

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15327

研究課題名(和文) KLHL2/3 を標的とした新規WNKキナーゼシグナル阻害法の確立

研究課題名(英文) KLHL2/3 as molecular targets to modulate WNK kinases

研究代表者

内田 信一 (UCHIDA, SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50262184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：KLHL2およびKLHL3をターゲットとしたWNKシグナル制御の可能性は、細胞培養系での評価としては、その可能性は十分あると考えられた。一方、今後生体内でどのような細胞や臓器で上記戦略が有効かどうかを探るため、KLHL2およびKLHL3のノックアウトマウスを作成し解析することが出来た。結果として、KLHLによるWNKの制御は、やはり腎臓での役割が大きいことが判明したが、多臓器ではKLHL2とKLHL3の両方にWNKキナーゼが支配されている細胞もあると思われ、今後のKLHL2/3トランスジェニックマウスおよびダブルノックアウトマウスの解析が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of overexpression of KLHL2 and KLHL3 on WNK protein abundance in cultured cells. Overexpression of KLHL2 or KLHL3 along with WNK kinases dramatically decreased WNK protein abundance. Thus, it would be possible to modulate WNK signaling in vivo by overexpressing KLHL2 or KLHL3. Further study using KLHL2/3 transgenic mice would be necessary. We also evaluated the in vivo roles of KLHL2 and KLHL3 by generating and analyzing KLHL2 and KLHL3 knockout mice. We found that KLHL2 knockout induced WNK4 protein level not in cortex but in medulla. In KLHL3 knockout mice, the major changes of WNK protein observed in various organs was WNK1 and WNK4 in the kidney. Although the abundant expression of KLHL3 in brain was observed, WNK proteins in the whole brain was not increased, suggesting the compensation by KLHL2 or the increased in specific cell populations. We plan further study using the double knockout of KLHL2 and KLHL3.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 水・電荷室 キナーゼ E3リガーゼ

1. 研究開始当初の背景

我々はヒトの遺伝性塩分感受性高血圧症(偽性低アルドステロン症 II 型: PHAII)の病態解明を通して、WNK キナーゼのシグナル伝達系を明らかにし(*Cell Metab* 2007)、腎臓では生理的な塩分排出調節のみならずカリウムやリンの代謝にも重要な働きをしていること、また腎臓のみならず生体内の各臓器で働いていること(血管平滑筋でのトーン調節、脂肪細胞の分化・産生、腫瘍細胞の遊走と浸潤など)、またインスリンやアンジオテンシン II やアルドステロンといった種々の液性因子や電解質異常により制御を受け、生活習慣病の種々の局面での病態形成に関与している事を明らかにしてきた(*PLoS One* 2011; *Hypertension* 2012, 2013)。

最近、この WNK キナーゼ蛋白を分解する E3 ユビキチンリガーゼ(KLHL2/3-Cullin3 複合体)を我々は同定した(*Cell Reports* 2013)。この分解系の重要性は、その破綻がやはりヒトで PHAII を引き起こす事からも明らかで、最近我々が作製した病態モデル(KLHL3^{R528H/+}ノックインマウス)でもその機序が確認された(*Hum. Mol. Genet.* 2014)。

2. 研究の目的

今まで我々は、この WNK シグナル系を制御すべく、WNK-SPAK 結合阻害薬(*Biochemical J* 2013)や SPAK 直接阻害薬(*JASN* 2015)の開発を進めてきている。今回は、この WNK キナーゼの分解系である KLHL2/3-Cullin3 複体に着目し、この分子を標的として、KLHL2/3 の発現量の制御により WNK キナーゼの細胞内での発現量を制御することで WNK シグナル系を制御可能かどうかを探索する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞系における KLHL2/3 強制発現による WNK キナーゼ発現制御の検討

HEK293 細胞における強制発現系による解析。

HEK293 細胞に、KLHL2 ないし KLHL3 と WNK キナーゼの 1 から 4 までを同時に強制発現させ、KLHL2/3 の有無により WNK キナーゼの蛋白量に変化がみられるかを検討した。

内因性に WNK キナーゼを発現している各種培養細胞を用いた検討。

次に KLHL2/3 の強制発現により内因性の WNK キナーゼ蛋白量の変化の有無を検討した。

(2) KLHL2/3 トランスジェニックマウスの作成

細胞培養系での検討と並行して、生体内での効果を探るため、トランスジェニックマウスの作成のためのコンストラクトを BAC から各遺伝子を単離して行う。

(3) KLHL2, KLHL3 ノックアウトマウス解析による生体内での KLHL2/3 標的の同定

KLHL3 による WNK4 の制御は、ヒトの病態においても明らかであるが、それ以外の KLHL2/3 による全ての WNK キナーゼに対する制御が、生体内のどの臓器どの細胞で起きているかは明らかでない。今後の KLHL2/3 による制御戦略の策定においても、この情報は重要である。

4. 研究成果

(1)

HEK293 細胞において、KLHL2, KLHL3 いずれの強制発現も、同時に強制発現させた WNK1, WNK3, WNK4 の蛋白発現量を減少させた。WNK の下流に位置する OSR1 および NKCC1 蛋白のリン酸化も低下させ、KLHL2 および KLHL3 は WNK キナーゼの E3 リガーゼとして、その細胞内蛋白量を制御できる事が示された。

一方、内因性に WNK4 を発現している腎臓遠位尿細管由来の mpkDCT 細胞、その他 WNK1 及び WNK3 を内因性に発現している glioblastoma 由来の脳腫瘍細胞において、KLHL2 および KLHL3 の強制発現での WNK 蛋白への影響を検討した。その結果、のように同時に強制発現した場合と異なり、内因性の WNK キナーゼ蛋白量には大きな変化がみられなかった。そのため、KLHL2/3 とともに E3 リガーゼを構成する Cullin3 も同時に強制発現させたが、効果の増強は得られなかった。このことから、WNK キナーゼと KLHL2/3 との結合の場合は、同時の強制発現であればその機会は十分にありえるが、一旦細胞内での特定の部位に WNK キナーゼが運ばれたあとは、その機会が減少し、分解の効率が低下すると思われる。KLHL2 および KLHL3 を恒常的に長期間発現増強できれば、この問題は解決できると思われる、安定発現株の確立を現在目指している。

(2)

トランスジェニックマウス作製は実績のある BAC トランスジェニックの作成を行っている。プロモーターとして内因性のプロモーターを使うか、薬剤で制御可能な形に持つていくか、両面から作成を試みている。さらに KLHL2 と KLHL3 はともに生体内でその蛋白を

検出する良い抗体がないために、タグを着けることも検討しており、このためいくつかのステップに渡る BAC への改変を必要としており、この時点ではまだマウスを得るにはいたらなかった。

(3)

一方、KLHL2 および KLHL3 ノックアウトマウスも作成は順調にすすみ、その解析を行うことが出来た。

KLHL2 ノックアウトマウスの作成と解析
最新の CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術により、エクソン 2 及び 3 をターゲットとした KLHL2 ノックアウトマウスの短期間での作成に成功した。ノックアウトマウスは致死でなく、外見上異常はなく、成長も野生型と差は無く、成獣で解析が可能であった。まず全身臓器での発現を RT-PCR と抗体で検討し、発言量の多い脳、肺、腎臓、等で WNK キナーゼの蛋白発現量のノックアウトマウスでの増加の有無を検討した。その結果、各臓器全体をホモジナイズした試料におけるウェスタンブロットでは、わずかに腎臓での WNK4 の増加を認めるだけであった。そこで、腎臓での更なる検討のため、腎臓を皮質、髄質外層、髄質内層に分けて検討した結果、KLHL2 自体の発現は皮質より髄質に多いことが判明し、それに伴って KLHL2 ノックアウトマウスにおいて WNK4 の増加は髄質に多いことが判明した (BBRC, 2017)。今までは WNK4 の役割は NaCl 共輸送体の存在する皮質の遠位曲尿細管での役割が主であったが、髄質での WNK4 の役割を今後明らかにする必要がある。今後は臓器全体の解析で無く、WNK の免疫染色において、各臓器の特異的な細胞での WNK キナーゼ蛋白の増加がみられないかを検討することで、KLHL2 の生体内での WNK キナーゼに対する役割を明らかにし、KLHL2 を介した WNK の制御が生体内でどの細胞において有効かを明らかにする。

KLHL3 ノックアウトマウスの作成と解析
KLHL3 ノックアウトマウスはインフレームのエクソンに LacZ 遺伝子を組み込んだマウスと、それらも CRE マウスとの交配で取り除いた 2 種類を解析した (MCB 2017)。結果として両マウスの系統とも形質はかわらなかったが、KLHL3 の内因性の発現部位を LacZ 蛋白の発現パターンから知ることが出来た。すでに腎臓の遠位曲尿細管には存在が推定されていたが、やはり尿細管の中でも遠位曲尿細管で発現が際だって多かった。その他では脳の海馬などの神経細胞での発現が多くみられた。その他、眼球、肺、心臓、肝臓、胃、

大腸、精巣に発現が確認された。その各々の臓器での WNK 蛋白の発現量を検討すると腎臓での WNK1 と WNK4 の増加は明らかであったが、その他の臓器では明らかでなかった。これらの KLHL3 が発現している臓器で、WNK の蛋白量に変化が無い理由としては、臓器の中でも特定の細胞に KLHL3 が発現しており、臓器全体の評価ではわからない可能性と、KLHL3 だけでなく KLHL2 もその分解に関与しており、各々単独のノックアウトでは形質が現れない可能性が考えられた。今後ダブルノックアウトの解析をすすめる予定である。

その他得られた興味深いデータとしては、KLHL3 ノックアウトマウスのヘテロノックアウトマウスでは腎臓における WNK1, WNK4 の増加がみられなかった事である。以前、ヒトで PHA11 を引き起こす R523H という変異をノックインした KLHL3 ノックインマウスでは、ヘテロノックインマウスでも著明な WNK1 と WNK4 の増加が観察された。つまり、その場合の変異の持つ意味は、単なる機能喪失型変異ではなく、ドミナントネガティブ型の変異である事が明らかとなった。単なるヘテロでの機能喪失では PHA11 は発症しないことが明らかとなった。

まとめ

KLHL2 および KLHL3 をターゲットとした WNK シグナル制御の可能性は、トランスジェニックマウスが作成中で、生体内での検証は本研究期間内には終了出来なかったが、細胞培養系での評価としては、その可能性は十分あると考えられた。一方、今後生体内でどのような細胞や臓器で上記戦略が有効かどうかを探るため、KLHL2 および KLHL3 のノックアウトマウスを作成し解析することが出来た。この成果は、世界に先駆けた報告であり、この分野をリードしている研究室としての優位性を発揮できた。結果として、KLHL による WNK の制御は、やはり腎臓での役割が大きいことが判明したが、他臓器では KLHL2 と KLHL3 の両方に WNK キナーゼが支配されている細胞もあると思われ、今後のダブルノックアウトの解析で明らかになってくると思われた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Kasagi Y, Takahashi D, Aida T, Nishida H, Nomura N, Zeniya M, Mori T, Sasaki E, Ando F, Rai T, Uchida S, Sohara E. Impaired

degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 487(2):368-374, 2017. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.068. 査読あり

2. Takahashi D, Mori T, Sohara E, Tanaka M, Chiga M, Inoue Y, Nomura N, Zeniya M, Ochi H, Takeda S, Suganami T, Rai T, Uchida S. WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice. *EBioMedicine.* 18:118-127, 2017. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011. 査読あり

3. Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, Oda M, Ko SBH, Ko MSH, Mandai S, Nomura N, Rai T, Uchida S. Sohara E. Salt suppresses IFN γ inducible chemokines through the IFN γ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells. *Sci Rep.* 7:746580, 2017. doi: 10.1038/srep46580. 査読あり

4. Mandai S, Furukawa S, Kodaka M, Hata Y, Mori T, Nomura N, Ando F, Mori Y, Takahashi D, Yoshizaki Y, Kasagi Y, Arai Y, Sasaki E, Yoshida S, Furuichi Y, Fujii NL, Sohara E, Rai T, Uchida S. Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. *Sci Rep.* 7:46369, 2017. doi: 10.1038/srep46369. 査読あり

5. Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin inhibitors block sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int.* 91(2):402-411, 2017. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.001. 査読あり

6. Sasaki E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, Yoshizaki Y, Ando F, Mori Y, Mandai S, Zeniya M, Takahashi D, Nomura N, Rai T, Uchida S. Sohara E. *KLHL3* knockout mice reveal the physiological role of *KLHL3* and the pathophysiology of pseudo-hypoaldosteronism Type II caused by mutant *KLHL3*. *Mol Cell Biol.* 37(7). pii: e00508-16, 2017. doi: 10.1128/MCB.00508-16. 査読あり

7. Ando F, Sohara E, Morimoto T, Yui N, Nomura N, Kikuchi E, Takahashi D, Mori T, Vandewalle A, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Uchida S. Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun.* 7:13636, 2016. doi: 10.1038/ncomms13636. 査読あり

8. Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of Hypertension-associated STK39 polymorphism knockin cell lines with the CRISPR/Cas9 System. *Hypertension.* 66(6):1199-1206, 2015. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05872. 査読あり

9. Mori T, Hosomichi K, Chiga M, Mandai S, Nakaoka H, Sohara E, Okado T, Rai T, Sasaki S, Inoue I, Uchida S. Comprehensive genetic testing approach for major inherited kidney

diseases, using next-generation sequencing with a custom panel. *Clin Exp Nephrol.* 21:63-75, 2017. doi: 10.1007/s10157-016-1252-1. 査読あり

10. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II-with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus. *J Am Soc Nephrol* 26:2129-38, 2015. doi: 10.1681/ASN.2014070639. 査読あり

11. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol* 26:1525-36, 2015. doi: 10.1681/ASN.2014060560. 査読あり

12. Yoshizaki Y, Mori Y, Tsuzaki Y, Mori T, Nomura N, Wakabayashi M, Takahashi D, Zeniya M, Kikuchi E, Araki Y, Ando F, Isobe K, Nishida H, Ohta A, Susa K, Inoue Y, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Sohara E. Impaired Degradation of WNK by Akt and PKA Phosphorylation of *KLHL3*. *Biochem Biophys Res Commun.* 467:229-34, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.184. 査読あり

13. Mori Y, Mori T, Wakabayashi M, Yoshizaki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Uchida S. Involvement of Selective Autophagy Mediated by p62/SQSTM1 in *KLHL3*-Dependent WNK4 Degradation. *Biochem J.* 472:33-41, 2015. doi: 10.1042/BJ20150500. 査読あり

14. Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. Generation and Analysis of Knock-In Mice Carrying Pseudohypoaldosteronism Type II-Causing Mutations in the Cullin 3 Gene. *Biol Open.* 4:1509-17, 2015. doi: 10.1242/bio.013276. 査読あり

{学会発表}(計14件)

1. Arai Y, Kanda E, Iimori S, Naito S, Noda Y, Sasaki S, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S. Low White Blood Cell Count Is Independently Associated with the Progression of Chronic Kidney Disease in the Elderly: The CKD-ROUTE Study. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

2. Fujimaru T, Mori T, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, Ando F, Mori Y, Nomura N, Naito S, Okado T, Rai T, Uchida S. Sohara E. Development of a Customized Diagnostic Panel for Targeted Exome Sequencing of

Polycystic Kidney Diseases. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

3. Kikuchi H, Nomura N, Minamishima Y, Rai T, Uchida S, Sohara E. Targeted Metabolomic Analysis of Kidney from the Subtotal Nephrectomy Mouse Model of Chronic Kidney Disease. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

4. Mori Y, Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of p62/SQSTM1 (p62) KO Cell Lines Using CRISPR/Cas9 -The Role of p62 on WNK1 Regulation by Changes of Extracellular Potassium Concentration-. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

5. Sasak E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, Rai T, Uchida S, Sohara E. Generation and Analysis of KLHL3 Knockout Mice. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

6. Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin Rapidly Dephosphorylates Sodium-Chloride Cotransporter in Response to High Potassium Intake. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

7. Takahashi D, Mori T, Sohara E, Chiga M, Inoue Y, Nomura N, Zeniya M, Rai T, Uchida S. WNK4 regulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

8. Yoshizaki Y, Sohara E, Mori T, Kikuchi E, Takahashi D, Zeniya M, Araki Y, Mori Y, Ando F, Rai T, Uchida S. Drug Repositioning Screening for Keap1-Nrf2 Binding Inhibitors by Using Fluorescent Correlation Spectroscopy. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

9. Zeniya M, Mori T, Yui N, Nomura N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Uchida S. The proteasome inhibitor bortezomib attenuates renal fibrosis in mice. The 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology. Chicago (USA), Nov, 2016.

10. Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Kikuchi E, Uchida S. Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2015.

11. Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of Hypertension-Associated STK39

Polymorphism Knock-in Cell Lines with the CRISPR/Cas9 System. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2015.

12. Nomura N, Shoda W, Sohara E, Rai T, Uchida S. Potassium-induced dephosphorylation of renal sodium-chloride cotransporter is NOT dependent on the anions. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2015.

13. Shoda W, Naito S, Yui N, Iimori S, Susa K, Mori T, Nomura N, Sohara E, Okada T, Rai T, Uchida S. Sunitinib-induced nephrotic syndrome and acute kidney injury in a malignant insulinoma patient: a case report. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2015.

14. Susa K, Sohara E, Takahashi D, Rai T, Uchida S. The Major Contribution of WNK4 to the Pathogenesis of Pseudohypoaldosteronism Type II (PHAI) Caused by the KLHL3 Mutation R528H. The 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November, 2015.

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50262184

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし