

88. 細胞内小胞ホメオスタシスの動作原理

大場 雄介

北海道大学 大学院医学研究科 細胞生理学分野

Key words : 細胞内シグナル伝達, 細胞内小器官, エンドサイトーシス, 蛍光イメージング

緒言

細胞膜は単に細胞内外を隔てる脂質二重膜ではなく、外部環境や他の細胞とのコミュニケーションのインターフェースとして機能する。また、2次元方向の流動性のみならず、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスにより内膜成分と相互に交流があり、細胞内外の膜のホメオスタシスを維持している。内膜成分であるエンドソームやエキソソームも、シグナル伝達発信のプラットフォームとして機能する。

アンジオテンシン II (angiotensin II, AII) は、高血圧、アテローム性動脈硬化症、および心不全臓等の心血管疾患の発症において重要な役割を持つ多面的なペプチドホルモンである^{1,2)}。AII 受容体の4つサブタイプのうち、1型受容体 (AT1R) は最も研究の機能解析の進んでいる受容体であり、AII 依存性血管収縮に関与する^{1,2)}。Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) /mitogen-activated protein kinase (MAPK、以下 ERK) は AT1R シグナル伝達の重要な下流因子であり³⁾、AT1R を介した病態発症の主要なエフェクター分子であると考えられる。AT1R 以外の受容体のシグナル伝達機構は不明な点が多いが、2型受容体 (AT2R) は ERK 活性化の阻害を介して AT1R の作用に拮抗することが報告されている^{1,2,4,5)}。しかしながら、生理的条件下における AT2R による AT1R シグナルの調節機構は、未だ議論の余地がある。

本研究では、AT1R と AT2R の直接的な機能連関を明らかにするため、蛍光タンパク質タグ付き AT1R および AT2R を用い、AT2R が AT1R と直接相互作用することを明らかにした。受容体複合体は AT1R、AT2R および PKC の活性に依存してエンドサイトーシスによって内在化され、この内在化に伴い両受容体の C 末端が近接するような構造を取ることを、フェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer, FRET) を用いて見出した。これらの知見により、リガンド依存性の AT1R 活性化を AT2R が阻害する分子メカニズムの一端を解明したといえる。

方法

ヒト AT1R および AT2R の cDNA はヒト臍帯静脈内皮細胞の cDNA ライブラリーから、PCR 法によりサブクローニングした。なお、以前の報告⁶⁾ に従い、開始コドンの直後に HA および FLAG タグが挿入されるようプライマーを設計した。得られた PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO にクローニングし、pCXN2-YFP と pCXN2-CFP ベクターの EcoRI および NotI 部位にサブクローニングすることで、HA-AT1R-YFP と FLAG-AT2R-CFP を得た。352-354 番目のセリン残基をアラニンに置換したリン酸化欠損 AT2R 変異体は、2ステップ PCR 法により作製した。*Entacmaea quadricolor* eqFP650 (TurboFP650) の cDNA は、PCR で増幅後 pCMV 由来ベクターにクローニングし、pFX-eqFP650 と命名した。また、ラット ERK2 cDNA を PCR で増幅し、pFX-eqFP650 の XhoI および NotI 部位にサブクローニングすることで、pFX-eqFP650-ERK2 を得た。

AII、LPA、および PD123319 は Sigma から入手した。EGF およびロサルタンは PeproTech 社および LKT ラボラトリーズ社から購入した。Staurosporine および AG1478 とは Calbiochem 社から購入した。Höchst33342 および Gö6983 はそれぞれ、Invitrogen 社およびケイマン・ケミカルから入手した。FLAG および HA に対する抗体はストラタジーンおよび Roche 社から、抗 ERK およびリン酸化 ERK2 は Cell Signaling Technology 社から購入した。リン酸化セリン/スレオニン抗体はエンゾライフサイエンスから入手した。

HeLa 細胞は 10 % FBS 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Sigma) 中で培養しました。発現プラスミドが FuGENE HD (Roche 社) を用いて導入した。

免疫沈降およびイムノブロットは常法に基づき実施した。なお、細胞可溶化液に SDS サンプルバッファーを添加した後は、AT1R と AT2R の凝集を防ぐため、ボイルせず 50 °C でインキュベートした。蛍光顕微鏡観察および FRET 効率の算出は、以前の報告に従った⁷⁾。なお、補正 FRET 値 (FRET_c) は、以下の式を用いて画像中の各画素ごとに計算した: $FRET_c = FRET - (0.5 \times CFP) - (0.02 \times YFP)$ 。0.5 および 0.02 は同条件で撮像した場合の CFP と YFP 蛍光の FRET チャネルへの漏れ込み比である。FRET_c 画像は最終的に擬似カラーモードで表示した。eqFP650-ERK の核移行を定量化するために核をヘキストで染色し、核領域と細胞領域に対して作成されたマスク画像を用いて、核と細胞全体における eqFP650-ERK の蛍光強度を定量し、その日を ERK の活性とした。

結 果

1. AT2R は選択的に AT1R 依存性 ERK リン活性化を阻害する

AT2R シグナルは AT1R 依存性シグナルと拮抗することが報告されているため^{1,2,4,5)}、まず AT1R または他の受容体により誘導される ERK 活性化に対する AT2R の効果を検討した。AII 処理は HeLa 細胞ではほとんど ERK を活性化しないが、AT1R の存在下では ERK リン酸化を誘導する (図 1a)。また、蛍光タンパク質タグした ERK2 の局在を定量化したところ、AT1R の発現依存的かつ AII 刺激依存的な ERK 核移行が観察された (図 1b)。これらの方法によって得られた ERK 活性化の時間経過は互いに一致していたので (図 1c)、意図したタンパク質を発現する HeLa 細胞における ERK 活性をモニターするため、以下の実験では ERK の核移行でその活性化をモニターした。AT2R の発現は AII 依存性 ERK 活性化を誘導しないが、AII および AT1R 依存性の ERK 活性化を抑制した (図 1d)。AT2R 阻害薬 PD123319 はこの AT2R による抑制効果をキャンセルした。

次に、AT2R による作用が AT1R に特異的か否かを検討した。EGFR 阻害薬 AG1478 処理は AII-AT1R 依存 ERK 活性化に対する阻害効果を有さないことから (図 1e)、HeLa 細胞においては EGFR のトランス活性化経路は存在しないことが解った。この条件下において、AT2R は EGF 依存的な ERK 活性化抑制しないことがわかった (図 1f)。また、リゾホスファチジン酸 (LPA) (図 1g)、ウシ胎児血清 (FBS) (図 1h) による ERK 活性化に対しても、AII-AT2R は抑制効果を示さなかった。以上より、AT2R による ERK の抑制効果は AT1R シグナルに選択的であり、その作用点は ERK/MAPK カスケードより上流であることが示唆された。

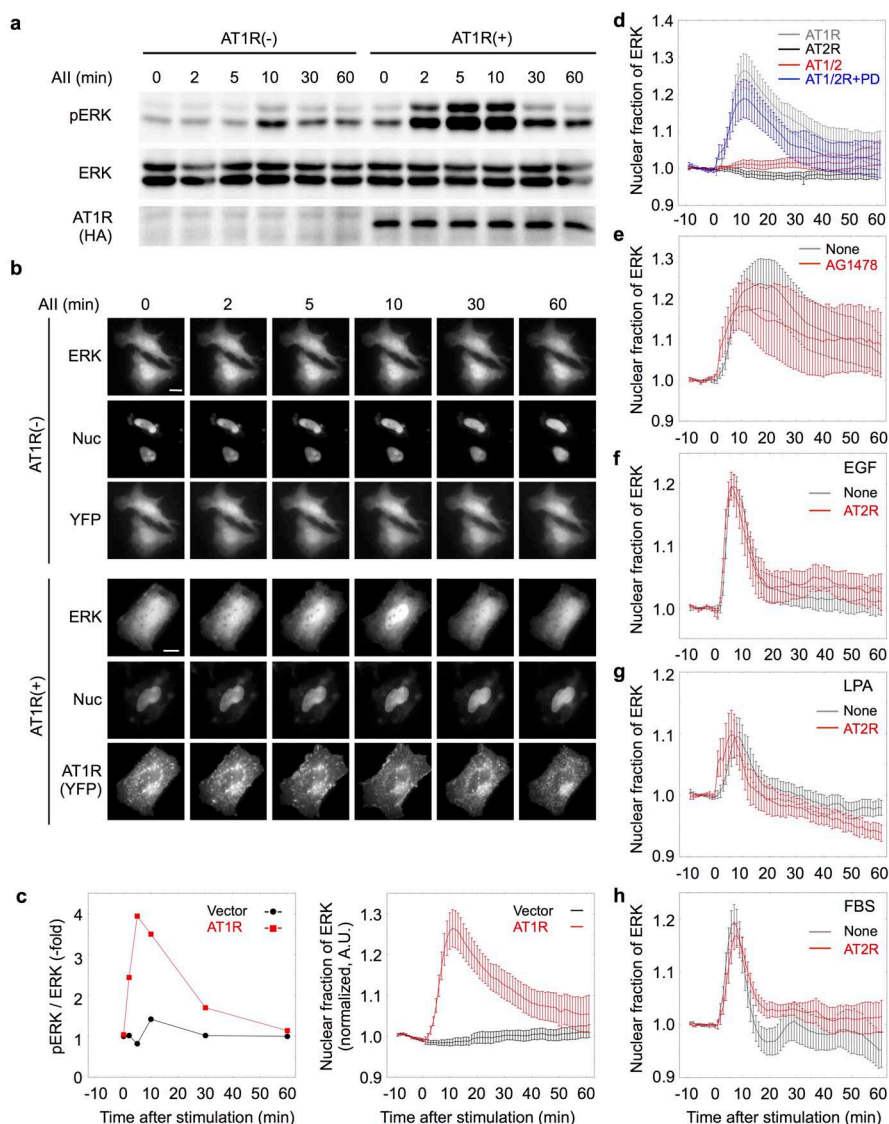


図1. AT2RはAT1Rシグナル伝達を特異的に抑制する

(a) HeLa細胞にAT1R発現ベクターまたはコントロールベクターを遺伝子導入した。24時間後に4時間の血清飢餓処理をした後、AII刺激または未処理のままとした。図に示す時刻に細胞可溶化液を調製し、SDS-PAGEで可溶化タンパク質を展開した。ERKのリン酸化状態はリン酸化特異的抗体を用いたイムブロッティングにより決定した。また、ERKおよびAT1Rの発現はERKおよびHAに対する抗体を用いて評価した。(b) eqFP650-ERK単独またはAT1Rと共発現したHeLa細胞をHoechst 33342で染色し、落射蛍光タイムラプス顕微鏡で観察した。時刻0でAII刺激を行った。スケールバー: $50\mu\text{m}$ 。(c) aにおけるバンドの強度とbにおける核ERK/総ERKの平均蛍光強度を定量し、それぞれ左右のグラフにプロットした。エラーバーは平均値の標準誤差 (s.e.m.)、タイムラプスイメージングのサンプルサイズは $N = 8$ である。(d) HeLa細胞にAT1R単独、AT2R単独あるいはAT1RとAT2Rを共発現させ、AT2R特異的阻害薬PD123319の非存在下または存在下で4時間インキュベートした。細胞をタイムラプス顕微鏡でモニターしながら、時刻0でAII刺激を行った。平均核ERK/総ERK比を経時的にプロットした。エラーバーはs.e.m.を示す ($N = 5$)。 (e) AT1Rを発現するHeLa細胞をEGFR阻害薬AG1478の非存在下または存在下で4時間インキュベートし、タイムラプス顕微鏡によって観察した。時刻0でAII刺激を行った。平均核内ERK蛍光強度比を経時的にプロットした。エラーバーはs.e.m.を示す ($N = 3$)。 (f-h) AT2R発現ベクターまたはコントロールベクターを導入したHeLa細胞を、AIIの存在下においてタイムラプス顕微鏡で観察した。時刻0において、EGF (f)、LPA (g)、およびFBS (h) で刺激した。エラーバーはs.e.m.を示す [$N = 6$ (f)、5 (g)、5 (h)]。

2. AT2RはAT1Rと相互作用する

図1の結果から、AT2Rは複合体を形成することによりAT1Rシグナル伝達を減弱すると推察した。実際、AT1RとAT2Rが直接結合することが、免疫沈降法で過去の報告において示されている⁸⁾。しかし、これらの報告ではAII刺激によって相互作用が増強するかどうかは示されていない。そこで、HeLa細胞株においてAT1RとAT2Rの直接的な相互作用か否かを免疫共沈法を用いて検討した。その結果、AT1RとAT2RはAII非存在下においても結合すること、AII処理によりその結合は僅かに増強するが、AT1RおよびAT2Rの阻害薬処理は両者の結合に影響を及ぼさないことが明らかになった(図2)。この結果は、図1に示したERK活性化のプロファイルとは一致しない。しかしながら、このことは必ずしもAT2Rが受容体レベルでAT1Rのシグナル伝達を抑制する可能性を否定するのではなく、むしろシグナルクロストークメカニズムのさらなる理解のためには、生化学的分析以外のアプローチが必要であることを示唆している。

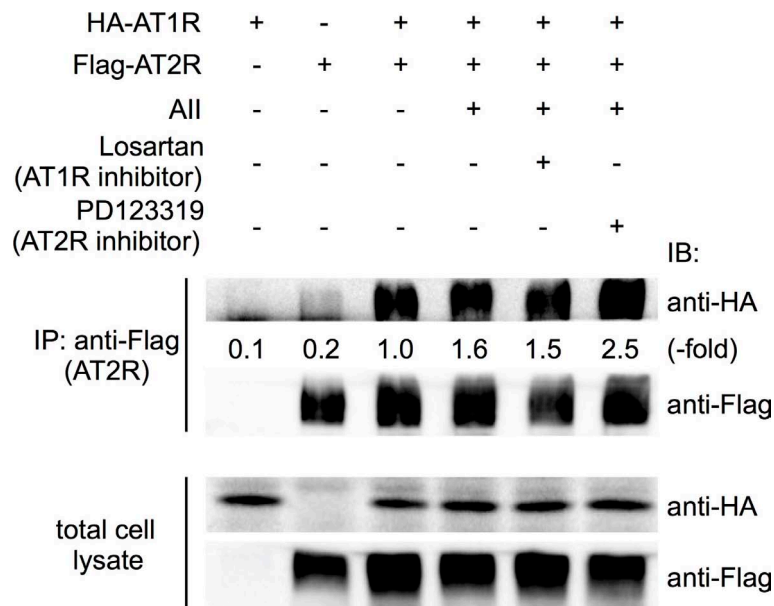


図2. AT2RはAT1Rと相互作用する

上部に示される発現ベクターを導入したHeLa細胞を、血清飢餓処理し、AT1R特異的阻害薬ロサルタンまたはAT2R特異的阻害薬PD123319で前処理した後AIIで刺激した。可溶化バッファーで細胞を可溶化し、抗FLAG抗体による免疫沈降産物を抗HAまたは抗FLAG抗体を用いたイムノプロットングにより解析した。タンパク質の発現は細胞可溶化液の一部を使用したイムノプロットで確認した。

3. AII刺激はAT1R依存的にAT2Rの内在化を誘導する

AT1RはAII刺激によりエンドサイトーシスにより内在化されることが報告されているため⁹⁾、AT2Rは時空間的な制御を介してAT1Rシグナル伝達の調節に関与する可能性があるという仮説を立てた。AT1RおよびAT2Rの細胞内局在と輸送を可視化するために、CFPおよびYFPタグした受容体の発現ベクターを作製し、それらの局在を観察した。AIIの非存在下では、AT1RおよびAT2Rともに、主として細胞膜に局在した(図3a)。AII刺激によりAT1Rはすぐに内在化されたのに対し、AT2R単独発現時はAII刺激後も細胞膜にその局在が保持された。次に、共発現時のAT1RおよびAT2Rでの細胞内局在性とその変化を調べた。AII刺激の非存在下でもAT1RおよびAT2Rは細胞膜で共局在し(図3b)、免疫共沈の結果(図2)と一致した。しかし、AII刺激により、AT2RはAT1Rとともに内在化し、顆粒状構造で特に強く共局在していた(図3b)。

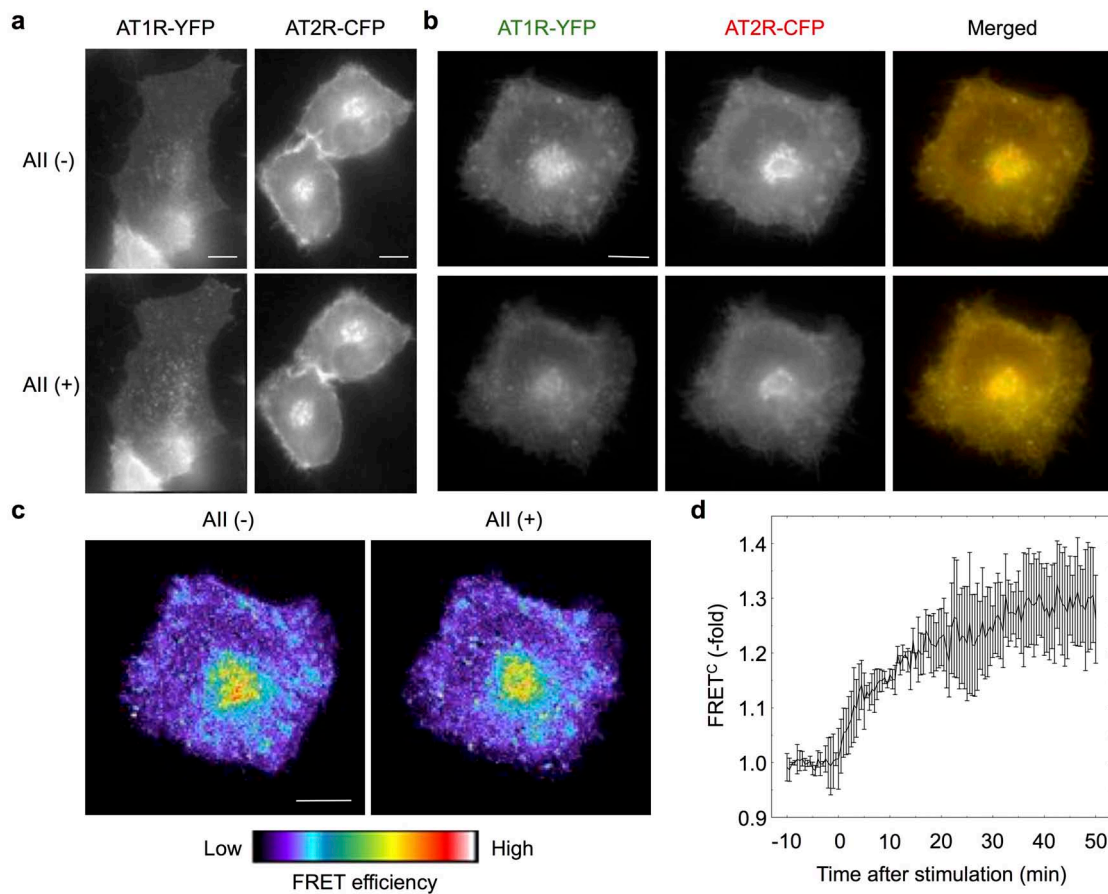


図3. AT2RはAT1Rとともに内在化される

(a) AT1R-YFP または AT2R-CFP を導入した HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。AII 刺激前と刺激後 30 分の画像を示す。(b) AT1R-YFP および AT2R-CFP の両方を発現している HeLa 細胞を用いて多次元タイムラプス蛍光顕微鏡観察を行った。撮像開始後 10 分で AII 刺激を行った。マージ画像を右に示す。(c, d) b と同様に顕微鏡観察した画像を用いて、補正 FRET 画像 (FRET_c) を再構成して疑似カラーモードで表示した (c)。また、平均 FRET_c の時間経過をプロットした (d)。エラーバーは s.e.m. を示す (N = 3)。スケールバー: 50 μm (a-c)。

FRET は生きた細胞内の分子間相互作用を検出するための強力なツールであるので、AT2R-CFP と AT1R-YFP で生じる FRET を解析した (図 3c)。非刺激時には弱い FRET シグナルが検出されたのに対し、AII 刺激によって生じる顆粒状構造において強い FRET が観察された (図 3d)。以上の結果より、AII 非存在下でも AT2R と AT1R が結合しているが、AT1R と AT2R の分子配向は FRET シグナルを強く生じる位置関係にはないこと、AII 刺激により両者の複合体の構造変化が生じ、FRET が生じることが明らかになった。

4. AT1R-AT2R 複合体の構造変化には両受容体へのリガンド結合が必要である

さらに AT1R と AT2R 間の関係を明確にするために、AII 依存性受容体複合体構造変化に対する受容体拮抗薬の効果調べた。AT1R 阻害薬であるロサルタンは、受容体間の FRET シグナルのみならず、両受容体の内在化を完全に抑制した (図 4a, b)。したがって、AII 依存性の受容体内在化および構造変化は AT1R シグナル伝達に完全に依存していたことが示された。一方、AT2R 拮抗薬 PD123319 処理は AT1R の内在化を抑制しないものの、AT2R 輸送および両受容体間の FRET を有意に抑制した (図 4a, b)。よって、AT2R シグナルは受容体ヘテロ二量体の構造変化に、少なくとも部分的に関与していることが示唆された。これらの結果から、両受容体からのシグナルが受容体ヘテロダイマーの構造変化のために不可欠であることを示している。

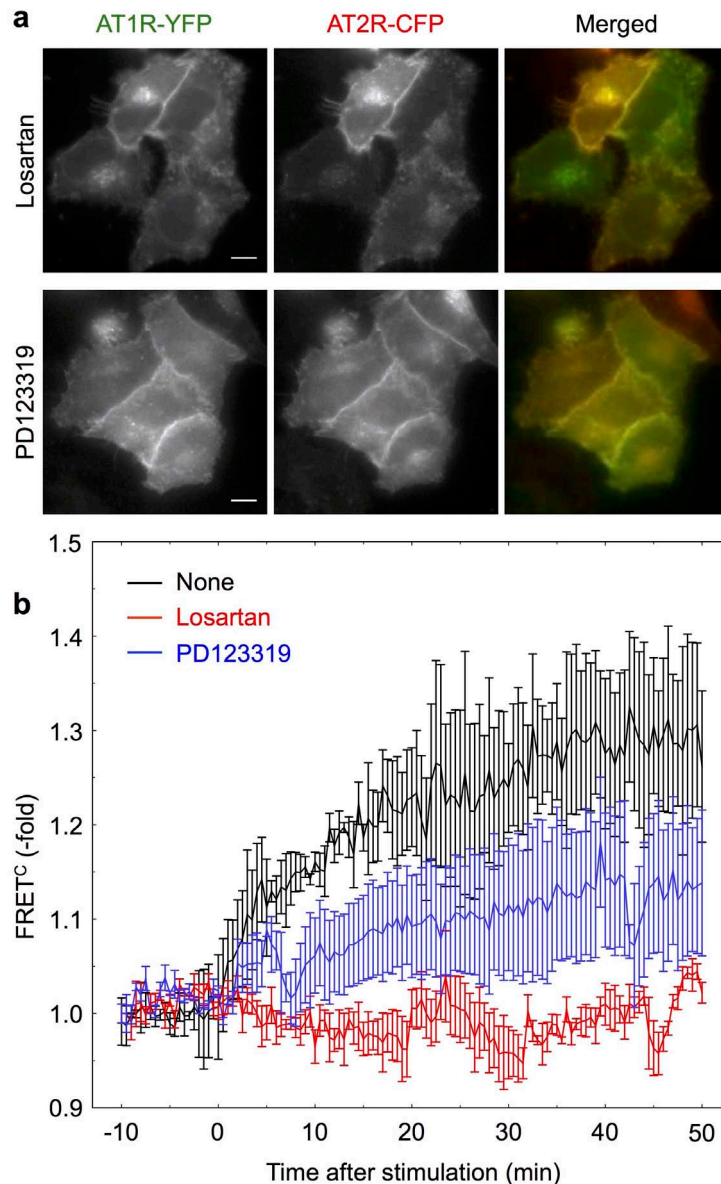


図4. 受容体への AII 結合は受容体複合体内在化に必要である

(a) 図 3c と同様に調製した細胞を、ロサルタンまたは PD123319 のいずれかで前処理した。蛍光顕微鏡による観察を開始した後、時刻 0 で AII 刺激を行った。スケールバー: $50\ \mu\text{m}$ 。(b) a と同様に調製した細胞をタイムラプス顕微鏡で観察した。各細胞群の FRET^c の時間経過をプロットした。エラーバーは s.e.m.を示し (N = 3)。

5. PKC による AT2R リン酸化が AT1R と AT2R の機能連関に重要である

PKC は AT1R の主たる下流のエフェクターの一つであるため、受容体の動態における PKC 阻害薬の効果を検討した。PKC 阻害薬処理は AT1R 内在化に影響を与えなかったのに対し、AT2R の内在化は抑制され、AT1R とは異なる局在を示した (図 5a)。PKC 阻害薬は受容体間の FRET シグナルに対し、AII 刺激後 20 分までは影響を示さなかったのに対し、20 分以降は有意な抑制効果を示した (図 5b)。このデータは、PKC 活性化が AT1R と AT2R と二量体の内在化との機能的関連性 (受容体二量体の構造変化) のために不可欠であることを示している。

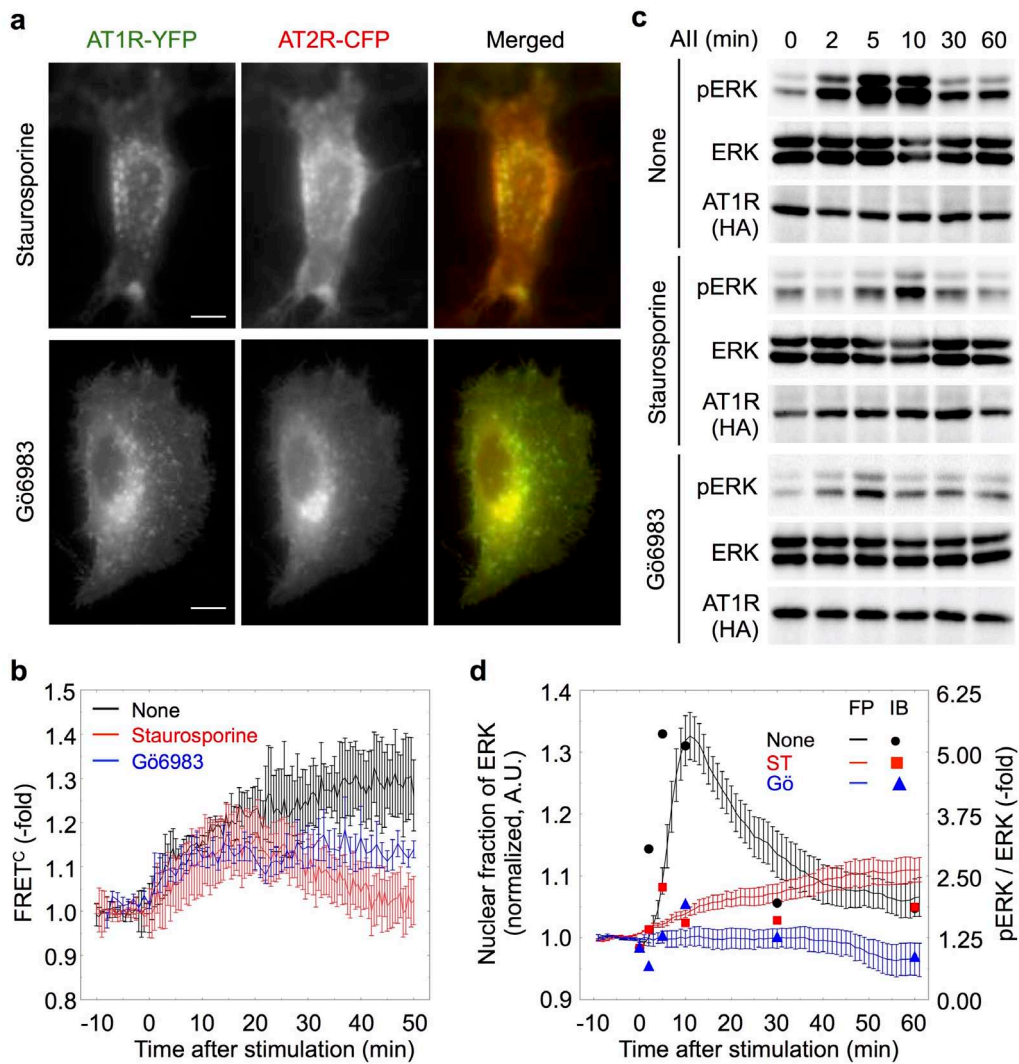


図5. PKC 活性は受容体複合体内在化に必要である

(a, b) HeLa 細胞に AT1R-YFP および AT2R-CFP の発現ベクターを導入した。24 時間後、細胞を PKC 阻害薬 (スタウロスポリンまたは Gö6983 のいずれか) で前処理または未処理のまま 30 分間インキュベートした。続いて細胞を蛍光顕微鏡で観察し、時刻で AII 刺激を行った。代表的な画像を示す。スケールバー: 50 μ m (a)。スタウロスポリンと Gö6976 の存在下または非存在下での FRET^c の時間経過のプロット (b)。エラーバーは s.e.m.を示す (N = 3)。(c) HeLa 細胞に AT1R 発現ベクターまたはコントロールベクターを導入した。24 時間後、細胞をスタウロスポリンまたは Gö6976 のいずれかまたは未処理でインキュベートした後、AII で刺激した。ERK のリン酸化状態を免疫プロットングにより評価しました。(d) AT1R と eqFP650-ERK を発現する HeLa 細胞を、PKC 阻害薬の存在下または非存在下でインキュベートし、蛍光顕微鏡によりモニタリングした。時刻 0 で AII 刺激を行った。核 ERK 蛍光強度比 (FP) と免疫プロットの強度 (IB) を経時的にプロットした。エラーバーは s.e.m.を示す (N = 4)。

最後に、AT1R シグナル伝達に対する AT2 の抑制効果に対する PKC の効果を評価した。PKC は AT1R 依存 ERK 活性化に関与することが報告されているため¹⁰⁾、ERK 活性化をエンドポイントとする本実験系においては PKC 阻害薬の使用は適していない可能性がある。実際、スタウロスポリンまたは Gö6983 処理は、AT1R 依存性の ERK 核移行を阻害する (図 5c, d)。AT2R のアミノ酸配列を解析したところ、C 末端領域に PKC によりリン酸化可能な配列を同定した。抗リン酸化セリン/スレオニン抗体を用いた免疫沈降産物の免疫プロットにより、AII-AT1R シグナルによる AT2R のリン酸化が検出できた (図 6a)。このリン酸化は、AT2R の C 末に存在する 3 つのセリン残基をアラニン

に置換した変異体 (AT2R-3A) では抑制された。また、AT2R-3A は野生型と比較して AT1R 依存的な ERK 活性化に対する抑制効果も小さかった (図 6b)。AT2R-3A 変異体は AT1R 存在下でも内在化や AT1R との共局在は示さず、細胞膜および核周辺領域に局在した (図 6c)。さらに、AT1R と AT2R 間の FRET も 3A 変異体では有意に減弱していた (図 6d)。以上より、AII 依存的かつ AT1R-PKC 依存的な AT2R リン酸化が、AT2R による AT1R シグナル伝達抑制に重要であることが示された。

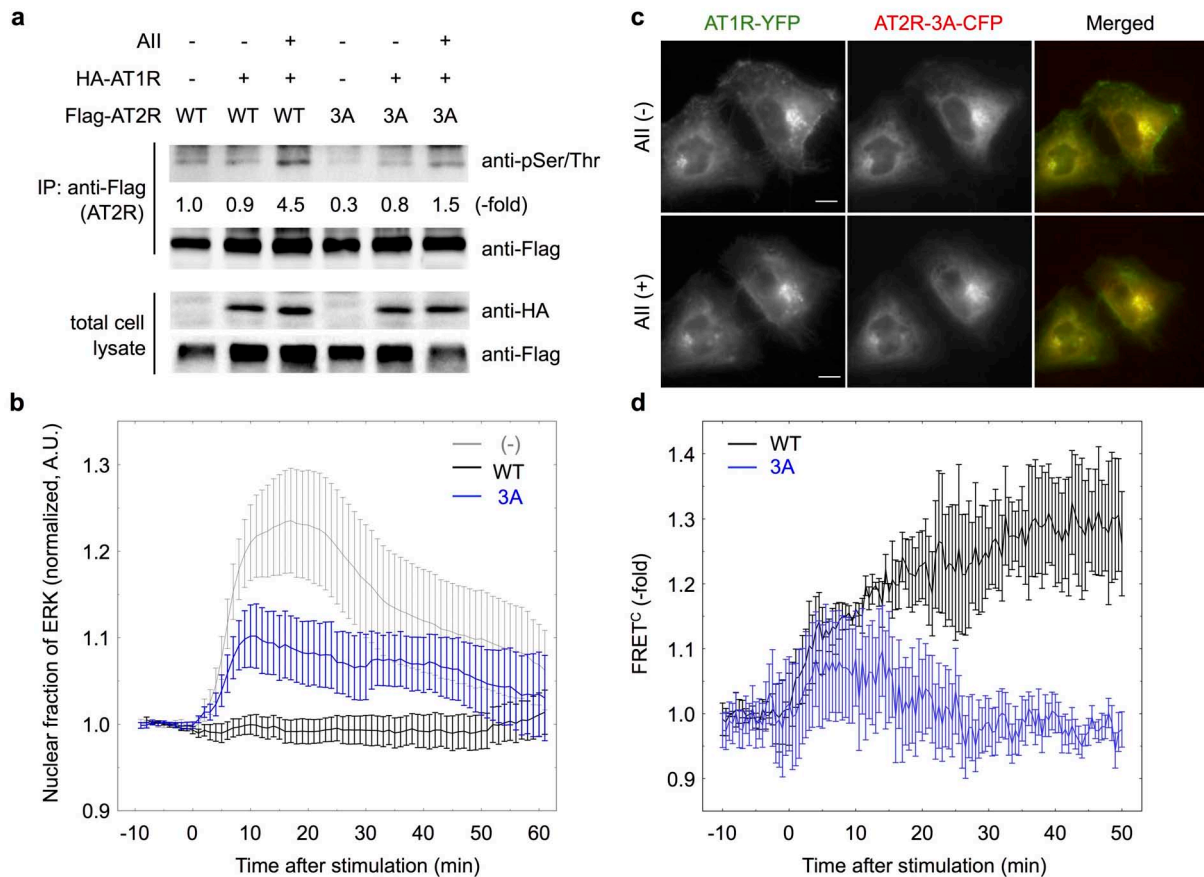


図 6. PKC による AT2R リン酸化は ERK 活性化の阻害に必要である

(a) 上に示すタンパク質の発現ベクターを導入した HeLa 細胞を、4 時間血清飢餓処理し、10 分間 AII によって刺激した。細胞を可溶性バッファーで溶解し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った後に抗リン酸化セリン/スレオニン抗体 (pSer / Thr) または抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングで解析した。(b) HeLa 細胞に eqFP650-ERK、AT1R-YFP および AT2R-CFP か AT2R-3A-CFP のいずれかを発現させ、24 時間後にタイムラプス顕微鏡観察を行った。時刻 0 で AII 刺激を行った。核 ERK 蛍光強度比を経時的にプロットしたエラーバーは s.e.m.を示す (N = 3)。(c、d) HeLa 細胞を AT1R-YFP および AT2R-3A-CFP を発現ベクターでトランスフェクトした。24 時間後、細胞を蛍光顕微鏡観察に付し、AII によって刺激した。代表的な画像を示す。スケールバー: 50 μ m (c)。AT1R と AT2R または AT2R-3A 間 FRET^c の経時変化を示す (d)。エラーバーは s.e.m.を示す (N = 4)。

考 察

本研究により、AT1R と AT2R の複合体形成およびその構造変化が、AT2R による AT1R シグナル伝達の阻害に重要であることが示された (図 7)。また、この減少には PKC による AT2R のリン酸化が重要である。特にこの一連の過程はエンドソームにおいて生じることがイメージングのデータが明らかになっており、シグナル伝達のプラットフォーム

ームとしてのエンドソームの重要性が明らかになってきた。今後はこれらのシグナル伝達の結果生じるエンドソームや細胞内小器官の動態変化やそのホメオスタシスについて、さらに研究を進めていきたい。

尚、本研究の成果については、既に論文発表済である¹¹⁾。

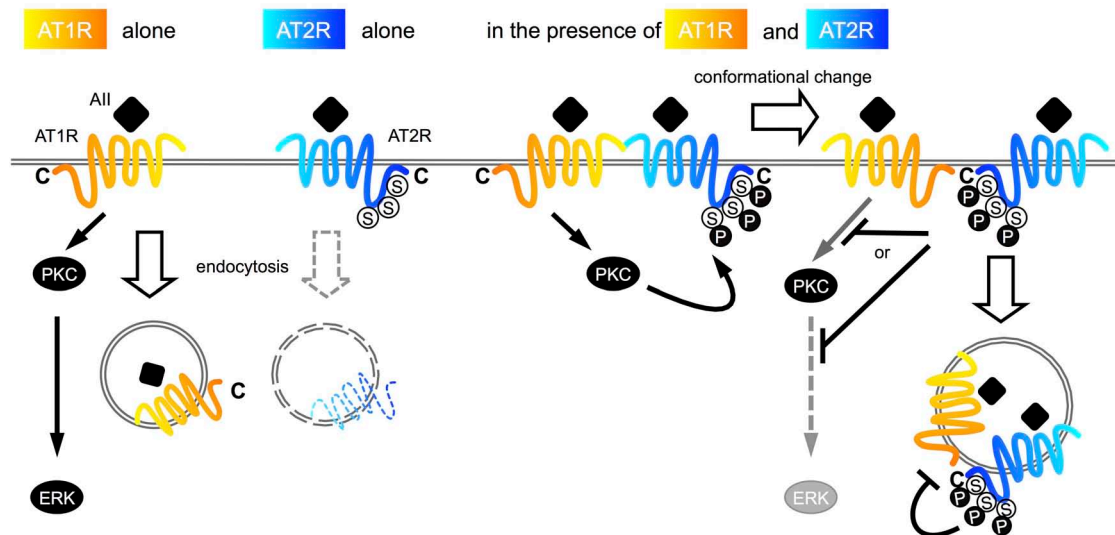


図7. AT2RによるAT1Rシグナル抑制機序の模式図

AIIによるAT1Rの刺激は、PKCを介したERKリン酸化とAT1R自身の内在化を引き起こします。一方AT2R単独では刺激後も細胞膜に留まる。両方の受容体が存在する場合は、AII刺激は、PKCによるAT2RC末端のリン酸化を引き起こし、受容体間ヘテロダイマーの構造変化と受容体複合体の内部移行を誘導する。このプロセスがAT2RによるAT1R依存性ERKリン酸化の抑制に必要なである。

文 献

- 1) Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(1): 11-34. PMID: 10699153
- 2) Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1): C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006 PMID: 16870827
- 3) Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, Delafontaine P. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(10): 2322-32. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.035. PMID: 23769949
- 4) Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension.* 1996; 27(3 Pt 2): 760-5. doi: 10.1161/01.HYP.27.3.760 PMID: 8613237
- 5) Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, Nahmias C. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J.* 1997; 325(Pt 2): 449-454. PMID: 9230127
- 6) shida J, Asada S, Daitoku H, Fujiwara K, Kon Y, Sugaya T, Murakami K, Nakajima T, Kasuya Y, Fukamizu A. Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *Int J Mol Med.* 1999; 3(3): 263-70. PMID: 10028049
- 7) Inuzuka T, Tsuda M, Kawaguchi H, Ohba Y. Transcription factor 8 activates R-Ras to regulate angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379(2): 510-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.101. PMID: 19116136
- 8) AbdAlla S, Lother H, Abdel-tawab AM, Qwitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001; 276(43): 39721-6. PMID: 11507095

- 9) Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Intracellular tracking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(9): 1266-77. PMID: 9259318
- 10) Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80(5): 375-82. PMID: 12056542
- 11) Inuzuka T, Fujioka Y, Tsuda M, Fujioka M, Satoh AO, Horiuchi K, Nishide S, Nanbo A, Tanaka S, Ohba Y. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Sci Rep.* 2016;6:21613. doi: 10.1038/srep21613. PMID: 26857745.