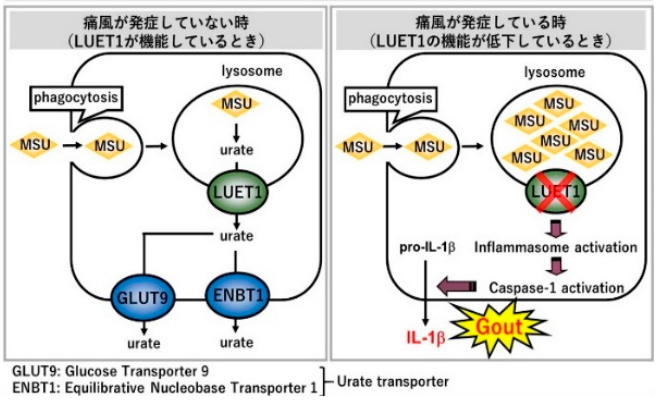
124　痛風を誘発するリソソームにおける尿酸動態の分子基盤	保嶋　智也

【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ギ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、ジギ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）



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

名古屋市立大学 大学院医薬学総合研究院（薬学） 薬物動態制御学分野

Key words：尿酸，トランスポーター，リソソーム，痛風

緒　言

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 monohydrate）が生成されることに起因して発症する。まず血中で結晶化した尿酸の微粒子は、マクロファージにより貪食され、リソソームに移行し、リソソーム膜を破壊する。その結果、インフラマソームが活性化され、炎症性サイトカイン（IL-1βやIL-18）が分泌されることで、痛風が発症すると考えられている［1］。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、高尿酸血症と診断される。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10 mg/dl以上の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、痛風発症のトリガーは血中の尿酸の結晶化という物理化学的な要因に依るものではないと考えた。そして、新たに生体においては、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の仮説を立て、その検証を行うこととした。

上述の様に、痛風の発症は、マクロファージにより貪食されMSUがリソソーム膜を傷害することに起因すると考えられている。つまり、マクロファージのリソソーム内に過剰に蓄積したMSUが痛風発作を誘発すると考えられる。それゆえ、血清尿酸値が高いにも関わらず痛風発作を起こしていない場合においては、マクロファージのリソソーム内においてMSUが恒常的に可溶化されていると推察される。可溶化を効率的に行うには、リソソーム内の尿酸濃度が低く保たれている必要がある。このことから、我々は、マクロファージのリソソーム膜に局在し、リソソーム外に尿酸を排泄させるトランスポーターが存在している可能性を考えた。

そこで、まず*in silico*スクリーニングにより「リソソーム膜に局在するトランスポーター様タンパク質」かつ「マクロファージにおいて高発現」という条件に該当する遺伝子を抽出し、クローニングした。次に、それらをヒト腎由来HEK293細胞に一過性に発現させ、尿酸輸送活性を評価したところ、尿酸輸送活性を有するトランスポーターを見出すことに成功した。我々は、本トランスポーターをLysosomal Urate Exporting Transporter 1（LUET1）と命名した。本研究課題においては、LUET1の詳細な機能解析を行うと共に、高尿酸血症から痛風発症へのトリガー因子としてLUET1が関与する可能性（仮説）について検証を行う。これにより、LUET1を標的とし、これまでの血清尿酸値を下げるという痛風治療のコンセプトとは全く異なる、痛風治療薬の開発に繋げることを目的とする。

方　法

1.　リソソーム局在化シグナル除去によるLUET1の細胞膜局在化　～簡易機能評価法の確立～

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ギトニンでの処理により細胞膜透過性を上昇させ、チアミンを細胞質内へ移行させてリソソーム内取り込みを評価している。しかし、ジギ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、LUET1を細胞膜輸送に働かせることで、尿酸の細胞内取り込み評価に基づく、より簡便で安定した機能評価系を構築する。そのために、まず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。膜貫通タンパク質のN末端もしくはC末端の細胞内ドメインに

D/Exxxφφ（x：任意のアミノ酸、φ：疎水性アミノ酸）配列を有すると、リソソーム膜に局在することが知られている［2］。LUET1 のアミノ酸配列を解析すると、N 末端側が細胞内にあり、さらにその細胞内領域に 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変異体（LUET1-LLAA）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。

2. LUET1 の尿酸輸送機能解析

実験には、LUET1-AA を、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に一過性に発現させた細胞を用い、LUET1 による尿酸の細胞内取り込みを評価・解析する。輸送機能評価には放射ラベルされた尿酸（[^{14}C]urate）を用い、その放射線量を測定することによって、定量を行った。LUET1 のチアミン輸送活性を既に見出しているが、詳細な機能の解析には至っていないため、LUET1 の尿酸に対する親和性や、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。それにより、高尿酸結晶から痛風発症を誘発する機構における LUET1 の機能的役割を探る。

結果および考察

1. リソソーム局在化シグナル除去による LUET1 の細胞膜局在化

LUET1 のリソソーム膜移行シグナルを置換除去した LUET1-LLAA 導入細胞において、mock 細胞での取り込みに比べて 5 倍程度の高い取り込みが見られ、LUET1-LLAA が尿酸に対する輸送能を有することが示唆された（Fig.1a）。一方で、LUET1 導入細胞での取り込みは、mock 細胞での取り込みに比べて 2 倍程度であった。また、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（Fig.1b）。このことから、LUET1 が主にリソソーム膜に局在するため、その多くが尿酸の細胞内取り込みに働くことができなかったことによると考えられる。リソソーム膜移行シグナルが除去されている LUET1-LLAA は、細胞膜に移行したことで、尿酸の細胞内取り込みに働くことができたものと考えられる。リソソーム膜移行シグナルは、LUET1 の N 末端近くの細胞内ドメインにあるため、この部分の 2 アミノ酸の置換による移行シグナル除去が LUET1 の機能に影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えられ、LUET1-LLAA は、LUET1 と同等の尿酸輸送能を有するものと考えられる。

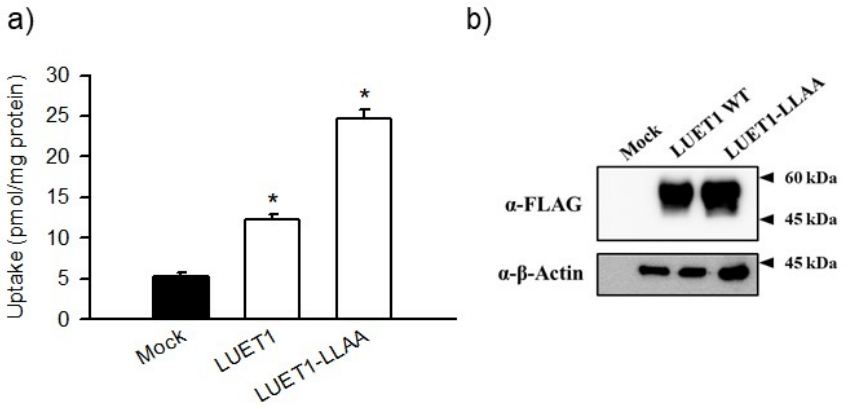


Fig.1. Uptake of Urate in HEK293 Cells Transiently Expressing LUET1-LLAA

a) The uptake of [^{14}C]urate (4 μM) was evaluated for 2 min at pH 5.0 and 37℃ in HEK293 cells transiently expressing LUET1 and LUET1-LLAA, and mock cells. Data are presented as the means±S.E. (n = 3). *p＜0.05 compared with the value in mock cells.

b) Western blot analysis of the protein expression of transiently introduced FLAG- LUET1 and LUET1-LLAA in HEK293 Cells. The analysis was performed using the samples (10 μg aliquots of the whole-cell lysate. ß-actin was used as a loading control.)

2. LUET1 による尿酸取り込みの時間推移と濃度依存性

LUET1-LLAA による尿酸輸送機能解析にあたり、LUET1-LLAA を HEK293 細胞一過性発現系での尿酸の取り込みの時間推移を pH 5.0 の酸性条件下で検討した。Fig.2a に示したように、LUET1-LLAA 導入細胞での尿酸取り込みは、mock 細胞での取り込みを大きく上回り、5 分まで時間に比例して増大した。これに基づき、以降の実験では、取り込み時間を 5 分に設定し、LUET1-LLAA による尿酸の初期取り込みを評価することとした。

LUET1-LLAA による尿酸取り込みの濃度依存性について検討した結果、トランスポーターによる輸送の特徴である飽和性が認められた（Fig.2b）。この飽和性は Michaelis-Menten 型の担体輸送モデルに適合し、Michaelis 定数（K_m）は 980 μM、最大輸送速度（V_{max}）は 1.92 nmol/min/mg protein と得られた。この速度論的特性から、本研究での通常の輸送特性評価での尿酸濃度（4 μM）は、K_m を十分に下回り、輸送効率が最高となる線形領域内にあることが確認された。また、尿酸の血中濃度は 200～400 μM 程度とされており、同様に K_m を下回っている。尿酸結晶を貪食した後のリソソーム内尿酸濃度の詳細は不明であるが、この K_m は尿酸の飽和濃度（約 400 μM）に近い水準にあることから、リソソームにおける尿酸の可溶化機構に機能しているものと推察される。

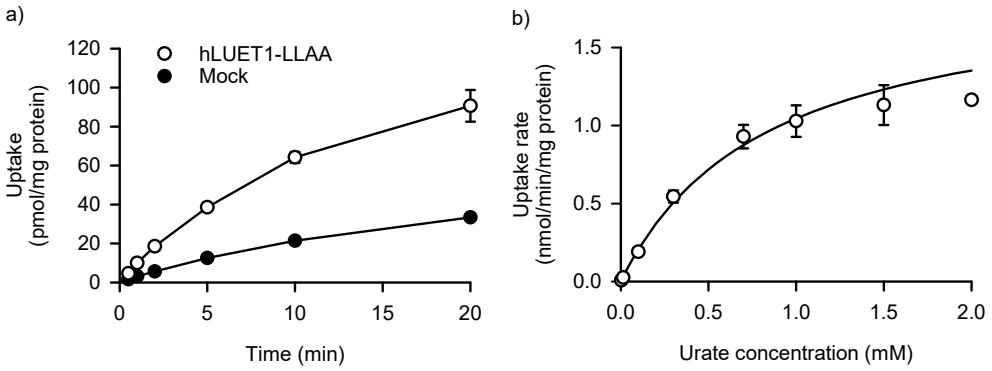


Fig.2. Time Course and Concentration Dependence of the Uptake of Urate in HEK293 Cells Transiently Expressing LUET1-LLAA

a) The uptake of [^{14}C]urate (4 μM) was evaluated at pH 5.0 and 37℃ in HEK293 cells transiently expressing LUET1-LLAA and mock cells. Data are presented as the means ±S.E. (n = 3).

b) The specific uptake of [^{14}C]urate was evaluated at pH 5.0 and 37℃ in HEK293 cells transiently expressing LUET1-LLAA and mock cells. Data are presented as the means ±S.E. (n = 3). The K_m and V_{max} are 980±75 μM and 1.92±0.14 nmol/min/mg protein, respectively.

3. LUET1 による尿酸取り込みに対する細胞外 pH の影響

LUET1 による尿酸輸送機能特性の評価として、細胞外 pH の影響について検討した。LUET1-LLAA を導入した HEK293 細胞での尿酸の取り込みは、pH 5.5 から 4.5 までの範囲で pH 上昇に伴って低下し、pH 6.0 以上では、mock 細胞での取り込みと同等の低レベルとなった（Fig.3a）。一方、mock 細胞での尿酸取り込みは、pH に依らず低レベルで推移し、LUET1-LLAA 導入細胞での pH 依存的な尿酸取り込み特性は LUET1-LLAA の機能特性に由来するものであることが確認された。この結果から、LUET1-LLAA の尿酸輸送機能は顕著な酸性指向性を有しており、酸性条件下で高い活性を示す一方で、pH 6.0 以上の中性ないしアルカリ性条件下では、ほとんど機能しないことが示唆された。通常、細胞質は pH7.4 前後の中性付近の環境にある一方で、リソソーム内は pH 5 前後の酸性環境にある。このような細胞質及びリソソーム内 pH 環境を考慮すると、酸性指向の pH 依存性を示す LUET1 の生理的役割としては、リソソーム内から細胞質への尿酸の排出輸送への関与が考えられる。

このような酸性指向の pH 依存性輸送のメカニズムとしては、H^+共輸送の可能性が考えられる。この点を探るため、H^+イオノフォア（脱共役剤）である CCCP（carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone）及び FCCP（carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone）の効果を検討した。その結果、取り込み溶液への CCCP 及び FCCP の添加によって細胞内外のプロトン濃度勾配を消失させることにより、LUET1-LLAA を導入した HEK293 細胞での尿酸取り込みは大きく低下し、mock 細胞での取り込みと同程度となった（Fig.3b）。一方、mock 細胞での取り込みは、CCCP 及び FCCP の影響を受けることなく、低レベルであり、LUET1-LLAA 導入細胞での結果は、LUET1-LLAA の特性に由来するものであることが確認された。この結果は、H^+濃度勾配の消失により LUET1-LLAA の尿酸輸送活性は失われることを示唆するものであり、したがって、LUET1 は H^+濃度勾配を駆動力とする機構により機能することを示唆するものである。

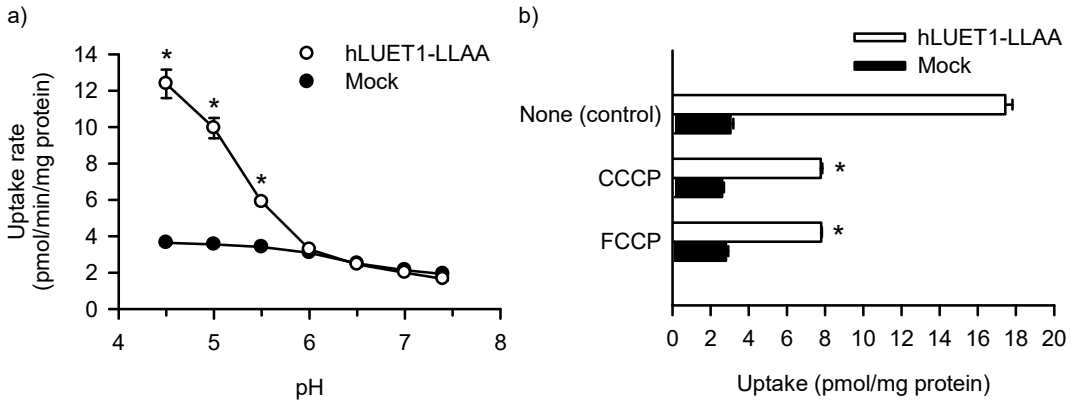


Fig.3. Effect of Extracellular pH and H^+ Ionophores on Urate Uptake in HEK293 Cells Transiently Expressing LUET1-LLAA

a) The uptake of [^{14}C]urate (4 μM) was evaluated at 37℃ in HEK293 cells transiently expressing LUET1-LLAA and mock cells. Data are presented as the means±S.E. (n = 3). *p＜0.05 compared with uptake in mock cells at each pH.

b) The uptake of [^{14}C]urate (4 μM) was evaluated in the presence of a protonophore (50 μM) or in its absence at pH 5.0 and 37℃ in HEK293 cells transiently expressing LUET1-LLAA and mock cells. Data are presented as the means±S.E. (n = 3). *p＜0.05 compared with control for LUET1-LLAA.

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野の湯浅博昭教授、防衛医科大学校分子生体制御学分野の松尾洋孝准教授、東京大学医学部附属病院薬剤部の高田龍平講師である。

文　献

1） V Hornung, F Bauernfeind, A Halle, E O Samstad, H Kono, K L Rock, K A Fitzgerald, E Latz. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol. 2008 Aug;9(8):847-56. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18604214 DOI: 10.1038/ni.1631

2） F G Guarnieri 1, L M Arterburn, M B Penno, Y Cha, J T August. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. J Biol Chem. 1993 Jan 25;268(3):1941-6. PMID: 8420968