

## WNK キナーゼ制御における新規塩分感受性高血圧症原因遺伝子 KLHL3・Cullin3 の役割についての研究

内田 信一, 蘇原 映誠

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

**概要** PHAII の原因遺伝子として with-no-lysine kinase (WNK) の一員である WNK1 及び WNK4 が同定されていた。WNK は最終的に NaCl 共輸送体(NCC)をリン酸化して活性化させ、塩分を原尿から再吸収するという WNK シグナルを形成している。PHAII は WNK シグナルが過剰に亢進する事によって発症する事を、ソルト・サイエンス研究財団の助成等により我々は報告してきた。WNK シグナルの更なる解明は、単に PHAII そのものの病態解明に留まらず、腎臓における生理的なナトリウム調節や血圧調節に関わるメカニズムの解明に有用と考えられている。しかし、WNK キナーゼの変異でなぜ PHAII が起きるのかは今まで不明であった。

最近、新たに Kelch-like 3 (KLHL3) と Cullin3 (CUL3) が PHAII の原因遺伝子として同定された。KLHL3 は、Cullin3 と結合して KLHL3-Cullin3 ユビキチン E3 リガーゼという複合体を形成する分子で、基質をアダプターとして捉え、その基質をユビキチン化し、蛋白分解へ導く役割を持つ。我々は過去の研究で WNK4 が KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼの基質であることを報告したが、他方、WNK1 や NCC が KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼの基質であるという報告もあった。さらに、いずれの報告も培養細胞実験に基づいたものであったため、実際の生体内における KLHL3 の基質は不明なままであり、KLHL3 の変異が生体内でどのように PHAII を発症させるのかについて検討が求められていた。

これらの疑問を解明するため、我々や他のグループから家系を報告された KLHL3 R528H 変異を有するノックインマウスを作製し、解析した。この KLHL3<sup>R528H/+</sup>マウス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 の本質である NCC のリン酸化亢進を認めたことから、KLHL3 変異による良好な PHAII のモデルマウスであることが確認された。次に KLHL3 変異による PHAII 発症メカニズムの探求を行ったところ、腎遠位尿細管における WNK1 と WNK4 の蛋白増加を発見した。これは、KLHL3 変異のために WNK1 と WNK4 をとらえる事ができなくなり、Cullin3/KLHL3 複合体による WNK キナーゼの蛋白分解システムが破綻したために、WNK1 と WNK4 の蛋白量が増加していると考えられ、事実、蛍光相関分光分析計測装置を用いた検討で、WNK1、WNK4 はともに野生型 KLHL3 蛋白とは結合するが、変異 KLHL3 R528H 蛋白とは結合できないことが示された。

以上の結果から、KLHL3 変異による PHAII は、変異 KLHL3 が WNK1、WNK4 と結合できなくなることにより、これらのユビキチン化が減弱し、WNK1 及び WNK4 の蛋白量が増加することによって、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナルが亢進するため発症すると明らかになると同時に、KLHL3 による WNK 分解系が生理的に機能している事がはじめて生体で証明された。

### 1. 研究目的

高血圧は全世界で広くみられる疾患であり、特に先進国においては非常に頻度が高く、人口の 20-25%程度が罹患していると考えられている。その克服は世界的な課題

であるが、高血圧には数多くの因子が関わっており、病態の全容解明は容易ではない。そのような状況下、我々は、本研究財団助成(助成番号 0832, 1026, 1228)により、塩分感受性高血圧症を呈する遺伝性疾患である偽性低ア

ルドステロン症 II 型(以下 PHAII)の分子病態を遺伝子改変マウス作成と解析により明らかにしてきた。PHAII は、塩分感受性高血圧、高カリウム血症、代謝性アシドーシスなどを特徴とする遺伝性疾患である。<sup>1)</sup> PHAII のような単一遺伝子の異常で起こる高血圧性疾患について詳細を検討することは、単に PHAII そのものの病態解明や治療法の開発に留まらず、腎臓におけるナトリウム調節や血管の収縮の調節など、血圧調節に関わるメカニズムの幅広い解明に有用であると期待される。

PHAII の原因遺伝子としては、with-no-lysine kinase (WNK)の一員である WNK1 及び WNK4 が同定されていた。WNK は oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1) と STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) をリン酸化することによって活性化し、リン酸化された OSR1、SPAK はさらに Na-Cl cotransporter (NCC) をリン酸化・活性化するという WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを構成している事を我々は報告した<sup>2)</sup>(*Cell Metab* 2007, *Hum Mol Genet* 2009, *J Cell Sci* 2011)。このカスケードについては我々を含めて、これまでに複数のモデルマウスを用いた検討がなされており、このカスケードが亢進すると腎臓の遠位尿細管におけるナトリウム再吸収が亢進し、塩分感受性高血圧を呈することが確認されている。

さらに、この刺激伝達系がインスリン<sup>3,4)</sup>、塩分摂取<sup>5)</sup>、アルドステロン<sup>5)</sup>、アンジオテンシン II<sup>6)</sup>、さらにはカリウム摂取<sup>7)</sup>により制御される事を報告し、生理的な NaCl や K 出納調節に重要な働きをしている事を明らかにしてきた(*Kidney Int* 2008, *BBRC* 2010, *PLoS One* 2011, *CEN* 2011, *Hypertension* 2012)。インスリンからからの制御は、ALLHAT や ACCOMPLISH といった大規模前向き研究で明らかになった『肥満患者群で NCC の阻害薬であるサイアザイドがより有効であった』という事実を説明する知見として高く評価された。またこの WNK キナーゼの系は、腎臓尿細管のみならず血管の平滑筋における NKCC1 輸送体制御によりそのトーンスを調節により血圧調節に関わっていることも明らかにしてきた<sup>8)</sup>(*CEN*, 2012, *Hypertension* 2013)。

このように WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの存在が明らかになるにつれ、同カスケードが PHAII という稀少疾患だけでなく、生理的状況下における塩分再吸収の制御にどのように関与しているかに注目が集まってい

る。さらに、高血圧だけでなく肥満やインスリン抵抗性といった広汎な生活習慣病をも治療する新たな創薬対象としても脚光を浴びている。しかし、同カスケードの全容、特に上位因子からどのような制御を受けているかについては依然不明な点が多かった。

最近、次世代シーケンス技術による検索が行われた結果、新たに Kelch-like 3 (KLHL3) と Cullin3 (CUL3) が PHAII の原因遺伝子として同定された<sup>9,10)</sup>(*Nature Genet*, *Nature* 2012)。KLHL3 は、Cullin3 と結合して KLHL3-Cullin3 ユビキチン E3 リガーゼという複合体を形成する分子で、ユビキチン化される基質と Cullin3 との間のアダプターという役割を持つ。我々は過去の研究で WNK4 が KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼの基質であることを報告した<sup>11)</sup>(*Cell Rep* 2013, *BBRC*, 2013)。

しかしその一方、WNK1 や NCC が KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼの基質であるという報告もあり、どの分子が KLHL3 の基質なのかについては論争中であった。さらに、これらのいずれの報告も培養細胞実験に基づいたものであったため、実際の生体内における KLHL3 の基質は不明なままであり、KLHL3 の変異が生体内でどのように PHAII を発症させるのかについて、検討が求められていた。また、ヒトにおいては KLHL3 の変異を持つ患者の方が WNK の変異を持つ患者より重症の PHAII を呈することが報告されているが、KLHL3 の変異による PHAII と WNK の変異による PHAII の病態の違いがなぜ起こるのか、その機序も不明であった。

これらの生体内における真の KLHL3 による WNK 分解系の働きを解明するため、ヒト患者家系で報告されているものと同じ変異を持つ KLHL3<sup>R528H/+</sup>ノックインマウスを作製した。本研究では KLHL3 がどのように PHAII 発症に関与しているのかを遺伝子改変マウスの作成と解析を通して探り、生体内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

目的に記したように、ヒト患者家系で報告されているものと同じ変異を持つ KLHL3<sup>R528H/+</sup>ノックインマウスを作製し、解析を行った。なお、これらの研究結果は *Human Molecular Genetics* 誌 2014 年 10 月号に報告する<sup>12)</sup>と同時に、東京医科歯科大学よりプレスリリースを行い、世間へ

の周知をはかった。また 2014 年 9 月 2 日に LifePro 医療ニュースに掲載された。

## 2. 1 KLHL<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスの作成

BAC を用いた遺伝子改変技術を駆使し、KLHL3 に R528H 変異を持つ ES 細胞を作製し、熊本大学 竹田直樹先生との共同研究で KLHL3<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスを作製に成功した (Figure 1)。

## 2. 2 KLHL3<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスは PHAII の症状を呈した

このノックインマウスは PHAII の症状を有する事が期待され、血圧と電解質異常の検討を行った。予想通り、KLHL3<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスは塩分感受性高血圧 (Figure 2)、高 K 血症、代謝性アシドーシス (Table 1) を呈し、同変異を有するヒトと同じく、PHAII のモデルマウスであることが証明された。この事により、KLHL3 の変異が

どのような分子メカニズムで PHAII を呈するかを検討するためのモデルとして使用可能である事が確認された。

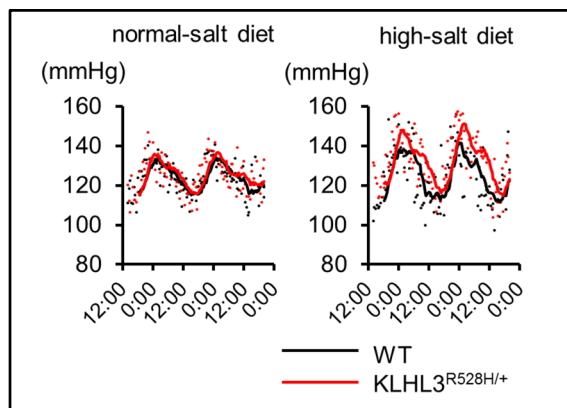


Figure 2. KLHL3<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスは high-salt diet(8%)摂取下で高血圧を呈する

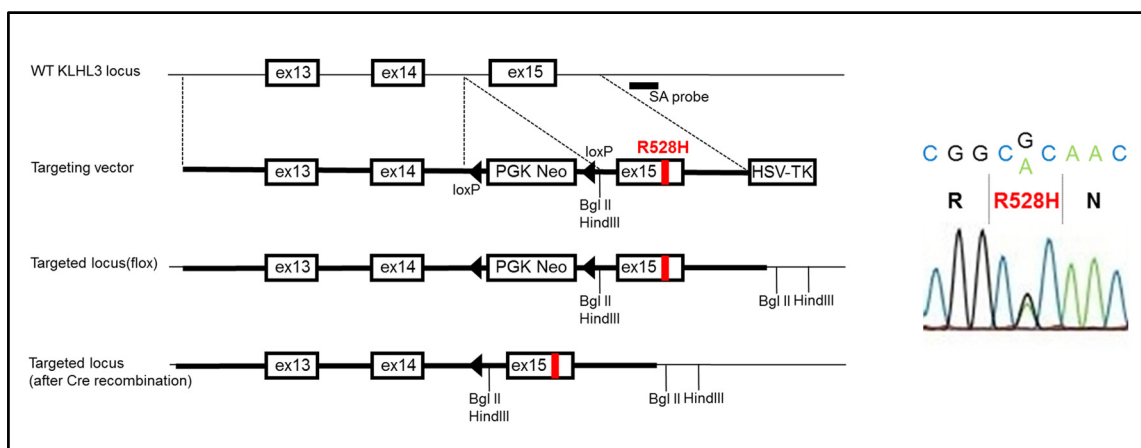


Figure 1. 変異を導入したターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入してノックインマウスを作製

Table 1. KLHL3<sup>R528H/+</sup> ノックインマウスは高 K 血症、代謝性アシドーシスを呈する

	WT (n = 12)	R528H/+ (n = 12)	p
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	149.0 ± 0.4	149.7 ± 0.4	0.295
K <sup>+</sup> (mmol/l)	4.1 ± 0.1	4.8 ± 0.1	<0.001
Cl (mmol/l)	113.1 ± 0.4	116.0 ± 0.6	0.002
BUN (mg/dl)	24.1 ± 1.4	22.9 ± 0.9	0.095
Glu (mg/dl)	221.8 ± 8.3	219.3 ± 11.4	0.861
pH	7.321 ± 0.008	7.287 ± 0.011	0.025
pCO <sub>2</sub>	44.5 ± 1.4	46.1 ± 1.6	0.464
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23.5 ± 0.4	21.7 ± 0.4	0.009
AnGap (mmol/dl)	16.5 ± 0.5	16.4 ± 0.5	0.87
Hb (g/dl)	14.7 ± 0.3	14.6 ± 0.2	0.86

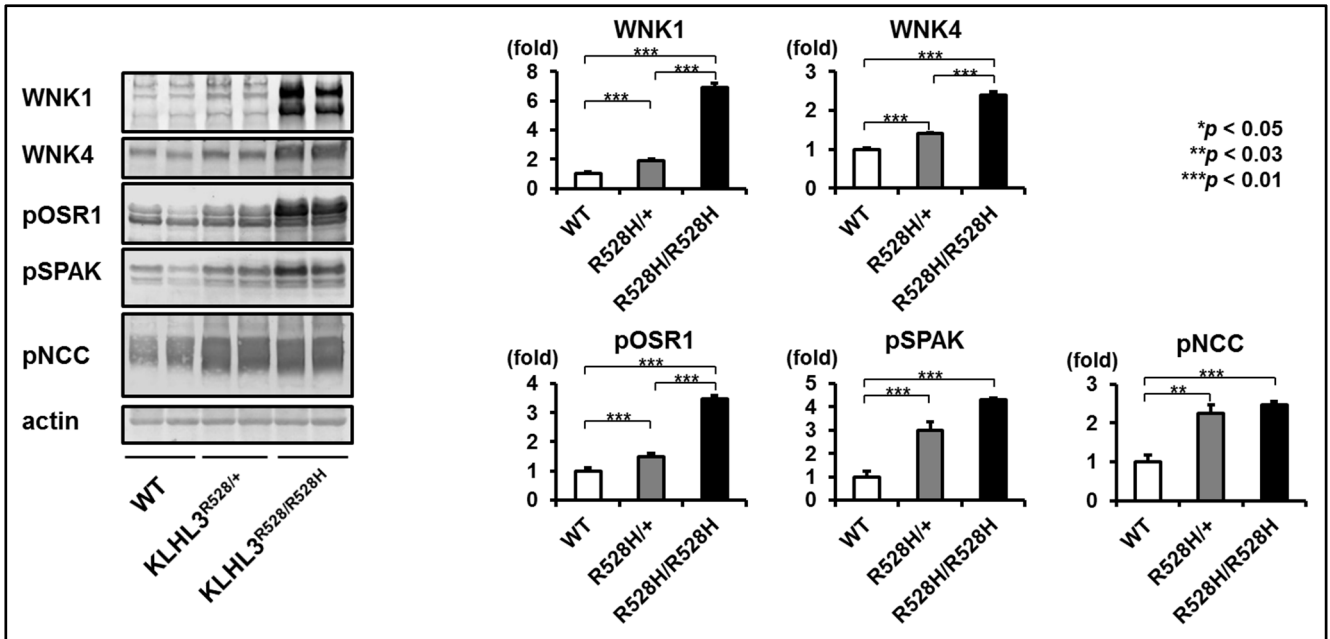


Figure 3. KLHL3<sup>R528H/+</sup>マウス腎では WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進している

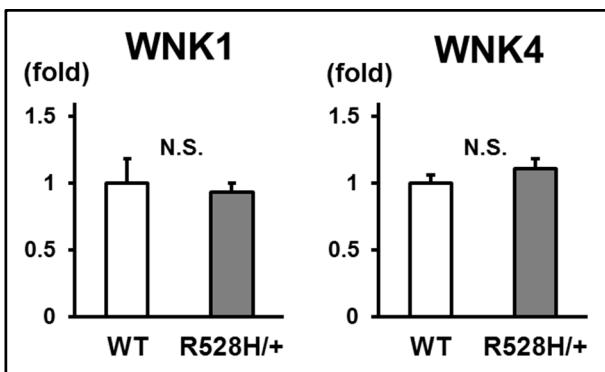


Figure 4. real time PCR の結果、KLHL3<sup>R528H/+</sup>マウス腎では WNK1、WNK4 の mRNA 増加は認めず

### 2. 3 WNK1とWNK4の両方のWNKキナーゼのタンパク発現が KLHL<sup>R528H/+</sup>ノックインマウスでは亢進し、下流のOSR1/SPAK-NCCリン酸化シグナルを亢進させる

腎臓の Western blotting では、PHAI1 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おり、何らかの feedback ではなく、WNK 発現亢進がその主たる原因である事が明らかになった (Figure 3)。また、WNK1 と WNK4 の mRNA レベルは定量的 RT-PCR によって、増加していない事が

明らかになった (Figure 4)。この事実は KLHL3 が WNK1、WNK4 両方の WNK キナーゼを捉えてタンパク分解することによって、生理的な制御を行っている事実を強く示唆した。

### 2. 4 腎遠位尿細管における WNK1、WNK4 の発現亢進

NCC は腎臓の遠位尿細管にのみ発現しているため、本マウスで亢進している WNK キナーゼが腎臓の遠位尿細管で増加しているかを蛍光免疫染色で確認した。以下の図に示すように、KLHL3 は腎臓遠位尿細管にシグナルが認められ、WNK1/WNK4 ともに遠位尿細管での発現が亢進している事も確認された (Figure 5)。すなわち、KLHL3 による WNK キナーゼの分解系が遠位尿細管で機能し、下流の NCC までつながっている事が明らかになった。

### 2. 5 KLHL3 R528H 変異の WNK 結合能力の低下

KLHL3 の R528H 変異による WNK 分解系破綻の分子メカニズムを明らかにするために、fluorescence correlation spectroscopy を用いて、WNK1、WNK4 と KLHL3 の結合について検討した結果、WNK1、WNK4 はともに野生型 KLHL3 蛋白とは結合するが、変異型 KLHL3 R528H 蛋白とは結合できないことが示された (Figure 6)。

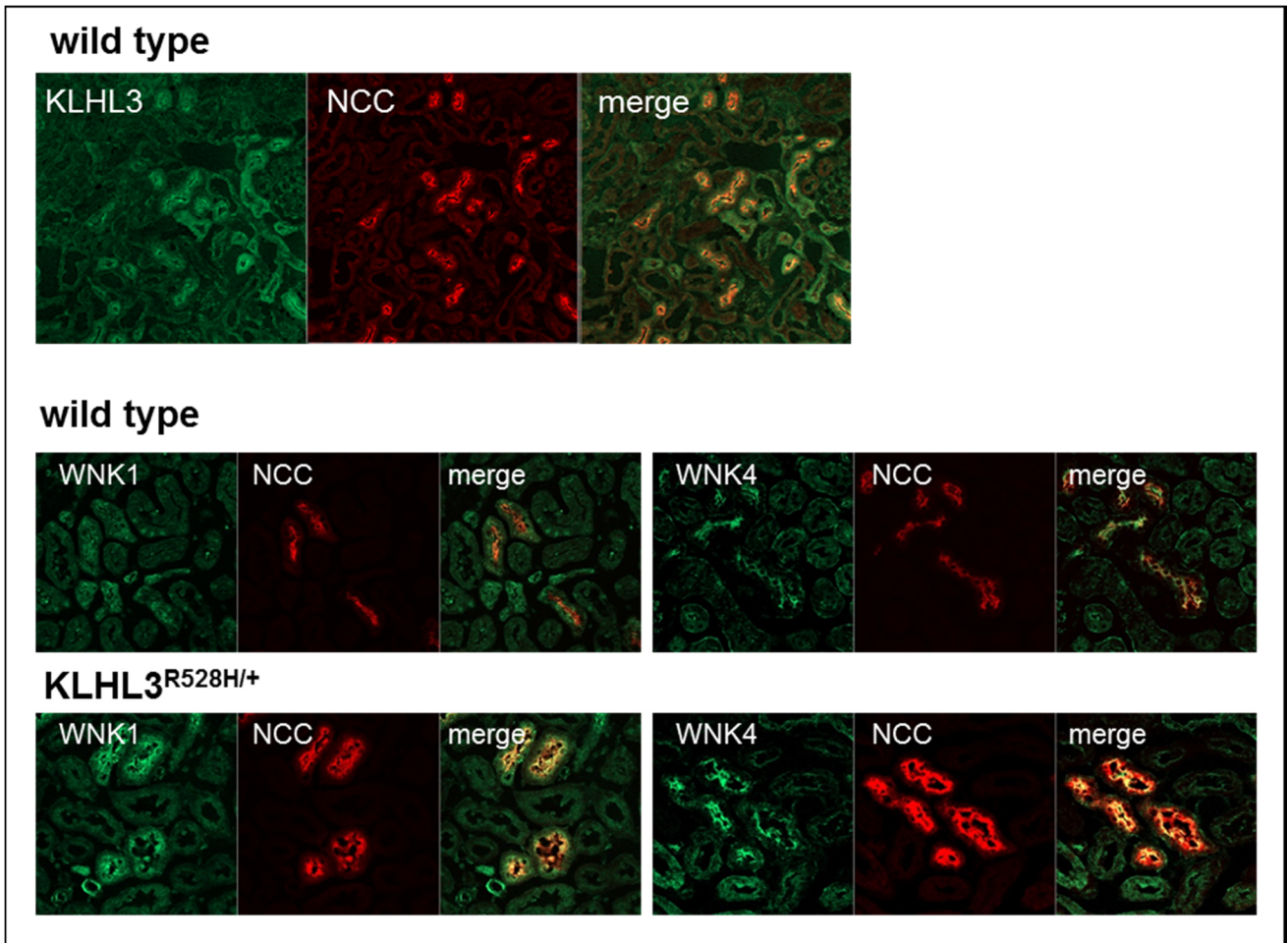


Figure 5. KLHL3<sup>R528H/+</sup>マウス遠位尿管では WNK1、WNK4 ともシグナルが亢進

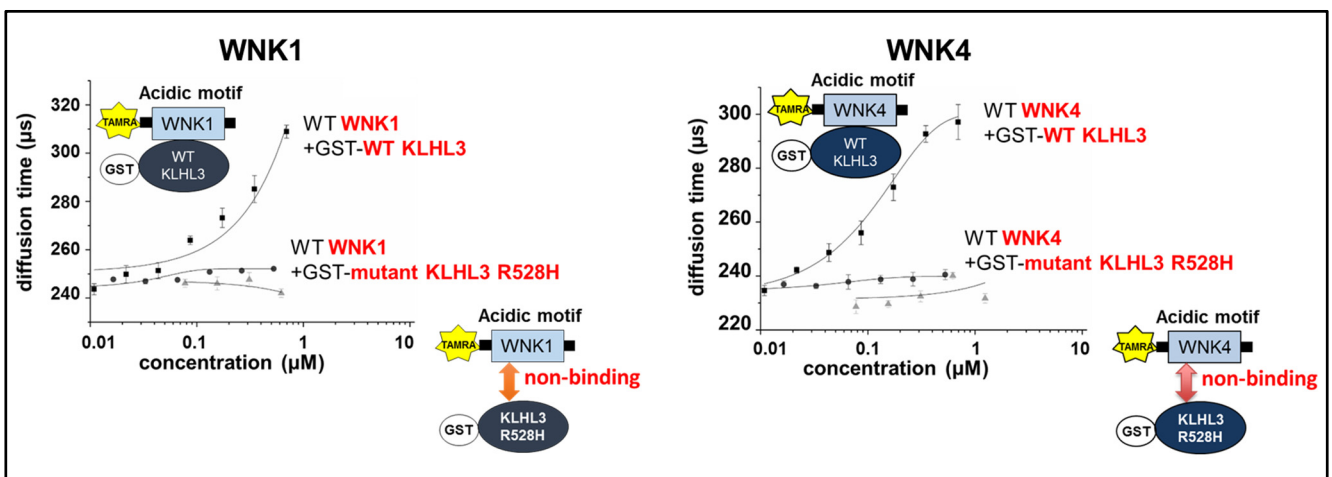


Figure 6. WNK1、WNK4 と wild-type KLHL3 は結合するが、KLHL3 R528H は結合しない

### 3. 考察および今後の課題

以上の知見から、KLHL3 変異による PHAII は、変異 KLHL3 が WNK1、WNK4 と結合できなくなることにより、

これらのユビキチン化が減弱し、WNK1 及び WNK4 の蛋白量が増加することによって、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナルが亢進するため発症すると考えられた。

本研究により、KLHL3 の生体における真の基質が WNK1 及び WNK4 であることが示されたが、これは生体における KLHL3 の役割を明らかにした世界初の功績である。また、ヒト PHAII 家系においては、WNK1 や WNK4 の変異の家系より KLHL3 の変異の家系の方が重症である理由も、WNK1 と WNK4 の両方の増加で説明できる可能性が示唆された。すなわち、WNK1 または WNK4 単独の増加より、両方の増加の方が重症になるのではないかという説明である (Figure 7)。

また、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの上位調節因子としてこれまでにインスリン、アンジオテンシン II、アルドステロンなどが報告されているが、これらと WNK とを介する因子については詳しく分かっておらず、この部分に KLHL3 が関わっている可能性も浮上し、この系の

全容解明、ひいては新規治療ターゲット策定への重要な足掛かりになるとと思われる。最近我々は WNK シグナル阻害薬の発見もソルト・サイエンス研究財団の援助のもと報告しており<sup>13,14</sup>、さらなる創薬を目指しての展開が期待される。

KLHL3 の変異で WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードに変化が生じるということは、逆に言えば、PHAII 患者でない健常者においても、KLHL3-Cullin3 E3 リガーゼが生理的に WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを調節していることを意味する。すなわち、KLHL3 が腎臓におけるナトリウム調節について重要な生理的役割を果たしているということを生体で初めて証明したことになり、今後の高血圧の研究や新薬の開発に大きなインパクトをもたらすものと考えられる。

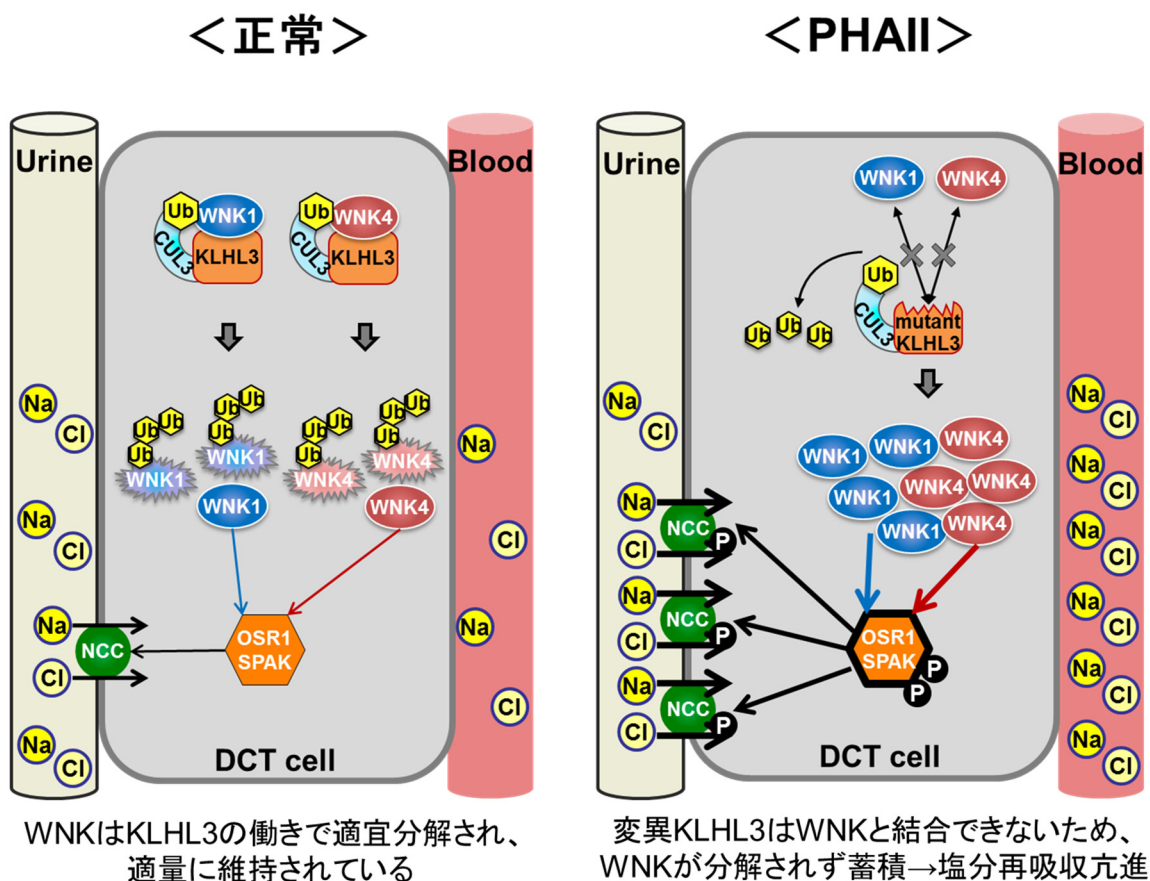


Figure 7. KLHL3 変異による PHAII 発症のメカニズム

#### 4. 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: 981-90, 2012.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, *et al.* (2010) Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin Exp Nephrol*.
- 8) Zeniya M, Sohara E, Kita S, *et al.* (2013) Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension*. 2013; 62: 872-8.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Susa K, Sohara E, Rai T, *et al.* (2014) Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet*. 2014; 23: 5052-60.
- 13) Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, *et al.* (2015) Discovery of Novel SPAK Inhibitors That Block WNK Kinase Signaling to Cation Chloride Transporters. *J Am Soc Nephrol*. In press.
- 14) Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, *et al.* (2013) Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J*. 2013; 455: 339-45.

## Investigation of the Roles of KLHL3/Cullin3 in the Regulation of WNK Signal

Shinichi Uchida, Eisei Sohara

Tokyo Medical and Dental University, Department of Nephrology

### Summary

Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII) is a hereditary disease characterized by salt-sensitive hypertension due to increased sodium reabsorption in the kidney, which is the result of activation of the WNK kinase-OSR1/SPAK kinase-NaCl cotransporter (NCC) phosphorylation cascade. Activation of this WNK phosphorylation signaling cascade in the kidney leads to increased sodium reabsorption through NCC. Mutations in the with-no-lysine kinase 1 (WNK1) and WNK4 genes are known to be responsible for PHAII. Recently, two novel genes, KLHL3 and Cullin3, were identified as also being involved in PHAII pathology. KLHL3 is a member of the BTB-BAK-Kelch family, which is a substrate adapter protein of Cullin3-based E3 ubiquitin ligase complexes. We have previously reported that WNK4 is the substrate of KLHL3-Cullin3 E3 ligase-mediated ubiquitination. However, WNK1 and NCC were also reported to be targets of KLHL3-Cullin3 E3 ligase by other groups. Therefore, the targets of KLHL3 remain unclear, as well as their involvement in the pathogenesis of PHAII. Moreover, all of these studies were performed on cultured cells. Thus, it was necessary to clarify the pathophysiological role of KLHL3 in PHAII in an *in vivo* system.

In this study, we generated and analyzed KLHL3<sup>R528H/+</sup> knock-in mice, carrying the same mutation as PHAII patients, to determine the pathophysiological role of KLHL3 in PHAII *in vivo*. These mice exhibited salt-sensitive hypertension and hyperkalemia, indicating that the KLHL3<sup>R528H/+</sup> mouse is an ideal model of PHAII. Interestingly, we found increased protein expression levels of both WNK1 and WNK4 kinases in KLHL3<sup>R528H/+</sup> mouse kidney *in vivo*, resulting in the activation of WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation signaling. In addition, we confirmed that mutant KLHL3 R528H is not able to bind with the acidic motif of WNK1 and WNK4. Here, we clarified that KLHL3 mutation results in the accumulation of both WNK1 and WNK4 due to the loss of the ability of the Cullin3-KLHL3 E3 ligase complex to bind to WNK kinases *in vivo*. Thus, we demonstrated pathogenesis of KLHL3 causing PHAII *in vivo*, for the first time.

Importantly, these results also indicate that this novel KLHL3 mediated regulation of WNK signaling is an important physiological mechanism for sodium handling in the kidney. In this respect, we believe that our findings could prove extremely valuable in furthering understanding of the physiological mechanisms underlying sodium homeostasis in the kidney.