

## 尿細管生理

### Renal tubular physiology

頼 建光\*<sup>1</sup> 内田 信一\*<sup>2</sup>

Tatemitsu RAI and Shinichi UCHIDA

#### はじめに

腎臓は、細胞外液の量と電解質組成を調節し、生存環境の恒常性を維持できる唯一の臓器である。腎臓における水・電解質制御の最終効果器は尿細管に発現する各種輸送体である。各尿細管セグメントに発現するチャネル・トランスポーターがほとんどクローニングされ同定されている現在、それらの輸送体の機能がどのように制御されているのか、その関連分子の同定を含めた調節メカニズムを明らかにすることが主な研究対象となっている。さらに、その調節の破綻がいかに疾患の発症と関連しているかを明らかにしたうえで、新たな治療法への模索が盛んに行われている。本稿では、尿細管機能の調節と病態とのかかわりに関する新知見について概説したい。

#### 近位尿細管：SGLT2 グルコース輸送体

SGLT2(Na/glucose transporter 2)は近位尿細管でのグルコース再吸収を担う主要な輸送体である。このSGLT2を阻害する薬剤が、インスリン非依存性に血糖値を下げる新規作用機序の糖尿病治療薬として2014年から本邦で使用されるようになった。尿中の糖排泄を増加させることによる血糖降下作用に加え、SGLT2阻害薬には同時に血圧を低下させる作用もあるといわれている。SGLT2阻害薬の降圧作用のメカニズムの詳細はまだ明らかでない点も多いが、尿糖による二次的な浸透圧利尿効果とナトリウム利尿の亢進の双方が関与していると考えられる。SGLT2輸送体を介して、塩分の出納と血糖コントロールとの間に関連があるか

どうか、いまだ不明であった。

最近、脂肪細胞中のPPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )が血中adiponectinを増加させることによりSGLT2の発現量を低下させ、ナトリウム利尿と糖代謝を制御していることが発表された<sup>1)</sup>。野生型のマウスにおいては、高塩分食負荷によって著明なナトリウム利尿が惹起され、腎臓周囲の脂肪細胞におけるPPAR $\gamma$ の発現量の増加がみられた。脂肪細胞特異的にPPAR $\gamma$ をノックアウトしたマウスでは、高塩分食負荷によるナトリウム利尿は減弱し、塩分感受性の血圧上昇が亢進していた。さらに脂肪細胞特異的PPAR $\gamma$ ノックアウトマウスでは、野生型に比べ高塩分食負荷による空腹時血糖の上昇がみられた。PPAR $\gamma$ によるナトリウム利尿と糖代謝の制御メカニズムを探るためSGLT2の発現を調べたところ、高塩分食負荷により、野生型マウスではSGLT2の発現量は低下したが、脂肪細胞特異的PPAR $\gamma$ ノックアウトマウスではその変化はみられなかった。SGLT2阻害薬を投与したところ、いずれのマウスにおいてもナトリウム利尿と尿糖の増加が惹起された。また、adiponectinノックアウトマウスを用いることにより、PPAR $\gamma$ からSGLT2を抑制するシグナルを仲介するmediatorとしてadiponectinを同定した。また、この一連の過程に対する高血糖の影響を調べるため、糖尿病モデル(db/db)マウスに高塩分食負荷を行ったところ、糖尿病モデルマウスではコントロールに比べてSGLT2の発現増加とナトリウム利尿効果の減弱がみられた。ヒトのII型糖尿病患者においても、血糖コントロールが不良な患者は、良好な患者に比べナトリウム利尿は減弱しており、それは血中のadiponectinレベルと相関していた。これらの結果から、PPAR $\gamma$ /adiponectin/SGLT2 pathwayがナトリウム/グルコースの恒常性の制御にかかわっていることが示され、糖尿病患者において、良好な血糖のコントロールにより塩分感受性高血

\*<sup>1</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科茨城県腎臓疾患地域医療学講座寄附講座 \*<sup>2</sup> 同 腎臓内科学

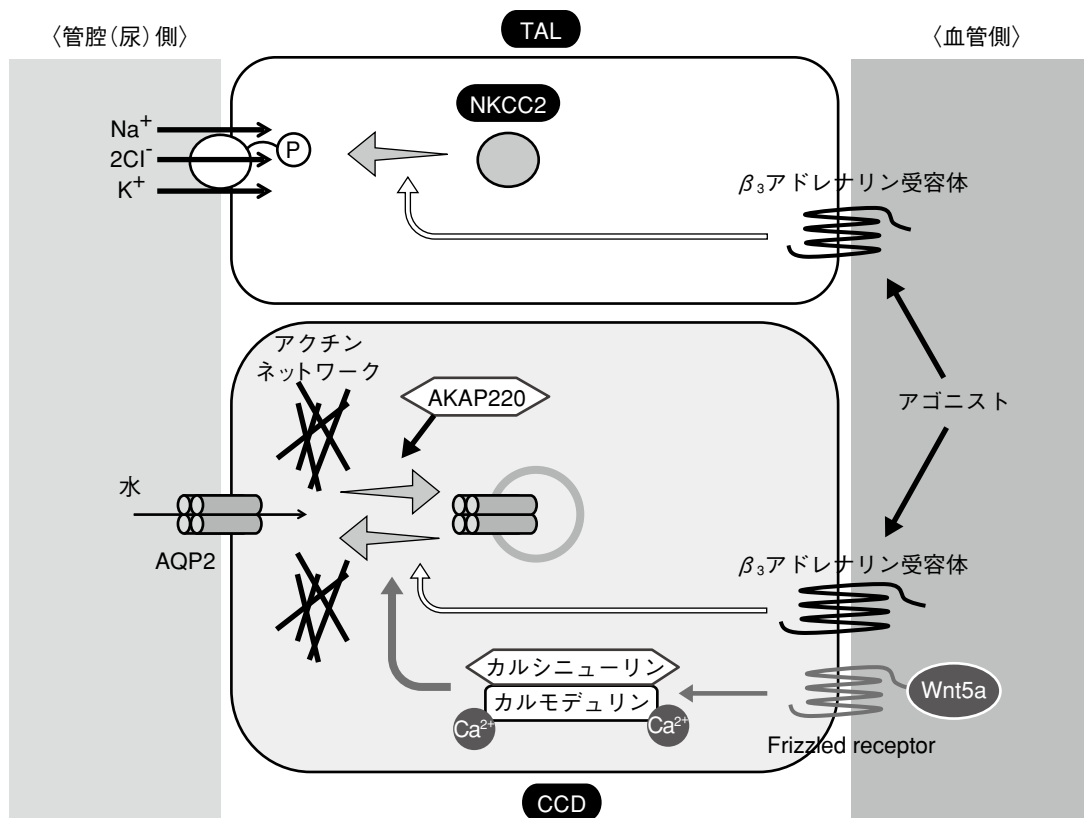


図1 バソプレシン非依存性 AQP2 制御機構

圧を軽減できる可能性が示唆された。最近、大規模臨床試験で、SGLT2 阻害薬エンパグリフロジンが、心血管イベントリスクの高いII型糖尿病患者において、心血管イベント発症率を低下させ、腎症の進展を抑制することが示されており<sup>2,3)</sup>、SGLT2 輸送体の体液と糖代謝の制御における役割については、さらに詳細なメカニズムの解明とトランスレーショナルスタディへの展開が期待される。

**水代謝：バソプレシン非依存性 AQP2 制御**

腎臓における水の再吸収において、バソプレシン(AVP) AQP2 水チャネルシグナル伝達系が主要な役割を果たしていることは言うまでもない。AVP は下垂体より分泌され、腎臓集合管細胞の血管側にあるバソプレシン V2 受容体 (AVPR2) と結合し、細胞内 cAMP-protein kinase A 系を活性化し、AQP2 をリン酸化する。リン酸化された AQP2 は apical 側の細胞膜へ移動し、水分の再吸収が促進される。最近、AVP に依存しない AQP2 の制御因子がいくつか明らかにされた(図1)。これらの因子は、AVPR2 の遺伝子異常によって発症する X 染色体性腎性尿崩症(XNDI)の治療にお

いて、AVP に依存しない新規治療薬のターゲットとなりうることを期待される。

**1. beta3 アドレナリン受容体**

腎臓においては、beta1 と beta2 アドレナリン受容体(AR)は交感神経系による腎機能の制御にかかわっているが、今回、イタリヤのグループにより beta3AR の抗利尿作用が明らかにされた<sup>4)</sup>。マウス生体腎の切片を利用した *ex vivo* の実験で、beta3AR を刺激すると、集合管において AQP2 が apical 側細胞膜へ集積し、太いヘンレ上行脚において Na-K-2Cl 共輸送体の活性化がみられた。さらに、beta3AR ノックアウトマウスでは水利尿、尿中ナトリウム、カリウム、クロライドの排出亢進がみられた。また、beta3AR の選択的アゴニストをマウスに投与すると、逆の効果がみられた。この結果から、beta3AR の刺激により、XNDI の患者の治療を、AVPR2 をバイパスして行える可能性が示唆された。

**2. AKAP220**

A-kinase anchoring proteins (AKAPs) は protein kinase A と他のシグナル伝達にかかわる分子から成るマクロ分子複合体である。以前から AKAPs は集合管細胞における AQP2 の apical 側細胞膜への双方向的な移動に関与しているといわ

れ、なかでも AKAP220 は集合管細胞内で AQP2 と共局在し、*in vitro* 発現実験では AKAP220 によって AQP2 のリン酸化が亢進することが報告されていた<sup>5)</sup>。今回、ワシントン大学のグループが CRISPR/Cas9 ゲノム編集法で、マウス集合管培養細胞とマウス生体において AKAP220 をノックアウトしたところ、培養細胞においては apical 側のアクチンネットワークが障害され、ノックアウトマウスにおいては集合管細胞の apical 側細胞膜に AQP2 の集積がみられた。さらに、これらのマウスに水分負荷を行っても、尿浸透圧の低下はみられず、尿希釈障害を呈していることがわかった。AKAP220 が欠失することにより引き起こされるこの形質(AQP2 の細胞膜への集積)は、まさに XNDI を治療する際に望まれる現象でもあり、この pathway の詳細なメカニズムの解明により新たな治療ターゲットを明らかにできる可能性がある。

### 3. Wnt5a / カルシニューリン

われわれは、最近、集合管の培養細胞において、frizzled 受容体のリガンドである Wnt5a が、AQP2 の蛋白発現量を増加させ、リン酸化の状態を変化させ(S261 の脱リン酸化と S269 のリン酸化)、AQP2 を細胞表面へ誘導することを明らかにした<sup>7)</sup>。Wnt5a は、frizzled 受容体と結合し、Wnt / Ca<sup>2+</sup> シグナル伝達系を活性化させる。すなわち、ER からの Ca 放出を促進させ、カルシウム結合蛋白であるカルモデュリンを介してカルシニューリンなどの下流のシグナル分子を活性化し、多種多様な細胞機能に影響を与える。AQP2 の制御における Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン / カルシニューリンシグナル系の関与を調べるため、カルモデュリンの阻害薬である W7 およびカルシニューリンの阻害薬であるシクロスポリン A を培養細胞の実験系に投与したところ、両者とも Wnt5a の効果を完全に阻害した。このことから、Wnt5a は Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン / カルシニューリンシグナル系を活性化することで AQP2 を制御していることがわかった。Wnt5a が実際に生体内で水の再吸収へかかわっていることを示すため、マウスの腎臓から集合管を単離し灌流実験を行ったところ、Wnt5a は水透過性を上昇させ、dDAVP の約 54 % もの効果を発揮した。腎性尿崩症モデルマウスにおいても、Wnt5a の投与で細胞表面の AQP2 発現量は増加し、尿濃縮力は上昇した。

これらの結果から、Ca<sup>2+</sup> / カルモデュリン / カルシニューリンシグナルが AVP とは異なる機序で AQP2 の水透過量を増加させることがわかり、AQP2 の新たな制御機構が明らかとなった。Wnt5a の解析から、カルシニューリンは AQP2 の主要な制御因子と考えられた。カルシニューリンを直接

活性化することで知られるアラキドン酸が集合管培養細胞において AVP 様効果を持ったことから、カルシニューリン活性化薬が腎性尿崩症治療の標的となりうることを確認した。カルシニューリンを活性化する薬剤のスクリーニングが腎性尿崩症の新規治療戦略となることが期待される。

## ナトリウム代謝

### 1. WNK シグナル系

2001 年に遺伝性高血圧疾患偽性低アルドステロン症 II 型(PHA II)の原因遺伝子として with-no-lysine(WNK)キナーゼの一員である WNK1 と WNK4 が同定され、PHA II の分子病態の解析を通じて、腎臓における新規の塩分再吸収・血圧調節系 WNK シグナル系が発見された<sup>8)</sup>。WNK は oxidative stress-responsive kinase 1(OSR1)と STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase(SPAK)をリン酸化し、リン酸化された OSR1, SPAK はさらに Na-Cl 共輸送体(NCC)をリン酸化、活性化するという WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナル伝達系を構成している。複数のモデルマウスの検討から、このシグナル系の亢進が腎臓の遠位尿細管において NCC を活性化しナトリウム再吸収を増加させることが PHA II の原因であることが確認されている<sup>8,9)</sup>。さらにこのシグナル系は疾患の原因にとどまらず、生理的に重要な塩分再吸収・血圧調節機構であることも明らかにされた<sup>10,11)</sup>。

また 2012 年になって、2つのグループから次世代シーケンシング技術により全エクソンが網羅的に解析されたことにより、新たに Kelch-like protein 3(KLHL3)と Cullin3 が PHA II の原因遺伝子として同定された<sup>12,13)</sup>。KLHL3 と Cullin3 はともに、細胞内における蛋白質分解を担うユビキチン-プロテアソームシステムの構成員であり、WNK1 と WNK4 が KLHL3-Cullin3 ユビキチン E3 リガーゼ複合体の基質としてユビキチン化され、分解を受けることが判明した。WNK4 あるいは KLHL3 いずれの PHA II 疾患起因性遺伝子変異を導入しても、蛋白同士の結合の障害が起り、結果として WNK4 のユビキチン化障害が起き、細胞内 WNK4 の蛋白量が異常増加し、PHA II を発症する<sup>14~18)</sup>。KLHL3 の機能調節には KLHL3 S433 リン酸化が WNK との結合制御にかかわることが示されており、この KLHL3 のリン酸化をアンジオテンシン II/PKC, インスリン/Akt, PKA などが行っていることが報告されており、新たな WNK シグナル系の調節メカニズムの一つとして提示されている<sup>19,20)</sup>

また、Cullin3 においては、ほとんどすべての PHA II 疾患

起因性遺伝子変異は、エクソン9のスプライシングドナーもしくはアクセプター部位の周辺に局在している。Cullin3の遺伝子変異を持つPHA II患者の白血球内ではCullin3のエクソン9の欠失が起きていることが確認された<sup>21,22)</sup>。最近、エクソン9の欠失したCUL3(CUL3 $\Delta$ 403~459)を発現するヘテロノックインマウスが作製され解析が行われた<sup>23)</sup>。そのマウスにおいて、WNK4の発現量は増加しており、その下流のシグナル系の活性化も確認された。そして細胞実験においてCUL3 $\Delta$ 403~459は野生型CUL3と比較してKLHL3のユビキチン化や自己のユビキチン化を亢進させていることや、KLHL3と強く結合していることなどが示唆された<sup>23,24)</sup>。一方で、われわれの作製したCUL3の発現量が低下したモデルマウスの解析では、WNKシグナル系の亢進は認めなかった<sup>25)</sup>。このことから、CUL3遺伝子変異においてはCUL3の発現量低下でなく、CUL3 $\Delta$ 403~459のdominant negative作用がCUL3の機能を障害することがPHA IIの発症に関連していることが示唆された。

これらの研究の結果、WNK4、KLHL3、Cullin3のいずれの疾患起因性遺伝子変異においても、WNK4キナーゼの転写か分解の異常によるWNK4の蛋白量の増大とWNKシグナルの過剰な亢進が、PHA II発症の共通のメカニズムであることが示された。

## 2. MAGED2 遺伝子変異と Bartter 症候群

出生前 Bartter 症候群は、出生前における腎性のナトリウム喪失、多尿、羊水過多、早産を呈する遺伝性疾患である。その原因としてこれまでは、ヘンレの太い上行脚に局在してナトリウム再吸収に直接かかわる蛋白の遺伝子異常が指摘されてきた<sup>26)</sup>が、今回新たにMAGED2がその原因遺伝子として同定された<sup>27)</sup>。Laghmaniらドイツとフランスなどの共同研究グループは、重症ではあるが一過性の性質を持ち、男児にのみ発症する出生前 Bartter 症候群の7家系を解析したところ、すべての家系において母親と患児のX染色体上にMAGED2の遺伝子異常を発見した。MAGED2はmelanoma-associated antigen D2(MAGE-D2)をコードし、胎児期におけるナトリウム再吸収や羊水の容量調節への役割は不明だが、子宮内死亡した患児を解析したところ、胎児尿細管でNKCC2とNCCがapical膜に正しく局在せず、細胞質内にとどまっていることが判明した。すなわち、MAGE-D2は胎生期の腎臓において少なくとも2つのナトリウム輸送体の発現の制御に不可欠だということが明らかになった。また培養細胞での発現実験により、MAGE-D2はシャペロン蛋白Hsp40やG蛋白のサブユニットGs- $\alpha$ などと結合することが示され、これらの蛋白との相互作用が

NKCC2とNCCの局在異常のメカニズムに関係している可能性が示唆された。

通常の出生前 Bartter 症候群は、生涯その形質は持続するが、興味深いことに、MAGED2変異によるものは一過性であるという特徴があり、出生後間もなく臨床症状が寛解する。論文筆者は、出生前における腎臓髄質の低酸素状態に適応するうえでMAGE-D2がHsp40などとの相互作用を通じて役割を果たしている可能性を仮説として提示しており、もしそうだとすれば出生後に酸素供給が増加しMAGE-D2への依存度が低下することで、症状が寛解することが説明できる。

MAGED2 遺伝子変異による出生前 Bartter 症候群そのものは非常に稀な疾患ではあるが、これまで不明であった輸送体の制御メカニズムに示唆をもたらすものであり、また、成人においても、MAGE-D2に血圧制御や腎虚血における役割があるかどうか、検討を要する課題である。

## カリウム代謝：遠位尿細管におけるカリウム分泌制御機構(図2)

### 1. mTORC2

2002年に発見されて以来、mTOR(mammalian target of rapamycin)は細胞内恒常性を維持するための多種多様な機能を有する蛋白として注目を浴び続けてきた。mTORはさまざまなサブユニットと複合体を形成して機能を発揮することが知られており、2種類の複合体mTORC1(mTOR complex 1)とmTORC2が存在する。最近、ドイツのグループが、mTORC1は腎臓においてミトコンドリアの生合成を制御し、近位尿細管の虚血に対する感受性に関係していることを報告した<sup>28)</sup>。しかし、mTORC2の腎臓における役割の多くは不明であった。

今回同じグループが、mTORC2において機能的に必須なサブユニットであるRICTOR(rapamycin-insensitive companion of TOR)の遠位ネフロン特異的ノックアウトマウスを作製し、mTORC2が遠位尿細管におけるカリウム分泌の重要な制御因子であることを示した<sup>29)</sup>。このマウスでは、遠位ネフロン特異的にmTORC2シグナル伝達が障害されており、高カリウム食を負荷すると、致死的な高カリウム血症を呈した。この時、血中のアルドステロン濃度は正常の10倍にまで達した。野生型マウスでは高カリウム食負荷で、腎臓内mTORC2シグナル系は活性化されており、SGK1およびPKC $\alpha$ のリン酸化と、ROMKカリウムチャネルの発現量と活性が増加していたが、遠位ネフロン特異的ノック

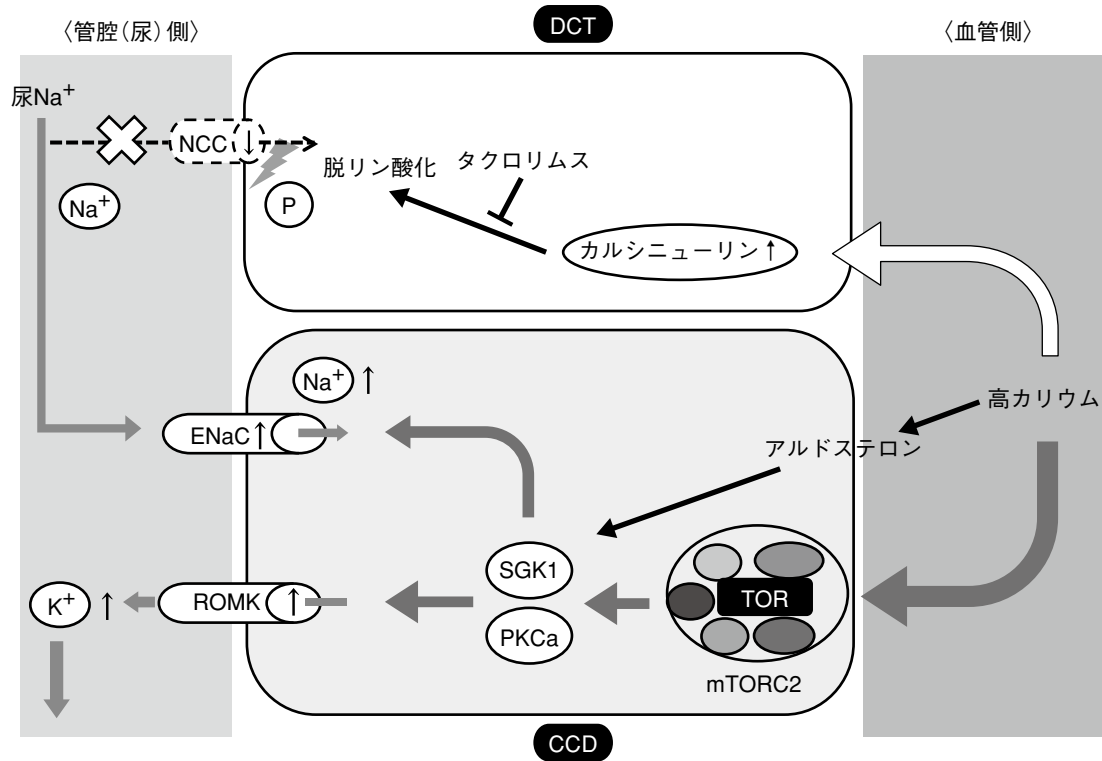


図2 遠位尿細管における高カリウム負荷時のカリウム分泌制御機構

アウトマウスでは、これらすべての代償的变化が消失していた。

興味深いことに、先行研究の一つでは、mTORC2がENaC(上皮型ナトリウムチャネル)を制御する可能性が報告されていた<sup>30)</sup>が、今回の遠位ネフロン特異的ノックアウトマウスは、ナトリウム制限に対し十分に尿中ナトリウム排泄を抑制することが可能で、ENaCの機能はほぼ保持されていた。この結果の食い違いがノックアウトマウスにおける代償作用のためかどうかは不明であるが、いずれにしても、mTORC2がアルドステロン感受性の尿細管セグメントにおいてROMKを介したカリウム分泌制御に中心的な役割を果たしていると考えられ、今後このpathwayの詳細な検討が望まれる。

## 2. NCC/カルシニューリン

腎臓でのカリウム排泄制御機構については、近年、カリウム排泄に直接かわるカリウムチャネルとともに、遠位尿細管に存在するNa-Cl共輸送体(NCC)が、協調して高カリウム摂取時の血圧の調整と尿中カリウム排泄を制御していることが明らかになりつつある。すなわち、遠位尿細管のNCCの活性化・不活性化によって、下流に流れるナトリウムの量が変化することで、尿中カリウムが調整され

る。上述のように、NCCはWNK4-OSR1/SPAK刺激伝達系によって活性化されることが示されており、低カリウム時にはこの系を介してNCCが活性化されることが知られている。一方で、高カリウム摂取時のNCCの制御機構にはさまざまな報告が存在するが、いまだ不明な点が多い。

われわれは、高カリウム摂取時のNCCの制御機構を明らかにするため、マウスに高カリウム溶液を経口投与し、急性期のNCCの変化について検討を行ったところ、カリウム負荷時にNCCが脱リン酸化され不活性化することを確認した<sup>31)</sup>。この時、WNK4、OSR1/SPAKは高カリウム負荷による変化をほとんど認めなかった。このことから、カリウムによるNCCの脱リン酸化にはWNK-SPAKとは独立した制御機構があると考えられたので、脱リン酸化酵素の検討を行ったところ、カルシニューリン(protein phosphatase 2B)の阻害薬であるタクロリムスと、カルモデュリン(カルシニューリンの上流調節因子)の阻害薬であるW7によって、カリウムによるNCCの脱リン酸化が有意に阻害されることを発見した。このことから、カリウム負荷後急性期におけるNCCの脱リン酸化にはWNK4-SPAKカスケードの関与はほとんどなく、カルシニューリンの活性化によるものと考えられた。さらに、カリウム負荷急性期の

尿中カリウム排泄を検討したところ、タクロリムスを投与したマウスにおいて尿中へのカリウム排泄は有意に抑制された。

これらの結果により、高カリウム負荷急性期における、カルシニューリンとNCCを介した新規のカリウム分泌制御機構が明らかにされた。また、カルシニューリン阻害薬使用時の有害事象である高カリウム血症の病態が明らかとなり、今後の予防法確立のための臨床研究への発展(NCC阻害薬のサイアザイドとの併用療法など)が期待される

## おわりに

腎臓尿細管生理の領域において、この1年間の進歩のなかから、輸送体機能調節の新たな知見と病態とのかかわりについて主に概説した。さらに研究が進展して、新たな治療法の開発につながるような成果が得られることを期待したい。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- Zhao Y, Gao P, Sun F, Li Q, Chen J, Yu H, Li L, Wei X, He H, Lu Z, Wei X, Wang B, Cui Y, Xiong S, Shang Q, Xu A, Huang Y, Liu D, Zhu Z. Sodium intake regulates glucose homeostasis through the PPAR $\delta$ /Adiponectin-mediated SGLT2 pathway. *Cell Metab* 2016 ; 23 : 699-711.
- Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE ; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in Type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2015 ; 373 : 2117-2128.
- Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Zinman B ; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin and progression of kidney disease in Type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2016 ; 375 : 323-334.
- Procino G, Carosino M, Milano S, Dal Monte M, Schena G, Mastrodonato M, Gerbino A, Bagnoli P, Svelto M.  $\beta$ 3 adrenergic receptor in the kidney may be a new player in sympathetic regulation of renal function. *Kidney Int* 2016 ; 90 : 555-567.
- Okutsu R, Rai T, Kikuchi A, Ohno M, Uchida K, Sasaki S, Uchida S. AKAP220 colocalizes with AQP2 in the inner medullary collecting ducts. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 1429-1433.
- Whiting JL, Ogier L, Forbush KA, Bucko P, Gopalan J, Seternes OM, Langeberg LK, Scott JD. AKAP220 manages apical actin networks that coordinate aquaporin-2 location and renal water reabsorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : E4328-4337.
- Ando F, Sohara E, Morimoto T, Yui N, Nomura N, Kikuchi E, Takahashi D, Mori T, Vandewalle A, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Uchida S. Wnt5a activates AQP2 through calcineurin. *Nat Commun* 2016. in press.
- Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin SH, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II : generation and analysis of a Wnk4(D561A/+) knockin mouse model. *Cell Metab* 2007 ; 5 : 331-344.
- Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, Lin SH, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 3978-3686.
- Chiga M, Rai T, Yang SS, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int* 2008 ; 74 : 1403-1409.
- Wang Y, O'Connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE, Shah SJ, Shi X, Pan L, Rampersaud E, Shen H, Kim JD, Subramanya AR, Steinle NI, Parsa A, Ober CC, Welling PA, Chakravarti A, Weder AB, Cooper RS, Mitchell BD, Shuldiner AR, Chang YP. Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 226-231.
- 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, Fadowski JJ, Belsha CW, Hunley TE, Nelson RD, Trachtman H, Cole TR, Pinsky 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.
- Louis-Dit-Picard H, Barc J, Trujillano D, Miserey-Lenkei S, Bouatia-Naji N, Pylypenko O, Beaurain G, Bonnefond A, Sand O, Simian C, Vidal-Petiot E, Soukaseum C, Mandet C, Broux F, Chabre O, Delahousse M, Esnault V, Fiquet B, Houillier P, Bagnis CI, Koenig J, Konrad M, Landais P, Mourani C, Niaudet P, Probst V, Thauvin C, Unwin RJ, Soroka SD, Ehret G, Ossowski S, Caulfield M ; International Consortium for Blood Pressure (ICBP) ., Bruneval P, Estivill X, Froguel P, Hadchouel J, Schott JJ, Jeunemaitre X. KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 456-460.
- Ohta A, Schumacher FR, Mehellou Y, Johnson C, Knebel A, Macartney TJ, Wood NT, Alessi DR, Kurz T. The CUL3-KLHL3 E3 ligase complex mutated in Gordon's hypertension syndrome interacts with and ubiquitylates WNK isoforms : disease-causing

- mutations in KLHL3 and WNK4 disrupt interaction. *Biochem J* 2013 ; 451 : 111–122.
15. 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.
  16. Shibata S, Zhang J, Puthumana J, Stone KL, Lifton RP. Kelch-like 3 and Cullin 3 regulate electrolyte homeostasis via ubiquitination and degradation of WNK4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 7838–7843.
  17. Wu G, Peng JB. Disease-causing mutations in KLHL3 impair its effect on WNK4 degradation. *FEBS Lett* 2013 ; 587 : 1717–1722.
  18. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHA II in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 2014 ; 23 : 5052–5060.
  19. Shibata S, Arroyo JP, Castañeda-Bueno M, Puthumana J, Zhang J, Uchida S, Stone KL, Lam TT, Lifton RP. Angiotensin II signaling via protein kinase C phosphorylates Kelch-like 3, preventing WNK4 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 15556–15561.
  20. 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. Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. *Biochem Biophys Res Commun* 2015 ; 467 : 229–234.
  21. Osawa M, Ogura Y, Isobe K, Uchida S, Nonoyama S, Kawaguchi H. CUL3 gene analysis enables early intervention for pediatric pseudohypoaldosteronism type II in infancy. *Pediatr Nephrol* 2013 ; 28 : 1881–1884.
  22. Tsuji S, Yamashita M, Unishi G, Takewa R, Kimata T, Isobe K, Chiga M, Uchida S, Kaneko K. A young child with pseudohypoaldosteronism type II by a mutation of Cullin 3. *BMC Nephrol* 2013 ; 14 : 166.
  23. Schumacher FR, Siew K, Zhang J, Johnson C, Wood N, Cleary SE, Al Maskari RS, Ferryman JT, Hardege I, Yasmin, Figg NL, Enchev R, Knebel A, O'Shaughnessy KM, Kurz T. Characterisation of the Cullin-3 mutation that causes a severe form of familial hypertension and hyperkalaemia. *EMBO Mol Med* 2015 ; 7 : 1285–1306.
  24. Ibeawuchi SR, Agbor LN, Quelle FW, Sigmund CD. Hypertension-causing mutations in Cullin3 protein impair RhoA protein ubiquitination and augment the association with substrate adaptors. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 19208–19217.
  25. Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Isobe K, Kikuchi E, Ohta A, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of knock-in mice carrying pseudohypoaldosteronism type II-causing mutations in the cullin 3 gene. *Biol Open* 2015 ; 4 : 1509–1517.
  26. Jeck N, Schlingmann KP, Reinalter SC, Kömhoff M, Peters M, Waldegger S, Seyberth HW. Salt handling in the distal nephron : lessons learned from inherited human disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 ; 288 : R782–795.
  27. Laghmani K, Beck BB, Yang SS, Seaayfan E, Wenzel A, Reusch B, Vitzthum H, Priem D, Demarets S, Bergmann K, Duin LK, Göbel H, Mache C, Thiele H, Bartram MP, Dombret C, Altmüller J, Nürnberg P, Benzing T, Levchenko E, Seyberth HW, Klaus G, Yigit G, Lin SH, Timmer A, de Koning TJ, Scherjon SA, Schlingmann KP, Bertrand MJ, Rinschen MM, de Backer O, Konrad M, Kömhoff M. Polyhydramnios, transient antenatal Bartter's syndrome, and MAGED2 mutations. *N Engl J Med* 2016 ; 374 : 1853–1863.
  28. Grahammer F, Haenisch N, Steinhardt F, Sandner L, Roerden M, Arnold F, Cordts T, Wanner N, Reichardt W, Kerjaschki D, Ruegg MA, Hall MN, Moulin P, Busch H, Boerries M, Walz G, Artunc F, Huber TB. mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is essential in response to ischemic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E2817–2826.
  29. Grahammer F, Nesterov V, Ahmed A, Steinhardt F, Sandner L, Arnold F, Cordts T, Negrea S, Bertog M, Ruegg MA, Hall MN, Walz G, Korbmacher C, Artunc F, Huber TB. mTORC2 critically regulates renal potassium handling. *J Clin Invest* 2016 ; 126 : 1773–1782.
  30. Gleason CE, Frindt G, Cheng CJ, Ng M, Kidwai A, Rashmi P, Lang F, Baum M, Palmer LG, Pearce D. mTORC2 regulates renal tubule sodium uptake by promoting ENaC activity. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 117–128.
  31. Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin inhibitors block NCC dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int* 2016. in press.