



Title	Biological function analysis of ATP6AP2/(pro)renin receptor in the retina [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	神田, 敦宏
Description	配架番号 : 1685
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6963号
Issue Date	2015-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60038
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Atsuhiro_Kanda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 神田 敦宏

学 位 論 文 題 名

ATP6AP2/（プロ）レニン受容体の網膜における生物学的機能解析
(Biological function analysis of ATP6AP2/(pro)renin receptor in the retina)

【背景と目的】レニン・アンジオテンシン系（RAS）は、生物が海から陸へと進化する過程で塩分と水分を体内に保持するために発達した循環ホルモンシステム（循環 RAS）であるが、臓器局所では細胞の分化・増殖など組織修復などの役割を担っている（組織 RAS）。我々はこれまでに組織 RAS および組織 RAS の上流に位置する（プロ）レニン受容体が、眼組織における炎症・血管新生の上流で網膜疾患の分子病態を制御していることを動物モデルで示し、受容体結合プロレニン系（receptor-associated prorenin system: RAPS）という新たな病態概念を提唱してきた。（プロ）レニン受容体によるこの 2 つの作用（組織 RAS の活性化および RAS 非依存性細胞内シグナル活性化）は眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められる。さらに近年、（プロ）レニン受容体は、その膜貫通領域断片が ATP 依存プロトンポンプ Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) のアダプタータンパク ATP6AP2 と同一分子であることが同定された。これにより（プロ）レニン受容体機能は、V-ATPase に関連した正常発生や炎症病態などに様々な作用を持つ Wnt シグナルにおいて、Wnt 受容体リン酸化に必須であることも明らかとなつて、V-ATPase に関連する多彩な生理的・病理的意義が ATP6AP2 [以下、(P)RR を ATP6AP2 と表記する]の機能とリンクしている可能性が指摘されていた。

これまでに我々は、ATP6AP2 が糖尿病網膜症における血管新生・炎症、つまり疾患の進行に関与する重要な分子であることを明らかにした。また最近、網脈絡膜疾患のみならず、結膜節外辺縁帯 B 細胞性リンパ腫の病態形成においても ATP6AP2 および RAS/RAPS が B 細胞性リンパ腫の線維化・転移などに関与していることを報告した。一方で、視細胞特異的な *Atp6ap2* コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析より、*Atp6ap2* が網膜発生において細胞極性分子の Par3 (partitioning defective 3 homolog) と共役し、視細胞の細胞極性に関与する重要な役割を担っていることを明らかにした。しかしながら、成体網膜における *Atp6ap2* の生理的な機能解析を行った報告はない。そこで、今回我々は、これまでに明らかにされていなかった成体網膜における ATP6AP2 の生理的機能解析を行った。

【対象と方法】成体マウス網膜における ATP6AP2 共役タンパク質を同定するため、抗 *Atp6ap2* 抗体を用いた免疫沈降/質量分析解析 (IP/MS) を行った。さらに免疫染色法や酵母を用いた Known bait-known prey 解析などにより IP/MS 結果を検証した。また、siRNA による *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンを行い、イムノブロット解析、免疫組織染色法などを用いた解析により共役タンパク質の機能への影響を検討した。

【結果と考察】抗 *Atp6ap2* 抗体とマウス網膜を用いた IP/MS 解析の結果、*Atp6ap2* がグルコース代謝経路で解糖系と TCA サイクルをつなぐ酵素の一つ、ピルビン酸脱水素酵素 E1 の β サブユニット (Pdhb) をはじめとする 9 種類のタンパクと共役していることを同定した。その共役は、Known bait-known prey 解析、co-transfection/co-IP 解析などにより検証し、Pdhb と直接共役することを確認した。またマウス網膜において *Atp6ap2* と Pdhb が、網膜色素上皮細胞 (RPE)、視細胞内節と神経節細胞で共局在していることを確認した。さらに、

細胞内における Atp6ap2 の詳細な局在を解析するため、マウス網膜における免疫電顕微鏡解析を行った。結果、Atp6ap2 シグナルは RPE をはじめとする細胞の細胞質に認められた。マウス網膜抽出タンパクを分画しておこなったイムノブロット解析においても、Atp6ap2 は細胞質と膜画分の両方に局在していた。そして、ATP6AP2 と PDHB の共役による生理的機能を解明するため、siRNA を用いた *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンによる PDH への影響を検討した。結果、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞では、PDH 酵素活性とアセチル-CoA 濃度は減少し、一方で乳酸濃度は上昇していた。また、既報で PDHB タンパクはチロシンリン酸化により安定性が減少することが報告されている。そこで、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞での PDHB タンパクのリン酸化を検討したところ、リン酸化は上昇していた。さらに、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウン RPE 細胞をチロシンキナーゼ阻害剤で処理をしたところ、PDHB タンパクの減少が回復した。これらのことより、ATP6AP2 は、PDHB タンパクのリン酸化を制御し、その安定性に関与していると示唆された。一方、ヒト胎児腎臓由来の HEK293T 細胞でも同様に *ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンによる PDH 酵素活性への影響などを検討したが、RPE 細胞で見られたような変化は認められなかった。PDH 複合体は、解糖系からミトコンドリアにおける好気性代謝に関与しており、過剰のグルコースは呼吸鎖を介して活性酸素 (ROS) の産生を促す。そこで、ATP6AP2 が PDHB を介してグルコース誘導酸化ストレスに関与しているのではないかと考え、ATP6AP2 ノックダウン RPE 細胞での ROS 産生を測定した。結果、グルコース負荷により上昇した ROS は、*ATP6AP2* 遺伝子ノックダウンにより抑制された。

網膜は体内の中で最も酸素・ATP 消費量が高く、エネルギー代謝が活発な組織である。そのため、本研究では他臓器に比べグルコース代謝経路への影響が顕著に表れたものと示唆される。過食の現代社会では、高いエネルギー代謝を営む細胞（特に網膜）が酸化ストレスの産生源になってしまうという皮肉を生んでいる。この意味で、眼において効率よいエネルギー産生を補助する ATP6AP2 の役割は諸刃の剣となっていると考えられる。しかしながら、ATP6AP2 の機能が大きく阻害されてもピルビン酸脱水素酵素複合体の機能低下は比較的軽度で済み、実際、PDHB タンパク質が欠失した動物でも、高いエネルギー代謝を営む眼でのみその影響が現れている。したがって、眼疾患において ATP6AP2 を分子ターゲットとする治療戦略は、将来的に有望な選択肢となると考えられる。

【結論】網膜において、ATP6AP2[（プロ）レニン受容体]がピルビン酸脱水素酵素を介してグルコース代謝経路、ひいてはエネルギー産生から酸化ストレスにまで関与していることを明らかにした。ATP6AP2 の網膜における生理的機能を明らかにした点で、今後の創薬研究において疾患適応の拡大や副作用を回避するなどの点で大きく貢献することが期待される。