

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20861

研究課題名（和文）腎老化病態におけるATRAPと新規老化関連因子Glutaminaseの関連性の究明

研究課題名（英文）Investigation of the association of glutaminase, a novel aging-related factor, with ATRAP in renal senescence

研究代表者

浦手 進吾 (URATE, Shingo)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90963455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞と生体レベルで加齢性腎障害における1型アンジオテンシンII受容体(AT1R)結合タンパク質(AT1R-associated protein: ATRAP)とGlutaminase(GLS)の関連性および病態生理学的意義を究明する。まず我々はATRAPとグルタミン代謝の関連性に焦点を当てた。免疫沈降法を用いて、細胞レベルでATRAPとグルタミントランスポーターの分子的相互作用について検証を行い、さらにATRAP全身性高発現遺伝子改変マウスにおけるグルタミントランスポーター発現解析を行った。これらの結果からATRAPの抗老化作用の機序が徐々に明らかにされつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未曾有の高齢社会を経験している本邦において健康寿命延伸の関心は高く、特に加齢性腎障害の克服は抗加齢対策の要となりえる。これまでに当研究室はATRAP欠損が加齢性腎障害を促進させることを示し、ATRAPの抗老化作用の可能性を明らかにした。近年、GLSは新規老化関連因子として報告されている。本研究では、ATRAPとGLSの関連性を明らかにし、ATRAPの抗老化作用の機構を探求することが目的である。これまでに細胞と生体レベルでATRAPとGLSの関連性を示す結果が少しずつ明らかになりつつある。しかし、十分にその関連性を証明するためには今後も継続した研究の必要性がある。

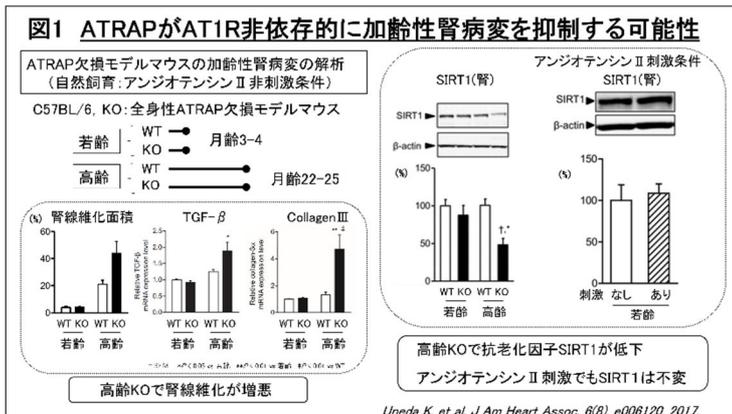
研究成果の概要（英文）：In this study, we investigate the relationship between AT1R-associated protein (ATRAP) and glutaminase (GLS) and its pathophysiological significance in age-related renal injury at the cellular and biological levels. First, we focused on the relationship between ATRAP and glutamine metabolism. Using immunoprecipitation assays, we examined the molecular interaction between ATRAP and glutamine transporters at the cellular level, and analyzed the expression of glutamine transporters in ATRAP systemically overexpressing transgenic mice. These results are gradually clarifying the mechanism of anti-aging effects of ATRAP.

研究分野：腎臓病

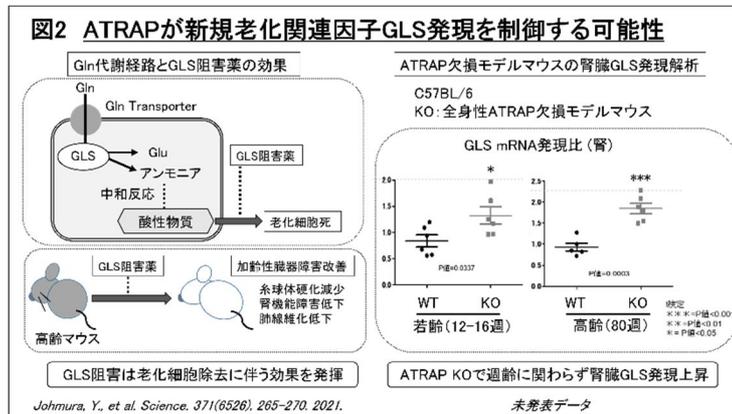
キーワード：老化 CKD

1. 研究開始当初の背景

1型アンジオテンシン II(Ang II)受容体(AT1R)結合タンパク質(AT1R-associated protein: ATRAP)は AT1R に直接結合し、細胞内取り込みを促進することで AT1R 情報伝達系の過剰活性化を抑制する。研究代表者の研究室では、長期飼育した全身性 ATRAP 欠損マウスは、野生型マウスと比較し、腎臓 Sirtuin1(SIRT1)発現の低下とともに腎機能低下、腎線維化および酸化ストレスが増悪することを明らかにした(Uneda K, et al. J Am Heart Assoc. 2017; 6(8): e006120)。一方で、Ang II 負荷した若年 ATRAP 欠損モデルマウスでは腎臓 SIRT1 発現は低下しなかったことから、ATRAP 欠損モデルマウスにおける加齢性腎障害の促進は AT1R 非依存的な作用と考えられた(図1)。しかし、その詳細な機序は依然として不明である。



近年、老化関連因子として Glutaminase (GLS) が報告された (Johmura Y, et al. Science. 2021; 371(6526): 265-270)。GLS は Glutamine (Gln) を基質とし、Gln を Glutamate (Glu) へ変換する酵素である。GLS 発現が増加すると、Glu と副産物としてアンモニア、グルタミン酸、β-ケトグルタル酸も増加し、細胞内のさまざまな生化学反応に影響を与える。腎臓を含めた加齢性臓器障害において、不可逆的に増殖停止した細胞(老化細胞)の蓄積が関与する。その老化細胞が除去されずに蓄積する機序として、老化細胞のリソソーム障害による酸性物質蓄積に対して、GLS 発現上昇を契機としたアンモニア産生増加による中和反応が寄与することが明らかになった(図2)。



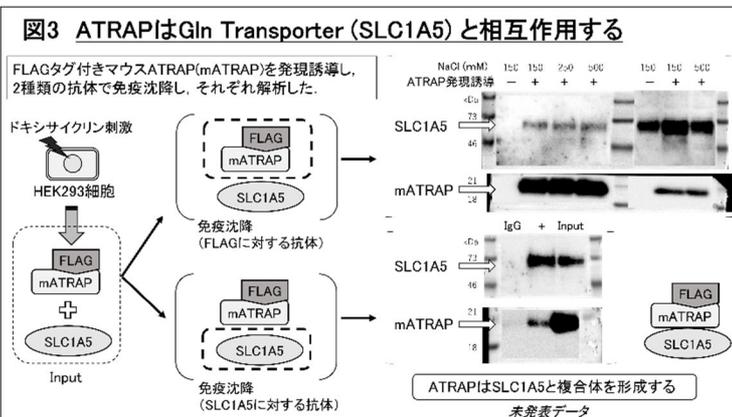
予備的研究で ATRAP 欠損モデルマウスの若年と高齢個体で腎臓 GLS の mRNA 発現が上昇することを見出した(未発表, 図2)。この結果は ATRAP 欠損が GLS 発現上昇を介して老化細胞蓄積を促進する可能性を示唆する。そこで、本研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、「加齢性腎障害における ATRAP の AT1R 非依存的な作用とはどのような機序か。ATRAP は GLS 発現制御を介して加齢性腎障害の発症・進展に関与するか。ATRAP 発現を調節することで加齢性腎障害を制御できるか」である。

2. 研究の目的

これまでの予備的研究で、ATRAP と GLS の関連性が加齢性腎障害をより高度にする機序である可能性を見出した。この結果を基礎として、本研究は、細胞と生体レベルで加齢性腎障害における ATRAP の病態生理学的意義を GLS 機能に着目して解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ATRAP 相互作用タンパク質として3種類の Gln Transporter を同定したことに続き、その相



相互作用の証明とともに、ATRAP と Gln Transporter が相互作用する領域の同定を試みる(図 3)。

さらに、生体レベルにおいても ATRAP 発現変動に伴い Gln Transporter の発現量がどのように変化するかを検証し、また ATRAP 発現変動に伴い細胞内への Gln 取り込み量が変動するかを検証するために、ATRAP 欠損モデルマウスの若年と高齢個体の腎臓検体をメタボローム解析し、Gln を含めた細胞内代謝産物を網羅的に定量する。

4. 研究成果

我々は ATRAP と Glutaminase(GLS)の関連性を明らかにする過程のまず初めに、ATRA と Gln 代謝の関連性に焦点を当て、その中でも特に ATRAP と Gln Transporter の相互作用について解析を進めた。ヒト近位尿細管細胞において免疫沈降法を用いて ATRAP 複合体を抽出し、質量分析で解析することで ATRAP の相互作用タンパク質として 377 種を同定し、その中から Gln Transporter 3 種類を同定した。それぞれの Gln transporter について細胞レベルで分子的相互作用について免疫沈降法を用いて検証を行い、ATRAP とそれら Gln Transporter における相互作用を見出した。引き続き、相互作用領域の同定を試みる。

さらに ATRAP 全身性高発現遺伝子改変マウスの腎臓において、これら Gln Transporter の発現上昇を明らかにし、生体レベルにおいても同様の分子的相互作用の兆候を見出した。今後は、機能的相互作用について解析を開始し、細胞レベルで ATRAP 発現変動条件下における Gln 代謝構成物質の生成量がどのように変化するかを引き続き検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Shohei, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Tsukamoto Shunichiro, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Taguchi Shinya, Yamada Takayuki, Kobayashi Ryu, Kanaoka Tomohiko, Kamimura Daisuke, Kinguchi Sho, Takiguchi Masahito, Funakoshi Kengo, Yamashita Akio, Ishigami Tomoaki, Tamura Kouichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of a High-Protein Diet on Kidney Injury under Conditions of Non-CKD or CKD in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7778 ~ 7778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24097778	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Shunichiro, Wakui Hiromichi, Uehara Tatsuki, Shiba Yuka, Azushima Kengo, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Hirota Keigo, Urate Shingo, Suzuki Toru, Yamada Takayuki, Kinguchi Sho, Yamashita Akio, Tamura Kouichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Combination of sacubitril/valsartan and blockade of the PI3K pathway enhanced kidney protection in a mouse model of cardiorenal syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Heart Journal Open	6. 最初と最後の頁 ead098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ehjopen/ead098	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 翔平, 涌井 広道, 大上 尚仁, 浦手 進吾, 小林 竜, 小豆島 健護, 田村 功一
2. 発表標題 高蛋白食が腎臓に与える影響についての5/6腎摘CKDモデルマウスを用いての検討
3. 学会等名 第45回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上原 立己, 浦手 進吾, 涌井 広道, 田村 功一
2. 発表標題 AT1受容体結合因子の発現増強はアリストロキア酸腎症モデルマウスにおける腎臓の炎症を抑制する
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 翔平, 涌井 広道, 大上 尚仁, 浦手 進吾, 小林 竜, 小豆島 健護, 田村 功一
2. 発表標題 5/6腎摘CKDモデルマウスにおいて, 高蛋白食負荷が糸球体障害と尿細管障害へ及ぼす影響について
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関