

## 塩分感受性高血圧症に関わる WNK4 蛋白の機能制御機構の解明

内田 信一<sup>1</sup>, 蘇原 映誠<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学

<sup>2</sup> 東京医科歯科大学腎臓内科

**概要** 偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) は WNK1、WNK4、KLHL3、Cullin3 の変異が原因で高血圧を呈する。我々は以前 PHAII のモデルマウス (Wnk4<sup>D561A/+</sup> ノックインマウス) で WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化刺激伝達系が亢進していることを報告したがこの系の制御メカニズムは不明だった。本研究では WNK キナーゼ、KLHL3、Cullin3 がどのように PHAII 発症に関与しているのかを探り、ヒトにおける新たな高血圧症発症機序を解明することを目的とした。

細胞の強制発現系で KLHL3 は WNK4 および Cullin3 と結合し、KLHL3 の強制発現は WNK4 ユビキチン化の増強と WNK4 蛋白量の減少をもたらす一方、PHAII の変異 WNK4 は KLHL3 によるユビキチン化をうけず、細胞内 WNK4 蛋白量が増加した。同様に PHAII 変異 KLHL3 は WNK4 をユビキチン化する事が出来ず、細胞内 WNK4 蛋白量が増加した。実際、WNK4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作成・解析で WNK-OSR1/SPAK-NCC の亢進と血圧上昇がみられ、WNK4 蛋白量増加によって WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの亢進を認める事が明らかになった。KLHL3 又は Cullin3 変異のある PHAII 患者で尿中リン酸化 NCC 排泄量が増加し、WNK4 変異をもつ PHAII モデルマウスと共通の病態がヒト PHAII 患者でもみられる事が確認された。

以上より、WNK4 のユビキチン化障害が PHAII 発症の共通の病態であることが明らかとなった。今後、WNK キナーゼのユビキチン化制御が高血圧症の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

### 1. 研究目的

従来、遺伝性高血圧疾患は腎臓尿管の Na チャネルやトランスポーター蛋白自身の変異による Na 再吸収の異常な増加というメカニズムで考えられてきた。しかし、2001 年に遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (以下 PHAII) 患者には WNK キナーゼに変異があることが linkage analysis によって報告された<sup>1)</sup>。この発見によって、WNK キナーゼを介して血圧をコントロールするネットワークが腎臓に存在することを示唆された。申請者内田信一は東京医科歯科大学腎臓内科において近年 WNK キナーゼについての研究を指揮してきた。

最近、東京医科歯科大学腎臓内科ではヒトの変異 WNK4 を組み込んだノックインマウス、すなわち PHAII モデルマウスを作成し解析を行った<sup>2)</sup>。このモデルマウスの作成と解析により、Na-Cl 共輸送体 (以下 NCC) が

OSR1/SPAK というキナーゼを介して、病態モデルマウスでは過度にリン酸化され、リン酸化された NCC は細胞膜上に集積し、NaCl を過度に再吸収することにより、高血圧症をおこすことが明らかになった。すなわち、PHAII は WNK4 の過剰な機能亢進により WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進するために、塩分再吸収が過度に起きるために発症することを当研究室は明らかにしてきた。さらに、このリン酸化刺激伝達系がアルドステロン、アンギオテンシン II やインスリン、さらには細胞外カリウムといった刺激によって制御される事を報告し、生理的な NaCl 出納においても重要な働きをしている事を明らかにしてきた<sup>3-7)</sup>。

最近、我々は PHAII を引き起こす D561A ミスセンス変異体を発現するヘテロノックインマウスにおいて、変異 WNK4 蛋白発現の著明な増加を発見した。これが mRNA

増加による転写亢進のためではないことは予備実験で確認しており、D561A 変異による WNK4 蛋白の安定性増加に起因していると推測された。WNK4 蛋白発現の単純な増加だけでも NCC の発現とリン酸化を亢進し、腎臓遠位尿細管での過剰な塩分再吸収を引き起こし、結果として塩分感受性高血圧をきたす事を WNK4 トランスジェニックマウスで我々は確認しており、WNK4 分子自体の制御機構を明らかにする事が、塩分感受性高血圧の理解に重要であると考えられた。

しかしながら、どのようなメカニズムで WNK4 キナーゼ自体が制御されているかの詳細な分子機構は不明であったが、2012年 KLHL3 と Cullin3 という2つの分子の変異が PHAII を引き起こすことが GWAS から明らかになり、報告された<sup>8-9)</sup>。WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの関連は不明であったが、KLHL3 と Cullin3 は一般的にユビキチン化に関わる蛋白として知られており、これらの新規原因蛋白が WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードに関わる蛋白のユビキチン化と分解に関わっている可能性が示唆された。本研究では WNK キナーゼ、KLHL3、Cullin3 がどのように PHAII 発症に関与しているのかを探り、ヒトにおける新たな高血圧症発症機序を解明することを目的とした。

## 2. 研究方法 研究結果

一般に KLHL ファミリー蛋白というのは Cullin3 と複合体を形成し、E3-ligase を形成することが知られている。E3-ligase はユビキチン化という過程の中で中心的な役割を担っており、KLHL 蛋白は通常、ユビキチン化したい基質蛋白がはまるように kelch repeat というプロペラ構造をとっており、基質をつかまえる働きをしている。まず我々は KLHL3 の基質蛋白の検討を行った。

### KLHL3 は Cullin3 と WNK4 と結合して複合体を形成する

KLHL3 は予想通り Cullin3 と結合することを免疫沈降法で確認した。さらに、KLHL3 が WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの各因子と結合する可能性を検討するために、各蛋白との免疫沈降法を行ったところ、WNK4 とのみ結合が認められた。また、WNK4 と Cullin3 は KLHL3 の存在下でのみ、同じ複合体に存在することが明らかになり、KLHL3 が WNK4 をとらえる働きをしていることが明らかになった。(Fig. 1, Fig. 2)

### KLHL3 の強制発現によって WNK4 蛋白の減少を認める

KLHL3 が実際に結合する WNK4 蛋白量の制御を行っているかを検討するために、HEK293 細胞において KLHL3 を強制発現すると WNK4 蛋白量の減少を認めた。また、PHAII を起こす変異 KLHL3 は WNK4 と結合することができず、WNK4 蛋白減少効果がなくなっていた。このことは KLHL3 が WNK4 の蛋白分解を行っている可能性を示唆した (Fig. 3)。

### KLHL3 は WNK4 のユビキチン化を起こす

HEK293 細胞において KLHL3 を発現させると WNK4 蛋白量の減少を認めたが、実際に KLHL3 によって WNK4 ユビキチン化が増加するかを検討した。図にあるよ

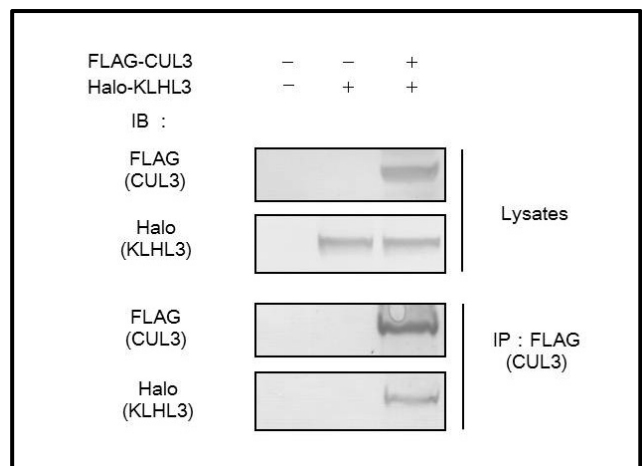


Fig. 1. Cullin3 と KLHL3 は結合する

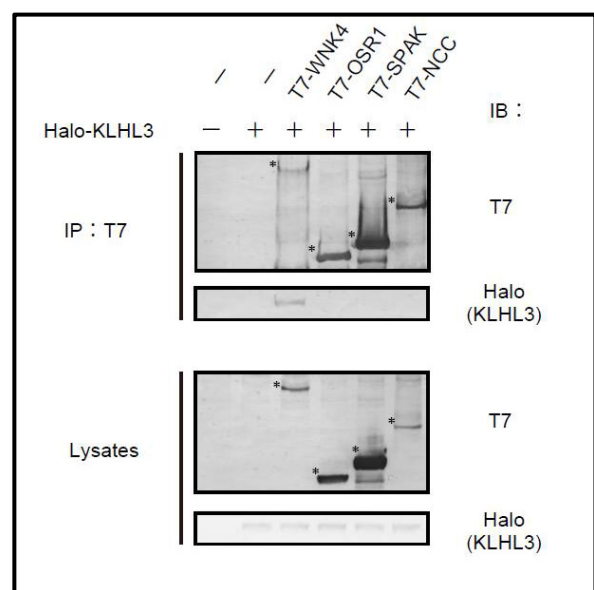


Fig. 2. KLHL3 は WNK4 と結合する

うに、KLHL3 発現によって、WNK4 ユビキチン化が亢進することが明らかになった。すなわち、KLHL3 によって WNK4 のユビキチン化が亢進し、蛋白分解されることが証明された (Fig. 4)。

PHAII 変異 KLHL3 は WNK4 のユビキチン化が十分に行えない

我々は KLHL3 の変異によってなぜ PHAII が起きるか

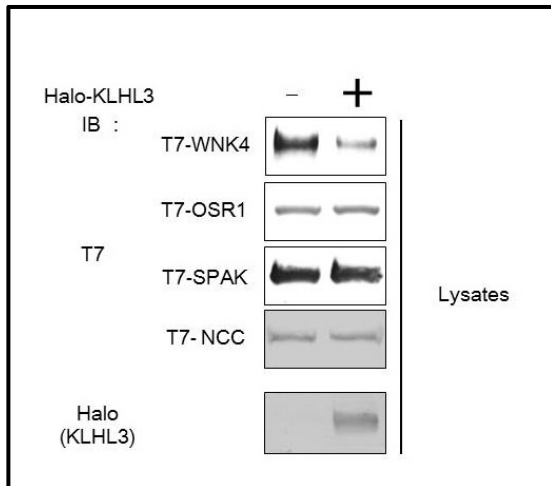


Fig. 3. KLHL3 は WNK4 蛋白量を減少させる

を検証するために、まず KLHL3 R528H 変異を用いて WNK4 のユビキチン化と蛋白減少効果を検討した。変異 KLHL3 は WNK4 のユビキチン化を行えず、さらに WNK4 蛋白量を減少させることができなかった (Fig. 5)。また、PHAII 変異 WNK4D564A は野生型 KLHL3 によるユビキチン化を受けることができずに蛋白量も多いままであった。すなわち、PHAII においては、KLHL3 による WNK4 のユビキチン化が行えずに WNK4 蛋白量が増えることがその本質である可能性が示唆された (Fig. 6)。

WNK4 変異蛋白における蛋白分解異常の生体での証明

我々は PHAII 変異 WNK4D564A を組み込んだノックインマウスを有している。この変異 WNK4 が細胞実験のようにユビキチン化障害を呈するのであれば、蛋白量は増えるはずである。Fig. 7 のように生体内においても WNK4D564A は蛋白発現が増えており、分解系の異常によるものであると考えられた。

WNK4 トランスジェニックマウスの解析

WNK4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作成・解析で WNK-OSR1/SPAK-NCC の亢進と血圧上昇がみられた (Fig. 8, Fig. 9)。この事は単純な WNK4 発現量

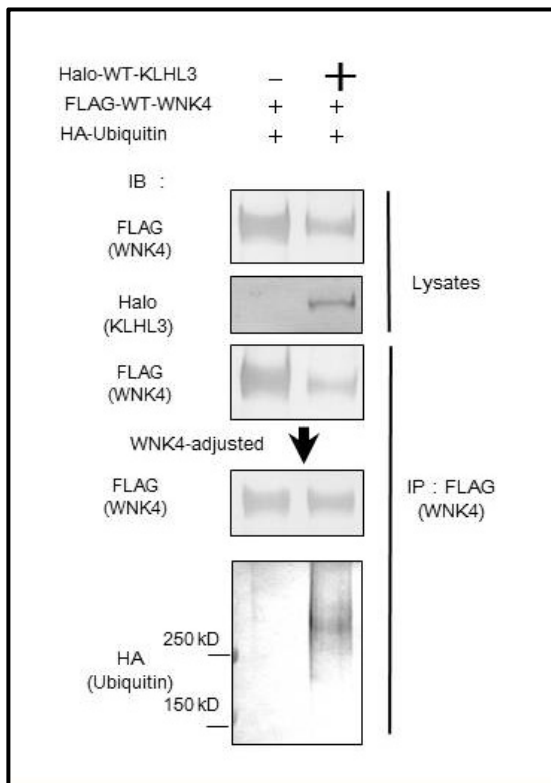


Fig. 4. KLHL3 によって WNK4 はユビキチン化される

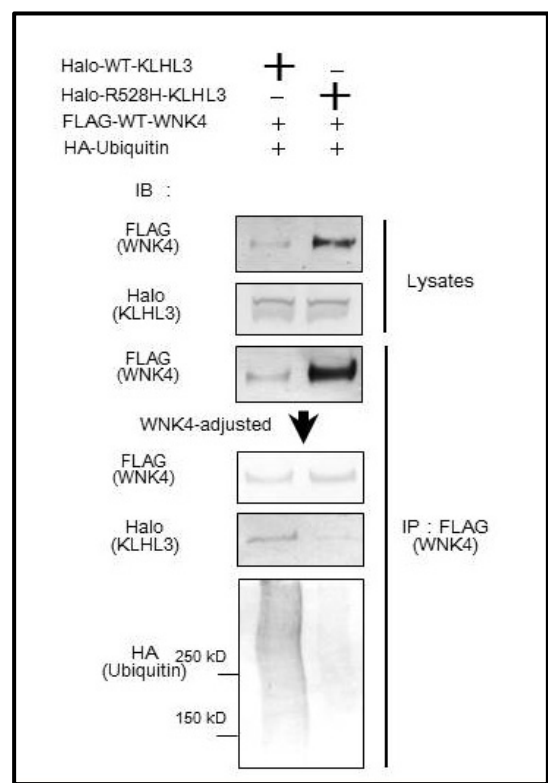
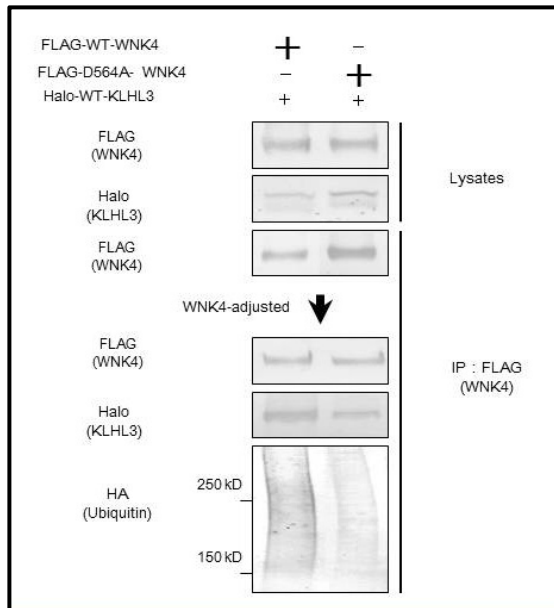
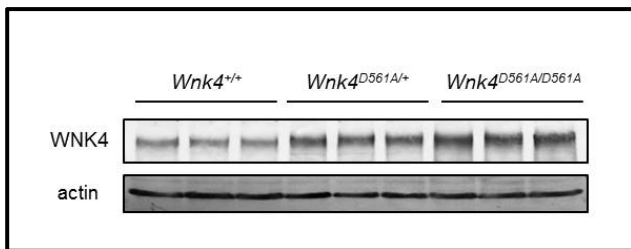


Fig. 5. 変異 KLHL3 は WNK4 をユビキチン化できない



**Fig. 6.** 変異 WNK4 は KLHL3 によるユビキチン化をうけない

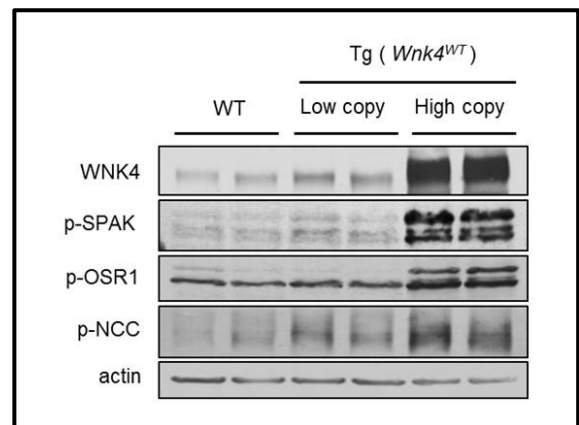


**Fig. 7.** WNK4D561A は生体内で蛋白発現量が増加している

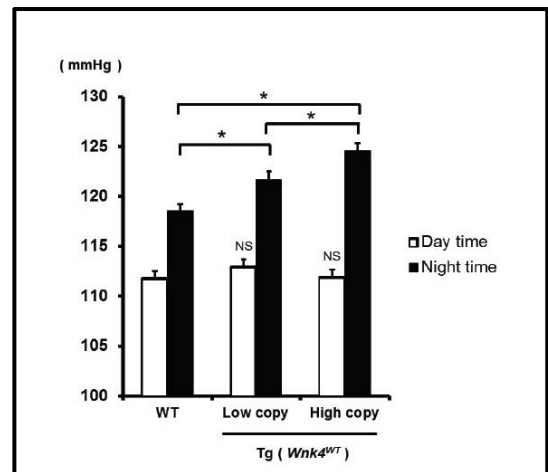
増加のみで WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの異常な上昇を呈し、PHaII になる事を証明した。

### 3. 考 察 今後の課題

今回、我々は新しく同定された PHaII の原因蛋白である KLHL3/Cullin3 と WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの関係を明らかにした。KLHL3 と WNK4 が結合することにより、E3 ligase に WNK4 が組み込まれてユビキチン化を受け、WNK4 が分解されることにより、WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが制御されている事が証明された。また、PHaII においては、WNK4、KLHL3、Cullin3 の変異がこのユビキチン化制御に関わっている事がわかり、WNK4 のユビキチン化障害が PHaII



**Fig. 8.** WNK4 トランスジェニックマウスにおける OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの亢進



**Fig. 9.** WNK4 トランスジェニックマウスにおける血圧上昇

発症の共通の病態であることが明らかとなった (**Fig. 10**)。本研究は Cell Reports 誌に掲載された<sup>10)</sup>。この事は腎臓の塩分再吸収における新しい制御機構の存在を明らかにし、今後、WNK キナーゼのユビキチン化制御が高血圧症の新たな治療ターゲットとなる可能性があると考えられた。我々は WNK-SPAK 系に関わる創薬の研究も行っており、今後の本研究の臨床への応用と発展が必ずなされると確信している。

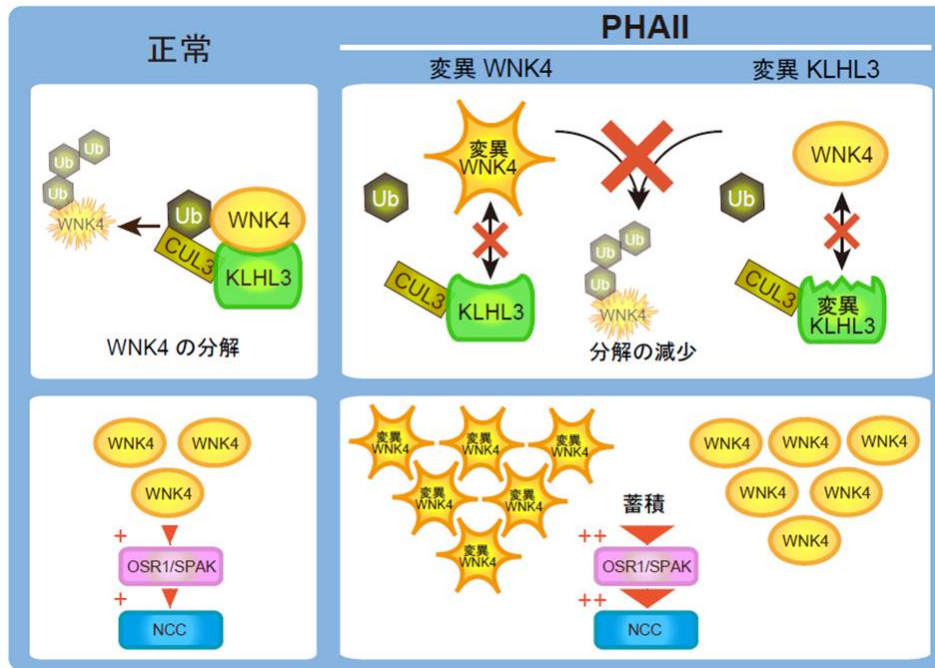


Fig. 10. Cullin3-KLHL3 による WNK-OSR1/SPAK-NCC 制御機構と PHAII 発症メカニズム

#### 参考文献

- 1) Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, *et al.* (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112.
- 2) Yang SS, Morimoto T, Rai T, *et al.* (2007) Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II : generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 5: 331-344, 2007
- 3) Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, *et al.* (2012) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension*. 60: 981-990, 2012.
- 4) Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, *et al.* (2008) Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 74: 1403-1409.
- 5) Talati G, Ohta A, Rai T, Sohara E, Naito S, *et al.* (2010) Effect of angiotensin II on the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in cultured mpkDCT cells and in vivo mouse kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 844-848.
- 6) Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, *et al.* (2010) Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin Exp Nephrol*.
- 7) Sohara E, Rai T, Yang SS, *et al.* (2011) Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. *PLoS One*. 6: e24277.
- 8) Boyden LM, Choi M, Choate KA, *et al.* (2012) Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature*. 482: 98-102.
- 9) Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, *et al.* (2012) KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat Genet*. 44: 456-60.
- 10) Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, *et al.* (2013) Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep*. 3: 858-68.

## Investigation of Mechanisms of Ubiquitination and Degradation of WNK Kinase Protein

Shinichi Uchida, M.D., Ph.D.

Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University

### Summary

Mutations in WNK kinases cause the human hypertensive disease pseudohypoaldosteronism type II (PHAII), but the regulatory mechanisms of the WNK kinases are not well understood. Mutations in kelch-like 3 (KLHL3) and Cullin3 were also recently identified as causing PHAII. Therefore, new insights into the mechanisms of human hypertension can be gained by determining how these components interact and how they are involved in the pathogenesis of PHAII. The purpose of the present study was to determine the pathogenic role of PHAII-causing mutations in the WNK4, KLHL3, and Cullin3 genes. We found that KLHL3 interacted with Cullin3 and WNK4, induced WNK4 ubiquitination, and reduced the WNK4 protein level. When the expression levels of wild-type and mutant KLHL3 were similar, the R528H mutant was less able to reduce the endogenous protein level of WNK4 as compared to wild-type KLHL3. We also tested the effect of PHAII-causing mutations of WNK4 on WNK4-KLHL3 interaction and WNK4 ubiquitination. Although wild-type KLHL3 decreased WNK4, this decrease mediated by KLHL3 was blunted in all PHAII-causing WNK4 mutants. Thus, the reduced interaction of KLHL3 and WNK4 by PHAII-causing mutations in either protein reduced the ubiquitination of WNK4, resulting in an increased level of WNK4 protein. Transgenic mice overexpressing WNK4 showed PHAII phenotypes, and WNK4 protein was indeed increased in *Wnk4(D561A/+)* PHAII model mice. WNK4 is a target for KLHL3-mediated ubiquitination, and the impaired ubiquitination of WNK4 is a common mechanism of human hereditary hypertension. In summary, our study identified that WNK4 is a substrate of KLHL3-Cullin3-mediated ubiquitination and that the impaired ubiquitination of WNK4 is a common mechanism of PHAII by WNK4, KLHL3, and Cullin3 PHAII-causing mutations.