

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461243

研究課題名(和文) PHAIIにおけるKLHL3/Cullin3の役割の検討

研究課題名(英文) Analysis of the role of KLHL3/Cullin3 in PHAII

研究代表者

太田 哲人(Ohta, Akihito)

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：00510356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近、偽性低アルドステロン症II型(PHAII)の新たな原因遺伝子としてKelch-like 3(KLHL3)とCullin3(Cul3)が明らかになった。KLHL3/Cul3とWNKシグナル経路との関連を検討するため、培養細胞での強制発現系とCul3遺伝子変異ノックインマウスの解析を行った。その結果、KLHL3はWNK1/4のコピキチン化にかかわっており、変異KLHL3ではWNKのコピキチン化が障害されWNKシグナル系の亢進が起こり、高血圧を呈することがわかった。Cul3変異ノックインマウスではCullin3蛋白発現量の減少がみられ、PHAII様の形質は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, Kelch-like 3 (KLHL3) and Cullin3 (Cul3) were identified as novel causative genes for the hereditary hypertensive disease, pseudohypoaldosteronism type II (PHAII). To elucidate the relationship between KLHL3/Cul3 and the WNK signaling pathway, we analyzed protein overexpression system in cultured cells and generated mutant Cul3 knock-in mice. As a result, we found that KLHL3 was associated with the ubiquitination of WNK1/4, and that mutant KLHL3 interfered with WNK ubiquitination resulting in the hyper-activation of the WNK signaling pathway, leading to the development of hypertension. In the mutant Cul3 knock-in mice, decreased expression of Cullin3 was observed, whereas PHAII-like phenotype was not replicated. This result suggested that mere heterozygous deletion of Cul3 was not sufficient for the onset of PHAII and that the mutant Cul3 protein with the deletion of exon9 might have a dominant-negative function.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：遺伝性高血圧 WNKキナーゼ 偽性低アルドステロン症II型 コピキチン化 遺伝子改変マウス ノックインマウス Akt リン酸化

1. 研究開始当初の背景

偽性低アルドステロン症 II 型 (pseudo-hypoaldosteronism type II: PHAII) は、塩分感受性高血圧症を呈する遺伝性の難治性疾患である。PHAII は WNK キナーゼの遺伝子変異によって引き起こされるが、筆者はこの疾患の病態についてモデルマウスを用いて解析し、WNK キナーゼの基質として OSR1/SPAK キナーゼ、さらにその基質として SLC12A 輸送体分子の存在を明らかにし、それらが腎臓の塩分出納調節および血管のトーン調節に重要なシグナル伝達系を構成していることを明らかにした (*Hum Mol Genet.* 2009; 18: 3978., *J Cell Sci.* 2011; 124: 1391., *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425: 456., *Clin Exp Nephrol.* 2012; 16(4): 530.)。すなわち、今まで知られていたレニン-アンジオテンシン系とは異なる新たな血圧調節系 (WNK シグナル伝達系) の存在を、世界に先駆けて明らかにした。申請者はさらに研究をすすめ、この系は、塩分やカリウム摂取に応じて制御されている事 (*Kidney Int.* 2008; 74: 1403., *Clin Exp Nephrol.* 2011; 15(2): 195.)、アルドステロン・アンジオテンシン II・インスリンなどの液性因子によって制御を受ける事 (*Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393(4): 844., *PLoS One.* 2011; 6: e24277.) を報告し、一般的な塩分感受性高血圧発症に関わることを示してきた。このように本シグナル上流の制御因子は明らかになりつつあったが、それらと WNK をつなぐ、WNK シグナル活性化と制御の分子機序は不明のままであった。

最近、PHAII の新たな原因遺伝子として Kelch-like 3 (KLHL3) と Cullin3 (Cul3) が明らかになった。筆者は KLHL3 が Cul3 と複合体を形成し、WNK4 の E3 ユビキチンリガーゼとして機能する事を示した (*Biochem J.* 2013; 451(1): 111.)。しかしながらこれまでに KLHL3/Cul3 と WNK4 シグナル経路についての病態検討は報告されておらず、疾患起因性変異 KLHL3/Cul3 による PHAII の発症メカニズムも不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、PHAII 患者群で報告された疾患起因性変異 KLHL3 / Cullin3 を用い、WNK - OSR1 / SPAK シグナル経路との関連を検討し、PHAII における高血圧発症メカニズムについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞内ユビキチン化による WNK-NCC シグナル系の制御:

KLHL3 / Cullin3 と WNK との関係を細胞での強制発現系において検討した。

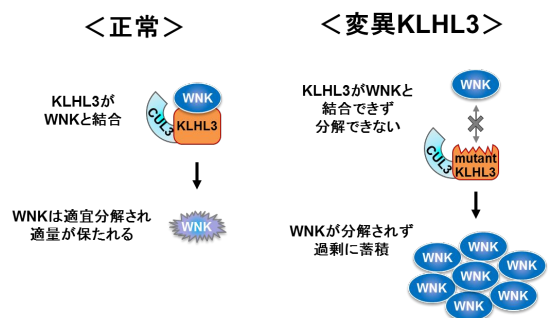
(2) 疾患起因性 Cullin3 遺伝子変異を持つ遺伝子改変マウスの作製:

生体内における KLHL3/Cul3 の生理的な基質の探索と、Cul3 の遺伝子変異による PHAII の発症メカニズムの解明のために、疾患起因性 Cul3 遺伝子変異をノックインした遺伝子改変マウスを作製、解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞内ユビキチン化による WNK-NCC シグナル系の制御:

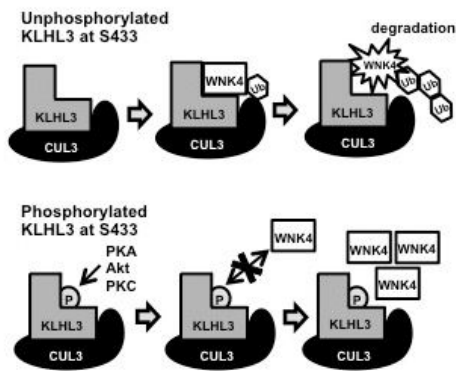
PHAII 患者で報告のあった疾患起因性 KLHL3 / Cullin3 変異を持つ安定発現株を作製し、蛋白を精製し質量分析にかけ、野生型 KLHL3 / Cullin3 と変異型 KLHL3 / Cullin3 での複合体形成を比較検討した。ある KLHL3 の変異体では KLHL3 とユビキチンリガーゼ複合体を構成する Cullin3 との結合が障害されており、また他の KLHL3 の変異体では WNK キナーゼとの結合が障害されていることも判明した。また Cullin3 ノックダウンにて WNK1 の発現増加が見られた。次に KLHL3 - Cullin3 を精製し、WNK1 を基質としてユビキチンアッセイを行ったところ、WNK1 のユビキチン化が確認され WNK1 が KLHL3 の基質であることが判明した。さらに、変異 KLHL3 ではこのユビキチン化が阻害されていた。また PHAII で報告されていた疾患起因性変異 WNK4 発現細胞でも KLHL3 との結合は阻害されていた。このことから KLHL3 は WNK1/4 のユビキチン化に直接かかわっており、変異 KLHL3 では WNK キナーゼのユビキチン化が障害され、その結果 WNK の発現増加による下流のシグナル亢進が起こり、高血圧を呈することが想定された (図 1)。



(図 1) 変異 KLHL 変異による PHAII 発症メカニズム

また、質量分析を利用して KLHL3 のリン酸化サイトを同定し、その部位に対するリン酸化抗体を作製し検討した。その結果、KLHL3 の kelch-repeat 内の S433 がリン酸化サイトであると同定された。WNK4 によって免疫沈降された KLHL3 は S433 リン酸化が減少しており、S433 リン酸化によって KLHL3 は WNK4 との結合を減少させることがわかった。In vitro キナーゼアッセイで

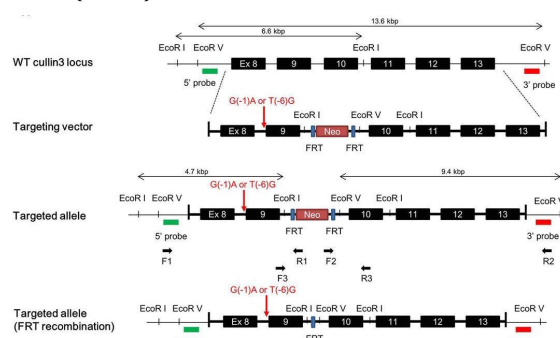
はPKAとAktによるKLHL3S433のリン酸化が確認され、さらに培養細胞においてforskolinとinsulinの刺激でKLHL3S433リン酸化が亢進した。このことからPKAとAktによるKLHL3リン酸化がWNK4との結合を制御することが明らかとなり、インスリンやバソプレシンによるWNKシグナル制御の生理的メカニズムの一つであると考えられた(図2)。(雑誌論文)



(図2) KLHL3 S433リン酸化サイトの役割

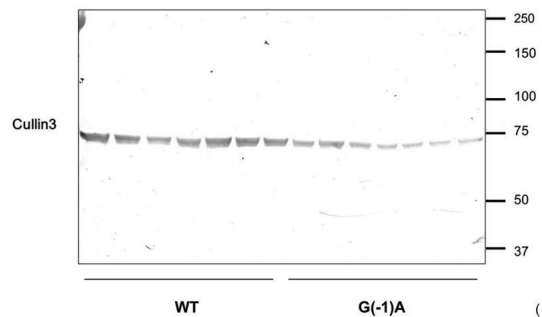
(2) 疾患起因性 Cullin3 遺伝子変異を持つ遺伝子改変マウスの作製:

Cullin3 に報告されている病原性変異は exon 9 周囲に位置し、変異を有する患者の白血球では exon9 の skipping が起きている事が確認されている。しかしながらこの変異が PHAII を引き起こす分子病態は明らかでなかった。PHAII 起因性である Cullin3 の exon9 の splice acceptor の変異 G(-1)A をもつノックインマウスを作製しその解析を行った(図3)。



(図3) 疾患起因性 Cullin3 ノックインマウスの作製

その結果、変異ノックインマウスは、ヒトでの白血球での結果と異なり、その変異アレルから exon9 の skipping が確認できなかった。ヘテロ変異マウスでの腎臓 Cullin3 蛋白質発現量は正常の約 50%であり、変異アレルからは正常の転写翻訳はおきていない事が推測された(図4)。

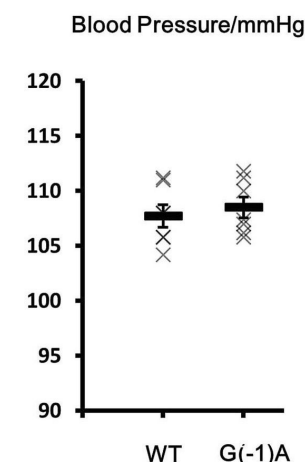


(図4) ヘテロ変異マウスでの腎臓 Cullin3 蛋白質の発現

同時にこのヘテロ変異マウスでは PHAII 様の形質は確認できなかった(表1、図5)。

	WT (n=7)	G(-1)A (n=7)	P value
Na <sup>+</sup> (mM)	147.1±0.6	146.3±0.7	0.399
K <sup>+</sup> (mM)	4.89±0.23	4.86±0.16	0.921
Cl <sup>-</sup> (mM)	110.1±0.3	108.7±0.4	0.022*
pH	7.30±0.02	7.31±0.02	0.742
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	47.2±1.6	48.1±2.0	0.749
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	23.4±0.4	23.9±0.3	0.334
BUN (mg/dl)	21.6±1.5	25.3±1.0	0.064
Glu (mg/dl)	221	231	0.631
Hb (g/dl)	14.5	14.6	0.720

(表1) ヘテロ変異マウスの表現型: 血液生化学



(図5) ヘテロ変異マウスの表現型: 血圧

すなわち、本マウスモデルでは exon9 の skipping を再現できなかったが、単なる Cullin3 の heterozygous deletion では PHAII が発症しない事が確認され、exon9 が skip された変異 Cullin3 は単なる非機能蛋白でなく、数ある Cullin3 ベースの E3 リガーゼ中で KLHL3 に対して特異的に作用する機能を持っている事が示唆された。(雑誌論文)

### 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)

Generation and analysis of knock-in mice carrying

pseudohypoadosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. **Biol Open**. 2015; 4(11): 1509-17. doi: 10.1242 / bio. 013276. 査読あり

Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 467(2): 229-34. doi: 10.1016 / j.bbrc. 2015.09.184. 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 哲人(OHTA, Akihito)  
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：00510356

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：