

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17244

研究課題名（和文）WNKシグナルの網羅的解析による新規高血圧治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of new antihypertensive drug by comprehensive analysis of WNK signal

研究代表者

磯部 清志（ISOBE, KIYOSHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：80804591

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）：WNK1/4のダブルノックアウト細胞の作成は困難であったが、腎集合管培養細胞においてAQP2の機能亢進に重要と推定されるミオシン軽鎖キナーゼ（MYLK）をCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を応用してノックアウトし、リン酸化プロテオミクスを施行し解析した。その結果、MYLKは従来知られていたミオシン軽鎖をリン酸化するだけでなく、種々の細胞骨格および小胞輸送に関わる働きをしていることが明らかになった。実際にMYLKをノックアウトした腎集合管細胞ではAQP2の頂側膜からのエンドサイトーシス後の小胞輸送が障害されており、AQP2の機能調整にMYLKがどのように作用しているか明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々はCRISPR-Cas9ゲノム編集技術とリン酸化プロテオミクスを用いてMYLKの細胞内リン酸化シグナルを詳細に解明することができた。MYLKは従来ミオシン軽鎖をリン酸化しミオシンの機能を調節する機能しか知られていなかったが実際には多岐にわたる機能があることが判明した。細胞内シグナルの解明により新たな創薬につなげていく重要な情報基盤となる。また、この手法は細胞内の特定のリン酸化酵素の役割を詳細に解明することが出来、新たなシグナル伝達を発見することにつながるということが証明されたといえる。

研究成果の概要（英文）：Prior studies have implicated myosin light chain kinase (MLCK) in the regulation of aquaporin-2 (AQP2) in the renal collecting duct. To discover signaling targets of MLCK, we used CRISPR-Cas9 to delete the MLCK gene (Mylk) to obtain MLCK-null mpkCCD cells. The phosphoproteomics experiments revealed that, of the 1,743 phosphopeptides quantified over multiple replicates, 107 were changed in abundance by MLCK deletion (29 decreased and 78 increased). The presence of multiple proteins in the actomyosin category prompted experiments showing that MLCK deletion inhibits the normal effect of vasopressin to depolymerize F-actin, providing a potential explanation for the AQP2 trafficking defect. We conclude that MLCK is part of a multicomponent signaling pathway in both the cytoplasm and nucleus that includes much more than simple regulation of conventional nonmuscle myosins through myosin regulatory light chain phosphorylation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：WNK アクアポリン2 ミオシン軽鎖キナーゼ リン酸化プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

<概要> 本邦で高血圧患者は推定 4300 万人とされ、まさに国民病といえる。高血圧は重大な心血管合併症との強い因果関係をもち、その治療は国民の生命予後改善に重要である。しかし、降圧剤を内服しても高血圧を呈する患者は高血圧患者の 25%になるとの報告があり、有効な治療法の新規開発は、いまなお高血圧治療に大きく貢献するものと考えられる。我々は遺伝性高血圧症の解析を通じて、腎と血管において血圧制御に重要な役割を果たす WNK キナーゼシグナルを発見し、解析を進めてきた。しかし、WNK はユビキタスに発現しているため、その阻害薬開発は断念されている。本研究では WNK キナーゼの基質同定を目的とし、リン酸化プロテオミクス手法を駆使した網羅的解析を実施する。このことにより WNK シグナルを介した高血圧を治療・予防しうる新規治療薬開発へつなげていくことが出来る。

<背景>

高血圧患者は本邦で 4300 万人をこえ、30 歳以上の男性の 60%、女性の 45%が高血圧とされる。高血圧は心血管系イベントの重要なリスク因子となり、高血圧に肥満、耐糖能異常を合併するメタボリック症候群 (MetS) を呈することよりさらにそのリスクは高まる。本邦疫学調査によれば男性の約 25%、女性の 22%程度が MetS に罹患するとされ、高血圧、MetS はまさに国民病と言える。高血圧症、肥満、耐糖能異常に対する治療は、健康寿命の延長、予防医学的見地からの医療費の抑制という視点で、臨床的に極めて重要な治療ターゲットである事に疑いはない。これまでに申請者は遺伝性高血圧症の解析を通じて、血圧制御に重要な役割を果たす With no lysine kinase (WNK) の機能解析、およびその下流で腎臓での塩分貯留に働く Na-Cl 共輸送体 (NCC) の活性制御に関する研究を行ってきた。

WNK は塩分感受性高血圧の key regulator である。

申請者の所属する東京医科歯科大学腎臓内科学研究室では、遺伝性疾患で高カリウム血症と塩分感受性高血圧を特徴とする偽性程アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子 WNK キナーゼの解析を行ってきた。WNK は WNK1 から 4 まで 4 つのアイソフォームがあり、WNK1 と WNK4 が腎臓では重要な働きをしている。WNK は、その下流の OSR1 及び SPAK キナーゼという基質をリン酸化することで活性化し、これらのキナーゼはさらに NCC をリン酸化することで活性化させているというリン酸化シグナルカスケードを明らかにした (Cell Metab. 2007)。その後、E3 ユビキチンリガーゼである Kelch-like protein 3 (KLHL3)、Cullin 3 が新たに PHAII の原因遺伝子として同定された。これらは WNK キナーゼを分解制御し、シグナル制御に重要な役割を果たしている事を報告した (Wakabayashi, Isobe (3/19) et al. Cell Rep. 2013)。また腎と同様に血圧制御に重要な血管では、WNK は同様に SPAK のリン酸化を経て、NCC と同じ SLC12A family に属する Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC1) の活性化にも関与し、血管トーンスを制御している事を報告している (Zeniya, Isobe (10/17) J Am Soc Nephrol. 2015)。このように、WNK シグナル伝達系は、腎と血管において生理的な血圧制御に重要な役割を果たしている。

WNK の血圧制御以外の機能

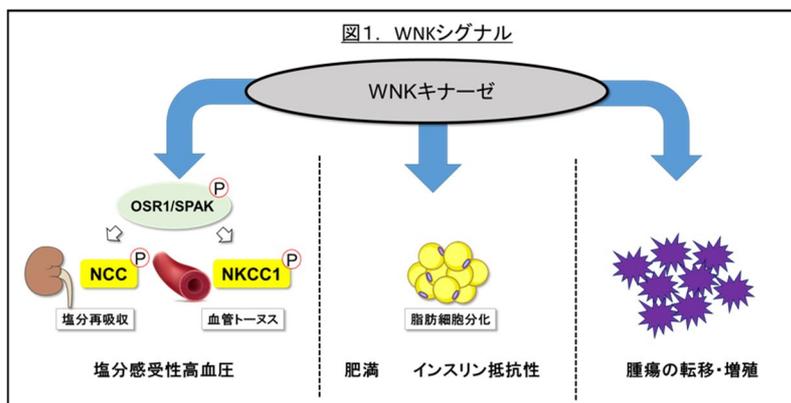
WNK-OSR1/SPAK リン酸化シグナルカスケードを制御している因子は様々報告がされており、血清カリウム値、アルドステロンやアンギオテンシン II などがある。その中でわれわれはインスリンが WNK-OSR1/SPAK リン酸化カスケードを亢進させることを明らかにした (PLoS One 2011)。また WNK4 ノックアウト (WNK4-KO) マウスを作成し解析した結果、WNK4-KO マウスは肥満になりにくく、WNK4 が PPAR の抑制を通して脂肪細胞への分化を抑制していることも明らかにしている (EBioMedicine. 2017)。

また WNK シグナルは抗腫瘍効果のターゲットとしても注目されている。WNK1 は血管新生を促進し、かつその下流の SPAK の阻害により細胞増殖や細胞移動を抑制するなどが明らかとなっている。

上記のように WNK シグナルを明らかにすることは、高血圧のみならず肥満や悪性腫瘍への新規治療薬開発の基盤的情報を提供することにもつながる (図 1)。

これまでの我々の実験結果から、脂肪細胞へ分化する際に WNK の下流に存在しシグナル伝達に重要な SPAK のリン酸化には変化がなく、SPAK ノックダ

ウン実験でも下流への影響を認めなかった。NKCC1 阻害薬である bumetanide を用いた実験で阻害されなかった。このことから、脂肪細胞における WNK の基質は従来の SPAK/OSR1 と異なると推



測されるが、WNK シグナルの詳細な機序は未だ明らかではない。また WNK 阻害薬は発見されているが、アイソフォーム選択性はなく WNK1 はコピキタスに存在するため安全性の観点から開発が断念されている。これらのことから WNK シグナル機序を明らかにすることで、より臓器や目的に特異的な WNK シグナル阻害薬創薬への基盤を形成できると期待される。

2. 研究の目的

細胞などの試料中に存在するタンパク質をトリプシンでペプチドに消化したのちに質量分析器を用いて網羅的に解析することが可能となっている。さらにリン酸化したペプチドを TiO₂ カラムを使用して抽出することで、蛋白リン酸化の変化を網羅的に解析することも可能となっている。また CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術は 2012 年初めて報告された後、急速に普及している。申請者機部は 2017 年まで、米国の国立衛生研究所 (NIH) において System Biology の最先端研究を担う Knepper 研究室に所属し、リン酸化シグナル伝達の解析に従事してきた。CRISPR-Cas9 を用いてターゲットとするキナーゼをノックアウト (KO) し、のちにリン酸化プロテオミクスを行うことで、そのキナーゼがどのようなリン酸化シグナル伝達を担っているのかを解析してきた。本研究では WNK シグナル阻害の創薬につながる基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

WNK1 及び WNK4 ダブルノックアウト培養細胞の作成を介して、WNK の基質についての情報をさらに得ていくことを目指した。

4. 研究成果

WNK1 及び WNK4 ダブルノックアウト培養細胞の作成が困難であった。CRISPR による WNK4 ノックアウト (KO) 細胞を作成する段階で、細胞を一つ一つ FACS を用いて分離し、シングル化して培養しなおす過程がある。しかし、このシングル化により、細胞の形質が変化してしまうことがある。許容できる範囲での変化であれば解析に用いることができるが、大きく変化してしまう場合は、シングル化による artifact か、ノックアウトによる影響なのか判断することは困難となる。大きく変化しない場合でも、複数のシングル化した細胞を集めて統計上の解析を行い artifact か KO による影響か判別を行う必要があった。

WNK1、WNK4 ダブル KO 細胞作成するため、WNK4 KO 細胞を用いて、WNK1 ノックアウト用の CRISPR Cas9 ベクターを挿入して再度シングル化を行った。WNK1 ノックアウトのための guide RNA のデザインを行い、CRISPR-Cas9 ベクターを用意した。この際に使用する WNK4 KO 細胞として、Control と比較して SPAK のリン酸化が著しく変化していないことや、DNA Sequencing で遺伝子変異が確認されていることを条件とした。しかし、ウェスタンブロットングで、WNK4 の発現が消えているクローンの DNA Sequencing をしても KO となる変異が一部の細胞で確認できなかったため、WNK4 KO が FACS でのシングル化による artifact による可能性があることが判明し、WNK4 KO 細胞の表現型の解析を DNA Sequencing 行い解析しなおしている。

3T3 の WNK4 ノックアウトも作成をいたしたが、シングル化による形質変化の影響が大きく、各細胞の表現系が異なっていたために、解析することが困難であった。現在、上皮細胞系に集中して完成を目指している。

改めて、MyIk ノックアウト mpkCCD 細胞の解析を行い論文報告したので、下に記す。

単一クローン培養細胞の形質を調べるため、の単一細胞隔離をノックアウト細胞を作る前に予め行った。我々は 48 クロウンを mpkCCD_{C11} 細胞から単一隔離して作成した。各クローンは Transwell plate にて培養し、trans-epithelial resistance (TER) と AQP2 の発現を測定した。クローン # 38 (mpkCCD_{C11-38}) が vasopressin 刺激により最も AQP2 を多く発現し、vasopressin 依存性の AQP2 のリン酸化や頂側膜への移動などが認められた。AQP2 の発現量は従来の mpkCCD_{C11} 細胞よりも 1.7 倍多く認められた。そして、AQP2 の発現量は vasopressin アナログである dDAVP の刺激時間依存性に増加し、AQP2 の活性化リン酸化部位である pS269 のリン酸化も dDAVP 刺激により増加した。これらの結果から mpkCCD_{C11-38} 細胞は、オリジナルの mpkCCD_{C11} 細胞と同じ形質を持っていることが確認された。より多くの AQP2 を発現できることは評価の難しい AQP2 のリン酸化の評価に資するため、我々はこの新しい培養細胞クローンである mpkCCD_{C11-38} 細胞を今後の実験に使用することにした。

1. ノックアウト細胞の作成。

我々は CRISPR ガイド RNA (gRNA) をミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK, 遺伝子名 MyIk) と A キナーゼ触媒サブユニット (PKA-C; 遺伝子名 Prkaca) と A キナーゼ触媒サブユニット (PKA-C; 遺伝子名 Prkacb) をターゲットとして複数作成した。gRNA 作成にあたっては CRISPR デザインツールを提供している Website を利用した (<http://crispr.mit.edu>)。各 gRNA に対応する配列を持った CRISPR プラスミド (pCMV-Cas9-GFP) は Sigma に注文し入手した。この CRISPR プラスミドは gRNA、Cas9、セクションマーカーとして GFP をコードしている。細胞にトランスフェクションした 2 日後に FACS を用いて GFP 発現細胞のみを単一培養しクローン化した。このようにして、我々は MyIk, Prkaca and Prkacb ノックアウト細胞を作成し、PKA に関しては Prkacb ノックアウト細胞にさらに Prkaca をターゲットとする CRISPR ベクターをトランスフェクションすることでダブルノックアウトを作成した。作成したノックアウト細胞はウェスタンブロッ

ティングと DNA シークエンスにてノックアウトされていることを確認した。

1. Mylk ノックアウト mpkCCD 細胞の解析.

a. リン酸化プロテオミクス解析

Mylk ノックアウトによるシグナル伝達系への影響を調べるため、我々は安定同位体アミノ酸ラベリング細胞 (SILAC) 法を用いて定量的リン酸化プロテオミクスを行った。実験は3つの独立した MLCK ノックアウトとコントロールを使用して3回行い結果を解析した。培養細胞は膜上で培養し、膜間電気抵抗 (TER) は MLCK ノックアウトとコントロールで有意な差は認められなかった。リン酸化ペプチドは Fe-NTA と TiO₂ カラムを使用して抽出を行ったが両者の抽出したリン酸化ペプチドはスペクトラムが異なっており、最大限リン酸化ペプチドを集めるため両者を使用してリン酸化ペプチドの抽出を行い、後に両者の結果を総合して解析した。リン酸化ペプチドは全部で 8055 種類のリン酸化ペプチドが少なくとも1つのペアで同定、及び測定された。それらの中で 1852 種類のリン酸化ペプチドが全てのペアで同定及び測定された。殆どのリン酸化ペプチドが Heavy と Light の比が1周辺にあり、ラベリングは問題なく行われたことを確認した。また Mylk に由来するペプチドは3つ全ての MLCK ノックアウト細胞では全く検出されず、ノックアウトが成功していることも判明した。ミオシン制御軽鎖 (MRLC) はミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) の基質として知られている。我々の結果では MLCK の MRLC リン酸化部位である T18 と S19 のリン酸化は 40%ほどコントロール細胞よりもノックアウト細胞で減少しているのみであった。Rho 関連コイル状リン酸化酵素 (ROCK) やロイシンジッパーインタラクチンリン酸化酵素 (ZIPK または DAPK3)、そして CDC42 結合リン酸化酵素 (MRCK または CDC42BPB) などが MRLC の同部位をリン酸化することが過去に報告されており、それら他のリン酸化酵素が代償して働いていることの結果と思われた。MLCK の機能は従来 MRLC をリン酸化し、ミオシンの機能を制御することが言われてきたが、知られているよりもその機能が広い可能性が考えられた。MLCK ノックアウトの影響を推測するため、我々はこれらの蛋白を遺伝子分類体系 (GO) により分類した。変化の見られた遺伝子の GO で頻繁に見られるものは以下であった。“plasma membrane” (Rel11, Mphospho8, Mark3, Gprc5c, Arhgef28, Cobl, Sptan1, Ephb2, Pi4kb, Ctnnd1, Shroom2, Palld, Baiap2l2, Cap1)、“cell-cell (adhesions) junction” (Tmop, Sptan1, Ctnnd1, Atxn2l, Lad1, Shroom2, Eef1d, Mylk)、“(regulation of) transcription” (Carhsp1, Mphospho8, Baz1b, Tmop, Akap8, Ctnnd1, Eef1d, Xrn2)、“actin (re)organization, actin filament polymerization” (Sptan1, Palld, Nf1, Cap1, Cobl)である。これらの結果は MLCK の機能が細胞骨格制御であることを裏付けている。実際に遺伝子セット解析では核膜形成に関わる遺伝子が減少していることが示唆された。さらに、細胞内小胞輸送に関わる蛋白にも変化が見られたことが解析により明らかになった。これらのデータは MLCK はアクチンによる小胞輸送にも重要な働きをしていることが考えられた。

a. 核膜形状とアクチンポリマー化

MRLC のリン酸化によるミオシン II の活性化はストレスファイバーの形成や細胞の形状構築に重要な働きをしていることが知られている。またリン酸化プロテオミクスでもこの働きを支持する結果が得られたことから、我々は MLCK ノックアウトでの核の形状を調べてみた。核は DAPI で染色し、Confocal 顕微鏡で撮影し形状と容量解析した。核の容量は MLCK ノックアウトにおいて有意に増加していることが確認されたさらに、その形状はコントロール細胞と比較して薄く、面積が広がっていることがわかった。細胞の頂側の面積を単位面積あたりの細胞数より計算したところ MLCK ノックアウトでより広がった。

またバゾプレッショ刺激により mpkCCD 細胞のアクチンポリマー化 (F-Actin) は減少することがわかっている。このバゾプレッショ依存性の F-Actin の変化が MLCK ノックアウトでどのように変化するかを調べるため、F-Actin に結合するファロイデンに蛍光標識した物質を使用して F-Actin の変化を顕微鏡で観察した。dDAVP 刺激によりコントロール細胞では予想通り F-Actin の顕著な減少が認められるが MLCK ノックアウトではこの反応が明らかに弱くなっていることがわかった。また正常細胞では F-Actin は ZO-1 と共染色されているのが見られるが、MLCK ノックアウト細胞ではこの共染色が見られなくなり、F-Actin の分布と ZO-1 の結合にも影響を及ぼしていることがわかった。

a. アクアポリン 2 の発現量とリン酸化

我々は MLCK がアクアポリン 2 (AQP2) の発現量を変化させるかどうかを調べた。Figure1-1 で示したように AQP2 の発現量は単離細胞間で大きく異なってしまうためコントロール細胞、及び MLCK ノックアウト細胞をそれぞれ 10 個ランダムに選び、AQP2 の発現量を比較した。結果、AQP2 の発現量は予想通り変化は大きかったが、明らかに大きく増減してはいなかった。バゾプレッショ刺激は短期的には AQP2 の S269 リン酸化の状態を増加させ、その機能を増加させることがわかっている。このことから MLCK が AQP2 のリン酸化の状態に変化を生み出すかどうかを検討した。コントロール細胞では AQP2 S269 のリン酸化は予想通りバゾプレッショ刺激により増加していることが示された。しかし、この変化は MLCK でも同様であり、MLCK ノックアウトによる影響は認められなかった。またバゾプレッショ刺激により AQP2 はリン酸化後、頂側膜に移動することがわかっているが、この移動も MLCK ノックアウトでは正常に認められた。

a. MLCK ノックアウト細胞での AQP2 のエンドサイトーシス

リン酸化プロテオミクスの解析結果から MLCK ノックアウト細胞では、細胞内小胞輸送に関わる蛋白のリン酸化が減少していることが示された。AQP2 の頂側膜への輸送に関して変化は認めら

れなかったため、次に AQP2 のエンドサイトーシスの状況を調べた。正常の細胞では AQP2 は細胞質に取り込まれ AQP2 の見え方が一様な分布からまばらな様相に変化しているが、MLCK では一様な分布のまま変化が認められなかった。このことからより詳しく AQP2 のエンドサイトーシスの変化を調べた。dDAVP 除去後の経時的変化を 5 分、10 分、20 分と調べた結果を Figure 3-15 に示す。AQP2 は緑、早期エンドゾーム抗原 1 (EEA1) を赤で染色している。正常な細胞では dDAVP 除去後 5 分の早期で EEA1 陽性の 1 - 2 μ m の大きな細胞内小胞が形成されているが、20 分の段階では大きな小胞は認められなくなっている。大きな小胞を STED 顕微鏡を用いて拡大撮影した写真では EEA1 と AQP2 が同じ小胞膜に存在していることが確認できる。対照的に MLCK ノックアウト細胞では AQP2、EEA1 は非常に小さい点としてのみ確認され、正常な細胞で見られた大きな小胞は確認されなかった。20 分を超えても大きな小胞は確認されなかった。このことから、MLCK ノックアウトによりエンドサイトーシスの機構が大きく損なわれている可能性が示唆された。この AQP2 の頂側膜よりの回収の時点で変化が認められるのかを確認するため、ビオチンを用いて細胞膜回収率測定を行った。このビオチンは DTT 等の還元剤により切断される構造を持っており、AQP2 に結合している糖に結合させ、dDAVP 除去後に DTT 治療を行い細胞内に入ったもののみビオチン化されている実験系を使用した。ビオチン化蛋白のみアビジンビーズで抽出後にウエスタンブロッティングにより評価を行った。ビオチン化 AQP2 が細胞内に取り込まれた AQP2 の量を示しているが、両者に差は認められなかった。さらに頂側膜に存在している AQP2 総量に対する割合にも変化は認められなかった。これらの結果は MLCK ノックアウトでは AQP2 は dDAVP 除去後に細胞内には問題なく入っていることを示している。

以前の報告に S269 リン酸化 AQP2 は頂側膜に存在することが判明しており、AQP2 の脱リン酸化に MLCK ノックアウト細胞では問題があり、エンドサイトーシスの機構が損なわれていることを仮定した。しかし、dDAVP 除去後 S269 の脱リン酸化は MLCK ノックアウト細胞でも正常な細胞と同様に起こっており、変化は認められなかった。次に、より微細な細胞内の状況を観察するため、dDAVP 刺激している状態と、dDAVP 除去後 10 分後の細胞を電子顕微鏡を用いて観察した。正常な細胞では dDAVP 除去後 500 - 800 nm の大きな小胞が出現しているのが確認できるが、MLCK ノックアウト細胞では 100 nm 未満の小さな小胞が頂側膜直下に観察された。以上の結果より、MLCK ノックアウト細胞では dDAVP 除去後 AQP2 は頂側膜から細胞内に小胞として取り込まれてはいるが早期エンドゾームへの輸送状況に問題があることが考えられた。

これらの結果をまとめて、

Physiol Renal Physiol. 2020;318(3):F600-F616. doi: 10.1152/ajprenal.00431.2019.。
に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furusho Taisuke, Sohara Eisei, Mandai Shintaro, Kikuchi Hiroaki, Takahashi Naohiro, Fujimaru Takuya, Hashimoto Hiroko, Arai Yohei, Ando Fumiaki, Zeniya Moko, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Nomura Naohiro, Yamamoto Kohei, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Renal TNF activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 713 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.11.021	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 -
1. 著者名 Shoda Wakana, Nomura Naohiro, Ando Fumiaki, Tagashira Hideaki, Iwamoto Takahiro, Ohta Akihito, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Sodium/calcium exchanger 1 is the key molecule for urinary potassium excretion against acute hyperkalemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0235360 ~ 0235360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0235360	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 -
1. 著者名 Fujii Shinya, Kikuchi Eriko, Watanabe Yuko, Suzuyama Honoka, Ishigami-Yuasa Mari, Mori Takayasu, Isobe Kiyoshi, Uchida Shinichi, Kagechika Hiroyuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Structural development of N-(4-phenoxyphenyl)benzamide derivatives as novel SPAK inhibitors blocking WNK kinase signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127408 ~ 127408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127408	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 -
1. 著者名 Fujii Shinya, Kikuchi Eriko, Suzuyama Honoka, Watanabe Yuko, Ishigami Yuasa Mari, Masuno Hiroyuki, Mori Takayasu, Isobe Kiyoshi, Uchida Shinichi, Kagechika Hiroyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural Development of Salicylanilide Based SPAK Inhibitors as Candidate Antihypertensive Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202100273	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 -

1. 著者名 Isobe Kiyoshi、Raghuram Viswanathan、Krishnan Laya、Chou Chung-Lin、Yang Chin-Rang、Knepper Mark A.	4. 巻 318
2. 論文標題 CRISPR-Cas9/phosphoproteomics identifies multiple noncanonical targets of myosin light chain kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F600 ~ F616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00431.2019	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------