

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860629

研究課題名(和文)新規WNKキナーゼ制御系であるKLHL3-Cullin3の病態生理学的役割の検討

研究課題名(英文)Pathophysiological roles of KLHL3-Cullin3 as a novel WNK regulatory system

研究代表者

若林 麻衣(Wakabayashi, Mai)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00707292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：KLHL3はWNK4をユビキチン化し血圧制御に関わる。本研究ではWNK4分解系におけるp62/SQSTM1(p62)、選択的オートファジー、偽性低アルドステロン症II型(PHAI1)の関与を検証した。HEK293T細胞においてKLHL3はp62と結合し、WNK4はこれらを介してオートファゴソームに取り込まれた。プロテアソーム阻害下p62ノックダウンによりWNK4とKLHL3はともに増加したが、PHAI1変異KLHL3存在下ではその増加は見られなかった。以上からWNK4はp62を介した選択的オートファジーによる制御を受け、PHAI1ではオートファジーに伴うWNK4分解も阻害されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We reported that kelch-like protein 3 (KLHL3)-Cullin3 E3 ligase ubiquitinates with-no-lysine kinase 4 (WNK4) and that impaired WNK4 ubiquitination causes pseudohypoaldosteronism type II, a hereditary hypertensive disease. As proteasome inhibition is known to activate p62-mediated selective autophagy, we investigated whether WNK4 degradation induced by KLHL3 is also mediated by such an autophagic mechanism. 3-Methyladenine, an autophagy inhibitor, blocked the epoxomicin-induced decrease in WNK4. Co-immunoprecipitation assays revealed that KLHL3 formed a complex not only with WNK4 but also with p62. Under proteasome inhibition, p62 overexpression decreased KLHL3 and WNK4 protein levels, and p62 knockdown dramatically increased KLHL3 and WNK4 protein levels. Thus, WNK4 was degraded not only by proteasomes but also by p62-KLHL3-mediated selective autophagy, which may be involved in WNK regulation under certain pathophysiological conditions.

研究分野：高血圧症

キーワード：高血圧症 オートファジー WNK KLHL3 PHAI1 p62

1. 研究開始当初の背景

近年、腎臓内科学領域において、慢性腎臓病 (CKD) という新たな概念が提唱された。CKD は国民の健康を脅かす疾患群であり、その対策は喫緊の課題となっている。CKD において、高血圧は腎障害の結果として発症するのみならず、腎症の進行を促し、慢性腎不全へと進展させる最大の危険因子となっている。ゆえに CKD での高血圧発症メカニズムの解明とその制御は、CKD 克服における最重要課題である。高血圧の発症には腎臓が深く関わっており、腎における水、電解質の再吸収調節機構の破綻こそが高血圧発症のキーステップといえる。

申請者が所属する東京医科歯科大学腎臓内科学研究室では、遺伝性的高血圧疾患である偽性低アルドステロン II 型(PHAI)の病態解明を通じて、血圧調節にきわめて重要な WNK-OSR1/SPAK リン酸化シグナル伝達系を世界に先駆けて発見した。WNK-OSR1/SPAK-SLC12a 輸送体シグナル伝達系は、腎の Na-Cl 共輸送体(NCC)を介した塩分再吸収や、血管平滑筋収縮の調節を通じて、生体の血圧調節に重要な役割を果たしており、その破綻は高血圧症を引き起こす。特に、腎遠位尿細管における WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナルカスケードは極めて重要な役割をもつ。

申請者 若林麻衣は、WNK キナーゼの新たな制御系である KLHL3-Cullin3 複合体について、その E3 ユビキチンリガーゼ機能の詳細を明らかにし、今まで知られていた WNK キナーゼが関わる病態へのこれらの分子の関与を明らかにした。

この研究の過程で、申請者は、培養細胞系において KLHL3-Cullin3 による WNK4 のユビキチン化を促すと、プロテアソーム阻害薬のみでは WNK4 の分解は抑えられないという現象を確認した。細胞内におけるタンパク質分解系には、ユビキチン・プロテアソーム

系以外にもオートファジー・リソソーム系という分解系が存在することから、WNK4 の分解にこのオートファジー・リソソーム系が関与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、新規血圧調節系である KLHL3-Cullin3 による WNK4 分解系、特にオートファジー系への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

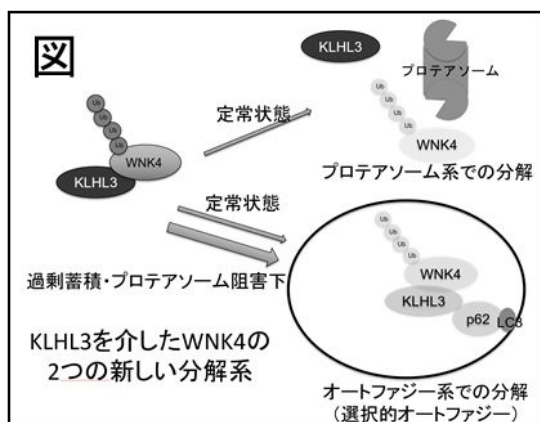
HEK293T 細胞を用いた強制発現系において、各種阻害剤への曝露実験を行った。また、Immunoblotting による蛋白発現量の評価、RT-PCR による mRNA 発現量の評価、免疫沈降による蛋白間の結合評価を行った。さらに、HEK293T 細胞、およびマウスの腎組織検体で免疫染色を行い、蛋白の細胞内局在を検討した。

4. 研究成果

WNK4 はプロテアソーム阻害剤によりその分解が促進される。このとき LC3B-II の発現が増加していたことから、オートファジーの誘導が示唆された。次に、プロテアソーム阻害による WNK4 の分解増加がオートファジー依存かを検討するため、オートファジー阻害剤である 3-MA の投与を細胞に行った。結果、WNK4 の発現量は 3-MA の投与量に依存して増加し、WNK4 の分解はオートファジーにも依存していることが示唆された。加えてプロテアソーム阻害下で KLHL3 発現による WNK4 の減少をオートファジー阻害剤で抑制できるかを検討したところ、WNK4 の分解は抑制された。これよりプロテアソーム阻害下での KLHL3 による WNK4 分解はオートファジーによるものであることが明確となった。

ここで、KLHL3 と同じ KLHL ファミリーに属する Keap1 の研究において、酸化ストレスによって p62/SQSTM1 (p62)の発現が誘導され、誘導された p62 が Keap1 と結合し、これらが選択的オートファジーにより分解されることによって、結果として Nrf2 の発現量増加をきたすことが報告されている。このことから、KLHL3 と Keap1 の相同性に着目して KLHL3 と p62 との結合を検証し、申請者は実際に結合が見られることを発見した。さらに WNK4 がプロテアソーム系による分解だけでなく、KLHL3-p62 との結合を介した選択的オートファジーによる分解も受けていることを見出した。また、プロテアソーム阻害下の p62 の knock down により WNK4 と KLHL3 はともに増加した。一方で PHAII を引き起こす KLHL3 変異体存在下では knock down による WNK4 の増加は見られなかったことから、これらオートファジー系が PHAII の病態に関わる可能性も示唆された。さらに、実際に培養細胞系とマウス陣組織において、WNK4 は KLHL3、p62 を介してオートファゴソームに取り込まれていることを示した。

これらのことから WNK4 は、KLHL3-CUL3 複合体によるユビキチン修飾後、プロテアソームによる分解だけでなく、p62 を介した選択的オートファジーによる制御も受け、PHAII ではオートファジーによる WNK4 分解も阻害されていることが示された(図)。(以上雑誌論文 1、学会発表 1 に発表)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. 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. 査読あり doi: 10.1042/BJ20150500.
2. 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. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.184.

[学会発表](計2件)

1. 森 雄太郎、森 崇寧、若林 麻衣、銭谷 慕子、蘇原 映誠、頼 建光、佐々木 成、内田 信一. p62/SQSTM1 が関わる WNK4 の選択的オートファジーと偽性低アルドステロン症 II 型との関わり. 第 58 回日本腎臓学会学術総会. 名古屋、2015 年 6 月.
2. 吉崎 幸、蘇原 映誠、森 崇寧、若林 麻衣、高橋 大栄、銭谷 慕子、菊池 絵梨子、森 雄太郎、荒木 雄也、安藤 史顕、頼 建光、佐々木 成、内田 信一. PKA と Akt による KLHL3 リン酸化が WNK4 との結合を制御する. 第 58 回日本腎臓学会学術総会. 名古屋、2015 年 6 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等;特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 若林 麻衣 (Mai、
WAKABAYASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤
講師

研究者番号：00707292

()

研究者番号：

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：