

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19446

研究課題名(和文)小胞体ストレスシグナルによる、電解質輸送膜蛋白の制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of regulation of ion transporters by ER stress

研究代表者

井上 佑一(Inoue, Yuichi)

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：50735834

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)：遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 型(PHAI)の原因遺伝子である KLHL3/Cullin3複合体はWNKキナーゼの分解を担うが、我々はKLHL3ノックアウトマウス作成によって、生体での KLHL3の組織分布を明らかにし、さらにKLHL3は二量体を形成して、これに変異KLHL3が組み込まれることにより、優性遺伝型のPHAIを発症することを明らかにした。本研究によって、KLHL3によるWNKシグナル制御機構は、量だけでなく、我々が過去に報告した、リン酸化などを介した質的な制御も重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the with-no-lysine kinase 1 (WNK1), WNK4, kelch-like 3 (KLHL3), and cullin3 (CUL3) genes are known to cause the hereditary disease pseudohypoaldosteronism type II (PHAI). However, physiological in vivo roles of KLHL3 remain unclear. Therefore, here we generated KLHL3<sup>-/-</sup> mice that expressed  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) under the control of the endogenous KLHL3 promoter. Immunoblots of  $\beta$ -Gal and LacZ staining revealed that KLHL3 was expressed in some organs, such as brain. However, the expression levels of WNK kinases were not increased in any of these organs other than the kidney. KLHL3<sup>-/-</sup> mice also showed PHAI-like phenotypes, whereas KLHL3<sup>+/-</sup> mice did not. This clearly demonstrates that the heterozygous deletion of KLHL3 was not sufficient to cause PHAI, indicating that autosomal dominant type PHAI is caused by the dominant negative effect of mutant KLHL3. We further demonstrated that the dimerization of KLHL3 can explain this dominant negative effect.

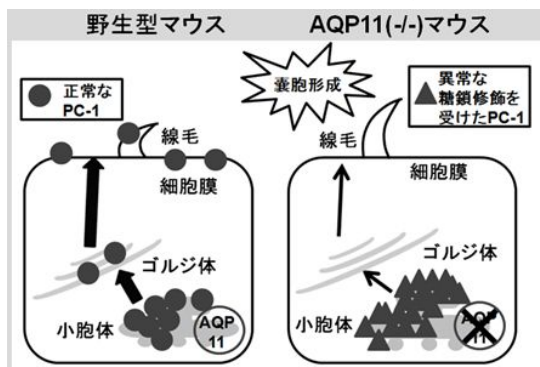
研究分野：腎臓内科

キーワード：電解質 WNKシグナル

1. 研究開始当初の背景

ER ストレスは、翻訳後修飾の異常、Ca 調節の異常や酸化ストレスなどにより誘導されるが、通常はその下流の IRE1/PERK/ATF6 を介して細胞の恒常性は維持される。しかし、過剰な ER ストレスは、細胞の機能異常やアポトーシスなどを引き起こす事で、様々な疾患の原因となる。AQP11 は、水透過性を有する、ER に局在する膜チャネル蛋白である。AQP11 ノックアウトマウスでは、ER ストレスや酸化ストレスが腎臓などで亢進しており、ER の機能や ER ストレスに AQP11 が重要である事が知られている (FASEB J 2008, Am J physiol Renal Physiol 2013)。

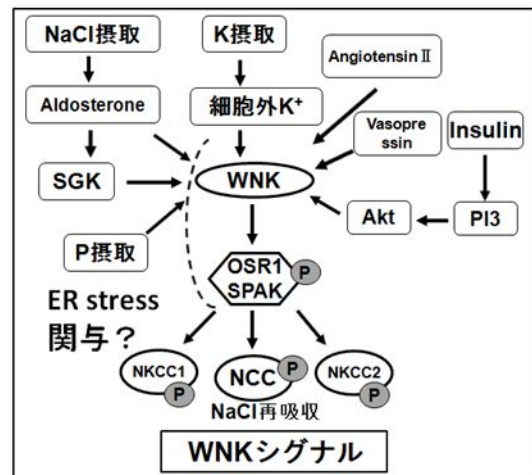
AQP11 ノックアウトマウスが、多発性嚢胞腎を呈する事は分かっていたが、その嚢胞腎形成メカニズムは不明であったため、申請者井上は、まずマウスの AQP11 を、生体内で蛋白として解析する為に、N 末端に 3×HA のついた AQP11 を発現するような AQP11 BAC トランスジェニックマウスを作成し、AQP11 が近位尿細管の ER に局在する事を示した。(J Am Soc Nephrol 2014)。ER は、蛋白の転写、糖鎖付加、折りたたみ、輸送を制御する重要な細胞内小器官である。申請者井上は、ER ストレスや酸化ストレスが亢進している AQP11 ノックアウトマウス腎臓では、AQP11 が存在しないために、嚢胞性腎疾患の原因となる膜蛋白であるポリシスチン 1(PC-1)やポリシスチン 2(PC-2)の、ER においての品質管理や輸送に異常が起きているのではないかと仮説を立て研究を行なった。結果、PC-1 の糖鎖異常と膜への輸送障害が起きている事を発見し、これらが腎臓における嚢胞形成の重要なメカニズムである事を明らかにした(J Am Soc Nephrol 2014 (in press) )(下図参照)。



すなわち、この結果から、ER ストレスや酸化ストレスなどで、ER の機能異常が起きると、PC-1 のような膜蛋白の異常が起きる事が示唆された。

腎臓の尿細管には、Na-K-Cl cotransporter (NKCC)、Na-Cl cotransporter (NCC)、epithelial Na channel (ENaC)などの様々な膜蛋白が存在する(右下図参照)。申請者井上も、NCC の研究に従事してきたが(BBRC 2010)、申請者井上の所属する東京医科歯科大学腎臓内科では、腎臓尿細管膜蛋白研究

で世界を牽引しており、中でも、その遺伝子異常が偽性低アルドステロン症 II 型 (pseudo- hypoaldosteronism type II: PHAII) を引き起こす WNK kinase ならびにその下流シグナルである、WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナル伝達系については、その系が遺伝子変異のみならず、塩分やカリウム、リン摂取等の食事により制御されている事や (Kidney Int 2008, AJP Renal 2009)、インスリン (PLoS One 2011, Hypertension 2012)、アンジオテンシン II (AngII) (BBRC 2010)、アルドステロン (Kidney Int 2008) などの液性因子によっても制御を受ける事を明らかにしてきた(下図参照)。



しかし、これらの上流因子と下流の電解質輸送膜蛋白をつなげる詳細なメカニズムは不明である。

PHAII モデルマウスは、塩分を貯留するマウスであるが (Kidney Int 2008)、塩分感受性高血圧を呈する Dahl rat も ER ストレスが亢進する事が報告されている (PLoS One 2010)。又、AngII の投与によっても ER ストレスは亢進する (J Cell Mol Med 2009)、電解質輸送体は体内環境により制御されている事が良く知られており、その制御に ER が関わっている可能性が以前より考えられていた。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、「塩分やカリウムなどの過剰な負荷・欠乏などが、ER ストレスや酸化ストレスを介して、腎臓尿細管の電解質輸送膜蛋白の蛋白修飾/輸送/機能などを制御する」、という仮説を検証/証明することを目標とする。また、WNK シグナルを制御する、PHAII モデルとなる KLHL3 ノックアウトマウスの解析を通じ、体液調節系などにおける KLHL3 の機能を明らかにしていく。

### 3. 研究の方法

#### KLHL3 ノックアウトマウスの作成と解析

Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)は通常を Cullin3(CUL3)と複合体を形成して転写因子である nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)をプロテアソームを介した分解に誘導している。しかし、酸化ストレス下では、Keap1 はリン酸化 p62 と結合してオートファジーを分解される。結果、細胞内に増加した Nrf2 が抗酸化作用をもつ蛋白発現を誘導し酸化ストレスに対応している。この酸化ストレスに対応する中心的役割を果たしている Keap1 蛋白は KLHL family に属している。同じ KLHL family の Isoform である KLHL3 が近年腎遠位尿管で NCC が亢進する遺伝病である PHAII の原因遺伝子として報告された。そこで我々は KLHL3 のノックアウトマウスを作成し、その詳細な機能の解明を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) KLHL3 ノックアウトマウスの作成

内因性の KLHL3 プロモーター下流に LacZ があり、Cre-loxP システムが発動して KLHL3 がノックアウトされると、LacZ 遺伝子が作動し βgal を発現する KLHL3 ノックアウトマウスを作製することに成功した。

#### (2) KLHL3 の組織ならびに細胞局在

KLHL3 がどの臓器に発現しているかを確認するために、野生型と KLHL3 ホモノックアウトマウスの各臓器を採取し、β-gal 抗体を用いて Western blotting を行った。β-gal の発現を認めた臓器に関しては、LacZ 染色を試みた。β-gal の Western blotting では、腎臓、脳、眼、精巣、心臓、肺、胃に染色を確認し、とくに腎臓と脳に強く発現を認めた。腎臓の LacZ 染色では腎皮質に、脳では皮質ならびに海馬に染色が認められた。

#### (3) KLHL3 ノックアウトマウスの組織の WNK キナーゼの発現量

KLHL3 が確認できた臓器に関して WNK の評価を行ったところ、腎臓では予想通り WNK の増加を認めたが、腎臓以外では、脳も含めて WNK の変化は認めなかった。

#### (4) KLHL3 ノックアウトマウスのフェノタイプ

このノックアウトマウスは KLHL3R538H/+ ノックインマウスと同様に PHAII の症状を有することが期待され、血圧と電解質異常の検討を行った。予想通り、KLHL3<sup>-/-</sup>ノックアウトマウスでは塩分感受性高血圧、高 K 血症、代謝性アシドーシスを呈し、PHAII のモデルマウスと同様であることを確認した。しかしながら、KLHL3<sup>+/-</sup>ヘテロノックアウトマウスでは、KLHL3R528H/+ ノックインマウスとは異なり PHAII 様の症状を認めなかった。以上より、KLHL3 R528H はドミナントネガティブ効果を持つことが示唆された。

#### (5) KLHL3 ノックアウトマウスでの WNK4-SPAK/OSR1-NCC シグナル化スケート

腎臓の Western blotting では、PHAII の原因となる WNK1 と WNK4 の両方の WNK キナーゼのタンパク発現が亢進していた。さらに、下流の OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードはすべて亢進していた。しかしながら、KLHL3<sup>+/-</sup>では WNK カスケードの亢進を認めなかった。

#### (6) 二量体形成による KLHL3R528H のドミナントネガティブ効果

HEK293T を用いて、KLHL3 の野生型同士ならびに、野生型と変異型 KLHL3R528H で二量体を形成することを確認した。また、野生型 KLHL3 単独よりも、野生型 KLHL3 に変異型 KLHL3R528H が加わった方が明らかに WNK4 の増加を認めたことから、KLHL3R528H が野生型 KLHL3 と二量体を形成しかつドミナントネガティブ効果を示すことを *in vitro* で明らかにした。

ER ストレスの研究に関しては、電解質負荷による ER ストレスマーカーの反応が十分でなく、今後も検討を続けていくことになった。

### 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)

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 .

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 pseudo- hypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. *Biol Open*. 2015, 4:1509-17. doi: 10.1242/bio.013276. 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 .

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.* 2015, 26:2129-38. doi: 10.1681/ASN.2014070639. 査読有 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井上祐一 (Inoue, Yuichi)

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 : 20284911