



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                              |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/60038">https://hdl.handle.net/2115/60038</a>                                                            |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                    |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                              |
| File Information    | Atsuhiro_Kanda_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                             |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）      氏 名   神田   敦宏

主査   教授   佐邊   壽孝  
審査担当者   副査   教授   畠山   鎮次  
副査   教授   三輪   聡一

### 学 位 論 文 題 名

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

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と考えられているが、高等動物において組織修復などにも関与する（組織 RAS と呼ばれる）。申請者らの研究室ではこれまでに、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示し新たな病態概念を提唱してきた。プロレニン受容体からの 2 つの作用機作、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<sup>+</sup>-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り、V-ATPase に関連する多彩な生理的・病理的意義が ATP6AP2 の機能とリンクしている可能性が指摘された。本申請は、成体網膜における ATP6AP2 の生理的機能に関して解析したものである。

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 8 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が同定された。ATP6AP2 と PDHB との相互作用の生理的機能を解明するため、RPE 網膜細胞において ATP6AP2 遺伝子ノックダウンを行ったところ、PDH 酵素活性とアセチル・CoA 濃度が減少し、一方、乳酸濃度は上昇した。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が、ATP6AP2 遺伝子ノックダウン細胞では、PDHB のリン酸化の上昇を認め、このことはチロシンキナーゼ阻害剤により回復した。従って、ATP6AP2 は PDHB リン酸化を制御し、その安定性に関与することが示唆された。一方、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞ではこのようなこと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産生を促す。ATP6AP2 ノックダウン RPE 細胞での ROS 産生を測定したところ、グルコース負荷により上昇する ROS 産生は、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。申請者らはこれらの実験結果を、他臓器細胞に比べ網膜細胞ではグルコース代謝経路への影響が顕著に表れたものと解釈した。

今回の結果から、申請者らは、ATP6AP2 は眼組織における効率よいエネルギー産生に関与するが、その役割は眼組織の恒常性維持には諸刃の剣である可能性を指摘した。

審査にあたり、副査の畠山教授より、(プロ) レニン受容体の分子特性 (組織発現部位など)、MS 解析の実験手法・結果、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼと PDHB (ピルビン酸脱水素酵素 E1  $\beta$  サブユニット) との関係、(プロ) レニン受容体と PDHB の結合に関する質問があった。申請者は、(プロ) レニン受容体は普遍的に発現・分布していること、具体的な MS 実験手法・結果の解説 (その他に同定した共役タンパク質についても)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼは PDHB ではなく PDHA をリン酸化とすること、(プロ) レニン受容体は PDHB が合成後にミトコンドリアまでに移行するまで間の細胞質で結合している可能性を返答した。また、副査の三輪教授からは、(プロ) レニン受容体の細胞内局在、(プロ) レニン受容体による PDHB リン酸化制御のメカニズム、実験で主に用いた細胞に関する質問があった。申請者は、マウス網膜での免疫電子顕微鏡解析結果や細胞分画実験での結果などを含め (プロ) レニン受容体には N 末端側のみの可溶性分子が存在すること、キナーゼそのものではなく物理的に (プロ) レニン受容体が PDHB のリン酸化を抑制している可能性、実験ではヒト由来で樹立されている正常網膜細胞 (網膜色素上皮) を使用し、またその細胞の性質・特性などについて返答した。次いで主査の佐邊教授からは、(プロ) レニン受容体を標的にした糖尿病網膜症での治療、学位申請論文に関する質問があった。申請者は、これまでに報告した論文を引用し (プロ) レニン受容体の病的機能 (血管新生・炎症への関与) について述べ、また学位論文の修正をおこなう旨、返答した。

修正後の論文を再度審査したところ、口頭発表も含め、審査委員一同、今回の成果を評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるに足る資格を有するものと判断した。