

令和元年6月18日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04837

研究課題名(和文) 翻訳後修飾による腎臓内シグナル伝達機構の解明と慢性腎臓病治療への展開

研究課題名(英文) Intra-renal signaling through post-translational modification as the potential target to counteract kidney diseases

研究代表者

柴田 茂 (Shibata, Shigeru)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60508068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の働きは多様な細胞が有機的に連動することで発揮され、腎臓病では細胞同士の機能連関が障害される。この仕組みの解明を目指し、核内受容体MRとユビキチンリガーゼKLHL3に焦点をあてて解析を行った。その結果、体液量や組成の変化に伴い尿細管細胞の機能が選択的に制御される分子機構が明らかとなってきた。間在細胞ではmTOR/ULK1系を介したMRのリン酸化、遠位尿細管細胞においてはPKC・Calcineurinを介したKLHL3のリン酸化修飾がそれぞれ分子スイッチとして作用し、主細胞の働きと連動することで体液恒常性を維持している。これらの異常が様々な腎疾患の病態に関与する可能性も明らかとなりつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病は本邦の国民病ともいわれており、腎臓病の予後改善に向けて病態基盤の解明と理解が不可欠である。高血圧は慢性腎臓病の主要な進展因子であり、中でもレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の病的な活性化は高血圧の発症と腎臓病の進展の両者に深く関与している。本研究より、腎臓内での翻訳後修飾を介したシグナル伝達機構の詳細と、腎臓病における病的役割が解明されつつある。特にアンジオテンシンIIが様々な尿細管細胞に作用する分子基盤の詳細や、野菜や果物などカリウムを多く含む食物(DASH食)の降圧作用・臓器保護作用の一端が明らかとなってきており、腎・高血圧疾患の診療に有用な情報が蓄積されている。

研究成果の概要(英文)：Global responses of the kidney to physiological perturbations can be determined by the coordinate action of different constituent kidney cells. In this study, we evaluated signaling pathways involved in the cell-selective control of renal tubular cells, especially focusing on mineralocorticoid receptor, a steroid receptor, and the ubiquitin ligase component Kelch-like 3. We found that mineralocorticoid receptor in intercalated cells are selectively controlled by phosphorylation, which is regulated by angiotensin II signaling through mTOR-ULK1 pathway. We also found that Kelch-like 3 acts downstream of angiotensin II and plasma K⁺ alterations, regulating NaCl cotransporter in distal convoluted tubule cells. These effects are integrated to produce appropriate kidney responses in response to the activation of renin-angiotensin-aldosterone system, and the dysregulation of these mechanisms can be involved in fluid and electrolyte abnormalities associated with diverse kidney diseases.

研究分野：腎臓病学

キーワード：リン酸化 ユビキチン・プロテアソーム系 慢性腎臓病 高血圧 膜輸送体 核内受容体 電解質異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

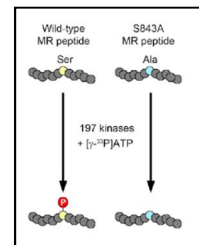
リン酸化やユビキチン化をはじめとする翻訳後修飾(post-translational modification; PTM)は蛋白質の主要な機能制御機構であり、外的環境の変化に応じて迅速に蛋白活性を変化させる分子スイッチとして作用している。糖尿病や高血圧などの生活習慣病と PTM の異常の関連は注目を集めている。我々は以前、アルドステロンの受容体である鉱質コルチコイド受容体(MR)のリガンド結合領域に存在する、リガンドと受容体の結合とシグナル活性化を制御するリン酸化サイト(S843)の存在を明らかにした。本機構は腎集合管間在細胞に選択的に認められ、Cl/HCO₃ 共輸送体 pendrin を制御している。一方で、Boyden・Lifton らによって同定された家族性高血圧性高カリウム血症(偽性低アルドステロン症 II 型; PHAII)の新たな責任遺伝子である KLHL3 の生理的作用を検討し、Ser/Thr キナーゼ WNK がこのユビキチンリガーゼの基質であることを明らかにし、質量分析により WNK4 におけるユビキチン結合サイトを網羅的に同定した。更なる解析にて、アンジオテンシン II (AngII)がプロテインキナーゼ C(PKC)を介して KLHL3 の基質結合領域(S433)をリン酸化することで KLHL3 と WNK4 の会合を抑制することも明らかとなった。

2. 研究の目的

- (1) MR-S843 のリン酸化を担う責任キナーゼを同定し、上流シグナルを明らかにする。
- (2) MR-pendrin 系や PKC-KLHL3-WNK 系の生理的・病的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

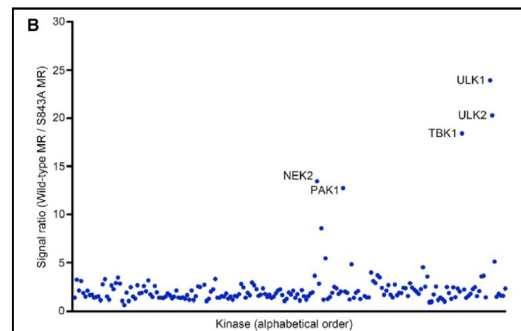
- (1) MR-S843 と周囲のアミノ酸配列を含むペプチド、および S843 をアラニンに変異させたペプチド(MR A843 ペプチド;ネガティブコントロール)を精製し、RI 標識 ATP 存在下に recombinant kinase panel と反応させ、責任キナーゼを網羅的にスクリーニングする(右図)。MR-S843 ペプチドと MR-A843 ペプチドの放射能活性とを比較することで kinase の同定を試みる。
- (2) 様々な腎疾患モデルを用いて、MR-pendrin 系や PKC-KLHL3-WNK 系の変化を解析する。



4. 研究成果

(1) MR-pendrin 系に関する新発見

MR-S843 の責任キナーゼを同定するため、約 200 の recombinant kinase panel を用いて網羅的解析を行った(右図)。その結果、Unc51-like kinase (ULK)が MR のリン酸化作用を有することが判明し、この結果は mass spectrometry や ULK1/ULK2 double knockout MEF を用いた検討等でも裏付けられた。更なる検討にて、ULK1 は腎集合管間在細胞に豊富に存在すること、アンジオテンシン II が mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して ULK を抑制することで MR の脱リン酸化を引き起こす経路が明らかとなった。実際に、in vivo において AngII による pendrin の誘導は mTOR の阻害薬である AZD8055 により完全に抑制され、mTOR が pendrin の上流シグナルとして作用することが確認された。尚、血管系においては AngII が epithelial growth factor receptor の transactivation を介して mTOR を活性化することが知られており、間在細胞においても同様の経路が関与する可能性がある。更に、本機構の生理的意義を明らかにするため pendrin ノックアウトマウスを用いた検討を行い、レニン・アンジオテンシン・



アルドステロン(RAA)系活性化に伴う食塩再吸収と血圧の維持に当該機構が不可欠であることを明らかにした。また、一連の研究課程にて、MR-pendrin 系がカリウム制御にも重要であることも判明している。他のグループの最近の報告においても、PHAII のモデルマウスにおいて pendrin を欠損させることで高カリウム血症が改善することが示されており、我々の研究成果が裏付けられている。

(2) PKC-KLHL3-WNK 系に関する新発見

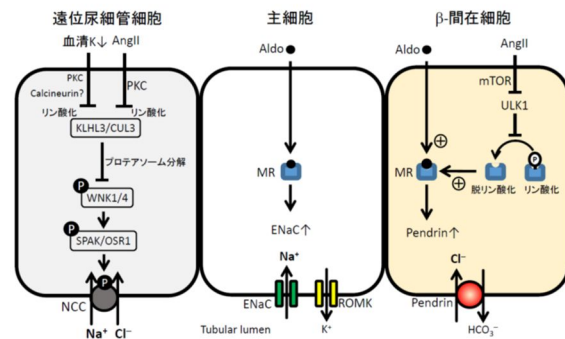
KLHL3 と Cul3 により構成されるユビキチンリガーゼ(CRL3-KLHL3)の活性調節には、プロテインキナーゼ C を介した KLHL3 の基質結合領域(Ser433)のリン酸化が中心的な役割を果たしている。研究代表者らは AngII に加えてカリウム代謝の変化が KLHL3 の機能を修飾することを見出した。低カリウム血症では KLHL3-S433 のリン酸化誘導および KLHL3 の発現低下の両メカニズムを介して KLHL3 の作用が抑制され、その結果、AngII 非存在下においても下流シグナルが活性化されて食塩の再吸収が誘導されると考えられる。本成果は、疫学的には良く知られているカリウム欠乏と高血圧の関係において、KLHL3 が中心的な役割を果たすことを意味している。

KLHL3-S433 のリン酸化には protein kinase C の作用が重要だが、脱リン酸化を担う分子については明らかとなっていない。そこで、我々はセリン・スレオニンフォスファターゼである calcineurin に着目して検討を行った。calcineurin は T 細胞において細胞内 Ca 濃度の上昇により活性化され、転写因子である nuclear factor of activated T cell (NFAT)を脱リン酸化し、核内への移行と IL-2 などの転写活性化を促進する。tacrolimus や cyclosporine は calcineurin の作用を阻害するため、免疫抑制薬として幅広く使用されている。しかしながら多くの副作用の存在も知られており、そのひとつとして高血圧や高カリウム血症の発症が挙げられる。この作用の少なくとも一部はサイアザイド感受性 Na-Cl 共輸送体(NCC)の過剰活性化に由来し、上流シグナルとして WNK の関与が示唆されていたが、詳細なメカニズムは不明のままであった。そこで CRL3-KLHL3 の制御に calcineurin が関与する、という仮説のもと、KLHL3-S433 の脱リン酸化作用を *in vitro* phosphatase assay にて検討したところ、calcineurin が強力に KLHL3-S433 の脱リン酸化を促進することが明らかとなった。逆に、calcineurin の作用を遺伝子ノックダウンあるいは薬理的に抑制したところ KLHL3-S433 のリン酸化量は増加し、WNK/SPAK 系を介した NCC の活性化と食塩感受性高血圧が惹起された。更に、calcineurin 阻害薬の WNK に対する作用は、リン酸化を受けない KLHL3-S433A 変異体では認められないことも判明した。腎臓において calcineurin を制御する生理的シグナルを探索するために培養細胞での検討を行ったところ、細胞外カリウム濃度の上昇に伴って KLHL3-S433 の脱リン酸化が促進された。以上の結果より、calcineurin は腎臓において CRL3-KLHL3 の脱リン酸化酵素として作用しており、このユビキチンリガーゼの活性を制御することで血圧や電解質調節に本質的な役割を担うことが判明した。このメカニズムが calcineurin 阻害薬の使用に伴う血圧異常や電解質異常にも関わっているものと考えられる。

(3) 総括

以上の解析を通じて、機能の異なる多様な尿細管細胞の作用が連動し、腎臓全体として適切な応答が誘導されるメカニズムの一端が明らかにされた。すなわち、体液量減少時には RAA 系を介して副腎でアルドステロンが産生される。アルドステロンは集合管主細胞において MR を活性化することで上皮性 Na チャネル(ENaC)の働きを誘導する。この作用にはナトリウムの再吸収と交換でカリウムの排泄が伴うが、RAA 系の活性化に伴い同時に産生される AngII の働きによ

って遠位尿細管細胞と集合管間在細胞の働きが増強され、カリウム排泄を抑制しつつ食塩再吸収を最大化するような経路が活性化される。遠位尿細管では CRL3-KLHL3 のリン酸化と不活性化が惹起され、NCC が活性化される(右図)。間在細胞においては AngII/mTOR/ULK1 系による MR の脱リン酸化と活性化により pendrin の膜発現が誘導される。これらのメカニズムの異常はカリウム欠乏に伴う食塩感受性高血圧、あるいは calcineurin 阻害薬に伴う薬剤性の電解質異常など、さまざまな腎疾患の病態に関連しているものと想定される。



5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Ishizawa K, Wang Q (Co-first), Li J, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Uchida S, Lifton RP, Shibata S. Calcineurin dephosphorylates Kelch-like 3, reversing phosphorylation by angiotensin II and regulating renal electrolyte handling. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 116:3155-3160, 2019. 査読有
2. Wang Q, Wang D, Shibata S, Ji T, Zhang L, Zhang R, Yang H, Ma L, Jiao J. Group I metabotropic glutamate receptor activation induces TRPC6-dependent calcium influx and RhoA activation in human kidney podocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 511(2):374-380, 2019. 査読有
3. Nemoto Y, Kumagai T, Ishizawa K, Miura Y, Shiraishi T, Morimoto, C, Sakai K, Omizo H, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Kawachi H, Kuro-O M, Uchida S, Shibata S. Phosphate binding by sucroferric oxyhydroxide ameliorates renal injury in the remnant kidney model. **Sci Rep.** 11:1732, 2019. 査読有
4. Yamazaki O, Ishizawa K, Hirohama D, Fujita T, Shibata S. Electrolyte transport in the renal collecting duct and its regulation by the renin-angiotensin-aldosterone system. **Clin Sci.** 133:75-82, 2019. 査読有
5. Shibata S, Ishizawa K, Wang Q, Xu N, Fujita T, Uchida S, Lifton RP. ULK1 phosphorylates and regulates mineralocorticoid receptor. **Cell Rep** 17:560-576, 2018. 査読有
6. Hirohama D, Ayuzawa N, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Watanabe A, Shimosawa T, Marumo T, Shibata S, Fujita T. Aldosterone is essential for angiotensin II-induced upregulation of pendrin. **J Am Soc Nephrol.** 29:57-68, 2018. 査読有
7. Toyoki D, Shibata S, Kuribayashi-Okuma E, Xu N, Ishizawa K, Hosoyamada M, Uchida S. Insulin stimulates uric acid reabsorption via regulating urate transporter 1 and ATP-binding cassette sub-family G member 2. **Am J Physiol Renal Physiol.** 313:F826-834, 2017. 査読有
8. Shibata S. Mineralocorticoid receptor and NaCl transport mechanisms in the renal distal nephron. **J Endocrinol.** 234:T35-47, 2017. 査読有
9. Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Hypokalemia and pendrin induction by aldosterone. **Hypertension.** 69:855-862, 2017. 査読有
10. Asakawa S, Shibata S, Morimoto C, Shiraishi T, Nakamura T, Tamura Y, Kumagai T, Hosoyamada M, Uchida S. Podocyte injury and albuminuria in experimental hyperuricemic model rats. **Oxid Med Cell Longev.** 2017:3759153, 2017. 査読有
11. Castaneda-Bueno M, Arroyo JP, Zhang J, Puthumana J, Yarborough O, Shibata S, Rojas-Vega L,

- Gamba G, Rinehart J, Lifton RP. Phosphorylation by PKC and PKC regulate the kinase activity and downstream signaling of WNK4. **Proc Natl Acad Sci USA**. 114: E879-E886, 2017. 査読有
12. Shibata S, Ishizawa K, Uchida S. Mineralocorticoid receptor as a therapeutic target in chronic kidney disease and hypertension. **Hypertens Res**. 40: 221-225, 2017. 査読有
 13. Ishizawa K, Xu N, Loffing J, Lifton RP, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Potassium depletion stimulates Na-Cl cotransporter via phosphorylation and inactivation of the ubiquitin ligase Kelch-like 3. **Biochem Biophys Res Commun**. 480: 745-751, 2016. 査読有
 14. Shibata S. Context-dependent mechanisms modulating aldosterone signaling in the kidney. **Clin Exp Nephrol**. 66:524-528, 2016. 査読有

[学会発表](計 20 件中 5 件掲載)

1. Wang Q, Ishizawa K, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Uchida S, Shibata S. Kelch-like 3 dephosphorylation by calcineurin as a mechanism regulating Na-Cl cotransporter. AHA/ASH Joint Hypertension Sessions 2018, Chicago, USA, 2018
2. Shibata S. Aldosterone and hypertension: MR-dependent and potassium-dependent effects. AHA/ASH Joint Hypertension Sessions 2017, California, USA, 2017
3. 柴田 茂. 腎臓におけるミネラルコルチコイド受容体シグナルの修飾機構と体液調節における役割. 生命科学系合同年次大会(ConBio2017), 神戸, 2017
4. Shibata S. Uncovering pathways downstream of angiotensin II signaling in the distal nephron of the kidney (invited lecture). Gordon Research Conference (angiotensin), Lucca, Italy, 2016
5. Shibata S. Regulation of mineralocorticoid receptor in the kidney. The 36th Annual Meeting of the Korean Society of Nephrology, Seoul, Korea, 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤田 敏郎

ローマ字氏名：Toshiro Fujita

所属研究機関名：東京大学

部局名：先端科学技術研究センター

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 10114125

研究分担者氏名：内田 俊也

ローマ字氏名：Shunya Uchida

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 50151882

(2)研究協力者

ローマ字氏名：Richard P Lifton

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。