

## 電解質異常を伴う新規遺伝性高血圧症の分子病理学的解析

大阪大学大学院医学系研究科 腎臓内科学研究室

服部 洸輝

### 1.緒言

マグネシウム (Mg) は、多彩な生命現象、例えば、核酸・タンパク質の合成、ミトコンドリアでのエネルギー産生、血管トーン調節、心筋・骨格筋の活動電位の制御、骨形成などに関与している、生体に必須の主要元素である<sup>1)</sup>。そのため、主に消化管、腎臓、骨が互いに協調することで、血液中の Mg 濃度は極めて狭い範囲 (0.8~1.0 mmol/L) に維持されている。Mg の恒常性が破綻し、血清 Mg 濃度が著しく低下すれば、不整脈、痙攣、筋力低下などが出現する。しかし、症状を伴わない軽度の低 Mg 血症であっても、それが慢性的に持続すれば、高血圧、糖尿病、冠動脈疾患の発症のリスクとなる<sup>2)</sup>。この場合、Mg 補充による病態の改善が報告されている<sup>3-5)</sup>。近年、慢性腎臓病患者でも低 Mg 血症の頻度が意外に高いことが明らかにされ<sup>6)</sup>、CKD の発症・進行や生命予後との関連が指摘されている<sup>7-10)</sup>。

本研究では、申請者らが腎臓内科外来で診察した、低マグネシウム血症、低カリウム血症、高血圧症の患者家系 (図 1) の遺伝子解析を行い、本疾患の病態メカニズムを解明するとともに、この解析を通して腎臓でのマグネシウムおよびカリウムの動態について新たな知見を得ることを目的とする。

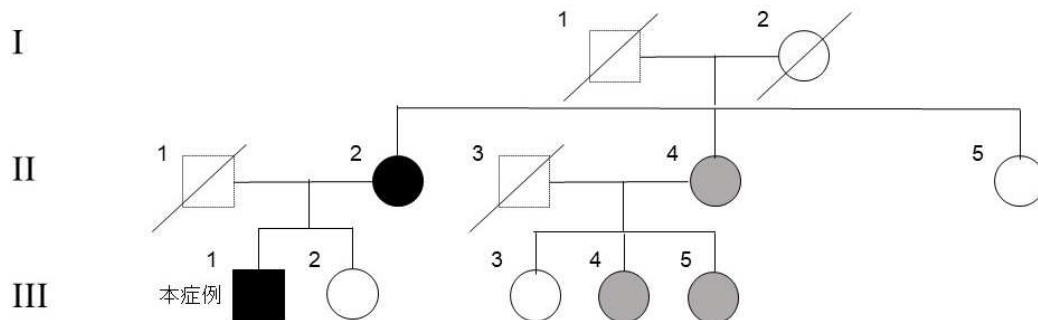


図 1 本疾患を有する家族の家系図

## 2.方法

2.1 申請者らが実際に外来患者で見出してきた、低マグネシウム血症、低カリウム血症を伴う遺伝性高血圧症を有する家系における、whole exome sequence を用いた trio 解析により、本症例の責任遺伝子を同定する。

2.2 同定した責任遺伝子とその変異がタンパクの挙動をどのように変化させるかを、in vitro 発現系を用いて解析する。

2.3 同定した責任遺伝子において、その変異がタンパクの推定立体構造をどのように変化させるかを、AlphaFold2 を用いて解析する。

2.4 同定した責任遺伝子に変異を持つ knock-in mouse を作成し、この同定した遺伝子変異が本当に疾患を再現できるか検討する。

## 3.結果

3.1 この家系における、whole exome sequence を用いた trio 解析により、可能性のある 70 個の遺伝子の中から、ion channel 分子の scaffold として機能する、ankyrin 3 をコードする ANK3 の変異を同定した (chr10:60166594C>T (rs531162695) (GRCh38.p12))。ANK3 は、52 個の exon を有し、51 個の splice variant の存在が知られている。この variant の配列は、exon28 に属しており、exon28 を含む ankyrin3 isoform3 は、ヒト腎皮質に多く発現していることが GTEx portal で確認されている。Ankyrin3 は、Hg channel TRPM6/7 の電荷 driving force を生み出す、K channel Kv1.1 と結合し、Kv1.1 機能を抑制することが知られている<sup>1)</sup>。また、Ankyrin3 が、集合管の Na channel である Enac の機能を増量することも明らかになっている。

3.2.1 ankyrin3 isoform3 の normal および mutant 分子発現ベクターを作成、HEK293 細胞に遺伝子導入したところ、normal に比べ mutant ankyrin3 のタンパク発現量が著明に亢進していた (図 2)。

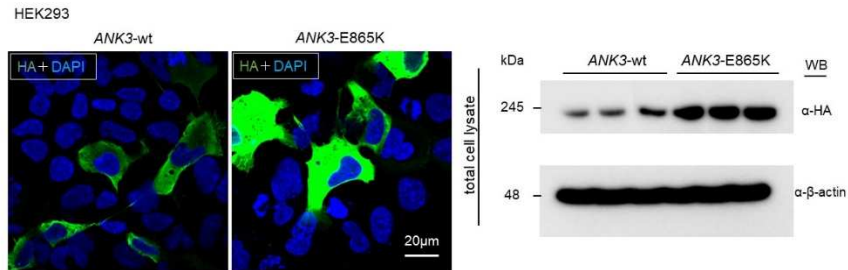


図 2 異常 ANK3 タンパクの発現増加

3.2.2 このタンパクの発現増加を調べる目的で、申請者らは、cycloheximide chase assay により、mutant ankyrin3 のタンパクの半減期が著明に延長していることを見出した (図 3)。これら発現ベクターの promoter 配列は同一であるため、タンパク分解過程に違いがあると考えられた。

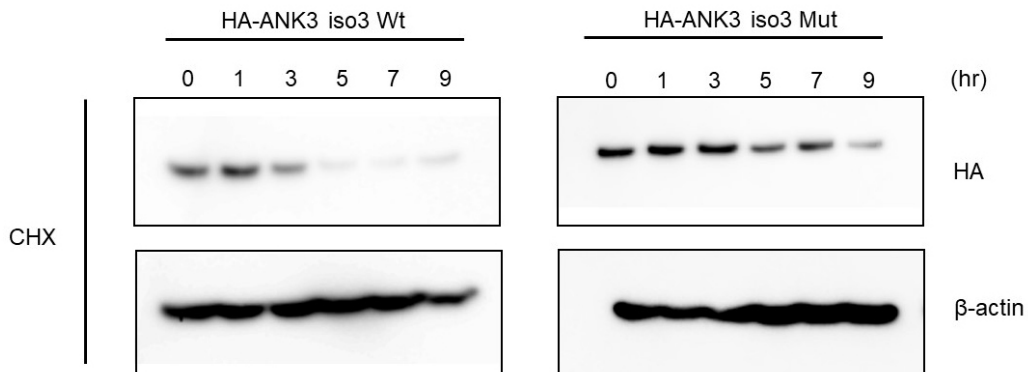


図 3 異常 ANK3 タンパクの半減期延長

3.2.3 そこで申請者らが、ankyrin3 のアミノ酸配列に着目したところ、ankyrin3 には、多くの Ubiquitin E3 ligase である、CDC20 の認識配列 (D-box、KEN-box) を多く認めた。そこで、CDC20 shRNA で CDC20 を knock down したところ、ankyrin3 発現増加が認められ、ankyrin3 の分解に、Ubiquitin E3 ligase である CDC20 が関与することが示唆された (図 4)。

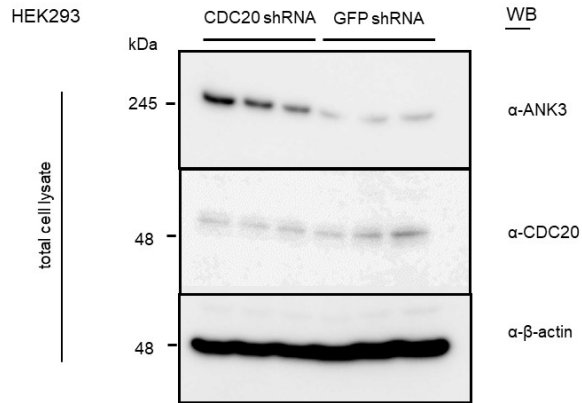


図4 CDC20 が ANK3 タンパクの発現を調節する

3.2.4 そこで、WT ankyrin3 と mutant ankyrin3 において、CDC20 との結合、ankyrin3 の ubiquitin 化、ankyrin3 の分解の程度を調べる目的で、proteasome 阻害剤処理後に、ankyrin3 による免疫沈降反応を行ったところ、mutant ankyrin3 は CDC20 と結合できず、ubiquitin 化も低下して、結果として分解が WT に比べて低下していることが判明した (図 5)。

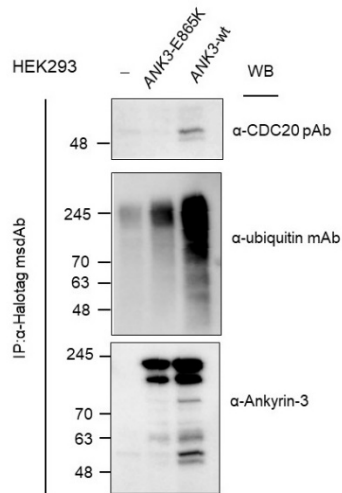


図5 異常 ANK3 タンパクは CDC20 と結合できない

3.2.5 また、WT ankyrin3 と mutant ankyrin3 において、Kv1.1 との結合がどの程度異なるのかを検討するため、WT ankyrin3 と mutant ankyrin3 それぞれと GST-Kv1.1 C terminal 発現ベクターの co-transfection を行い、GST で免疫沈降反応を行ったところ、WT に比べて、mutant ankyrin3 と Kv1.1 との結合が増強していることが示唆された (図 6)。

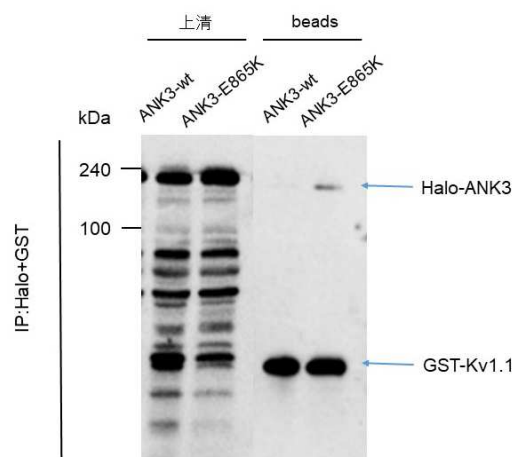


図 6 異常 ANK3 タンパクと Kv1.1 の結合増強

3.3 本研究で判明した、ANK3 遺伝子変異がアミノ酸配列の変化を通して ankyrin3 タンパクの立体構造をどのように変化させるかを検討するため、AlphaFold2 による推定立体構造予測を行った。mutant ankyrin3 では、WT に比べて分子単体の場合、C 末の部分に軽度の立体構造の違いを認めた。また、CDC20 と ankyrin3 との位置関係は、WT と mutant では大きく異なり、WT に比べて mutant では、CDC20 が接近困難になるようにみえた (図 7)。

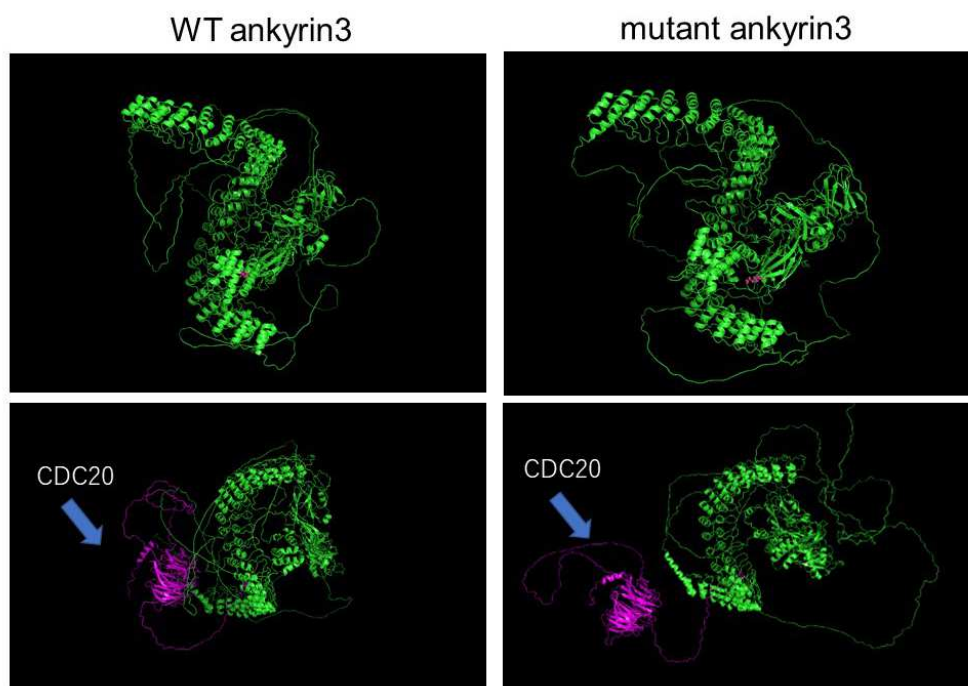


図 7 AlphaFold2 による ANK3 と CDC20 の推定立体構造

3.4 本研究で見出してきた *ANK3* 変異が、本当にこの病態を引き起こすのか、また本病態をより詳細に解析する目的で、ヒトと同等の *Ank3* 変異を hetero にもつ、knock-in (KI) mouse を作成し、免疫染色を行った。In vitro の結果に一致して、*Ank3* hetero KI mouse では、ankyrin3 タンパクの発現増加が認められたが、Kv1.1 の発現量は KI mouse で変化していなかった (図 8)。また、 $\alpha$ Enac 以外の  $\beta\gamma$ Enac 発現量は増加していた (図 9)。

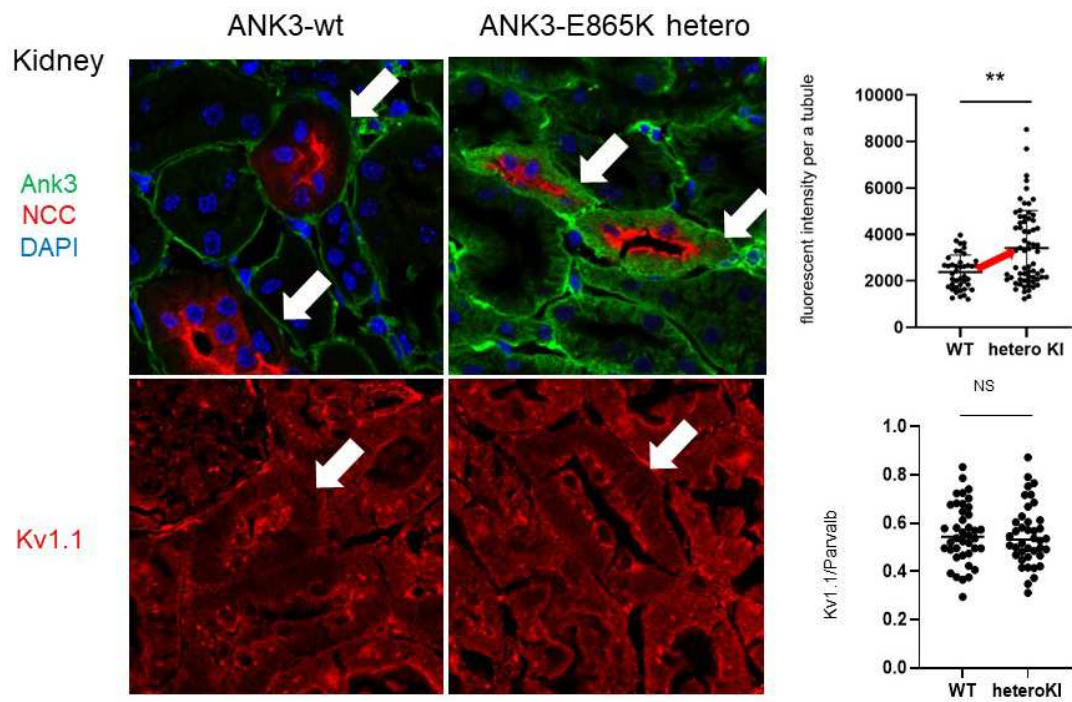


図 8 ANK3 KI マウスにおける異常 ANK3 タンパク発現増強

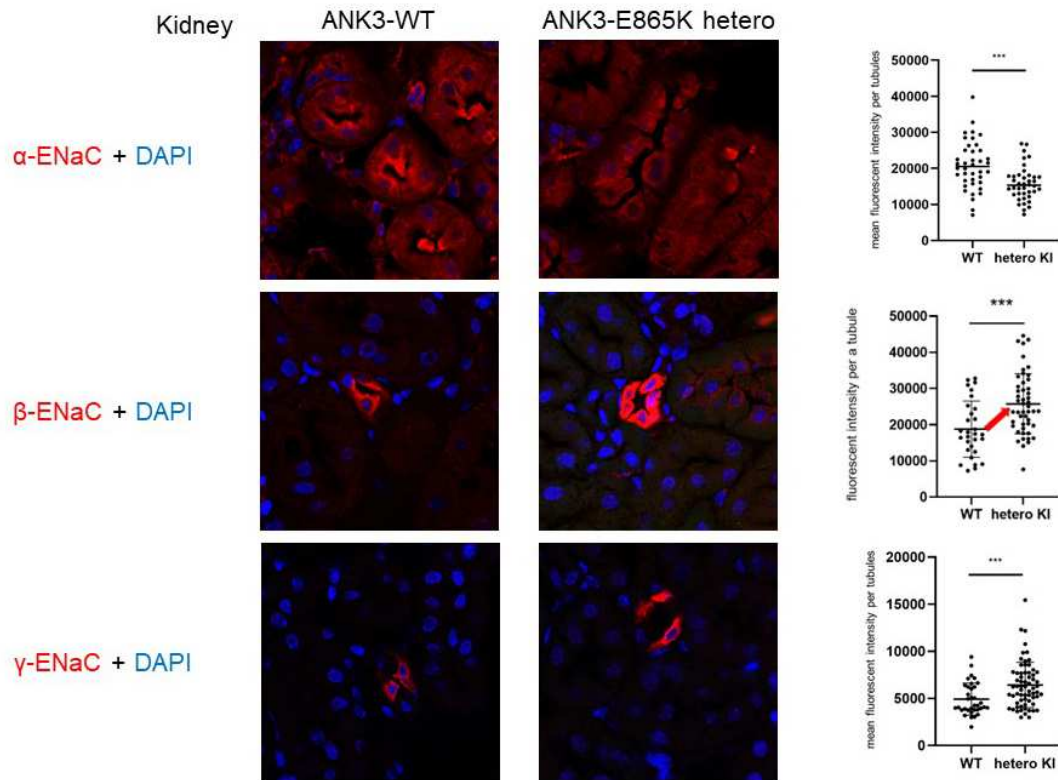


図9 ANK3 KI マウスにおける Enac の発現

#### 4.考察

低マグネシウム血症と低カリウム血症を合併した高血圧患者家系に対して whole exome 解析を行って、新規責任遺伝子 ANK3 を同定した。ANK2、ANK3 が関わる遺伝性疾患は、家族性不整脈<sup>12,13)</sup>、精神疾患<sup>14)</sup>が今まで知られているが、それらはすべて loss of function mutation であった。今回、われわれが発見した ANK3 の遺伝子変異は、gain of mutation である点が、まったく新しい遺伝子変異といえる。本研究で見出された変異をもつ ANK3 遺伝子から翻訳される ankyrin3 タンパクは、その立体構造の変化から、Ubiquitin E3 ligase である、CDC20 が ankyrin3 分子に接近困難になり、Ubiquitin 化が十分に行えないことによって、proteasome でのタンパク分解が減弱し、タンパク発現量が増加することが予想された。タンパク発現量が増加した ankyrin3 は、Kv1.1 との結合が増強するという性質の変化をきたし、Kv1.1 の機能をより強く抑制し、結果として低マグネシウム血症につながる。一方、発現増強した変異 ankyrin3 がより多くの Enac を活性化し、低カリウム血症および高血圧症につながる (図 10)。

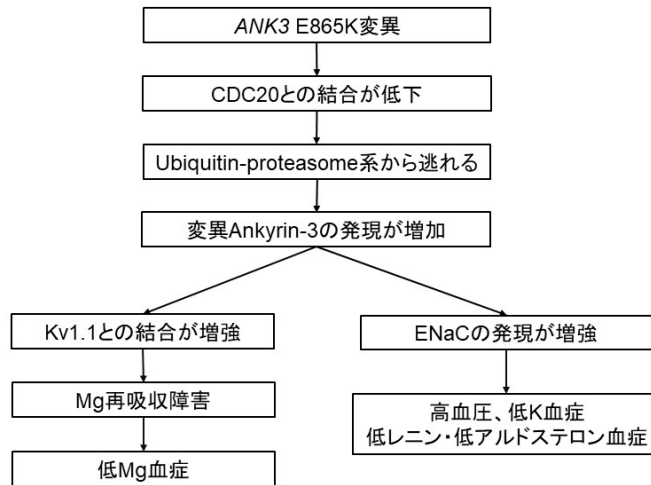


図 10 本疾患の病態まとめ

## 5.結語

大阪大学医学部附属病院で診察した外来患者から、電解質異常を伴う高血圧症の原因遺伝子変異として、*ANK3:chr10:60166594C>T,pE865K* を見出し、本遺伝子変異がどのように本疾患を引き起こすかの病態メカニズムについて一部を解明した。

## 6.文献

- 1) de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2015;95(1):1-46.
- 2) Geiger H, Wanner C. Magnesium in disease. *Clin Kidney J.* 2012;5(Suppl 1):i25-i38.
- 3) Dibaba DT, Xun P, Song Y, Rosanoff A, Shechter M, He K. The effect of magnesium supplementation on blood pressure in individuals with insulin resistance, prediabetes, or noncommunicable chronic diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2017;106(3):921-9.
- 4) Veronese N, Watutantrige-Fernando S, Luchini C, Solmi M, Sartore G, Sergi G, et al. Effect of magnesium supplementation on glucose metabolism in people with or at risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis of double-blind randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2016;70(12):1463.
- 5) Darooghegi Mofrad M, Djafarian K, Mozaffari H, Shab-Bidar S. Effect of magnesium supplementation on endothelial function: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 2018;273:98-105.
- 6) Oka T, Hamano T, Sakaguchi Y, Yamaguchi S, Kubota K, Senda M, et al. Proteinuria-associated



renal magnesium wasting leads to hypomagnesemia: a common electrolyte abnormality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(7):1154-62.

7) Sakaguchi Y, Shoji T, Hayashi T, Suzuki A, Shimizu M, Mitsumoto K, et al. Hypomagnesemia in type 2 diabetic nephropathy: a novel predictor of end-stage renal disease. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1591-7.

8) Sakaguchi Y, Iwatani H, Hamano T, Tomida K, Kawabata H, Kusunoki Y, et al. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2015;88(4):833-42.

9) Tin A, Grams ME, Maruthur NM, Astor BC, Couper D, Mosley TH, et al. Results from the Atherosclerosis Risk in Communities study suggest that low serum magnesium is associated with incident kidney disease. *Kidney Int*. 2015;87(4):820-7.

10) Azem R, Daou R, Bassil E, Anvari EM, Talierno JJ, Arrigain S, et al. Serum magnesium, mortality and disease progression in chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2020;21(1):49.

11) San-Cristobal P, Lainez S, Dimke H, de Graaf MJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. Ankyrin-3 is a novel binding partner of the voltage-gated potassium channel Kv1.1 implicated in renal magnesium handling. *Kidney Int*. 2014;85(1):94-102.

12) Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, et al. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):9137-42.

13) Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, et al. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(50):17533-8.

14) Yang R, Walder-Christensen KK, Lalani S, Yan H, Garcia-Prieto ID, Alvarez S, et al. Neurodevelopmental mutation of giant ankyrin-G disrupts a core mechanism for axon initial segment assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(39):19717-26.

## 7.成果発表

### 学会発表

・梶本幸男、坂口悠介、貝森淳哉、服部洸輝、朝比奈悠太、土井洋平、岡樹史、高橋篤史、猪阪義隆. 低 Mg・低 K 血症を伴う遺伝性高血圧症の新規責任遺伝子 ANK-3 の同定とその変異の機能解析. 第 51 回日本腎臓学会西部学術大会. 福井. 2021. 優秀演題賞受賞.

・梶本幸男、坂口悠介、貝森淳哉、服部洸輝、朝比奈悠太、土井洋平、岡樹史、高橋篤史、猪阪義隆. 低 Mg・低 K 血症を伴う遺伝性高血圧症の新規責任遺伝子 ANK-3 の同定とその変異の機能解析. 第 53 回臨床体液研究会. 東京. 2021. 優秀演題賞受賞.

・梶本幸男、坂口悠介、貝森淳哉、服部洸輝、朝比奈悠太、土井洋平、岡樹史、高橋篤史、猪阪義隆. 低 Mg・低 K 血症を伴う遺伝性高血圧症の新規責任遺伝子 ANK-3 の同定とその変異の機能解析. 第 65 回日本腎臓学会学術大会. 神戸. 2022. 優秀演題賞受賞.