

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790590  
 研究課題名（和文） 日本人型シスチン尿症の病因解明の鍵を握るシスチン輸送体結合蛋白質の同定とその役割  
 研究課題名（英文） Identification and characterization of cystine transporter interacting proteins for elucidation of cystinuria  
 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：

シスチントランスポーターBAT1/rBAT の変異は、シスチン尿症を引き起こす。日本人に多く見られる BAT1 の P132L という変異によって、シスチントランスポーターの機能が消失し、これは機能保持に参与するタンパク質が結合できなくなった結果だと考えられた。そこで BAT1 結合タンパク質の同定とその機能解析を目指し研究を行った。その結果、BAT1 の機能調節に関与すると思われる結合タンパク質をいくつか同定できたが、P132L 変異体に結合しなかったものは見つからなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

シスチン尿症 (MIM 220100) は、腎近位尿管腔側のシスチントランスポーターの遺伝的変異によって生じる常染色体劣性の疾患である。シスチントランスポーターは、1回膜貫通型タンパク質 rBAT (related to b0,+ transporter) と 12回膜貫通型タンパク質 BAT1/ b0,+AT がジスルフィド結合で連結することによって形成されるヘテロ二量体型トランスポーターである。そのどちらの変異によってもシスチン尿症となり、現在遺

伝子変異に基づく新たな病型分類 (A型:rBAT をコードする SLC3A1 遺伝子のホモの変異; B型:BAT1 をコードする SLC7A9 遺伝子のホモの変異; AB型:SLC3A1 遺伝子と SLC7A9 遺伝子の複合ヘテロ変異) が提唱されている。当研究室は、BAT1 の分子同定 (J. Biol. Chem. 274: 28845-28848, 1999) を行った後、シスチン尿症の患者解析を行い、その成果を最近発表した (Kidney Int. 69: 1198-1206, 2006)。それによると、日本人のシスチン尿症変異は、欧米人のものとは大きく異なり、欧米人では見いだされていない BAT1 の C-末端の変異

P482L (第 482 残基であるプロリンのロイシンへの変異)が、日本人症例の約 85%を占めている。P482L 変異は、トランスポータータンパク質の C-末端細胞内ドメインにあり、基質結合や基質輸送に直接は関与しないと考えられる部位の変異である。しかも、部位特異的変異導入による Pro482 の小型アミノ酸への変異では輸送活性は低下しないが、大型アミノ酸への変異で P482L と同様の機能の消失が観察された (Kidney Int. 69: 1198-1206, 2006)。これは、この部位でのタンパク質間相互作用が当該トランスポーターの機能活性にとって重要であること、またそのタンパク質間相互作用の障害が P482L の病態を引き起こすことを示唆している。P482L 変異は、輸送体異常症に広く見られる細胞膜への移行障害とは異なり、細胞膜へ出現するにも関わらず機能が消失しているため、この部位に想定されるタンパク質間相互作用は、トランスポーターの細胞膜上での機能維持に必須のものとして想定される。

## 2. 研究の目的

本研究は、BAT1 トランスポーター特に 482 番目のプロリンへ結合するタンパク質を同定し、当該トランスポーターの細胞膜上での機能発現に必須の新たなタンパク質間相互作用を明らかにし、日本人シスチン尿症の大半を占める P482L 変異の病態発現の機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) BAT1 C 末端領域のトランスポーター機能に対する役割の検討

BAT1 C 末端領域の機能的役割について検討するため、C 末端側からアミノ酸を欠失させた変異体を作製した。その変異体を rBAT と共に HEK293 細胞に発現させて、アイソトープラベルされたシスチンの細胞内への取り込み能を測定することによって、トランスポーター機能の検討を行った。

### (2) Yeast two hybrid による Pro482 結合タンパク質の同定

まず始めに、BAT1 の C 末端領域を bait として yeast two hybrid screening を行い、BAT1 の C 末端領域に結合するタンパク質の同定を行った。Prey には、ヒト腎臓 cDNA のライブラリーを用いた。得られたポジティブコロニーに関して、prey の cDNA の抽出を行い、BAT1-P482L 変異体の bait との結合を yeast two hybrid 法により検討し、BAT1 に結合することができるが、P482L 変異体には結合できないタンパク質群の発見を試みた。

### (3) 細胞発現系を用いたプロテオミクス手法による Pro482 結合タンパク質の同定

細胞系や動物組織でのトランスポーター複合体の同定には、効率の良い免疫沈降が必要である。トランスポーターに 2 つまたは 3 つのエピトープタグを繰り返すことによって、高効率の免疫沈降が得られることを確認している。そこで、HA または flag エピトープタグ付 BAT1 とその P482L 変異体、補助サブユニット rBAT のコンストラクトを作製し、野生型のタグ付きコンストラクトは輸送活性を保持することを確認した。これらのコンストラクトを培養細胞に安定に発現させた。後に高速液体クロマトグラフィーと質量分析計 (LC/MS) を用いたタンパク質同定を行うため、培養細胞にはヒト腎由来細胞である HEK293 細胞を用いた。トランスポーターを発現させた細胞を界面活性剤にて可溶化後、免疫沈降によりトランスポーター複合体を精製・濃縮した。SDS-PAGE でこの試料を分離し、クーマシーブリアントブルー (CBB) にて染色を行った。得られた結合タンパク質のバンドをトリプシン溶液中で消化し、LC/MS システムを組み合わせてタンパク質の同定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) トランスポーター機能における BAT1 の C 末端領域の重要性

BAT1 の 482 番目のプロリンがトランスポーター機能の保持に重要だと分かっているが、C 末端領域全体に関して検討を行うため、C 末端からアミノ酸 1 残基ずつを欠損させた欠損体を用いて解析を行った。これら欠損体を rBAT と共に HEK293 細胞に一過性に発現させ、細胞内へのシスチンの取り込み能を測定した (図 1)。その結果、C 末端から 412 番目のプロリンまでを欠損させると活性が約 60%に減少し、410 番目のバリンまで欠損させるとほとんど活性を保持できないことが分かった。

	30	25	20	15	10	5	1
WT	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	PEEDPE	
Δ1	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	PEEDP	
Δ2	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	PEED	
Δ3	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	PEE	
Δ4	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	PE	
Δ5	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP	P	
Δ6	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V	VP		
Δ7	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV	V			
Δ8	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV				
Δ9	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV				
Δ10	IM12	KFGWAQKISK	PITMHLQMLMEV				
Δ15	IM12	KFGWAQKISK	PITMH				
Δ20	IM12	KFGWAQKISK					
Δ25	IM12	KFGWA					
Δ30	IM12						

図 1-A BAT1 の C 末端領域からの欠損体

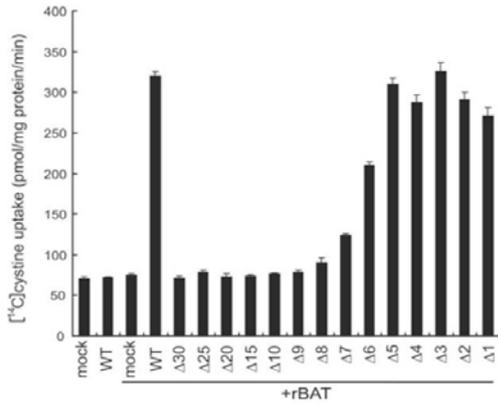


図1 -BC末端の欠損体のトランスポーター機能

### (2) Yeast two hybridによるPro482結合タンパク質の同定

BAT1のC末端領域を bait、ヒト腎臓 cDNA のライブラリーを prey として yeast two hybrid screening を行った。その結果、BAT1 のC末端領域に結合すると思われる約150個のポジティブコロニーが得られた。得られたポジティブコロニーに関して、prey の cDNA の抽出を行い、BAT1-P482L 変異体の bait とともに酵母にトランスフォームを行いそれぞれのタンパク質間相互作用を調べた。しかしながら、BAT1 のC末端領域に結合が見られたものは、BAT1-P482L 変異体についてもポジティブとなり、BAT1 の482番目のプロリン残基に特異的に結合するタンパク質は得られなかった。

### (3) 細胞発現系を用いたプロテオミクス手法によるPro482結合タンパク質の同定

免疫沈降の効率を上げるため、3つのHAまたはflag エピトープタグを繰り返したBAT1とそのP482L変異体、および補助サブユニット rBAT のコンストラクトを作製した。野生型のタグ付きコンストラクトは輸送活性を保持することを確認した。これらのコンストラクトをヒト腎由来細胞である HEK293 細胞に安定に発現させた。エピトープタグ抗体を用いた免疫蛍光染色によって細胞膜表面での発現を確認した(図2)。これらの安定発現細胞において、BAT1/rBAT-HA および BAT1/rBAT-flag は輸送活性を持つこと、P482L/rBAT-HA および P482L/rBAT-flag は輸送活性を失っていることを確認した。

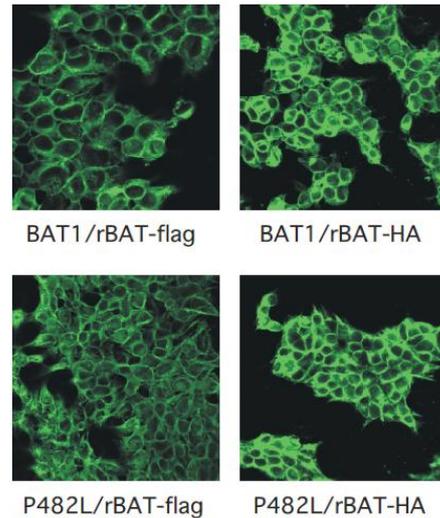


図2 BAT1/rBAT および P482L/rBAT の安定発現細胞の樹立

BAT1/rBAT-HA および P482L/rBAT-HA 安定発現細胞を 2% CHAPS または 1% Triton X-100 にて可溶化後、抗 HA 抗体による免疫沈降によりトランスポーター複合体を精製・濃縮した。SDS-PAGE によりこの試料を分離し、CBB にてタンパク染色を行った(図3)。

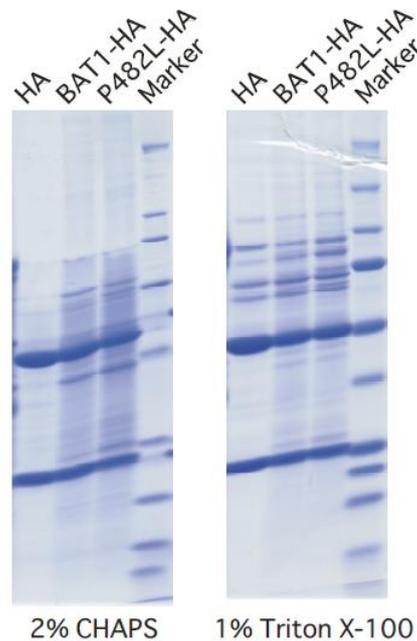


図3 免疫沈降サンプルの SDS-PAGE 後のゲルの CBB 染色

BAT1 と P482L 変異体との結合タンパクの違いを観察したかったが、残念ながら SDS-PAGE

ゲルのCBB染色の結果には違いが見られなかった。得られたBAT1結合タンパク質のバンドをトリプシン溶液中で消化し、高速液体クロマトグラフィーと質量分析計(LC/MS)システムを組み合わせることでタンパク質の同定を行った。その結果、Heat shock 70 kDa protein, DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1, protein arginine methyltransferase 5, NADH dehydrogenase Fe-S protein 2 (NADH-coenzyme Q reductase), Serum paraoxonase/arylesterase 2 (PON 2), ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II, solute carrier family 25, member 13 (citrin), programmed cell death 8 isoform 1, galectin 3 binding protein などがBAT1結合タンパク質として得られた。

#### 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 1 件)

1. Sakamoto S, Chairoungdua A, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Promchan K, Tanaka H, Kimura T, Ueda T, Fujimura M, Shigeta Y, Naya Y, Akakura K, Ito H, Endou H, Ichikawa T, Kanai Y.

A novel role of the C-terminus of b 0, + AT in the ER/Golgi trafficking of the rBAT/b 0, + AT heterodimeric amino acid transporter. *Biochem. J.* (2009) 417, 441-448 (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 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

なし