

124 痛風を誘発するリソソームにおける尿酸動態の分子基盤 保嶋 智也

【目的】 痛風は、血中の尿酸濃度が溶解度を上回り、尿酸結晶 (MSU : monosodium urate) が生成されることに起因して発症する。このことから、血清尿酸値が飽和濃度付近である 7 mg/dl を超えると痛風発症のリスクを抱える高尿酸血症と診断され、その罹患者割合は高齢になるにつれ飛躍的に高まる。しかしながら、血清尿酸値が 7 mg/dl を超えた人のすべてが痛風を発症するわけではなく、痛風の 5 年発症率は、8.0~8.9 mg/dl の場合は 4.1%、9.0~9.9 mg/dl の場合は 19.8%、10 mg/dl 以上の場合では 30%とされている。逆に言うと、血清尿酸値が尿酸の溶解度を大きく上回る高尿酸血症罹患者においても、その 7 割が痛風を発症していない。このことから、我々は、生体においては、恒常的に結晶化した尿酸を可溶化させる機構が備わっており、その機能不全が痛風を発症させると考えた (下図)。痛風の治療は、血中尿酸値を低下させることが基本である。しかし、体内の尿酸は、強い抗酸化作用を示す重要な生理活性物質として機能している。体内の尿酸を含む抗酸化物質レベルと寿命には因果関係があると指摘されている。それゆえ、体内の抗酸化物質が低下傾向にある高齢者において、過度の尿酸値の低減は、生体への悪影響が懸念される。以上から、本研究課題では生体における MSU の可溶化機構を解明し、血中尿酸値の低下を標的としない全く新しい痛風治療の戦略構築を目指す。

【方法】 LUET1 はリソソーム膜に局在するため、現状では、輸送機能評価に際しては、界面活性剤であるジキトニンでの処理により細胞膜透過性を上昇させ、尿酸を細胞質内へ移行させて輸送を評価している (1. **【目的】** における評価法)。しかし、ジキトニン処理の条件設定が難しく、再現性に問題がある。そこで、膜タンパク質をリソソーム膜に局在させる移行シグナルに着目した。LUET1 のアミノ酸配列を解析すると、N 末端側が細胞質内にあり、さらにその細胞質内領域に ExxxLL 配列を有していることが確認された。そこで、この配列を ExxxAA に変換することでリソソーム膜移行シグナルを除去した LUET1-LLAA 体を作製し、細胞膜輸送に基づいた尿酸輸送活性を評価した。また、LUET1-LLAA 体を用い、LUET1 介在性の尿酸輸送の親和性や、輸送駆動力等の基本的な特性を速度論的手法により解析した。

【結果】 ヒト胎児由来 HEK293 細胞に、LUET1、LEUT1-LLAA 変異体をそれぞれ遺伝子導入し、細胞内への尿酸取り込みを評価した結果、mock 細胞に比べ、LUET1 では約 2 倍、LEUT1-LLAA では約 5 倍の細胞内取り込みの上昇がみられた。ウエスタンブロットで、LUET1、LEUT1-LLAA のタンパク発現量を検討したところ、その量はほぼ同等であったことから、リソソーム膜移行シグナルの除去で、多くの LUET1 の局在が細胞膜に変動したことが示唆された。また、LEUT1-LLAA の尿酸輸送は顕著な飽和性を示し、その親和性を表すミカエリス定数 K_m は、980 μM と算出された。また、LEUT1-LLAA を介した尿酸輸送は、顕著な pH 依存性を示した。そこで、LUET による尿酸輸送に H^+ が駆動力として関与しているか、プロトノフォアの処理を行ったところ、細胞内尿酸取り込みは有意に減少した。このことから、LEUT1 の尿酸輸送は H^+ との共輸送を駆動力としていることが示された。

想定される高尿酸血症時の痛風発症機構 (マクロファージにおける機構)

