



Angiotensin II type 1 receptor-mediated activation of Ras in cultured rat vascular smooth muscle cells

奥田, 正則

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-12-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2375

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002375>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	おく　だ　まさ　のり 奥　田　正　則	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1714号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成11年12月8日	
学位論文題目	Angiotensin II type 1 receptor-mediated activation of Ras in cultured rat vascular smooth muscle cells （培養ラット血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシンIIタイプ1受容体を介した Ras の活性化）	
審査委員	主査 教授 横山 光 宏 教授 中 村 俊 一 教授 横 野 浩 一	

論文内容の要旨

I. 緒言；

アンジオテンシンIIは血圧や循環血液量の維持に加え、血管平滑筋細胞の増殖促進作用があり、高血圧、動脈硬化、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄といった種々の心血管系疾患の進展に関与していると考えられている。

MAP キナーゼは、多くの細胞において成長因子によって活性されるセリン、スレオニンキナーゼで、MAP キナーゼキナーゼによってチロシン、スレオニン残基がリン酸化を受けて活性化される。活性化された MAP キナーゼは細胞増殖に関与する細胞内酵素、転写因子をリン酸化するが、なかでも、転写因子の p62^{TCF} は、成長因子刺激による *c-fos* プロトオンコジーンの発現を誘導することが明らかにされている。平滑筋細胞において、アンジオテンシンIIは *c-fos* を含めたいくつかのプロトオンコジーンの発原を刺激する。以前に我々は、平滑筋細胞においてアンジオテンシンIIが MAP キナーゼを主として C キナーゼ依存性の機序でリン酸化することを示した。MAP キナーゼ経路はそれゆえ、成長因子受容体の場合と同様、アンジオテンシンII受容体から核への重要なシグナル伝達経路の一つであると考えられている。

ras プロトオンコジーン産物の Ras 蛋白は膜結合性 GTPase であり、様々な成長因子のチロシンキナーゼ型受容体から MAP キナーゼへのシグナルにおいて重要な働きをしている。最近の研究では、Ras の活性化はいくつかの G 蛋白カップル型受容体における MAP キナーゼ活性化に関与していることが報告されているが、平滑筋細胞において、アンジオテンシンIIが Ras を活性化するかどうかは明らかでなかった。我々は、アンジオテンシンIIがアンジオテンシンIIタイプ1（AT1）受容体を介して Ras を活性化することを示し、さらに百日咳毒素に対する反応性の違いから、Ras の活性化がアンジオテンシンIIによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導に不可欠でないことを示した。

II. 方法

培養ラット大動脈平滑筋細胞を用いて、以下の方法で実験を行った。

1) Ras 結合 GDP,GTP の解析

平滑筋細胞を [P^{32}] -正リン酸で標識した後、様々なアゴニストで刺激した。免疫沈降した Ras と結合している GDP 及び GTP を薄層クロマトグラフィー法により分離し、バイオイメージングアナライザーを用いて %GTP / (GDP+GTP) を Ras 活性化の指標として計測した。

2) MAP キナーゼ内リン酸化アッセイ

細胞抽出液を MAP キナーゼの基質であるミエリン塩基性蛋白を含むゲルを用いてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。ゲル内で酵素反応が可能となる状態に戻すため、ゲルから SDS を除去し、ゲル内蛋白の変性、再変性処理を行った。その後、ゲルを [γ -P32] ATP と反応させ、ゲル内でリン酸化を受けたミエリン塩基性蛋白の放射性活性をバイオイメージングアナライザーで解析した。

3) 抗 MAP キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット解析

細胞抽出液を SDS-PAGE した後、ニトロセルロース膜に転写した。抗 MAP キナーゼモノクローナル抗体を一次抗体とし、また、ペルオキシターゼで標識したヒツジ抗マウス IgG 抗体を二次抗体として用いた。ペルオキシターゼで標識した蛋白はジアミノベンジジンを基質として可視化された。MAP キナーゼの活性化はリン酸化によるバンドの上方移動によって判定した。

4) *c-fos* RNA レベルの解析 (ノザンブロット法)

AGPC 法によって回収した総 RNA を、ホルムアルデヒドを含む 1 % アガロースゲルを用いて電気泳動した。RNA をニトロセルロース膜上へ転写し、 [P^{32}] で標識した *v-fos* cDNA プローブによりランダムプライマー法でハイブリダイゼーションを行った。膜を十分洗浄した後、バイオイメージングアナライザーによって、*c-fos* mRNA レベルを解析した。

III. 結果

1) AT1 受容体を介して Ras は活性化される。

平滑筋細胞を 100nM のアンジオテンシン II で刺激すると、活性化した Ras の比率は 2 - 5 分以内に約 3 倍に上昇し、100nM/ml の EGF で刺激した時とはほぼ同程度に Ras が活性化された。その後、5 分をピークとして約 30 分以内に活性化 Ras 率はほぼ刺激前のレベルに復した。アンジオテンシン II による Ras の活性化は濃度依存性で、EC50 は約 1 nM であった。

この反応は AT1 受容体拮抗剤の CV-11974 により完全に抑制された。AT1 受容体は、百日咳毒素非感受性の Gq 蛋白を介してホスホリパーゼ C を活性化し、ホスホイノシチドの過水分解から C キナーゼの活性化と細胞内カルシウムの上昇を促すと考えられているが、C キナーゼを活性化するホルボールエステルの PMA、カルシウムイオノフォアのイオマイシンは Ras を活性化しなかった。

2) アンジオテンシン II による Ras 活性化に百日咳毒素感受性 G 蛋白が関与する。

平滑筋細胞を 500ng/ml の百日咳毒素で 5 時間処理すると、Gi 蛋白の α サブユニットがほぼ完全に ADP リボシル化されること、すなわち、Gi 蛋白機能を抑制できることを我々は以前に報告している。この方法によって、EGF による Ras の活性化は抑制されなかったが、アンジオテンシン II による Ras の活性化は約 70% 抑制された。

3) アンジオテンシン II による MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導は百日咳毒素非感受性である。

ゲル内キナーゼアッセイによる検討で、アンジオテンシン II は、44kDa、42kDa の MAP キナーゼを、2 - 5 分以内の早い時間経過で急速に活性化したが、この反応は百日咳毒素によって全く抑制さ

れなかった。また、抗 MAP キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法においてもアンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化に百日咳毒素は無効であった。

ノザンブロット法によるアンジオテンシンⅡによる *c-fos* 発現の誘導に対する百日咳毒素の効果を検討したが、抑制効果は全く認めなかった。

IV. 考察

Ras の活性化は2つの反応によって調節されている。1つは GDP 結合型から GTP 結合型への変換反応で、この反応はグアニンヌクレオチド変換因子によって触媒される。もう1つは、GTP の過水分解反応による Ras の不活性化反応で、これは GTPase 活性化蛋白 (GAPs) によって刺激される。アンジオテンシンⅡによる Ras の活性化がどちらの機序によって調節されているかについてはさらなる検討が必要であるが、この論文は、血管平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡが Ras の GTP 結合型の形成を促進し、Ras を著明に活性化させることを示した初めての報告である。

我々はまた、Ras の活性化が AT1 受容体を介していることを明らかにした。AT1 受容体の活性化は、ホスホリパーゼ C によるホスホイノシチドの過水分解を促し、C キナーゼの活性化と細胞内カルシウムの上昇を引き起こす。AT1 受容体からホスホリパーゼ C へのシグナルは Gq 蛋白を介していると考えられているので、この経路がアンジオテンシンⅡによる Ras の活性化に関与している可能性が考えられた。T リンパ球や PC12 細胞において、C キナーゼは Ras の活性化に関与していることが知られており、また、PC12 細胞においては、細胞内カルシウムの上昇が Ras を活性化させるという報告もある。しかし、我々の検討では、平滑筋細胞においては C キナーゼの活性化も細胞内カルシウムの上昇も Ras を活性化しなかった。この結果は Ras の活性化が Gq 蛋白に依存しないことを示唆する。一方、ラット大動脈において、アンジオテンシンⅡの受容体が百日咳毒素感受性の Gi 蛋白とカップルしていることが示されており、百日咳毒素がアンジオテンシンⅡによる Ras の活性化を著明に抑制したことから、アンジオテンシンⅡによる Ras の活性化には Gi 蛋白が関与していることが示唆された。

G 蛋白カップル型受容体における MAP キナーゼ活性化における Ras の関与はアゴニストや細胞の種類により大きく異なる。平滑筋細胞においては、百日咳毒素の前処理はアンジオテンシンⅡによる Ras の活性化を著明に抑制したが、MAP キナーゼの活性化や *c-fos* の発現は抑制しなかった。百日咳毒素による Ras の抑制は完全ではなかったため、残存する Ras 活性が MAP キナーゼの活性化に関与している可能性は否定できない。しかし、PMA による C キナーゼの活性化が Ras を活性化しないにもかかわらず、MAP キナーゼを活性化することを考慮すれば、少なくとも、平滑筋細胞においてはアンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導に対して、Ras は必要不可欠な因子ではないと考えられる。アンジオテンシンⅡによって活性化される Ras の機能については明らかでないが、Ras は、K⁺チャンネル活性を調節する可能性が指摘されており、血管収縮などの細胞反応に関与しているのかもしれない。今後、平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡによって活性化される Ras が、どのような働きをしているかを検討する必要がある。

V. 結論

血管平滑筋細胞において、

1) アンジオテンシンⅡは、AT1 受容体及び Gi 蛋白を介して、時間及び濃度依存性に Ras を活性化する。

2) アンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導に関して、Ras の活性化は必ずしも不可欠ではない。

論文審査の結果の要旨

アンジオテンシンⅡは血圧や循環血流量の維持に加え、血管平滑筋細胞の増殖促進作用があり、高血圧、動脈硬化、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄といった種々の心血管経疾患の進展に関与していると考えられている。

MAP キナーゼは、多くの細胞において成長因子によって活性化されるセリン、スレオニンキナーゼで、MAP キナーゼによってチロシン、スレオニン残基がリン酸化を受けて活性化される。活性化された MAP キナーゼは細胞増殖に関与する細胞内酵素、転写因子をリン酸化するが、なかでも、転写因子の p62^{TCF} は、成長因子刺激による *c-fos* プロトオンコジーンを発現を誘導することが明らかにされている。以前に我々は、平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡが MAP キナーゼを主として C キナーゼ依存性の機序でリン酸化することを示した。MAP キナーゼ経路はそれゆえ、成長因子受容体の場合と同様、アンジオテンシンⅡ受容体から核への重要なシグナル伝達経路の一つであると考えられている。

ras プロトオンコジーン産物の Ras 蛋白は膜結合性 GTPase であり、様々な成長因子のチロシンキナーゼ型受容体から MAP キナーゼへのシグナルにおいて重要な働きをしている。最近の研究では、Ras の活性化はいくつかの G 蛋白カップル型受容体における MAP キナーゼ活性化に関与していることが報告されているが、平滑筋細胞において、アンジオテンシンⅡが Ras を活性化するかどうかは明らかでない。そこで、以下の検討を行った。

1) 培養ラット大動脈平滑筋細胞を 100nM のアンジオテンシンⅡで刺激すると、活性化した Ras の比率は 2-5 分以内に約 3 倍に上昇し、100ng/ml の EGF で刺激した時とほぼ同程度に Ras が活性化された。その後、5 分をピークとして約 30 分以内に活性化 Ras 率はほぼ刺激前のレベルに復した。アンジオテンシンⅡによる Ras の活性化は濃度依存性で、EC50 は約 1 nM であった。

この反応は ATI 受容体拮抗剤の CV-11974 により完全に抑制された。ATI 受容体刺激は、ホスホリパーゼ C を活性化し、ホスホイノシチドの過水分解から C キナーゼの活性化と細胞内カルシウムの上昇を促すと考えられているが、C キナーゼを活性化するホルボールエステルの PMA、カルシウムイオンフォアのイオノマイシンは Ras を活性化しなかった。

2) 平滑筋細胞を 500ng/ml の百日咳毒素で 5 時間処理すると EGF による Ras の活性化は抑制されなかったが、アンジオテンシンⅡによる Ras の活性化は約 70% 抑制された。従ってアンジオテンシンⅡによる Ras の活性化に百日咳毒素感受性 G 蛋白が関与する。

3) ミエリン酸性蛋白を用いてのゲル内キナーゼアッセイによる検討で、アンジオテンシンⅡは、44kDa、42kDa の MAP キナーゼを、2-5 分以内の早い時間経過で急速に活性化したが、この反応は百日咳毒素によって全く抑制されなかった。また、抗 MAP キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法においてもアンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化に百日咳毒素は無効であった。

ノザンブロット法によりアンジオテンシンⅡによる *c-fos* mRNA の発現誘導に対する百日咳毒素の効果を検討したが、抑制効果は全く認められなかった。従って、アンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導は百日咳毒素非感受性である。

G 蛋白カップル型受容体における MAP キナーゼ活性化における Ras の関与はアゴニストや細胞の

種類により大きく異なる。平滑筋細胞においては、百日咳毒素の前処理はアンジオテンシンⅡによる Ras の活性化を著明に抑制したが、MAP キナーゼの活性化や *c-fos* の発現は抑制しなかった。百日咳毒素による Ras の抑制は完全ではなかったため、残存する Ras 活性が MAP キナーゼの活性化に関与している可能性は否定できない。しかし、PMA による C キナーゼの活性化が Ras を活性化しないにもかかわらず、MAP キナーゼを活性化することを考慮すれば、少なくとも、平滑筋細胞においてはアンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導に対して、Ras は必要不可欠な因子ではないと考えられる。アンジオテンシンⅡによって活性化される Ras の機能については明らかではないが、Ras、K⁺チャンネル活性を調節する可能性が指標されており、血管収縮などの細胞反応に関与しているのかもしれない。今後、平滑筋細胞においてアンジオテンシンⅡによって活性化される Ras が、どのような働きをしているかを検討する必要がある。

本研究は血管平滑筋におけるアンジオテンシンⅡの細胞内シグナル伝達について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアンジオテンシンⅡは、ATI 受容体および Gi 蛋白を介して、時間および濃度依存性に Ras を活性化する。更に、アンジオテンシンⅡによる MAP キナーゼの活性化と *c-fos* の発現誘導に関して、Ras の活性化は必ずしも不可欠ではないという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。