

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790789

研究課題名（和文）日本人型遺伝子変異によるシスチン尿症のペプチドミメティック薬治療に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Basic study for treatment of Japanese type of Cystinuria by peptidomimetic drugs

研究代表者

永森 收志（NAGAMORI SHUSHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90467572

研究成果の概要（和文）：

シスチン尿症は、シスチンを腎尿細管から再吸収するトランスポーターの機能不全によりシスチンが多発性結石を形成し、重篤な腎機能障害に陥る常染色体劣性の疾患である。日本人のシスチン尿症原因変異の約 80% がトランスポーター C 末端領域の 1 アミノ酸残基置換 P482L である。本研究では日本人変異型トランスポーターの生体内における機能喪失機序を *in vitro* および *in vivo* であきらかにし、治療法開発への方向性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Cystinuria is an inherited disorder of renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids by dysfunction of the transporter. It results in nephrolithiasis of cystine and leads to kidney failure. 80% of Japanese patients have the same mutation P482L at the C terminal of the cystine transporter. In this study, we have revealed the mechanism for the dysfunction of the mutant transporter *in vitro* and *in vivo*. This opens the door for treatment of the disease in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：トランスポーター、シスチン尿症、遺伝病、ペプチドミメティック薬、病態モデル

## 1. 研究開始当初の背景

シスチン尿症は、腎近位尿細管管腔側の 1 回膜貫通型タンパク質 rBAT (SLC3A1) と 12 回膜貫通型タンパク質 BAT1/b<sup>0</sup>+AT (SLC7A9) の二つのサブユニットからなるヘテロ二量体型シスチントランスポーターの遺伝的変異による常染色体劣性の疾患で

ある。シスチン及び塩基性アミノ酸の近位尿細管における再吸収機構であるシスチントランスポーターの機能不全により、溶解度の低いシスチンが多発性の結石を形成し、重篤な腎機能障害に陥る。サブユニットのうち、b<sup>0</sup>+AT の分子同定は本研究の研究協力者である金井好克教授ら複数のグループによって

なされ、b<sup>0</sup>+AT が物質輸送機能を司るトランスポーターの本体であることが明らかになった(1)。どちらのサブユニットの変異によってもシスチン尿症となるが、日本人症例の約80%において b<sup>0</sup>+AT の C 末端にある第 482 残基であるプロリンからロイシンへの変異 (P482L) が見られる一方で、比較的症例報告の多い欧米人にはこれまでのところ一件 (0.001%程度) しか同様の変異が報告されていない(2, 3, 4)。

一般的に、トランスポーターの C 末端領域は基質の輸送には直接関与しないと考えられており、むしろ C 末端領域の変異や欠損はトランスポーターの細胞膜への局在化の異常をもたらす例が多数報告されている。ところが P482L 変異体の場合、培養細胞をもちいた実験において野生型同様に発現が細胞膜上に見られるにもかかわらずトランスポーターの機能を完全に喪失している(2)。トランスポーターが細胞膜上に存在することから、P482L 変異による病態発現は細胞膜移行の異常によるものではないことが示されている。ところが前述のように C 末端領域は基質の輸送には重要でないとされているため、P482L 変異がどのようにトランスポーターの機能を損ない、病態発現に関わっているかはまったく不明であった。

興味深いことに、P482 をロイシン以外的大型側鎖を持つアミノ酸に置換した場合もトランスポーターの機能が失われた(2)。このことから、この C 末端領域におけるタンパク質間相互作用が、野生型と変異型で異なっていることが示唆された。一方で、シスチントランスポーター b<sup>0</sup>+AT と同じ SLC7 ファミリーに属する大型中性アミノ酸トランスポーター LAT1 は、トランスポーター本体単独で輸送機能を持つことが精製タンパク質を用いた実験で確認出来ていること (未発表データ) や前述のように他の多くのトランスポーターの研究結果から、C 末端領域に結合するタンパク質がトランスポーターの機能そのものに必要だとは考えにくい。そこで、P482L 変異体の C 末端領域に特定のタンパク質が非生理的に結合することによってシスチントランスポーター機能が失われるという仮説を立て、以下のようにして P482L 変異を持つ b<sup>0</sup>+AT の C 末端にのみ結合するタンパク質を同定することに成功した (投稿準備中)。

まず、野生型および P482L 変異型 C 末端領域とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を発現、精製し、培養した HEK293 細胞から調整した細胞可溶化液に対して Pull-down を行った。得られた試料を SDS-PAGE 上で展開し、GST-P482L 融合タンパク質のみに特異的に結合するタンパク質を選別し、質量分析計を

もちいて解析した。その結果、もっとも顕著に P482L 変異型 C 末端領域に結合したタンパク質は、シャペロンタンパク質 HSP40h であった。さらに 482 番目のプロリン残基の部位特異的変異体のうち、前述の輸送活性を喪失している変異体は、ロイシン変異体とほぼ同様に HSP40h との結合を示した。

次に、野生型トランスポーターが発現している細胞に比べて P482L 変異体が発現させた HEK293 細胞において、HSP40h が細胞膜内側に強く結合していることが分かり、HSP40h は実際の細胞内においても P482L 変異体により選択的に結合することが示された。さらに HSP40h のノックダウンを行い、HSP40h 発現量の減少に伴いトランスポーターとの結合も低下している状況下で、P482L 変異型トランスポーターの輸送活性を測定した。その結果、HSP40h の発現量減少に伴い、P482L 変異型トランスポーターの活性回復が見られた。以上のことから、P482L 変異特異的に非生理的結合をする HSP40 によって P482L 変異トランスポーターの輸送活性が消失していることが、強く示唆された。

1. Chairoungdua et al *J. Biol. Chem.* 274: 28845-28848, 1999, 2. Shigeta et al *Kidney Int.* 69: 1198-1206, 2006, 3. Bisceglia et al *Mol Genet Metab.* Epub 2009, 4. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

## 2. 研究の目的

本研究は、P482L 変異型 C 末端領域の変異がトランスポーターの機能を喪失させる機序を明確に示すことを第一の目的とした。また、これまでの研究結果は培養細胞をもちいた実験系得られていることから、とくに、*in vivo* における機能解析をするため、病態モデルマウスを作成し、解析することを目的とした。

さらに、HSP40h の結合様式を解明し、病的なタンパク質相互作用を消失させるペプチド配列を見つけだし、最終的にはペプチドの投与による P482L 変異トランスポーターの輸送機能回復を達成することを第二の目的とした。見いだしたペプチド配列がペプチドミメティック(ペプチド模倣)な結合阻害薬デザインのモデルペプチドとなり、将来の投薬による遺伝性シスチン尿症治療の開発につながることを期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) P482L 変異型トランスポーターを発現させた培養細胞から調整した膜小胞の基質結合活性および基質輸送活性を解析し、野生型の膜小胞と比較した。

(2) *in vivo* における解析を目的にマウス b<sup>0</sup>+AT P482L 変異体の輸送機能が、ヒト

P482L 変異体と同様に低下していることをアフリカツメガエル卵母細胞系で確認し、P482L 変異型トランスポーターノックインマウスを作成した。作成したモデルマウスの24時間尿を集め、尿中のアミノ酸を解析した。

(3) 作成した病態モデル KI マウスの腎皮質から刷子縁膜小胞を調製し、変異体トランスポーター分子の機能解析を行った。

(4) ペプチドによる輸送回復効果の評価を行うため、アフリカツメガエル卵母細胞内で P482L を発現させ、P482LC 末を含むペプチドを細胞内に導入し、輸送回復効果が調べた。

#### 4. 研究成果

(1) P482L 変異型トランスポーターを発現させた細胞から調整した膜小胞の基質結合活性は、野生型の膜小胞とほぼ同じであり、変異型トランスポーターの基質結合性には異常がないことが示唆される。よって P482L 変異型の輸送活性低下は、トランスポーターの構造変化を HSP40h タンパク質が阻害することにより起きていることが示唆された。

(2) マウス  $b^{6,+}AT$  P482L 変異体の輸送機能が、ヒト P482L 変異体と同様に低下していることをアフリカツメガエル卵母細胞系で明らかにした。この結果を基に *in vivo* モデルとして P482L 変異型トランスポーターノックインマウス C57BL/6 Slc7a9 P482L を作製した。ノックインマウスの24時間尿のアミノ酸分析を行ったところ、P482L ノックインマウスの尿中のシスチンと2塩基性アミノ酸は野生型の70倍から100倍であった。したがって、このノックインマウスはシスチン尿症モデルマウスとして使用できることが明らかになった。

モデルマウスの腎皮質を免疫染色したところ、P482L 変異体トランスポーターは、野生型トランスポーター同様に尿細管アピカル膜に局在していた。その発現量は刷子縁膜小胞のウエスタンブロットによって、野生型とほぼ同じであることが示された。また、変異型トランスポーターは細胞膜上で輸送機能を発揮するために必要な rBAT とのヘテロ二量体を形成していた。したがって、P482L 変異によるシスチン取り込み機能不全は、*in vivo* においても変異トランスポーター分子が輸送機能を喪失したことによるものであることが強く示唆された。

(3) ラピッドフィルトレーション法をもちいて野生型および P482L ノックインマウスから調製した刷子縁膜小胞への放射性シスチンの取り込みを調べたところ、P482L ノックインマウスから調製した刷子縁膜小胞へのシスチン取り込みは見られなかった。一方で、両者の刷子縁膜小胞へのシスチン結合量は、培養細胞による実験同様、ほぼ同程

度であったことから、P482L 変異型トランスポーターは基質を結合することはできるが、輸送できない状態であることが示唆された。これは HSP40h の結合によるものである可能性が考えられる。

(4) ノックインマウスにペプチドを血管内投与し、尿中のシスチン濃度の変化を測定することでモデルペプチドの効果を検討するための予備実験として、P482L 変異を含む P482L トランスポーターの C 末端 14 アミノ酸残基のペプチドが、アフリカツメガエル卵母細胞による機能評価系において P482L 変異輸送体の機能回復効果を検討した。卵母細胞を用いた場合、容易にペプチドを細胞内に直接注入することが出来る点で非常に有利であるため、輸送回復キネティクスの解析とペプチド間での定量的比較解析が可能である。卵母細胞に野生型もしくは P482L 変異輸送体 cRNA をおよび P482L C 末ペプチドを細胞内に導入し、野生型トランスポーターの機能が十分に発現する 2.5 日後、P482L 変異輸送体の輸送回復効果を測定、解析した。P482L のシスチン輸送活性は、わずかではあるが有意に上昇していた。ペプチドの導入により、P482L 変異トランスポーターと非生理的結合蛋白質である HSP40h の結合が解離し、活性の回復が見られている可能性が考えられた。

本研究の成果によって、将来の治療方法開発に向けての方向性が示された。

#### 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 6 件)

1. Kaira K., Sunose Y., Arakawa K., Ogawa T., Sunaga N., Shimizu K., Tominaga H., Oriuchi N., Itoh H., Nagamori S., Kanai Y., Segawa A., Furuya M., Mori M., Oyama T., Takeyoshi I. Prognostic Significance of L-type Amino Acid Transporter 1 Expression in Surgically Resected Pancreatic Cancer. *Br J Cancer* in press. 2012 査読有
2. Tanaka H., Takafuji K., Taguchi A., Wiriyasermkul P., Ohgaki R., Nagamori S., Suh P-G, Kanai Y. Linkage of N-cadherin to Multiple Cytoskeletal Elements Revealed by a Proteomic Approach in Hippocampal Neurons. *Neurochem Int.* in press. 2012 査読有
3. Wiriyasermkul, P. Nagamori S., Tominaga H., Oriuchi N., Kaira K., Nakao H., Kitashoji T., Ohgaki R., Tanaka H., Endou H., Endo K., Sakurai H and Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L- $\alpha$ -methyl tyrosine by

- tumor-upregulated amino acid transporter LAT1: a cause of the tumor uptake in PET. *J Nucl Med* in press. 2012 査読有
4. Kawamura Y, Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Inoue H, Utsumi Y, Oda T, Nishiyama J, Kanai Y, Shinomiya N. Pathogenic GLUT9 Mutations Causing Renal Hypouricemia Type 2 (RHUC2). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011; **30**:1105-11. 査読有
  5. Imai H, Kaira K., Oriuchi N., Shimizu K., Tominaga H., Yanagitani N., Sunaga N., Ishizuka T., Nagamori S., Promchan K., Nakajima T., Yamamoto N., Mori M., Kanai Y. Inhibition of L-type Amino Acid Transporter 1 Has Antitumor Activity in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2010; **30**: 4819-28. 査読有
  6. Shiraya K., Hirata T., Hatano R., Nagamori S., Wiriyasermkul P., Jutabha P., Matsubara M., Muto S., Tanaka H., Asano S., Anzai N., Endou H., Yamada A., Sakurai H., Kanai Y. A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. *J Biol Chem*. 2010; **285**:22141-51 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
1. Nagamori S, Takafuji K, Nishiyama S and Kanai Y Comprehensive and comparative quantification of epithelial cell membrane transporters between wild type and diabetic model mice 第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 16 日 京都
  2. Kawamoto Y, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Iio K, Kanai Y. Establishment of a human-disease model mouse for Japanese-type cystinuria 第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 14 日 京都
  3. Nagamori S, Umemura Y, Wiriyasermkul P, Nakagomi S, Nishinaka Y, Takafuji K, Ohgaki R, Toru Kimura and Kanai Y Functional coupling between a Na<sup>+</sup>-dependent anion transporter SMCT2 and a urate-anion exchanger URAT1 through a scaffold protein PDZK1 第一回多階層生体機能学 HD Physiology 国際シンポジウム 2012 年 1 月 21 日 東京
  4. 永森 收志、平田 拓、Pattama Wiriyasermkul、他 3 名、金井好克 比較定量オミックス技術を用いた新規アニオントランスポーター Oatn1 の生体における機能の解析 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011 年 11 月 25 日 岡山
  5. 永森 收志、梅村 康浩、Pattama Wiriyasermkul、中込咲綾、西中由美子、他三名、金井好克 足場タンパク質 PDZK1 上における Na<sup>+</sup>依存アニオン輸送体 SMCT2 と尿酸-アニオン交換体 URAT1 の機能共役 2011 年度生理研研究会 上皮細胞の恒常性維持機構におけるイオン・物質輸送の新しい分子生理 2011 年 11 月 22 日 岡崎
  6. Nagamori S, Umemura Y, Wiriyasermkul P, Nakagomi S, Nishinaka Y, Takafuji K, Ohgaki R and Kanai Y Functional coupling of a Na<sup>+</sup>-dependent anion transporter and a urate-anion exchanger through a scaffold protein. 第 84 回日本生化学会大会 シンポジウム「生体膜エネルギー変換装置の超分子科学」招待講演 2011 年 9 月 21 日 京都
  7. 永森 收志他 上皮細胞膜トランスポーターの質量分析による網羅的変動解析手法の確立 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 22 日 神奈川県・横浜市
  8. Pattama Wiriyasermkul, 永森 收志他 The structural requirements of leucine derivatives to be transported by L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and to activate mammalian target of rapamycin (mTOR) 第 118 回日本薬理学会近畿部会 2010 年 11 月 19 日 大阪府・豊中市
  9. 永森 收志他 メタボロミックスを用いた新規有機アニオントランスポーター Oatn1 の生体内における機能の解析 2010 年度 生理研研究会 2010 年 11 月 4 日 愛知県・岡崎市
  10. Nagamori S CE-MS based metabolome analysis in knockout mice reveals real physiological substrates of an organic anion transporter (Invited short talk) Gordon Research Conference: Membrane Transport Proteins 2010 年 8 月 17 日 米国・メイン州ビッドフォード

11. 永森收志他 新規塩基性アミノ酸トランスポーターCAT5 の機能と構造の解析から解くトランスポーターの基質輸送に伴った構造変化 第 117 回日本薬理学会近畿部会 2010 年 7 月 8 日 徳島県・徳島市

[図書] (計 2 件)

1. 永森收志 栄養・食品機能とトランスポーター 日本栄養・食糧学会 監修 建帛社 ISBN : 978-4-7679-6154-5 2011 年 全 304 頁 第 2 章 アミノ酸のトランスポーター、p.39-62
2. 永森收志 トランスポートソーム生体膜輸送機構の全体像に迫る 金井好克編 メディカルドゥ ISBN : 978-4-944157-49-5 2011 年 全 280 頁 第 8 章 トランスポートソームの制御と病態 4. タンパク質間相互作用によるアミノ酸トランスポーター機能の制御と疾患、p.255-259

6. 研究組織

(1) 研究代表者名

永森 收志 (NAGAMORI SHUSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 90467572