

助成番号 0832

腎臓における新規 NaCl 出納調節系 (WNK4-OSR1/SPAK-NCC 系) の 摂取食塩量による制御機構の解明

内田 信一¹, 頼 建光²¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学²東京医科歯科大学医学部附属病院腎臓内科

概要 塩分摂取状況により WNK-OSR/SPAK-NCC 系がアルドステロンを介して制御されていることが判明した。このことは、腎臓にはアルドステロンの制御下に、いままで同定されていた上皮型 Na チャネルの系以外に、WNK-OSR/SPAK-NCC 系が存在し、腎臓での NaCl 出納調節を担っていることが明らかとなった。アルドステロンから WNK-OSR/SPAK-NCC 系までの刺激伝導系については本研究ではその詳細は明らかでなかった。

一方、低浸透圧刺激による WNK キナーゼの活性上昇を手がかりとして、今現在も不明な点が多い WNK キナーゼ活性化のシグナルについて、COS 細胞に内因性に存在する WNK1 キナーゼ活性を測定することで検討した。その結果、低張であること自体が刺激因子では無く、さらに外液の低 Na 自体も有意な刺激因子では無く、低 Cl ないし低 K が刺激因子であることが判明した。K と Cl が別個に刺激因子となるのか、どちらかが主体であるのかについては現在検討中である。いずれにしても、細胞外のイオン濃度の状況を感じて(細胞内イオン濃度の変化を介してと思われるが)下流にシグナルを送るキナーゼとして WNK キナーゼは働いている可能性があり、その意味ではイオンセンサーとしての機能を WNK1 キナーゼは持っていることが判明した。

1. 研究目的

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・電解質輸送体蛋白である。輸送体蛋白自体の研究は近年めざましく発展したが、生体が摂取食塩量の変化を感じ、そのシグナルをいかにして輸送体蛋白まで伝えているかという点は未だ不明な点が多い。我々は、平成 17 年度本研究財団助成(助成番号 0528)により、塩分感受性高血圧症を呈する遺伝性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型(以下 PHAII)の分子病態を遺伝子改変マウス作成により明らかにした⁽¹⁾。この我々が発見した腎臓での新規 NaCl 出納調節系である WNK4 キナーゼ-OSR1/SPAK キナーゼ-Na-Cl 共輸送体(NCC)のリン酸化刺激伝達系は、PHAII という病態のみならず生理的な塩分摂取量に応じても変化するという可能性が示唆された。

本研究の目的は、この WNK4-OSR1/SPAK-NCC 系が塩分摂取量に応じて制御を受けるのか、受けるとすればその制御の分子機構は何かを明らかにする事である。WNK4 のさらに上流に位置する制御因子は何なのか？アルドステロンの関与はあるのか、あるとすればアルドステロンから WNK4 をつなぐ分子は何か？アルドステロン以外に細胞外の NaCl 濃度を感じ取る仕組みがこの系にあるかどうかについても検討を加える。

2. 研究方法

WNK4-OSR1/SPAK 系がいかにして活性化されるかは全く明らかになっていない。我々は、食餌の NaCl 摂取量により OSR1/SPAK-NCC のリン酸化が制御されるかどうかについて、野生型マウスに正塩、低塩、高塩食を与え、リン酸化 OSR1/SPAK 抗体、リン酸化 NCC 抗体にて、これら分子のリン酸化状態を把握した。結果で述べるように実際

に制御を受けていることが明らかとなったため、その制御を司る液性因子の検索を行った。摂取 NaCl 量による制御はレニン・アルドステロン系の関与が想定されるため、まず外因性のアルドステロン投与やアルドステロン阻害薬の投与で OSR1/SPAK-NCC のリン酸化に変化が現れるかを検討した。生体内でアルドステロンによる制御が明らかになったため、培養細胞系にて、アルドステロンから WNK4 ないし OSR1/SPAK までのシグナル伝達の解明を行った。今まで遠位尿細管ではアルドステロンが serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK) を経由して上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) を制御する系が唯一アルドステロンと腎臓での NaCl 出納調節を結ぶ系とされてきたが、WNK4-OSR1/SPAK-NCC 系も関与している可能性があり検討を加えた。最近 SGK が WNK4 をリン酸化するというデータも示されており⁽²⁾、アルドステロン→SGK→WNK4-OSR1/SPAK-NCC とシグナルが伝達されるかどうかについて検討した。一方、WNK キナーゼが培養細胞において低 NaCl 溶液にて活性化されるということも見だしている。この事は、尿細管局所で尿細管管内の NaCl 濃度が低下すると、それを感知してこの系が活性化され NaCl くみ上げを増加させ、到達する NaCl が多いときは活性を低下させるという尿細管内局所の NaCl センサーとして OSR1/SPAK キナーゼが機能している可能性を示唆している。今回、抗リン酸化 OSR1/SPAK 抗体を用いて OSR1/SPAK のリン酸化の状態を把握することで WNK キナーゼ活性をモニターし、種々の条件下で培養した細胞

内 WNK キナーゼ活性を測定する事で、上記の仮説について検証した。

3. 研究結果

3. 1 NaCl 摂取量により制御を受ける WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系へのアルドステロンの関与

C57BL/6J マウスに、各々塩分量 0.4% の通常食、4.0% の高塩食、0.01% の低塩食を 10 日間摂取させ、腎臓全体から whole lysate を調整し、イムノブロットを行い OSR1/SPAK および NCC のリン酸化の状態を検討した。図 1 に示すように、低塩食では OSR1/SPAK と NCC のリン酸化のリン酸化は著明に亢進し、高塩食では抑制されていた。この状態での血中アルドステロン濃度は図 2 に示すように変化しており、OSR1/SPAK と NCC のリン酸化に並行してように見えたため、低塩食摂取により高アルドステロンを呈しているマウスにアルドステロン阻害薬であるスピロノラクトンを、一方高塩食により低アルドステロンを呈しているマウスに外因性にアルドステロンを投与し、OSR1/SPAK と NCC のリン酸化にどのような変化がみられるかを検討した。その結果図 3 にみられるように、外因性アルドステロンは OSR1/SPAK と NCC のリン酸化を回復させ、スピロノラクトンは増加したリン酸化を部分的にはあるが阻害した。これらの結果は、摂取食塩量による WNK-OSR1/SPAK-NCC 系の制御が一部アルドステロン依存性であることを示していた。

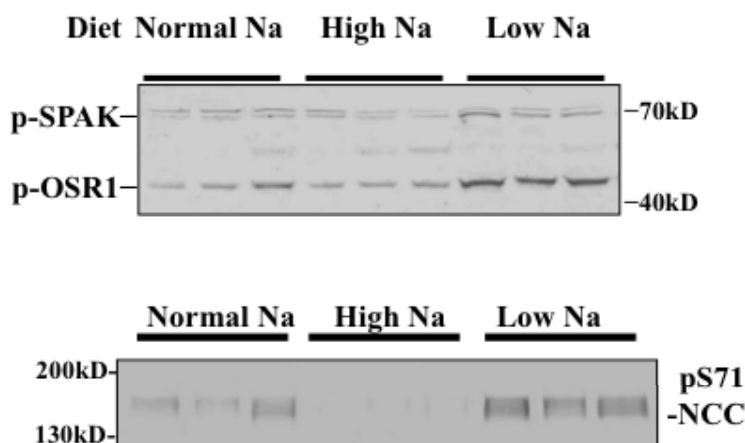


Figure 1. Phosphorylation status of OSR1, SPAK, and NCC in mice fed low, normal, and high salt diets. Phosphorylations of these proteins were decreased by high salt diet and increased by low salt diet.

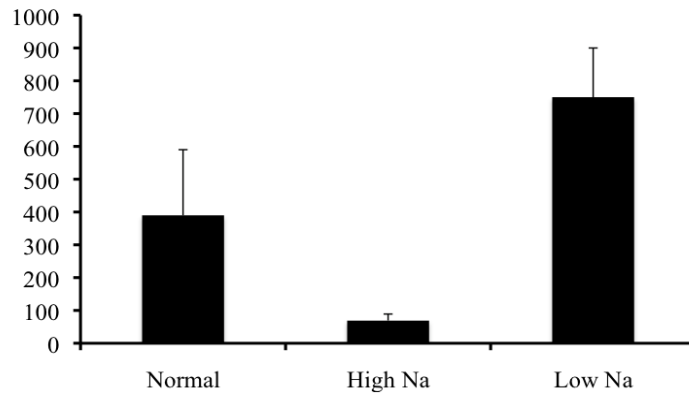


Figure 2. Serum aldosterone levels (pg/ml) in mice fed low, normal, and high salt diets

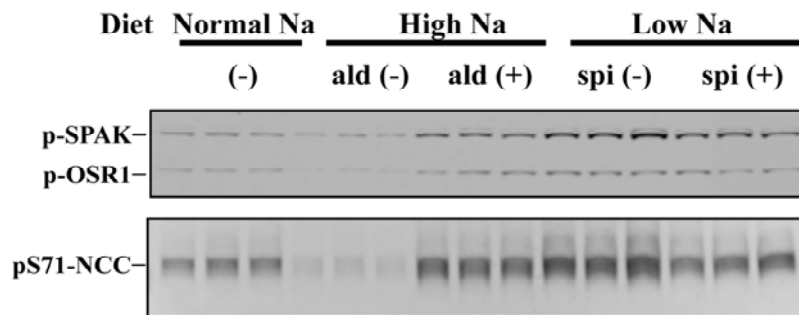


Figure 3. Effect of aldosterone and spironolactone on OSR1/SPAK and NCC phosphorylation in wild-type mice. Representative immunoblots of phosphorylated OSR1/SPAK and NCC in the kidneys of wild-type mice are shown. Decreased phosphorylation of OSR1/SPAK and NCC by a high-sodium diet was restored by exogenous aldosterone, and corresponding increases in phosphorylation by a low-sodium diet were decreased by spironolactone. Aldosterone was administered by osmotic mini-pump (0.07 mg/kg/day). Spironolactone (Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in ethanol at 25 mg/mL and added to drinking water. Mice received spironolactone at a dose of 20 mg/kg/day. ald: aldosterone, spi: spironolactone.

3. 2 培養細胞におけるアルドステロンの WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系への直接関与の可能性

上記の結果を得て、アルドステロンから WNK-OSR1/SPAK-NCC 系へのシグナル伝達経路をさらに詳細に検討するために、培養細胞系にて *in vivo* でみられた制御系が再現できるかを検討した。しかしながら、腎臓由来の各種培養細胞 (MDCK 細胞, mIMCD3 細胞, DCT 細胞) にアルドステロンを添加し、内因性の WNK 活性を OSR1/SPAK のリン酸化を指標として検討したが、優位な上昇を検出することはできなかった。特に、DCT 細胞は、微量ながらも NCC 輸送体も発現している細胞であり、生

体内の遠位尿細管に近い細胞として、アルドステロンによる制御機構を研究するためのよい培養細胞モデルと期待していたが、意外にも生体内で観察された結果を培養系で再現することはできなかった。この生体内と培養細胞系での結果の乖離の原因については考察にて述べる。

3. 3 低浸透圧刺激による WNK キナーゼ活性上昇の分子メカニズムの検討

WNK キナーゼ活性は、当初高浸透圧刺激がその刺激因子として報告されたが⁽³⁾、その後低浸透圧かつ低クロライド溶液により活性化されることが報告された⁽⁴⁾。我々は COS 細胞において細胞外液を種々の条件に変化させた

ときの内因性の WNK キナーゼ活性を OSR1/SPAK のリン酸化を指標として測定した。

その結果、COS 細胞では WNK1 が主要な WNK キナーゼであることを siRNA を用いた実験(図4)で明らかにし、この WNK1 キナーゼ活性は以前の報告のように高浸透圧でも低浸透圧でも活性化されることが判明した。しかしながら活性化の時間経過は、高浸透圧刺激による活性上昇は一過性であるのに対し、低浸透圧による活性化は少なくとも 24 時間持続することが判明し(図5)、両者の活性化機構が異なることが推定された。

今回我々は、低浸透圧刺激の分子メカニズムをさらに

詳細に検討した。低浸透圧溶液は、細胞培養液を単純に水で3分の2希釈したものであったため、培養液中の全ての成分(イオンや浸透圧)が低下している。そこでまず、希釈した溶液の浸透圧をマニトールで等張に戻したときに WNK1 キナーゼ活性がどのように変化するかを検討した。その結果、等張に戻しても WNK1 キナーゼ活性は活性化され、低浸透圧自体が刺激因子で無い可能性が得られた。つぎに、Na と Cl を別々に正常濃度に戻すと、Na を戻しても活性化は低下しないのに対し、Cl を正常濃度まで戻すと、活性は低下した。このことより低張溶液での WNK1 キナーゼ活性刺激亢進は、低クロライドがその刺激因子で

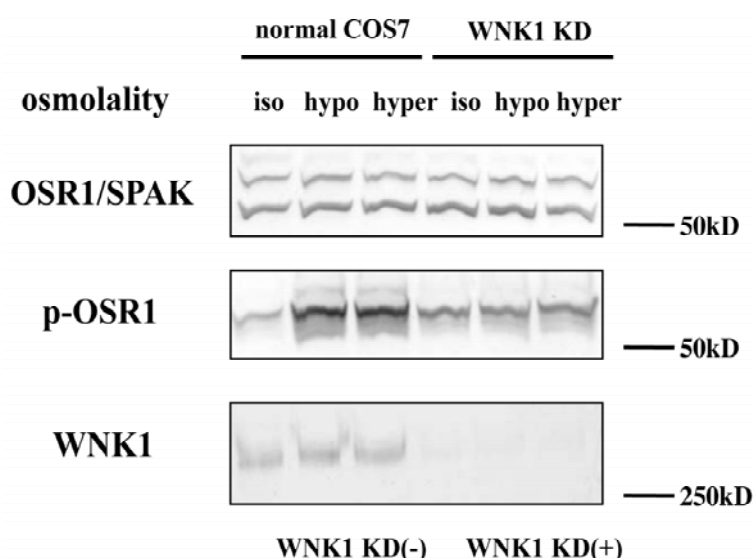


Figure 4. Effect of hypotonicity and hypertonicity on WNK1 kinase activity. Hypertonic (hyper) medium (450 mOsm/kg H₂O) or hypotonic (hypo) medium (200 mOsm/kg H₂O) increased the phosphorylation of OSR1/SPAK, which was completely abolished by the treatment with siRNA to WNK1.

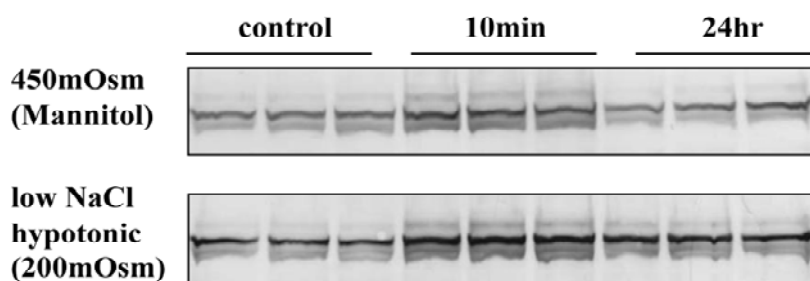


Figure 5. Time course of WNK1 activation by hypertonic and hypotonic media. Hypertonic (hyper) medium (450 mOsm/kg H₂O) or hypotonic (hypo) medium (200 mOsm/kg H₂O) increased the phosphorylation of OSR1/SPAK 10 min after the switch, but the increased WNK1 activity sustained for 24 hours only in the hypotonic medium.

あることが判明した。一方、K も低張溶液で希釈されていることから、別個に検討した。その結果低 K も有効な WNK1 キナーゼ刺激因子である事が判明した。さらに K チャネル阻害薬が非常に有効に WNK1 キナーゼ活性を阻害することも判明し、細胞内 K 濃度が重要な WNK1 キナーゼ活性の制御因子である可能性も考えられた。

4. 考 察

4.1 WNK-OSR/SPAK-NCC 系はアルドステロンの制御下の腎臓での新たな NaCl 出納調節系である。

WNK-OSR/SPAK-NCC 系は腎臓での食塩出納調節に関わっていることがマウスの実験にて明らかになった。しかも今回データには示していないが、以前我々の報告した偽性低アルドステロン症 II 型モデルマウス(WNK4 D561A ノックインマウス)では、高塩負荷時の WNK-OSR/SPAK-NCC 系の抑制がきかないことも判明しており、このことが WNK4D561A ノックインマウスでは持続的な NaCl 負荷を生み出し、高血圧症を招くことが証明された。

この摂取食塩量に応じた WNK-OSR/SPAK-NCC 系の制御機構の上流には、今回の検討により、アルドステロンが関与していることが明らかになった。しかしながら、スピロラクトンで完全に遮断されているわけではなく、アルドステロン以外の因子の存在も否定できない。一方、この結果をうけて、アルドステロン以後の細胞内刺激伝達系を検討するため、培養細胞系にてアルドステロン添加時の WNK キナーゼ活性の変化を測定したが、生体内でのアルドステロン投与時にみられた著明な刺激効果は培養細胞系ではみられなかった。使用した培養細胞全てにミネラルコルチコイド受容体の発現は蛋白レベルで確認しており、低反応の理由とは考えにくい。一つの可能性としては、ミネラルコルチコイド受容体以降 WNK キナーゼまでの間に必要な蛋白が、培養細胞に欠如しているのかもしれない。一方で、アルドステロンが腎臓以外の臓器に一度作用して何らかの液性因子を介して腎臓遠位尿細管に働いている可能性もある。

このように、今回の検討では、シグナル伝達系の詳細は不明ながら、腎臓にはアルドステロンの制御下に、いままで同定されていた上皮型 Na チャネルの系以外に、WNK-OSR/SPAK-NCC 系が存在し、腎臓での NaCl 出納調節を担っていることが明らかになった。

4.2 アルドステロン以外の WNK-OSR/SPAK-NCC 系の活性制御機構

低浸透圧刺激による WNK キナーゼの活性上昇を手がかりとして、今現在も不明な点が多い WNK キナーゼ活性化のシグナルについて、COS 細胞に内因性に存在する WNK1 キナーゼ活性を測定することで検討した。その結果、今まで有効な刺激とされてきた低張かつ低クロライドという刺激条件は、低張であること自体が刺激因子では無く、また低 Na 自体も有意な刺激因子では無く、低 Cl ないし低 K が刺激因子であることが判明した。K と Cl が別個に刺激因子となるのか、どちらかが主体であるのかについては現在検討中である。いずれにしても、細胞外のイオン濃度の状況を感じて(細胞内イオン濃度の変化を介してと思われるが)下流にシグナルを送るキナーゼとして WNK キナーゼは働いている可能性があり、その意味ではイオンセンサーとしての機能を WNK キナーゼは持っていることが判明した。

このことが生体内で持つ意味としては、一つの可能性としては、遠位尿細管の管腔に到達する Cl 濃度を感じし、少なれば WNK キナーゼが活性化されて NCC をリン酸化し、NaCl のくみ上げを増加させるという自動制御機構に関与する可能性がある。一方、K に関しては、WNK-OSR/SPAK-NCC 系の活性化は腎からの K 排泄に対しては減少させる方向に働くため(PHAI は高 K 血症を呈する)、低 K によりこの系が活性化されるのは合目的である可能性がある。この系の尿細管での下流に存在する上皮型 Na チャネルの系は、その活性化が K 分泌に働くため、WNK-OSR/SPAK-NCC 系とは NaCl を体内に保持するという意味では同じ方向に働くが、K の動態としては逆になる。この K による WNK-OSR/SPAK-NCC 系の制御は、WNK-OSR/SPAK-NCC 系が NaCl 出納調節のみならず、K 出納調節にも関わる可能性を示唆しており興味深い。

5. 今後の課題

アルドステロンから WNK-OSR/SPAK-NCC 系までの刺激伝導系について、培養細胞にてよい系が作れない以上、マウスの系にてさらに検討を加える。アルドステロンから上皮型 Na チャネルの間には SGK が存在すると言われており、SGK ノックアウトマウスにてこの WNK-OSR/SPAK-NCC 系のアルドステロンによる活性化が減弱するかどう

かを検討する必要がある。そこで、SGK までシグナルがたどれば、その後は SGK から WNK-OSR/SPAK-NCC 系を培養細胞系にて検討できる可能性があると思われる。

低 Cl と低 K 刺激の関係を今後検討する必要がある。予備実験的には、クロライドチャネル阻害薬よりも K チャネル阻害薬の方が低張液による WNK1 キナーゼ活性を有意に抑制する事から、Cl よりも K の細胞内濃度が一番の WNK1 キナーゼ活性の制御因子である可能性が出てきており、今後この点を証明すべく実験が必要となる。また、K の摂取量に応じた WNK-OSR/SPAK-NCC 系の制御機構を生体内で明らかにする必要がある。

文 献

1. Yang SS, Morimoto T, Rai T, *et al.* Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 2007; 5: 331-344.
2. Ring AM, Leng Q, Rinehart J, *et al.* An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4025-4029.
3. Verissimo F, Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 2001; 20: 5562-5569.
4. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, *et al.* WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem* 2005; 280: 42685-42693.

No. 0832

Regulation of WNK4-OSR1/SPAK-NCC Cascade by Dietary Sodium Intake

Shinichi Uchida,

Department of Nephrology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

Tatemitsu Rai,

Department of Blood Purification, Tokyo Medical and Dental University.

Summary

Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) is an autosomal-dominant disorder characterized by hyperkalemia, acidosis, and hypertension. We recently found the activation of WNK-OSR1/SPAK-NaCl cotransporter (NCC) kinase cascade in the *Wnk4^{D561A}* knockin mice, a mouse model of PHAII. Phosphorylated NCC was concentrated on the apical plasma membranes of the distal tubules in the kidneys, resulting in increased thiazide-sensitive volume expansion and hypertension. To investigate whether this phosphorylation cascade is involved in physiological situations in addition to the disease state (PHAII), we measured the phosphorylation status of OSR1/SPAK and NCC in mice that were fed low-, normal-, and high-sodium diets. We found that the phosphorylation of OSR1/SPAK and NCC was increased by a low-sodium diet and decreased by a high-sodium diet and that this regulation by dietary sodium intake was completely lost in the *Wnk4^{D561A}* knockin mice. The increased phosphorylation under low-sodium diet was inhibited by spironolactone infusion, and the decreased phosphorylation under high-sodium diet was reversed by exogenous aldosterone infusion. Thus, the WNK4-OSR1/SPAK-NCC cascade is a novel effector system of aldosterone in the kidneys that regulates the body's sodium balance.