

# 論文の内容の要旨

論文題目 NUAK1 の生理機能解析

氏 名 稲塚 歩佳

## 【序論】

NUAK family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) は、AMPK 関連キナーゼファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである。in vitro の解析において NUAK1 は LKB によってリン酸化され活性化されることが示されている。生体において NUAK1 は、マウス胚発生における腹側体壁形成に不可欠であることが示されているが、NUAK1 ノックアウトマウスが胎生致死になるため NUAK1 の生理機能はほとんど明らかにされていない。

骨格筋のグルコース取り込みを促進する生理的刺激は筋収縮とインスリンである。筋収縮刺激によるグルコース取り込みに、LKB1 が AMPK $\alpha$ 2 や NUAK2 を介して寄与することが示されている。一方、筋特異的 LKB1 ノックアウトマウスは、骨格筋におけるインスリン感受性の増加とグルコース恒常性の改善を示したことから、全身性のグルコース代謝に対し、骨格筋の LKB1 は抑制的に働くことが示唆されている。この際に LKB1 の下流を担う AMPK 関連キナーゼは不明である。

本研究の目的は、成体組織における NUAK1 の生理機能を解明することである。このため、NUAK1 の組織分布を明らかにし、筋特異的 NUAK1 ノックアウト (muscle-specific NUAK1 knockout、MNUAK1KO) マウスを作出した。表現型解析として、骨格筋の形態、全身性のグルコース恒常性、および骨格筋のグルコース代謝を調べた。観察された表現型の分子機序を明らかにするため、骨格筋の定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。

## 【結果と考察】

### 1. NUAK1 は酸化的リン酸化能の高い組織に選択的に発現している。

ヒトと同様に Nuak1 mRNA は大脳と心臓で高発現していた。それに加え NUAK1 が骨格筋の一種であるヒラメ筋においても高発現していることを見出した。NUAK1 の筋種別発現パターンは蛋白質レベルでも確認された。NUAK2 は骨格筋ではほとんど検出されなかった。

ヒラメ筋は、ミトコンドリア密度が高く酸化的リン酸化の盛んな I 型および IIA 型筋繊維から成る。脳と心臓における高発現を考慮すると、NUAK1 は酸化的リン酸化能の高い組織に選択的に発現することが示唆された。筋特異的 NUAK1 ノックアウトマウスを作出することによって、NUAK2 による代償を懸念することなく、骨格筋における NUAK1 の機能を解析できると考えた。

### 2. MNUAK1KO マウスは、高脂肪食負荷によって引き起こされる耐糖能異常に耐性を示す。

MNUAK1KO マウスの表現型解析として、初めに体重、筋重量、筋繊維径、および筋繊維組成を調べたが、MNUAK1KO マウスと対照マウスとの間に差異は認められなかった。次にグルコース恒常性を調べた。通常食では MNUAK1KO マウスと対照マウスとの間に差異は認められなかったが、高脂肪食誘導性の高血糖が、MNUAK1KO マウスでは、対照マウスに比べて有意に抑制されていた。経口グルコース負荷試験とインスリン負荷試験においても MNUAK1KO マウスは対照マウスに比べ有意に低い血糖値を示した (図 1A、1B)。これらのグルコース恒常性の改善と一致して、MNUAK1KO マウスは対照マウスに比べて、血漿遊離脂肪酸濃度の有意な低下や、高インスリン血症が抑制される傾向を示した。

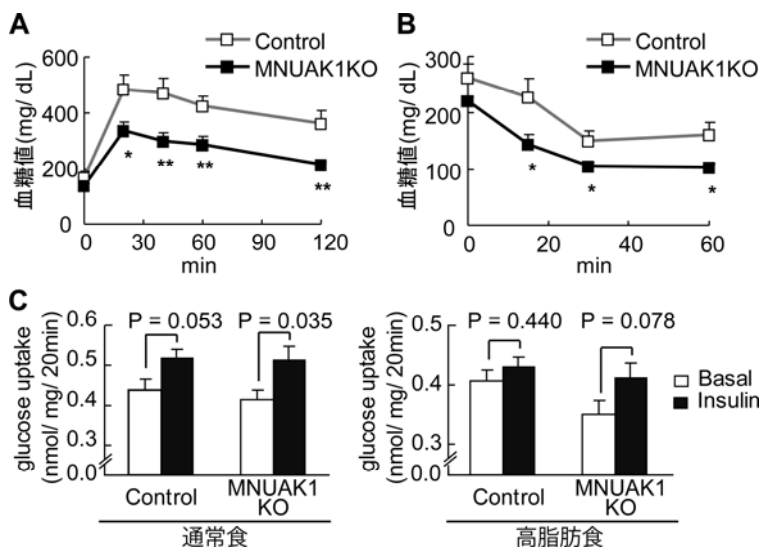


図 1. MNUAK1KO マウスにおけるグルコース代謝の変化

**A.** 経口グルコース負荷試験。高脂肪食負荷したマウスを 15 時間絶食させた後、グルコースを経口投与し、血糖値の推移を調べた。Mean + SEM, n = 12. **B.** インスリン負荷試験。高脂肪食負荷したマウスを 2 時間絶食させた後、インスリンを腹腔内投与し、血糖値の推移を調べた。Mean + SEM, n = 8. **C.** 単離ヒラメ筋におけるインスリン誘導性のグルコース取り込み量。単離したヒラメ筋を、インスリン非存在下 (Basal) または存在下 (Insulin) で培養し、20 分間の 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose 取り込み量を測定した。Mean + SEM, n = 7 (通常食) または n = 8 (高脂肪食)。\*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01 (Student's

MNUAK1KO マウスと対照マウスとの間で摂食量に差異が認められなかったことから、MNUAK1KO マウスにおける全身性のグルコース恒常性の改善は、NUAK1 を欠失した骨格筋に起因していると推測し、単離したヒラメ筋のグルコース取り込み能とグリコーゲン濃度を調べた。通常食群では、MNUAK1KO マウスと対照マウスのヒラメ筋のいずれもインスリン刺激によるグルコース取り込みを

示した (図 1C 左)。高脂肪食群では、対照マウスのヒラメ筋でインスリン感受性が減弱していたのに対し、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では、通常食群と同様にインスリン刺激によるグルコース取り込み能が維持されていた (図 1C 右)。また、グリコーゲン濃度は、通常食、高脂肪食いずれの条件においても MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では対照マウスのヒラメ筋に比べ有意に高かった。

以上から、骨格筋における NUA1 の欠失は、高脂肪食負荷による骨格筋のインスリン耐性を抑制し、グルコースの取り込みとグリコーゲンの貯蔵を促進することによって全身性のグルコース恒常性を改善することが示唆された。

### 3. MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では、TBC1D4 のリン酸化レベルが上昇している。

骨格筋のグルコース取り込みは、GLUT4 の発現量やその細胞膜への移行に大きく依存する。GLUT4 の細胞膜移行は、リン酸化 TBC1D4 によって促進される。MNUAK1KO マウスの骨格筋におけるグルコース代謝促進の分子機構を明らかにするため、ヒラメ筋における GLUT4 の蛋白質レベルと、グルコース投与後の TBC1D4 のリン酸化レベルを調べた。グルコース投与後、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋は対照マウスのヒラメ筋に比べ、TBC1D4 Thr-649 のリン酸化レベルが有意に高かった。GLUT4 の蛋白質レベルに関して、MNUAK1KO マウスと対照マウスの間に差は認められなかった。

以上から、NUAK1 を欠失したヒラメ筋では、食後高血糖に応答した GLUT4 の細胞膜移行シグナルが増強されることが示唆された。

### 4. MNUAK1KO マウスのヒラメ筋ではインスリンシグナルのネガティブフィードバックが抑制されている。

NUAK1 の欠失による蛋白質リン酸化レベルの変化を網羅的に検出するため、高脂肪食負荷した MNUAK1KO マウスと対照マウスのヒラメ筋を摘出し、定量的リン酸化プロテオーム解析を行った。実験は各 4 回行い、MNUAK1KO マウスと対照マウスの差が全ての実験で 1.5 倍以上かつ平均で 2 倍以上のリン酸化ペプチドを NUA1 の欠失によって変動したリン酸化ペプチドとして選別した。

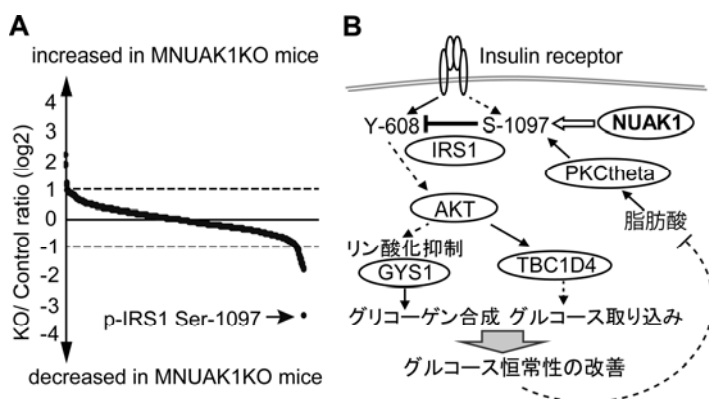


図 2. MNUAK1KO マウスヒラメ筋における網羅的蛋白質リン酸化レベルの変化

A. マウスヒラメ筋のリン酸化プロテオーム解析結果。定量的に検出された 1229 個のリン酸化ペプチドの KO/control 比を黒いドットで示した (mean, n=4)。点線より外側のリン酸化ペプチドを NUA1 の欠失によって変動したリン酸化ペプチドとして選別した。B. MNUAK1KO マウスのヒラメ筋で予想されるインスリンシグナル制御。実線：直接的作用、点線：間接的作用、白矢印：未確認の相互作用。

定量的に検出された 1229 個のリン酸化ペプチドのうちリン酸化レベルが最も大きく変化したのは、IRS1 の Ser-1097 で、KO/control 比は  $0.10 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  SEM) であった (図 2A)。これに加え、グルコース代謝に関与する蛋白質では、IRS1 Ser-1097 を標的とする PKCtheta の Ser-676 および、GYS1

の Ser-653/657 においてリン酸化レベルの低下が認められた。

IRS1 Ser-1097 のリン酸化は IRS1 のチロシンリン酸化を阻害するため、PKC $\theta$ →IRS1 Ser-1097 経路は、インスリンシグナルのネガティブフィードバック経路として知られている。また GYS1 は、インスリンシグナルによって Ser-653 を含む複数の Ser 残基のリン酸化が抑制されることによって活性化される。したがって、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋におけるこれらの部位のリン酸化レベルの減少は、インスリンシグナルを増強し、グルコース取り込みとグリコーゲン合成を促進したと考えられる (図 2B)。

#### 5. MNUAK1KO マウスのヒラメ筋ではインスリンシグナルが増強されている。

リン酸化プロテオームによって示唆された NUA1 欠失によるインスリンシグナルの増強を検証するため、高脂肪食負荷したマウスを絶食後、グルコースまたはインスリンを投与し、ヒラメ筋における IRS1 Tyr-608 とその下流の AKT Thr-308 のリン酸化レベルをイムノブロットによって調べた。グルコース投与後、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では対照マウスのヒラメ筋に比べ、IRS1 Tyr-608 と AKT Thr-308 のリン酸化レベルが有意に高かった。またインスリン投与後、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では対照マウスのヒラメ筋に比べ AKT Thr-308 のリン酸化レベルが有意に高かった。さらに、絶食条件において、MNUAK1KO マウスのヒラメ筋では対照マウスのヒラメ筋に比べ、AKT のリン酸化レベルが有意に低かった。

絶食条件の骨格筋における AKT リン酸化レベルの増加は、高脂肪食負荷によるインスリン耐性の特徴とされている。以上から、MNUAK1KO マウスでは、インスリン耐性が抑制され、インスリンシグナルが増強されていることが示された。

#### 【結論】

NUAK1 は、脳、心臓、ヒラメ筋などの酸化的リン酸化能の高い組織に選択的に発現していた。筋特異的 NUA1 欠失は、高脂肪食負荷による骨格筋のインスリン耐性を抑制し、グルコース取り込みを促進することによって、全身性のグルコース恒常性を改善した。これらの表現型は、筋肉特異的 LKB1 ノックアウトマウスの表現型と多くの点で一致することから、骨格筋における NUA1 の上流キナーゼは LKB1 であることが示唆される。定量的リン酸化プロテオーム解析の結果、NUAK1 の欠失によって IRS1 Ser-1097 のリン酸化レベルが際立って減少していたことから、NUAK1 が IRS1 Ser-1097 を基質としてインスリンシグナルのネガティブフィードバック調節に寄与している可能性が示唆された。IRS1 Ser-1097 の上流分子である PKC $\theta$  のリン酸化レベルの減少は、MNUAK1KO マウスにおける血漿遊離脂肪酸の減少を反映していると解釈できる。NUAK1 の生理的機能は、ヒラメ筋など酸化的リン酸化能の高い筋肉において、インスリンシグナルを負に制御することによってグルコースの取り込みを抑制することであると考えられる。