

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 安部えりこ

横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻分子生物学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	循環制御医学	教授	石川	義弘
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	泌尿器科学	教授	榎山	和秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	実験動物医学	准教授	中澤	正年

博士の学位論文審査結果の要旨

Angiotensin II type-1 receptor-associated protein (ATRAP) promotes internalization of transferrin receptor-1 (TfR1).

AT1受容体関連タンパク質 (ATRAP)によるトランスフェリン受容体1 (TfR1) の細胞内在化促進

学位論文の審査にあたり、審査冒頭で申請者から以下のように学位研究の要旨が説明された。

【論文内容の要旨】

慢性腎臓病の患者数は増加の一途をたどっている。腎線維化は慢性腎臓病へ至る共通経路であり、腎線維化の程度は腎機能と相関している。しかしそのメカニズムはまだ不明な点が多い。我々はレニン-アンジオテンシン系に關与するAngiotensin II type 1 receptor (AT1R) に結合し、その内在化を促進する事でAngiotensin IIによるAT1Rの過剰な病的活性化を抑制するATRAPを同定し、解析を行ってきた。また我々はATRAP全身性ノックアウトが、野生型マウスと比較して、加齢に伴う酸化ストレスの蓄積と腎線維化の増悪を生じることが報告されている。これらの現象はAngiotensin II-AT1R経路に依存しない可能性が示唆されているが、その分子的機序は明らかでない。そこでATRAPの新たな分子機能の解明を行うことを目的とし、ATRAPの新規結合タンパク質を解析した。Flag-ATRAP発現誘導可能なHEK293細胞を構築し、Flag-ATRAP複合体を免疫沈降した。その複合体について質量分析を施行した結果、376個のATRAP複合体構成タンパク質候補を同定した。そのタンパク質候補は細胞内輸送に関わる分子が多いことがわかり、またTfR1を含む膜受容体が複数同定された。TfR1は鉄取り込みを介して酸化ストレス蓄積、さらには腎線維化に関わる。そこで本研究ではTfR1に着目し、培養細胞やマウスの腎組織においてATRAPとTfR1が分子的に相互作用することを確認した。次に、ATRAP発現誘導時に細胞全体でのTfR1の発現量が変動しない一方、細胞膜におけるTfR1発現が減少することを生化学的な細胞膜分画法や蛍光染色法を用いて明らかにした。さらにATRAP発現誘導により、細胞内鉄量の低下と酸化ストレスシグナルの一つであるNRF2, HO-1発現が低下することを明らかにした。本研究ではATRAPとTfR1の相互作用を発見し、ATRAPがTfR1の膜局在制御を介しその機能を抑制する事を明らかにした。これにより、ATRAPが細胞内鉄濃度を抑制し、その結果、酸化ストレスシグナルを抑制していることが示唆された。さらに本研究では、ATRAP複合体構成因子として、TfR1以外にも酸化ストレス制御に関わる膜分子を複数同定している。今後、ATRAPによる酸化ストレス制御の全容を明

らかにすることで、慢性腎臓病の発症のメカニズム解明につなげていく事が出来ると考えている。

以上の学位研究の要旨の説明に続いて、以下の質疑応答がなされた。

中澤副査の意見及び質疑応答の概要

1. ATRAP過剰発現はどの程度なのか。

申請者応答：ヒト培養細胞にマウス配列のATRAPを発現させているため内在性より何倍誘導されたか比較できないが、薬剤で最大限発現誘導できる条件で行った。

2. ATRAP発現誘導をしてTfR1発現量自体に変化はあったか。

申請者応答：ATRAP発現誘導時も細胞全体におけるTfR1の発現量（タンパク, mRNA）はコントロールと変化は見られなかった。

3. ATRAP発現誘導での鉄取り込みは低下したが、ATRAPノックアウトした場合はどうか。

申請者応答：HEK293を用いてATRAPをノックダウンした場合にコントロールと比較して細胞内鉄量が増加した。しかし腎線維化増悪を認めた高齢ATRAPノックアウトマウスにおいての鉄量は検証できていない。

槇山副査の意見及び質疑応答の概要

1. 研究の立案, 実験へ申請者がどの程度関わったか。

申請者応答：研究立案に十分関与し、実験の施行に関してほとんど申請者が行ったことを説明した。

2. レニンアンジオテンシン（RA）系阻害薬はすでに存在しておりATRAPはそれを超える役割が期待できるのか。

申請者応答：RA系阻害薬はRA系の生理的な機能も阻害してしまい、腎障害や電解質異常、低血圧などの副作用が出現することがあり、治療の制約となっている。一方でATRAPはAT1Rの生理的シグナルには悪影響を与えずにRA系過剰活性化を選択的に抑制できる。さらにATRAPはAT1RだけではなくTfR1などとも相互作用することが本研究で明らかとなり、さらなる効果も期待できるのではないかと考えている。

3. ATRAPの生体内での発現について

申請者応答：ATRAPは腎臓, 心臓, 脂肪細胞などさまざまな組織に発現している. 特に腎臓に多く発現しており, その中では糸球体には少なく, 尿細管には広く存在している.

4. ATRAPを薬にするとしたら, ATRAPそのものを投与するのか, もしくはATRAP発現増加物質をいれるのか.

申請者応答：現在, ATRAP活性化薬の創薬を目標に, ATRAP発現を増加させる低分子化合物の探索をしているところである.

5. ATRAP結合タンパク質としてTfR1以外にも同定されているが, 今後解析していきたい分子はあるか.

申請者応答：酸化ストレス制御に関与するグルタミントランスポーターも複数同定されており, 解析を進めているところである.

石川主査の意見及び質疑応答の概要

1. 高齢ATRAP-KOマウスでみられた腎線維化増悪は, AT1R非依存的といってよいのか.

申請者応答：Angiotensin II 刺激をしていないためAT1Rシグナルの過剰活性化には至っていないと考えている. しかしARBを加えた検討などはできていない.

石川主査からのコメント：GPCRを活性化するにはアゴニストは必要ないため別のメカニズムが存在しているのかもしれない.

2. 酸化ストレスを検証する場合には直接ROS測定する必要があるのではないか.

申請者応答：培養条件などによりROSは大きく変化する可能性があり, 酸化ストレスに感受性が高いとされているNRF2, HO-1を今回は用いた. 今後, ROS測定装置などで解析してみたいと考えている.

3. ATRAPがTfR1の局在はクラスリン系を制御すること考えているのか.

申請者応答：ATRAPはエンドサイトーシスよりはリサイクリングに関与しているのではないかと考えているが, TfR1も主にはクラスリン依存性にエンドサイトーシスされることや本研究においてATRAP複合体のGO解析でクラスリン依存性エンドサイトーシスがエンリッチしていたことから, クラスリン系なのではないかと考えている.

石川主査のコメント：AT1R含め, カベオリンとの関与も研究されているため今後の論文化

の際には参考にすると良いだろう。

以上の他にも質疑が行われたが、いずれも申請者から適切な回答が得られた。

発表内容ならびに質疑応答はいずれも適切なものであり、審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると判定された。