

特集：糖尿病性腎症の成因と病態—新たな展開

(プロ)レニン受容体/ATP6AP2 と細胞死

木内謙一郎*¹ 市原淳弘*² 伊藤 裕*¹

要 旨

(プロ)レニン受容体[(P)RR]は組織においてレニン・プロレニンと結合し、レニン活性を上昇させる、あるいはプロレニンにレニン活性を賦与するだけでなく、受容体を介した独自の細胞内シグナルを発生させるユニークな分子である。局所のレニン・アンジオテンシン系(RAS)の調節因子として、(P)RRの活性化は高血圧や糖尿病における心臓線維化や蛋白尿の進展に重要な役割を果たしている。大変興味深いことに、(P)RRのC末端側ドメインはATP6AP2と呼ばれており、液胞型プロトンATPase(V-ATPase)と局在を共にしていることが示されている。V-ATPaseはサブユニットから構成される複合蛋白水素イオン輸送体で、受容体を介したエンドサイトーシス、蛋白やシグナル分子の修飾、膜輸送、ライソソーム酵素の活性化など、さまざまな基本的な細胞機能に関与しており、V-ATPaseの機能不全は細胞死を引き起こす。V-ATPaseにおける(P)RRの役割は、これまでの研究で示唆されているほか、最近も精力的に研究されている。さらに、(P)RRにはV-ATPaseとWnt受容体複合体との間の介在蛋白としての新しい機能があることが発見された。このように、(P)RRは複数の機能を有する分子であり、その構造と挙動は複雑である。本稿では、(P)RRと哺乳類のV-ATPaseの機能、細胞生存に焦点を当て、現在得られている知見と今後の研究の展望について述べる。

緒 言

(プロ)レニン受容体[以下、(P)RR]はレニン・プロレニンの受容体として2002年にクローニングされた分子であ

(Pro)renin receptor/ATP6AP2 and cell death

*¹慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

*²東京女子医科大学高血圧内分泌内科

る¹⁾。(P)RRと結合したレニンはレニン酵素活性が上昇し、プロレニンはレニン活性を獲得するだけでなく、アンジオテンシンIIとは独立した細胞内伝達を引き起こす。(P)RRは局所レニン・アンジオテンシン系(RAS)に重要な役割を果たし、さらに(P)RR独自の細胞内伝達経路が高血圧や糖尿病における心臓線維化や蛋白尿に関与していることが示されてきた^{2~5)}。またわれわれの研究により、(P)RRは哺乳類のV-ATPaseと呼ばれる巨大な複合蛋白の構造と機能に必須の分子であることが明らかになった⁶⁾。液胞型プロトンATPase(vacuolar adenosine triphosphatase: V-ATPase)は、受容体を介したエンドサイトーシス、小胞膜輸送、ライソソーム酵素の活性化などさまざまな細胞機能にかかわることが知られており、V-ATPase機能不全は細胞死を引き起こす。また、(P)RRはV-ATPaseとWnt受容体複合体との介在蛋白としての機能も担っていることが報告された⁷⁾。このように、(P)RRは複数の機能を有し、複雑な構造と挙動を示す非常にユニークな分子である。本稿では、(P)RRの機能のなかで特にV-ATPaseのサブユニットaccessory protein2(ATP6AP2)としての機能に焦点を当てる。

発生や細胞死における(プロ)レニン受容体の意義

これまでの研究でV-ATPaseの機能における(P)RRの役割が示唆されている。すなわち、(P)RRを欠損したマウスの胚幹細胞を胚盤胞に導入してもキメラを形成することができないことがわかっている。また、レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンtype I受容体など、RAS関連物質の欠損モデルは致死ではないことから、(P)RRにはRASと独立した生物の生存に必須な機能が関与していることが示唆された^{8~10)}。さらに、(P)RRが変異したゼブラフィッシュは、早期に眼球や皮膚の色素沈着異常、神経細胞死などの発達異常を示し、発達早期に死亡することか

ら、神経細胞やメラノサイトにおいて重要な機能を担っていることが示唆された¹¹⁾。V-ATPase のサブユニットの変異型ゼブラフィッシュは(P)RR 変異型ゼブラフィッシュと同様の表現形を示すことから¹¹⁾、(P)RR と V-ATPase の間に機能的な関連があることが示唆された。アフリカツメガエルにおいても、初期胚に(P)RR に対する morpholino RNA を投与したところ、頭部や尾部の低形成、眼球の色素沈着低下など、(P)RR 変異型ゼブラフィッシュと同様の表現形が観察された⁷⁾。ヒトにおいては、伴性劣性遺伝を示す家族性てんかんの一家系において、(P)RR 遺伝子エクソンの splice enhancer に点突然変異が入っていることがわかっており、(P)RR が神経細胞の機能に関与する可能性が示唆されている^{12,13)}。以上より、(P)RR 遺伝子の変異や欠損によって観察される表現形から、(P)RR が発生や細胞生存に重要な役割を果たしていることが考えられる。

これまで(P)RR 欠損マウスの作製を数多くのグループが精力的に試みてきたが、(P)RR 欠損胚幹細胞は胚盤胞に注射した際にキメラを形成せず成功していなかった¹⁴⁾。このため、胎生致死を回避するため、組織特異的(P)RR 欠損マウスの作製にわれわれのグループが初めて成功した⁶⁾。驚くべきことに、心筋細胞特異的(P)RR 欠損マウスは劇症の心不全を発症し、全例が早期に死亡した。(P)RR 欠損心筋細胞は無数の空胞が核周囲に蓄積し、なかには多重空胞やオートファゴソームも認められ、non-apoptotic cell death を引き起こすことから、RAS とは独立した機序が細胞障害の原因と考えられた。(P)RR の C 末端側は細胞内オルガネラの酸性環境を調節する V-ATPase の付随蛋白である ATP6AP2 として発見された経緯がある¹⁶⁾。したがって、(P)RR 欠損心筋細胞の表現形を説明するメカニズムとして、(P)RR の V-ATPase における役割を検討したところ、(P)RR は V-ATPase 付随蛋白として、哺乳類 V-ATPase の機能に必須であり、特に膜貫通部分である V_0 セクターの機能と構造に必須であることが明らかとなった。われわれの行った検討では、マウス各組織における(P)RR の発現レベルは、V-ATPase の他のサブユニットの発現と相関することがわかっており、(P)RR が生理的には哺乳類 V-ATPase 関連蛋白として機能していることが明らかとなった¹⁷⁾。

V-ATPase のサブユニットとしての(P)RR の生理的意義

V-ATPase は細胞膜に結合した、サブユニットから構成される巨大な蛋白複合体であり、細胞質側から管腔側へ水

素イオンを輸送し、オルガネラの内部や細胞外を酸性環境に維持している。V-ATPase はほぼすべての細胞に発現しており、トランスゴルジネットワーク、エンドソーム、ライソソーム、分泌顆粒、メラノソーム、シナプス小胞など、細胞内のさまざまな部分に広く分布している。この V-ATPase 依存性のオルガネラ酸性環境は、蛋白や膜の輸送、膜癒合、受容体を介するエンドサイトーシス、ライソソームにおける蛋白分解などに重要な役割を果たしている¹⁸⁾。例えば、ライソソームにおける蛋白分解に必須な加水分解酵素はその至適酵素活性が低 pH 状態において発揮される。さらに、食食、細胞内へのウイルスの侵入、癌の転移、胚形成における水平方向決定など、さまざまな細胞現象に V-ATPase はかかわっている^{18,19)}。V-ATPase は pH センサーとして膜輸送を調節していることも最近の研究で報告されている²⁰⁾。われわれの研究においても、(P)RR は細胞内オルガネラの酸性環境を検知し、V-ATPase の活性を調節している可能性が示唆されている⁶⁾。(P)RR を含む V-ATPase の構成因子の変異体や、薬剤による V-ATPase 活性阻害はオルガネラの pH 恒常性を障害し、小胞内膜蛋白の蓄積を引き起こしたり、後期エンドソームやライソソームの間の輸送を阻害し、さまざまな生命体に細胞死を引き起こすこともある^{6,21)}。また、非常に機能分化した細胞や組織において重要な役割を担っている V-ATPase も存在し、腎臓遠位尿細管の間在細胞における尿の酸性化を司ったり、破骨細胞における骨吸収に重要な役割を果たしている。さらに、V-ATPase は内分泌組織にも非常に豊富に発現し、膵臓における β 細胞や副腎におけるカテコラミン産生細胞では、V-ATPase は分泌小胞内の酸性化とは独立した機序でホルモンの調節分泌に重要な役割を担っていることがわかっている^{22,23)}。このように、V-ATPase は幅広くかつ特異的な分布を示すことから、この酵素がさまざまな基本的な細胞機能に重要であり、細胞生存においても必須であることがわかる。(P)RR 欠損心筋細胞における細胞内小胞の蓄積は、V-ATPase 阻害薬のパフィロマイシンで再現されたことから、(P)RR の生理的な機能は V-ATPase に関連した機能が非常に大きく、細胞生存に必須であることがわれわれの研究結果から明らかとなった。

V-ATPase は進化の過程で保存されており、植物、酵母、哺乳類に相同性が確認されている²⁴⁾。V-ATPase は複合蛋白であり、 V_1 セクターと V_0 セクターから構成される(図)。哺乳類においては、 V_1 セクターは 8 つのサブユニット(A~H)から構成され、ATP の加水分解にかかわっている。 V_0 セクターは 7 つの異なるサブユニット(a, c, c', d, e, Ac45,

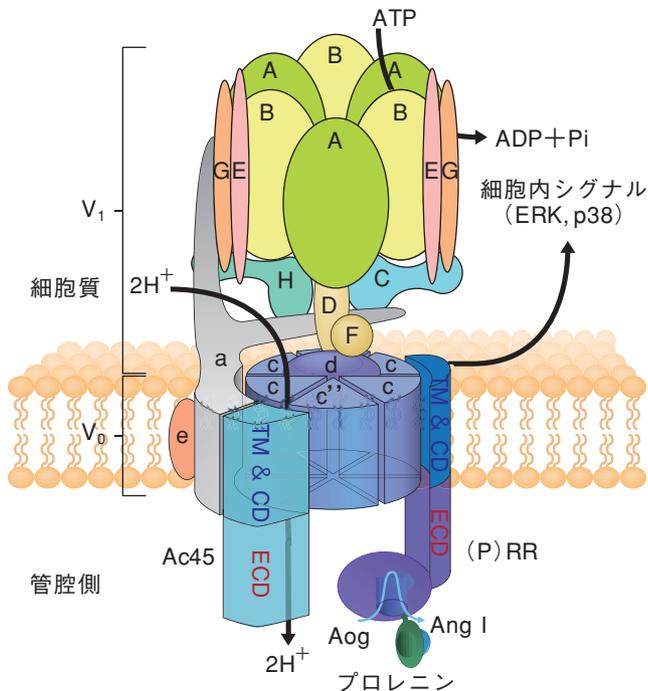


図 想定される哺乳類液胞型プロトン ATPase (V-ATPase) と (プロ)レニン受容体[(P)RR]の構造と局在

(P)RR に結合したプロレニンはレニン活性を獲得しアンジオテンシンⅠが産生される。一方、(P)RR は V-ATPase の付随サブユニットとして、V-ATPase の膜貫通ドメインである V₀ セクターと複合体を形成しているものと考えられる。TM & CD: 膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン, ECD: 細胞外ドメイン, Aog: アンジオテンシノーゲン, Ang Ⅰ: アンジオテンシンⅠ

(P)RRで構成され、細胞膜に結合し、細胞膜内外の水素イオンの輸送にかかわっている。サブユニットのなかには、(a, d, B, C, E, G, H)異なるアイソフォームを有するものがあり、V-ATPase の各組織や細胞内局在の特異性が豊富になっている²⁵⁾。さらに、アイソフォームの存在により、他のアイソフォームの機能を相互に補完している可能性も示唆されている²⁶⁾。特筆すべきことは、2つの V-ATPase 付随蛋白である Ac45 と (P)RR には、いまだ酵母の相同蛋白が見つかっていないことである。

分子構造に基づいた (P)RR の機能

ヒトでは (P)RR 遺伝子は X 染色体短腕である p11.4 上に存在する。mRNA は 2034 塩基対から成り、選択的スプライシング蛋白は存在しない。(P)RR 蛋白は 350 アミノ酸、37 kDa の分子であり、4つの異なるドメインから構成される。すなわち、N 末端側に存在するシグナルペプチド、細

胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および短い細胞内ドメインである²⁷⁾。細胞外ドメインはレニン・プロレニンとの結合を担っており、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは V-ATPase 関連領域であると考えられている。他の RAS 関連物質と異なり、(P)RR 遺伝子は塩基配列が種を超えて相関性が高いことが知られており、RAS の機能が未発達なアフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫などといった原始的な生物にも (P)RR 相同分子が見つまっている¹⁴⁾。ヒト、ラット、マウスの間の (P)RR 遺伝子の塩基配列の相関性は約 95%、(P)RR 蛋白のアミノ酸配列の相関性は 80%以上といわれている²⁸⁾。このように、(P)RR は酵母との相関性はないものの、進化の過程で保存された蛋白である。特にウシのカテコラミン分泌顆粒から発見された ATP6AP2、すなわち (P)RR の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは脊椎動物・無脊椎動物両者の間に相関性が非常に高いことがわかっており¹⁶⁾、(P)RR 分子の最も基本的な機能として、V-ATPase のサブユニットとして細胞生存に関与していることを裏付けるものである。一方、細胞外ドメインは脊椎動物に限ってアミノ酸配列の相関性が高いことから¹⁴⁾、RAS が進化の過程で登場してから、(P)RR は ATP6AP2 蛋白にレニン・プロレニン結合能を獲得したと考えることもできる²⁹⁾。したがって、RAS は (P)RR を介し、V-ATPase の機能を調節することによって細胞内酸性環境や細胞生存にも影響を与えている可能性がある。

今後の展望

(P)RR はレニン・プロレニンの受容体であるだけでなく、哺乳類 V-ATPase の付随サブユニットである。V-ATPase のサブユニットがなぜレニン・プロレニンの受容体としての機能を獲得したのかについてはいまだ有力な証拠は得られていないが、組織 RAS と細胞内環境が (P)RR を介して相互に影響し、調節されているならば大変興味深い。われわれは今後、(P)RR の受容体としての機能と、V-ATPase 関連蛋白として細胞の生存に必須な機能を区別して解析することにより、(P)RR を介した細胞内シグナルが高血圧や糖尿病の病態にどれほど影響を及ぼしているのかに関して検討を進めるとともに、組織 RAS と細胞内酸性環境および細胞生存のリンクに関して検討していく必要がある。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Nguyen G, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1417-1427.
2. Ichihara A, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1128-1135.
3. Ichihara A, et al. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2495-2503.
4. Ichihara A, et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006 ; 47 : 894-900.
5. Ichihara A, et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1950-1961.
6. Kinouchi K, et al. The (pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 2010 ; 107 : 30-34.
7. Cruciat CM, et al. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 2010 ; 327 : 459-463.
8. Ito M, et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 3521-3525.
9. Tanimoto K, et al. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 31334-31337.
10. Yanai K, et al. Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 5-8.
11. Amsterdam A, et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 12792-12797.
12. Contrepas A, et al. A role of the (pro)renin receptor in neuronal cell differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 ; 297 : R250-257.
13. Ramser J, et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet* 2005 ; 14 : 1019-1027.
14. Burckle C, Bader M. Prorenin and its ancient receptor. *Hypertension* 2006 ; 48 : 549-551.
15. Nishi T, Forgac M. The vacuolar (H⁺)-ATPases - nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 ; 3 : 94-103.
16. Ludwig J, et al. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 10939-10947.
17. Kinouchi K, Ichihara A, Itoh H. Functional characterization of (pro)renin receptor in association with V-ATPase. *Front Biosci* 2011 ; 17 : 3216-3223.
18. Forgac M. Vacuolar ATPases : rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 917-929.
19. Marshansky V, Futai M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking : targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* 2008 ; 20 : 415-426.
20. Hurtado-Lorenzo A, et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006 ; 8 : 124-136.
21. Beyenbach KW, Wicczorek H. The V-type H⁺ATPase : molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 2006 ; 209 : 577-589.
22. Sun-Wada GH, et al. The a3 isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 2006 ; 119 : 4531-4540.
23. Sun-Wada GH, et al. Differential expression of a subunit isoforms of the vacuolar-type proton pump ATPase in mouse endocrine tissues. *Cell Tissue Res* 2007 ; 329 : 239-248.
24. Stevens TH, Forgac M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997 ; 13 : 779-808.
25. Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M. Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase : toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1658 : 106-114.
26. Kawamura N, et al. Optic nerve compression and retinal degeneration in Tcirg1 mutant mice lacking the vacuolar-type H-ATPase a3 subunit. *PLoS One* 2010 ; 5 : e12086.
27. Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2008 ; 8 : 127-132.
28. Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 21 : 18-23.
29. Sihm G, et al. Physiology of the (pro)renin receptor : Wnt of change? *Kidney Int* 2010 ; 78 : 246-256.