

心腎連関における mTOR-ULK1 系の関与の解明

帝京大学医学部内科学講座 腎臓研究室

柴田 茂

1. 応募時の研究背景

我が国の慢性腎臓病（CKD）患者（糸球体濾過量 60ml/min 以下あるいは蛋白尿を有する患者）は 1300 万人にも上り、その病態は肥満や糖尿病、高血圧にといった生活習慣病とも密接に関連している。様々な疫学的研究から CKD が心血管障害の主要なリスク因子であることも明らかとなっており（“心腎連関”）、CKD の進展抑制は末期腎不全のみならず、心血管疾患の発症率低下にも繋がるのが期待されるが、心腎連関のメカニズムについては十分に明らかとなっていない。

オートファジー制御分子として同定された Ser/Thr kinase である ULK1 (Unc51-like-kinase 1) は Beclin-1 をリン酸化することでオートファゴソームの形成に中心的な役割を果たすことが知られている。その一方で、糖代謝の修飾 (Li et al. Mol Cell 2016) やゴルジ装置への蛋白質輸送 (Joo et al. Mol Cell 2016) など、non-canonical な役割も注目を集めている。ULK1 の上流分子としては細胞内の栄養センサー (nutrient sensor) である mammalian target of rapamycin (mTOR) が作用する。mTOR は PI3 キナーゼファミリーに属する Ser/Thr kinase で、mTOR complex (mTORC) と呼ばれる複合体を形成し、アミノ酸などの栄養刺激や様々なホルモン、増殖因子等によって活性化される。mTOR は細胞増殖や蛋白合成を促進させるとともに、ULK1 を S757 にてリン酸化・不活性化し (Kim et al. Nat Cell Biol 2011)、オートファジーを抑制的に制御していると考えられる。

ミネラルコルチコイド受容体 (MR) は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドの作用を受けて活性化し、体液調節をはじめとする様々な代謝プロセスを制御している。MR の作用を抑制する MR 拮抗薬は心不全に対する有効性が示されており、また腎保護作用を有することも明らかとなりつつあるが、その一方で MR の活性制御機構については不明の部分も多い。我々はこれまで、MR の活性調節機構の全貌解明を目指して研究を行ってきた (Shibata et al. Nat Med 2008; J Clin Invest 2011)。一連の研究課程で、リガンド結合領域 (S843) のリン酸化に伴って受容体とリガンドであるアルドステロンとの結合が制御される、という新規調節のメカニズムを報告した (図 1; Shibata et al. Cell Metab 2013)。しかしながら、MR のリン酸化を担う分子の本体は明らかでなかった。

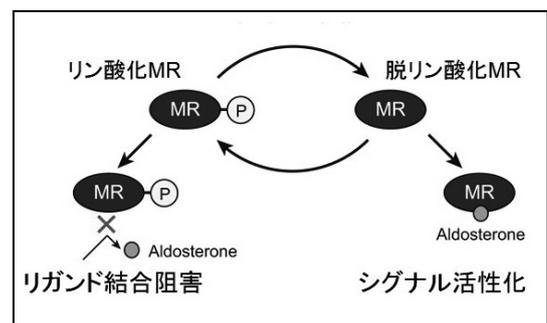


図 1. リン酸化による核内受容体 MR の制御
リガンド結合領域(S843)のリン酸化によりリガンド(aldo-sterone)と MR の結合が抑制され、細胞選択的に核内受容体のシグナルが制御される。

リン酸化による MR 制御機構の全貌解明を目指し、MR-S843 を含むペプチドを RI 標識 ATP 存在下に recombinant kinase panel と反応させ、約 200 の Ser/Thr キナーゼを対象に網羅的なスクリーニ

ングを実施したところ、予想外にも ULK1 が MR-S843 のキナーゼとして作用することを見出した (図 2)。しかしながら、ULK1 が実際に MR のリン酸化酵素として作用するか否か、シグナル伝達経路、病態形成に占める意義、他の核内受容体制御における役割など、依然として未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

以上の研究背景に基づき、本研究では①ULK1 とその上流分子である mTOR による MR 調節機構の分子メカニズムの詳細解明、②臓器障害における当該メカニズムの病的意義の探索、③他の核内受容体調節において ULK1 が果たす役割の解明、の 3 点を目的として検討を行った。

3. 研究方法および研究の進捗

(1) ULK による MR リン酸化作用の確認

スクリーニングで認められた ULK による MR-S843 リン酸化作用を *in vitro* および培養細胞系で確認した。

1. *In vitro* kinase assay および LC-MS/MS を用いた検討 :

MR-S843 を含む標的ペプチドを合成し、ULK1 と反応させた後、LC-MS/MS によりリン酸化の有無ならびにリン酸化部位を同定した。その結果、ULK1 と反応させることで、MR-S843 がリン酸化されることが確認された (図 3)。

2. HEK 細胞における ULK1 のノックダウンと ULK1/ULK2 ダブルノックアウト線維芽細胞 (MEF) を用いた検討 :

ULK1 は HEK 細胞にも発現している。そこで、同細胞にて siRNA を用いて ULK1 をノックダウンし、MR を過剰発現させることで、MR のリン酸化作用の差異をコントロールと比較した。2 種類の siRNA で検討した結果、どちらの場合でもリン酸化レベルはコントロールに対し 50%程度低下していた。このことから、内因性の ULK1 が MR-S843 をリン酸化することが明らかとなった。一方で、シグナルは完全に消失しないことから、ULK1 以外にも MR のリン酸化を担う分子が存在するものと考えられた。我々のスクリーニングアッセイでは、

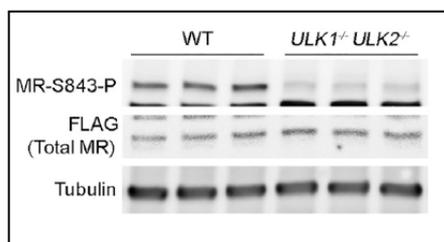


図 4. 野生型・ULK1^{-/-} ULK2^{-/-} MEF における MR リン酸化量の比較

ULK1 のほか ULK2、TBK といったキナーゼが MR-S843 ペプチドをリン酸化する可能性が示されている (図 2)。そこで野生型 MEF および ULK1/ULK2 ダブルノックアウト MEF (ULK1^{-/-} ULK2^{-/-} MEF) に MR を導入し検討を行ったところ、リン酸化レベルは前者に比較し後者にて 20%程度にまで減少した (図 4)。このことから、ULK1 および ULK2 が MR のリン酸化を担う主要分子であることが確認された。

我々は以前、レニン・アンジオテンシン系を介して産生されるペプチドホルモンであるアンジオテンシン II (AngII) が AngII 受容体 (AT1R) を介して MR の脱リン酸化を促進することを報告している (Shibata et al. Cell Metab 2013)。一方、これまでの先行研究からは、AngII が mTOR を活性化することも明らかにされている (Eguchi et al. J Biol Chem 1999 など)。上述のように、ULK1

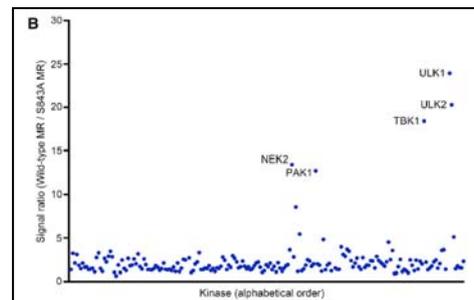


図 2. MR-S843 をリン酸化する分子のスクリーニング

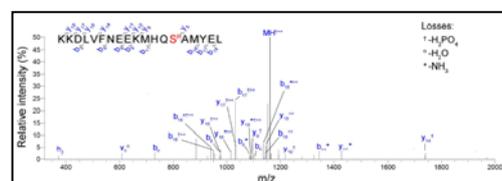


図 3. リン酸化 MR ペプチドの MS/MS spectrum

の活性は mTOR を介した S757 のリン酸化により不活性化されている(Kim et al. Nat Cell Biol 2011)。これらのことを総合し、AngII による MR の脱リン酸化作用に mTOR ならびに ULK1 が関与する可能性を想定して検討を行った。HEK 細胞に AT1R および MR を過剰発現させ AngII を投与したところ、mTOR の基質である S6 キナーゼのリン酸化と ULK1-S757 のリン酸化が誘導された。さらに、AngII の添加によって MR-S843 の脱リン酸化が認められ、この作用は mTOR の阻害薬である AZD8055 により抑制された。このことから、AngII は下流分子として mTOR を活性化し、ULK1 を抑制的に制御していること、そしてこの系が MR のリン酸化レベルを制御していることが判明した。

(2) In vivo における検討

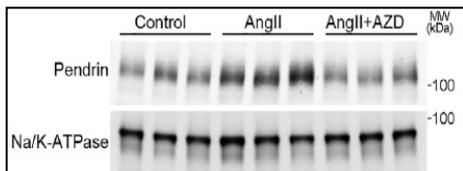


図5. AngIIによる pendrin 誘導と mTOR 阻害薬 AZD8055 の効果 (in vivo)

mTOR-ULK1 系が in vivo において MR シグナルに及ぼす影響を評価するため、マウスに AngII の持続投与を行い、mTOR 阻害薬 AZD8055 の腎尿細管作用を検討した (図5)。間在細胞における MR の下流分子である pendrin は AngII により誘導されたが、この効果は AZD8055 により有意に抑制された。一方、興味深いことに、主細胞における MR のターゲットである ENaC や遠位尿細管細胞における NCC

の誘導は AZD8055 により抑制されなかった。本結果は、MR のリン酸化が主に間在細胞で誘導される、というこれまでの結果に沿うものであり、MR の局所調節の多様性を裏付けるものと考えられる。

ULK1 の腎作用ならびに心血管作用をより詳細に明らかにすべく、CRISPR/Cas9 を用いた ULK1 ノックアウトマウスの作成に着手した (図6)。マウス作出後、アンジオテンシン II や高カロリー食などの mTOR 活性化刺激を加えた場合の血圧、心・腎機能障害への影響を評価する予定である。

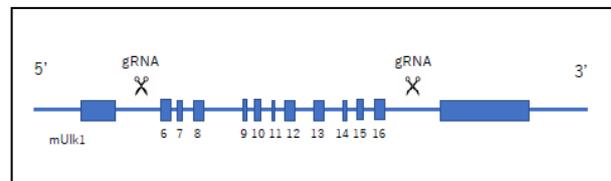


図6. ULK1 ノックアウトマウス作成のストラテジー

(3) 他の核内受容体における ULK1 の役割の探索

核内受容体の構造が高度に保存されていることを鑑みれば、当該機構はMRのみならず他の核内受容体調節にも関わっている可能性がある。そこで現在、MRの配列情報をもとに、相同性のある分子XおよびYについてULK1による制御の可能性を考え、peptideを用いたkinase assayによりリン酸化の有無ならびにリン酸化部位の探索を行っている。

4. 総括

本研究の結果、AngII シグナルと MR シグナルの synergy の分子基盤の一端が明らかとなったと考えられる。AngII は mTOR を介して ULK1 を抑制することで MR の脱リン酸化を促し、リガンド感受性を亢進させる。このメカニズムは腎臓尿細管の間在細胞にて pendrin を制御し、食塩感受性高血圧の病態に関与しているものと想定される。一方で先行研究から、心血管系においても AngII と MR のクロストークの存在が報告されており (Jaffe et al. Circ Res 2005; Lu et al. Endocrinol 2019)、mTOR-ULK1 系が MR を介し心腎障害の両者に関与している可能性も考えられる。今後更なる検討を進めていく予定である。