

タンパク分解系による WNK シグナル制御の病態生理学的役割の解明

内田 信一

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 が報告され、WNK は最終的に NaCl 共輸送体 (NCC) をリン酸化によって活性化させ、塩を原尿から再吸収するという WNK シグナルを形成することを我々は明らかにしてきた。遺伝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 KLHL3 と Cullin3 がユビキチンリガーゼとして WNK キナーゼの分解を担うことが明らかとなったが、今回、我々は KLHL3 ノックアウトマウスの作成に成功し、KLHL3 の組織分布と機能を検討した。我々は KLHL3 の exon3 に LacZ を組み込み、内因性の KLHL3 プロモーター下に β -gal を発現するノックアウトマウスを作成した。Western blotting では腎臓、脳、眼、精巣、心臓、肺、膵臓、胃に β -gal 発現を確認し、特に脳と腎臓に発現が強く確認され、LacZ 染色では、脳の海馬、腎臓の遠位尿細管に強く染色が認められた。しかし、腎臓を除く臓器において、WNK キナーゼの発現増加は認めず、他の代償機構や我々の検討していない臓器へのさらなる検討が必要と考えられた。また、腎臓において、KLHL3 ノックアウトマウスは WNK1 と WNK4 の分解不良による発現増加を認め、その下流の SPAK と NCC のリン酸化が増加することで PHAII 様の症状を呈していた。しかしながら、KLHL3^{+/+}-ヘテロノックアウトマウスでは、KLHL3^{R528H/+}ノックインマウスとは異なり WNK シグナルの亢進を認めず、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。そのメカニズム解明のために共免疫沈降法を行い、KLHL3 は二量体を形成することを発見し、KLHL3R528H が野生型 KLHL3 と二量体を形成し、この二量体のどちらかに変異 KLHL3 が組み込まれることにより、KLHL3 による WNK 分解システムが破綻し、ドミナントネガティブ効果を示すことで PHAII を発症することを *in vitro* で明らかにした。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。

1. 研究目的

本邦における高血圧に起因する死亡者数は年間約 10 万人と推定され、高血圧は心血管病の最大の危険因子であり、心血管病死亡の約 50%が至適血圧を超える血圧高値に起因するものと考えられている。塩分摂取は直接的な血圧増悪因子の一つであり、日本人において塩分摂取過多は高血圧治療における大きな課題である。塩分感受性亢進の概念として、生体が従来保持している塩分出納調節機能や塩分過剰負荷に対する血管などの生理的適応機構の破綻によって起きると考えられており、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, 1422)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。塩分感受性調節機構として近年、腎臓尿細管での塩分再吸収を担う輸送体を制御する WNK シグナルに注目が集まっている。これは、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性腎疾患である偽性低アルドステロン症II型 (Pseudohypoaldosteronism typeII (PHAII))の原因遺伝子として WNK4(With no lysine kinase 4)と WNK1(With no lysine kinase 1)というセリン・スレオニンキナーゼが同定されたことに端を発する¹⁾。PHAIIは塩分感受性高血圧の他

に、高カリウム血症、代謝性アシドーシスなどを呈する、常染色体優性遺伝形式の遺伝性腎疾患であり、Na-Cl 共輸送体(NCC)の阻害薬であるサイアザイド利尿薬によりすべての症状が改善される事実から、NCCの機能亢進がその病態に関わっていると想定された 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。

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²⁾。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^{3,4)}、塩分摂取⁵⁾、アルドステロン⁵⁾、アンジオテンシン II⁶⁾、さらにはカリウム摂取⁷⁾により制御される事を報告し、PHAII という限られた病態だけでなく、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。

2012年に PHAII の新しい原因遺伝子として、KLHL3 (kelch-like family member 3)と CUL3(cullin 3)が報告された^{8,9)}。我々をはじめとした複数のグループが、KLHL3 は WNK キナーゼと結合して CUL3/KLHL3 による E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、KLHL3 蛋白内のプロペラ構造を形成する kelch repeats が WNK キナーゼの acidic motif を捉えることによって、WNK をユビキチン化し、蛋白分解系に導く働きをしていることを明らかにした¹⁰⁾。我々は PHAII 患者の変異を組み込んだ KLHL3R528H/+ ノックインマウスを作成し、WNK1と WNK4 がともに蛋白分解されずに異常に発現増加することによって WNK シグナルを亢進させていることを明らかにした。また、同時に WNK4 の PHAII 変異のホットスポットである acidic motif に変異があると、KLHL3 が WNK4 を捕捉できなくなることで WNK4 発現が増加して NCC 活性の過剰亢進につなが

って PHAII を発症することも明らかになった。

しかしながら、我々の KLHL3 ノックインマウス作成により¹¹⁾、PHAII における KLHL3 の病態生理は明らかになりつつあるものの、KLHL3 が生体内でどのように機能しているか、また、優性遺伝形式を呈する KLHL3 の dominant negative effect のメカニズムは不明のままであった。今回、我々は生体における KLHL3 の機能を明らかにすることを目的とし、KLHL3 ノックアウトマウスを作成し、解析した。

2. 研究方法および結果

目的に記したように、KLHL3 ノックアウトマウス(KLHL3^{-/-})を作製し、解析を行った。なお、これらの研究結果は Molecular and Cellular Biology 誌 2017年3月号に報告し、世間への周知をはかった。

2.1 KLHL3 ノックアウトマウスの作製

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。(Figure 1)

2.2 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、βgal 抗体を用いて Western blotting を行った (Figure 2)。βgal の発現を認めた臓器に関しては、LacZ 染色を試みた。

βgal 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強く染色が認められた (Figure 3)。

2.3 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。脳に関しては、発現の多かった海馬も評価したが、WNK キナーゼの発現増加は認めなかった (Figure 4)。

2.4 KLHL3 ノックアウトマウス(KLHL3^{-/-})は PHAII の症状を呈した

このノックアウトマウスは KLHL3R528H/+ 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

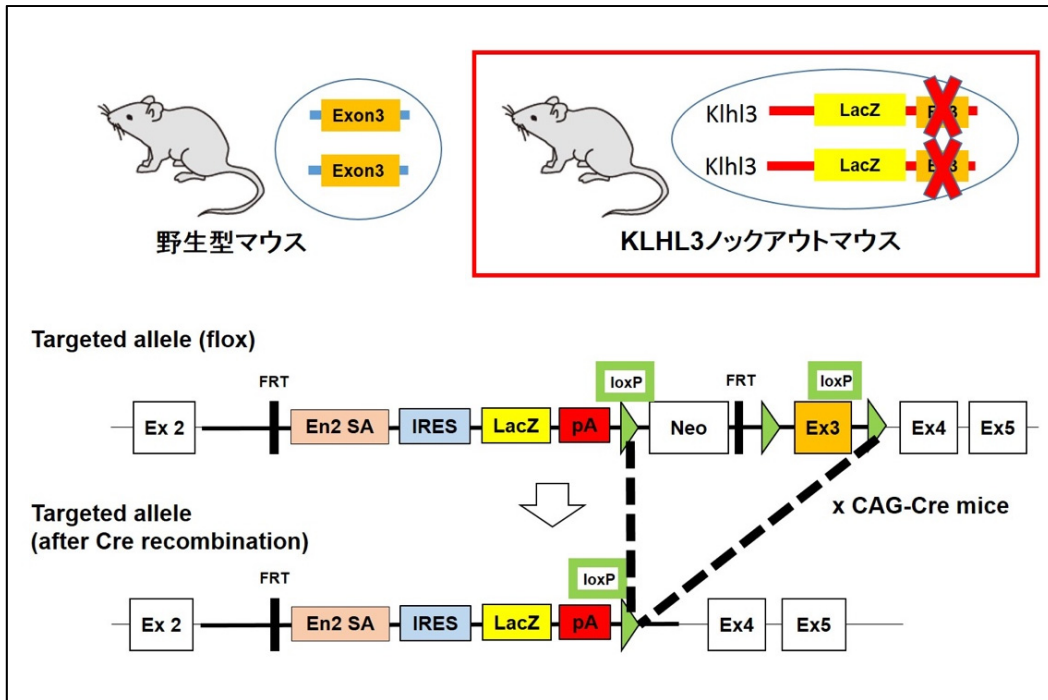


Figure 1: KLHL3 ノックアウトマウスの作成

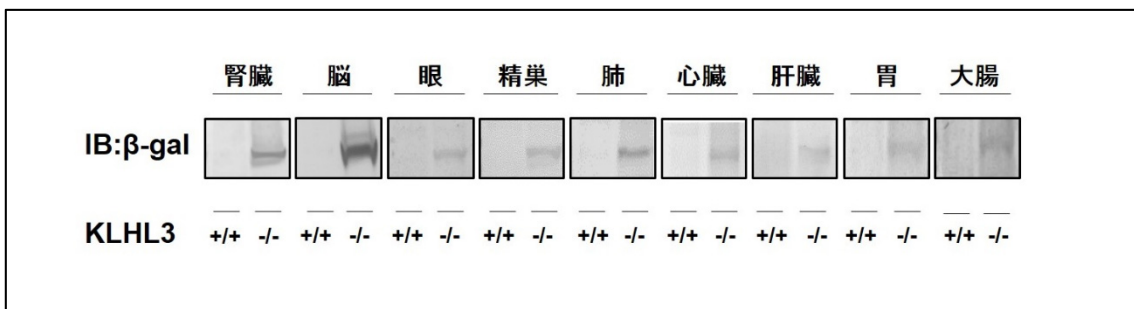


Figure2: KLHL3 プロモーター下にある βgal 発現の確認



Figure3: KLHL3^{-/-}マウスの LacZ 染色

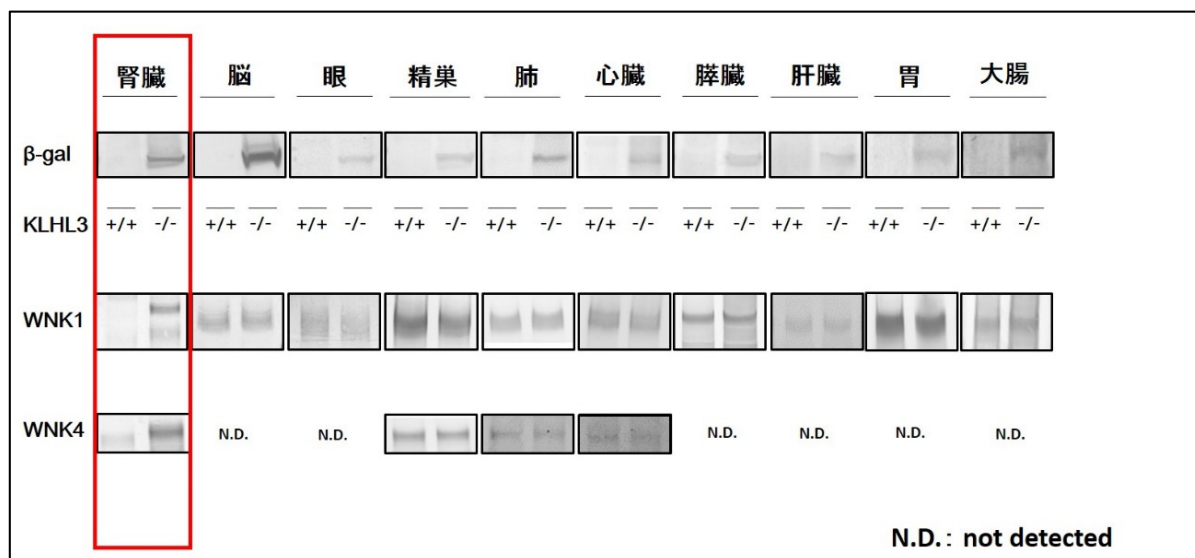


Figure 4: KLHL3^{-/-}の各臓器における WNK キナーゼ発現の変化

質異常の検討を行った。予想通り、KLHL3^{-/-}ノックアウトマウスでは塩分感受性高血圧 (Figure 5), 高 K 血症, 代謝性アシドーシス (Table 1) 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^{+/-}ヘテロノックアウトマウスでは, KLHL3^{R528H/+}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。

2. 5 WNK1 と WNK4 のタンパク発現が KLHL3^{-/-}ノックアウトマウスでは亢進し, 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, 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^{+/-}では WNK カスケードの亢進を認めなかった (Figure 6)。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。

2. 6 二量体形成が KLHL3R528H のドミナントネガティブ効果を説明する

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, この二量体のどちらかに変異 KLHL3 が組み込まれることにより, KLHL3 による WNK 分

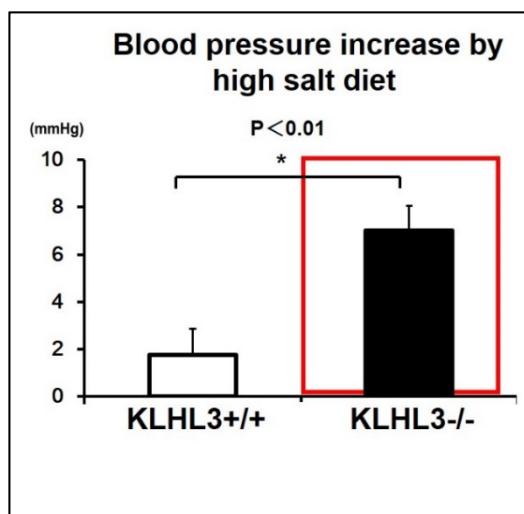
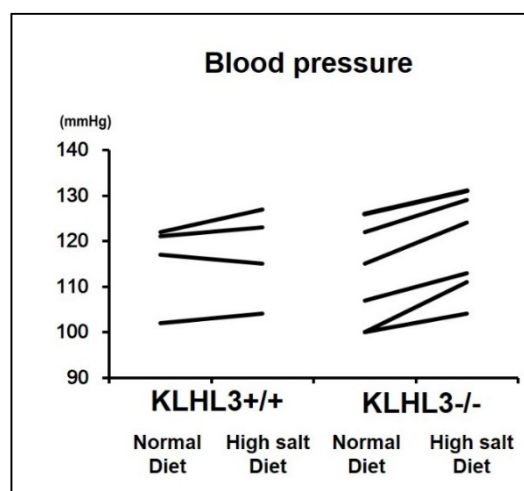


Figure 5: KLHL3^{-/-}マウスは塩分感受性亢進を呈する

Table 1: KLHL3 ノックアウトマウスの血液学的検査

	KLHL3 +/+ (n=13)	KLHL3 +/- (n=32)	KLHL3 -/- (n=14)
Blood biochemistry			
Na ⁺ (mmol/l)	149.5 ± 0.6	148.8 ± 0.4	150.4 ± 1.9
K ⁺ (mmol/l)	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	5.2 ± 0.2*
Cl ⁻ (mmol/l)	112.0 ± 0.8	111.4 ± 0.6	116.1 ± 1.8*
Glu (mg/dl)	228.0 ± 18.8	239.9 ± 9.5	222.5 ± 11.6
pH	7.297 ± 0.011	7.286 ± 0.009	7.235 ± 0.015*
pCO ₂ (mmHg)	43.7 ± 1.1	43.7 ± 1.4	45.1 ± 2.4
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	21.6 ± 0.6	20.6 ± 0.4	19.0 ± 0.8*
Hb (g/dl)	14.9 ± 0.3	15.0 ± 0.1	14.5 ± 0.2

*P < 0.05 compared with KLHL3 +/+ mice.

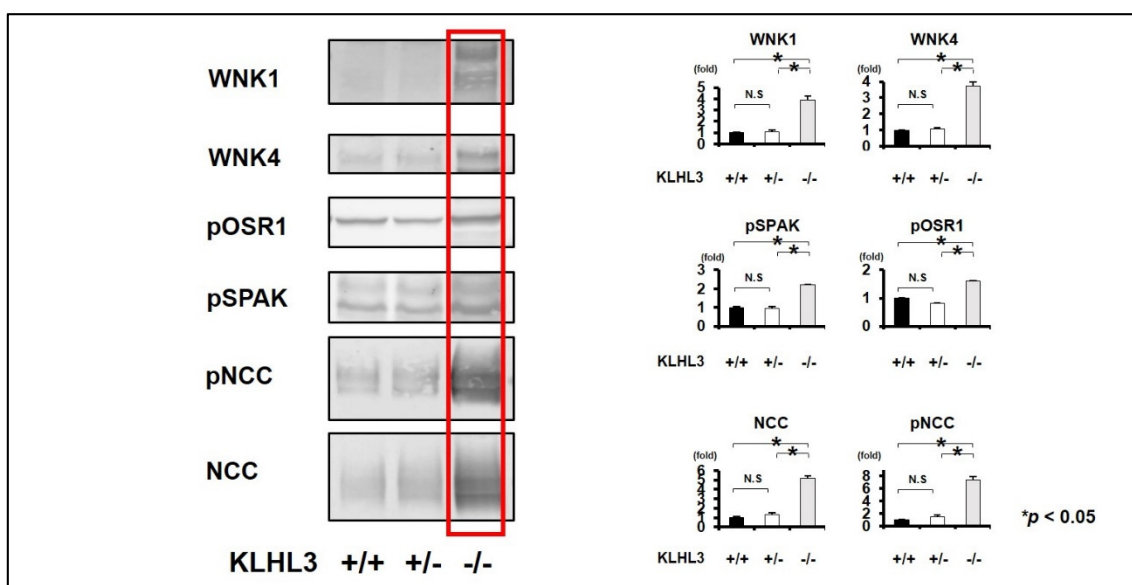


Figure 6: KLHL3^{-/-}マウスにおける WNK シグナル亢進

解系が破綻し、ドミナントネガティブ効果を示すことで PHAII を発症することを *in vitro* で明らかにした (Figure 7)。

3. 考察と今後の課題

以上の知見から、KLHL3 欠損による PHAII 様症状が出現することは、本来 WNK1 ならびに WNK4 と結合するはずの KLHL3 が欠損することで、これらのユビキチン化が減弱することで、WNK の蛋白量が増加し、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。

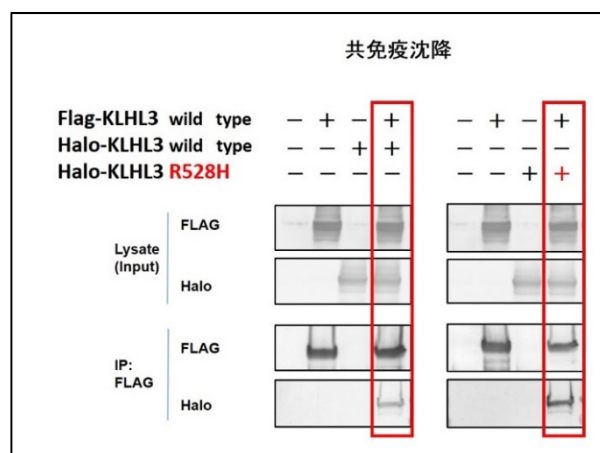


Figure 7: KLHL3 は二量体を形成する

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。また, KLHL3 は多臓器にわたり存在していることがわかったため, 本マウスを通じて, 今後は腎外臓器での KLHL3 の働きを探る必要があるが, 今回, WNK キナーゼは KLHL3 が発現している臓器での変化が乏しく, 他の代償機構や我々の検討していない臓器へのさらなる検討が必要である。

PHAI1を起こす変異型 KLHL3R528H には dominant negative 効果があり, 二量体形成がその一因として示唆され, 強いフェノタイプを示すには, KLHL3 は量が半分になるのでは十分でなく, KLHL3 の質的变化が重要であると考えられた (Figure 8)。

これらのメカニズムを介した新しい治療法の開発を進めていきたい。

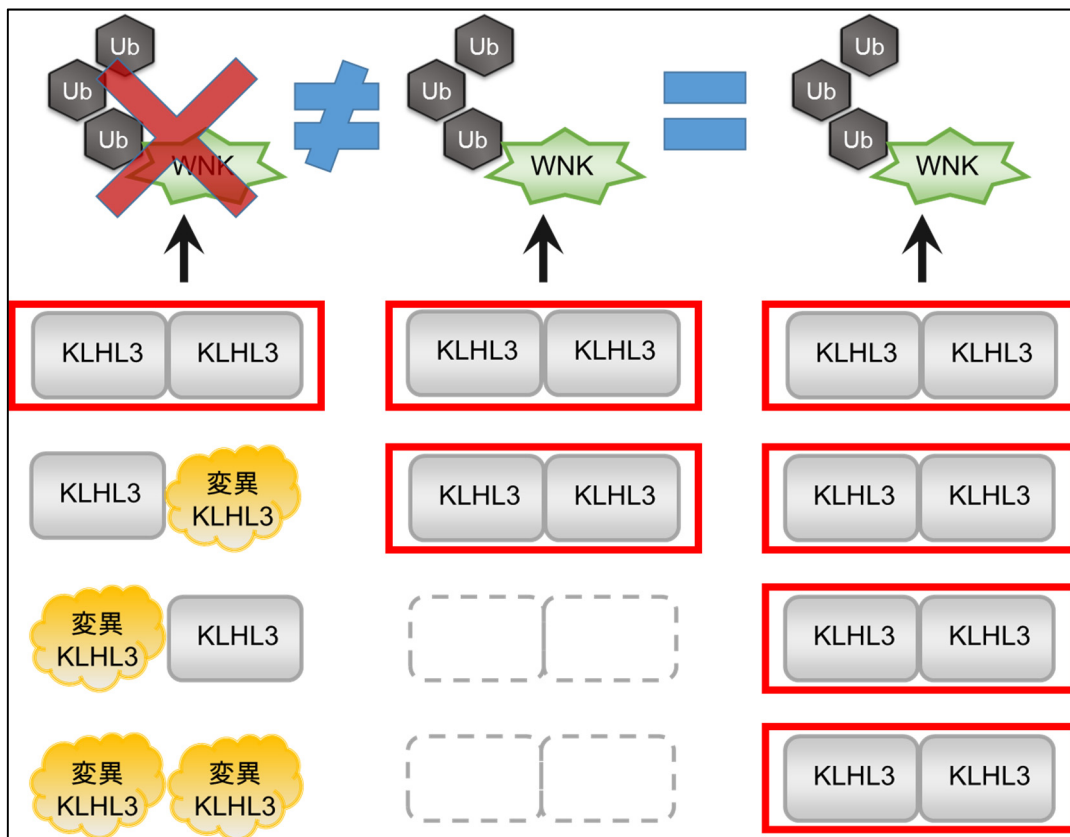


Figure 8: 変異 KLHL3 R528H のドミナントネガティブ効果

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) 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.
- 11) 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.

Investigation of Regulation of WNK Signal by Protein Degradation System

Shinichi Uchida

Tokyo Medical and Dental University, Department of Nephrology

Summary

Mutations in with-no-lysine kinase 1 (WNK1), WNK4, Kelch-like 3 (KLHL3) and Cullin 3 (CUL3) genes are reported to cause PHAII. Recently, we generated KLHL3^{R528H/+} mice and demonstrated that mutant KLHL3 resulted in defective degradations of WNK1 and WNK4, leading to PHAII, indicating that KLHL3/CUL3 ubiquitin ligase complex interacts and degrades WNK kinases. However, pathophysiological roles of KLHL3 other than PHAII is still unclear.

To answer these questions, we generated two KLHL3^{-/-} mice lines; conventional KLHL3^{-/-} mice and KLHL3^{-/-} mice that express β -gal under endogenous KLHL3 promoter in this study. Using these mice, we sought to determine the tissue distribution of KLHL3 and its role in regulating WNK protein level in each tissue.

At first, we investigated the tissue distribution of KLHL3 using β -gal expression. Immunoblots of β -gal showed the strong expression in brain and kidney, and the lower expressions in eye, testis, heart, lung and pancreas. Strong LacZ staining was observed in hippocampus and distal tubules in brain and kidney, respectively. Next, we investigated the protein levels of WNK1, WNK3 and WNK4 in the whole tissues of KLHL3^{+/-} and KLHL3^{-/-} mice where KLHL3 expression was detected. In the brain and other tissues showing the lower expression levels of KLHL3, expression levels of WNK1, WNK3 and WNK4 were not increased in KLHL3^{+/-} and KLHL3^{-/-} mice. However, only in kidney, WNK1 and WNK4 was significantly increased in KLHL3^{-/-} mice, but not in KLHL3^{+/-} mice. KLHL3^{-/-} mice also showed PHAII-like phenotypes, but KLHL3^{+/-} mice did not.

Our data clearly showed that the WNK protein levels in KLHL3-expressing tissues might not be governed only by KLHL3. Involvement of other KLHL protein could be possible, or the assessment of WNK protein levels at cell level, not in tissue level, might be necessary to determine the role of KLHL3 in specific types of cells in each tissue. Lack of PHAII phenotypes in KLHL3^{+/-} mice clearly showed the heterozygous deletion of KLHL3 was not enough to cause PHAII in the kidney, indicating that PHAII phenotypes in KLHL3^{R528H/+} heterozygous mice we previously observed are caused by the dominant-negative effect of R528H KLHL3 mutant. Dimer formation of wild-type and R528H KLHL3, which we could demonstrate, would explain the dominant-negative effect of this mutant. These findings could help us to further understand the physiological roles of KLHL3 and the pathophysiology of PHAII caused by mutant KLHL3.