

# オートファジー制御分子による血圧調節と臓器老化防御機構の分子基盤の解明 (腎尿細管ナトリウム(Na)輸送体の構造に着目した血圧調節と分子基盤の解明)

山崎 修

帝京大学医学部内科学講座腎臓グループ

## 概要

【目的】高血圧は日本全国に2000万人以上患者が存在する国民病である。高血圧は加齢とともに患者数が加速度的に増加し、食塩感受性も増加する。更には食塩感受性と加齢とは相互に増悪する可能性を秘めている。申請者は腎尿細管Na輸送体NBCe1に焦点をあて、種々の機能解析法を用いてNa輸送のメカニズムを詳細に研究してきた。また所属する研究室では遠位尿細管～集合管のNa輸送を制御するミネラルコルチコイド受容体(Mineralocorticoid Receptor:MR)の作用する高血圧の制御メカニズムを精力的に研究している。本研究の目的は、腎臓におけるNa輸送系の統合制御機構、および加齢に伴う高血圧の病態への関与を解明することである。

## 【方法】

- 1) NBCe1の一塩基ヴァリエント(single nucleotide variant:SNV)機能解析:近位尿細管Na輸送体NBCe1の構造および過去の患者報告例からNa輸送機能制御部位を調査した。更にPolyphen-2予測ツールを用いて、同部位の中から機能変化を起こしうる候補SNVを検索した。
- 2) MRのSNV解析:腎集合管に分布し強力なNa再吸収作用を惹起するMRのSNV検索を行った。
- 3) オートファジー障害マウスにおける膜輸送体発現検索:オートファジー制御因子ULK1のノックアウト(Knock Out:KO)マウスを用いて腎Na膜輸送体をWestern blotting法で検索した。

## 【結果】

- 1) NBCe1の機能低下型変異体R881Sを新規に同定した。この変異体は、蛋白発現量の低下・細胞膜発現欠損を示すのみならず、グリコシル化障害を併せ持ち、2量体の形成障害を来す変異体であった。Two-electrode voltage clamp法を用いた機能解析では、R881Sの機能はほぼ欠損していた。以上から、R881Sの患者が機能低下に伴う重篤な血圧調節破綻を起こすことが想定された。
- 2) MRのC末端に位置するLigand Binding Domain(LBD)がAldoの結合部位であることから、同部位のSNVが機能変化を生じると想定された。候補SNVをおおよそ50箇所同定した。
- 3) ULK1KOマウスでは加齢によりULK1蛋白量が減少し、ULK1が加齢制御に関わる重要な因子であることが想定された。

【考察】上記所見は、腎尿細管Na輸送体を介した高血圧惹起メカニズムの一端を解明するものである。一方で、高血圧は老化によっても加速的に増悪することから、今後上記変異体群と老化との関連性についても検討していきたい。

## 1. 研究目的

高血圧は日本国民のうち2000万人が罹患するといわれる国民病で、国を挙げて対応しなければならない喫緊

の課題である<sup>1)</sup>。高血圧の成立機序は、心拍出量と末梢血管抵抗の積と言われているが、双方に関わる因子は、先天的・後天的・また環境因子など多岐にわたる。

一方で、食塩摂取に伴い高血圧が惹起されるという事実と、海に囲まれた日本では食塩摂取量が高いことから、日本では食塩摂取過剰に伴う高血圧を発症する頻度が高い。更には特に食塩摂取が高血圧を著明に誘導する高血圧を「食塩感受性高血圧」と呼ばれている。この分子基盤として、腎臓の尿細管に発現している種々の Na 輸送体群が関与していることが知られている<sup>2)</sup>。

すなわち、腎尿細管の加齢と細胞老化は血圧調節機構の破綻をきたす主要な要因であるものの、そのメカニズムは十分に解明されていない。

研究者は、腎臓の Na 輸送体を介した高血圧の発症メカニズムに着目し、一貫して研究を進めてきた。特に近位尿細管に発現するナトリウム重炭酸共輸送体 NBCe1 (Na-bicarbonate cotransporter electrogenic type1: NBCe1) が近位尿細管の主たる Na 再吸収能を持つこと、更には同輸送体機能が破綻することで生じる家系群にいち早く着目した。かつて所属していた研究室では、現在報告されている exon 領域に属する 15 家系中、実に 10 家系を報告し、世界をリードしてきた。研究者も同研究に参画し、独自に NBCe1 の一塩基ヴァリエント (single nucleotide variant: SNV) に着目し、現在までに機能変化を起こす SNV を 2 か所同定している<sup>3, 4)</sup>。更に留学中に NBCe1 の機能変化を来す蛋白結合部位・リン酸化部位を新たに同定してきた<sup>5, 6)</sup>。

また研究者の現在所属する研究室は、腎遠位尿細管～集合管に発現する種々の Na 輸送体が関与する高血圧の発症メカニズムについて精力的に研究している。特に本研究室では、集合管に発現し Na 輸送を制御するミネラルコルチコイド受容体 (Mineralocorticoid Receptor: MR) の過剰亢進作用に基づく高血圧の発症メカニズムを詳細に報告してきた<sup>7)</sup>。

特に、MR の作用を規定するミネラルコルチコイドは MR のリガンド結合領域 (ligand binding domain: LBD) と結合することでその作用を発揮する。我々の研究室の知見である、LBD に位置するリン酸化サイト S843 部位の不適切な活性化により重篤な高血圧が惹起される一連のメカニズムは、LBD の高血圧との密接な関連を示すのみならず、LBD に位置する SNV が高血圧に関与する可能性を示唆するものである。

一方で、我々は近年、自己細胞成分の分解と self-renewal (自己再生) を担うオートファジーの initiator である Ser/Thr キナーゼ ULK1 の新たな役割として、MR の活性調節作用を報告した<sup>8)</sup>。オートファジーが self-renewal に関わる本質的な機構であること、そして MR が強力な血圧調節機構であることを鑑みれば、この知見は細胞老化と高血圧との関連に ULK1 が関与する可能性を示している。また他の研究室からの報告では、ULK1 の機能障害が糖尿病性腎臓病においても病的な役割を担うことも明らかにされている<sup>9)</sup>。これらの知見を合わせると、加齢及び高血圧・糖尿病といった生活習慣病に由来する臓器障害に対して ULK1 が抑制的な役割を担っていることが想定され、細胞老化と生活習慣病によって形成される臓器障害の vicious cycle が、ULK1 シグナルの破綻により加速される可能性が考えられる。このような背景に基づき、本研究では加齢ならびに生活習慣病に由来する細胞老化と血圧調節障害・心腎障害における ULK1 の役割を明らかにすることを目的とする。この目的を達成するため、我々は CRISPR/Cas9 を用いて ULK1 のノックアウトマウス (ULK1-KO) 系統を樹立した。本マウスは isozyme の代償作用によって明らかな発達異常を呈さないことから、環境要因の長期的な影響を評価することが可能である。本モデルにおいては、ULK1 の欠失に伴ってオートファジーの最大活性化能が低減しているものと想定され、加齢に対する忍容性やミネラル・糖質などの過栄養ストレス存在下での腎臓・心血管系の self-renewal が低下し、MR の活性異常も重なって血圧上昇と心腎障害が加速される可能性が考えられる。本モデルを用いた一連の解析により、生活習慣病と老化によって形成される高血圧と臓器障害の悪循環におけるオートファジー制御因子 ULK1 の役割を明らかにする。

## 2. 研究方法

### 2.1 NBCe1 の新規 SNV の探索

NBCe1 の患者報告例はその多くが膜貫通領域に集中しており、同部位が機能活性変化を来しうると想定される。そのため、膜貫通領域に存在する NBCe1 の膜貫通領域に属する SNV を NCBI database から網羅的に抽出する。更に、SNV のうち、ミスセンス変異に焦点を当て、ミスセンス変異に伴うアミノ酸変異が、実際に機能変化を生じるかどうかを、Polyphen-2 予測ツールを用いることで、より効率

的に機能変化を起こしうる SNV 検索を行う。得られた SNV の情報を基に, mutagenesis lightning kit (Agilent 社) を用いて NBCe1 プラスミドに変異を導入する。NBCe1 SNV の発現量検索として, HEK293 細胞を用いた lipofection 法による強制発現法を用い, Western Blotting 法により解析を行う。NBCe1 SNV の細胞内局在については, 共焦点顕微鏡 LSM 800 with airyscan (Carl-Zeiss Co. Ltd.) を用いて確認を行う。更に機能解析法として, two-electrode voltage clamp 法を用いて機能解析を行う。具体的には, mMessage mMachine T7 kit (Ambion 社) を用いて mRNA を作成し, アフリカツメカエル卵母細胞に注入する。十分な膜蛋白発現が得られたのちに, two-electrode voltage clamp 法を用いて, 電流の多寡を以て機能解析を行う。

## 2. 2 MR の SNV 検索

前述の通り, MR の LBD が重要部位と想定されるため, homology 解析を行ったところ, 同部位が種を超えた保存領域 (highly conserved area) であることが確認された。そのため LBD 領域に位置する SNV を NCBI database から網羅的に抽出した。同様に Polyphen-2 予測ツールを用いてより効率的に機能変化を起こしうる SNV を検索する。

## 2. 3 ULK1-KO の老化モデルとしての表現型の確認 (in vivo)

C57/BL6N マウスをベースとして, Ulk1 の exon 6-16 をターゲットに CRISPR/Cas9 を用いて ULK1-KO を作成した。本マウスの腎臓において Ulk1 mRNA の欠失を確認済みである。本マウスを 18 ヶ月まで飼育後表現型を野生型 (C57B6N) と比較する。また腎臓での食塩輸送活性の評価として腎組織より超遠心法により膜蛋白を抽出し, NHE3, SGLT1/2, NKCC2, NCC, ENaC, pendrin といった NaCl 輸送体の発現量の変化を検討する。

## 3. 研究結果

### 3. 1 NBCe1 変異体 R881S の発見, および変異体の特徴

NBCe1 の SNV を抽出し検討した所, 膜貫通部位 transmembrane 12 の部位に, 新規に R881S を同定した。この R881S 変異体は, HEK 細胞強制発現系実験で Western Blotting 法を用いて確認した所, 野生型のおよそ 10% 程度の蛋白発現にとどまっていた。更に興味深いことに, 蛋白質量の低下も伴っていた (Fig. 1)。NBCe1 が翻

訳後にグリコシル鎖による糖鎖修飾を経て成熟することが知られているため, N-glycosylase F による脱グリコシル化実験を行った。野生型に比し, R881S は脱グリコシル化実験で著明な質量低下を生じなかったことから (Fig. 2), R881S 蛋白は糖鎖修飾を受けない変異体であることが想定された。

更にビオチン化 Western blotting 法を用いて膜発現量を確認した所, R881S 変異体は膜発現が完全に欠損していた (Fig. 1)。共焦点顕微鏡による確認でも, R881S は HEK 細胞・MDCK 細胞いずれの系においても細胞内局在が著明で, かつ膜発現が欠損しており, ビオチン化 western blotting 法と一致する結果であった (Fig. 3)。

研究者の既報告では, 細胞内局在を示す変異体群のうち, ドミナントネガティブ作用を持つ変異体があることが知られていた。そのため, R881S 変異体がドミナントネガティブ作用を持つかどうかを共免疫沈降法で確認した。結果として, R881S 変異体は, 野生型のような 2 量体を形成することができず, そのためドミナントネガティブ作用も持たないことが示された (Fig. 4)。これらの特徴は, 過去の患者報告および SNV 報告とは全く異なる形式であり, 新たな NBCe1 の機能低下機序であることが想定された。

実際に, アフリカツメカエル卵母細胞発現系を用いた two-electrode voltage clamp 法による機能解析法を行ったところ, R881S 変異体は機能活性を完全に欠失していることが証明された (Fig. 5)。

過去の患者報告例の機能活性測定では, おおよそ 50 ~ 60% 未満で疾患が発症する傾向にある。患者報告例は血中重炭酸濃度の低下に起因する重篤なアシドーシスや血圧変化といった腎 Na 輸送機能由来の症状のみならず, 腎外症状として, 脳・消化管・骨・精神発達遅滞などの幅広い症状を呈することが特徴である。R881S 変異体の発見により, 腎尿細管 Na 輸送体の血圧に及ぼす影響を知り, 更には多様な臓器の障害メカニズムの解明につながる事が示された。

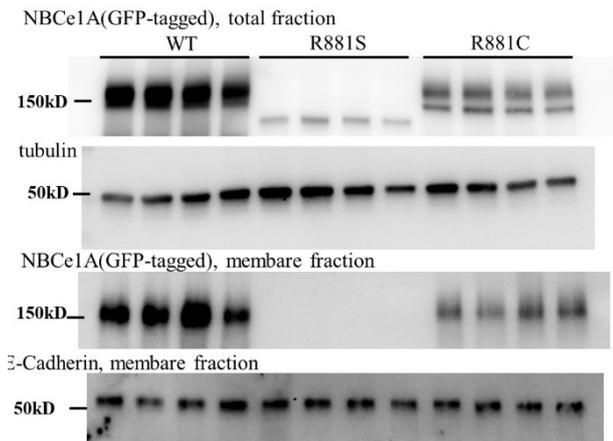


Fig. 1

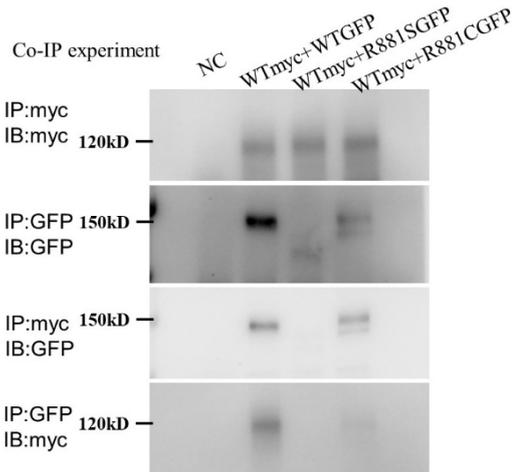


Fig. 4

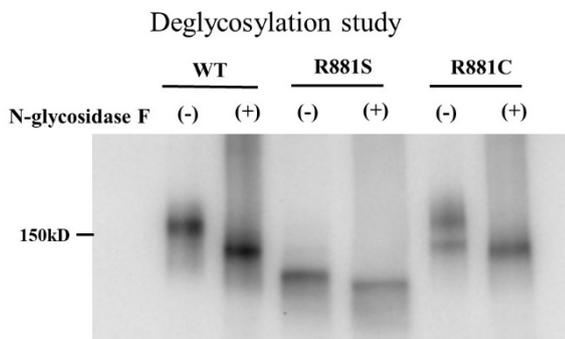


Fig. 2

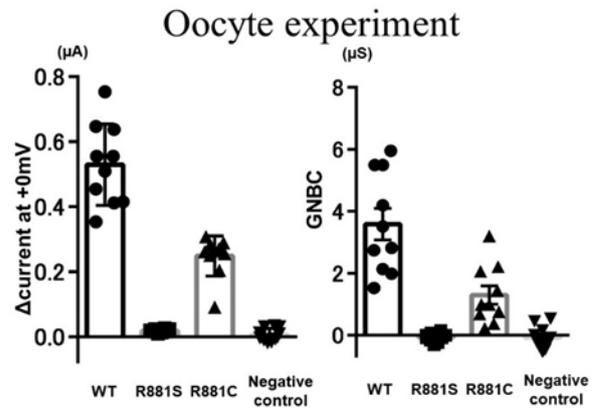


Fig. 5

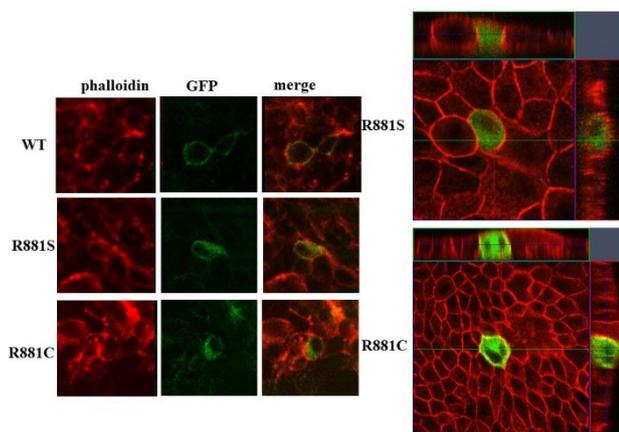


Fig. 3

### 3. 2 ULK1-レニンアンジオテンシン-アルドステロン (Aldosterone: Aldo)-ミネラルコルチコイド受容体 (Mineralocorticoid receptor: MR) のシグナルカスケードを最終規定する MR の治療反応性の予測 (topology 解析)

ULK1 カスケードの下流には MR が配置されており, MR の不適切な活性化により重篤な高血圧が発症する。そのため, MRの活性化を惹起するメカニズムが高血圧の最終規定因子と想定された。

以前我々は S843 部位が MR の不適切な活性化に寄与すると報告したが<sup>8)</sup>, S843 や重篤な高血圧を発症する遺伝家系 S810L<sup>10)</sup>を含む部位は Aldo の LBD に属している。すなわち MR の不適切な活性化を惹起する部位は LBD にあると考えられる (Fig. 6)。

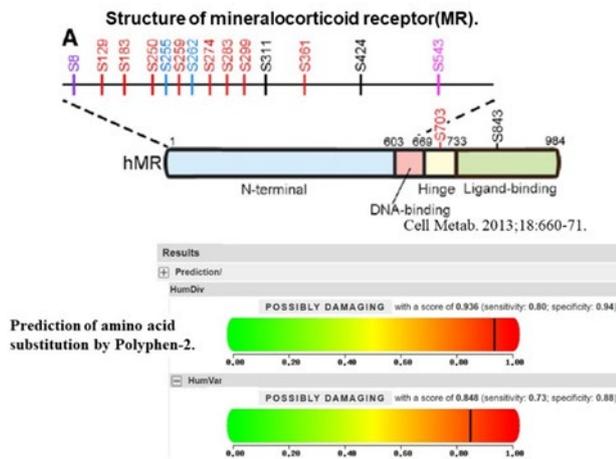


Fig. 6

また、つい最近報告された研究報告では、*in vitro* 系での ULK1 阻害薬の投与が MR の不適切な活性を助長する、という研究結果を Luciferase assay を用いて明らかにした<sup>11)</sup>。この結果は我々の仮説を強く支持するものであり、同手法を参考にしながら MR の SNV の機能特性を調べる意義があるものと考えた。

そこで、LBD 領域に報告されている SNV を抽出し、さらに機能変化予測ソフト Polyphen-2 を用いる事で、より効率的に機能変化を生じうる SNV を 50 個以上抽出することができた。Mutagenesis により各 SNV を有する MR の construct 作成を終えた段階であり、今後我々の既報の通り、Luciferase assay を行う事で、SNV の MR 活性への影響、ULK1 シグナリングにどのように影響を及ぼすかを評価する予定である。また MR の活性化と加齢に伴う高血圧との関連を検討するため、公共データを用いた検討も実施する予定としている。

### 3.3 ULK1-KO マウスの表現型解析および腎 Na 輸送体解析

本研究に先立ち樹立した ULK1-KO マウスは、胎生致死はせずに成熟し、成熟個体で比較ができる状態であった。しかしながら、ホモ個体においては繁殖能力が著しく低く、かつ昨今の人件費・資材の高騰もあり受託飼育先の再選定などのプロセスも必要であったため、研究に必要な個体を得るために時間を要している。現在では繁殖委託先への移行も終了し、繁殖計画を見直すことでこの問題は解決しつつあり、今後対象マウスの成熟を待って実験を実施する予定である。

## 4. 考察

### 4.1 NBCe1 変異体 SNV である R881S の及ぼすインパクト

腎臓の尿細管 Na 輸送体は多種多様に局在しながら統合的に制御され、腎からの Na 排泄を制御していると考えられる。

高血圧に起因する死亡数は常に死亡原因の上位であるが、いまだ制圧できていない。その理由として高血圧の発症に SNV 要素の蓄積が含まれていることが想定されている。ゲノムワイド関連解析では SNV の蓄積が高血圧を悪化させることが次々と明らかになっている<sup>12)</sup>。更には SNV の蓄積による心血管リスクは家族歴をも凌駕するという報告もあり<sup>13)</sup>、SNV の血圧に及ぼす影響は無視できないものとなっている。

実際、過去に研究者が報告してきた NBCe1 の機能変化型 SNV (K558R) は、最大 1.4% の保有率となる。常染色体潜性(劣性)遺伝形式であることを考えると、おおよそ 1 万人に 2 人の患者が理論上存在することとなる。この頻度は、腎臓領域の最大の遺伝病である多発性嚢胞腎(おおよそ 1~4 万人に 1 人の発症確率)、更には欧米では出生前遺伝スクリーニングを行う事で知られている嚢胞性線維症(欧米ではおおよそ 3000 人に 1 人の発症確率)にも迫る疾患発現頻度である。

R881S 頻度については現時点で頻度報告がされていないが、上記内容は NBCe1 の SNV 変異の及ぼす潜在的影響が高いことを示唆する。

また R881S 変異の特筆すべき特徴として、蛋白発現量のみならず、質量低下作用を併せ持つことが挙げられる。転写・翻訳の後に作られた NBCe1 蛋白は、膜発現に至るまでに多段階での修飾を受ける。この時に糖鎖が付加されることによって蛋白質量が増加する「糖鎖修飾」が行われる。糖鎖修飾障害のメカニズムを詳細に調べることが、今後の正常膜発現・輸送機能改善につながる可能性が示唆された。

R881 部位は、研究者がかつて所属していた研究室で報告した、患者報告例の R881C 変異体と同一部位である。一方で、R881C 変異体は機能活性がおおよそ 30-40% 保有され、部分的に膜発現するのに対し、R881S は完全に欠損している。一塩基の違い(C:システイン→S:セリン)にも関わらず、機能活性が完全に欠失するという点で、

R881 部位が輸送能に大きなインパクトを与える制御部位であることが示唆される。

#### 4. 2 MR の SNV が高血圧制御に関わる期待

ULK1 の下流に位置する MR は高血圧に深くかかわり、我々は過去に MR を介した高血圧惹起のメカニズムを「MR 関連高血圧」と定義し数々の報告を行ってきた。高血圧の発症には先天性・後天性などの数多くの要因が複雑に絡み合い、個人差も多いことが知られている。一方で、遺伝子レベルでの個人差を規定する因子として SNV が注目され、MR 関連高血圧における疾患の重篤化に寄与している可能性があると考えた。

今回同定した Aldo との結合ポケットを中心に 50 個以上の SNV が候補として抽出できた。

同 SNV 群が MR 関連高血圧の重篤化、更には加齢による重篤化に寄与する可能性が高いと考えられた。

#### 5. 今後の課題

NBCe1 の SNV 変異体や MR の SNV 変異体は、それぞれに Na 輸送能を変化させる規定因子であるが、腎臓における Na 輸送体は多種多様に局在しており、他の Na 輸送体との関連については検討すべき余地があると考ええる。

実際に他の Na を直接/間接的に輸送する輸送体、具体的には Na-Cl 共輸送体 (Na-Cl cotransporter: NCC)、Na-K-2Cl 共輸送体 (Na-K-2Cl cotransporter: NKCC2)、上皮性 Na チャネル (Epithelial Na Channel: ENaC)、カリウムチャネル (renal outer medulla K channel: ROMK) においては血圧の変化を生じる SNV が多数報告されている<sup>14)</sup>。同 SNV の蓄積効果が臨床面での高血圧発症にどれだけ結び付けられるかどうか、検討課題と言える。

また遺伝子変異の保有状態が、加齢による加速因子を経ることで、高血圧を惹起するかどうか、更には血管の

動脈硬化・心血管障害・脳血管障害といった実質臓器障害に影響を及ぼすかどうかについては、検討する必要があると考える。

実際に、老化抑制因子 FOXO3 (forkhead box O3) の variant が高血圧を軽減し脳梗塞発症を抑制するという報告<sup>15)</sup>、更には variant の存在が、特に女性において収縮期血圧を 6 mmHg 下げると報告<sup>16)</sup>もあり、高血圧と老化との間には SNV による遺伝要素が深くかかわっていると想定される。

今後 SNV の及ぼす老化と高血圧のメカニズムに、腎 Na 輸送体がどのように寄与していくのかを検証していきたい。

#### 6. 文献

1. NIPPON DATA 80/90/2010/2020 平成 30 年度総括・分担研究報告書
2. Int J Mol Sci. 2020;21(15):5358.
3. Pflugers Arch. 2011;461(2):249-59.
4. Pflugers Arch. 2013;465(9):1281-91.
5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(3):E329-37.
6. Sci Signal. 2018;11(554):eaat5018.
7. Cell Metab. 2013;18(5):660-71.
8. Cell Rep. 2018;24(3):569-576.
9. J Clin Invest . 2020 Sep 1;130(9):5011-5026.
10. Science. 2000 Jul 7;289(5476):119-23
11. Endocrinology. 2024;165(4):bqae015
12. Nat Genet 2018; 50, 1412-24.
13. Eur Heart J. 2016;37:561-7.
14. Bioscience Reports (2022) ;42 :BSR20220977.
15. J Hypertens. 2024;42(3):484-489.
16. Am J Hypertens. 2016;29(11):1292-1300..

## Mechanism of Developing Hypertension with Longevity via Renal Sodium Transporters.

Osamu Yamazaki

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine

### Summary

**Introduction:** Hypertension is a common disease with more than 20 million patients throughout Japan. The number of hypertensive patients increases with age, and salt sensitivity. Furthermore, salt sensitivity and aging are expected to exacerbate hypertension mutually. We focused on the renal tubular sodium (Na) transporter NBCe1 and demonstrated the magnitude of sodium handling with mutations in NBCe1 using functional analysis techniques. We also focused on the regulatory mechanisms of hypertension via mineralocorticoid receptor (MR), located in the distal tubular and collecting duct. The purpose of this study is to elucidate the integrated regulatory mechanism of the Na transport system in the kidney tubule and its relationship between hypertension and aging.

**Methods:** 1) Novel identified novel single nucleotide variant (SNV) of NBCe1: We surveyed the transmembrane domain of Na transporter NBCe1, using the Polyphen-2 prediction tool. 2) Identified SNVs on MR: We hypothesized that the Ligand Binding Domain (LBD) at the C-terminus of MR is an important site for binding Aldo. We searched SNVs in MR that induce potent sodium reabsorption. 3) Generation of ULK1 knockout (KO) mice: ULK1-KO mice are considered an autophagy-impaired model, leading to accelerated hypertension and aging.

**Results:** 1) We newly identified a novel loss-of-function SNV, R881S, located in transmembrane 12. R881S SNV was distributed only in the cytosol and lacked a dominant negative effect. Functional analysis using the two-electrode voltage clamp method showed that R881S transport activity was completely abolished. 2) We identified approximately 50 SNVs in the LBD area, potentially regulating the blood pressure system. 3) The amount of ULK1 protein decreased with aging in ULK1-KO mice, suggesting that ULK1 is an important factor in the regulation of aging.

**Discussion:** These findings support that the Na transport system contributes to hypertension. We need to investigate the relationship between SNVs and hypertension accelerated by aging.