

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		腎臓における翻訳後修飾の制御異常と生活習慣病への関与の検討			
研究テーマ (欧文) AZ		Dysregulation of post-translational modification in the distal nephron: implication in hypertension and kidney disease			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)シバタ	名)シゲル	研究期間 B	2014 ~ 2015年
	漢字 CB	柴田	茂	報告年度 YR	2016年
	ローマ字 CZ	Shigeru	Shibata	研究機関名	帝京大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		帝京大学医学部内科学講座 准教授			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。) 本研究では翻訳後修飾による腎臓内シグナル伝達機構の解明、ならびにその異常と高血圧・慢性腎臓病との関連の解明を目指して研究を行い、進捗状況は以下の通りである。 1. RING E3 ユビキチンリガーゼ構成分子 KLHL3 の制御機構と新規標的基質の探索 家族性高血圧の一型である偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI)の原因遺伝子として同定された KLHL3 は Cullin 型 RING E3 ユビキチンリガーゼの構成分子であり、N 末端にて scaffold 蛋白である Cullin 3 と結合し、C 末端に存在する Kelch プロペラドメインを介して特定の基質と会合する。研究者らは KLHL3-CUL3 ユビキチンリガーゼの活性制御機構としてリン酸化の関与を検討するため、proteomics の手法を用いて KLHL3 のリン酸化サイトを網羅的に解析し、再現性をもってリン酸化される 4 つのサイトを同定した (Shibata S et al. <i>PNAS</i> 2014)。このうち基質結合ドメインに存在するリン酸化サイト(S433)に着目して解析し、このサイトが Angiotensin II シグナルによる protein kinase C の活性化によってリン酸化されることを見出した。また、このサイトのリン酸化によって KLHL3 は WNK キナーゼ等の基質結合能力を失い、したがってユビキチン化活性が喪失することが明らかとなった。また、KLHL3 の新規標的基質の解析のため遠位尿細管細胞由来の KLHL3 免疫沈降複合体の成分について質量分析にて解析を行い、KLHL3 と複合体を形成する蛋白質 82 種類を同定している。現在これらの分子の生理的な意義についての詳細な解析を進めており、近日中に論文化する予定である。 2. MR のリン酸化修飾の制御経路の解明 研究者らは近年、MR のリガンド結合領域にリン酸化サイトが存在すること、そして生体内ではこのサイト(S843)のリン酸化によって細胞選択的にリガンド結合と MR シグナルが制御されていることを報告したが(Shibata et al. <i>Cell Met</i> 2013)、キナーゼの本体ならびにその上流シグナルについては明らかとなっていない。研究者らはこの問題にとりくむため、recombinant kinase panel を用いた <i>in vitro</i> kinase screen の系を確立した。現在までに 200 種類ものキナーゼについてスクリーニングを終えており有力なキナーゼの同定に成功している。今後細胞培養系および <i>in vivo</i> の系での validation および生理的意義の探索、病態モデルでの制御異常等の検討を進めている。					
キーワード FA	ユビキチンリガーゼ	リン酸化	核内受容体	プロテオミクス	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Context-dependent mechanisms modulating aldosterone signaling in the kidney.							
	著者名 ^{GA}	Shibata S	雑誌名 ^{GC}	Clin Exp Nephrol					
	ページ ^{GF}	In press	発行年 ^{GE}	2	0	1	6	巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}		発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}		発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

1. Kelch-like 3 (KLHL3) and cullin-3 (CUL3) are components of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase. Mutations in KLHL3 or CUL3 cause pseudohypoaldosteronism type II (PHAII; also known as familial hypertension and hyperkalemia), a rare Mendelian disorder that causes hypertension. To evaluate the role of phosphorylation in regulating KLHL3 activity, we have comprehensively mapped phosphorylation sites in human KLHL3, and found that S433 in the Kelch domain (substrate binding domain) undergoes phosphorylation (Shibata et al. *PNAS* 2014). Interestingly, this site is recurrently mutated in independent PHAII families, strongly supporting the functional importance of this site. Further analysis revealed that angiotensin II signaling increases phosphorylation of this site via protein kinase C, and that phosphorylated KLHL3 loses its ability to bind and degrade substrates via ubiquitination. These studies reveal that volume depletion via angiotensin II signaling prevents CUL3/KLHL3-mediated degradation of substrates, directing the kidney to maximize renal salt reabsorption, and that this pathway is dysregulated in subjects with PHAII. We have also been screening novel substrates for KLHL3. Using mass spectrometry, we have identified 82 proteins that associate with KLHL3.
2. We have previously reported that S843 in the ligand binding domain of mineralocorticoid receptor is phosphorylated in vivo, and that phosphorylation of this site regulates MR signaling in a cell-selective manner via preventing ligand binding (Shibata et al. *Cell Met* 2013). The identity of kinases has been unknown. We have established an assay to screen the responsible kinases in vitro, and have been evaluating the ability of 200 Ser/Thr kinases to phosphorylate MR at this site. Future studies will clarify the detailed mechanisms and pathways regulating the phosphorylation, the identity of kinase, and its implication in hypertension and chronic kidney disease.