

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591878

研究課題名 (和文) グリオキシル酸還元酵素のミトコンドリア局在化配列の同定と原発性高
尿酸血症の探索研究課題名 (英文) Identification of mitochondrial targeting signal in glyoxylate
reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR) and Surveillance of primary hyperoxalurias

研究代表者

高山 達也 (TAKAYAMA TATSUYA)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90324350

研究成果の概要 (和文)：グリオキシル酸還元酵素 (GRHPR) は原発性高尿酸血症性2型 (PH2) の原因酵素であり、328個のアミノ酸からなる分子量約36kDaの蛋白である。これまでの共同研究でGRHPRは細胞質とミトコンドリアに局在していることを示したが、ミトコンドリア局在化シグナルは同定されていない。そのシグナルはC-terminalに存在する可能性があり、ベクターを作成し検討中である。一方、PH2のgenotypingを行い、新たなmutationを同定した。また、PH1の確定診断には肝生検が行われている。しかしながら、assayに必要な酵素が製造中止になり、その酵素を精製するとともに別の反応系より、その条件を決定し論文報告した。

研究成果の概要 (英文)：Nucleotide sequence of the cDNA for the glyoxylate reductase / hydroxypyruvate reductase (GRHPR) gene, which is candidate enzyme for primary hyperoxaluria type 2 (PH2), indicates that the gene encodes the a 328-amino-acid protein with a calculated molecular weight of 35,563Da. We demonstrated that GRHPR is located both in the cytoplasm and in mitochondria. However, mitochondrial targeting sequence has not still identified and we are vigorously exploring it. We also identified new mutation of the GRHPR gene. PH1 is diagnosed by the decrease or loss of the serine:pyruvate /alanine:glyoxylate aminotransferase (SPT/AGT) activity in human liver biopsy, but the essential enzyme in the assay of SPT is no longer in production. We confirmed that the activity of AGT in human liver can be determined by either AGT, SGT or SPT activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：結石症学

1. 研究開始当初の背景

本邦における原発性高尿酸血症 (PH) は未だ十分に検討されていない。また、全世界

的に原発性高尿酸血症2型 (PH2) は十分に検討されていない。PH2の臨床症状は無症状から多臓器不全と多岐にわたる phenotype

を示すが、この原因は全くわかっていない。さらに PH2 の原因酵素である glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR)は、サイトソルとミトコンドリアに局在するが、そのシグナルは同定されていない。

2. 研究の目的

GRHPR の細胞内局在、特にミトコンドリア局在化シグナルを同定し、その変異型が PH2 の亜型とすれば、この多岐にわたる phenotype の一部を説明できる。さらに、特発性尿酸カルシウム尿路結石症と診断されている患者様の中に PH2 の亜型が含まれている可能性も高く、この研究の意義はきわめて高い。

そして、全国から確定診断のために肝臓や尿、血液等の患者様のサンプルが当大学泌尿器科学講座に送られてくる。PH1、PH2 の genotyping を丹念に行い、その特徴を見極める必要がある。PH2 では日本人の患者様の genotyping を行い、複合ヘテロ接合であることを示した。そのうちの1つの遺伝子変異は中国人の患者様と同一であった。この変異はヨーロッパや欧米では見られず、地域的な遺伝子変異が存在し、DNA 診断の一助となると考えられ、今後症例を増やした検討が必要である。

3. 研究の方法

ミトコンドリア局在化シグナルの同定後、そのシグナルの変異型を含むベクターを作成し、培養細胞に transfection し、その機能を解析する。一方で、全国から送られてくる原発性高尿酸尿症の診断のためのサンプルを解析するとともに、PH1、PH2 の genotyping を行い、症例を集積し、解析する。

4. 研究成果

グリオキシル酸還元酵素 (GRHPR) は原発性高尿酸尿症性 2 型の原因酵素であり、328 個のアミノ酸からなる分子量約 36kDa の蛋白である。その cDNA は 3 つの translation initiation codon の候補がある。また、alterative splice variant があり、28 bp の核酸の欠損により、frameshift をおこし、N-terminal から 3 番目にあたる translation initiation codon より前で stop codon を誘導する。この遺伝子産物は約 27kDa になると予測される。これまでの共同研究で GRHPR は細胞質とミトコンドリアに局在していることがわかっているが、ミトコンドリア局在化シグナルは同定されていない。そこで、候補開始コドンを検討したベクターを作成し、N-terminal を中心にそれらのベクターの細胞内局在を調べた。その結果、C-terminal についての検討する必要性が生じ、ベクターを作成し検討中である。

一方、原発性高尿酸尿症 2 型の genotyping を行い、新たな mutation を同定した。また、原発性高尿酸尿症 1 型の確定診断には肝生検が行われている。しかしながら、assay に必要な酵素が製造中止になり、その酵素を精製するとともに別の反応系を作り、その条件を決定し論文報告した。

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 9 件)

- ① 高山達也、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、原発性高尿酸尿症 2 型の人種差および地域分布、日本尿路結石症学会誌、査読無、6 巻、2008、104-107※第 10 回奨励賞(第 17 回学術集會に於いて)
- ② 高山達也、大園誠一郎、尿酸代謝関連酵素の細胞内局在とその意義、第 24 回浜松カンファランス泌尿器科学の最近の進歩、査読無、2008、8-10
- ③ 三浦健一郎、藤井寛、藤木拓磨、松村英樹、黒田奈緒、田中絵里子、近本裕子、秋岡祐子、甲能深雪、宮川三平、服部元史、小川由英、高山達也、末期腎不全以外に明らかな臓器障害がなく、腹膜透析を行っている原発性過シュウ酸尿症 I 型の男児例、日本小児腎不全学会雑誌、査読無、28 巻、2008、105-106
- ④ Takaoka N、Takayama T、Miyazaki M、Nagata M、Ozono S. Modification of primers for GRHPR genotyping: avoiding allele dropout by single nucleotide polymorphisms and homology sequence. Urol Res, 査読有, Vol.36, 2008, 297-302
- ⑤ 永田仁夫、高山達也、麦谷荘一、大園誠一郎、浜松医科大学泌尿器科における SPT/AGT 測定による PHI の診断、日本尿路結石症学会誌、査読無、7 巻、2009、111-114
- ⑥ Nagata M、Ichiyama A、Takayama T、Oda T、Mugiya S、Ozono S. Assay of alanine:glyoxylate aminotransferase in human liver by its serine: glyoxylate aminotransferase activity. Biomedical Res, 査読有、Vol.30, 2009, 295-301
- ⑦ 麦谷荘一、大園誠一郎、特集 尿路結石治療の新しい流れ: beyond ESWL ; 2cm を超す尿管結石の治療、Urology View、査読無、8 巻、2010、54-57
- ⑧ 永田仁夫、高山達也、麦谷荘一、小田敏明、市山 新、大園誠二、SGT 活性による AGT 測定系の確立、日本尿路結石症学会誌査読無、9 巻、2010、105-109
- ⑨ 高山達也、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、尿酸代謝関連酵素に尿路結石治療の未

来を求めて、泌尿器科紀要、査読有、57
巻、2011、39-41

[学会発表] (計 13 件)

- ①高山達也、永田仁夫、大園誠一郎、過シュウ酸尿症 2 型、第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008.04.26、横浜市
- ②永田仁夫、高山達也、麦谷荘一、大園誠一郎、浜松医科大学泌尿器科における SPT/AGT測定によるPH1 の診断、日本尿路結石症学会第 18 回学術集会、2008.08.30、大阪府
- ③高山達也、高岡直央、永田仁夫、麦谷荘一、上仁教義、岡田裕作、久原とみ子、大園誠一郎、本邦の原発性高尿酸尿症 2 型 3 例の genotyping、第 58 回日本泌尿器科学会中部総会、2008.11.16、滋賀県大津市
- ④Takayama T, Takaoka N, Miyazaki M, Nagata M, Mugiya S, Johnin K, Okada Y, Kuhara T, Cramer SD, Ozono S. The relationship between molecular analysis and ethnic differences of genotype in Japanese patients with primary hyperoxaluria type 2. 11th International Symposium on Urolithiasis, September 4, 2008, Nice, France.
- ⑤Takaoka N, Takayama T, Miyazaki M, Nagata M, Ozono S. Modification of primers for grhpr genotyping: avoiding allele dropout by single nucleotide polymorphisms (snps) and homology sequence. 11th International Symposium on Urolithiasis, September 5, 2008, Nice, France.
- ⑥高山達也、高岡直央、宮崎美紀、京野陽子、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、人種差や地域分布が原発性高尿酸尿症 2 型の遺伝子診断をさらに有効にする、第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.04.17、岡山市
- ⑦鈴木孝尚、新保 齊、栗田 豊、麦谷荘一、大園誠一郎、妊娠中に尿管結石を生じた 1 例、第 116 回静岡県泌尿器科医会、2009.06.20、浜松市
- ⑧高山達也、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、尿酸代謝関連酵素に尿路結石治療の未来を求めて、第 59 回日本泌尿器科学会中部総会、2009.10.29、金沢市
- ⑨永田仁夫、麦谷荘一、松本力哉、伊藤寿樹、杉山貴之、大塚篤史、高山達也、古瀬 洋、栗田 豊、大園誠一郎、妊娠中に発祥した上部尿管結石症に対し経尿道的尿管結石碎石術を施行した 1 例、第 23 回日本 Endourology・ESWL学会総会、2009.11.12、東京都
- ⑩高山達也、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、尿路結石発症の謎にせまる：尿路結石発生における尿酸代謝の重要性、第 98 回

日本泌尿器科学会総会、2010.4.27、盛岡市

- ⑪永田仁夫、高山達也、麦谷荘一、小田敏明、市山 新、大園誠一郎、SGT 活性による AGT 測定系の確立、第 20 回日本尿路結石症学会、2010.08.27、大阪市
- ⑫原田雅樹、水野卓爾、高山達也、松本力哉、ADL 要介護状態の高齢患者に認められた上部尿路結石に対する碎石術の検討、第 60 回日本泌尿器科学会中部総会、2010.12.01、名古屋市

[図書] (計 7 件)

- ①麦谷荘一、永田仁夫、高山達也、大園誠一郎、医学書院、PNL：補助装置、尿路結石症のすべて、2008、pp80
- ②麦谷荘一、永田仁夫、高山達也、大園誠一郎、医学書院、PNL：合併症、尿路結石症のすべて、2008、pp81
- ③麦谷荘一、永田仁夫、高山達也、大園誠一郎、医学書院、PNL：治療成績と適応拡大、尿路結石症のすべて、2008、pp82
- ④麦谷荘一、永田仁夫、高山達也、大園誠一郎、医学書院、PNL：ESWL との併用療法、尿路結石症のすべて、2008、pp83
- ⑤永田仁夫、高山達也、麦谷荘一、大園誠一郎、医学書院、尿路結石の高分子物質、尿路結石症のすべて、2008、pp169-pp170
- ⑥高山達也、永田仁夫、麦谷荘一、大園誠一郎、医学書院、シュウ酸代謝関連酵素の測定、尿路結石症のすべて、2008、pp196
- ⑦Cramer SD, Takayama T, Lifton RP, Stefan Somlo S, Giebisch GH, Seldin DW, Elsevier, Chapter 33 : Primary Hyperoxaluria Genetic Diseases of the Kidney, 2009, pp571-pp586

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 達也 (TAKAYAMA TATSUYA)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90324250

(2) 研究分担者

大園 誠一郎 (OZONO SEIICHIRO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00183228

永田 仁夫 (NAGATA MASAO)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70397397

高岡 直央 (TAKAOKA NAOHISA)
浜松医科大学・医学部・特任研究員
研究者番号：30467229

(3) 連携研究者

該当者無し