

特集：水電解質と輸液

膜輸送蛋白質 Up-to-Date

安西尚彦

はじめに

腎臓は、生体の恒常性を維持するために重要な器官であり、特に Na^+ ・水調節機構は細胞外液量や血漿浸透圧をそれぞれ独立に制御する腎臓の水電解質代謝の代表とも言える。腎臓のネフロンはこれらの生理機能発現のために高度に発達したものであり、糸球体濾過とそれに続く尿細管での再吸収および分泌が行われる。この尿細管細胞におけるイオンや溶質の再吸収と分泌は膜輸送蛋白質が担っている。本稿では、腎臓を中心として膜輸送蛋白質に関する研究の最近の進歩について概説する。

膜輸送蛋白質とは

細胞膜に存在するイオン、溶質輸送に関与する蛋白質は、古典的な生理学的・薬理学的特性から、チャンネル型輸送体(以下、チャンネル)と担体(キャリア)型輸送体(以下、トランスポーター)に分類される。1990年代に行われた分子クローニングにより、これらの膜輸送蛋白質は、いずれも細胞膜を複数回貫通する構造を持つものであることがわかった。1992年には水に対するチャンネル(aquaporin)が発見された¹⁾ことから、チャンネルはイオンチャンネルと水チャンネルに分類される。トランスポーターは、ATPの加水分解エネルギーを利用した能動輸送を行う Na^+ 、 K^+ ポンプや H^+ ポンプのようなイオンポンプと、ATPのエネルギーを用いず、共輸送・逆輸送・単輸送などを行う SLC(solute carrier)トランスポーター(ヒトで360種類)、さらに最近では薬物などの排出に関与し ATP 結合領域(ATP-binding cassette)を持つ ABCトランスポーター(ヒトで48種類)の3つに分類されている(表1)。

チャンネルとトランスポーターの相違

トランスポーターはチャンネルとは異なり“pore”が全開になることはなく、輸送のたびに基質結合部位の向きを細胞内・外に1回ごとにスイッチ・リセットしながら物質を輸送するとされる。このため、トランスポーターの輸送率($10^2 \sim 10^4$ 個/秒)はチャンネルの輸送率($10^6 \sim 10^8$ 個/秒)よりもきわめて遅くなる。さらに有機溶質のトランスポーターでは、チャンネルとは異なり、輸送基質として内因性物質だけでなく、薬物や環境化学物質を含む多くの外因性物質も認識するものがある。この「多選択性」の輸送もトランスポーターの特徴と言える。

膜輸送蛋白質遺伝子異常

細胞の生存と機能は、細胞膜に存在するチャンネルやトランスポーターなどの膜輸送蛋白質により形成される細胞内外のイオン組成、電位差などの維持によって保障される。さらに膜輸送蛋白質は本来の細胞への栄養供給・不要代謝産物除去といった個々の細胞の生存維持の役割だけでなく、上皮組織における経上皮輸送と神経組織における神経伝達物質の回収のような組織の特異機能の一端を担うものもある。したがって、多くの疾患が膜輸送蛋白質の遺伝子異常によりもたらされることが推測され、それらに対しては遺伝子治療が合目的治療となる。 Cl^- チャンネルの一種であり ABCトランスポーターにも分類される CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子変異により嚢胞性線維症を発生することを皮切りに²⁾、膜輸送蛋白質の遺伝子異常により生じる「チャンネル病」や「トランスポーター病」と言える多くの先天性疾患が引き起こされることが、実際1990年代に行われた分子クローニングにより次々に明らかにされた(表2)。特に腎臓領域においては、Bartter 症候群などの水・電解質異常が水や無機イオンの

表 1 トランスポーターの分類

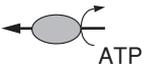
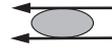
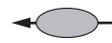
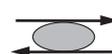
	生体必須物質	生体異物・薬物
能動輸送 	イオンポンプ Na ⁺ , K ⁺ -ATPase H ⁺ -ATPase	ABCトランスポーター P-glycoprotein MRPs
共輸送 	SGLT (Na-glucose cotransporter) EAAC1 (Na-glutamate cotransporter)	PEPT (H-peptide cotransporter)
単輸送 	GLUT (Glucose transporter)	OCT (Organic Cation transporter)
逆輸送 	NHE (Na, H exchanger) SLCトランスポーター	OAT (Organic Anion transporter)

表 2 チャネル・トランスポーター異常による疾患

1. 嚢胞性線維症：CFTR Cl⁻チャネル
2. 常染色体性劣性筋硬直症：ClC-1 Cl⁻チャネル
3. 高 K 血性周期性四肢麻痺：電位作動性 Na⁺チャネル
4. 悪性高熱症：リアノジン受容体 Ca²⁺遊離チャネル
5. QT 延長症候群：HERG チャネル, KvLQT1 (KCNQ1) チャネル
6. 先天性グルコース・ガラクトース吸収不全症：Na⁺/グルコーストランスポーター SGLT1
7. カルニチン欠乏症：有機カチオン/カルニチントランスポーター OCTN2
8. X 連鎖精神遅滞：モノカルボン酸トランスポーター MCT8
9. Dubin-Johnson 症候群：ABC トランスポーター MRP2
10. Tangier 病：ABC トランスポーター ABCA1

表 3 チャネル・トランスポーター異常による遺伝性尿細管疾患

1. 腎性尿崩症：水チャネル AQP2
2. Liddle 症候群：上皮性 Na チャネル (ENaC) β サブユニット
3. Bartter 症候群：Na⁺/K⁺/2Cl⁻トランスポーター, K⁺チャネル ROMK, Cl⁻チャネル CLCNKB, Barttin
4. Gitelman 症候群：Na⁺/Cl⁻トランスポーター
5. 偽性低アルドステロン症 I 型：ENaCα, β, γ サブユニット
6. 偽性低アルドステロン症 II 型：WNK1, WNK4
7. 近位尿細管性アシドーシス：Na⁺/HCO₃⁻トランスポーター kNBC1
8. 遠位尿細管性アシドーシス：Cl⁻/HCO₃⁻トランスポーター AE1
9. Dent 病：Cl⁻チャネル CLC5
10. 腎性低尿酸血症：尿酸トランスポーター URAT1
11. シスチン尿症：シスチントランスポーター BAT1, rBAT
12. Hartnup 病：アミノ酸トランスポーター B⁰AT1

チャネル・トランスポーターの遺伝子異常・機能異常に基づくことが多く報告されている(表 3)。これらの遺伝性疾患の大きな特徴は、多くの場合その原因遺伝子の異常が loss of function の表現型でありながら、一般的な常染色体劣性遺伝形式ではなく、常染色体優性遺伝形式を示す場合が多く認められることで、遺伝子異常産物による dominant negative 効果が強調されることも多い。

膜輸送蛋白質研究：最近の進歩

1. 膜輸送蛋白質立体構造

2000 年のヒトゲノム概要配列の解読により、膜輸送蛋白質

質のみならず、多くの蛋白質の一次配列は明らかになったと言える。しかし、例えば、膜輸送蛋白質異常をきたす遺伝子変異がどのような構造的な変化を起こすことにより疾患発症に至るかを解明することなしに、「チャネル病」や「トランスポーター病」の根本的な治療はありえない。そのためには、蛋白質の高次構造の解明が必須で、遺伝子異常により変化した高次構造を改善する薬物の開発につながる事が期待される。従来、膜蛋白の結晶化とその構造解析は困難であることが知られていたが、1998 年の MacKinnon ら

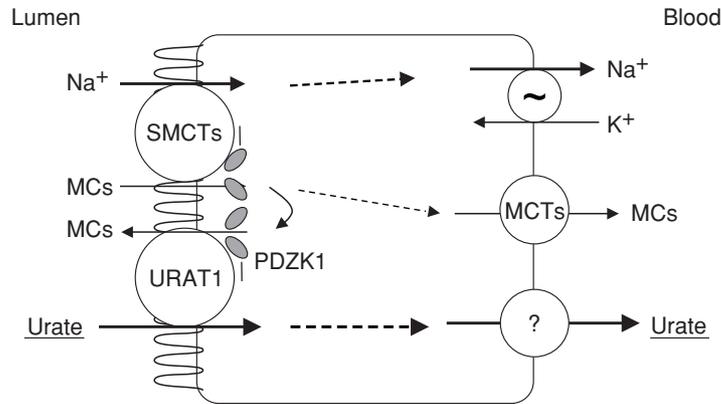


図 腎臓の尿酸トランスポートソーム

SMCTs : sodium-coupled monocarboxylate transporters, URAT1 : urate transporter 1, MCTs : monocarboxylate transporters, MCs : monocarboxylates

による原核生物型 K^+ チャネル KcsA の結晶構造解析³⁾を皮切りに、水チャネルや Cl^- チャネルなどのチャネル蛋白質の構造解析や、グルタミン酸トランスポーター、P型ポンプ、さらにABCトランスポーターなど、他の膜輸送蛋白質においても三次元構造の解明が進みつつあり、今後、さらに多くの哺乳類のトランスポーターの構造解析も進むものと期待される。

2. 機能ユニットとしての膜輸送分子複合体の把握

上記の構造解析が、基本的には「1分子の動態」としての構造機能連関の解明に大きく貢献することが期待される。しかし、実際にはトランスポーターを含むチャネルやレセプターなど膜貫通蛋白は、細胞膜内において単独で存在するわけではなく、その細胞内部分を介し、PDZドメインを含む細胞内支持蛋白質をはじめとした多種多様な細胞内蛋白との相互作用により、シグナル分子群の集積などによる膜輸送蛋白質機能が制御されていることが、神経細胞、特にそのなかで高度に発達したシナプスにおいて明らかにされている。

後シナプス肥厚部蛋白質 PSD-95、ショウジョウバエ癌遺伝子抑制遺伝子産物 Dlg、タイト結合蛋白質 ZO-1 の三者に保存された 80~90 のアミノ酸から成る配列として見出された PDZドメインを持つ蛋白質(以下、PDZ蛋白質)は、シナプスにおいて細胞膜の裏打ち構造や細胞骨格のネットワーク形成、そして細胞表層に発達した細胞内シグナル伝達のネットワーク形成などに重要な役割を担っていることが知られている⁴⁾。PDZ蛋白質は、神経以外の消化管や腎臓など上皮細胞にも発現していることが確認されており、上皮組織においてもPDZ蛋白質は膜蛋白質の局在、集積の制御やシグナル伝達系の集積、さらには細胞極性の

成立に深く関わっていることが徐々に明らかになってきた。

PDZ蛋白質を介した膜輸送分子複合体形成と尿細管輸送機能ユニットの例として、2002年にわれわれの研究室で同定された腎臓尿酸トランスポーター URAT1⁵⁾を例に説明したい。

URAT1は近位尿細管管腔側膜に局在し、その遺伝子異常により家族性腎性低尿酸血症を発症するのみならず、尿酸排泄促進薬ベンズブロマロンの薬物標的となる腎臓尿酸輸送のキーとなる膜輸送蛋白質である。URAT1は、細胞内に蓄積された乳酸などの有機アニオン(モノカルボン酸)の外向き勾配を利用して細胞内に尿酸を取り込む特性を持つ。われわれは、URAT1の細胞内C末端にPDZモチーフが存在することから、何らかの蛋白質が結合する可能性を考え、酵母 Two-hybrid法を行って、PDZ蛋白質のPDZK1と結合することを明らかにした⁶⁾。最近われわれは、さらにこのPDZK1は2004年に同定された腎臓近位尿細管管腔側膜に存在する Na^+ 依存性乳酸トランスポーター SMCT1⁷⁾ともそのC末端のPDZモチーフを介して結合することを確認した⁸⁾。このことは、URAT1-PDZK1-SMCT1という三者複合体が形成されることで、SMCT1からURAT1への駆動力となる乳酸の受け渡しが効率的に行われることを、機能的な点からだけでなく物理的にも可能としている可能性が考えられる⁹⁾(図)。また、この三者複合体が、一分子の解析だけでは解明できなかった「 Na^+ 依存性尿酸輸送」という生理現象の分子基盤となる可能性を持つ。さらには、インスリン抵抗性を基盤として発症するメタボリック症候群において、高インスリン血症により活性化される Na^+ -尿酸共輸送の分子実態として、同症候群患者に

みられる高尿酸血症の一因となることも推測される¹⁰⁾。

膜輸送蛋白質の生理機能は、その蛋白質自体のリン酸化などによる輸送機能制御機構に加えて、蛋白質合成から細胞膜への細胞内輸送、細胞膜上での局在制御機構、細胞内へのエンドサイトーシスから分解に至る機構などにより決定されるが、これらのステップのほとんどに蛋白質間相互作用が関与していると考えられる。上述の腎臓尿酸輸送機能ユニットを中心に、これらの生理機能決定因子を広く一つの膜輸送機能システム「トランスポートソーム」として捉える重要性が、大阪大学大学院医学系研究科の金井好克教授らにより提案され、現在、文部科学省特定領域研究「膜輸送複合体」として採択され、広範な研究グループによる成果の蓄積がなされつつある。

おわりに

膜輸送蛋白質の研究は、これまで主として生理的条件下での検討が中心で、その結果をもとに病態生理の機序を推定していた。しかし分子生物学の進歩に加え、最近の網羅的解析技術の発展により、適切な病態モデルの確立が望まれるが、遺伝子改変動物の作製技術の進歩は多くのモデル動物の提供を可能にしている。従来のノックアウトマウスに加え、臓器特異的なノックアウトマウスの作製や、遺伝病で発見された遺伝子変異をノックイン技術で動物に導入する方法により、より一層ヒトの病態生理に近いモデル動物の解析を行い、病態治療法開発につなげる必要があると思われる。

また「トランスポートソーム」を構成する因子の網羅的解明が今後進むことにより、膜輸送蛋白質の器官における生理的役割や病態時の働きを定量的に理解し、それを基盤とした治療法の開発が期待される。そのために、器官全体を対象とした *in vivo* の実験検討に加え、すべての過程を再構成する方向を目指す、*in silico* でのコンピュータモデルによる生体機能のシミュレーションとモデル化研究の必要性が高まるものと考えられる。

文 献

1. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992 ; 256 : 385.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; 245 : 1066-1073.
3. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel : molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 1998 ; 280 : 69-77.
4. Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supra-molecular complexes. *Ann Rev Neurosci* 2001 ; 24 : 1-29.
5. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002 ; 417 : 447-452.
6. Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H. The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem* 2004 ; 279(44) : 45942-45950.
7. Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V. Expression of slc5a8 in kidney and its role in $Na(+)$ -coupled transport of lactate. *J Biol Chem* 2004 ; 279(43) : 44522-44532.
8. Anzai N, Miyazaki H, He X, Kanai Y, Miyauchi S, Ganapathy V. Identification of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 (SMCT1). *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : A753 (abstract).
9. Anzai N, Kanai Y, Endou H. New insights into renal transport of urate. *Curr Opin Rheumatol* 2007 ; 19(2) : 151-157.
10. Anzai N, Endou H. Drug discovery for hyperuricemia. *Expert Opin Drug Discov* 2007 ; 2(9) : 1251-1261.