

|             |                                                                                                                                                                                   |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | こ ばやし けん いち<br>小 林 謙 一                                                                                                                                                            |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                                                                                         |
| 学 位 記 番 号   | 農 博 第 1474 号                                                                                                                                                                      |
| 学位授与の日付     | 平 成 17 年 3 月 23 日                                                                                                                                                                 |
| 学位授与の要件     | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                           |
| 研究科・専攻      | 農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻                                                                                                                                                         |
| 学 位 論 文 題 目 | Studies on Physiological Function of Tamm-Horsfall Protein (THP),<br>a GPI-anchored Protein in the Kidney<br>(腎臓における GPI アンカー型タンパク質 Tamm-Horsfall Protein (THP)<br>の生理学的機能に関する研究) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 吉 川 正 明      教 授 北 畠 直 文      教 授 河 田 照 雄                                                                                                                            |

### 論 文 内 容 の 要 旨

Tamm-Horsfall Protein (THP) は、正常尿中に最も多く存在する分子サイズ 100kDa の糖タンパク質である。THP は、腎臓ではイオン再吸収細胞である thick ascending loop of Henle (TALH) 細胞で産生され、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを介して小胞体膜に結合しており、細胞表面に輸送された後に、膜から切り離され、尿中に遊離型 THP (uTHP) として排出される。THP は、腎臓外分泌細胞の分泌顆粒膜に存在する GPI アンカー型タンパク質 GP2 と 86% のホモロジーを有する。GP2 が腎臓のエクソサイトーシスに関与することから、THP も生体膜の動態に関連した何らかの機能が予想されたが、その生理学的意義については、全く不明であった。本論文は、腎臓における THP の生理学的機能を解明することを試みたものである。

第 1 章では、マウス THP ゲノム構造の解析を行った。その結果、マウス THP 遺伝子は、7 番染色体 (7F1 領域) に存在しており、11 エキソンから構成され、そのすぐ下流に同じく 11 エキソンからなるマウス GP2 遺伝子が、わずか 2.5kb の間隔で隣接して存在することを見出した。すなわち、THP 遺伝子と GP2 遺伝子は、元々 1 つの遺伝子が遺伝子重複によって進化してきたことが示唆された。従って、THP と GP2 は、構造上のみならず機能上の類似性があると考察した。次に、マウス THP 遺伝子の 5' 非翻訳領域と、TALH 細胞特異的なナトリウムイオントランスポーターであるマウス NKCC2 のプロモーター領域を比較した結果、極めて高い相同性があることが判明した。そこで、マウス TALH 細胞において、THP と NKCC2 が機能上密接に関連していると考察した。

第 2 章では、細胞膜から尿中への THP の遊離機構の解析を行う目的で、ヒト uTHP の C 末端構造を検討した。その結果、ヒト uTHP は、GPI アンカー結合部位の 66 アミノ酸上流である 548 番目のフェニルアラニンと 549 番目のセリンの間で切断を受けて生成されることが判明した。本結果より、細胞膜からのヒト THP の遊離には、キモトリプシン様のプロテアーゼが関与することが示唆された。この切断部位は、GP2 でも高度に保存され、THP 及び GP2 は、共通の遊離機構を有することが示唆された。

第 3 章では、THP がイオントランスポーターの輸送及び再回収と関与していることを *in vivo* で明らかにする目的で、ELISA 法による uTHP の微量定量法を確立するとともに、ラットを用い uTHP 量及び尿中ナトリウムイオン変化の検討を行った。その結果、絶水により尿の pH が 7 以下になると THP 遊離活性が低下し、ナトリウムイオントランスポーターの再回収が抑制され、尿中ナトリウムイオン濃度が低下するという連関を見出した。

第 4 章では、THP 遺伝子の変異と家族性若年性高尿酸血症性腎症 (familial juvenile hyperuricemic nephropathy: FJHN) との関連を明らかにする目的で、FJHN 患者尿を用い、THP、尿酸、及びナトリウムイオン濃度を定量した。その結果、THP 量の顕著な低下と、尿中の尿酸濃度及びナトリウムイオン濃度の低下が観察された。よって THP は、ナトリウムイオンだけでなく尿酸の再回収にも関与していることが示唆された。本疾患は、ヒト THP 遺伝子的一方に変異が生じることで発症することから、変異型ヒト THP が、もう一方の正常型ヒト THP の遊離まで阻害してしまうドミナントネ

ガティブ型異常であると考察した。

以上の結果より、THPの生理学的機能は、GPI アンカー型の膜裏打ちタンパク質として、ナトリウムイオントランスポーターを輸送小胞に組み込み、細胞膜へ輸送するエキソサイトーシスに関与するとともに、中性 pH 依存的な膜遊離機構を介して、エンドサイトーシスによる細胞膜からの再回収を調節することで、ナトリウムイオン再吸収を制御していると結論づけた。また、ヒトの TALH 細胞の細胞膜表面には、尿酸輸送に関わる未知のトランスポーターの存在が示唆され、FJHN では、細胞膜からのヒト THP の遊離機構が阻害される結果、尿酸の再吸収が継続的に昂進し、高尿酸血症を引き起こすという病態モデルを提出した。

## 論文審査の結果の要旨

Tamm-Horsfall Protein (THP) は、正常尿中に最も多く存在する糖タンパク質であり、腎臓のイオン再吸収細胞である thick ascending loop of Henle (TALH) 細胞に局在している。THP は、膵臓外分泌細胞の分泌顆粒膜に存在し、エキソサイトーシスに関与する GP2 と高い構造上の相同性を有することから、THP も生体膜の動態に関連した機能が予想されたが、その生理学的意義については従来、全く不明であった。本論文は、腎臓における THP の生理学的機能を解明する目的で、THP のゲノム構造及び尿中への遊離機構を解明し、THP 分泌量が尿の pH、ナトリウムイオン濃度と連関していることを見出し、THP が腎臓においてナトリウムイオントランスポーターの輸送及び再回収に関与していることを明らかにしたものである。

評価できる主要な点は、以下の通りである。

- (1) マウス THP ゲノム構造を解析した結果、THP 遺伝子と GP2 遺伝子が、わずか 2.5kb の間隔で隣接して存在すること、またマウス THP 遺伝子の 5' 非翻訳領域と TALH 細胞特異的なナトリウムイオントランスポーターであるマウス NKCC2 遺伝子のプロモーター領域を比較した結果、極めて高い相同性があることを明らかにした。
- (2) ヒト THP の尿中への排出は、GPI アンカー部位の切断によるものではなく、548番目のフェニルアラニンと549番目のセリンとの間で生じる特異的なプロテオリシスによるものであることを解明した。
- (3) ラットでは絶水により、尿の pH が7以下になると、細胞膜からの THP の遊離が減少し、同時に尿中ナトリウムイオン濃度が低下するという連関を明らかにした。これは、THP の遊離が低下することによってエンドサイトーシスが抑制された結果、ナトリウムイオントランスポーターの細胞膜からの再回収が抑制されるためと考察した。
- (4) ヒト THP ゲノム変異が原因である家族性若年性高尿酸血症性腎症 (familial juvenile hyperuricemic nephropathy: FJHN) 患者では THP は尿へ排出されないことを見出した。また、尿中の尿酸濃度及びナトリウムイオン濃度の低下がみられた。ヒトの TALH 細胞の細胞膜表面には、尿酸輸送に関わる未知のトランスポーターが存在し、この疾患では細胞膜からの THP の遊離が阻害されることによって、このトランスポーターの再回収が阻害される結果、尿酸の再吸収が継続的に昂進し、高尿酸血症を引き起こすという病態モデルを提出した。

以上のように、本論文は腎臓でのイオン再吸収における THP の機能を解明したものであり、生理学、細胞生物学および分子生物学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。