

学位論文の要旨

Angiotensin II type-1 receptor-associated protein
interacts with transferrin receptor-1
and promotes its internalization.
(AT1 受容体関連タンパク質はトランスフェリン受容体 1 と
相互作用し, その内在化を促進する)

March, 2023
(2023 年 3 月)

Eriko Abe
安部 えりこ

Department of Molecularbiology
Yokohama City University Graduate School of Medicine
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 分子生物学

(Doctoral Supervisor: Hidehisa Takahashi, Professor)

(指導教員: 高橋 秀尚 教授)

Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization.

(AT1 受容体関連タンパク質はトランスフェリン受容体 1 と相互作用し、その内在化を促進する)

<https://www.nature.com/articles/s41598-022-22343-5>

序論

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関与する Angiotensin II type 1 receptor (AT1 受容体) に結合し、その内在化を促進する事で Angiotensin II による AT1 受容体の過剰な病的活性化を抑制する Angiotensin II type 1 receptor associated protein (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ミトコンドリア機能障害を伴う腎線維化の増悪を生じることを報告している。これらの現象は Angiotensin II-AT1 受容体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 Angiotensin II-AT1 受容体経路以外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。その結果、376 個の候補タンパク質を同定し、その中にトランスフェリン受容体 1 (Transferrin receptor1: TfR1) が含まれていた。TfR1 は細胞内へ鉄を取り込む受容体であり、鉄は活性酸素を産生し、線維化に関与する。そこで ATRAP と TfR1 の相互作用を探ることで酸化ストレスや腎線維化に関わる ATRAP の未知の分子機構を解明することとした。

実験材料と方法

酸化ストレス制御に関わる ATRAP 結合タンパク質を同定するために、まず Flag タグ付きマウス ATRAP (F-mATRAP) をドキシサイクリン依存的に発現誘導可能な HEK293 細胞を構築した。次に、F-mATRAP 複合体を免疫沈降し、その複合体について質量分析を施行した。その結果得られた複合体構成タンパク質候補のうち TfR1 に着目し、分子的相互作用を免疫沈降法、ウエスタンブロット解析により検証した。次に、ATRAP 発現誘導による TfR1 タンパク質および mRNA 発現量、細胞内局在をウエスタンブロット解析、RT-qPCR 解析、免疫

蛍光染色解析を用いて解析した。また、ATRAP 発現誘導時が TfR1 の機能である鉄取り込みに影響するかを、細胞内鉄濃度を測定することで評価した。さらに、酸化ストレスシグナルへの影響を NRF2 タンパク質発現、その NRF2 が転写する HO-1 mRNA 発現の変化を解析することで評価した。

結果

ドキシサイクリン依存的に Flag タグ付き-マウス ATRAP (F-mATRAP) を発現誘導する HEK293 を樹立し、ドキシサイクリン依存的に適切に F-mATRAP 発現が誘導されることをウェスタンブロット解析、免疫蛍光染色で確認した。樹立した細胞を用いて F-mATRAP 複合体を精製し質量分析を行った結果、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 は酸化ストレスを伴う腎線維化に関わることが報告されているため、ATRAP と TfR1 の分子的相互作用を培養細胞やマウスの腎組織を用いて確認した。次に、ATRAP 発現の増強時により、細胞全体での TfR1 の発現が変動しない一方、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とした。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。

考察

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示唆された。これらの結果は培養細胞を用いたものであり、酸化ストレスを誘導する動物モデルなどを用いた個体レベルでの ATRAP-TfR1 経路の生理的意義の解析が今後の課題である。具体的には、ATRAP と TfR1 の直接相互作用の解析や、相互作用部位の同定など、より詳細な検討が必要である。

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。このように、ATRAP 分子機構を解明することで ATRAP が酸化ストレス、ミトコンドリア障害をとともなう加齢性腎線維化に関与するというこれまでの報告の分子メカニズムの解明につながると考える。

また、これまでに Angiotensin II-AT1 受容体経路における酸化ストレス誘導を ATRAP が抑制していることも明らかにしている。このように、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.

引用文献

Humphreys, BD. (2018), Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol*, 80, 309–26.

Jomova, K. & Valko, M. (2011), Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.

Kawabata, H. (2019), Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med*, 133, 46–54.

Tamura, K., Azushima, K., Kinguchi, S., Wakui, H. & Yamaji, T. (2022), ATRAP, a receptor-interacting modulator of kidney physiology, as a novel player in blood pressure and beyond. *Hypertens Res*, 45(1), 32–9.

Uneda, K., Wakui, H., Maeda, A., Azushima, K., Kobayashi, R., Haku, S., Ohki, K., Haruhara, K., Kinguchi, S., Matsuda, M., Ohsawa, M., Minegishi, S., Ishigami, T., Toya, Y., Atobe, Y., Yamashita, A., Umemura, S. & Tamura, K. (2017), Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. *J Am Heart Assoc*, 6(8).

Yasumura, S., Naito, Y., Okuno, K., Sawada, H., Asakura, M., Masuyama, T. & Ishihara, M. (2020), Effects of Heterozygous TfR1 (Transferrin Receptor 1) Deletion in Pathogenesis of Renal Fibrosis in Mice. *Hypertension*, 75(2), 413–21.

論文目録

I 主論文

Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization.

Abe, E., Yamashita, A., Hirota, K., Yamaji, T., Azushima, K., Urate, S., Suzuki, T., Tanaka, S., Taguchi, S., Tsukamoto, S., Uehara, T., Wakui, H., Tamura, K. & Takahashi, H.

Sci Rep. Vol.12, No.1, 17376, 2022.

II 参考論文

1. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein deficiency attenuates sirtuin1 expression in an immortalised human renal proximal tubule cell line.

Yamaji, T., Yamashita, A., Wakui, H., Azushima, K., Uneda, K., Fujikawa, Y., Haku, S., Kobayashi, R., Ohki, K., Haruhara, K., Kinguchi, S., Ishii, T., Yamada, T., Urate, S., Suzuki, T., Abe, E., Tanaka, S., Kamimura, D., Ishigami, T., Toya, Y., Takahashi, H. & Tamura, K.

Sci Rep. Vol.9, No.1, 16550, 2019.

2. Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice.

Urate, S., Wakui, H., Azushima, K., Yamaji, T., Suzuki, T., Abe, E., Tanaka, S., Taguchi, S., Tsukamoto, S., Kinguchi, S., Uneda, K., Kanaoka, T., Atobe, Y., Funakoshi, K., Yamashita, A. & Tamura, K.

Int J Mol Sci. Vol.22, No.22, 12432, 2021.

3. Cardiovascular and renal outcomes with SGLT-2 inhibitors versus GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: a systematic review and network meta-analysis.

Yamada, T., Wakabayashi, M., Bhalla, A., Chopra, N., Miyashita, H., Mikami, T., Ueyama, H., Fujisaki, T., Saigusa, Y., Yamaji, T., Azushima, K., Urate, S., Suzuki, T., Abe, E., Wakui, H. & Tamura, K.

Cardiovasc Diabetol. Vol.20, No.1, 14, 2021.

4. Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy.

Taguchi, S., Azushima, K., Yamaji, T., Urate, S., Suzuki, T., Abe, E., Tanaka,

S., Tsukamoto, S., Kamimura, D., Kinguchi, S., Yamashita, A., Wakui, H. & Tamura, K.

Sci Rep. Vol.11, No.1, 23587, 2021.

5. Systematic Review of the Association Between Worsening Renal Function and Mortality in Patients With Acute Decompensated Heart Failure.

Yamada, T., Ueyama, H., Chopra, N., Yamaji, T., Azushima, K., Kobayashi, R., Kinguchi, S., Urate, S., Suzuki, T., Abe, E., Saigusa, Y., Wakui, H., Partridge, P., Burger, A., Bravo, CA., Rodriguez, MA., Ivey-Miranda, J., Tamura, K., Testani, J. & Coca, S.

Kidney Int Rep. Vol.5, No.9, 1486-94, 2020.

6. Tissue-specific expression of the SARS-CoV-2 receptor, angiotensin-converting enzyme 2, in mouse models of chronic kidney disease.

Tsukamoto, S., Wakui, H., Azushima, K., Yamaji, T., Urate, S., Suzuki, T., Abe, E., Tanaka, S., Taguchi, S., Yamada, T., Kinguchi, S., Kamimura, D., Yamashita, A., Sano, D., Nakano, M., Hashimoto, T. & Tamura, K.

Sci Rep. Vol.11, No.1, 16843, 2021.

7. Tissue xanthine oxidoreductase activity in a mouse model of aristolochic acid nephropathy.

Ishii, T., Kumagae, T., Wakui, H., Urate, S., Tanaka, S., Abe, E., Suzuki, T., Yamaji, T., Kinguchi, S., Kobayashi, R., Haruhara, K., Nakamura, T., Kobayashi, S. & Tamura, K.

FEBS Open Bio. Vol.11, No.2, 507-18, 2021.