ウリカーゼ融合タンパク質を用いた 尿酸トランスポーター機能評価法の開発

中村真希子¹⁾ 細山田 真²⁾ 市田 公美¹⁾

背 景

近年同定された腎臓に存在する尿酸トランスポーターは、尿酸の分泌・再吸収に関係することから、血漿尿酸値を規定する存在として注目されている。既存のトランスポーター評価法には^[14C]標識尿酸を用いた方法があるが、細胞を破碎した試料を使用するため、経時的な尿酸輸送評価などは不可能である。そこで本研究では、生細胞における簡便な尿酸トランスポーター機能解析法の開発を目的として、ウリカーゼ・HyPer融合タンパク質を構築した。ここでは、特異的な尿酸酸化酵素ウリカーゼを応用することとした。尿酸がウリカーゼにより酸化される際の副生成物である過酸化水素に着目した。過酸化水素と反応し蛍光を変化させるタンパク質HyPerとウリカーゼを融合させることにより、ウリカーゼによる尿酸の酸化時にHyPerが発する蛍光によって尿酸を検出することが可能なツールを構築した。この融合タンパク質を発現させた細胞に尿酸を添加し、その蛍光を経時的に測定することにより、尿酸トランスポーターの機能評価が可能となる。

方 法

サル腎上皮由来COS7細胞を用い、尿酸トランスポーターurate transporter 1 (URAT1) の恒常発現株を作製した。加えてウリカーゼ・

HyPer融合タンパク質をトランスフェクションし一過性発現させた。融合タンパク質の発現は蛍光顕微鏡観察により確認した。その細胞に尿酸またはコントロール物質アデニンを添加し、添加後30分間蛍光測定を行った。さらにURAT1阻害薬であるベンズプロマロンを尿酸と共に系に添加した際も同様に評価を行った。

結果・考察

URAT1 を恒常的に発現するCOS7 細胞に、ウリカーゼ・HyPer融合タンパク質を強制発現できた。その細胞に尿酸を添加したところ、0.5-10 nmol尿酸添加に伴い蛍光強度比が上昇し、同量のアデニン添加のサンプルと比較すると、有意に高いことが示された。さらに尿酸と共にトランスポーター阻害薬ベンズプロマロンを0.1-10 μ Mとなるよう添加すると、その蛍光強度比は有意に低下した。これらのことから、ウリカーゼ・HyPer融合タンパク質によって尿酸トランスポーターを介した尿酸取り込みの蛍光検出が可能であることが示され、生細胞に応用可能なトランスポーター機能評価法であることが示唆された。本手法は簡便に多検体処理が可能であることから、トランスポーター阻害薬の新規スクリーニングなどに有用であると考えられる。

1) 東京薬科大学 薬学部 病態生理学教室

2) 帝京大学 薬学部 人体機能形態学

Makiko Nakamura, Kimiyoshi Ichida

Mkoto Hosoyamada