

機関番号：32610

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790819

研究課題名 (和文) 尿酸輸送体 URATv1 のスプライスバリエントによる極性輸送変化と血中尿酸値の調節

研究課題名 (英文) Changing of intracellular trafficking in polarized cells and regulation of serum urate level by the splicing variants of urate transporter URATv1.

研究代表者

木村 徹 (KIMURA TORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30433725

研究成果の概要 (和文)：

電位依存性尿酸排泄トランスポーターURATv1にはスプライスバリエントが存在する。それはN末端が短い(URATv1-S)もしくはN末端が長い(URATv1-L)という2種類のURATv1である。これらアイソフォームのヒト腎臓組織での発現と細胞内でのソーティングメカニズムの解明を目的として研究を行った。URATv1-Sは主に腎遠位尿細管の管腔側に、URATv1-Lは主に腎近位尿細管の血管側に発現が見られた。また、イヌ腎臓由来細胞であるMDCK細胞を用いたin vitroの解析によって、URATv1-Lの極性発現にはN末端領域が重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

It has been reported that two splicing variants of URATv1 are exist. One is the short isoform (URATv1-S) that composed with 512 amino acids and the other one is the long isoform (URATv1-L) that composed with 540 amino acids. URATv1-S was expressed in apical side of renal distal tubules. On the other hand, URATv1-L was expressed in basolateral side of renal proximal tubules. GFP fused URATv1s were expressed in MDCK cells and intracellular localization was observed to analyze trafficking mechanism in vitro. It seems that N-terminal of URATv1-L includes sorting signal to basolateral membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：尿酸、トランスポーター、腎臓、極性発現

1. 研究開始当初の背景

尿酸は、ヒトにおいてアデノシンやグアノシンといったプリン体の最終代謝産物である。この尿酸の代謝経路はヒトおよびその近縁の類人猿に特有のものであり、他の種においては、尿酸は尿酸酸化酵素（ユリケース）によって開裂を受け代謝される。したがって、ヒトでは血清尿酸値が高値を示し、尿酸の排

泄低下や産生亢進によって高尿酸血症を発症する。悪性物質としての側面のみが強調されてきた尿酸であるが、近年ではラジカルスカベンジャーとして中枢神経保護作用を持ち、生体にとって正に働いているという報告も相次いでいる。よって、生体内における尿酸の排泄・再吸収を行うシステムの機能解析が生体にとって重要と考えられる。

当研究室において、有機陰イオントランスポーターファミリーに属する URAT1 のクローニングがなされ、この URAT1 が腎近位尿細管管腔膜に存在し、尿酸の再吸収を行っている尿酸トランスポーターであることが証明された (Enomoto et al. Nature 417 447-452, 2002)。URAT1 の発見により近位尿細管管腔側の尿酸再吸収の過程は明らかとなったが、尿酸がどのように血管側に運ばれるのか、その血流側の排出路は長い間不明であった。近年我々は、グルコーストランスポーターに属する GLUT9 (SLC2A9) が、尿酸に対して高い輸送活性を持つ排泄型の尿酸トランスポーターであり、近位尿細管の血流側に存在して尿酸の排泄路として働いていることを示した (Anzai et al. J Biol Chem 283 26834-8 2008) (図 1)。GLUT9 の輸送活性は電位依存性であったことから、我々は URATv1 と改名した。今回私は、この URATv1 に着目して研究を行った。

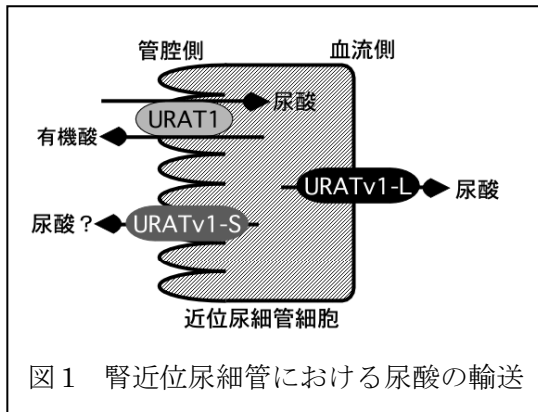


図 1 腎近位尿細管における尿酸の輸送

2. 研究の目的

URATv1 には以前からスプライスバリエントが存在することが報告されている (Augustin et al. J Biol Chem 279 16229-36 2004)。この2つのスプライスバリエントは、開始コドンの位置が異なることによって作られる N 末端が短い 512 アミノ酸 (URATv1-S とする) または N 末端が長い 540 アミノ酸 (URATv1-L とする) の 2 種類の URATv1 である。しかしながら、この URATv1-S と URATv1-L の細胞内極性輸送や血中尿酸値の調節に関する報告はない。細胞内の極性輸送は、輸送される目的のタンパク質に結合するタンパク質が決定することがほとんどである。そこで申請者は、2つのスプライスバリエントをそれぞれ認識する抗体を作製し、ヒト腎臓組織における局在を明らかにし、URATv1-S と URATv1-L の異なる N 末端に結合し極性輸送を担うタンパク質を探索し、それに伴う血中尿酸値の調節機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 腎尿細管における URATv1 の発現部位の検討

URATv1-S と URATv1-L との間で異なる N 末端を GST と融合する形で精製した。これをウサギに免疫することによって、URATv1-S と URATv1-L をそれぞれ認識する抗体を得た。この抗体を用いてヒト腎臓組織切片の免疫染色を行い、それぞれの発現部位の検討を行った。

(2) Yeast two hybrid screening による URATv1 結合タンパク質の同定

スプライスバリエント間で異なる N 末端領域の bait を作製し、それらによる Yeast two hybrid スクリーニングを行った。prey には、腎臓 cDNA ライブラリーを用いた。

(3) URATv1 内に存在する極性輸送ターゲットティングシグナル部位の解析

腎臓由来細胞である MDCK 細胞に蛍光タンパク質 (GFP) を融合させた URATv1-S または URATv1-L を発現させた。発現させた URATv1-S と URATv1-L が管腔側、基底側に発現しているのかはつきりさせるため、管腔側または基底側から細胞膜タンパクをビオチン化し、それぞれの細胞膜を可視化した。それぞれには、極性輸送に関わるターゲットティングシグナルが存在するはずであり、このシグナル部位を決定するために、N 末端から数残基ずつを欠失させた変異体を作製し、MDCK 細胞に発現させてその細胞内極性輸送に関わるアミノ酸配列部位の決定を行った。

4. 研究成果

(1) 腎尿細管における URATv1 の発現部位の検討

図 2 に URATv1 の N 末端領域のアミノ酸配列を示した。URATv1-S と URATv1-L の N 末端はそれぞれ 21、50 アミノ酸残基異なっており、URATv1-L の配列中には細胞内極性発現に重要であると思われる di-leucine モチーフが存在する。

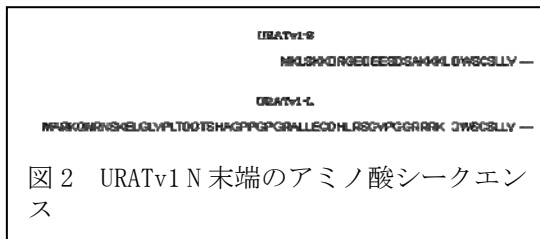


図 2 URATv1 N 末端のアミノ酸シーケンス

この異なるアミノ酸配列を認識する抗体を作成し、腎臓組織切片の蛍光染色を行った (図 3、図 4)。まず初めに、近位尿細管マー

カーである Lotus レクチンとの共染色を行った (図 3)。その結果、URATv1-S は近位尿細管にはほとんど発現していなかった。これに対し URATv1-L では近位尿細管にその発現が認められ、とくに基底膜/血管側に強いシグナルが認められた。

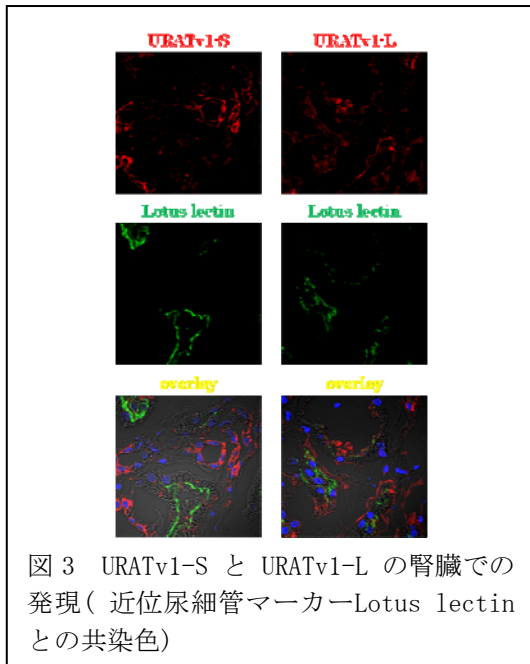


図 3 URATv1-S と URATv1-L の腎臓での発現 (近位尿細管マーカー Lotus lectin との共染色)

次に、皮質集合管のマーカーである DB レクチンとの共染色を行った (図 4)。URATv1-L は、DB レクチンで染色される遠位尿細管にはほとんど発現していなかったが、URATv1-S では皮質集合管の管腔側に強いシグナルが認められた。

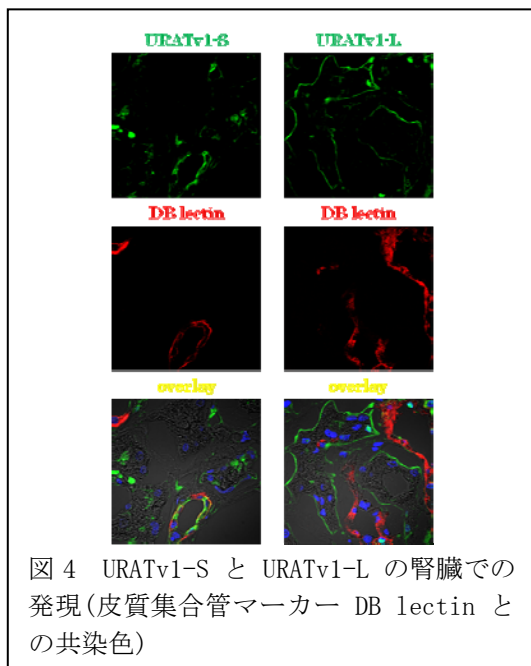


図 4 URATv1-S と URATv1-L の腎臓での発現 (皮質集合管マーカー DB lectin との共染色)

このように URATv1-S と URATv1-L では、発現している尿細管もその極性発現も全く異なっていた。

(2) Yeast two hybrid screening による URATv1 結合タンパク質の同定

URATv1-S と URATv1-L のスプライスバリエーション間で異なる N 末端領域にそれぞれ結合するタンパク質を同定するため、Yeast two hybrid screening を行った。URATv1 の異なる領域を bait、腎臓 cDNA ライブラリーを prey としてスクリーニングを行い、いくつかのポジティブクローンを得た。このうち、細胞内トラフィックに関与することが予想されるタンパク質を列挙すると、URATv1-S では、plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa、dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2、moesin など が得られた。URATv1-L では、ubiquitin-conjugating enzyme E2K、tyrosine 3-monooxygenase /tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide、PDZ domain containing 1 など が得られた。今後、これらタンパク質のノックダウンを行い、URATv1-S と URATv1-L の細胞内局在に与える影響を調べる必要がある。

(3) URATv1 内に存在する極性輸送ターゲットイングシグナル部位の解析

まず初めに、GFP を融合させた URATv1-S と URATv1-L をそれぞれ MDCK 細胞に導入し、細胞内局在の観察を行った (図 5、図 6)。発現させた URATv1 は緑色、ビオチン化した細胞表面は赤色で示しており、上段の大きなパネルが XY 平面、下段の小さいパネルが z 軸のコンフォーカル像を示している。URATv1-S は図 5 に示したように、管腔側と基底側の両方に発現が見られた。これに対し、URATv1-L では、基底側のみに発現が見られた (図 6)。

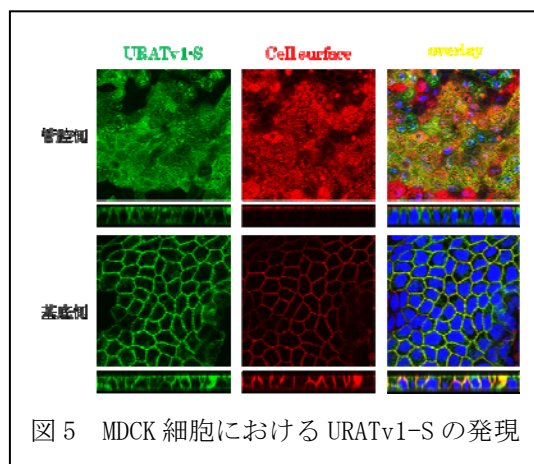


図 5 MDCK 細胞における URATv1-S の発現

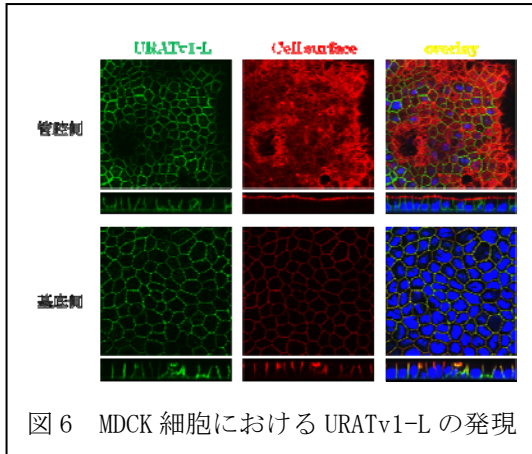


図6 MDCK細胞におけるURATv1-Lの発現

したがって、URATv1-SとURATv1-Lとの間で異なっているアミノ酸配列内に、極性輸送に関わるターゲティングシグナルが存在するはずである。このシグナル部位を決定するために、N末端から数残基ずつを欠失させた変異体を作製し、MDCK細胞に発現させてその細胞内極性輸送に関わるアミノ酸配列部位の同定を行った。図7に本研究で用いたURATv1-Sの欠失体を示した。これらをMDCK細胞に導入して検討を行った結果、URATv1-Sでは、N末端側のアミノ酸16残基を欠失させても(D4S)、野生型のURATv1-Sと同様に管腔側を基底側の両方に発現が見られた。URATv1-Lと異なる部位、つまり20残基を欠失させると(D5S)、タンパク質として不安定になるためか、発現がほとんど見られなかった。URATv1-Lについても同様に欠失体を用いて検討を行った(図8)。N末端から25残基欠失させても(D5L)、野生型のURATv1-Lと同様に基底膜にのみ発現が見られた。これに対し、N末端から30残基を欠失させると(D6L)、野生型と異なり管腔側と基底側の両方に発現が見られるようになった(図9)。これらの結果から、URATv1-LのN末端の26から30番目の間に極性発現に重要な部位が存在することが考えられた。そこで、この26から30番目のアミノ酸をアラニンに置換した変異体に関して検討を行った。

URATv1-S	
Wild	MKLSKKDRGEDEESDSAKKKL DWS--
D1S	M KDRGEDEESDSAKKKL DWS--
D2S	M EDEESDSAKKKL DWS--
D3S	M SDSAKKKL DWS--
D4S	M KKKL DWS--
D5S	M DWS--

図7 研究に用いたURATv1-Sの欠失体

Wild	BARPCMESEKLGAPPVTDOTSHGPPCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D1L	M BARCKLGAPPVTDOTSHGPPCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D2L	M LGAPPVTDOTSHGPPCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D3L	M VTDOTSHGPPCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D4L	M SHGPPCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D5L	M PCGBALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D6L	M ALLECTHLASGTPGGRK DWS--
D7L	M DTLASGTPGGRK DWS--
D8L	M GTPGGRK DWS--
D9L	M RKRK DWS--
D10L	M DWS--

図8 研究に用いたURATv1-Lの欠失体

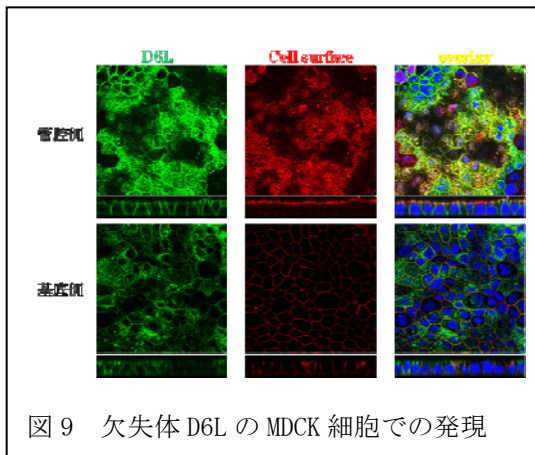


図9 欠失体D6LのMDCK細胞での発現

しかしながら、この変異体は野生型のURATv1-Lと同様に基底膜のみに発現が見られた(図10)。また、URATv1-LのN末端領域には細胞内の極性発現に重要であるとされる di-leucine モチーフが存在するため、この部位のアラニン変異体に関して検討を行った。しかしながら、この変異体も野生型のURATv1-Lと同様に基底膜のみに発現が見られた(データは示さず)。

以上の結果から、URATv1-Lの細胞内トラフィックにはN末端領域が重要であるが、そのトラフィックに関与する領域が複数存在することが示唆された。

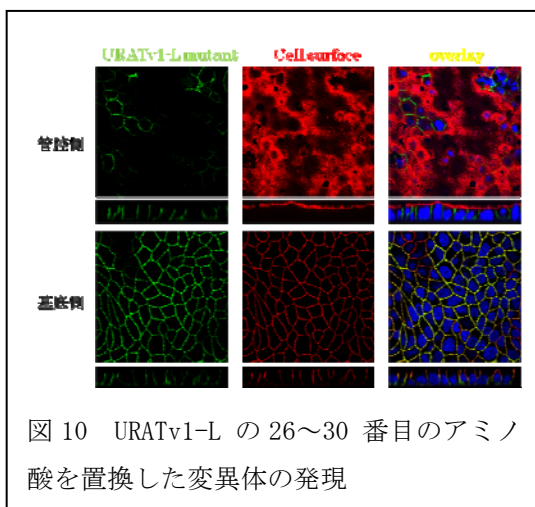


図10 URATv1-Lの26~30番目のアミノ酸を置換した変異体の発現

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Jutabha P, Anzai N, Kimura T, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Endou H, Sakurai H. Functional Analysis of Human Sodium-Phosphate Transporter 4 (NPT4/SLC17A3) Polymorphisms. J Pharmacol Sci. 2011, 115 : 249-53 査読あり

② Jutabha P, Anzai N, Kitamura K, Taniguchi A, Kaneko S, Yan K, Yamada H, Shimada H, Kimura T, Katada T, Fukutomi T, Tomita K, Urano W, Yamanaka H, Seki G, Fujita T, Moriyama Y, Yamada A, Uchida S, Wempe MF, Endou H, Sakurai H. Human sodium-phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. J Biol Chem. 2010, 285 : 35123-32. 査読あり

③ 塚田愛、木村徹、Promsuk Jutabha、安西尚彦、市田公美、櫻井裕之 尿酸トランスポーターURAT1 トランスジェニックマウスにおける尿酸の体内動態 痛風と核酸代謝 34 : 171-178 2010

④ 木村徹、安西尚彦、Promsuk Jutabha、三浦大作、遠藤仁、櫻井裕之 新規尿酸排出トランスポーターURATv1 の尿酸輸送特性の解析 痛風と核酸代謝 33: 177-182 2009 査読あり

⑤ 安西尚彦、Promsuk Jutabha、木村徹、櫻井裕之 腎臓の尿酸トランスポーター：最近の進歩 痛風と核酸代謝 33: 7-15, 2009 査読なし

[学会発表] (計7件)

① Toru Kimura Elucidation of urate transport mechanism by analysis of renal urate transporters' transgenic mice. 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (PP11) 2011年2月19日 新宿

② 木村徹、尿酸トランスポーターURATv1/GLUT9 の組織発現と極性細胞におけるソーティングの解析、第44回日本痛風・核酸代謝学会総会、2011年2月19日 新宿

③ Toru Kimura, Isoform specific tissue distribution of URATv1/GLUT9 and their trafficking in the polarized cells. 50th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2010年12月13日 アメリカ フィラデルフィア

④ 木村徹、尿酸輸送体過剰発現マウスを用いた尿酸輸送機構の解析、第53回日本腎臓学会年会、2010年6月16日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 徹 (KIMURA TORU)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：30433725

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安西 尚彦 (ANZAI NAOHIKO)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号：70276054