

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390217

研究課題名(和文) 遺伝子ノックアウトによりファンconi症候群様所見を示す膜蛋白の発見とその意義の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of a membrane protein TRAP involved in Fanconi syndrome like symptoms.

研究代表者

金井 好克 (Kanai, Yoshikatsu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60204533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)： バイオインフォマティクスによる解析から、多数の近位尿管管腔側輸送体と共発現変動する腎特異的新規膜タンパクTRAPを同定し、そのノックアウトマウスを作製したところ、Fanconi 症候群類似の、糖、アミノ酸、尿酸等の顕著な尿中排泄上昇を呈することを明らかにした。更にプロテオミクスによる網羅的解析により、TRAPが統合的に制御する管腔側輸送体群の全体像を明らかにし、TRAPによる輸送体群の管腔側膜への局在維持機構を解析した。

本研究の成果は、Fanconi 症候群の新たな原因遺伝子候補を提示するとともに、溶質輸送の生理学において個別の輸送体を統合する新たな視点を導入するものと期待される。

研究成果の概要(英文)： We identified a novel membrane protein TRAP, which was specifically localized at luminal membrane of renal proximal tubules. It's KO mice showed Fanconi syndrome-like symptoms such as glucosuria, aminoaciduria and uricosuria. TRAP was co-expressed with various renal transporters. Proteomics analysis showed that TRAP interacts directly with those transporters to regulate their localization at luminal membrane of renal proximal tubules. TRAP KO mice did not maintain normal distribution of transporters at luminal membrane. These data suggest that TRAP can regulate multiple transporters of renal proximal tubules by affecting their localization at luminal membrane. Our results indicate that TRAP can be a new candidate gene responsible for Fanconi syndrome. They, furthermore, suggest a novel mechanism to integrate multiple transporters in solute transport.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎臓学 腎生理学

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管の物質輸送を担う輸送体は、腎生理学の研究の蓄積と、尿中への溶質の漏出をきたす種々の遺伝性疾患の解析によりその存在が予想され、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。研究代表者は、尿細管の輸送を担う、糖、アミノ酸、尿酸、有機酸の輸送体の分子実体解明に貢献してきた (*Nature* 360, 467-71, 1992; *J Clin Invest* 93, 397-404, 1994; *J Biol Chem* 272, 18526-9, 1997; *J Biol Chem* 274, 19745-51, 1999; *J Biol Chem* 274, 13675-80, 1999; *J Biol Chem* 274, 28845-8, 1999; *J Biol Chem* 275, 20787-93, 2000; *Nature* 417, 447-52, 2002; *Nat Genet* 36, 999-1002, 2004; *Am J Hum Genet* 83, 744-51, 2008; *Sci Transl Med* 1: 5ra11, 2009)。これらの分子クローニングの成果は、輸送体の生理機能と個々の輸送体異常症の解明に貢献したが、いまだに多くの未解明の問題が残されている輸送体機能異常症にファンconi (Fanconi) 症候群がある。

Fanconi 症候群は、近位尿細管の輸送体機能の広汎な障害であり、後天性のものと遺伝性のものがある。後天性の Fanconi 症候群は他の疾患に随伴する場合や、薬剤や重金属による尿細管上皮細胞の ATP 産生障害に起因するものが知られている。遺伝性の Fanconi 症候群には、代謝異常やミトコンドリア病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。最近、近位尿細管管腔側膜の輸送体の変異による細胞膜移行の障害が、Fanconi 症候群の原因となる例が報告された。これは、一つの管腔側膜輸送体の細胞膜移行の障害が同じく管腔側膜にある他の多くの輸送体の細胞膜移行に異常をきたすもので、管腔側膜の複数の輸送体の膜移行を統合的に制御する機構の存在を予想させるものであるが、その実体は解明されていない。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、昨今、その背景にある分子複合体の重要性が強調されている。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重要な課題となる。研究代表者らは、「このような管腔側膜輸送体局在の統合的制御の背景には、それを司る分子が存在する」という想定のもとに、この分子の探索を行った。その分子の異常は、Fanconi 症候群の新たな原因遺伝子として期待されるものとなるはずである。探索は、共発現データベース COXPRESS を用いたバイオインフォマティクスによる解析から出発した。管腔側の輸送体を統合的に制御する分子は、発現制御においても多くの輸送体との関連性が見いだされる可能性があるため、管腔側輸送体と共発現する遺伝子を探索した結果、COXPRESS 解析において高いスコアで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(図1左)。その遺伝子のコードする蛋白 (TRAP と命名 : transporter-associated protein) は、2回膜貫通型の新規膜蛋白であり(図1右)、腎特異的な発現を示し、免疫組織学的検討では近位尿細管の管腔側に局在していた。

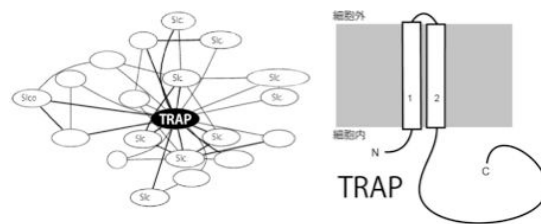


図1 COXPRESS 解析結果と TRAP

そこで、TRAP のノックアウトマウスを作製したところ、ホモノックアウトマウスは、明らかな腎の組織学的な変化は示さないが、尿中にグルコース、尿酸、アミノ酸の漏出を呈し、Fanconi 症候群に類似の尿所見を示した。図3及び表1(次ページ)に示すように、野生型マウスに比して、ホモノックアウトマウスでは、グルコースは約9倍、尿酸は約2倍、アミノ酸のうち、グリシン、ヒドロキシプロリン、スレオニン、グルタミン、シスチン、メチオニン、イソロイ

シン、ロイシン、ヒスチジン等は、2-5倍の尿中排泄量の上昇が見られた。従って、腎近位尿細管の管腔側に発現する2回膜型蛋白である 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蛋白の有力な候補となる。本研究は、TRAPの機能的意義を明らかにし、Fanconi 症候群との関連を探求した。

2. 研究の目的

遺伝子ノックアウトにより Fanconi 症候群様所見を示す新規膜蛋白 TRAP の機能的意義を解明し、Fanconi 症候群との関連を探求するために、本研究は以下の目標を設定した。1. 網羅的比較定量解析が可能なプロテオミクス手法を用いて TRAP が相互作用する輸送体の同定を行い、TRAP が関与する輸送体制御機構の全体像を明らかにする。2. TRAP が輸送体を管腔側膜上に保持する機構を明らかにする。3. TRAP が管腔側膜上への輸送体保持を通じて生理機能に如何に関わるか明らかにし、Fanconi 症候群との関連へとアプローチする。

3. 研究の方法

1. 網羅的比較定量プロテオミクスによる TRAP ノックアウトマウス尿細管輸送体の変動解析

TRAP により制御される近位尿細管管腔側膜の輸送体の変動の全体像をつかむ目的で、網羅的比較定量プロテオミクスを用いて検討した。尿細管管腔側膜画分を調整し、尿素洗浄より細胞膜に結合する可溶性蛋白を十分に除去した。続いて、トリプシンで消化し、PTS (Phase Transfer Surfactant)法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した。各画分は、LC-MS (advance LC, Q-Exactive, Thermo)で分析した。得られたマススペクトルデータを UniProt データベースとタンパク同

定/定量ソフトウェアを用いて解析した。網羅的比較定量プロテオミクスの変動解析によって管腔側膜上で量の変化が見いだされた輸送体については、より定量性に優れる SIM 法を用いた標的プロテオミクスで再定量した。

2. 管腔側膜輸送体の局在における TRAP 機能の解析

TRAP は、近位尿細管管腔側膜上の輸送体の存在量を維持していることを示唆する結果を得ている。管腔側膜上輸送体の局在について抗体を用いた解析を行い、野生型マウスと TRAP ノックアウトマウスで比較し、TRAP による輸送体の局在制御機構を解析した。

3. TRAP による管腔側膜輸送能の制御解析

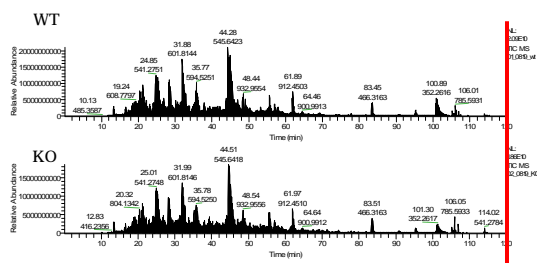
TRAP は輸送体局在及び存在量の維持を通じ、輸送体の生理機能に大きな影響を与えていると考えられる。近位尿細管管腔側における溶質取り込みの変化を明らかにするため、腎臓近位尿細管刷子縁膜小胞 (BBMV) を用いて、Rapid Filtration 法による輸送活性測定を行い、野生型マウスと TRAP ノックアウトマウス由来の BBMV における各種溶質輸送能の比較を行った。

4. 研究成果

1. 網羅的比較定量プロテオミクスによる TRAP ノックアウトマウス尿細管輸送体の変動解析

プロテオミクスを用いた網羅的解析の結果、698 分子が同定され(図 2A)、TRAP ノックアウトマウスを用いたサブトラクションの結果、TRAP 特異的に相互作用する分子として 145 のタンパク質が同定された(図 2B)。同定された分子群の中には輸送体及び輸送体関連因子などが多数存在しており、TRAP が輸送体との相互作用を通じて、複数の輸送体群を統合的に制御し得る可能性が示唆された。これら同定された個々の分子と生理機能及び病

態との関連性の解析を進めている。



同定されたタンパク質

Sample	Protein	Peptide
WT	637	3019
KO	553	2391

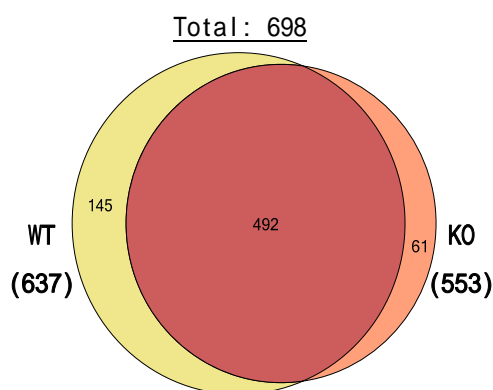


図2 質量測定により得られたイオンクロマトグラム(上)及びデータベース解析により同定されたタンパク質(下)

2. 管腔側膜輸送体の機能を維持する TRAP 機能の解析

質量分析の結果を基に、TRAPと相互作用する候補分子群について、マウス腎臓組織切片において輸送体の特異抗体及び管腔側膜マーカーを用いた二重染色を行った。得られた染色結果は超解像顕微鏡システム(SR-SIM)を用いて微細構造の解析に供した。その結果、複数の輸送体について、野生型マウスでは管腔側膜マーカーと局在が一致しているのに対し、TRAPノックアウトマウスでは管腔側膜マーカーより内側に局在が移動しており、尿細管の物質輸送機能への影響が示唆された(図3)。これらの結果より、TRAPノックアウトマウスにおけるFanconi症候群類似の尿所見は、輸送体局在の変化による尿細管機能変化(再吸収異常)が主要な要因の一つで

あると考えられた。

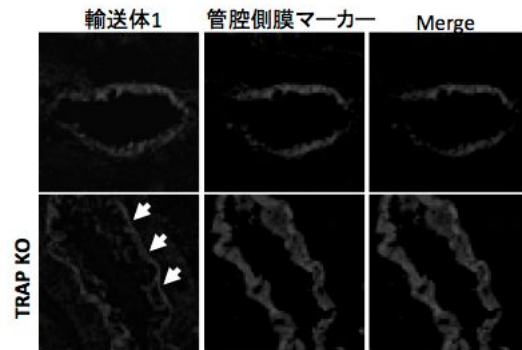


図3 野生型マウス(上)とTRAPノックアウトマウス(下)における腎臓近位尿細管管腔側膜上の輸送体局在

3. TRAPによる輸送体生理機能制御機構の解析

これまでの結果より、TRAPは輸送体の管腔側膜上への維持を通じて、輸送体の機能に密接に関与する可能性が考えられる。TRAPによる管腔側膜における輸送体機能制御を解析するため、近位尿細管刷子縁膜小胞(BBMV)を用いた輸送活性測定を行った結果、関連する多くの輸送体についてはTRAPノックアウトマウス由来のBBMVにおいて基質の取り込みが野生型マウスBBMVに対し変化していることが確認された。溶質については変動が確認されなかったものもあるが、これは、実験に用いたBBMVサンプルは近位尿細管全般を含んでいるのに対して、TRAPは近位尿細管S3のみに存在するためであり、TRAPの機能を抽出するには、S1、S2部位が可能な限り取り除かれ、S3が濃縮されたBBMVを調整する必要があると考えられる。これについては引き続き検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

- Hanaoka H, Ohshima Y, Suzuki Y, Yamaguchi A, Watanabe S, Uehara T, Nagamori S, Kanai Y, Ishioka NS, Tsushima Y, Endo K, Arano Y. Development of a Widely Usable Amino Acid Tracer: 76Br-Methyl-Phenylalanine for Tumor PET Imaging. J Nucl Med. 2015 May;56(5):791-7. doi:

- 10.2967/jnumed.114.152215.
2. Wongthai P, Hagiwara K, Miyoshi Y, Wiriyaserkul P, Wei L, Ohgaki R, Kato I, Hamase K, Nagamori S, Kanai Y. Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by ATBO+, LAT1 and LAT2. *Cancer Sci*. 2015 Mar;106(3):279-86. doi: 10.1111/cas.12602.
 3. Kaira K, Sunose Y, Oriuchi N, Kanai Y, Takeyoshi I. CD98 is a promising prognostic biomarker in biliary tract cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2014 Dec;13(6):654-7. PubMed PMID: 25475870.
 4. Namikawa M, Kakizaki S, Kaira K, Tojima H, Yamazaki Y, Horiguchi N, Sato K, Oriuchi N, Tominaga H, Sunose Y, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Takeyoshi I, Yamada M. Expression of amino acid transporters (LAT1, ASCT2 and xCT) as clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2014 Oct 9. doi:10.1111/hepr.12431.
 5. Chiba T, Matsuo H, Kawamura Y, Nagamori S, Nishiyama T, Wei L, Nakayama A, Nakamura T, Sakiyama M, Takada T, Taketani Y, Suma S, Naito M, Oda T, Kumagai H, Moriyama Y, Ichida K, Shimizu T, Kanai Y, Shinomiya N. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan;67(1):281-7. doi: 10.1002/art.38884. PubMed PMID: 25252215.
 6. Isoda A, Kaira K, Iwashina M, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Asao T, Matsumoto M, Sawamura M. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci*. 2014 Nov;105(11):1496-502. doi: 10.1111/cas.12529.
 7. Nagamori S, Kanai Y. [Amino acid transporters in cancer]. *Seikagaku*. 2014 Jun;86(3):338-44. Review.
 8. Chiba T, Matsuo H, Nagamori S, Nakayama A, Kawamura Y, Shimizu S, Sakiyama M, Hosoyamada M, Kawai S, Okada R, Hamajima N, Kanai Y, Shinomiya N. Identification of a hypouricemia patient with SLC2A9 R380W, a pathogenic mutation for renal hypouricemia type 2. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014;33(4-6):261-5. doi: 10.1080/15257770.2013.857781. PubMed PMID: 24940677.
 9. Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, Tominaga H, Oriuchi N, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Tsukamoto N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell

carcinoma. *Head Neck*. 2014 Jun 10. doi: 10.1002/hed.23797.
 永森收志, 金井好克 プロテオミクスを用いたトランスポーターの網羅的発現変動解析: 食餌等による栄養吸収の変化をとらえる *生物の科学・遺伝* 2015;69:47-51

[学会発表](計10件)

1. Noriyoshi Isozumi, Pattama Wiriyaserkul, Pornparn Kongpracha, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai 網羅的定量プロテオミクス解析による細胞株のトランスポーター発現プロファイル 第87回 日本生化学会大会 2014年10月17日 京都
2. Pornparn Kongprach, Pattama Wiriyaserkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Suguru Okuda, Kenjiro Tadagaki, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Inhibition of cancer- type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular events in pancreatic cancer cells. The 87th Meeting of Japanese Pharmacological Society Kinki Branch 2014年10月24日 和歌山
3. Noriyoshi Isozumi, Pattama Wiriyaserkul, Pornparn Kongpracha, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Expression Profiles of Amino Acid Transporters in Cancer Cell Lines by Comprehensive Quantitative Proteomics. 新学術領域研究「多階層生体機能学」最終成果報告会・終了記念シンポジウム 2015年2月5日 大阪
4. Ling Wei, Hideyuki Tominaka, Pattama Wiriyaserkul, Ryuichi Ohgaki, Kohei Hagiwara, Suguru Okuda, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. 3-fluoro- L- alpha- methyltyrosine (FAMT) PETにおける18F- FAMTの腎臓集積の分子機序の解明 第88回 日本薬理学会年会 2015年3月18日 名古屋
5. Pornparn Kongpracha, Pattama Wiriyaserkul, Noriyoshi Isozumi, Printip Wongthai, Kazuko Kaneda-Nakashima, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Suppression of cancer- type amino acid transporter LAT1 affects multiple cellular events in pancreatic cancer cells. The 88th Annual Meeting of Japanese Pharmacological society 2015年3月19日 名古屋
6. Printip Wongthai, Kohei Hagiwara, Pattama Wiriyaserkul, Noriyoshi Isozumi, Ryuichi Ohgaki, Shushi Nagamori, Yoshikatsu Kanai. Cellular uptake of 4- borono- L- phenylalanine, a 10B carrier of boron neutron capture

therapy, depends on the expression of cancer type amino acid transporter LAT1. The 88th Annual Meeting of Japanese Pharmacological society 2015年3月19日 名古屋

7. Nagamori S, Kanai Y. Comprehensive evaluation of cancer specific amino acid transporter LAT1 reveals multiple physiological functions of LAT1 and mechanism of anti-tumor activity by LAT1 inhibitors. 第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日 名古屋
8. Nagamori S, Kanai Y. Identification of a new heterodimeric amino acid transporter in the apical membrane of renal proximal tubule. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会 2015年3月22日 神戸
9. 永森收志 トランスポーターの網羅的プロテオミクスによるアミノ酸輸送系のプロファイリングと変動解析 第19回アミノ酸セミナー 2014年12月5日 東京
10. Nagamori S. Transportsomes; the physical and/or functional complexes of transporters. The 2nd International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2014年11月1日 滋賀

〔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/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金井好克 (KANAI, Yoshikatsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60204533

(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

(3)研究分担者

奥田傑 (OKUDA, Suguru)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 50511846

(4)研究分担者

永森收志 (NAGAMORI, Shushi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90467572