

# 塩・浸透圧調節分子 WNK シグナル系の中樞神経系の発達と機能における役割

福田 敦夫, 秋田 天平, 渡部 美穂, 石橋 賢

浜松医科大学医学部神経生理学講座

## 概要

### 1. 研究目的

KCC2 と NKCC1 はリン酸化による機能制御を受ける。 $[Cl^-]_i$  の低下は、特異的 N 末端残基における NKCC1 のリン酸化を誘導し、機能的活性化により  $[Cl^-]_i$  を回復する。逆に  $[Cl^-]_i$  の増加は KCC2 による  $Cl^-$  排出を促進し、NKCC1 および KCC2 が  $[Cl^-]_i$  によって相反的に調節される。リン酸化酵素 WNK は、KCC2 と NKCC1 を直接リン酸化する STE20 型キナーゼ (SPAK および OSR1) のリン酸化状態を上流で制御し、KCC2 と NKCC1 に相反的に作用する。すなわち、WNK 下流の SPAK および OSR1 は KCC2 の C 末端部に結合し、リン酸化により KCC2 の  $Cl^-$  輸送能を低下させるが、NKCC1 の N 末端尾部リン酸化は逆に  $Cl^-$  取り込みを促進する。

統合失調症や自閉症などの精神疾患のリスク因子として妊婦の高血圧症が知られるが、興味深いことに、WNK-SPAK/OSR-NKCC1/KCC2 カスケードの異常も確認され、さらに GABA の機能不全の関与も明らかである。そこで、塩-浸透圧調節系と  $Cl^-$  ホメオダイナミクスに着目し、WNK シグナル系が GABA システムを介して、脳組織の発生・分化・シナプス形成と成長後の脳機能や行動にどのような生理的役割を持つのか、関連する遺伝子改変マウス (WNK3-KO, KCC2 疑似リン酸化, KCC2 持続脱リン酸化) を用いて明らかにする。

### 2. 研究方法

#### 2. 1 WNK3-KO マウスを用いた解析

2017 年に開始した探索的研究の結果、内向き整流性 K 電流 ( $K_{ir}$ ) が活性化し、さらに抑制性シナプス活動頻度が上昇し、興奮性シナプス活動頻度は逆に減少していることを見出した。 $[Cl^-]_i$  はむしろ上昇傾向があり、WNK3-KO では何らかの代償機構が働き、逆に SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2 の活性が上昇している可能性もある。そこで、まず  $[Cl^-]_i$  が有意に上昇しているかどうかを確かめ、ついで WNK1, SPAK, OSR1 のリン酸化特異抗体を用いたウェスタンブロットでリン酸化カスケードの状態を確認する。

#### 2. 2 KCC2 疑似リン酸化マウスを用いた解析

SPAK/OSR1 による KCC2 のリン酸化部位である 906 番目と 1007 番目のスレオニン残基をグルタミン酸に置換するミスセンス変異を導入し、この部位が恒常的に疑似リン酸化されているマウス (KCC2-T906E/T1007E) を用いて電気生理学的に  $[Cl^-]_i$  と  $Cl^-$  取り出し能、呼吸性神経活動、歩行様神経活動を記録し、リズム形成を定量的に解析する。また、各種感覚刺激に対する反応を定量的に解析する。

#### 2. 3 浸透圧- $Cl^-$ 調節系遺伝子改変マウスの行動と脳波の解析

KCC2 の SPAK/OSR1 によるリン酸化部位のスレオニン残基をアルギニンに置換するミスセンス変異を導入し、この部位が恒常的に脱リン酸化されているマウス (KCC2-T906A/T1007A) と WNK3-KO マウスに関して、生後 8 週齢で行動と脳波の解析を行い精神疾患フェノタイプとの整合性を評価する。

### 3. 研究結果

### 3. 1 WNK3-KO マウスを用いた解析

WNK3 KO マウスの内側前頭前野 (mPFC) の V 層錐体ニューロンで  $[Cl^-]_i$  が増加していた。NKCC1 および KCC2, さらにその上流・類縁の WNK1 SPAK/OSR1 も含めて、リン酸化状態を生後 21 日目に mPFC から得られた組織で野生型レベルと比較した。総 WNK1 タンパク質およびリン酸化 WNK1, WNK 下流の SPAK および OSR1 とそのリン酸化型, NKCC1 とリン酸化 NKCC1, KCC2 の総タンパクも有意差がなかった。

### 3. 2 KCC2 疑似リン酸化マウスを用いた解析

KCC2 の T906 と T007 の疑似リン酸化マウスを Crispr/Cas9 法で作製した。スパイン形成は正常に認められたが、中隔、視床下部、海馬、大脳皮質の神経分布に異常がみられた。また、神経細胞は十分な  $Cl^-$  排出ができず GABA 作用は *rundown* する。呼吸運動様神経発火はリズムが消失し、実際の呼吸も窮迫した。歩行運動様神経発火も延長した。さらに、触・痛・前庭刺激により容易にけいれん重積を起こすが、刺激による GABA 作用の *rundown* が関係すると考えられた。KCC2 の T906 と T007 が胎生期の適切な時期に脱リン酸化して機能を得て GABA 作用を調整することが、胎仔脳の正常な発達に必須であることを示した。

### 3. 3 浸透圧- $Cl^-$ 調節系遺伝子改変マウスの行動と脳波の解析

KCC2 の 906 番目と 1007 番目の脱リン酸化状態を模倣した  $Kcc2^{T906A/T1007A}$  マウス ( $Kcc2^{A/A}$ ) を作製した。行動解析を行った結果、社会性には影響がみられなかったが、社会的新奇探索性の低下が認められた。また、不安様行動の低下、驚愕反応の低下が認められたが、聴力が低下している可能性もある。さらに、脳波では波帯域の減少があった。自発的活動量、強迫的繰り返し行動、痛覚感受性、体重、呼吸数には野生型マウスと  $Kcc2^{A/A}$  マウスで差がみられなかった。WNK3 KO マウスではプレパルス抑制に有意な低下が認められた。

## 4. 考察

KCC2 の T906 と T1007 が胎生期にリン酸化状態から発達にともなって適切に脱リン酸化されて GABA 作用が調整されることが、正常な脳発達に必須であることが示された。また KCC2 機能が過剰亢進し、GABA 抑制が過大になると、不安と恐怖に対する感受性低下、認知機能などに変化がみられる可能性が考えられる。WNK3 は V 層錐体ニューロンへの興奮-抑制バランス、前頭前野の機能的出力に重要なことが分かった。

## 5. 今後の課題

WNK3 KO でニューロンのみを培養しての分析、KCC2 のリン酸化抗体を作製しての 906 番 1007 番のリン酸化の確認、活性型の二量体の割合など、KCC2 機能に対する WNK3 の影響をさらに分析する必要がある。

### 1. 研究目的

興奮性神経伝達物質のグルタミン酸と抑制性神経伝達物質の GABA による興奮-抑制バランスの崩壊と過剰興奮がてんかん原性につながる。グルタミン酸受容体は  $Na^+$  の流入により膜電位を脱分極させ、活動電位を発火(興奮)させる。一方、 $GABA_A$  受容体は  $Cl^-$  チャネルなので  $Cl^-$  の電気化学勾配に従った流入で膜電位を過分極(抑制)させるが、マイナスの静止膜電位のため、陰イオンの  $Cl^-$  は反発力を受ける。そのため、もし  $[Cl^-]_i$  が高い(化学勾配が小さい)と外向きの電気勾配によって  $Cl^-$  は細胞から押出され膜電位を脱分極させるので、GABA は時として興奮性にもなる。これを *Cl^-* ホメオダイナミクスと呼び、細胞外へ

$Cl^-$  を排出する KCC2 と、細胞内に  $Cl^-$  を取込む NKCC1 の 2 種の  $Cl^-$  トランスポーターにより制御される<sup>(1,2)</sup>。

GABA はフィードフォワードないしフィードバック性に興奮性シナプス伝達を抑制するが、*Cl^-* ホメオダイナミクスでは、 $[Cl^-]_i$  の一過性上昇が  $Cl^-$  透過の方向を逆転させ、GABA 作用の抑制から興奮への逆転を起こし、多くの回路を巻き込む発振の空間的リクルートメントを起こし得ると考える。実際、シナプス入力路を高頻度刺激すると、てんかん発作波様後発射が記録され、この間  $[Cl^-]_i$  上昇が持続し GABA 反応は興奮性に逆転する。これは、大量に放出された GABA により  $GABA_A$  受容体- $Cl^-$  チャネルから大量の  $Cl^-$  が流入し、その結果  $[Cl^-]_i$  が上昇して GABA 作用

が興奮性に逆転したためである<sup>(3)</sup>。したがって、流入したCl<sup>-</sup>を速やかに汲み出す KCC2 は発作抑制に極めて重要である。

また、未熟な神経細胞ではNKCC1がKCC2より優位で、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が高く維持されているため、幼若脳では同期的興奮が起りやすく(新生児けいれん)NKCC1の阻害薬が奏効する場合がある。しかし、1歳未満発症の熱性けいれん<sup>(4)</sup>や遊走性焦点発作を伴う乳児てんかん<sup>(5,6)</sup>においてもKCC2の変異が報告され、特発性てんかん(IGE)<sup>(7)</sup>の他、新生児や乳児のてんかんにおいてもKCC2機能低下が原因の可能性もある。さらに、統合失調症(Schizophrenia)や自閉症(ASD)などの脳の広範な発達障害が関与する疾患でもKCC2変異の報告が相次ぎ、KCC2が機能するのは成長後とする従来の考えを再検討する必要がでてきている<sup>(8)</sup>。さらに、シナプス形成前では傍分泌的に細胞外GABAやタウリンの濃度勾配が形成されており、GABA<sub>A</sub>受容体を介して持続性脱分極とCa<sup>2+</sup>振動を誘発し、神経発生の促進もしくは抑制、皮質板細胞の移動の減速ないし加速、GABA細胞の移動の促進等を起こすが、いずれの場合のGABA作用も高い[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>により脱分極性であることが必要で、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が低下してGABA作用が過分極性になると、これらの作用は消失する。また、GABA作動性興奮

は、シナプス形成や強化にも関与し、神経回路の発達に重要な役割を果たす<sup>(2,9)</sup>。

KCC2とNKCC1はリン酸化による機能制御を受ける。NKCC1は[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の変化に敏感で、生理的セットポイント濃度を下回る[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の低下は、特異的N末端残基におけるNKCC1のリン酸化を誘導し、機能的活性化により[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>を回復する。逆に[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の増加はKCC2によるCl<sup>-</sup>排出を促進し、NKCC1およびKCC2が[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>によって相反的に調節されることを示している。塩分感受性遺伝性高血圧症の原因遺伝子として同定されたリン酸化酵素WNKは、単一の遺伝子異常で塩分感受性高血圧を引き起こす分子であり、KCC2とNKCC1を直接リン酸化するSTE20型キナーゼ(SPAKおよびOSR1)のリン酸化状態を上流で制御する[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>感知調節経路として機能する。WNKはKCC2とNKCC1に対して相反的に作用することで生理的に協調させている。すなわち、WNK下流のSPAKおよびOSR1はKCC2のC末端部に結合し、リン酸化によりKCC2のCl<sup>-</sup>輸送能を低下させるが、NKCC1のN末端尾部リン酸化は逆にCl<sup>-</sup>取り込みを促進する(図2)<sup>(2)</sup>。実際、塩分負荷はWNKのリン酸化を低下させ、その下流のOSR1とSPAKのリン酸化を抑制し、更にその下流のNKCC1活性の低下と<sup>(10)</sup>、KCC2活性の上昇をもたらす塩分貯留を調節する<sup>(11)</sup>。

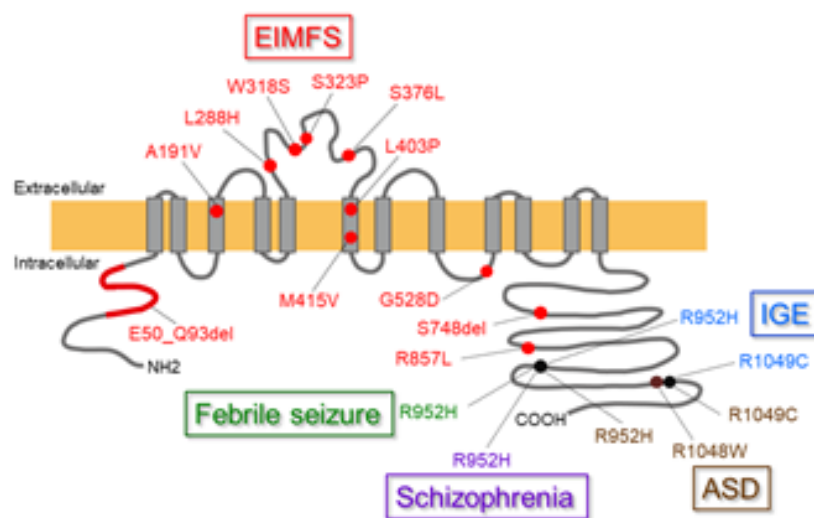
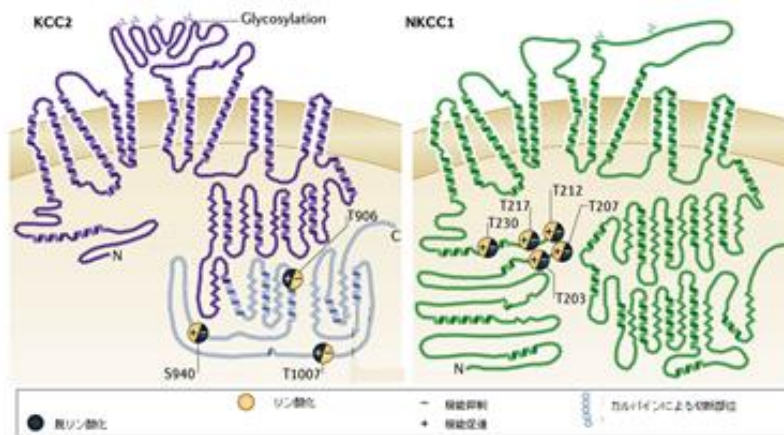


図1: 精神・神経疾患の原因となるKCC2の変異部位。変異部位の色は疾患名の色と対応させてある。(Fukuda & Watanabe, *Brain Res* in press)



**図 2: KCC2 および NKCC1 の構造とリン酸化部位.** KCC2 のスレオニン残基 T906 および T1007 における脱リン酸化, およびセリン残基 S940 のリン酸化は機能的活性化をおこす. すなわち, プロテインキナーゼ C (PKC) による S940 のリン酸化は KCC2 の膜での安定的局在を促進する. 一方, KCC2 輸送機能は SPAK/OSR1 キナーゼによる T906 および T1007 のリン酸化, プロテインホスファターゼ 1 (PP1) による S940 の脱リン酸化によって阻害される. SPAK および OSR1 による NKCC1 の N 末端残基リン酸化は機能的活性化をもたらす. 一方, PP1 による NKCC1 の N 末端のスレオニン残基の脱リン酸化は Cl<sup>-</sup> 輸送機能を抑制する. カルパインは KCC2 の C 末端フラグメント (~30kDa) を切断する. KCC2 および NKCC1 における糖鎖付加部位も示す. (福田, *Clinical Neuroscience* 2018)

脳の形成・発達は神経細胞の発生・移動・シナプス形成の各段階を経るが, これらの諸段階で遺伝的因子と環境的因子により正常発達からの軽微な逸脱が生じうる. 統合失調症や自閉症など, 脳機能の広汎な発達の障害が基盤にあると考えられる精神疾患では, 胎児期の脳発達は極めて重要な意味を持ち, 環境因子は遺伝子発現を修飾, あるいはその異常を増幅し病態形成に影響する. 統合失調症や自閉症などの精神疾患のリスク因子として妊婦の高血圧症が知られるが<sup>(12)</sup>, 興味深いことに, WNK-SPAK/OSR-NKCC1/KCC2 カスケードの異常も確認され<sup>(13,14)</sup>, さらに GABA の機能不全の関与も明らかである<sup>(15,16)</sup>. そこで, 塩-浸透圧調節系と Cl<sup>-</sup> ホメオダイナミクスに着目し, WNK シグナル系が GABA システムを介して, 脳組織の発生・分化・シナプス形成と成長後の脳機能や行動にどのような生理的役割を持つのか, 関連する遺伝子改変マウス (WNK3-KO, KCC2 疑似リン酸化, KCC2 持続脱リン酸化) を用いて明らかにする.

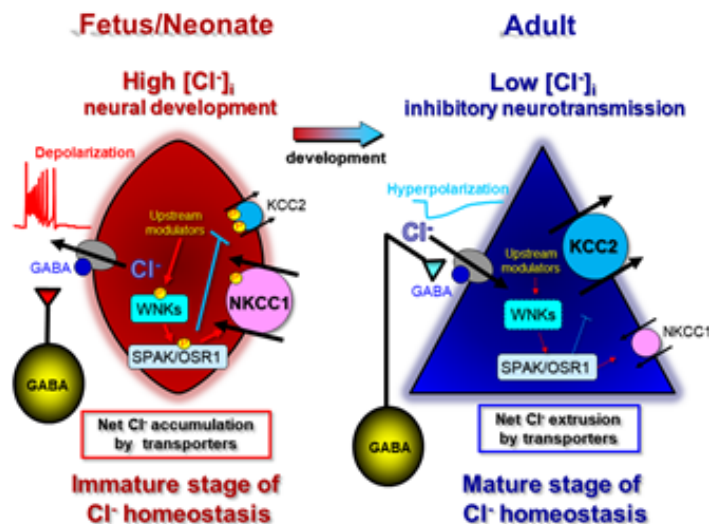
## 2. 研究方法

塩分-血圧調節機構において食餌塩分量や浸透圧に対して浸透圧-Cl<sup>-</sup> 調節系の WNK-SPAK/OSR1 のリン酸

化カスケードが応答し, 下流の NKCC1/KCC2 の活性を変化させて [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を調節し, その結果 GABA<sub>A</sub> 受容体-Cl<sup>-</sup> チャネルのアゴニスト (GABA やタウリン) への応答を変化させる. さらに, WNK-SPAK/OSR1 の上流で作用する種々の因子や発達の影響も加わり, この GABA 作用の切替が, 神経回路の発達・可塑性や生理機能あるいは病態に深く関わる<sup>(図 3)</sup>. そこで, この経路の影響を明らかにするため, 関連遺伝子の改変マウスを用い, 脳の構造と機能の分子生物学的・イメージング/電気生理学的・行動学的解析を行う.

### 2. 1. WNK3-KO マウスを用いた解析

WNK3 は X 染色体上にあるので, ヘテロ型メス WNK3 (X<sup>+</sup>X) とノックアウトオス WNK3 (X<sup>-</sup>Y) を交配し, 出生したオスの野生型 WNK3 (X<sup>+</sup>Y) とノックアウト WNK3 (X<sup>-</sup>Y) を比較する (東京医科歯科大内田教授より譲渡後繁殖中). 2017 年に開始した探索的研究の結果, 内向き整流性 K 電流 (Kir) が活性化し, さらに抑制性シナプス活動頻度が上昇し, 興奮性シナプス活動頻度は逆に減少していることを見出した. 原因として WNK 下流の SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2 の活性の低下を考えたが, グラミジジンパッチクランプ法で測定した [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> はむしろ上昇



**図 3: WNK-SPAK/OSR1 シグナルの発生的変化と上流因子.** WNK-SPAK/OSR1 を制御する上流因子として知られるのは:細胞内外のイオン, 酸化ストレス, NO, レプチンそしてタウリンである. 未熟な神経細胞では, タウリン輸送体で取り込まれたタウリンが WNK を活性化して SPAK/OSR1 をリン酸化し, その結果 KCC2 と NKCC1 のリン酸化による KCC2 活性の低下と NKCC1 活性の上昇による $[Cl^-]_i$  上昇をもたらす. 成長すると, 脳のタウリンもタウリン輸送体も減り, KCC2 や NKCC1 に対する働きも低下する. (Inoue et al., *J Biol Chem* 2012; Fukuda & Watanabe, *Brain Res* in press)

傾向があり, 仮説と矛盾していた。偶然同時期に, OSR1 によるリン酸化が Kir 機能を抑制することが報告され<sup>(17)</sup>, 我々の $[Cl^-]_i$ の結果も併せて考えると, WNK3-KO では何らかの代償機構が働き, 逆に SPAK/OSR1-NKCC1/KCC2 の活性が上昇している可能性もある。そこで, まず $[Cl^-]_i$ が有意に上昇しているかどうかを確かめ, ついで WNK1, SPAK, OSR1 のリン酸化特異抗体 (Dundee 大, Alessi 博士より提供済み)を用いたウェスタンブロットでリン酸化カスケードの状態を確認する。

## 2. 2. KCC2 疑似リン酸化マウスを用いた解析

SPAK/OSR1 による KCC2 のリン酸化部位である 906 番目と 1007 番目のスレオニン残基をグルタミン酸に置換するミスセンス変異を導入し, この部位が恒常的に疑似リン酸化されているマウス (KCC2-T906E/T1007E) を Yale 大 Kahle 博士から譲渡され繁殖中である。2017 年に開始した探索的研究の結果, 神経細胞移動に異常が認められたが, 細胞個々の形状はスパイン形成を含め正常であった。そこでグラミジシンパッチクランプを用いて電気生理学的に $[Cl^-]_i$ と  $Cl^-$ み出し能を定量的に解析する。マウスは全例生後1週以内に死亡し, 呼吸の異常が示唆されたので, 頸神経より記録される自発性呼吸リズムを定量的に解析する。また, 腰神経より歩行様神経活動も記録し, 興奮

抑制バランスが必須とされるリズム形成を定量的に解析する。また, 明らかな自発痙攣は示さないが, 刺激誘発性の痙攣がないか生後数時間以内で, 触覚, 痛覚, 前庭・固有感覚などの各種感覚刺激に対する反応を定量的に解析する。

## 2. 3. 浸透圧- $Cl^-$ 調節系遺伝子改変マウスの行動と脳波の解析

KCC2 の SPAK/OSR1 によるリン酸化部位のスレオニン残基をアルギニンに置換するミスセンス変異を導入し, この部位が恒常的に脱リン酸化されているマウス (KCC2-T906A/T1007A) を Yale 大 Kahle 博士と 2018 年に共同開発し研究に着手している。残念ながら競合グループにより, 抗けいれん作用に関しては論文化された<sup>(18)</sup>。そこで, KCC2-T906A/T1007 マウスと WNK3-KO に関して, 生後 8 週齢で以下のごとく行動と脳波の解析を行い精神疾患フェノタイプとの整合性を評価する。社会的行動評価:マウス 2 匹をオープンフィールド内に置き, 自発的積極的接触行動に費やす時間を測定し, 社会的行動を評価する。ビデオ画像行動解析ソフトウェア (Panlab S.L.U., SMART 3.0) 使用。認知機能評価:空間的参照記憶課題で場所学習機能を評価し, さらに報酬コーナーを変える逆転学習課題を行う。また, 空間的作業記憶課題を与え

て、作業記憶障害の評価を行う。自動行動解析装置 (NewBehavior AG, IntelliCage) 使用。衝動性・注意機能評価: 報酬に対してランダムに遅延時間が挿入され、反応時間の潜時で衝動性・注意機能の評価する。また、遅延価値割引課題でさらに詳しく衝動性を評価する。IntelliCage 使用。感覚運動系機能評価: 聴覚刺激に対する驚愕反応の先行刺激による抑制 (prepulse inhibition, PPI) を測定する (マウス用 PPI 測定装置, San Diego Instruments)。脳波解析: 自閉症や統合失調症では脳波の  $\gamma$  振動が異常を示すので<sup>(19)</sup>, 脳波の  $\gamma$  帯成分をパワースペクトラムで解析する (有線・無線記録解析システム PowerLab/LabChart Pro)。

### 3. 研究結果

#### 3. 1. WNK3-KO マウスを用いた解析

WNK3 KO マウスの内側前頭前野 (mPFC) の V 層錐体ニューロンからグラミシジンパッチクランプ法で測定した  $E_{GABA}$  は有意に脱分極側にシフトしており,  $[Cl]_i$  の増加を確かに示していた。このことより NKCC1 および KCC2 のリン酸化状態の変化が示唆されたので, さらにその上流・類縁のセリンスレオニンキナーゼ WNK1・SPAK/OSR1 も含めて, タンパク量とリン酸化状態を生後 21 日目に mPFC から得られた組織ホモジネートからウエスタンブロットで野生型レベルと比較した。WNK3 の削除に対する代償の上昇の可能性のある総 WNK1 タンパク質レベルおよび 382 番セリンのリン酸化 WNK1 の発現レベルに有意な差はなかった。さらに, WNK 下流の SPAK および OSR1 レベルや機能活性化に重要なリン酸化型 (SPAK pS373, OSR1 pS325) はともに変化していないことがわかった。さらに, NKCC1 とその機能活性型のリン酸化 NKCC1 (pT206) 量も総 NKCC1 レベルに対する pT206 NKCC1 の割合も変化していないことがわかった。さらに KCC2 の総タンパク質レベルも変化しなかった。

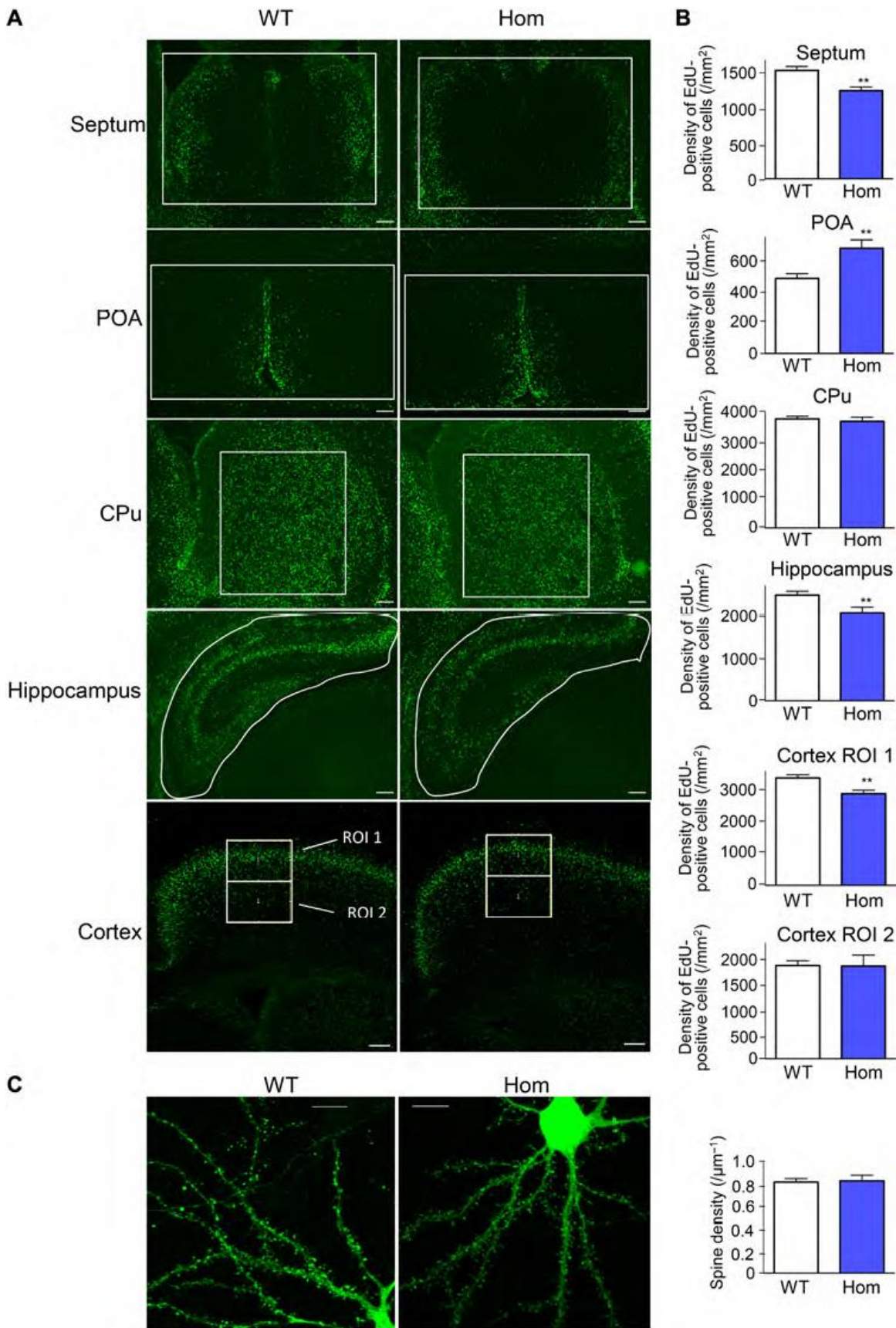
#### 3. 2. KCC2 疑似リン酸化マウスを用いた解析

リン酸化による KCC2 機能制御の役割について個体レベルで明らかにするために, KCC2 の 906 番目 (Thr<sup>906</sup>) と 1007 番目 (Thr<sup>1007</sup>) のスレオニン残基をグルタミン酸に置換し, この部位のリン酸化状態を模倣し, 発達に伴う脱リン酸化を妨げた遺伝子改変マウス (Kcc2<sup>EE</sup> マウス) を作製し, 解析を行った。Kcc2<sup>EE</sup> マウスは生後 10 時間前後で死亡し

た。スパイン形成は正常に認められたが, 中隔, 視床下部, 海馬, 大脳皮質の神経分布に異常がみられた (図 4)。また, グラミシジン穿孔パッチクランプ法により解析を行った結果, 野生型マウスと比較して, Kcc2<sup>EE</sup> マウスで GABA の平衡電位に差はみられなかったが, ホールセルパッチクランプ法による解析で, KCC2 による  $Cl^-$  の細胞外へのくみ出し能力が低下していることがわかった (図 5)。Kcc2<sup>EE</sup> マウスでは, しっぽをピンセットで軽くつまむ痛覚刺激および筆で背中をなでる接触刺激により, てんかん発作重積が認められた。脊髄第 4 頸神経より記録される自発性の呼吸リズムがみられず, 第 2 腰神経より記録される歩行リズムが乱れていた (図 5)。よって, 発達期に KCC2 の Thr<sup>906</sup> と Thr<sup>1007</sup> のリン酸化が適切に制御されることが, 抑制性 GABA 伝達の形成, 神経発達および生存に必須であることが示唆された。適切な時期に脱リン酸化が起こり, KCC2 が機能し始めないと, GABA 作用が興奮性から抑制性に変化しないため, 興奮性伝達と抑制性伝達のバランスが崩れ, その結果, 生存することができないことが明らかになった。この成果は掲載された *Science Signaling* 誌の表紙を飾り (図 6)<sup>(20)</sup>, Editorial Board により注目論文に選定され, 「FOCUS」に論文の紹介およびコメントが掲載された。

#### 3. 3. 浸透圧- $Cl^-$ 調節系遺伝子改変マウスの行動と脳波の解析

KCC2<sup>T906A/T1007A</sup> マウス (Kcc2<sup>AA</sup>) の行動表現型: KCC2 の 906 番目 (Thr<sup>906</sup>) と 1007 番目 (Thr<sup>1007</sup>) のスレオニン残基をアラニンに置換し, 脱リン酸化状態を模倣した KCC2<sup>T906A/T1007A</sup> マウス (Kcc2<sup>AA</sup>) を作製し, 解析を行った。行動解析を行った結果, Three chambers 社会性テストでは, Kcc2<sup>AA</sup> ヘテロマウスおよび Kcc2<sup>AA</sup> ホモマウスは野生型マウスと同様に, 空のケージを置いたチャンバーよりマウスを入れたケージを置いたチャンバーに長く滞在し, 社会性には影響がみられなかった。馴染みのマウスを入れたケージを置いたチャンバーと新奇のマウスを入れたケージを置いたチャンバーで比較したところ, 野生型マウスは新奇のマウスのチャンバーに長く滞在したが, Kcc2<sup>AA</sup> ヘテロ, ホモマウスは両方のチャンバーに同程度の時間滞在し, 社会的な新奇探索性の低下が認められた。また, 高架式十字迷路試験では野生型マウスと比較して Kcc2<sup>AA</sup> ヘテロ, ホモマウスはオープンアームでの滞在時間が長く



**Fig 4:** Developing *Kcc2E/E* mouse brains exhibit anomalous distribution of proliferating neurons but normal dendritic spine morphology.

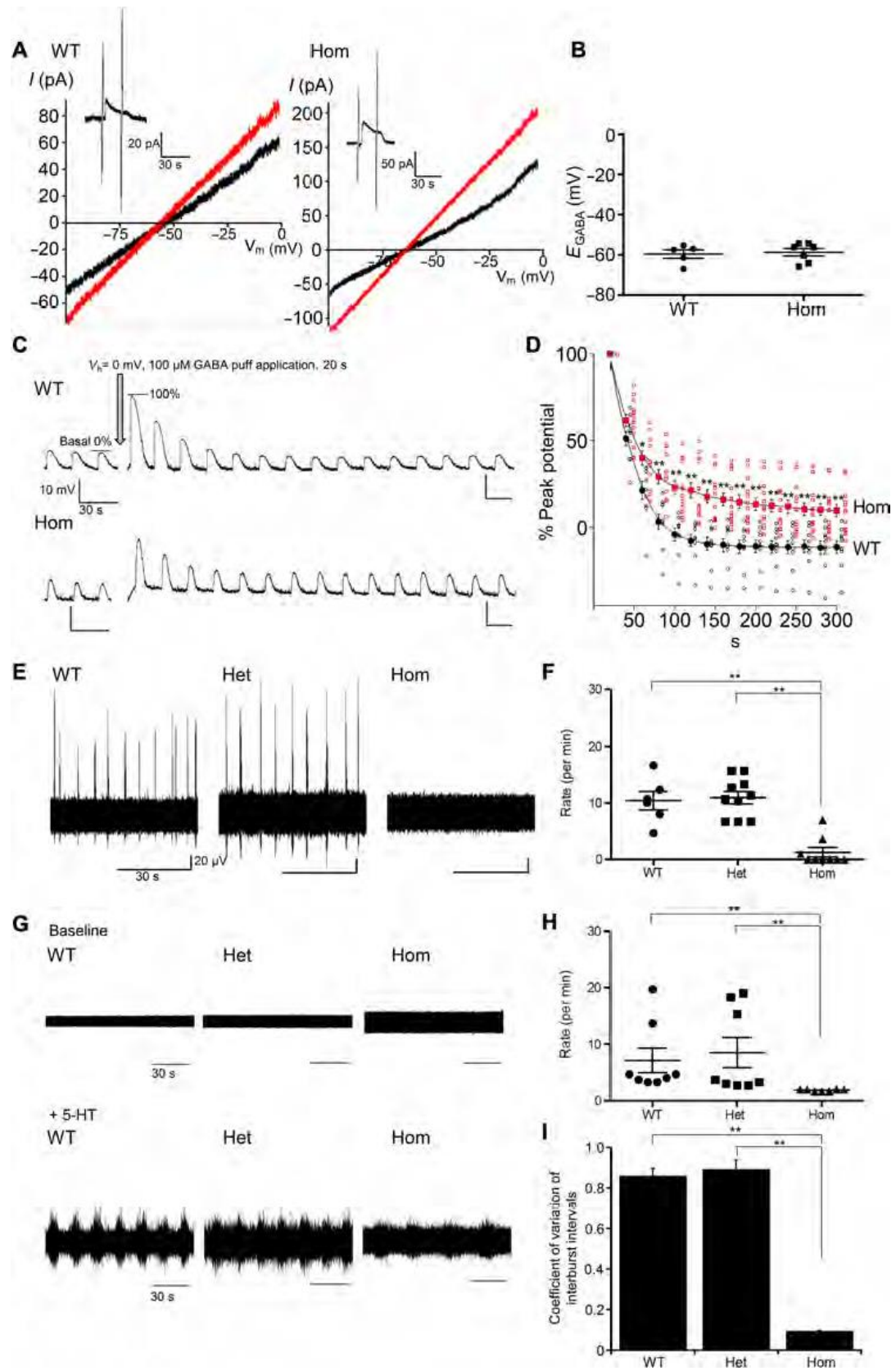


Figure 5: *Kcc2E/E* neurons exhibit impaired GABA-dependent Cl<sup>-</sup> extrusion and disrupted rhythogenesis.



、不安様行動の低下が認められた。驚愕反応テストでは  $KCC2^{AA}$  ヘテロ、ホモマウスは 90 - 100dB の音に対して驚愕反応を示す回数が少なく、驚愕反応の低下が認められた。驚愕反応を示すための筋力の低下を考え、ワイアハンダテストを行ったが、筋力には差がみられなかったことから、 $Kcc2^{AA}$  マウスでは聴力が低下している可能性が考えられた。さらに、脳波を測定した結果、野生型マウスと比較して  $Kcc2^{AA}$  ホモマウスで 45, 80 Hz のパワースペクトル密度の減少、野生型マウスと  $Kcc2^{AA}$  ヘテロマウスと比較して  $Kcc2^{AA}$  ホモマウスで 50 Hz のパワースペクトル密度の減少がみられ、 $Kcc2^{AA}$  マウスで  $\gamma$  波帯域の活動の減少が認められることがわかった。自発的活動量をみるオープンフィールドテスト、強迫的繰り返し行動をみるガラス玉覆い隠し試験、痛覚に対する感受性を調べるフォン・フレイトテスト、体重、呼吸数には野生型マウスと  $Kcc2^{AA}$  マウスで差がみられなかった。

WNK3 KO マウスの行動表現型: WNK3 KO マウスにおいても行動分析を行った。オープンフィールドテストでは、野生型の同腹子と比較してそれぞれのアリーナ中心部とコーナーの滞在時間には差はなく有意差は認められなかった。しかし、音響驚愕に基づくプレパルス抑制テストでは、WNK3 KO マウスにおいて 74dB のプレパルス後の 120dB に対する音響応答の減衰(プレパルス抑制)が完全に喪失しており、有意な低下が認められた。

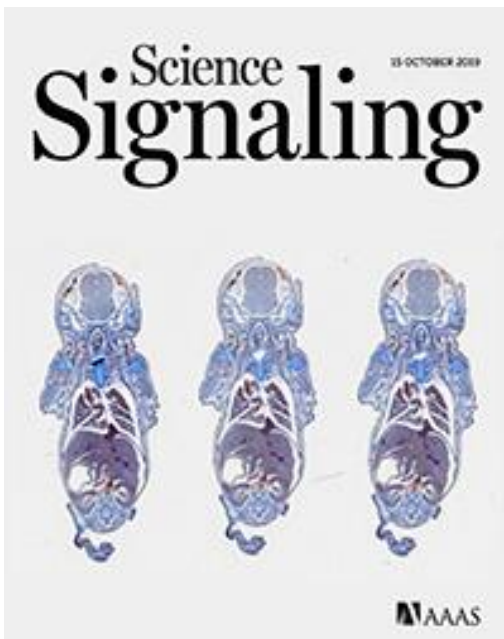


図 6: 我々の  $KCC2$  T906E-T1007E マウスを紹介する *Science Signaling* の表紙 (2019 年 10 月 15 日号)

#### 4. 考察

$Kcc2^{EE}$  マウスの結果から  $KCC2$  の T906 と T007 が胎生期にリン酸化状態から発達にともなって適切に脱リン酸化されて GABA 作用が調整されることが、胎仔脳の正常な発達に必須であることが示された。また、成熟した脳でも  $KCC2$  が正常に機能しないと、 $[Cl]_i$  が高くなり、GABA による抑制作用が低下するので、神経回路の興奮性と抑制性のバランスがくずれることが病因の一つである、てんかんや自閉症、統合失調症などの様々な精神疾患の背景に  $KCC2$  の機能低下による GABA の抑制力の低下が関与している可能性も考えられる。一方で  $Kcc2^{AA}$  マウスの結果から、 $KCC2$  の機能が亢進し、GABA による抑制力が強まることにより、不安と恐怖に対する感受性の低下、社会的新奇探索性の低下がみられることが明らかになった。脳波の  $\gamma$  波は認知や知覚、意識と深い関わりがあり、統合失調症の患者では GABA ニューロンの機能低下により  $\gamma$  波帯域の活動の減少がみられるという報告があることから、 $Kcc2^{AA}$  マウスでは認知機能などに変化がみられる可能性が考えられる。 $Kcc2^{EE}$  マウスと  $Kcc2^{AA}$  マウスは神経回路の興奮-抑制バランス異常のモデルとして、様々な精神疾患の研究に供する価値があると考えられる。

WNK3 KO マウスの成熟ニューロンにおける  $[Cl]_i$  の増加は、カリウムコンダクタンスの  $K_{ir}$  活性化による静止膜電位の深化と併せて考えると、さらに  $Cl$  の流出駆動力を高めることになるので、抑制性シナプス活動頻度上昇と興奮性シナプス活動頻度減少と併せて、V 層錐体ニューロンへの興奮-抑制バランスと SN 比が大きく変わることを示している。また、プレパルス抑制テストは、感覚ゲーティング中の抑制制御の直接的な尺度であり、前頭前野の興奮-抑制バランスの維持は、このプロセスにとって重要であるので、前頭前野の機能的出力に大きな障害があることを示している。これらの要因は、WNK3 KO マウスの行動障害の根底にある可能性がある。

#### 5. 今後の課題

WNK3 KO で錐体ニューロンにおいて  $[Cl]_i$  が増加している原因を解明するには至らなかった。グリアを含むさまざまな細胞タイプで構成される全組織ホモジネートを使用したことが、測定結果に影響を与えた可能性もあり、ニューロンのみを培養するなどしての分析が必要かもしれない

い。また、今回は利用できなかった KCC2 のリン酸化抗体を作製して 906 番 1007 番のリン酸化を確認したり、活性型の二量体の割合など、KCC2 機能に対する WNK3 KO の影響をさらに分析する必要がある。

## 6. 文献

1. Fukuda, A. Chloride Homeodynamics Underlying Pathogenic Modal Shifts of GABA Actions, In: J.L.R. RUBENSTEIN, P. RAKIC, B. CHEN, K.Y. KWAN, H.T. CLINE and J. CARDIN editors: *Comprehensive Developmental Neuroscience 2nd ed: Synapse Development and Maturation*, Cambridge: Academic Press, 2020, pp. 297-316.
2. 福田 敦夫, Cl<sup>-</sup>トランスポーター, *Clinical Neuroscience*: 36: 680-686, 2018.
3. Isomura, Y., Sugimoto, M., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Yamamoto-Muraki, S., Yamada, J., Fukuda, A. Synaptically activated Cl<sup>-</sup> accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 90, 2752–2756, 2003.
4. Puskarjov, M., Seja, P., Heron, S.E., Williams, T.C., Ahmad, F., Iona, X., Oliver, K.L., Grinton, B.E., Vutskits, L., Scheffer, I.E., Petrou, S., Blaesse, P., Dibbens, L.M., Berkovic, S.F., Kaila, K. A variant of KCC2 from patients with febrile seizures impairs neuronal Cl<sup>-</sup> extrusion and dendritic spine formation. *EMBO Rep.* 15, 723-729, 2014.
5. Stödberg, T., McTague, A., Ruiz, A.J., Hirata, H., Zhen, J., Long, P., Farabella, I., Meyer, E., Kawahara, A., Vassallo, G., Stivaros, S.M., Bjursell, M.K., Stranneheim, H., Tigerschiöld, S., Persson, B., Bangash, I., Das, K., Hughes, D., Lesko, N., Lundeberg, J., Scott, R.C., Poduri, A., Scheffer, I.E., Smith, H., Gissen, P., Schorge, S., Reith, M.E.A., Topf, M., Kullmann, D.M., Harvey, R.J., Wedell, A., Kurian, M.A. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat. Commun.* 6, 8038, 2015.
6. Saitsu, H., Watanabe, M., Akita, T., Ohba, C., Sugai, K., Ong, W.P., Shiraishi, H., Yuasa, S., Matsumoto, H., Beng, K.T., Saitoh, S., Miyatake, S., Nakashima, M., Miyake, N., Kato, M., Fukuda, A., Matsumoto, N. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci. Rep.* 6, 30072, 2016.
7. Kahle, K.T., Merner, N.D., Friedel, P., Silayeva, L., Liang, B., Khanna, A., Shang, Y., Lachance-Touchette, P., Bourassa, C., Levert, A., Dion, P.A., Walcott, B., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Hodgkinson, A., Awadalla, P., Nikbakht, H., Majewski, J., Cossette, P., Deeb, T.Z., Moss, S.J., Medina, I., Rouleau, G.A. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Rep.* 15: 766-774, 2014.
8. Fukuda, A., Watanabe, M. Pathogenic potential of human SLC12A5 variants causing KCC2 dysfunction. *Brain Res.*, 1710: 1-7, 2019.
9. Watanabe M and Fukuda A. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9: 371, 2015.
10. Zeniya, M., Sohara, E., Kita, S., Iwamoto, T., Susa, K., Mori, T., Oi, K., Chiga, M., Takahashi, D., Yang, S., Lin, S., 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.
11. Kahle, K.T., Rinehart, J., de Los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., Hebert, S.C., Gamba, G., Gimenez, I., Lifton, R.P. WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16783–16788, 2005.
12. Laurens, K.R., Luo, L., Matheson, S.L., Carr, V., Raudino, J.A., Harris, F., Green, M.J. Common or distinct pathways to psychosis? A systematic review of evidence from prospective studies for developmental risk factors and antecedents of the

- schizophrenia spectrum disorders and affective psychoses. *BMC Psychiatry* 15: 205, 2015.
13. Arion, D., Lewis, D.A. Altered Expression of Regulators of the Cortical Chloride Transporters NKCC1 and KCC2 in Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 68:21-31, 2011.
  14. Qiao, Y., Liu, X., Harvard, C., Hildebrand, M., Rajcan-Separovic, E., Holden, J., Lewis, M. Autism-associated familial microdeletion of Xp11.22. *Clin. Genet.* 74: 134-144, 2008.
  15. Peñagarikano, O., Abrahams, B.S., Herman, E.I., Winden, K.D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L.I. Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., Golshani, P., Trachtenberg, J.T., Peles, E., Geschwind, D.H. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* 147: 235-246, 2011.
  16. Fine, R., Zhang, J., Stevens, H. Prenatal stress and inhibitory neuron systems: implications for neuropsychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 19: 641–651, 2014.
  17. Taylor IV, CA, An, S.W., Kankanamalage, S.G., Stippec, S., Earnest, S., Trivedi, A.T., Yang, J.Z., Mirzaei, H., Huang, C.L., Cobb, M.H. OSR1 regulates a subset of inward rectifier potassium channels via a binding motif variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: 3840–3845, 2018.
  18. Moore, Y.E., Deeb, T.Z., Chadchankar, H., Brandon, N.J., Moss, S.J. Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115: 10166-10171, 2018.
  19. Uhlhaas, P., Singer, W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 100–113, 2010.
  20. Watanabe, M., Zhang, J., Mansuri, M.S., Duan, J., Karimy, J.K., Delpire, E., Alper, S.L., Lifton, R.P., Fukuda, A., Kahle, K.T. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival. *Sci. Signal.* 12: eaaw9315, 2019.

## Roles of WNK Signaling Pathway in the Central Nervous System Development and Function.

Atsuo Fukuda, Tenpei Akita, Miho Watanabe, Masaru Ishibashi

Department of Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine

### Summary

We are interested in the Cl<sup>-</sup> homeodynamics regulating GABA actions. We used WNK3 KO mice, since WNK family kinases are essential for signaling cascade regulating Cl<sup>-</sup> concentrations. WNKs are known to phosphorylate KCC2 at two threonine (Thr<sup>906</sup> and Thr<sup>1007</sup>) residues via downstream kinases, SPAK/OSR1. So, we engineered mice with the missense mutations Glu<sup>906</sup> and Glu<sup>1007</sup> (Kcc2<sup>E/E</sup>) to mimic constitutive phosphorylation or with the missense mutations Ala<sup>906</sup> and Ala<sup>1007</sup> (Kcc2<sup>A/A</sup>) to mimic constitutive dephosphorylation. In WNK3 KO, [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> of layer V pyramidal neurons in medial prefrontal cortex (mPFC) was significantly increased. However, NKCC1, pT206 NKCC1, KCC2, WNK1, pWNK1, total SPAK, total OSR1 and pSPAK1/pOSR1 were all unchanged. On the other hand, a significant reduction in pre-pulse inhibition was observed in WNK3 KO mice. Thus, WNK3 was found to be important for excitation-inhibition balance of layer V pyramidal neurons and functional output from mPFC. Kcc2<sup>E/E</sup> mice demonstrated abnormal neuronal distribution but normal dendritic spine formation, status epilepticus provoked by mild physiological stimulation, normal resting [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> but with significantly impaired Cl<sup>-</sup> extrusion capacity after Cl<sup>-</sup> loading, a lack of spontaneous respiratory discharge and an altered locomotor rhythm. Thus, precisely regulated KCC2 Thr<sup>906</sup>/Thr<sup>1007</sup> phosphorylation is essential for activity-dependent Cl<sup>-</sup> extrusion required for normal brain development. Kcc2<sup>A/A</sup> showed normal body weight, normal respiration, normal somatosensory function, normal sociability and normal locomotor activity but demonstrated a tendency of less anxiety and less social novelty. Startle response test showed much less responses by Kcc2<sup>A/A</sup>, we speculate they might have hearing disability, because their muscle power was normal. What interesting is decreases in power of EEG in  $\gamma$  band. Excessive KCC2 function and excessive GABA inhibition may result in decreased sensitivity to anxiety and fear, and cognitive function.