

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06183

研究課題名(和文) オートファジーを介したWNKシグナル制御による新規血管トーン調節機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of vascular tonus regulation by WNK signal

研究代表者

銭谷 慕子(三澤)(Zeniya, Moko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：10760283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症型(PHAII)において、原因遺伝子であるKLHL3はCullin 3とE3 ligaseを形成し、腎臓遠位尿細管でWNK1, WNK4を捉え分解することでNCCを制御する。KLHL2はKLHL3と同じKelch-like familyに属し、KLHL3と相同性が高く、細胞実験ではWNKを捉えて分解に導いたが、生体における生理的な役割は不明であった。KLHL2ノックアウトマウス腎臓においてWNK4蛋白の増加がみられた。腎臓を皮質と髄質に分けて評価したところ、特に髄質でWNK4蛋白発現が増加していた。

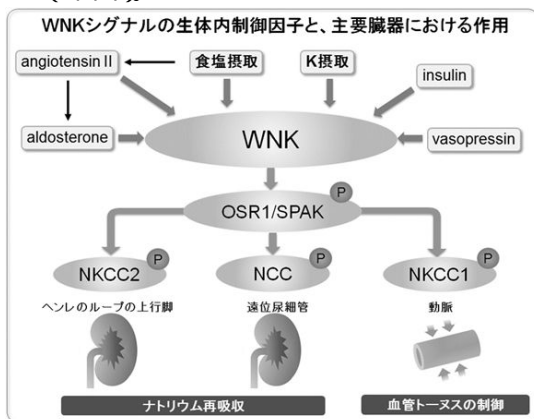
研究成果の概要(英文)：Normally, the KLHL3/CUL3 ubiquitin ligase complex degrades WNKs. In PHAII, the loss of interaction between KLHL3 and WNK4 increases levels of WNKs because of impaired ubiquitination, leading to abnormal over-activation of the WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade in the kidney's distal convoluted tubules (DCT). KLHL2, which is highly homologous to KLHL3, was reported to ubiquitinate and degrade WNKs in vitro. Mutations in KLHL2 have not been reported in patients with PHAII, suggesting that KLHL2 plays a different physiological role than that played by KLHL3 in the kidney. To investigate the physiological roles of KLHL2 in the kidney, we generated KLHL2^{-/-} mice. KLHL2 was predominantly expressed in the medulla compared with the cortex. Accordingly, medullary WNK4 protein levels were significantly increased in the kidneys of KLHL2^{-/-} mice. KLHL2 is indeed a physiological regulator of WNK4 in vivo; however, its function might be different from that of KLHL3 because KLHL2 mainly localized in medulla.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：WNKシグナル KLHL2

1. 研究開始当初の背景

申請者銭谷慕子の所属する東京医科歯科大学腎臓内科学教室では、遺伝性の塩分感受性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子である With-no lysine kinase 4 (WNK4) および WNK1 の腎臓における機能解析を通して、塩分感受性高血圧の機序の解明を進めてきた。高血圧には数多くの因子が関わっているが、PHAII のような単一遺伝子の異常で起こる高血圧性疾患は、腎臓におけるナトリウム調節、血圧調節に関わる多くのメカニズムのモデルとして有用であると期待され、これまで当教室では WNK について詳細な研究を進めてきており、その結果 WNK の様々な生体内制御因子が明らかとなり、さらに WNK が血管平滑筋においても重要な役割を果たしていることが解明された (下図)。



近年、Kelch-like protein 3 (KLHL3) も PHA II の原因遺伝子として同定され、KLHL3-Cullin3 複合体が E3 ユビキチンリガーゼとして WNK キナーゼを分解し、WNK-SPAK-NCC カスケードを減弱させることが当教室の研究から明らかになった。また、KLHL2 も KLHL3 同様 WNK に結合しその分解を促進することも、当教室から報告している。

申請者銭谷は、腎外臓器での WNK の機能の一つとして、血管平滑筋における angiotensin II による WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化シグナルの亢進が血管を収縮させることを解明した (Hypertension 2013)。さらにこのカスケードにおける WNK3 の制御機構の解明を進めた結果、angiotensinII は SQSTM1/p62 による選択的 autophagy を介して KLHL2 の発現量を低下させ、KLHL2 の減少が WNK3 の分解を抑制し、WNK3-SPAK-NKCC1 のリン酸化カスケードを亢進させるという、angiotensin II による血管収縮における新たな分子機序を解明した (J Am Soc Nephrol. In press)。血管トーンス制御にノーベル賞候補等で注目を浴びる新規蛋白分解系である autophagy が関与している事を証明したことで、この研究成果はプレスリリースを通して新聞掲載にも至っている。

しかし autophagy による KLHL2 を介した WNK シグナル制御機構は細胞実験を中心

とした検討であり、血管をはじめ生体内での役割については証明されていない。さらに、選択的 autophagy の分子である SQSTM1/p62 の KLHL2 に対する特異性についても、さらなる検討が必要である。また、angiotensinII 以外の血管収縮物質において同カスケードが関与するかどうかについても、現時点では依然として不明である。

2. 研究の目的

偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子である WNK キナーゼは、腎臓をはじめ様々な臓器の transporter の制御を介し、生体機能を維持している。我々は血管平滑筋における WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルは、angiotensinII による血管トーンス制御に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。さらに近年 WNK の制御分子として KLHL 蛋白が同定されたが、angiotensinII は SQSTM1/p62 による選択的 autophagy を促進し KLHL2 を減少させ、WNK3 シグナルを亢進させることを申請者銭谷は報告したが、これらは主に細胞実験での結果であり、生体血管平滑筋内での autophagy や KLHL2 の生理的意義は依然不明である。さらに血管以外の臓器での KLHL2 の役割やその制御機構についても未解明な点が多い。本研究では、KLHL2 および血管特異的 autophagy ノックアウトマウス等を用い、これらの疑問を解決することを目指す。

3. 研究の方法

KLHL2 ノックアウトマウスの作製と解析

KLHL2 ノックアウトマウスを作製し、血圧測定や血管トーンスの測定、さらに血管での WNK3-SPAK-NKCC1 カスケードの変化を western blotting 法などで確認することで、KLHL2 の血管における生体内での生理的意義を証明する。また低塩食や angiotensinII 投与においても同様の検討を行い、これらの刺激下における KLHL2 の役割を明らかにする。さらに、KLHL2 は血管以外でも WNK 蛋白の制御に関与している可能性があり、KLHL2 ノックアウトマウスの表現型解析により血管外での働きについても明らかにする。

4. 研究成果

KLHL2 ノックアウトマウスの作製と解析

(1) KLHL2 ノックアウトマウスの作成

KLHL3 ノックアウトマウスの作成は CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて作成した。ターゲットとなる gRNA は *Klhl2* 遺伝子の Exon3 と Exon4 の配列を選定した。それぞれのターゲット gRNA 配列を持つ CRISPR-Cas9 ゲノム編集により、Exon3 ターゲットでは 7 塩基欠損の、Exon4 ターゲットでは 38 塩基欠損の変異を持つマウスを作成した。それぞれの変異はともにフレームシフトを起こし、早期にストップコドンが出現する。それぞれのマウスの腎臓での KLHL2 蛋白の発現をウェスタンブロットにより評価を行った。(図 1)

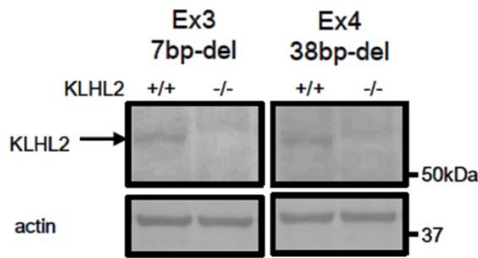


図1. 腎でのKLHL2蛋白発現量の評価

それぞれのターゲット gRNA で作成した KLHL2 ノックアウトマウスではともに KLHL2 蛋白の発現は消失していることを確認した。オフターゲット効果によるフェノタイプであることを否定するため、以後の実験はこれら2種類のノックアウトマウスを用いて実験・確認を行っている。

(2) KLHL2 ノックアウトマウスの解析

まず、KLHL3-WNK-SPAK/OSR1-NCC という確立された実験方法のある腎臓で KLHL2 が WNK-SPAK/OSR1 カスケードに与える影響を検証した。腎臓での WNK4 蛋白の発現量をウェスタンブロットにより評価したところ、KLHL2 を発現している Control マウスと比較して KLHL2 ノックアウトマウスで有意に増加していることが確認した。(図2)

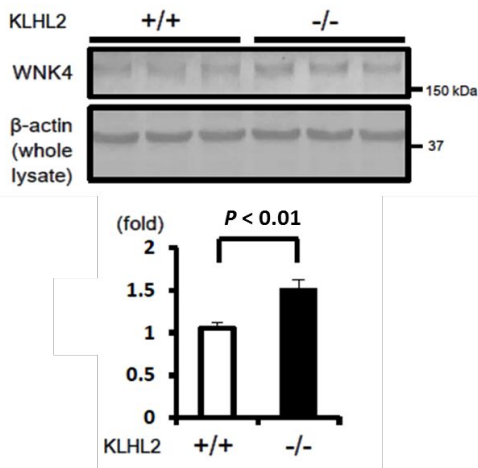


図2. 腎でのWNK4蛋白発現量の評価

しかし、WNK4 の mRNA の増加は認めず、この KLHL2 ノックアウトマウスでの WNK4 増加は WNK4 蛋白の分解に障害をきたしているためであると考えられた。WNK4 リン酸化シグナルの下流である SPAK/OSR1-NCC のリン酸化を評価したところ、WNK4 蛋白の増加にもかかわらず、SPAK、OSR1、NCC のリン酸化の亢進は確認できなかった。(図3) 採血検査の結果でも、KLHL2 と高い相同性配列を有する KLHL3 ノックアウトでは PHAII 様の高カリウム血症や代謝性アシドーシスなどのフェノタイプは確認されたが、今回の

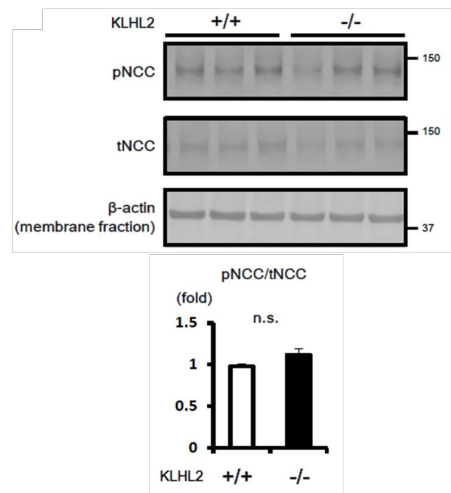
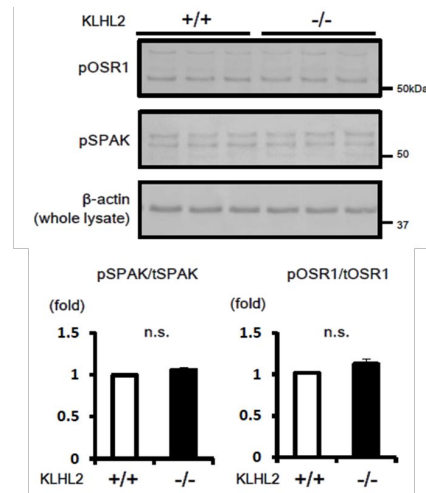


図3. 腎でのSPAK/OSR1-NCCリン酸化蛋白発現量の評価

KLHL2 ノックアウトマウスではそのような変化は認められたなかった。(表1)

	KLHL2 ^{+/+} (n=16)	KLHL2 ^{-/-} (n=16)	P Value
Na ⁺ (mmol/l)	147.6 ± 0.3	146.9 ± 0.4	0.209
K ⁺ (mmol/l)	4.66 ± 0.16	4.53 ± 0.16	0.528
Cl ⁻ (mmol/l)	109.4 ± 0.8	109.8 ± 0.7	0.737
pH	7.253 ± 0.02	7.291 ± 0.02	0.228
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	24.2 ± 0.5	24.2 ± 0.4	0.943
BE	-3.1 ± 0.7	-2.3 ± 0.7	0.454

表1. KLHL2ノックアウトマウスの採血検査結果

KLHL3 は遠位尿管に局限して存在することを我々は以前に報告し、また KLHL2 は mRNA レベルで腎臓の各 Segment に分布するという報告がある。このような背景から、我々は KLHL2 と KLHL3 の発現部位の違いによりフェノタイプに違いが生じると考え、KLHL2 の腎での局在を調べた。その結果、KLHL2 は遠位尿管の存在する皮質には発現が少なく、外側髄質および内側髄質に発現が豊富であることが判明した。(図4)

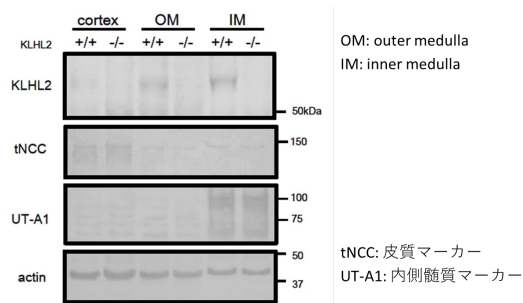


図4. KLHL2蛋白の局在

さらに WNK4 の発現量を皮質、外側髄質、内側髄質に分けて調べたところ、KLHL2 が多く発現している外側髄質、内側髄質にて WNK4 発現が有意に増加していることが明らかになった。(図5)

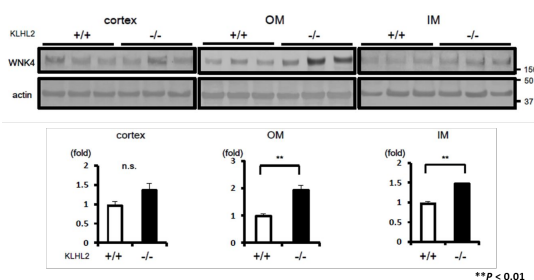


図5. WNK4の各部位での発現量

皮質では WNK4 の増加は有意ではなく、このため SPAK/OSR1-NCC のリン酸化の亢進が KLHL2 ノックアウトマウスでは確認できなかったと考えられる。KLHL2 と PHAII の原因遺伝子である KLHL3 は高い相同性を持つが局在が明らかに異なり、この局在の違いが腎での役割の違いにつながっていると考えられる。以上の研究成果を論文にまとめて発表した。(Biochem Biophys Res Commun. 2017) 現在 KLHL2 が髄質においてどのような生理的役割を担っているか、また血管でのトーンにどのような役割を担っているか過去の研究と照らしながら解析を進めている。

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 5 件)

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. 2017, 487:368-374. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.068. 査読有 .

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. 2017, 118-127. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011. 査読有 .

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 Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3. Mol Cell Biol. 2017, 37(7). doi: 10.1128/MCB.00508-16. 査読有 .

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. 2015, 467(2):229-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.184. 査読有 .

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. 2015, 472(1):33-41. doi: 10.1042/BJ20150500. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 銭谷慕子 新規腎線維化改善薬としての bortezomib の検討 . 第 60 回日本腎臓学会学術集会 平成 29 年 5 月 28 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
2. 笠木祐里、蘇原映誠、相田知海、高橋大栄、西田秀範、野村尚弘、銭谷慕子、森崇寧、佐々木絵美、安藤史顕、頼建光、内田信一 KLHL2 は腎臓で WNK4 蛋白の分解を行う . 第 60 回日本腎臓学会学術集会 平成 29 年 5 月 28 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

銭谷 慕子 (Zeniya, Moko)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号 : 10760283