

論文題目 アンジオテンシンⅡタイプ2受容体相互作用
タンパク質(ATIP1)の機能解析

氏名 早田 敬太

レニン-アンジオテンシン系(Renin Angiotensin System, RAS)は、血圧調節において最も重要な系であり、アンジオテンシンⅡ(AngⅡ)が主にタイプ1受容体(AT1)に作用することにより調節している。一方、タイプ2受容体(AT2)への作用の重要性も報告されているがその詳細なメカニズムは明らかになっていない部分が多い。また、AT2は7回膜貫通型のGPCR(G protein coupled receptor)であり、近年、GPCRのC末端領域と結合するタンパク質が、GPCRのトラフィッキング、およびシグナル伝達を制御しているという報告がなされている。本研究ではAT2のC末端と結合してクローニングされた新規タンパク質AT2 receptor interaction protein(ATIP)に着目し研究を進めた。

ATIPはAT2と結合するタンパク質として報告されているが、その機能はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究ではATIPの機能解析をおこなうことを目的とし、ATIPに対するモノクローナル抗体の作製、DNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。

これまで、ATIPはオルターナティブスプライシングによる5つのアイソフォームが報告されている。中でもATIP1は細胞の増殖抑制効果が報告されていることから、特にユニークな機能をもつタンパク質である可能性が高い。

ATIPの解析ため、ATIPに特異的なモノクローナル抗体(anti mouse ATIP monoclonal antibody; a-mATIP-mAb)を作成した。当研究室で開発したバキュロウイルス発現系により、gp64 fusionのmATIPを発現させ、免疫抗原を調整した。免疫後、マウス脾臓とミエローマ細胞を融合させ抗ATIP抗体を産生するハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマのスクリーニング後、培養上清を精製し、a-mATIP-mAbを得た。

作成したa-mATIP-mAbの評価をWesternBlotで行なった結果、ATIPを特異的に認識した。また、免疫沈降でも使用することができたため、複合体解析に向けた条件検討をおこなった。血管内皮細胞であるHUVECをもちいた結果、抗体に特異的に反応したATIPを酸溶出できた。そこで、ショットガン法LC-MS/MSにより解析した結果、HUVECに発現するヒトATIP1(hATIP1)を同定することができた。

ついで、AT2アゴニストであるCGP 42112A投与後誘導される遺伝子、およびsiRNA hATIPにより発現が抑制される遺伝子をDNAマイクロアレイによって網羅的に解析した。CGP 42112A刺激後のHUVECでは炎症性の作用を及ぼす遺伝子が誘導された。さらに、siRNA hATIPにより減少が見られた遺伝子を解析した結果、ATIP1がある遺伝子の発現に重要なタンパク質であることが示唆された。また、マイクロアレイのデータを別の側面から検討し、この結果を支持するデータを同様に得た。

本研究の結果からATIP1はAT2受容体からのシグナル伝達において重要な役割を果たすタンパク質であることが示された。また、HUVECにおいてhATIP1が同定できたことから、血管内皮細胞、およびAT2受容体の機能解析がhATIP1の研究から、さらに発展する可能性を示すことができた。