
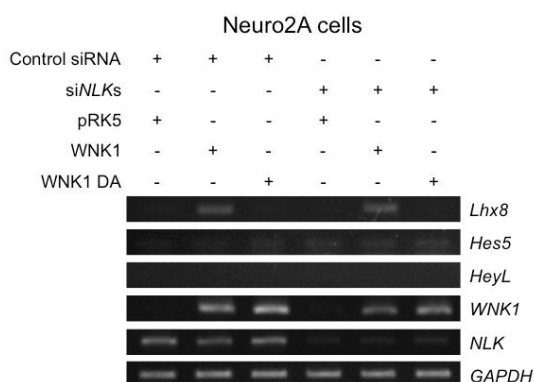
WNK と NLK が複合体を形成している可能性を考え、Neuro2A 細胞で WNK および NLK を強制発現させ、細胞抽出液から免疫沈降を行った。その結果、WNK と NLK は、培養細胞中において複合体を形成していることが明らかになった。

エピスタシスアッセイ

WNK、NLK 共にリン酸化酵素であることから、どちらかがリン酸化を通して、活性を制御している可能性を考え、エピスタシスアッセイを行った。Neuro2A において、WNK1 を強制発現させることで、下流因子 *Lhx8* の発現が活性化する。このような条件下で、NLK を siRNA を用いて、ノックダウンしたが、*Lhx8* の発現は変化しなかった。

一方、NLK を Neuro2A 細胞にて強制発現したところ、わずかながら *Lhx8* の発現が上昇した。そこで、WNK1 及び WNK4 を siRNA によりノックダウンしたところ、*Lhx8* の発現

WNKとNLKの相互作用



が抑制された。

以上のことから、NLK は、WNK の上流因子として機能していると考えられた。

in vitro キナーゼアッセイ

NLK がリン酸化酵素であり、WNK と直接複合体を形成し、上流因子として機能していると推測できたことから、NLK が WNK をリン酸化することで、WNK の活性を制御している可能性が考えられた。そこで、Neuro2A 細胞から NLK 及び酵素不活性型である NLK [KM]、WNK1 を単離し、*in vitro* でキナーゼアッセイを行ったところ、NLK が WNK1 を直接リン酸化していることが明らかになった。

神経分化の影響

Neuro2A 細胞は、レチノイン酸を添加することで、神経へと分化する。WNK は、分化以前での機能は未だ不明だが、分化以後では *Lhx8* の発現を維持し、アセチルコリン性神経への分化を促していることが分かっている。そこで、NLK がアセチルコリン性神経への分化にも作用しているかを調べるため、レチノイン酸の添加前後で、NLK と WNK の相互作用を調べた。その結果、分化以前は、上記のように NLK は WNK の活性を促進すると推測される結果を得ていたが、分化以後においては、NLK は WNK を抑制的に制御している可能性を示す結果を得た。NLK は、Notch シグナル伝達経路に対しては、常に抑制的に機能していることが知られており、分化以前、以後で変化しない。WNK も Notch シグナル伝達経路に対して、分化以前、以後で促進的に機能することに変化は無かった。以上から、WNK と NLK は相互作用しているものの、Notch シグナル伝達経路に対しては、独立に作用していると考えられるという結果になってしまった。

(4) WNK と GSK3

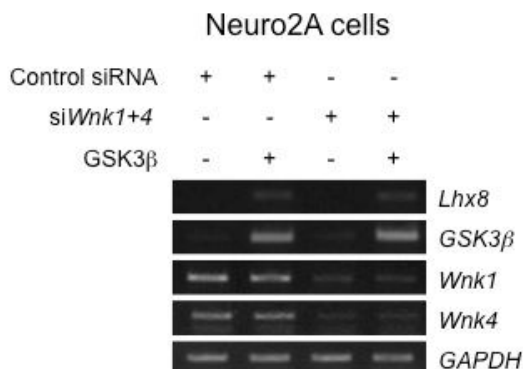
WNK と GSK3 の相互作用

NLK 同様、WNK と GSK3 が複合体を形成している可能性を考え、まず、Neuro2A 細胞を用いて、免疫沈降を行った。その結果、WNK と GSK3 は、複合体を形成していることが明らかになった。

エピスタシスアッセイ

GSK3 もリン酸化酵素であることから、エピスタシスアッセイを行い、WNK との上下関係を明らかにしようと試みた。Neuro2A 細胞に GSK3 を強制発現させると、わずかながら *Lhx8* の発現が上昇していた。この際に WNK1 及び WNK4 を siRNA によりノックダウンしたが、*Lhx8* の発現に変化は無かった。

Neuro2A 細胞において、Lhx8 の発現は WNK 依存的であることから、この結果は、GSK3 が WNK の下流で機能していることを示していた。



in vitro キナーゼアッセイ

WNK もリン酸化酵素であること、WNK と GSK3 が複合体を形成できること、GSK3 が WNK の下流で機能していたことから、WNK が GSK3 をリン酸化して、活性制御を行っている可能性が考えられた。そこで、Neuro2A 細胞から WNK1、及び酵素不活性型 WNK1 [DA]を単離し、大腸菌で GSK3 タンパク質を発現、精製し、in vitro キナーゼアッセイを行った。残念ながら、WNK1 は、GSK3 を直接リン酸化しなかったことから、WNK1 と GSK3 の間には、更に別の因子が介在していることを示している。

(5) まとめ

PHAI1 及び HSN2A の神経系における発症機構の解明のため、神経系における WNK の機能解析を行った。ショウジョウバエを用いた WNK の新規相互作用因子の探索から、WNK が Notch シグナル伝達経路と相互作用していることを見出した。Notch シグナル伝達経路は神経系の分化に非常に重要であることから、この制御機構を明らかにすることで、PHAI1 及び HSN2A の発症機構の解明に繋がると考えた。

さらなる新規相互作用因子の探索から、NLK 及び GSK3 を得た。両方共に Notch シグナル伝達経路の制御因子であったことから、当初は NLK-WNK-GSK3-Notch というシグナル伝達経路を想定し、その詳細を明らかにしようと、WNK-NLK の相互作用から解析を開始した。しかし、残念ながら、WNK と NLK は、Notch シグナル伝達経路に対して、独立に機能していると考えられる結果を得た。現在は、WNK-GSK3 の相互作用の解明を行っている。本研究の当初の目標である、発症機構の解明には至らなかったが、今後も WNK-GSK3-Notch という相互作用の詳細を解明し、

発症機構の解明へと繋げていきたいと考えている。

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) Shimizu, N., Ishitani, S., Sato, A., Shibuya, H. and Ishitani, T. (2014). Hipk2 and PP1c cooperate to maintain Dvl protein levels required for Wnt signal transduction. *Cell Reports*, **8**: 1391-1404. DOI: [10.1016/j.celrep.2014.07.040](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.040) 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

(1) Atsushi Sato and Hiroshi Shibuya. WNK signaling is involved in neural development via Lhx8/Awh. The 11th Japanese Drosophila Research Conference 2014 年 6 月 金沢歌劇座(石川県金沢市)

[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

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

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・助
教
研究者番号：30451925

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし