

第 37 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞記念講演 3

Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II–With no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus

銭谷 慕子

Moko ZENIYA

Na-K-Cl cotransporter isoform1 (NKCC1)は、血管平滑筋細胞の収縮において重要な役割を担っていることが知られている。血管平滑筋細胞の収縮にはカルシウム感受性クロライドチャンネルからのクロライド流出が関与しているが、NKCC1により細胞内クロライド濃度が増加している状況では、このチャンネルからのクロライド流出が増加し、脱分極が起りやすくなる。その結果、電位依存性カルシウムチャンネルからカルシウムが流入し、血管収縮が起こる。つまり、NKCC1が活性化していると血管収縮をきたす。

偽性低アルドステロン症II型の原因遺伝子として同定された With No-Lysine Kinase (WNK)は、OSR1/SPAKをリン酸化し、さらにそれがNa-Cl cotransporter (NCC)やNKCC1などをリン酸化し活性化する。血管トーンへのWNKファミリーの関与については、まずWNK1が血管トーンの維持に関与することが報告された¹⁾。また以前の研究で、低塩食によりWNK3-SPAK-NKCC1カスケードが亢進し血管収縮を起こすことを発見しており、低塩とWNK3シグナルをつなぐものがアンジオテンシンIIであることも解明した²⁾。

アンジオテンシンIIを通常のマウスとWNK3ノックアウトマウスに投与すると、wild-typeマウスでは低塩食下と同じようにSPAK-NKCC1の亢進が起こるが、WNK3ノックアウトマウスでは亢進しない。アルドステロン投与や、AT1Rブロッカーの投与実験も行った結果、アンジオテンシンIIはAT1Rを介して直接WNK3カスケードを制御していることが明らかになった。*in vivo*の実験においても、アンジオテンシンII投与によりwild-typeマウスの血圧は上昇

するが、WNK3ノックアウトマウスの血圧は上昇しない。また、腸間膜動脈を用いたトーンスの測定においても、WNK3のノックアウトマウスはwild-typeに比べアンジオテンシンIIによる血管収縮は軽度であり、またNKCC1ブロッカーであるブメタニドによる動脈の弛緩の程度も軽度であった。

以上より、低塩食およびアンジオテンシンII刺激により、WNK3-SPAK-NKCC1シグナルが亢進し、クロライドの流入が起こって血管収縮をきたす機序が明らかになった。しかし、アンジオテンシンIIがどのようにWNK3を制御しているのかは依然未解明であった。

近年、PHAIの原因として新たにKelch-like protein 3 (KLHL3)とCullin3 (CUL3)が同定された³⁾。KLHL3はCUL3と複合体を形成しE3リガーゼとして働くことで、WNK4のユビキチン化を増加させ、WNK4の発現量を減少させる⁴⁾。腎臓遠位尿細管では、WNK4-SPAK-NCCカスケードが塩分再吸収を制御しているが、このWNK4はKLHL3-CUL3複合体によりユビキチン化され分解される。また、WNK1~3もKLHL3-CUL3E3リガーゼによって分解されることが報告されている。さらにKLHL2はKLHL3と相同性が高く、特にWNKとの結合部位はほぼ同じだが、このKLHL2もWNKカスケードを分解することが明らかになっている⁵⁾。

以上を踏まえ、マウスの血管におけるアンジオテンシンII刺激によるWNK3の制御機構を、KLHL蛋白の関与を考慮して解明することを目的とし研究を行った。実験にはC57BL/6Jマウスの大動脈と、マウス血管平滑筋細胞株(MOVAS)を使用した。

マウス大動脈と血管平滑筋細胞のKLHLの発現をRT-

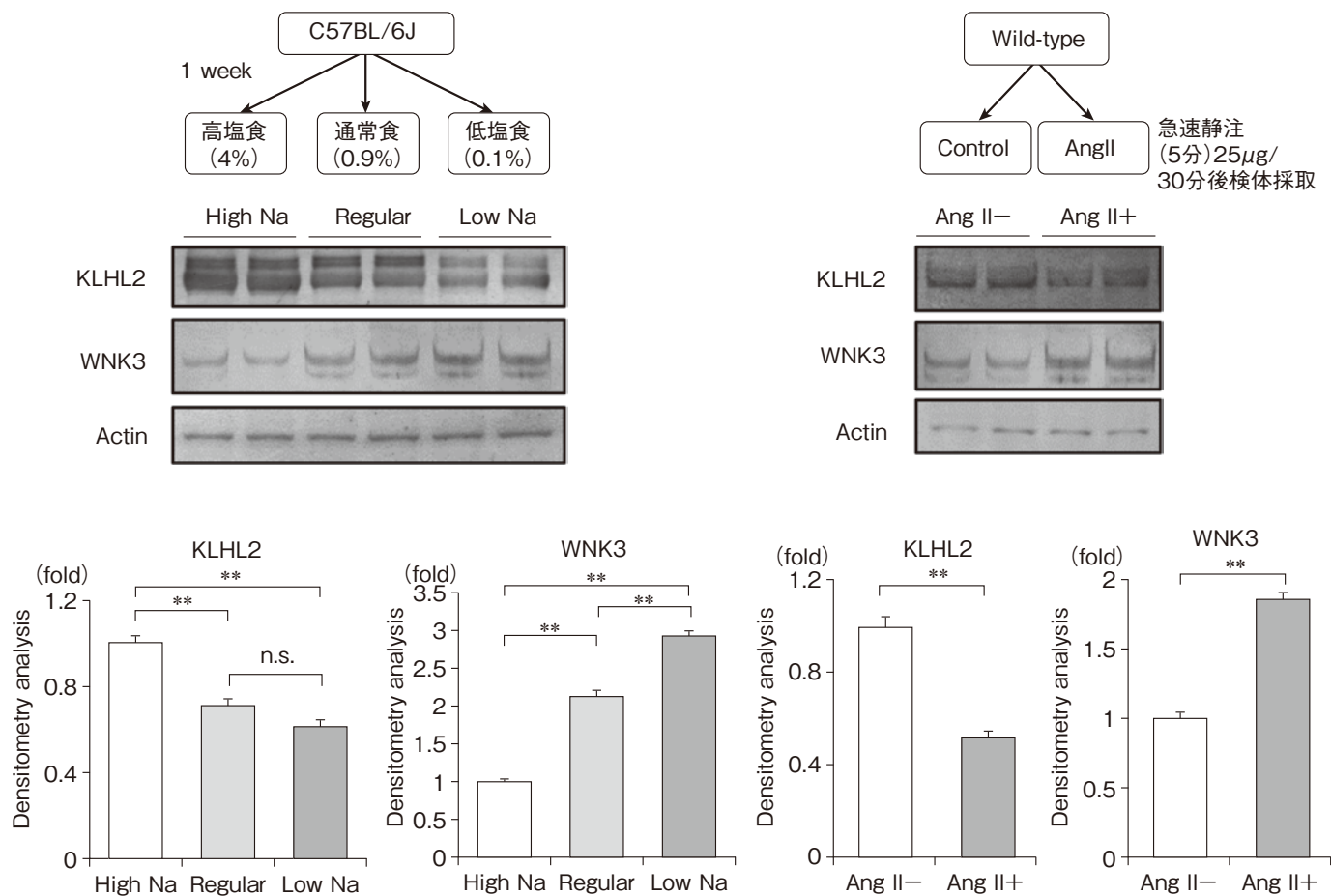


図1 マウス大動脈の塩分およびアンジオテンシン II (AngII) 投与による KLHL2-WNK3 の変化 (文献 6 より引用)

PCR と Western blotting で確認したところ、どちらにおいても KLHL3 の発現はなく、KLHL2 のみ発現が確認できた。また、マウスに塩分調整食およびアンジオテンシン II を投与したときの KLHL2 と WNK3 の変化をみると、低塩刺激およびアンジオテンシン II 投与により KLHL2 が減少し WNK3 が増加した(図 1)。血管平滑筋細胞にアンジオテンシン II を投与しても大動脈と同様の現象がみられ、しかも投与後 1 分、10 分という非常に短い時間経過での変化を認めた。

これら WNK3 の蛋白量増加時の WNK3 mRNA 量を定量すると、mRNA の増加はなく、WNK3 の蛋白量の増加は分解の抑制によることが示唆された。そこで KLHL2 が WNK3 を制御しているかどうかについて調べるために、KLHL2 のノックダウン実験と強制発現実験を行った。KLHL2 をノックダウンすると WNK3 が増加し、さらに下流のシグナルの亢進を認めた。逆に KLHL2 の強制発現で

は、WNK3 の減少と下流シグナルの減弱を認めた。以上より、KLHL2 が WNK3 の蛋白量を制御しているということが示された。

次に、アンジオテンシン II によりどのような機序で KLHL2 が減少するのかを調べた。蛋白の発現量減少には、合成の減少もしくは分解の促進という機序が考えられる。また、分解には大きくプロテアソーム系とオートファジー系が知られている。これらについて、それぞれ mRNA の定量や、各阻害薬を使用した実験を行った。アンジオテンシン II 投与により KLHL2 が減少しているときの RT-PCR を施行すると、KLHL2 の mRNA 量は減少しておらず、KLHL2 についても分解の亢進によって蛋白量が減少していることが示唆された。分解系の各阻害薬を用いた実験では、オートファジー阻害薬であるクロロキンの投与によりアンジオテンシン II 投与下の KLHL2 の減少は阻害されたが、プロテアソーム阻害薬の投与では KLHL2 の減少は阻害されな

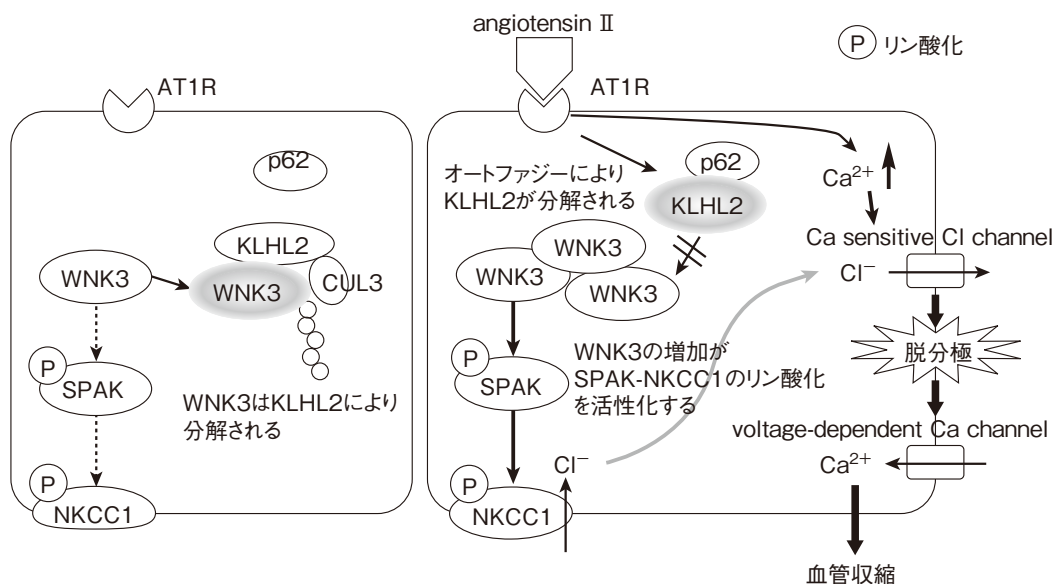


図2 アンジオテンシン II による血管収縮における、血管平滑筋の KLHL2- WNK3- SPAK-NKCC1 カスケード (文献 7 より引用)

かった。このことから、アンジオテンシン II 投与時の KLHL2 の減少はオートファジーを介した分解によるものと考えられた。

KLHL の分解に関しては、ほかの KLHL ファミリー蛋白である Keap1 を p62/SQSTM1 が選択的オートファジーにより分解するという報告がある。したがって、KLHL2 も p62 により分解される可能性を考え、その関与を確認するため p62 のノックダウン実験を行った。すると、p62 のノックダウン下ではアンジオテンシン II による KLHL2 の分解が阻害されたことから、アンジオテンシン II 投与による KLHL2 の減少は p62 による選択的オートファジーが関与していることが示された。

今回の研究は、1)アンジオテンシン II による血管収縮に KLHL2-WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルが関与している、2) KLHL 蛋白が腎外臓器で生理的に WNK シグナルを制御している、3)アンジオテンシン II によって選択的オートファジーが誘導される、という点において新規の発見である。

また、血管平滑筋細胞内の機序をまとめると、WNK3 は KLHL2 による分解を受けているが、アンジオテンシン II のシグナルが入ると p62 を介した選択的オートファジーにより KLHL2 が分解され、その蛋白量が減少することによって WNK3 が増加し、SPAK-NKCC1 シグナルを活性化し、血管収縮につながると考えられる(図 2)。

本研究により、アンジオテンシン II による血管収縮には、オートファジーによる KLHL2- WNK3-NKCC1 シグナ

ル伝達系の制御が重要な役割を果たしているということが明らかになった。

謝 辞

最後にこの研究を支えてくださった内田信一先生、蘇原映誠先生、頼 建光先生、佐々木 成先生、森 崇寧先生はじめ、すべてのラボと関係者の方々に心より感謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/ NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. Clin Exp Nephrol 2012 ; 16 : 530-538.
2. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. Hypertension 2013 ; 62 : 872-878. doi : 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01543. Epub 2013 Sep 9.
3. Boyden LM, Choi M, Choate KA, Nelson-Williams CJ, Farhi A, Toka HR, Tikhonova IR, Bjornson R, Mane SM, Colussi G, Lebel M, Gordon RD, Semmekrot BA, Poujol A, Välimäki MJ, De Ferrari ME, Sanjad SA, Gutkin M, Karet FE, Tucci JR, Stockigt JR, Keppler-Noreuil KM, Porter CC, Anand SK, Whiteford ML, Davis ID, Dewar SB, Bettinelli A, Fadrowski JJ, Bel-

- sha CW, Hunley TE, Nelson RD, Trachtman H, Cole TR, Pinski M, Bockenhauer D, Shenoy M, Vaidyanathan P, Foreman JW, Rasoulpour M, Thameem F, Al-Shahrouri HZ, Radhakrishnan J, Gharavi AG, Goilav B, Lifton RP. Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* 2012 ; 482 : 98–102. doi : 10.1038/nature10814.
4. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep* 2013 ; 3 : 858–868. doi : 10.1016/j.celrep.2013.02.024. Epub 2013 Feb 28.
 5. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 ; 437 : 457–462. doi : 10.1016/j.bbrc.2013.06.104. Epub 2013 Jul 6.
 6. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Discovery of novel spak inhibitors that block wnk kinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 1525–1536. doi : 10.1681/ASN.2014060560. Epub 2014 Nov 5.
 7. 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 : 2129–2138. doi : 10.1681/ASN.2014070639.