

AT₁受容体C末端に結合する新規機能制御分子についての検討

田村 功一¹ 鶴見 裕子² 田中 穰² 酒井 政司² 重永豊一郎²
小澤 素子² 東 公一² 松田みゆき² 石上 友章² 野田 義博³
木内 吉寛³ 岩井 将⁴ 堀内 正嗣⁴ 梅村 敏²

要 旨： レニン - アンジオテンシン系の生理活性物質Ang IIに対する受容体にはAT₁受容体とAT₂受容体の2種類のサブタイプがあり，この系の主要な生理作用は主にAT₁受容体を介する情報伝達系の活性化によりなされる。しかし，AT₁受容体が直接的にどのような分子に作用して下流の複雑な情報伝達系のネットワークを選択的に活性化し，病的な心血管系リモデリングや腎障害を促進しているかについては不明な点が多い。われわれはAT₁受容体のC末端に特異的に結合する未知の新しい蛋白質としてATRAP(AT₁ receptor-associated protein)の遺伝子クローニングを行い，現在その機能の解析と病態生理学的意義の検討を進めている。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 369-375)

Key words: AT₁ receptor, receptor internalization, signaling, angiotensin II, cardiac hypertrophy

はじめに

レニン - アンジオテンシン系の生理活性物質アンジオテンシンII(Ang II)は主要な受容体であるAT₁(angiotensin II type 1)受容体に作用して下流の情報伝達系を活性化することにより，高血圧，心肥大，心不全，動脈硬化，腎障害などの心血管病および腎不全の発症・進展に深くかかわっている。この系のより効率的な抑制により，これら疾患の予防および治療効果の向上を図ることは高齢化社会を迎えつつある日本にとって重要である。著者らはこれまでレニン - アンジオテンシン系遺伝子発現調節機構とその病態生理学的意義に関する分子生物学的研究を行っており，レニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節における近位プロモーター領域の重要性¹⁻⁴⁾，心血管系細胞・組織における特異的なレニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節機構⁵⁻⁸⁾，およびアンジオテンシノーゲン

遺伝子欠損マウス由来心筋細胞を用いた系でのgp130蛋白質を介するサイトカイン経路の重要性などについて明らかにしてきた^{9,10)}。最近ではレニン - アンジオテンシン系の新規活性制御因子の探索とその機能解析を行っており，レニン遺伝子発現活性化に核受容体的一种LXRが関与することや¹¹⁾，AT₁受容体刺激による心血管系リモデリング促進遺伝子発現の増加に転写制御因子AP1が関与することを明らかにした^{12,13)}。今回AT₁受容体に直接結合してその機能を調節している可能性が高い新規因子の遺伝子クローニングを行い，これをATRAP(angiotensin II type 1 receptor-associated protein)と名付けた^{14,15)}。ATRAPの機能および病態生理学意義については不明な点が多いが，研究代表者らの現在までの研究では，ATRAPが心筋細胞においてはAT₁受容体のinternalizationを促進してAT₁受容体を介する心肥大反応を抑制しうる可能性が明らかにされている。興味深いことに，生体ではATRAPの発現は特に腎や心において高く認められ，腎や心におけるATRAPの機能的意義を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

¹横浜市立大学附属病院腎臓高血圧内科

²横浜市立大学大学院医学研究科病態制御内科学

³横浜市立大学大学院医学研究科実験動物医学

⁴愛媛大学医学部分子細胞生命科学心血管生物学

2006年1月5日受付 2006年2月4日受理

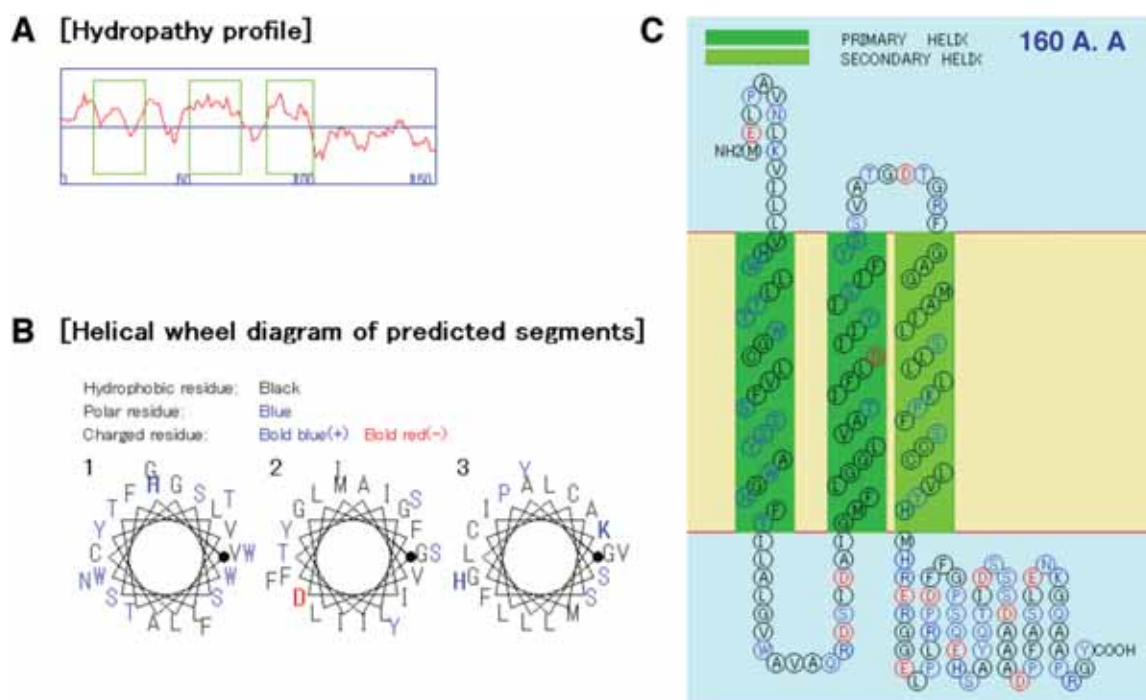


Figure 1 ATRAP is predicted to have three transmembrane domains.

A: Hydropobicity plot with the SOSUI program showing three boxed hydrophobic regions in the N-terminal end of ATRAP comprising the amino acid residues 14–36, 55–77, and 88–108 and a hydrophilic region from residues 109–161.

B: α -Helix conformation of the hydrophobic segments with the hydrophobic residues is shown in black, the polar residues in blue, positively charged residues in bold blue, and negatively charged residues, in bold red; the initial residue for the helix is marked with a bold dot. Numbers indicate the putative transmembrane domains.

C: Proposed structure of ATRAP showing the two first transmembrane domains in green as “primary” hydrophobic domains and the third transmembrane domain in light green as a “secondary” hydrophobic domain.

AT₁受容体に結合する 新規因子(ATRAP)の単離同定

マウス腎から作製されたcDNAライブラリーを用いてAT₁受容体C末端の細胞質内ドメインをbaitとしてyeast two-hybrid systemによる遺伝子クローニングを行い、AT₁受容体に特異的に結合する因子としてATRAPを単離同定した^{14,15)}。マウスATRAP cDNAは全長483塩基対から成り、相同性検索を行っても有意に相同性が認められる遺伝子は存在せず、新規因子と考えられた。また、ATRAPはAT₁受容体にのみ結合しAT₂受容体には結合しないと考えられた。

ATRAPのドメイン構造

コンピューターによる立体構造予測では、マウスATRAPのアミノ酸配列の解析から、N末端は細胞外ド

メインであり、N末端側に3つの膜貫通ドメインを持つとともにC末端側には細胞質内ドメインを持つという非常に珍しい構造上の特徴を有すると予測された¹⁶⁾(Fig. 1)。また、AT₁受容体の欠失変異体を用いての検討から同受容体C末端のアミノ酸残基(339–359)が、ATRAPとの結合に重要であると考えられた。さらにATRAPのC末端側を欠損させるとATRAPのAT₁受容体との結合能が失われることが明らかになり、ATRAPのC末端の細胞質内ドメインのアミノ酸残基(110–120)がAT₁受容体との結合に重要であると考えられた(Fig. 2)。

ATRAPの生体内組織分布

著者らは、ATRAP蛋白質発現の検出のためにポリクローナル抗ATRAP抗体を作製しており、Western blot解析においては*in vitro* transcribed/translated ATRAP蛋白質、培養細胞に遺伝子導入されたATRAP蛋白質、およ

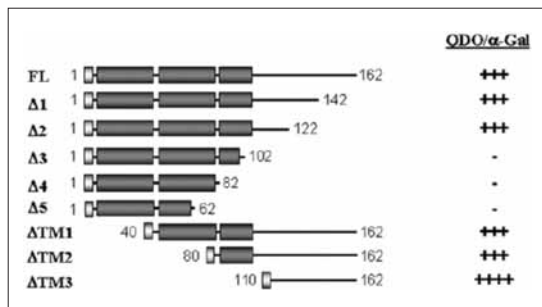


Figure 2 The C-terminal cytoplasmic domain is important for the interaction between ATRAP and AT₁ receptor.

Schematic representation of the yeast two-hybrid constructs used in the interaction assay with the C-terminal tail of AT₁ receptor. The yeast reporter strain AH109 was cotransformed with the deleted versions of the ATRAP two-hybrid expression plasmid pGADT7 and the C-terminal tail of AT₁ cloned in the two-hybrid expression plasmid pGBKT7. The cotransformants were selected in SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine (QDO). The yeast-galactosidase activity was determined in plates containing X-Gal (2 mg/ml) as a chromogenic substrate. The strength of interaction was evaluated qualitatively as the intensity of the development of blue color in yeast colonies growing in selective medium. FL: full length ATRAP, TM: transmembrane domain

び細胞・組織に発現している内在性ATRAP蛋白質について予想通り約18kDaの単一バンドの検出に成功し、これらのバンドは抗原ペプチド吸収試験において消失することから、ATRAP蛋白質に由来する特異的なバンドであると考えられる。そして、ATRAPの組織発現分布についての検討では、mRNAおよび蛋白質ともに、腎、心における高いレベルの内在性発現が認められている^{14,17)}。

ATRAPの腎細胞での発現分布と機能

腎ではATRAPはAT₁受容体と同様に尿細管を中心として広範囲の分布が認められ、細胞染色実験および電子顕微鏡での解析によるHEK293腎細胞での内在性ATRAPおよび遺伝子導入されたATRAPの細胞内局在の検討では、ATRAPは主に核周囲の小胞膜上(滑面小胞体, ゴルジ体など)に存在することが明らかになった。また、ATRAPにGFP-tagをつけてATRAPの細胞内移動の経時的解析を行ったところ、ATRAPはこれら細胞内小胞膜構造物から常に細胞表面の細胞膜に移動していることが明らかにされた。さらにATRAPをHEK293細胞に過剰発現させるとAng IIによるc-Fosプロモーター活性化の抑制がみられた。

ATRAPの心筋細胞での発現分布と機能

心筋細胞においても内在性にATRAP発現が認められ、主に核周囲に存在しており、免疫沈降実験により心筋細胞においてAT₁受容体およびATRAPが結合していることが明らかになった。また、心筋細胞での免疫細胞染色実験の結果、非刺激下においてAT₁受容体は主に心筋細胞の細胞膜に存在するのに対して、ATRAPは主に核周囲に存在していたが、心筋細胞をAng IIで刺

激するとAT₁受容体とATRAPがともに核周囲の領域でcolocalizeすることが明らかにされた(Fig. 3)。さらに、アデノウイルスベクターを用いてATRAPを心筋細胞に過剰発現させたところ、心筋細胞表面のAT₁受容体数の減少が認められ、ATRAPはAT₁受容体のinternalizationを促進することによりAT₁受容体情報伝達系に対して抑制的に作用している可能性が明らかにされた。

考 案

生体の血圧循環調節に重要なレニン-アンジオテンシン系の主要な受容体であるAT₁受容体を介する情報伝達系とその病態生理学的意義については、世界の数多くの研究室において研究が行われてきた¹⁸⁻²³⁾。AT₁受容体情報伝達系下流の活性化される情報伝達系、およびAT₁受容体自身の活性化機構あるいはAT₁受容体のdown-regulationの分子メカニズム、さらには、AT₁受容体情報伝達系活性化が心血管系リモデリングに関与するメカニズムについては、AT₁受容体自身のリン酸化の関与²⁴⁾、AT₁受容体細胞質ループ構造やC末端領域の関与^{25,26)}、あるいは細胞膜シグナリングドメインであるカベオラのシグナル伝達分子カベオリンとそのチロシンリン酸化のAT₁受容体のinternalizationへの関与^{27,28)}などが報告されているが、なお不明な点が多い。特にAT₁受容体に直接結合して下流の情報伝達系を制御する分子については長年にわたって遺伝子クローニングが多くの研究室において試みられてきたが、今回、世界で最初に新規AT₁受容体結合蛋白質としてATRAP遺伝子がクローニングされた。また、最近ATRAPとは異なる2種類のAT₁受容体結合蛋白質がクローニングされ、ARAR (type 1 angiotensin II receptor associated protein 1)、GLP (GDP/GTP exchange factor (GEF)-like protein)と名前が付けら

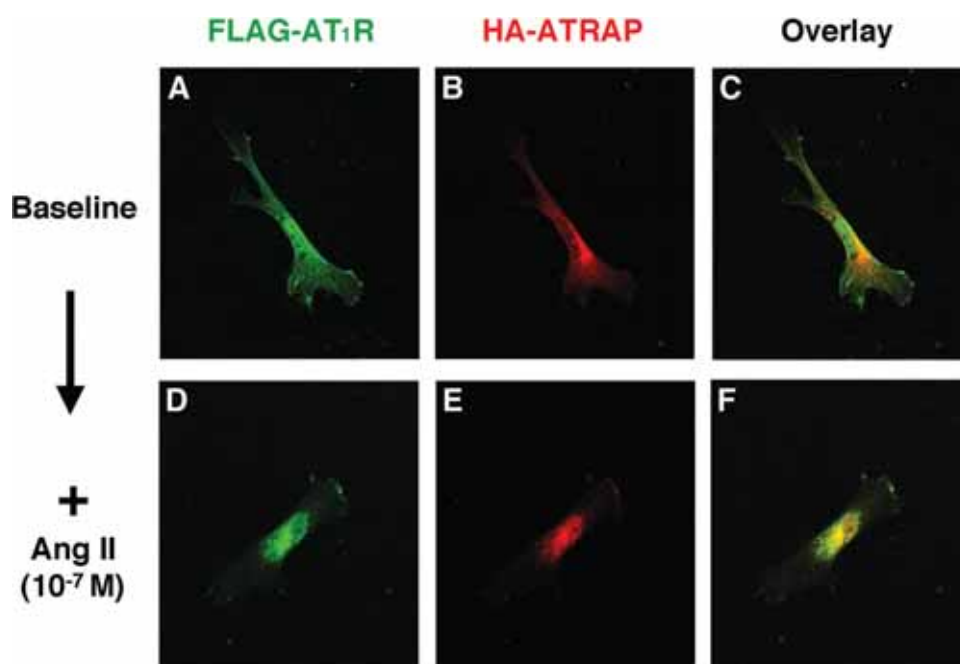


Figure 3 Co-localization of AT₁ receptor (AT₁R) and ATRAP in the perinuclear region is facilitated by Ang II. Cardiac H9c2 cells were transiently co-transfected with HA-tagged ATRAP and FLAG-tagged AT₁R. Then, cells were fixed under baseline conditions (A–C) or on stimulation with 100 nM Ang II for 60 minutes (D–F). Localization of FLAG-AT₁R was determined by using anti-FLAG antibody and green fluorescence secondary antibody and localization of HA-ATRAP was detected by using anti-HA antibody and red fluorescence secondary antibody.

れ、それぞれAT₁受容体のrecyclingやAT₁受容体による血管平滑筋細胞や腎尿細管細胞の肥大作用への関与の可能性が報告されている^{29, 30}。

ATRAPの組織発現分布についての検討では、mRNAおよび蛋白質ともに、腎、心における高レベルの内在性発現が認められている。腎レニン-アンジオテンシン系はAT₁受容体情報伝達系活性化を介して糸球体内圧上昇や尿管でのNa再吸収をもたらす、血圧上昇や糸球体硬化、間質線維化を促進する。よって高血圧や腎不全の病態生理における腎ATRAPの意義が注目される。一方、心レニン-アンジオテンシン系は、心筋細胞肥大、線維芽細胞増殖をもたらす心肥大や心不全の発症・進展を促進する。よって心肥大や心不全の病態生理における心ATRAPの意義も注目される。

以前著者らは、心血管系細胞での生理活性物質および伸展刺激によるAT₁受容体情報伝達系の活性化によるレニン-アンジオテンシン系および細胞外基質遺伝子発現誘導に関与するプロモーター領域に結合する転写

因子としてAP₁活性化因子(c-Jun)を明らかにした¹³。AT₁受容体遺伝子のプロモーター領域にはAP₁活性化因子結合転写活性化領域以外にも複数のpositive and negative regulatory elementsが存在し、その発現量は血管傷害や心筋梗塞などの種々の病態においても若干の変動は認められるが、比較的安定しているとされる。一方、AT₂受容体は胎児期に広範囲かつ高レベルに発現し、生後その発現量は急激に減少し、心血管系においては血管傷害、心筋梗塞、心肥大、心不全などの病態において強い発現誘導が認められる。また、現在までの研究によりAT₂受容体がAT₁受容体と拮抗して作用することが次第に明らかにされ、AT₁受容体とAT₂受容体の心血管および腎病変における発現バランスがこれら病変の発症・進展に重要であると考えられるようになっている³¹。一方、著者らの予備的検討結果では、腎や心でのATRAPの発現は種々の刺激によって変化することが明らかとなっており、したがってあまり発現量が変化しないAT₁受容体系の新規機能制御因子とし

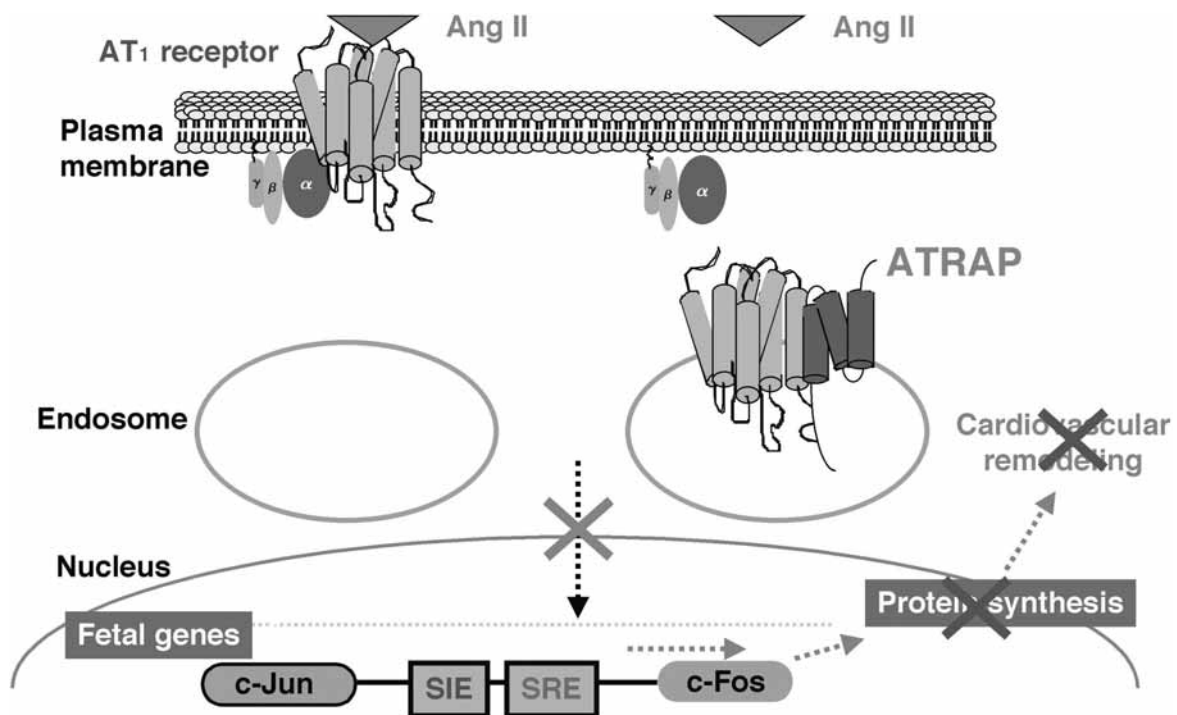


Figure 4 ATRAP inhibits AT₁ receptor-signaling by promoting receptor internalization without ligand binding.

てATRAPの病態生理学的意義が今後注目されるところである(Fig. 4)。

結 論

新規AT₁受容体結合因子として単離同定されたATRAPは、細胞レベルでの機能についてはAT₁受容体のinternalization情報伝達系に対する抑制作用が明らかにされつつある。しかし、生体組織におけるATRAPの生理作用や発現調節機序、あるいは高血圧やその臓器合併症でもある心肥大、動脈硬化、腎障害などにおける病態生理学的意義についてはまだまだ不明な点が多く、今後の研究の展開が期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究)、日本心臓財団研究助成金、武田科学振興財団研究助成金、かなえ医薬振興財団研究助成金、先進医薬研究振興財団循環医学研究助成金、横浜総合医学振興財団研究助成金、木村記念循環器財団研究助成金、横浜市立大学研究戦略プロジェクト事業先端的医科学先行的研究費などの研究助成により可能となったことを記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Tamura K, Tanimoto K, Murakami K et al: A combination of upstream and proximal elements is required for efficient expression of the mouse renin promoter in cultured cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 3617-3623.
- 2) Tamura K, Tanimoto K, Ishii M et al: Proximal and core DNA elements are required for efficient angiotensinogen promoter activation during adipogenic differentiation. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 15024-15032.
- 3) Tamura K, Umemura S, Ishii M et al: Molecular mechanism of transcriptional activation of angiotensinogen gene by proximal promoter. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 1370-1379.
- 4) Tamura K, Umemura S, Yamaguchi S et al: Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1959-1967.
- 5) Tamura K, Umemura S, Nyui N et al: Tissue-specific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1996, **27**: 1216-1223.
- 6) Tamura K, Umemura S, Yamakawa T et al: Modulation of tissue angiotensinogen gene expression in genetically obese hypertensive rats. *Am J Physiol*, 1997, **272**: R1704-R1711.
- 7) Tamura K, Umemura S, Nyui N et al: Activation of

- angiotensinogen gene in cardiac myocytes by angiotensin II and mechanical stretch. *Am J Physiol*, 1998, **275**: R1–R9.
- 8) Tamura K, Chiba E, Yokoyama N et al: Renin-angiotensin system and fibronectin gene expression in Dahl Iwai salt-sensitive and salt-resistant rats. *J Hypertens*, 1999, **17**: 81–89.
- 9) Nyui N, Tamura K, Mizuno K et al: Stretch-induced MAP kinase activation in cardiomyocytes of angiotensinogen-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **235**: 36–41.
- 10) Nyui N, Tamura K, Mizuno K et al: gp130 is involved in stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **245**: 928–932.
- 11) Tamura K, Chen YE, Horiuchi M et al: LXR α functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 8513–8518.
- 12) Tamura K, Nyui N, Tamura N et al: Mechanism of angiotensin II-mediated regulation of fibronectin gene in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 26487–26496.
- 13) Tamura K, Chen YE, Lopez-Illasaca M et al: Molecular mechanism of fibronectin gene activation by cyclic stretch in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 34619–34627.
- 14) Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K et al: Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 17058–17062.
- 15) Cui T, Nakagami H, Iwai M et al: ATRAP, novel AT₁ receptor associated protein, enhances internalization of AT₁ receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **279**: 938–941.
- 16) Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K et al: The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a trans-membrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol Biol Cell*, 2003, **14**: 5038–5050.
- 17) Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y et al: Interacting molecule of AT₁ receptor, ATRAP, is colocalized with AT₁ receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int*, 2006, **69**: 488–494.
- 18) Dzau VJ: Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*, 2001, **37**: 1047–1052.
- 19) Suzuki J, Iwai M, Nakagami H et al: Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT₁ and AT₂ receptors in neointimal formation. *Circulation*, 2002, **106**: 847–853.
- 20) Kagiya S, Eguchi S, Frank GD et al: Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation*, 2002, **106**: 909–912.
- 21) Zou Y, Akazawa H, Qin Y et al: Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 499–506.
- 22) Natarajan K, Yin G, Berk BC: Scaffolds direct Src-specific signaling in response to angiotensin II: new roles for Cas and GIT1. *Mol Pharmacol*, 2004, **65**: 822–825.
- 23) Ohashi H, Takagi H, Oh H et al: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res*, 2004, **94**: 785–793.
- 24) Olivares-Reyes JA, Smith RD, Hunyady L et al: Agonist-induced signaling, desensitization, and internalization of a phosphorylation-deficient AT_{1A} angiotensin receptor. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 37761–37768.
- 25) Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M et al: The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT₁ angiotensin receptor activation and signaling. *Endocrinology*, 2003, **144**: 2220–2228.
- 26) Tang H, Guo DF, Porter JP et al: Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res*, 1998, **82**: 523–531.
- 27) Wyse BD, Prior IA, Qian H et al: Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 23738–23746.
- 28) Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S et al: cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT₁ receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circ Res*, 2005, **97**: 829–836.
- 29) Guo DF, Chenier I, Tardif V et al: Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **310**: 1254–1265.
- 30) Guo DF, Tardif V, Ghelima K et al: A novel angiotensin II type 1 receptor-associated protein induces cellular hypertrophy in rat vascular smooth muscle and renal proximal tubular cells. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 21109–21120.
- 31) Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 1999, **33**: 613–621.

Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Interacting Molecule with AT₁ Receptor

Kouichi Tamura,¹ Yuko Tsurumi,² Yutaka Tanaka,² Masashi Sakai,² Toyochiro Shigenaga,²
Motoko Ozawa,² Koichi Azuma,² Miyuki Matsuda,² Tomoaki Ishigami,² Yoshihiro Noda,³
Yoshihiro Kiuchi,³ Masaru Iwai,⁴ Masatsugu Horiuchi,⁴ and Satoshi Umemura²

¹Department of Medicine, Yokohama City University Hospital, Kanagawa, Japan

²Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan

³Laboratory Animal Facility, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Kanagawa, Japan

⁴Division of Medical Biochemistry and Cardiovascular Biology, Department of Molecular and Cellular Biology, Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan

Key words: AT₁ receptor, receptor internalization, signaling, angiotensin II, cardiac hypertrophy

Accumulated evidence has revealed the pathophysiological significance of AT₁ receptor signaling in hypertension. Stimulation of cardiovascular cells with angiotensin II (Ang II) or stretch as well as blood pressure increase *in vivo* provoke activation of tissue renin-angiotensin system, which is accompanied by cellular hypertrophic and proliferative responses and cardiovascular tissue remodeling. These pathological responses are suppressed by AT₁ receptor antagonists, indicating that AT₁ receptor signaling plays an important role in cardiovascular complications in hypertension. We have recently cloned a novel molecule ATRAP (AT₁ receptor-associated protein) that specifically interacts with C-terminal of AT₁ receptor. We found an abundant expression of ATRAP in cardiovascular and renal tissues. Although ATRAP and AT₁ receptor have distinct subcellular localization in cardiomyocytes under baseline condition, Ang II stimulation made ATRAP colocalized with AT₁ receptor in the cytoplasm, thereby suggesting that ATRAP binds to the internalized AT₁ receptor. ATRAP decreased AT₁ receptor in number on the surface of cardiomyocytes, indicating an inhibitory effect of ATRAP on recycling AT₁ receptor. Furthermore, in downstream signaling pathways, ATRAP suppressed Ang II-induced activation of c-Fos promoter transcription and amino acid incorporation. Thus, cardiovascular and renal ATRAP may promote AT₁ receptor down-regulation and attenuate Ang II-mediated sequential hypertrophic and proliferative responses. In conclusion, ATRAP appears to be a new therapeutic target molecule to treat and prevent cardiovascular and renal complications in hypertension.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 369–375)