

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249032

研究課題名(和文) 新たな腎臓膜輸送体制御法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy to regulate renal channels and transporters

研究代表者

佐々木 成 (SASAKI, SEI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60170677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,300,000円、(間接経費) 10,890,000円

研究成果の概要(和文)：対象とする輸送体分子(AQP水チャネル、CLCクロライドチャネル、SLC12A輸送体)のさらなる制御機構の解明と病態への関与を明らかにし、それに基づいた新たな膜輸送体制御機構を確立することを目的として本研究は開始された。その結果、AQP研究においては近位尿細管小胞体に存在するAQP11の欠損が嚢胞腎原因遺伝子PC-1の糖化と細胞膜局在を障害することで嚢胞腎を引き起こすという新たな分子機構を解明し、CLC研究においては変異バーチンの小胞体係留を軽減する薬剤を同定し、WNK研究ではWNKキナーゼ系阻害薬の単離に成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study was to clarify novel regulatory mechanisms of renal transporters and channels, especially AQP water channels, CLC chloride channels, and SLC12A transporters, and to try to develop new strategy to treat diseases caused by the dysregulation of these transporters and channels. We clarified the molecular pathogenesis of renal cyst formation caused by the deletion of AQP11, identified the agents to rescue endoplasmic reticulum (ER)-retained disease-causing mutant Barttin, and isolated some chemical compounds that inhibited WNK-OSR1/SPAK-SLC12A signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学 塩分感受性高血圧 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

腎臓は生体内での水・電解質環境維持にとって最も重要な臓器である。腎臓の中でその機能を最終的に担うのは、腎臓の尿細管各部位における水・電解質輸送体分子である。本研究者のグループは、1990年代はじめから腎臓の膜輸送体遺伝子の同定を行い、AQP水チャネル(*Nature* 1993, *PNAS* 1994, *JBC* 1997など)、CLCクロライドチャネル(*JBC* 1993/1994/1996, *Neuron* 1994など)などを数多くのチャネル分子をクローニングし、その生理的役割を明らかにすべく腎臓内での発現部位の同定や機能解析(*JCI* 1995, *Kidney Int* 1995, *JASN* 1997, *AJP Renal* 1997, *JASN* 1997, *Science* 1997, *AJP Renal* 1999など)、またヒトでのこれら輸送体病の発見(*Am J Hum Genet* 2001)や遺伝子改変マウス作成(*Nature Genet* 1999, *AJP* 2005, *JBC* 2005, *PNAS* 2005)によって生体内で役割の解明を行ってきた。近年は、対象をこれらAQPやCLCチャネル以外にも尿素輸送体(*MCB* 2005)や他のナトリウム輸送体(SLC12A3など)にも広げ、このような研究を通して腎臓膜輸送体分子自体に関する情報は飛躍的に増加してきた。その後、輸送体分子自体の研究から、その周辺で輸送体分子を制御する因子の解析へと研究は発展し、輸送体分子が単独ではなく複合体やそのおかれている細胞内の場と相互作用して機能し、この事こそが生体内で各輸送体分子が外界の状況に応じて緻密に制御され機能する上で非常に重要であるというエビデンスを得ている(*Cell Metab* 2007, *JCB* 2008, *Hum Mol Genet* 2009)。このように、我々は世界でいち早くこの膜輸送体分子研究に分子生物学を導入し、その後も遺伝子改変動物作出や最先端の蛋白相互作用解析技術を導入し、研究対象としている輸送体分子について、それらの生理的、病態生理的に重要な制御機構を明らかにすることができた。今後も引き続きまだ明らかでない病態生理の解明は重要な課題であるが、既にある程度制御機構が判明したものについては、その機構を利用して外から輸送体を制御する方策の開発(阻害薬開発など)ないし遺伝子変異にて発生している病態を治療する方策を明らかにする事が、次のステップの研究として求められていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、対象とする膜輸送体(AQP水チャネル、CLCクロライドチャネル、SLC12A輸送体)の制御機構を生体レベルで明らかにしながら、明らかになった制御機構を利用して、それを外から人為的に制御する道を探ることにある。このことは腎臓でのNaCl出納調節に関わる輸送体(SLC12A3やCICクロライドチャネル)を研究対象とすれば、高血圧症の治療に直に結びつく研究となり、水の出納調節に関わる輸送体(AQP2)を研究対象とすれば、尿崩症や臨床の現場でもっとも頻度の多い問題である水利尿不全(浮腫、心不全、腹水)の病態を克服する新薬の開発につながる研究となる。

3. 研究の方法

各輸送体のノックアウトマウスや病原性の変異を持つノックインマウスを作成して解析し、病態生理を明らかにする。一方で、ミスセンス変異により小胞体に係留されてしまう膜蛋白を形質膜へ発現できるようにする薬剤を、パーチンのR8L変異を発現する細胞やノックインマウスを用いて、化合物ライブラリーをスクリーニングする事で探索する。またSLC12A輸送体を制御するWNK-OSR1/SPAKキナーゼシグナルにおいては、WNKとOSR1/SPAKキナーゼの結合を阻害する薬剤を、蛍光相関分光を用いた新規のスクリーニング系にて行う。

4. 研究成果

1) AQP11ノックアウトマウス(AQP11-KO)の腎嚢胞形成機序の解明。
AQP11ノックアウトマウスは嚢胞腎を来すことが知られていたが、その分子機序は不明であった。AQP11の細胞内や組織での存在部位もよい抗体がないために未同定であった。そこでBACを用いたAQP11トランスジェニックマウス(AQP11-TG)を作成し、その際にAQP11にHAのタグを付与して、HA抗体での観察を可能にした。このAQP11-TGはAQP11ノックアウトマウスと交配すると嚢胞腎の形質が相補されることから、生体内でも正しく機能している事が示された。HA-AQP11は腎臓以外の臓器にも発現していたが、腎臓では近位尿細管の小胞体に局在していた。そこで、嚢胞腎の原因遺伝子であるPKD1とPKD2の蛋白修

飾に AQP11-KO で異常が無いと調べると、PKD1 の glycosylation に異常があり、その結果細胞膜上の PKD1 発現量が低下していることが明らかとなった。この発現低下が嚢胞形成に寄与しているかどうかを調べるために、PKD1 ノックアウトマウスと AQP11-KO を交配したところ、PKD1^{+/-}バックグラウンドの AQP11-KO は通常のバックグラウンドの AQP11-KO より重篤な嚢胞腎を呈したことから、AQP11-KO での PKD1 の関与が確実となった (J. Am. Soc. Nephrol 2014 in press)。小胞体に存在する AQP がなぜ特定の PKD1 という蛋白のみにその糖化を障害するのかという疑問は残ったが、小胞体機能に小胞体に存在する AQP が寄与しているという初めて病態を明らかにすることができた。

2) パーター症候群起因性バーチンミスセンス変異体の小胞体係留改善薬の同定。
バーチンは腎臓特異的な CLC クロライドチャネルである CIC-K1 のサブユニットで、CIC-K クロライドチャネルの形質膜発現に必要である。以前に、バーチンの R8L というミスセンス変異体が小胞体に係留し、それ自身が形質膜に局在できないことが、この変異体がパーター症候群を引き起こす原因である事を明らかにしてきた。このような小胞体係留は、膜蛋白の変異体でよく見られ、この形質膜への発現を増やす薬剤の開発 (corrector) が望まれている。今回、この R8L を細胞膜へ発現させる薬剤を、本学ケミカルライブラリーを用いてスクリーニングした。その結果、培養細胞レベルではいくつかの化合物にその特性を見いだしたが、動物レベルでは毒性等の問題により、効果を見いだすには至らなかった。しかしながら、既にこのような機能が多くの蛋白で報告されている 17-AAG という薬剤で、R8L ノックインマウスにおいて、このマウスが示す難聴が改善されるという事実を報告できた。今後、リード化合物の修飾により、より良い corrector が得られると思われる。

3) WNK-OSR1/SPAK シグナル伝達阻害薬の開発。
WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナル伝達系は遺伝性の塩分高血圧症で活性化しているシグナル伝達系である。この系の阻害は、新たな降圧利尿薬につながる可能性があり、阻害薬を WNK と OSR1/SPAK との結合阻害という観点からスクリーニングした。ハイスループットな

スクリーニング系の開発のため、蛍光相関分光を用いた方法を考案し、ケミカルライブラリースクリーニングを行い、2つのリード化合物を得て、培養細胞レベルでシグナル伝達を阻害できることを報告した。

今後は、化合物修飾によって、生体で有効な治療薬の開発に向かう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 45 件)

1. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.* 70: 26-33, 2013. 査読有
2. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013. 査読有
3. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013. 査読有
4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 439: 30-4, 2013. 査読有
5. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 544-49, 2013. 査読有
6. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2. *Clin Exp Nephrol.* 17: 338-344, 2013. 査読有

7. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 457-62, 2013. 査読有
8. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013. 査読有
9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 62: 872-878, 2013. 査読有
10. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:456-61, 2012. 査読有
11. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension.* 60:981-90, 2012. 査読有
12. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol. Open.* 1:120-7, 2012. 査読有
13. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.* 16:530-8, 2012. 査読有
14. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427:743-7, 2012. 査読有
15. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Does a 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012. 査読有
16. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phenotypes of pseudohypoaldosteronism type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade. *J. Cell Sci.* 124:1391-5, 2011. 査読有
17. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin. Exp. Nephrol.* 15:195-202, 2011. 査読有
18. Nomura N, Tajima M, Sugawara N, Morimoto T, Kondo Y, Ohno M, Uchida K, Mutig K, Bachmann S, Soleimani M, Ohta E, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Jentsch TJ, Sasaki S, Uchida S. Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 301:F297-307, 2011. 査読有
19. Ohno M, Uchida K, Ohashi T, Nitta K, Ohta A, Chiga M, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization of WNK4 in mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* 136:25-35, 2011. 査読有
20. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Ohta E, Sasaki S, Uchida S. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. *PLoS One.* 6:e24277, 2011. 査読有
21. Eto K, Noda Y, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. *J. Biol. Chem.* 285:40777-84, 2010. 査読有
22. Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S. Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393:844-8, 2010. 査読有
23. Yang SS, Hsu YJ, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S, Lin SH. Mechanisms for hypercalciuria in

pseudohypoaldosteronism type II-causing WNK4 knock-in mice. *Endocrinology*. 151:1829-36, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 46 件)

1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

2. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46th Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

3. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

5. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

6. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

7. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

8. Yui N, Uchida S, Sasaki S. Ser-261 phosphorylation is an endocytic signal of aquaporin-2 water channel. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, November 7, 2013.

9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

10. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 1, 2012.

11. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 1, 2012.

12. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus (NDI) in Japanese patients: Analysis of 73 families. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 2, 2012.

13. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 2, 2012.

14. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Sasaki S, Uchida S. Generation and analyses of AQP11 BAC transgenic mice. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November 12, 2011.

15. Mori T, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. High throughput screening of drugs that inhibit WNK-OSR1/SPAK signaling cascade. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November 12, 2011.

16. Nomura N, Naito S, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library

screening for drugs to correct intracellular mislocalization of R8L mutant barttin. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November 11, 2011.

17. Oi K, Sohara E, Rai T, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. Renal phenotype of WNK3 knockout mouse. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia (USA), November 12, 2011.

18. Nomura N, Masato T, Ohta E, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment of Bartter syndrome type IV caused by R8L barttin mutation. The 43rd Annual Meeting of American Society of Nephrology, Denver (USA), November 10, 2010.

〔その他〕

東京医科歯科大学腎臓内科学ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 成 (SASAKI SEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：60170677