

## 総 説

### アミノ酸尿症の分子遺伝学

宮本 賢一, 瀬川 博子

徳島大学医学部栄養化学講座

(平成12年1月20日受付)

#### はじめに

細胞膜には個々のアミノ酸を輸送するトランスポーターが存在し、アミノ酸が細胞膜を横断することを助けている。アミノ酸トランスポーターは、細胞への栄養供給のほか、小腸や腎尿細管でのアミノ酸の上皮輸送、中枢神経での神経伝達物質の取り込み、さらに細胞内酸化還元的環境の調節維持において重要な役割を果たしている。その異常により、シスチン尿症やリジン尿性蛋白不耐症をはじめとするアミノ酸尿症、興奮性アミノ酸による神経細胞死、酸化ストレスによる細胞死や免疫不全などが生じる。とくにアミノ酸尿症の原因遺伝子解明は、アミノ酸トランスポーターの同定につながるため、長年待ち望まれていた。本稿では、アミノ酸尿症の原因遺伝子解明までの道のりを紹介する。

#### シスチン尿症とリジン尿性蛋白不耐症

シスチン尿症は、腎尿細管および小腸上皮細胞における中性、二塩基性アミノ酸輸送の先天的欠損である(図1)。症例によりかなりの遺伝的異質性がみられ、シスチンおよび二塩基性アミノ酸輸送系の障害の程度により3型に分類される<sup>1)</sup>。タイプ1では小腸からのシスチン、リジンおよびアルギニンの吸収が完全に障害され、これらのアミノ酸経口負荷により血中での濃度上昇が見られない。タイプ2では、小腸上皮でのシスチン吸収能はわずかに確認されるが、リジンやアルギニンの吸収能は見られない。また、アミノ酸経口負荷では同様に血中濃度の上昇が見られない。タイプ3は、小腸におけるアミノ酸吸収能はわずかに低下しているものの、経口負荷によりアミノ酸の血中濃度が正常に上昇する。また、これらの遺伝形式は複雑であり、不完全劣性遺伝形式をとることが報告されている。日本やアメリカでは2万人に一人、

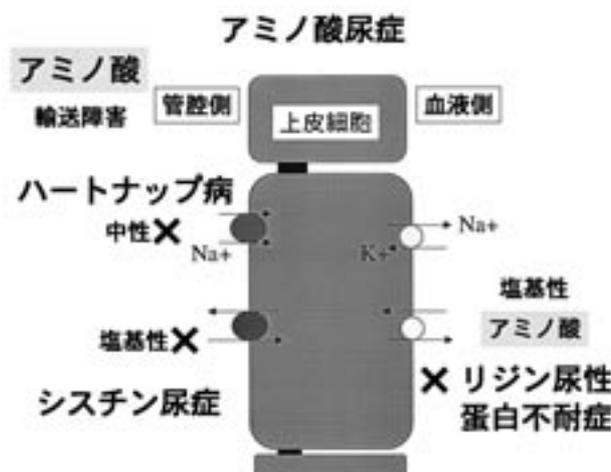


図1 上皮細胞におけるアミノ酸輸送系の異常と疾患  
アミノ酸尿症の原因となる輸送系と病名を示した。シスチン尿症とハートナップ病は、上皮細胞刷子縁膜における塩基性および中性アミノ酸輸送の障害によりアミノ酸尿症を生じる。一方、リジン尿性蛋白不耐症は、基底膜における塩基性アミノ酸の輸送障害による。

ヨーロッパでは7千人(イギリス2千人に一人)に一人の割合で発症する。このようなシスチン尿症の複雑な病態は、シスチン輸送系が複数の輸送システムによって行われているか、あるいは一つの輸送系が複数の蛋白で構成されている可能性が考えられていた。

リジン尿性蛋白不耐症(LPI)も、腎尿細管や小腸上皮細胞において塩基性アミノ酸輸送障害により多彩な症状を示す疾患である。とくに、高アンモニア血症は本疾患の予後を悪化させる。シスチン尿症が、上皮細胞の刷子縁側のアミノ酸輸送系異常であるのに比べてリジン尿性蛋白不耐症では上皮細胞や肝細胞の基底膜に存在するアミノ酸輸送系  $y^+L$  の異常であろうと推察されていた。

## シスチン尿症原因遺伝子の謎

ヒト腎尿細管でのシスチン輸送には2種類の輸送システム(高親和性システム( $K_m=0.012\text{mM}$ )および低親和性システム( $K_m=0.55\text{mM}$ )が存在し、シスチン尿症患者ではすべて高親和性システムが障害されていた。1992年から1993年にかけて、腎尿細管上皮細胞 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させる方法を用い、シスチントランスポーター cDNA が3カ所の研究室よりクローニングされた<sup>1)</sup>。それぞれ NAA-Tr/rBAT/D2 (以下 rBAT) と命名された遺伝子は、共通の蛋白質をコードし、推定膜貫通領域が1回、またC端側に他の蛋白と2量体を形成にするロイシンジッパーモチーフを有していた。これらの遺伝子は、卵母細胞で発現させると、ナトリウム非存在下でシスチンおよび中性/二塩基性アミノ酸の輸送を促進する  $b^0,+$  システムに関与する遺伝子であった。しかしながら、膜貫通領域が1回という輸送担体はこれまで報告がなく、どのようにしてシスチン輸送を促進するか多くの問題が残されていた。

Calonge や我々のグループは<sup>2,3)</sup>、スペイン人および日本人シスチン尿症患者の遺伝子解析を行い、rBAT のc端域に数カ所の変異を見出した。これらの変異のうち467番目のメチオニンがスレオニンへの変異は解析したシスチン尿症の40%に共通に見られる変異であった<sup>2)</sup>。一方、ポジショナルクローニングを進めていたグループは、シスチン尿症患者17家系の連鎖解析を行い、責任遺伝子が2番染色体の cen-D2 S391 D2 S119 cystinuria D2 S177 tel に存在することを明らかにしていた。そこで、rBAT の染色体座位が決定された結果、確かに 2p16 の D2 S119 と D2 S117 に存在していた。以上の事実より、rBAT 遺伝子異常は間違いなくシスチン尿症の原因であると考えられた。

## II型膜糖蛋白とは

rBAT 遺伝子がクローニングされた際、その構造より推定される蛋白質はトランスポーターとは考えにくかった<sup>4,5)</sup>。そこで類似の蛋白質を検索した結果、rBAT はII型膜糖蛋白質に属し、アミラーゼやマルターゼの構造と同様にN末端を細胞内に有し、C末端を細胞外に有する糖蛋白質であった。特に、4F2hc (CD98) と呼ばれる蛋白質の一部高いホモロジーを有していた。4F2hc は、human T-cell tumor line (HSB 2) の膜

に存在し、細胞増殖に関わる分子と考えられていた。4F2hc 遺伝子をもとに cRNA を合成し、卵母細胞で発現させると、ナトリウム非依存性の塩基性アミノ酸輸送システム ( $y^+$ -like system) の促進が観測された。促進される輸送システムは rBAT が関与する  $b^0,+$  とは異なり、卵母細胞に存在する内因性の輸送システムである。これらの結果より、rBAT および 4F2hc などのII型膜糖蛋白質は、アミノ酸トランスポーターを活性化する因子であろうと考えられた<sup>4)</sup>。

## II型膜糖蛋白を必要とするアミノ酸輸送担体の発見

rBAT の変異は、シスチン尿症患者の一部にしか見られない事実は、上述した仮説をさらに支持していた<sup>3)</sup>。つまり、多くの異常はアミノ酸トランスポーター本体にあると考えた。そこで、II型膜糖蛋白質により活性化されるアミノ酸トランスポーターの同定に着手した<sup>6)</sup>。

我々は、アミノ酸尿症の原因解明を複雑にしている要因として、これらのトランスポーターは複数のサブユニットを必要とし、それが単一因子のみを追跡する従来の方法でのクローニングを困難にしていると考えた。II型膜糖蛋白 4F2hc (CD98) の cRNA とラット C6 グリオーマ細胞 poly(A)<sup>+</sup>RNA の共発現による発現クローニングを試みた。それらの結果、4F2hc により活性化されるトランスポーター (LAT1 と命名) の cDNA を単離した<sup>6,7)</sup>。LAT1 の活性発現には 4F2hc が共存することが必須であり、LAT1 と 4F2hc の共発現によって出現する機能は、クローニングの待たれていた古典的中性アミノ酸輸送系 L の機能そのものであることを明らかにした<sup>6)</sup>。これにより、輸送系 L は、二つのサブユニットからなるヘテロダイマー構造を持つことが示唆された。本クローニングの成功により、従来の単一因子を追跡するクローニング法でアミノ酸トランスポーターがクローニングされ得なかった理由が明らかになった。

## 原因遺伝子の解明

このような研究を足がかりに、II型膜糖蛋白を必要とする一群のアミノ酸輸送系が同定された。 $y^+$ LAT1,  $y^+$ LAT2 は、塩基性アミノ酸輸送系  $y^+$ L を担当し、補助因子として 4F2hc を必要とする<sup>8)</sup>。スペインのグループは、いち早く  $y^+$ LAT1 の遺伝子解析を行いリジ



図2 アミノ酸尿症の原因遺伝子

II型膜糖蛋白 rBAT は、シスチントランスポーター-BAT1の機能発現に必須の補助因子である。I型シスチン尿症では rBAT 遺伝子が、II型シスチン尿症では、BAT1 遺伝子異常がある。一方、4F2hc は、y+LAT1 の補助因子として機能する。リジン尿性蛋白不耐症では、y+LAT1 遺伝子に異常が見られる。

ン尿性蛋白不耐症患者における異常を見いだした<sup>9)</sup>(図2)。同定された部位は第4細胞外ループと第8膜貫通領域で、この遺伝子異常により機能は完全に消失した。一方、我々は長年待ち望まれていた rBAT の相手方蛋白 BAT1 を同定した<sup>10)</sup>(図2)。同定したクローンは、やはり同じファミリーに属していた。BAT1 は補助因子として4F2hc ではなく rBAT を必要とし、IIおよびIII型シスチン尿症の原因遺伝子であることが解明された<sup>11)</sup>。

II型膜糖蛋白を補助因子とするアミノ酸トランスポーターファミリー

アミノ酸尿症の原因遺伝子解明の福音は、さまざまなアミノ酸輸送系が同時に明らかにされたことである(図3)。LAT2 は中性アミノ酸トランスポーターをコードし、主に小腸や腎における上皮細胞におけるアミノ酸輸送を担当する<sup>12)</sup>。やはり、機能発現には4F2hc を必要とした。asc1 は、アラニン、セリン、シスチンを輸送するトランスポーターでシステム asc をコードしていた<sup>13)</sup>。また、xCT はシスチン・グルタミン酸の交換輸送担体として同定され、やはり機能発現に4F2hc が必要であることが解明された<sup>14)</sup>(図4)。

このようにアミノ酸尿症の原因遺伝子解明により、研究の遅れていたアミノ酸トランスポーターの分野がここ

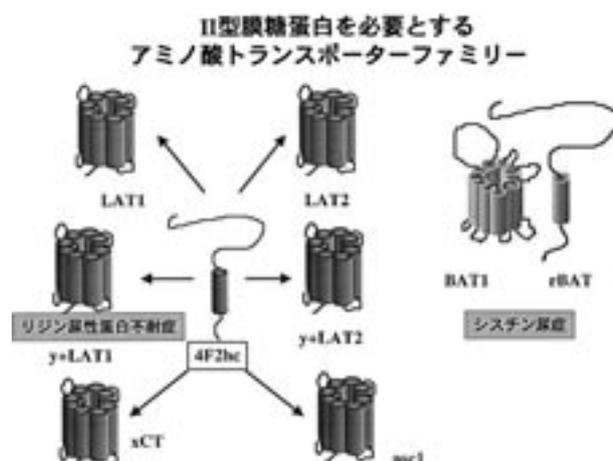


図3 機能発現にII型膜糖蛋白を必要とするアミノ酸トランスポーターファミリー

LAT1のクローニングをきっかけに、ヘテロダイマー構造を持つ一群のアミノ酸トランスポーターが同定された。LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2, xCT, asc1 は、いずれも機能発現にII型膜糖蛋白4F2hc を必要とする。また、BAT1 は、その機能発現に補助因子として rBAT を必要とする。これらのファミリーは、上皮細胞、ガン細胞、神経細胞、免疫細胞などで多くの必須アミノ酸輸送を担っている。

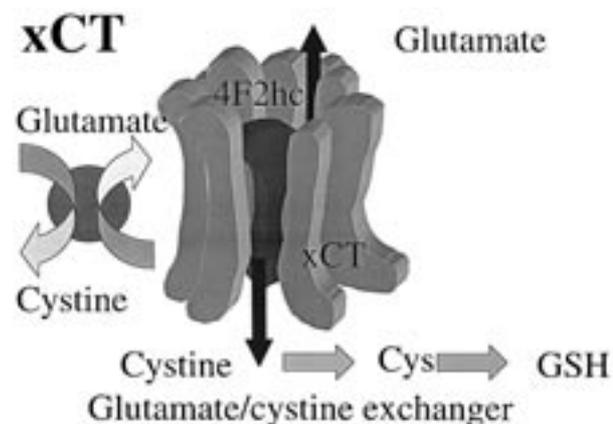


図4 シスチン・グルタミン酸アンチporter xCT のアミノ酸交換機能

II型膜糖蛋白を必要とするファミリーとしてシスチン・グルタミン酸アンチporter xCT が同定された。細胞内の重要なラジカルスカベンジャーであるグルタチオンは、グリシン、グルタミン酸、システインを前駆物質として合成されるが、システインの細胞への供給が合成の律速段階となっている。このようなシステインの輸送は、多くの細胞でシスチン・グルタミン酸アンチporterを介して行われる<sup>15)</sup>。

1年で急速な展開を見た。その結果、II型膜糖蛋白という補助因子を必要とする一群のアミノ酸トランスポーターが新しく登場した<sup>15)</sup>。これらは、長年謎とされてきた様々なアミノ酸輸送系の本体であった。とくに、これらのファミリーにはグルタチオン合成の材料となる含硫アミノ酸を供給することにより酸化的ストレスに対する

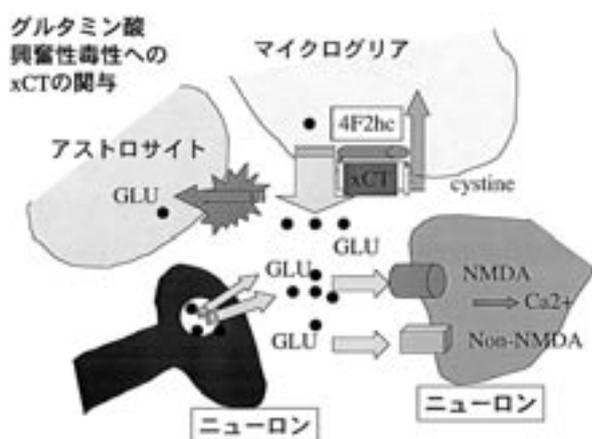


図5 xCTの神経細胞障害因子としての役割

xCTはそれを有する細胞にとってはシスチンの取り込みを行う点において酸化ストレスに対する細胞保護因子であるが、同時に細胞外へグルタミン酸を放出するため、神経組織において局所で過剰に機能すると細胞外グルタミン酸濃度の上昇を招き、神経細胞を惹起する。実際に脳梗塞の病巣周囲でこの状態が生じていると考えられる。xCTはマクロファージや神経組織のマイクログリアにその活性が高く、それらが集まる脳梗塞周辺部では、xCTを介して細胞外にグルタミン酸が放出される。これが、細胞外グルタミン酸濃度を維持するグルタミン酸トランスポーターの処理能力を超えると、グルタミン酸興奮毒性を発現し、脳梗塞周辺部での神経細胞障害を増悪させる<sup>16)</sup>。

細胞保護因子として位置付けられるシスチン・グルタミン酸交換輸送担体 xCT も含まれていた。このような分子の発見は、今後興奮性アミノ酸による神経細胞死、酸化ストレスによる細胞死や免疫不全などの病因解明に大きく貢献すると考えられた(図5)。

## おわりに

栄養学を研究する上で、食物の消化と吸収は生体代謝のスタートに位置している。消化吸收の研究と言うと、一見世俗的で非科学的に聞こえるが、この問題を分子レベルで研究すると、大変おもしろい世界が見えてくる。とくにアミノ酸吸収の研究は、歴史が古く、多くの知識が蓄積されている。培養細胞や膜標本から得られた結果は、個々のアミノ酸に対して独自の輸送系があるのではなく、類似した側鎖をもつ複数のアミノ酸を輸送する数種の輸送系によって、アミノ酸輸送が行われていることを証明した。塩基性アミノ酸はナトリウム非依存性輸送系  $y^+L$ ,  $y^+$ ,  $b^0,+$  により、酸性アミノ酸は  $Na^+$  依存性輸送系  $X^-AG$  により輸送される。多くのアミノ酸が属する中性アミノ酸輸送は  $Na^+$  非依存性輸送系  $L$  や  $Na^+$  依存性輸送系  $A$ ,  $ASC$  により行われる。アミノ酸尿症

の原因遺伝子解明は、これらアミノ酸輸送系の謎解きにつながった。小腸や腎などの上皮組織におけるアミノ酸トランスポーターの解明は、神経組織での神経伝達物質の再取り込み、細胞間相互作用における細胞機能の酸化還元的制御機構の手助けになると考えられる。さらに、血液脳関門を構成するアミノ酸輸送系も次第に明らかになった。現在、脳内への薬物輸送という観点で、アミノ酸輸送機構もさまざま勢いで、研究が進みはじめている。世俗的で非科学的な問題にこそ、次の新しいテーマが眠っているかもしれない。

## 謝 辞

これらの研究は、杏林大学医学部薬理学金井好克助教授、遠藤仁教授との共同で展開された。また、徳島大学医学部病態栄養の新居智子、岸田祐枝、谷圭子、竹谷豊助手、武田英二教授には共同実験者として多くの御支援をいただいた。シスチン尿症の研究は徳島大学医学部泌尿器科またリジン不耐症の研究は岐阜大学医学部小児科との共同研究である。本プロジェクトの共同研究者の方々に、心より感謝いたします。またアミノ酸輸送の研究のおもしろさを最初に教えていただいた、徳島大学医学部病態栄養学講座の故萩平博教授のご冥福をお祈りいたします。

## 参考文献

- 1) 宮本賢一：シスチン尿症, *Molecular Medicine* 32 : 242-243, 1995
- 2) Calonge, M.J., Gasparini, P., Chillon, M., Gallucci, M., et al.: Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat. Genet.*, 6 : 420-425, 1994
- 3) Miyamoto, K., Katai, K., Tatsumi, S., Sone, K., et al.: Mutation of the basic acid transporter gene associated with cystinuria. *Biochem. J.*, 310 : 951-955, 1995
- 4) Miyamoto, K., Segawa, H., Tatsumi, S., Katai, K., et al.: Effects of truncation of the COOH-terminal region of a  $Na^+$ -independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.*, 271 : 16758-16763, 1996
- 5) Segawa, H., Miyamoto, K., Ogura, Y., Haga, H., et al.: Cloning, functional expression and dietary regulation

- of the mouse neutral and basic amino acid transporter (NBAT). *Biochem. J.* 328 : 657-664, 1997
- 6) Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., et al. : Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.*, 273 : 23629-23632, 1999
- 7) Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P. J., et al. : Amino acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395 : 288-291, 1998
- 8) Pfeiffer, R., Rossier, G., Spindler, B., Meier, C., et al. : Amino acid transport of  $\gamma$ -L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. *EMBO J.*, 18 : 49-57, 1999
- 9) Borsani, G., Bassi, M. T., Sperandio, M. P., DeGrandi, A., et al. : SLC7A7, encoding a putative permease-related protein, is mutated in patients with lysinuric protein intolerance. *Nat. Genet.*, 21 : 297-301, 1999
- 10) Chairoungdua, A., Segawa, H., Kim, J.-Y., Miyamoto, K., et al. : Identification of an amino acid transporter associated with the cystinuria-related type II membrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 274 : 28845-28848, 1999
- 11) Feliubadalo, L., Font, M., Purroy, J., Rousand, F. et al. : Cystinuria consortium. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, coding of a subunit (b<sup>0</sup>,+AT) of rBAT. *Nat. Genet.*, 23 : 52-57, 1999
- 12) Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., et al. : Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, 274 : 19745-19751, 1999
- 13) Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S. : Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.*, 274 : 11455-11458, 1999
- 14) Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., et al. : Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter which associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J. Biol. Chem.* (in press)
- 15) Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. : Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.*, 78 : 969-1054, 1998
- 16) 金井好克 : アミノ酸トランスポーターとその異常による疾患 . チャンネルとトランスポーター , (岡田泰伸, 清野進 編), メジカルビュー社, 東京, 1997, p.p.159-184

## *Molecular biology of aminoacidurias*

*Ken-ichi Miyamoto, and Hiroko Segawa*

*Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

The homologous proteins rBAT and 4F2hc have been identified as the heavy chains of family of heteromeric amino acid transporters in mammals. Six light subunits of 4F2hc (LAT 1, LAT 2, y<sup>+</sup>LAT 1, y<sup>+</sup>LAT 2, asc 1, and xCT) and one of rBAT (BAT 1) are known. These glycoprotein-associated amino acid transporters, which follow the 12 transmembrane topology model, form heterodimers with the corresponding subunit and then are expressed in the plasma membrane. 4F2hc and y<sup>+</sup>LAT 1 express system y<sup>+</sup>L transport activity. On the other hand, rBAT and BAT 1 express system b<sup>0+</sup> activity. BAT 1 and y<sup>+</sup>LAT 1 have a tissue distribution and a chromosomal location that made them good candidate genes for cystinuria and lysinuric protein intolerance (LPI). Mutational analysis revealed cystinuria-associated mutations for BAT1 and LPI-associated mutations for y<sup>+</sup>LAT1. Transport defects have been shown for some of the BAT1 and y<sup>+</sup>LAT1 mutations. In addition, we focus on the animal members of the LAT cluster that form the family of glycoprotein-associated amino acid transporters.

Key words : amino acid, transporter, cystinuria, LPI