

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 丸山 順一

With No lysine [K] 4 (WNK4)は、偽性低アルドステロン症 II 型(Pseudohypoaldosteronism type II; PHAII)という遺伝性高血圧症の原因遺伝子として同定され、様々なイオンチャネルやイオントランスポータの機能を制御することが知られているプロテインキナーゼである。PHAII 変異を有する WNK4 は腎臓遠位曲尿細管において Na-Cl cotransporter (NCC)のタンパク量増加とリン酸化亢進を引き起こし、NaCl の再吸収を促進して高血圧病態を引き起こすとされている。しかしながら、野生型 WNK4 が NCC に対して活性化または不活性化のどちらの制御を行うのかは不明であり、WNK4 自体の機能制御機構も殆ど明らかにされていない。

申請者所属研究室において新規に同定された Apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3)は ASK1 と高い相同性を有する MAP3K であり、ストレス応答性 MAPK 経路である c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路及び p38 MAPK 経路を活性化する。ASK3 タンパクの臓器ごとの発現をイムブロットで確認した結果、腎臓において強い発現が見られた。そこで、ASK3 の腎臓における機能を明らかにする目的で、申請者所属研究室においてヒト腎臓 cDNA ライブラリーを prey とした酵母ツーハイブリッド法による ASK3 結合分子スクリーニングが行われた。その結果、ASK3 結合分子として WNK4 が同定された。

WNK4 は HEK293A 細胞にて ASK3 と共発現すると、ASK3 のキナーゼ活性依存的にイムブロット上でリン酸化によるバンドシフトを起こした。さらに LC-MS/MS を用いた解析により、この時の WNK4 におけるリン酸化部位の一つとして S575 が同定された。S575 は未知のリン酸化部位であったことから、このリン酸化を介した WNK4 の新たな機能制御機構の存在が示唆された。また、S575 が PHAII 変異部位に一次構造上近接して存在することから、未だ明らかとなっていない WNK4 による PHAII 発症の詳細な分子機構の解明に資する可能性も考えられた。そこで申請者は、WNK4 S575 リン酸化のメカニズム及び生理学的意義、ひいては WNK4 が原因の PHAII 発症機構の解明を目指し解析を行った。以下に本研究により得られた主要な知見をまとめた。

1. ASK3 過剰発現依存的な WNK4 S575 リン酸化は p38 MAPK-MK2/3/5 経路を介する

まず、ASK3 が WNK4 S575 を直接リン酸化するか否かを *in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。その結果、ASK3 による直接の S575 リン酸化は検出されなかった。一方で、マウス腎臓集合管上皮由来細胞株 mIMCD3 細胞において観察される ASK3 過剰発現依存的な WNK4 S575 のリン酸化亢進は p38 MAPK 阻害剤 SB202190 の処置により顕著に減弱した。この結果より、ASK3 過剰発現依存的な WNK4 S575 リン酸化は p38 MAPK 経路の活性化を介することが示唆された。S575 の周辺配列は p38 MAPK の基質コンセンサス配列ではなく、p38 MAPK の下流で活性化する MAPK-activated protein kinase 2/3/5 (MK2/3/5)の基質コンセンサス配列と一致していた。そこで、MK2 が WNK4 S575 を直接リン酸化するか否かを *in vitro* キナーゼアッセイにより検討したところ、MK2 による直接のリン酸化が検出され、上流の他のキナーゼでは検出されなかった。以上の結果より、ASK3 過剰発現依存的な WNK4 S575 リン酸化亢進は p38 MAPK-MK2/3/5 経路を介していることが示唆された。

2. S575 リン酸化は WNK4 の低浸透圧刺激依存的なキナーゼ活性化に必要である

WNK4 のキナーゼ活性についての S575 リン酸化の影響を *in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。その結果、低浸透圧刺激依存的な WNK4 キナーゼ活性亢進が S575A 変異体では有意に減弱していた。この結果より、WNK4 は低浸透圧刺激依存的に活性化し、その活性化に S575 リン酸化が関与する可能性が示唆された。

3. WNK4 は NCC タンパク量を正に制御する

PHAI 発症機構における NCC との関係性を考慮し、WNK4 と NCC を共に内在性に発現するマウス腎臓遠位尿管上皮由来細胞株である mpkDCT 細胞を用いて、WNK4 が NCC に対してどのような制御を行なっているか検討した。RNAi により WNK4 の発現抑制を行ったところ、mpkDCT 細胞内在性 NCC のバンド強度がメインバンド、アグリゲーションバンドともに減弱した。この結果より、WNK4 が NCC のタンパク量を正に制御する可能性が示唆された。また、WNK4 ノックダウン時に見られる NCC タンパク量減少はリソソーム阻害剤処置により部分的に回復することから、WNK4 による NCC タンパク量の正の制御に NCC タンパクのリソソームを介した分解の抑制が関与する可能性が示唆された。

4. WNK4 S575 上流のキナーゼの ASK3 と MK2 も NCC タンパク量を正に制御する

S575 リン酸化の上流のキナーゼである ASK3 と MK2 についても同様の検討を行った。RNAi により ASK3 の発現を抑制したところ、WNK4 の発現を抑制した時と同様に NCC タンパク量の減少が観察された。この NCC タンパク量減少は、S575 の直接のキナーゼとして機能する MK2 の発現抑制によっても観察された。以上の結果から、WNK4 による NCC タンパク量維持制御に S575 リン酸化が関与する可能性が示唆された。

5. WNK4 S575 は低浸透圧低クロライド刺激依存的に ASK3-p38 MAPK 経路を介してリン酸化される

NCC の細胞膜発現量は低浸透圧低クロライド刺激依存的に増加することが報告されており、このタンパク量増加に WNK4 S575 リン酸化による制御が関与する可能性を考えた。そこで、mpkDCT 細胞を用いて WNK4 S575 が低浸透圧低クロライド刺激依存的にリン酸化されるか否かを検討した。その結果、mpkDCT 細胞内在性 WNK4 の S575 が低浸透圧低クロライド刺激依存的にリン酸化される様子が観察された。また、このリン酸化は p38 MAPK 阻害剤である SB203580, SB202190 の処置や RNAi による ASK3 発現抑制により減弱した。以上の結果より、WNK4 S575 は低浸透圧低クロライド刺激依存的に ASK3-p38 MAPK 経路を介してリン酸化され、NCC 細胞膜発現量増加制御に関与する可能性が示唆された。

6. WNK4 は低浸透圧低クロライド刺激依存的な NCC 細胞膜発現量増加に関与する

細胞分画法を用いて細胞膜上に発現する NCC を検出する系を立ち上げ、低浸透圧低クロライド刺激依存的な NCC 細胞膜発現量増加に対する WNK4 の関与を検討した。その結果、WNK4 のノックダウンにより低浸透圧低クロライド刺激依存的な細胞膜成分中の NCC タンパク量増加が減少する様子が観察された。以上の結果より、WNK4 が低浸透圧低クロライド刺激依存的な NCC 細胞膜発現量増加に関与する可能性が示唆された。

本研究において、Wnk4におけるASK3-p38 MAPK-MK経路依存的な新規リン酸化部位としてS575を同定し、そのリン酸化がWnk4のキナーゼ活性制御に関与することを見出した。また、先行研究での過剰発現系による解析からNCCタンパク量の負の制御因子であると考えられてきたWnk4が、腎臓遠位曲尿細管細胞においてNCCタンパク量を正に制御することを見出した。Wnk4のキナーゼ活性制御機構はこれまで殆ど明らかになっておらず、活性制御に関与するリン酸化部位であるS575を同定したことはWnk4キナーゼ活性制御機構の解明において重要な知見であると考えられる。また、Wnk4が実際に機能する場である遠位曲尿細管細胞においてNCCタンパク量を正に制御することを見出したことは、これまでWnk4をNCCの負の制御因子として捉えてきたWnk4研究に一石を投じ、より正確なWnk4の機能の理解に繋がる重要な知見であると考えられる。本研究の結果は以上の二点において意義深いと考えられ、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。