

発表番号 49 (0528)

腎臓での新たな食塩出納調節因子 WNK キナーゼと 高血圧症との関連についての研究

内田 信一 (東京医科歯科大学大学院腎臓内科学)

WNK キナーゼは偽性低アルドステロン症 typeII (PHAII)の原因遺伝子であることが positional cloning 法で明らかにされ、その機能が注目されているキナーゼである。PHAII は優性遺伝形式の遺伝性高血圧疾患であり、腎臓での過剰な NaCl 再吸収がその病態として想定されていた。原因遺伝子が明らかになったものの、なぜこのキナーゼの変異が高血圧症を引き起こすのかは全く明らかになっていない。WNK は構造的にはセリン・スレオニンキナーゼであるが、その機能、生理的標的分子(リン酸化基質)も未だ包括的に同定されていない。したがってこの分子の機能およびその変異が本疾患を引き起こすメカニズムの解明は、腎臓でのイオン輸送、高血圧発症の新たなシグナル伝達系を明らかにすることにつながり、新たな高血圧症に対する創薬ターゲットの発見にもつながる。

本研究では、腎臓における WNK キナーゼの役割を、細胞培養系、遺伝子操作動物において明らかにすることで、腎臓がかかわる食塩感受性高血圧症の新たな分子メカニズムを解明することを目的とする。

具体的には、PHAII の病態を説明するクロライドシヤント仮説について、以前我々が PHAII を引き起こす変異型

WNK4 で確認した作用と同じ効果を WNK1 の過剰発現が持つかどうかを検討した。なぜなら WNK1 の患者解析により発見された変異は、イントロンの欠失で、それにより WNK1 発現が増加することが示されているためである。その結果、

- 1) WNK1 発現が、細胞での細胞間クロライド透過性を増加すること。
- 2) その際に、MDCKII 細胞の claudin 4 のリン酸化を増強させること。を見いだした。

このことは、WNK1 過剰発現と変異型 WNK4 が同様の機能を持ち、生体内でも遠位側尿管でクロライドシヤントを増大させ、PHAII を引き起こしている可能性が示唆された。また、この WNK1 の作用は、WNK4 の有無に影響されず、WNK1 と WNK4 の関係は、今までいわれているような、WNK1 が WNK4 を制御する関係というよりは、並列的な関係であることを示唆していた。

今後、これら培養細胞系での知見をふまえ、生体内での真の病態を探るため、WNK1 トランスジェニックマウスと WNK4 ノックインマウスを作成すべく、その DNA コンストラクションを行い、完了した。

助成番号 0528

腎臓での新たな食塩出納調節因子 WNK キナーゼと高血圧症との関連についての研究

内田 信一 (東京医科歯科大学大学院腎臓内科学)

1. 研究目的

WNK キナーゼは偽性低アルドステロン症 typeII (PHAII)の原因遺伝子であることが positional cloning 法で明らかにされ、その機能が注目されているキナーゼである。PHAII は優性遺伝形式の遺伝性高血圧疾患であり、腎臓での過剰な NaCl 再吸収がその病態として想定されていた。原因遺伝子が明らかになったものの、なぜこのキナーゼの変異が高血圧症を引き起こすのかは全く明らかになっていない。WNK は構造的にはセリン・スレオニンキナーゼであるが、その機能、生理的標的分子(リン酸化基質)も未だ包括的に同定されていない。したがってこの分子の機能およびその変異が本疾患を引き起こすメカニズムの解明は、腎臓でのイオン輸送、高血圧発症の新たなシグナル伝達系を明らかにすることにつながり、新たな高血圧症に対する創薬ターゲットの発見にもつながる。

本研究では、腎臓における WNK キナーゼの役割を、細胞培養系、遺伝子操作動物において明らかにすることで、腎臓がかかわる食塩感受性高血圧症の新たな分子メカニズムを解明することを目的とする。

2. 研究方法

2.1 細胞培養

野生型 MDCKII 細胞、および WNK4 安定発現 MDCKII 細胞(1)において、ヒト WNK1 強制発現安定細胞株を樹立した(Fig. 1)。WNK1cDNA の N 末に 3xFlag エピトープを挿入し、Zeocin 耐性発現ベクターを使用した(pCDNA3.1+ Zeo)。

2.2 クロライド透過性測定

文献1に報告した方法と同様に、樹立した細胞株の経上皮クロライド透過性を ^{36}Cl を用いて測定した。経上皮抵抗 (TER) MilliCell-ESR (ミリポア社)を用いて測定した。

2.3 claudin 4 リン酸化の検出

樹立した安定細胞株に claudin 4 発現ベクターを一過性にトランスフェクションし、その細胞を ^{32}P -リン酸でラベルした。claudin 4 へのリンの取り込みを、タグである Flag に対する抗体で免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、

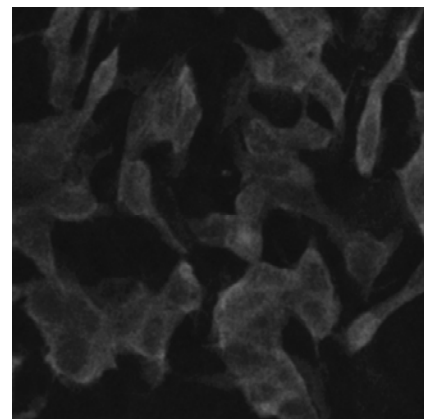
autoradiography にて検出した。

2.4 内因性 claudin 4 のリン酸化の検出

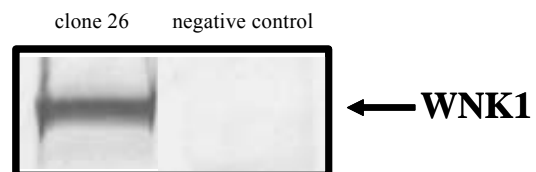
安定発現細胞より調整した cell lysate を抗 claudin 4 抗体 (Zymed 社)にて免疫沈降し、SDS-PAGE, Western blot 後、抗セリン、抗スレオニン抗体でリン酸化蛋白を検出した。

2.5 ターゲッティングベクターの作成

WNK4 のミスセンス変異体発現ノックインマウスを作成するため、そのためのターゲッティングベクターを作成した。Homologous recombination 後、ネオマイシン耐性遺伝子を取り除けるようにネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを lox-p 配列で挟む構造とした。



Cytosolic localization of WNK1 was observed.



WNK1 was detected by anti-FLAG (M2) antibody.

Fig. 1 Immunofluorescence and western blot of WNK1 in MDCKII cells

3. 研究結果

3.1 WNK1 発現の細胞間クロライド透過性に対する作用

MDCKII 細胞、ならびに以前樹立した WNK4 発現

MDCKII 細胞に、WNK1 発現安定細胞株を樹立出来た。これら細胞を用いて、経上皮クロライド透過性を測定したところ、WNK1 発現により有意にクロライド透過性が亢進した (Fig. 2)。このクロライド透過性上昇は WNK4 発現の有無には影響されなかった。また TER の上昇も伴っておらず、主要なイオン透過性を担うナトリウムの透過性には、WNK1 発現は影響していない可能性が高かった。

3. 2 WNK1 発現の claudin 4 リン酸化に対する作用

claudin 4 は WNK1,4 の発現する皮質集合管での主要な claudin である。以前我々は、変異型 WNK4 が claudin を強くリン酸化することを見いだした⁽¹⁾。今回、WNK1 発現は、claudin 4 リン酸化を増強した (Fig. 3)。また、その作用は、強制発現した claudin のみならず、MDCKII 細胞の内因性の claudin 4 でも確認され、その生理的、病態的意義が強まった。

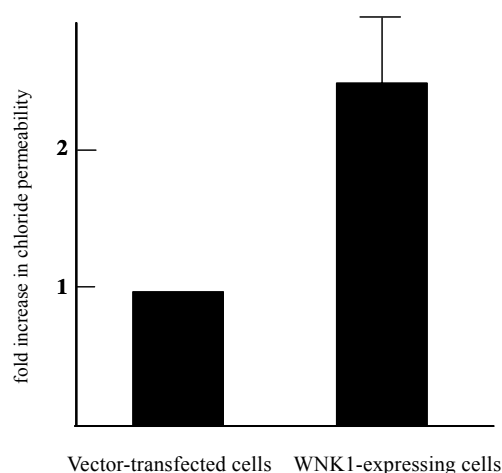


Fig. 2 Increased chloride permeability in WNK1-expressing cells

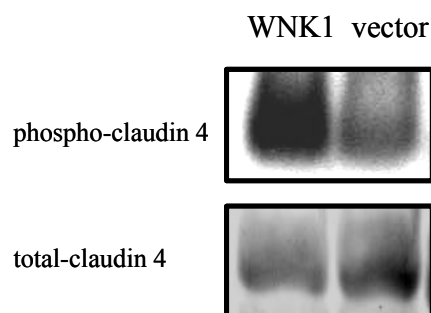


Fig. 3 Increased claudin 4 phosphorylation in WNK1-expressing cells

COS7 cells transiently transfected with HA-tagged claudin 4 and FLAG-tagged WNK1 or an empty vector were labeled with ³²P-phosphate. Cell lysates were immunoprecipitated with HA-agarose, and the phosphorylated claudin 4 was visualized by autoradiography.

4. 考察ならびに今後の課題

偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) は、WNK4 のミスセンス変異、WNK1 のイントロン変異がその原因として報告されている。PHAII は遠位側尿細管上皮でのクロライド透過性が上昇することがその原因の一つとして考えられており、我々はすでに WNK4 の変異体が、このクロライドシャント仮説を支持するように、細胞間のクロライド透過性を上昇させることを見いだしている⁽¹⁾。この際に、細胞間イオン透過性の電解質バリアーである claudin をリン酸化することも見いだしており、WNK4 に変異が入ると claudin を過剰にリン酸化し、それが claudin に何かしらの構造変化をきたし、細胞間イオン透過性を変える可能性があるかと推測している。今回、WNK1 について、同様の検討を行った。WNK1 の患者で見つかったイントロン変異は、その発現を増強させることが判明している。よって、WNK1 過剰発現の有無で、クロライド透過性に変化をきたすかを検討したが、その結果、変異 WNK4 で見られたようなクロライド透過性上昇が確認された。さらに、claudin のリン酸化増大も確認され、変異 WNK4 と同様の現象が WNK1 強制発現で引き起こされる事が明らかとなった。この際、野生型 WNK4 発現の有無は、WNK1 強制発現の結果に影響しないことから、WNK1 の下流に WNK4 が存在する可能性は低いと考えられた。

この様に PHAII の病態として、クロライドシャント仮説を支持するデータが WNK1 でも初めて得られた。しかしながら、変異 WNK4 に関しては、細胞間クロライド透過性亢進以外にも、経細胞のクロライド輸送を担う輸送体たんぱくを制御しているというデータも出されている。これらは主に、*Xenopus oocyte* を用いた強制発現系であり、我々は最近サイアザイド感受性 NaCl 輸送体や ROMK チャネルに対する変異型 WNK4 発現の影響を MDCK 細胞⁽²⁾ やトランスジェニックマウス⁽³⁾ で行ったところ、今までいわれているような作用は確認されなかった。

この様に、PHAII の病因は未だ明らかでなく、我々が MDCK 細胞で明らかにしたクロライドシャントの増加にしても、培養細胞系の過剰発現の影響を完全には否定出来ない。よって、真の病態を明らかにすべく、ヒト患者と同じ変異を持つノックインマウスが必要となる。今回、マウスの樹立に関してここで詳細を報告出来ないが、今後このモデルマウスの解析こそが、この分野での研究の方向性を正しく導くものとなると思われる。

文献

1. Yamauchi K, Rai T, Kobayashi K, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Hayama A, Sasaki S, Uchida S.

- Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 4690-4, 2004.
2. Yang S-S, Yamauchi K, Rai T, Hayama A, Sohara E, Suzuki T, Itoh T, Suda S, Sasaki S, Uchida S: Regulation of apical localization of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter by WNK4 in polarized epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330: 410-414, 2005.
 3. Yamauchi K, Yang S-S, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, and Uchida S: Apical localization of renal K channel was not altered in mutant WNK4 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 750-5, 2005。

0528

Mechanisms of hypertension caused by mutations of WNK kinases, novel regulators of NaCl handling in the kidney

Shinichi Uchida

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

Summary

Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII), known as Gordon syndrome, is an autosomal dominant disorder characterized by hypertension, hyperkalemia, and hyperchloremic metabolic acidosis. Recently, positional cloning linked mutations in two homologous protein kinase genes, WNK1 and WNK4 to PHAII.

WNKs [With No Lysine (K)] kinases are recently discovered serine-threonine protein kinases that may play an essential role in the regulation of electrolyte homeostasis. PHA II-causing mutations in the WNK1 gene are large deletions in the first intron that appears to increase WNK1 mRNA expression. On the other hand, mutations in the WNK4 gene are missense mutations that cluster within a span of four amino acids distal to the first putative coil domain.

We have previously reported that a disease-causing mutant WNK4 increased paracellular chloride permeability and claudin phosphorylation in MDCK II cells.

The purpose of this study was to determine whether the increased WNK1 expression had the same effect on paracellular chloride permeability and claudin phosphorylation as the disease-causing WNK4 has.

After generating WNK1-expressing cell lines in MDCKII cells, we measured paracellular chloride permeability and claudin phosphorylation, and found that both were significantly increased by WNK1 overexpression. This suggested that increased chloride shunt induced by WNK1 overexpression or missense mutations of WNK4 might cause PHAII. Further analysis using WNK1 transgenic mice or WNK4 knock-in mice may be necessary for identification of true pathogenesis of this disease.