

平成30年6月4日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08274

研究課題名(和文) 輸送体群を束ね局在を制御する腎尿細管上皮細胞新規膜タンパク質の機能の解明

研究課題名(英文) The function of a novel membrane protein in renal proximal tubules

研究代表者

永森 收志 (Nagamori, Shushi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90467572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多数の近位尿細管管腔側膜輸送体と共に発現変動する遺伝子TRAPは、腎特異的に発現する新規膜タンパク質をコードし、近位尿細管管腔側膜に局在した。野生型マウスにおいてTRAPが様々な輸送体と複合体を形成していることを示し、TRAPと相互作用する管腔側膜輸送体群の全体像を明らかにした。TRAPノックアウトマウスにおける糖・アミノ酸等の尿中排泄の顕著な上昇は、この複合体の消失によるものと考えられた。さらに網羅的定量プロテオミクスおよびメタボロミクスを用いたマルチオミクスにより、TRAPが様々な管腔側膜輸送体の近位尿細管管腔側膜における局在を統合的に制御する分子であることを、強く示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：A gene, named TRAP, was identified because the expression changes are correlated with expression changes of many transporters in proximal renal tubules and encodes a novel membrane protein expressed specifically in apical membranes of the renal proximal tubules. The TRAP knockout mice showed increasing of urinary excretion of sugar, amino acids etc., which is similar to Fanconi syndrome. We showed that TRAP makes complexes with various transporters and the whole proteome of the luminal membrane transporters interacting with TRAP. In addition, by using a multi-omics approach combined comprehensive quantitative proteomics and metabolomics, it is strongly indicated that TRAP is a key molecule that integrally regulates the localization of transporters on the apical membranes of the proximal tubules.

研究分野：膜タンパク質の生化学

キーワード：膜輸送複合体 プロテオミクス メタボロミクス 腎臓 トランスポーター マルチオミクス

1. 研究開始当初の背景

腎の生理機能と種々の遺伝性疾患の研究は、近位尿細管における物質輸送を担う輸送体の存在を予想してきた。これらの輸送体は、1990年代を中心とした分子クローニングにより分子実体が明らかになった。これまで研究代表者の所属研究室では、尿細管における糖、アミノ酸、尿酸、有機酸の輸送体の分子実体を解明してきた。分子クローニングにより、輸送体の生理機能と個々の輸送体異常症の多くが明らかになった一方で、個々の輸送体の解析では説明のつかない輸送体機能異常症が未だに存在し、そのうちの一つがファンコニ (Fanconi) 症候群である。

ファンコニ症候群は、腎近位尿細管における物質輸送機能の広汎な障害で、後天性もしくは遺伝性である。後天性ファンコニ症候群は、主に薬剤や重金属による尿細管上皮細胞の Na⁺, K⁺-ATPase 機能障害, ATP 産生障害, 酸化障害などに起因するものが知られている。遺伝性ファンコニ症候群には、Dent 病, ミトコンドリア脳筋症によるものが報告されているが、原因が特定されていないものも多い。そんな中、近位尿細管管腔側膜のリン酸輸送体 NaPi-IIa (SLC34A1) の変異によって細胞膜局在が障害され、その変異によりファンコニ症候群となる例が報告された (Magen et al. *N Engl J Med* 62, 1102-9, 2010)。これは、一種類の管腔側膜輸送体に生じた細胞膜への局在障害により、同じ管腔側膜にある他の多くの輸送体が細胞膜移行に異常を示しており、管腔側膜において複数種類の輸送体の膜局在を統合的に制御する機構の存在を予想させる。尿細管の輸送体は多重な機能共役により協調的に機能しており、近年にはその背景にある分子複合体の重要性が強調されている。また、輸送体の局在を統合的に制御する機構の解明は、尿細管輸送機能の理解にとってだけでなく、生体における輸送体機能を理解する上で重要な課

題となる。

そこで、研究代表者らは、「管腔側膜輸送体局在の統合的制御を司る分子が存在する」と仮説を立て、この分子の探索を行った。その分子の異常は、ファンコニ症候群の新たな原因遺伝子である可能性も期待される。共発現データベース COXPRESdb を用いたバイオインフォマティクスによる解析により、多くの管腔側輸送体と共発現変動する遺伝子を見いだした。その遺伝子のコードするタンパク質 (TRAP と命名: transporter-associated protein) は、2回膜貫通型と予測される新規膜タンパク質であり、腎特異的に発現し、近位尿細管の管腔側膜に局在していた。TRAP のノックアウトマウスを作成し解析したところ、ホモノックアウトマウスにおいてグルコース、有機酸、アミノ酸の尿中排泄量の上昇が見られ、ファンコニ症候群に類似の尿所見を示した。この TRAP ノックアウトマウスでは、尿中排泄量の上昇が見られる物質を輸送すると考えられる輸送体群の局在が、変化していることを見出した。また TRAP は様々な輸送体と複合体を形成していること、さらにこの TRAP を中心として多くの輸送体が含まれている輸送体超複合体が、TRAP ノックアウトマウスで欠失している示唆する予備データを得ていた。このことから、TRAP は、近位尿細管からの再吸収を司る多数の輸送体の機能を統合的に制御する膜タンパク質の有力な候補となると考えられた。

2. 研究の目的

新規膜タンパク質 TRAP ノックアウトマウスが、ファンコニ症候群に類似の尿所見を示すことから、膜輸送体の膜局在との関連から TRAP タンパク質の腎近位尿細管における機能的意義を明らかにし、ファンコニ症候群との関連を解明するために、以下の目標を設定した。

1) 網羅的比較定量プロテオミクスを用いて、

野生型マウスと TRAP ノックアウトマウスの腎近位尿細管における輸送体の発現変動解析を行い、TRAP により輸送体の管腔側膜局在を維持する輸送体の全体像を明らかにする。

2) 網羅的定量メタボロミクスを用いて、TRAP ノックアウトにより変動する尿中の物質を網羅的に明らかにし、上記、輸送体の全体像との関連づけを行う。

3) 生化学 / 分子生物学 / 細胞生物学的手法に加え、プロテオミクスを用いて、TRAP が特定の一群の輸送体を管腔側膜上に保持する機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) TRAP ノックアウトによるマウス近位尿細管輸送体の網羅的変動解析

近位尿細管で再吸収されるはずの栄養素や代謝物が尿中へ漏出する場合、それらの再吸収を担う輸送体の分子の機能自体が低下しているか、あるいは管腔側膜上での存在量が低下しているかの2つの可能性がある。TRAP ノックアウトマウスの管腔側膜上での各輸送体の存在量を野生型マウスと比較することにより、TRAP の役割についての重要な情報が得られると考えた。そこで本研究では、抗体の入手できない輸送体も含めて、近位尿細管管腔側膜の輸送体の変動の全体像を定量的につかむ目的で、網羅的比較定量プロテオミクスを用いて解析した。TRAP ノックアウトマウスおよび野生型マウスの腎臓より、尿細管管腔側膜画分を2価陽イオン法によって単離し (BBMV)、尿素洗浄を用いて細胞膜に結合する可溶性タンパク質を十分に除去する (Uetsuka et al *Eur J Neurosci.* 2015, Nagamori et al *JCB* 2004)。続いてトリプシンで消化し、Phase Transfer Surfactant 法 (Masuda et al *J Proteome Res* 2008) にて界面活性剤を除去して精製し、逆相チップカラムを用いて塩基性条件下で分画する。各画分は、LC-MS (HPLC : Advance UHPLC, Michrom

Bioresources; MS : Q Exactive, Thermo Scientific) で分析する。得られたマススペクトルデータを Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) と Mascot 2.4 (Matrix Science) を組み合わせて、UniProt database を用いて label-free 定量解析し、さらに一部のサンプルについては iTRAQ 法および mTRAQ を用いて比較定量解析を行った。

2) TRAP が相互作用する管腔側膜輸送体の解析

TRAP の機能を解析するために、TRAP がどのように一群の管腔側膜輸送体と相互作用するかを明らかにする。抗 TRAP 抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物を質量分析計で解析し、輸送体との複合体形成の有無を検討した。TRAP の可溶化に最適な界面活性剤をスクリーニングして免疫沈降を行った。TRAP ノックアウトマウスを用いた結果を対象とすることで非特異的なシグナルが排除され、TRAP と複合体を形成している輸送体を明らかにした。

3) TRAP ノックアウトによる表現型の解析

TRAP ノックアウトマウスは、糖・アミノ酸・尿酸などの尿中排泄が顕著に上昇するファンコニ症候群類似の表現型を示し、さらにノックアウトマウスではそれらを輸送すると考えられる複数の輸送体の局在が変化していたことから、野生型とノックアウトマウスの尿を採取し、CE-MS を用いたメタボロミクス解析および HPLC を用いた全アミノ酸分析を行った。また、TRAP ノックアウトマウスの表現型について、性差や週齢との関連を見いだすために、観察を行った。

4. 研究成果

1) TRAP ノックアウトによるマウス近位尿細管輸送体の網羅的変動解析

Label-free プロテオミクスを用いた網

羅的解析の結果、多いときでは約 2200 から 2300 分子が定量可能であり、iTRAQ、mTRAQ 法を用いた場合、1500-1800 分子、1000 分子前後が定量可能であった(表 1)。

Sample	Protein	Peptide
LF wt	2410	12042
LF KO	2392	11627
iTRAQ	1776	7522
mTRAQ	1077	4349

表 1. 各解析手法で定量可能な分子数

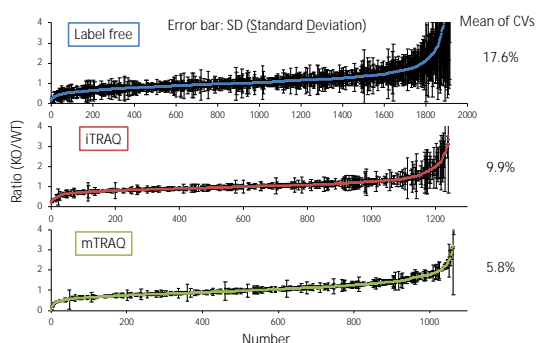


図 1. 各測定法による定量値の分散

Label-free 法ではより網羅的な定量が可能であり、iTRAQ 法では定量値の分散が Label-free 法に比べると少なかった(図 1)。

そこで、Label-free 法および iTRAQ 法による定量プロテオミクスで、野生型マウス、KO マウス由来の尿細管管腔側膜画分 (BBMV) をそれぞれ 5 匹分定量解析した。Label-free 法の結果、150 種類の SLC トランスポーターと ABC トランスポーターが比較定量可能であった。そのうち 26 種類の SLC トランスポーターの比較定量値が、1.5 倍以上変動(増減)していた。また、iTRAQ 法の場合は 80 種類の SLC トランスポーターが定量可能であり、6 種類の SLC および ABC トランスポーターが 1.5 倍以上変動していた。

2) TRAP が相互作用する管腔側膜輸送体の解析

野生型及びノックアウトマウスの BBMV を、

事前のスクリーニングにより得られた最適な界面活性剤で抗 TRAP 抗体を用いて TRAP の免疫沈降を行い、免疫沈降物を質量分析計で解析した(図 2)。その結果、63 種類のタンパク質が野生型を用いたサンプルにおいてのみ検出された。そのうち 17 種類が、トランスポーターやチャネルもしくは関連因子であった。これらは、アミノ酸や糖の輸送体を含んでおり、これらの輸送体が TRAP と相互作用できなくなったことが、グルコース、有機酸、アミノ酸の尿中排泄量の上昇に關与していることを強く示唆する。

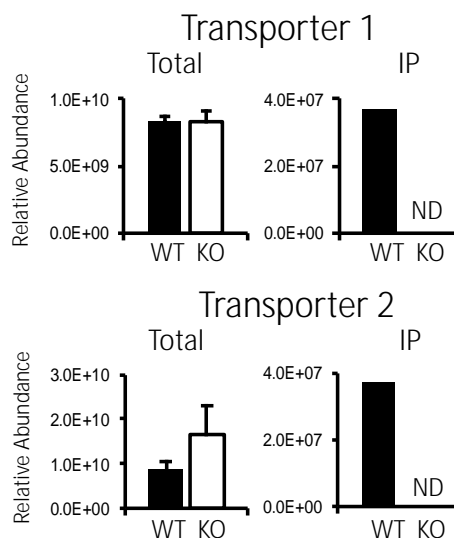


図 2. 代表的な共免疫沈降の結果

3) TRAP ノックアウトによる表現型の解析

野生型マウスとノックアウトマウスの尿についてメタボロミクス解析を行った結果、ノックアウトによって尿中の濃度が著しく変化する物質群のプロファイルが得られた。さらに、近位尿細管管腔側膜の網羅的定量プロテオミクスにより明らかにした TRAP ノックアウトにより発現量の影響を受ける輸送体群と、メタボロミクス解析により明らかになった TRAP ノックアウトにより尿中量が影響を受ける物質の相関性を解析した。これらの結果から、TRAP が様々な管腔側膜輸送体の近位尿細管管腔側膜における局在を統合的

に制御する分子であることが、強く示唆された。

以上の結果から、TRAP の機能不全が、ファンコニ症候群様の症状が発生する一因である可能性がはじめて示唆された。TRAP の機能に関する、さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件) すべて査読あり

1. Weng L, Han YP, Enomoto A, Kitaura Y, Nagamori S, Kanai Y, Asai N, An J, Takagishi M, Asai M, Mii S, Masuko T, Shimomura Y, Takahashi M. Negative regulation of amino acid signaling by MAPK-regulated 4F2hc/Girdin complex. *PLoS Biol.* 2018; 16: e2005090. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005090.
2. Shinozaki Y, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Isozumi N, Nagamori S, Kanai Y, Sugiura T, Kato Y, Wada T. Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1-ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;92:1356-1369. DOI: 10.1016/j.kint.2017.04.032.
3. Ikeda K, Kinoshita M, Kayama H, Nagamori S, Kongpracha P, Umemoto E, Okumura R, Kurakawa T, Murakami M, Mikami N, Shintani Y, Ueno S, Andou A, Ito M, Tsumura H, Yasutomo K, Ozono K, Takashima S, Sakaguchi S, Kanai Y, Takeda K. Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino-Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 2017; 21: 1824-1838. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.10.082.
4. Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, Nakagomi S, Kanai-Azuma M, Kaneda-Nakashima K, Okuda S, Nagamori S, Kanai Y. Essential Roles of L-Type Amino Acid Transporter 1 in Syncytiotrophoblast Development by Presenting Fusogenic 4F2hc. *Mol. Cell. Biol.* 2017; 37: e00427-16. DOI: 10.1128/MCB.00427-16.
5. Kongpracha P, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Kaneda K, Okuda S, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). *J Pharmacol Sci.* 2017; 133: 96-102. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.01.006.
6. Nagao H, Nishizawa H, Bamba T, Nakayama Y, Isozumi N, Nagamori S, Kanai Y, Tanaka Y, Kita S, Fukuda S, Funahashi T, Maeda N, Fukusaki E, Shimomura I. Increased Dynamics of Tricarboxylic Acid Cycle and Glutamate Synthesis in Obese Adipose Tissue: IN VIVO METABOLIC TURNOVER ANALYSIS. *J Biol Chem.* 2017; 292: 4469-4483. DOI: 10.1074/jbc.M116.770172.
7. Watabe T, Ikeda H, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Tanaka Y, Naka S, Kanai Y, Hagiwara K, Aoki M, Shimosegawa E, Kanai Y, Hatazawa J. 18F-FBPA as a tumor-specific probe of L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a comparison study with 18F-FDG and 11C-Methionine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2017; 44: 321-331. DOI: 10.1007/s00259-016-3487-1.
8. Nagamori S, Wiriyasermkul P, Okuda S, Kojima N, Hari Y, Kiyonaka S, Mori Y, Tominaga H, Ohgaki R, Kanai Y. Structure-activity relations of leucine derivatives reveal critical moieties for cellular uptake and activation of mTORC1-mediated signaling. *Amino Acids.* 2016; 48: 1045-1058. DOI: 10.1007/s00726-015-2158-z.
9. Wei L, Tominaga H, Ohgaki R, Wiriyasermkul P, Hagiwara K, Okuda S, Kaira K, Kato Y, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L-methyl-tyrosine (FAMT) by organic ion transporters explains renal background in [(18)F]FAMT positron emission tomography. *J Pharmacol Sci.* 2016; 130: 101-109. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.01.001.
10. Nagamori S, Wiriyasermkul P, Guarch ME, Okuyama H, Nakagomi S, Tadagaki K, Nishinaka Y, Bodoy S, Takafuji K, Okuda S, Kurokawa J, Ohgaki R, Nunes V, Palacin M, Kanai Y. Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinurial-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: 775-780. DOI: 10.1073/pnas.1519959113.

他 15 件

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 永森收志 Two cystine transporters ふたつのシスチントランスポーター、第 95 回日本生理学会大会 公募シンポジウム「腎尿細管トランスポーター：最近の進歩」(招待講演)2018 年、高松
2. Nagamori S. Quantitative proteomics reveal overall amino acid transport systems and the related signaling. IUNS 21st International Congress of Nutrition 2017 Scientific Symposium “Novel Functions and Uses of Amino Acids”、(招待講演)(国際学会)2017 年、アルゼンチン・ブエノスアイレス
3. 永森收志 栄養食品成分の吸収・排出を担う膜輸送体の網羅的定量プロテオミクスによる変動解析. 2017 年度日本農芸化学会年会 シンポジウム「栄養食品成分の吸収と排出～膜を超える仕組み」(招待講演)2017 年、京都
4. 永森收志 アミノ酸トランスポーターを標的とした創薬研究. 第一回名古屋大学医薬系 3 部局交流シンポジウム(招待講演)2016 年、名古屋
5. Shushi Nagamori. Significance of the comprehensive and quantitative proteomics of membrane transport proteins in drug discovery and in silico modeling. International and Interdisciplinary Symposium 2016 “Towards a New Era of Cardiovascular Research”(招待講演)(国際学会). 2016 年、東京
6. 永森收志 創薬研究における膜輸送体の網羅的解析と定量解析の意義. 第 89 回日本薬理学会年会(招待講演). 2016 年、横浜
7. 永森收志 プロテオミクスによるアミノ酸輸送と介在シグナルの全体像の解明. 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会 (JSAAS2015) (招待講演). 2015 年、新潟
8. 永森收志 網羅的プロテオーム解析が捉えるアミノ酸トランスポーターによる生体システムの制御. 第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会(招待講演). 2015 年、新潟
9. 永森收志、五十棲規義、Wiriyaermkul P、Kongpracha P、金井好克 プロテオミクスと輸送機能測定によるがん細胞アミノ酸トランスポーターの網羅的解析. 日本プロテオーム学会 2015 年会. 2015 年、熊本
10. 永森收志 生体界面構成因子の定量的解析に向けた膜タンパク質定量プロテオミクス. 平成 27 年度生理研研究会(招待講演). 2015 年、岡崎
11. 永森收志 がん特異的アミノ酸トランスポーターを標的としたがん診断法と治療法の開発. 第 31 回日本 DDS 学会学

術集会(招待講演). 2015 年、東京

12. 永森收志 アミノ酸トランスポーターを標的とした創薬研究. 第 10 回日本トランスポーター研究会(招待講演). 2015 年、東京
13. Nagamori S. Metabolomics and proteomics of knockout mice reveal physiological function of an orphan organic anion transporter. The 3rd Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications”(招待講演)(国際学会) 2015 年、淡路島

他 15 件

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学医学系研究科生体システム薬理学
ウェブサイト

<http://www.pharma1.med.osaka-u.ac.jp/>

奈良県立医科大学生体分子不均衡制御学共
同研究講座ウェブサイト

<http://www.naramed-u.ac.jp/~nagamorilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永森收志 (NAGAMORI, Shushi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90467572

(2) 研究分担者

大垣隆一 (OHGAKI, Ryuichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20467525

奥田傑 (OKUDA, Suguru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50511846