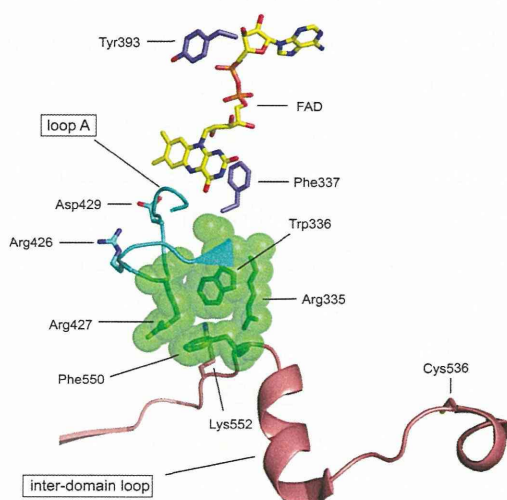


**Figure 3.** Structure of the active site cavity of FAD in human XOR. FAD is shown as a yellow colored stick model. The amino acid residues experimentally studied with various systems are listed in Table 2. The unique amino acid cluster consisting of the side chains of Arg427, Arg335, Trp336 and Phe550, is shown as a space-filling model in green (PDB: 2E1Q).

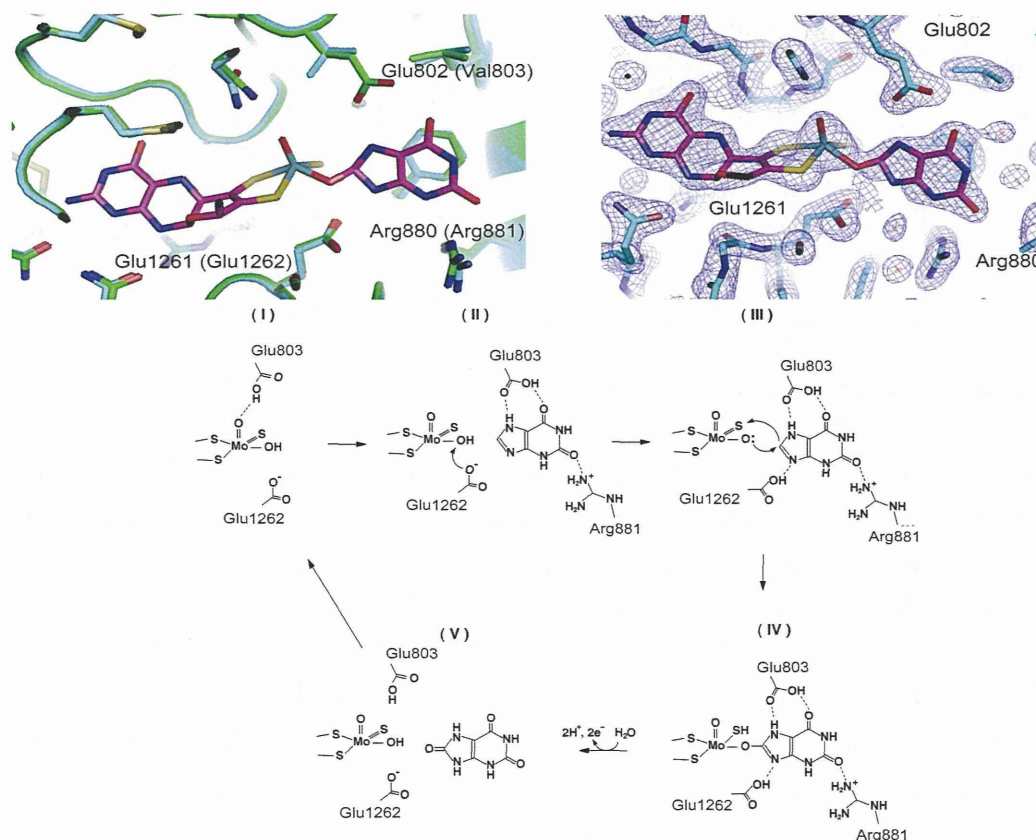


#### 4.3. The C-Terminal Moco Domain

The large third domain (residues 591 to 1317, colored light blue in Figure 2) sequesters Moco close to the interface of the Fe/S- and FAD-binding domains. However, recombinantly expressed proteins, including human and rat enzymes, lack Moco, likely due to overloading of the Moco synthesis and insertion enzymes in the expression system [69,70]. High-resolution crystal structure analysis of a mutant of rat XDH (1.7 Å) indicated that the conformation of the polypeptide chain surrounding Moco is very similar to that found in the native bovine milk enzyme [86]. Although the amino acid residues in the active site do not differ greatly in their positions and orientations, crystallographic information regarding the interactions of amino acid residues with substrates and inhibitors is based only on data for native fully active bovine XOR, and the mechanism of hydroxylation has been well understood only in the last decade. The amino acid residues directly involved in substrate binding and catalysis are Glu803, Arg881 and Glu1262 (human sequence) [69] (Figure 4). In the oxidized form of XORs, the Mo ion is in the +VI oxidation state, surrounded by an oxo- (=O) at the apical position, and one hydroxo (-OH) and one sulfido (=S) ligand in the equatorial plane [16], in addition to the two vicinal sulfur ligands contributed by the pterin group (Figure 4). It is now generally accepted that XOR transfers the -OH to the substrate [6,76] (Figure 4). Proton transfer occurs upon substrate binding from Mo-OH to Glu1262, and the protonated Glu1262 forms a hydrogen bond with substrate nitrogen atom, facilitating nucleophilic attack on the adjoining carbon by the oxygen atom, which has become a base (Mo-O<sup>-</sup>) [6,76]. When the residue corresponding to Glu1262 was mutated, the enzyme was completely inactivated [69,87]. Regarding the activating role of the charged residues of the active center, it was found that purine hydroxylation activity is significantly decreased by mutation of two residues, Glu803 and Arg881, in the active site cavity of human XOR into the corresponding residues in the amino acid sequence of AO, Val803 and Met881, respectively [69]. However, the mutants exhibited significant

AO activity. Proposed binding modes of substrates hypoxanthine and xanthine (Figure 4) have been proposed based on kinetic analysis of mutants, as illustrated in Figure 4. Those binding modes suggest that the activation mechanism facilitates nucleophilic reaction through hydrogen bond formation between the substrate and amino acid residues (Figure 4 bottom). The interaction of the 2-position keto group (C=O) and Arg881 is crucial for the efficacy of hydroxylation of the 8-position. These mechanisms are consistent with the metabolic sequence that hydroxylation of the 2-position of hypoxanthine precedes that at the 8-position [88–90]. X-Ray crystallography of the urate-bound reduced bovine XDH having full activity is consistent with this binding mode [86], as are the results of QM/MM studies with bovine XOR [91]. It was reported that two lysine residues were modified with fluorodinitrobenzene (FDNB) at pH 8.5, resulting in a decrease of activity due to slower release of the product, urate [75]. These residues were identified as Lys754 and Lys771 with rat XOR [74], both of which are located near the surface of the Moco domain, which may explain their accessibility to this chemical reagent. One of the nitro groups of DNB incorporated into a lysine residue of the enzyme was reported to be converted to an amino group due to reduction by substrate xanthine; this residue is most likely Lys771, which is rather close to the active site of the molybdenum center. Possible mechanisms will be discussed below.

**Figure 4.** Binding modes of the substrate xanthine and mechanism of its hydroxylation. Upper left, superposition of the two crystal structures around Moco of human E803V mutant XDH (cyan) and reduced native bovine XDH in the urate-bound form (green) [86]. Upper right, electron-density map of reduced native bovine XDH with bound urate [86] (PDB: 3AMZ). Lower, proposed hydroxylation mechanism based on the crystal structure of the urate-bound form and the results of mutation studies [69].





## 5. Mutations Causing Type I Xanthinuria

Although inherited XOR deficiency was first reported in 1954 [33], detailed analysis of mutation sites of XOR was first reported in 1997 [37], and subsequently there have been several reports on XOR protein mutations associated with xanthinuria, as summarized in Table 3, including recent work on SNPs not necessarily associated with xanthinuria. The incidence of XOR deficiency, including type II, has been reported to be 1/69,000, but SNP analysis suggested a higher frequency of mutation in XOR, possibly because most mutations not cause dysfunction, being asymptomatic or merely producing a lower level of uric acid in blood.

**Table 3.** Mutants causing type I xanthinuria.

Codon change	Amino acid change	Codon number	Phenotype	Reference
c. 140_141insG (c. 140dupG)	p.Cys48LeufsX12	47	Xanthinuria, type 1	[92]
c. 445C > T	p.Arg149Cys	149	Xanthinuria, type 1	[93]
c. 641delC	p.Pro214GlnfsX4	214	Xanthinuria, type 1	[94,95]
c. 682C > T	p.Arg228X	228	Xanthinuria, type 1	[37]
c. 1664_1665insC (c.1664dupC)	p.Ala556SerfsX15	555	Xanthinuria, type 1	[96]
c. 1663C > T	p.Pro555Ser	555	Decreased activity	[97]
c. 1820G > A	p.Arg607Gln	607	Decreased activity	[97]
c. 1868C > T	p.Thr623Ile	623	Decreased activity	[97]
c. 2107A > G	p.Ile703Val	703	Increased activity	[97]
c. 2164A > T	p.Lys722X	722	Xanthinuria, type 1	[98]
c. 2473C > T	p.Arg825X	825	Xanthinuria, type 1	[95]
c. 2567delC	p.Thr856LysfsX73	856	Xanthinuria, type 1	[37,96]
c. 2641C > T	p.Arg881X	881	Xanthinuria, type 1	[95]
c. 2727C > A	p.Asn909Lys	909	Decreased activity	[97]
c. 2729C > A	p.Thr910Lys	910	XDH deficiency	[97]
c. 2729C > T	p.Thr910Met	910	Xanthinuria, type 1	[52,92]
c. 3449C > G	p.Pro1150Arg	1150	Decreased activity	[97]
c. 3662A > G	p.His1221Arg	1221	Increased activity	[97]
c. 3953G > A	p.Cys1318Tyr	1318	Decreased activity	[97]

Any mutation that causes nonsense substitution [92,94–96,98,99] can be expected to cause loss of activity, since the active site of xanthine hydroxylation lies in the C-terminal domain and therefore truncated proteins should be inactive for hydroxylation. Arg881X is the longest peptide among the reported mutants having a stop codon (Table 3), and as the stop codon site is just at the active site region, as described above, it seems very likely that an active site cavity cannot be formed.

The mutation of Arg149Cys at the Fe/S I cluster motif [93] may influence the formation of the cluster, resulting in loss of electron transfer, even if the protein is completely processed and folded. Thr910 is located at a distance of 7.3 Å from Mo=S in the molybdenum center. Mutation of this residue to a bulky methionine or lysine residue seems likely to result in the loss of Moco or its sulfur atom, which is essential for the activity. Alternatively, insertion of the lysine residue may change the electrostatic environment in the active center cavity.

SNP analysis suggests that mutations of XOR may be quite frequent [97]. Although the conditions of activity determination, such as XDH/XO ratio and content of the desulfo-form of each mutant may have varied, it was reported that mutation of some residues not directly involved in the catalysis may result in partial loss of activity, possibly through effects on the protein conformation. It is intriguing to note that mutants Ile703Val and His1221Arg show increased activity due to an increase of  $V_{\max}$ . Those residues are located not in the active site cavity, but rather at the surface of the C-terminal Moco domain. As stopped-flow studies with XDH showed that the rate-limiting step of the overall reaction is release of urate, such mutation might increase the rate of release of urate. It has been reported that the  $k_{\text{cat}}$  value of bacterial XDH is 10 times higher [87] and the enzyme inhibition pattern is very different from that of mammalian enzyme, *i.e.*, bacterial XDH was not efficiently inhibited by febuxostat, a potent inhibitor of the mammalian enzyme [100]. Molecular dynamic simulation indicated that the bacterial enzyme molecule is much more mobile due to different mobility of surface amino acid residues, suggesting that the release rate of urate may be slower than that of the mammalian enzyme. This may be consistent with the finding that the modification of surface amino acid residues with FDNB caused slower release of urate, as described in the previous section.

## 6. Type II Xanthinuria Is the Consequence of Mutation of Human Moco Sulfurase Gene

As described above, the molybdenum atom of XOR and AO is coordinated by 5 atoms, of which one is a sulfide atom (Mo=S). During hydroxylation, two electrons from the substrate are transferred as hydride to Mo=S to form Mo-SH. The natural preparation is known to contain a significant amount of inactive form in which the sulfide atom (S) is replaced by an oxygen atom (O) [101]. The ratio Mo=O/Mo=S varies from batch to batch. The enzyme can be inactivated spontaneously by loss of sulfide, and the sulfide can also be removed by CN treatment to give SCN [101,102]. Fully active enzyme (Mo=S) can be separated using affinity chromatography [103,104]. The amount of desulfo-form seems to be regulated by the sulfur-donating activity in various organisms, including fly [102] or chicken [105,106], suggesting the existence of a sulfur-donating enzyme, Moco sulfurase. In *Drosophila melanogaster*, some mutations at maroon-like locus (*ma-l*) are known to cause inactivation of both XDH and XO [107], and combined deficiency of XOR and AO in humans was reported [108]. In 1995, it was proposed that type II xanthinuria might be due to a defect in sulfur donation, resulting in combined deficiency of XOR and AO [35]. Subsequently the *ma-l* gene, bovine Moco sulfurase gene and finally human Moco sulfurase gene were cloned and sequenced; all of them are members of a superfamily having a *NifS*-like domain in the N-terminal followed by a possible Moco-binding domain with a total of 888 amino acids [38,109,110]. Two independent xanthinuria patients were found to having a mutation that converts codon 419 to a nonsense codon [38]. Subsequently, other mutants, Ala156 to Pro [111] and Arg776 to Cys [112], were reported to cause type II xanthinuria. As human Moco sulfurase has not yet been successfully expressed as a soluble protein and its three-dimensional structure is not available, we can only speculate that the mutations cause some conformational change or folding error that affects Moco binding. Further studies can be expected on this interesting protein and on the mechanism of sulfur incorporation, including the question of whether the sulfur atom is incorporated before or after Moco is incorporated into XOR or AO protein.

## Acknowledgments

This work was supported by Grant-in Aids (T.N. 24659144, K. O. 24590393, K. I. 23591205) for scientific research from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture and the Gout Research Foundation of Japan.

## Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interests.

## References

1. Nishino, T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.* **1994**, *116*, 1–6.
2. Hille, R.; Nishino, T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Faseb J.* **1995**, *9*, 995–1003.
3. Hille, R. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2757–2816.
4. Enroth, C.; Eger, B.T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T.; Pai, E.F. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10723–10728.
5. Nishino, T.; Okamoto, K.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* **2008**, *275*, 3278–3289.
6. Hille, R.; Nishino, T.; Bittner, F. Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 1179–1205.
7. Elion, G.B. Enzymatic and metabolic studies with allopurinol. *Ann. Rheum. Dis.* **1966**, *25*, 608–614.
8. Berry, C.E.; Hare, J.M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **2004**, *555*, 589–606.
9. Hellsten-Westing, Y. Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry* **1993**, *100*, 215–222.
10. Linder, N.; Rapola, J.; Raivio, K.O. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest.* **1999**, *79*, 967–974.
11. Angermuller, S.; Bruder, G.; Volkl, A.; Wesch, H.; Fahimi, H.D. Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell. Biol.* **1987**, *45*, 137–144.
12. Ichikawa, M.; Nishino, T.; Nishino, T.; Ichikawa, A. Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes: High-resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **1992**, *40*, 1097–1103.
13. Elion, G.B.; Kovensky, A.; Hitchings, G.H. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **1966**, *15*, 863–880.
14. Pacher, P.; Nivorozhkin, A.; Szabo, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 87–114.

15. Okamoto, K.; Eger, B.T.; Nishino, T.; Kondo, S.; Pai, E.F.; Nishino, T. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1848–1855.
16. Okamoto, K.; Matsumoto, K.; Hille, R.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7931–7936.
17. Terkeltaub, R. Update on gout: New therapeutic strategies and options. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2010**, *6*, 30–38.
18. Becker, M.A.; Schumacher, H.R., Jr.; Wortmann, R.L.; MacDonald, P.A.; Eustace, D.; Palo, W.A.; Streit, J.; Joseph-Ridge, N. Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2450–2461.
19. Kamatani, N.; Fujimori, S.; Hada, T.; Hosoya, T.; Kohri, K.; Nakamura, T.; Ueda, T.; Yamamoto, T.; Yamanaka, H.; Matsuzawa, Y. An allopurinol-controlled, randomized, double-dummy, double-blind, parallel between-group, comparative study of febuxostat (TMX-67), a non-purine-selective inhibitor of xanthine oxidase, in patients with hyperuricemia including those with gout in Japan: phase 3 clinical study. *J. Clin. Rheumatol.* **2011**, *17*, S13–S18.
20. Massey, V.; Komai, H.; Palmer, G.; Elion, G.B. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3,4-*d*]pyrimidines. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 2837–2844.
21. Okamoto, K.; Eger, B.T.; Nishino, T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Mechanism of inhibition of xanthine oxidoreductase by allopurinol: Crystal structure of reduced bovine milk xanthine oxidoreductase bound with oxipurinol. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **2008**, *27*, 888–893.
22. Ames, B.N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6858–6862.
23. Glantzounis, G.K.; Tsimoyiannis, E.C.; Kappas, A.M.; Galaris, D.A. Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 4145–4151.
24. Palmer, R.M.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, *327*, 524–526.
25. Jones, S.P.; Bolli, R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2006**, *40*, 16–23.
26. Lundberg, J.O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 156–167.
27. Kobayashi, K.; Miki, M.; Tagawa, S. Pulse-radiolysis study of the reaction of nitric oxide with superoxide. *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* **1995**, 2885–2889, doi:10.1039/DT9950002885.
28. Nishino, T.; Nakanishi, S.; Okamoto, K.; Mizushima, J.; Hori, H.; Iwasaki, T.; Nishino, T.; Ichimori, K.; Nakazawa, H. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 783–786.
29. Okamoto, K.; Kusano, T.; Nishino, T. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Curr. Pharmaceut. Des.* **2012**, in press.
30. Li, H.; Samouilov, A.; Liu, X.; Zweier, J.L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24482–24489.

31. Massey, V.; Brumby, P.E.; Komai, H. Studies on milk xanthine oxidase. Some spectral and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1682–1691.
32. Saito, T.; Nishino, T. Differences in redox and kinetic properties between NAD-dependent and O<sub>2</sub>-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 10015–10022.
33. Dent, C.E.; Philpot, G.R. Xanthinuria, an inborn error (or deviation) of metabolism. *Lancet* **1954**, *266*, 182–185.
34. Kojima, T.; Nishina, T.; Kitamura, M.; Hosoya, T.; Nishioka, K. Biochemical studies on the purine metabolism of four cases with hereditary xanthinuria. *Clin. Chim. Acta* **1984**, *137*, 189–198.
35. Simmonds, H.A.; Reiter, S.; Nishino, T. Hereditary xanthinuria. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed.; Scriver, C.R., Ed.; McGraw-Hill, Health Professions Division: New York, NY, USA, 1995; pp. 1781–1797.
36. Mateos, F.A.; Puig, J.G.; Jimenez, M.L.; Fox, I.H. Hereditary xanthinuria. Evidence for enhanced hypoxanthine salvage. *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 847–852.
37. Ichida, K.; Amaya, Y.; Kamatani, N.; Nishino, T.; Hosoya, T.; Sakai, O. Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2391–2397.
38. Ichida, K.; Matsumura, T.; Sakuma, R.; Hosoya, T.; Nishino, T. Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 1194–1200.
39. Yamamoto, T.; Higashino, K.; Kono, N.; Kawachi, M.; Nanahoshi, M.; Takahashi, S.; Suda, M.; Hada, T. Metabolism of pyrazinamide and allopurinol in hereditary xanthine oxidase deficiency. *Clin. Chim. Acta* **1989**, *180*, 169–175.
40. Ichida, K.; Yoshida, M.; Sakuma, R.; Hosoya, T. Two siblings with classical xanthinuria type 1: Significance of allopurinol loading test. *Intern. Med.* **1998**, *37*, 77–82.
41. Pryde, D.C.; Dalvie, D.; Hu, Q.; Jones, P.; Obach, R.S.; Tran, T.D. Aldehyde oxidase: An enzyme of emerging importance in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8441–8460.
42. Garattini, E.; Terao, M. The role of aldehyde oxidase in drug metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 487–503.
43. Kucera, J.; Bulkova, T.; Rychla, R.; Jahn, P. Bilateral xanthine nephrolithiasis in a dog. *J. Small Anim. Pract.* **1997**, *38*, 302–305.
44. Van Zuilen, C.D.; Nickel, R.F.; van Dijk, T.H.; Reijngoud, D.J. Xanthinuria in a family of Cavalier King Charles spaniels. *Vet. Q.* **1997**, *19*, 172–174.
45. Tsuchida, S.; Kagi, A.; Koyama, H.; Tagawa, M. Xanthine urolithiasis in a cat: A case report and evaluation of a candidate gene for xanthine dehydrogenase. *J. Feline Med. Surg.* **2007**, *9*, 503–508.
46. Miranda, M.; Rigueira, L.; Suarez, M.L.; Carbajales, P.; Moure, P.; Fidalgo, L.E.; Failde, D.; Vazquez, S. Xanthine nephrolithiasis in a galician blond beef calf. *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 921–923.
47. Oda, M.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahata, N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* **2002**, *19*, 640–653.
48. Bradbury, M.G.; Henderson, M.; Brocklebank, J.T.; Simmonds, H.A. Acute renal failure due to xanthine stones. *Pediatr. Nephrol.* **1995**, *9*, 476–477.

49. Thomas, N.; Stephen, D.C.; Abraham, B.; Kekre, N.; Seshadri, M.S. Xanthinuria—An unusual cause for renal stone disease. *J. Assoc. Physicians. India* **1996**, *44*, 203–204.
50. Kiss, A.; Barenyi, M.; Csontai, A. Xanthine stone in the urinary bladder of a male child. *Urol. Int.* **1999**, *63*, 242–244.
51. Al-Eisa, A.A.; Al-Hunayyan, A.; Gupta, R. Pediatric urolithiasis in Kuwait. *Int. Urol. Nephrol.* **2002**, *33*, 3–6.
52. Arikyan, N.; Sarkissian, A.; Hesse, A.; Eggermann, T.; Leumann, E.; Steinmann, B. Xanthinuria type I: A rare cause of urolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* **2007**, *22*, 310–314.
53. Gargah, T.; Essid, A.; Labassi, A.; Hamzaoui, M.; Lakhoua, M.R. Xanthine urolithiasis. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **2010**, *21*, 328–331.
54. Martin, H.M.; Hancock, J.T.; Salisbury, V.; Harrison, R. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 4933–4939.
55. Vorbach, C.; Scriven, A.; Capecchi, M.R. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: Gene sharing in the lactating mammary gland. *Gene Dev.* **2002**, *16*, 3223–3235.
56. McManaman, J.L.; Palmer, C.A.; Wright, R.M.; Neville, M.C. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: Evidence of a role in lipid secretion. *J. Physiol.* **2002**, *545*, 567–579.
57. Nakazono, K.; Watanabe, N.; Matsuno, K.; Sasaki, J.; Sato, T.; Inoue, M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10045–10048.
58. Johnson, R.J.; Kang, D.H.; Feig, D.; Kivlighn, S.; Kanellis, J.; Watanabe, S.; Tuttle, K.R.; Rodriguez-Iturbe, B.; Herrera-Acosta, J.; Mazzali, M. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* **2003**, *41*, 1183–1190.
59. Elion, G.B. The purine path to chemotherapy. *Science* **1989**, *244*, 41–47.
60. Johnson, J.L.; Duran, M. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. In *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed.; Scriver, C.R., Childs, B., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Eds.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 3163–3177.
61. Ichida, K.; Amaya, Y.; Noda, K.; Minoshima, S.; Hosoya, T.; Sakai, O.; Shimizu, N.; Nishino, T. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): Structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* **1993**, *133*, 279–284.
62. Amaya, Y.; Yamazaki, K.; Sato, M.; Noda, K.; Nishino, T.; Nishino, T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14170–14175.
63. Minoshima, S.; Wang, Y.; Ichida, K.; Nishino, T.; Shimizu, N. Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase) (XDH) to band p23 of chromosome 2. *Cytogenet. Cell Genet.* **1995**, *68*, 52–53.
64. Xu, P.; Huecksteadt, T.P.; Hoidal, J.R. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics* **1996**, *34*, 173–180.



65. Wright, R.M.; Vaitaitis, G.M.; Wilson, C.M.; Repine, T.B.; Terada, L.S.; Repine, J.E. cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10690–10694.
66. Saksela, M.; Raivio, K.O. Cloning and expression *in vitro* of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem. J.* **1996**, *315*, 235–239.
67. Garattini, E.; Fratelli, M.; Terao, M. Mammalian aldehyde oxidases: Genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1019–1048.
68. Boer, D.R.; Thapper, A.; Brondino, C.D.; Romao, M.J.; Moura, J.J. X-ray crystal structure and EPR spectra of “arsenite-inhibited” *Desulfovibrio* aldehyde dehydrogenase: A member of the xanthine oxidase family. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8614–8615.
69. Yamaguchi, Y.; Matsumura, T.; Ichida, K.; Okamoto, K.; Nishino, T. Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J. Biochem.* **2007**, *141*, 513–524.
70. Nishino, T.; Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Hori, H.; Matsumura, T.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24888–24894.
71. Iwasaki, T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Mizushima, J.; Hori, H. Sequence motif-specific assignment of two [2Fe-2S] clusters in rat xanthine oxidoreductase studied by site-directed mutagenesis. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 771–778.
72. Kuwabara, Y.; Nishino, T.; Okamoto, K.; Matsumura, T.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8170–8175.
73. Nishino, T. The nicotinamide adenine dinucleotide-binding site of chicken liver xanthine dehydrogenase. Evidence for alteration of the redox potential of the flavin by NAD binding or modification of the NAD-binding site and isolation of a modified peptide. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5468–5473.
74. Nishino, T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29859–29864.
75. Nishino, T.; Tsushima, K.; Hille, R.; Massey, V. Inhibition of milk xanthine oxidase by fluorodinitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7348–7353.
76. Huber, R.; Hof, P.; Duarte, R.O.; Moura, J.J.; Moura, I.; Liu, M.Y.; LeGall, J.; Hille, R.; Archer, M.; Romao, M.J. A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8846–8851.
77. Palmer, G.; Massey, V. Electron paramagnetic resonance and circular dichroism studies on milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 2614–2620.
78. Porras, A.G.; Palmer, G. The room temperature potentiometry of xanthine oxidase. Ph-dependent redox behavior of the flavin, molybdenum, and iron-sulfur centers. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 11617–11626.

79. Caldeira, J.; Belle, V.; Asso, M.; Guigliarelli, B.; Moura, I.; Moura, J.J.; Bertrand, P. Analysis of the electron paramagnetic resonance properties of the  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$  centers in molybdenum enzymes of the xanthine oxidase family: Assignment of signals I and II. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2700–2707.
80. Hille, R.; Hagen, W.R.; Dunham, W.R. Spectroscopic studies on the iron-sulfur centers of milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10569–10575.
81. Ishikita, H.; Eger, B.T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E.F. Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 999–1009.
82. Massey, V.; Schopfer, L.M.; Nishino, T.; Nishino, T. Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 10567–10573.
83. Saito, T.; Nishino, T.; Massey, V. Differences in environment of FAD between NAD-dependent and  $\text{O}_2$ -dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15930–15935.
84. Hunt, J.; Massey, V. Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21479–21485.
85. Tsujii, A.; Nishino, T. Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Effect of guanidine-HCL or urea on the activity. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **2008**, *27*, 881–887.
86. Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Crystal Structures of Urate Bound Form of Xanthine Oxidoreductase: Substrate Orientation and Structure of the Key Reaction Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17080–17083.
87. Leimkuhler, S.; Stockert, A.L.; Igarashi, K.; Nishino, T.; Hille, R. The role of active site glutamate residues in catalysis of *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40437–40444.
88. Bergmann, F.; Dikstein, S. Studies on uric acid and related compounds III. Observations on the specificity of mammalian xanthine oxidases. *J. Biol. Chem.* **1956**, *223*, 765–780.
89. Cao, H.; Pauff, J.M.; Hille, R. Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase: The sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28044–28053.
90. Jezewska, M.M. Xanthine accumulation during hypoxanthine oxidation by milk xanthine oxidase. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *36*, 385–390.
91. Metz, S.; Thiel, W. A combined QM/MM study on the reductive half-reaction of xanthine oxidase: substrate orientation and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14885–14902.
92. Nakamura, M.; Yuichiro, Y.; Jorn Oliver, S.; Tomohiro, M.; Schwab, K.O.; Takeshi, N.; Tatsuo, H.; Ichida, K. Identification of a xanthinuria type I case with mutations of xanthine dehydrogenase in an Afghan child. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *414*, 158–160.
93. Sakamoto, N.; Yamamoto, T.; Moriwaki, Y.; Teranishi, T.; Toyoda, M.; Onishi, Y.; Kuroda, S.; Sakaguchi, K.; Fujisawa, T.; Maeda, M.; *et al.* Identification of a new point mutation in the human xanthine dehydrogenase gene responsible for a case of classical type I xanthinuria. *Hum. Genet.* **2001**, *108*, 279–283.

94. Jurecka, A.; Stiburkova, B.; Krijt, J.; Gradowska, W.; Tylki-Szymanska, A. Xanthine dehydrogenase deficiency with novel sequence variations presenting as rheumatoid arthritis in a 78-year-old patient. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2010**, doi:10.1007/s10545-009-9011-z.
95. Stiburkova, B.; Krijt, J.; Vyletal, P.; Bartl, J.; Gerhatova, E.; Korinek, M.; Sebesta, I. Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: Biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 93–99.
96. Levartovsky, D.; Lagziel, A.; Sperling, O.; Liberman, U.; Yaron, M.; Hosoya, T.; Ichida, K.; Peretz, H. *XDH* gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: A second report. *Kidney Int.* **2000**, *57*, 2215–2220.
97. Kudo, M.; Moteki, T.; Sasaki, T.; Konno, Y.; Ujiie, S.; Onose, A.; Mizugaki, M.; Ishikawa, M.; Hiratsuka, M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenetics Genom.* **2008**, *18*, 243–251.
98. Gok, F.; Ichida, K.; Topaloglu, R. Mutational analysis of the xanthine dehydrogenase gene in a Turkish family with autosomal recessive classical xanthinuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, *18*, 2278–2283.
99. Fujiwara, Y.; Kawakami, Y.; Shinohara, Y.; Ichida, K. A case of hereditary xanthinuria type 1 accompanied by bilateral renal calculi. *Intern. Med.* **2012**, *51*, 1879–1884.
100. Kikuchi, H.; Fujisaki, H.; Furuta, T.; Okamoto, K.; Leimkuhler, S.; Nishino, T. Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: Insight from molecular dynamics. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 331.
101. Massey, V.; Edmondson, D. On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6595–6598.
102. Wahl, R.C.; Rajagopalan, K.V. Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1354–1359.
103. Nishino, T.; Nishino, T.; Tsushima, K. Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on Sepharose 4B/folate gel. *FEBS Lett.* **1981**, *131*, 369–372.
104. Ikegami, T.; Nishino, T. The presence of desulfo xanthine dehydrogenase in purified and crude enzyme preparations from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *247*, 254–260.
105. Nishino, T. Purification of hepatic xanthine dehydrogenase from chicken fed a high-protein diet. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *341*, 93–98.
106. Itoh, R.; Nishino, T.; Usami, C.; Tsushima, K. An immunochemical study of the changes in chicken liver xanthine dehydrogenase activity during dietary adaptation. *J. Biochem.* **1978**, *84*, 19–26.
107. Wahl, R.C.; Warner, C.K.; Finnerty, V.; Rajagopalan, K.V. *Drosophila melanogaster* mal mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3958–3962.
108. Reiter, S.; Simmonds, H.A.; Zollner, N.; Braun, S.L.; Knedel, M. Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol. *Clin. Chim. Acta* **1990**, *187*, 221–234.

109. Amrani, L.; Primus, J.; Glatigny, A.; Arcangeli, L.; Scazzocchio, C.; Finnerty, V. Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* hxB and *Drosophila melanogaster* ma-1 genes with nifS from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 114–125.
110. Watanabe, T.; Ihara, N.; Itoh, T.; Fujita, T.; Sugimoto, Y. Deletion mutation in *Drosophila* ma-1 homologous, putative molybdopterin cofactor sulfurase gene is associated with bovine xanthinuria type II. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21789–21792.
111. Yamamoto, T.; Moriwaki, Y.; Takahashi, S.; Tsutsumi, Z.; Tuneyoshi, K.; Matsui, K.; Cheng, J.; Hada, T. Identification of a new point mutation in the human molybdenum cofactor sulfurase gene that is responsible for xanthinuria type II. *Metabolism* **2003**, *52*, 1501–1504.
112. Peretz, H.; Naamati, M.S.; Levartovsky, D.; Lagziel, A.; Shani, E.; Horn, I.; Shalev, H.; Landau, D. Identification and characterization of the first mutation (Arg776Cys) in the C-terminal domain of the Human Molybdenum Cofactor Sulfurase (HMCS) associated with type II classical xanthinuria. *Mol. Genet. Metabol.* **2007**, *91*, 23–29.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

<TOPICS>

# 3. 尿酸トランスポーター研究の進歩

Progress in urate transporter research

市田 公美

Kimiyoshi Ichida (教授) / 東京薬科大学病態生理学教室

key words

高尿酸血症におけるABCG2機能と尿酸動態の関係および*abcg2*ノックアウトマウスの検討から、ABCG2の機能低下により腸管からの尿酸排泄が減少し、それに伴って腎臓からの尿酸排泄が増加し、一見、従来の尿酸産生過剰型高尿酸血症を呈することが判明した。この病態に対し、我々は腎外排泄低下型高尿酸血症という概念を提唱している。つまり、従来の尿酸産生過剰型高尿酸血症には、腎外排泄低下型高尿酸血症と真の尿酸産生過剰型高尿酸血症の両方が混在していることになる。

ABCG2  
尿酸産生過剰型高尿酸血症  
腎外排泄低下型高尿酸血症

## はじめに

尿酸は、プリン体の最終代謝産物であり、血清尿酸値は尿酸への代謝量（産生量）と腎臓を中心とした排泄能のバランスにより規定されている。尿酸はトランスポーターにより輸送され、このトランスポーターが尿酸の排泄能に大きく関与している。近年、血清尿酸値に関する全ゲノム関連解析も行われ、尿酸トランスポーターの研究が大きく進み、多くの知見が得られている。本稿では、抗癌剤輸送ポンプとして抗癌剤耐性に関与することが知られていたABCG2 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 2) に関する最近の知見を概説する。

## 尿酸を輸送するトランスポーター

通常、ヒトの体内の尿酸プールは、成人男性で約700~1,700mg、平均1,200mgであり、成人女性では550~700mgといわれている。壊れた細胞から放出されるプリン体や新規に合成されるプリン体400~500mgと食事のプリン体により、1日あたり700~800mgのプリン体が尿酸プールに流入してくる。それと同じ量の尿酸が体外に排泄されることにより、血清尿酸値はほぼ一定に保たれている。

体外に排泄される尿酸の約7割が腎臓から、残りのほとんどは消化管から排泄される。血液中の尿酸の約90%は蛋白と結合せず遊離しており、糸球体で濾過された後、近位尿細管を中心に

再吸収と分泌が両方向性に行われ、最終的には糸球体を通じた尿酸の6~10%が尿中に排泄される。尿酸が再吸収または分泌されるためには、尿酸が細胞膜を越えて輸送される必要があり、これはトランスポーターを介して行われる。現在、多くの尿酸トランスポーターが報告されており、これらのなかで、URAT1とGLUT9/URATv1が腎臓において尿酸の再吸収に働く主要なトランスポーターである。一方、尿酸の排泄に働く主要なトランスポーターはABCG2である。ABCG2は、腎臓やその他、多くの臓器において発現しており、特に消化管からの尿酸排泄に重要な役割を担っている。



## ABCG2(BCRP)

ATP結合カセット(ATP-binding cassette: ABC)と呼ばれる共通配列を有し、ATPを利用して物質の能動輸送を行うABCトランスポーターは、細胞の内から外へ物質を汲み出す排泄ポンプとして働く。ABCトランスポーターであるABCG2の遺伝子は、当初、薬剤耐性に関連する遺伝子BCRP(*breast cancer resistance protein*)として、薬剤耐性の乳癌細胞からクローニングされた。ABCG2は、小腸、肝臓、腎尿管などの頂側(apical)膜に発現し、有機アニオン系化合物の排泄を行う。

このABCG2が痛風の発症に関連していることが、我々を含む2つのグループから同時に報告された<sup>2)</sup>。我々はヒトの胎児腎由来の細胞株HEK293細胞を用いて検討を行い、その結果、ABCG2には尿酸輸送能が認められた<sup>2)</sup>。さらに、その輸送は生理的な尿酸濃度の範囲において飽和現象が認められず、高容量性であった。

ABCG2の一塩基多型Q126XとQ141Kのアレル頻度は、それぞれ約3%および32%と高頻度で認められる<sup>3)</sup>。これらの変異体を用いて尿酸の輸送能を検討すると、Q126XによりABCG2の尿酸輸送能が消失するのに対し、Q141Kは尿酸輸送能が半分に減少する<sup>2)</sup>。この2つの一塩基多型は、1つの染色体上では同時に存在せず、独立したリスクとなっている<sup>2)</sup>。これらのことを用いて、痛風症例のABCG2の機能を評価すると、ABCG2の機能の低下に従って痛風の発症リスクは上昇し、機能が

4分の1以下になる遺伝子変異パターンをもつ症例では、ABCG2機能の正常例に比し痛風の発症リスクが約26倍にも上昇する<sup>2)</sup>。その後、ABCG2の尿酸輸送の詳細を明らかにするため、*abcg2*ノックアウトマウスの腎臓や腸管の尿酸輸送が検討され、*abcg2*が腸管の尿酸排泄に重要であることが示された<sup>4)5)</sup>。さらに、我々は高尿酸血症における尿酸動態に関する臨床データを検討した結果、ABCG2の機能低下に伴って血清尿酸値が上昇すると同時に尿中尿酸排泄量は増加し、従来の分類における産生過剰型高尿酸血症を呈することを明らかにした<sup>5)</sup>。この原因として、腸管からの尿酸排泄が減少したことにより、逆に腎臓からの尿酸排泄が増加したと推定されたが、尿酸は腸管の常在細菌により分解されるため、ヒトにおける腸管の尿酸排泄を検討することは困難であった。そこで、*abcg2*ノックアウトマウスを用い、*abcg2*の機能喪失に伴い、腸管の尿酸排泄減少と同時に尿中尿酸排泄量が増加することを確認した<sup>5)</sup>。

### 痛風・高尿酸血症の病型

高尿酸血症は、腎臓からの尿酸排泄が低下する尿酸排泄低下型高尿酸血症、尿酸の産生が増加したため腎臓からの排泄が増加している尿酸産生過剰型高尿酸血症と、両方の機序をもった混合型高尿酸血症の3つに分類されていた。それぞれの頻度は、尿酸排泄低下型が55~60%、尿酸産生過剰型が10~15%、そして混合型が25~30%となっ

ている。混合型を含めて考えると尿酸排泄低下型の機序をもっている高尿酸血症は全体の85~90%を占め、同様に産生過剰型の機序をもっているものは40~45%を占めていることになる。したがって、ほとんどの高尿酸血症の発症には尿酸の排泄低下が関与している一方で、半数近くは尿酸の産生過剰が関与しているといえる。尿酸産生過剰型高尿酸血症の成因として、生活習慣ではプリン体過剰摂取などが考えられていたが、遺伝の関与についてはLesch-Nyhan症候群などの発症頻度の低い先天性代謝異常症を除いて不明のままであった。最近、前述のようにABCG2の機能低下により、尿酸産生過剰型高尿酸血症の臨床検査パターンを示すことが判明したことから、我々は腎外排泄低下型高尿酸血症という概念を提唱している(図)<sup>5)</sup>。すなわち、ABCG2の機能低下により腸管の尿酸排泄が減少するのに伴って腎臓からの尿酸排泄が増加し、一見、従来の尿酸産生過剰型高尿酸血症を呈するというものである。このことは、比較的高頻度に見られる尿酸産生過剰型高尿酸血症を説明し得る候補遺伝子およびその変異が同定されていないという事実に一致する。たとえば、尿酸産生過剰型高尿酸血症の検討において、原因となるようなプリン代謝関連酵素の高頻度な異常が同定されておらず、また、全ゲノム関連解析において産生過剰型高尿酸血症をきたすような代謝関連の遺伝子もほとんど同定されていない。これまで尿酸産生過剰型高尿酸血症と判定されていたものの多くが、実際には

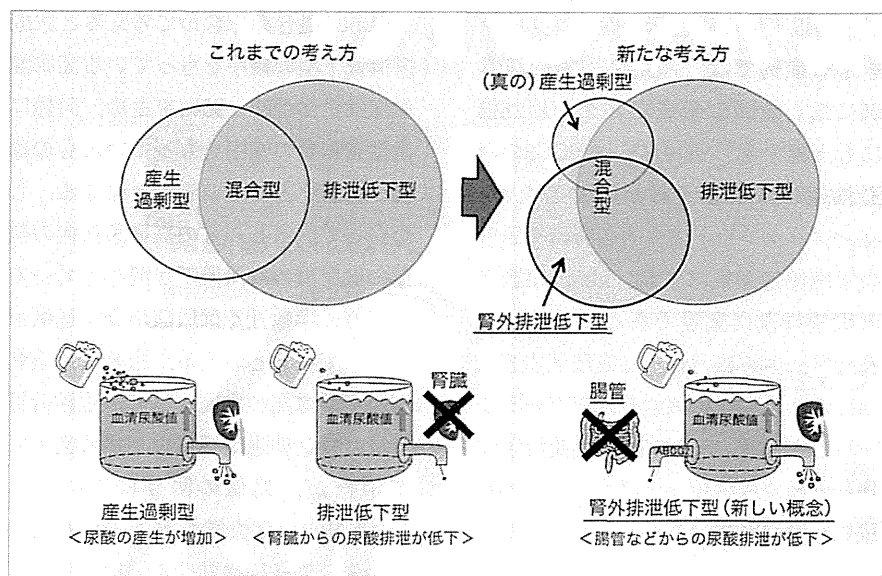


図 高尿酸血症の病型分類

(文献5)より改変引用)

腎外排泄低下型高尿酸血症であると考えられる<sup>5)</sup>。すなわち、従来の尿酸産生過剰型高尿酸血症は、この腎外排泄低下型高尿酸血症と真の尿酸産生過剰型高尿酸血症とが混在していたことになる。我々は、従来の尿酸産生過剰型

高尿酸血症を腎負荷型高尿酸血症と呼ぶことを提唱している。

文 献

1) Woodward OM, Kottgen A, Coresh J, et al: Identification of a

urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 10338-10342, 2009

2) Matsuo H, Takada T, Ichida K, et al: Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. Sci Transl Med 1: 5ra11, 2009  
 3) Maekawa K, Itoda M, Sai K, et al: Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. Drug Metab Pharmacokinet 21: 109-121, 2006  
 4) Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, et al: Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. PLoS One 7: e30456, 2012  
 5) Ichida K, Matsuo H, Takada T, et al: Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. Nat Commun 3: 764, 2012

市田 公美(Kimiyoshi Ichida)

1982年 東京慈恵会医科大学 卒業  
 1984年 東京慈恵会医科大学第2内科(現腎臓・高血圧内科) 入局  
 1998年 東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 講師  
 2007年 東京薬科大学薬学部病態生理学教室 教授



## 2 尿酸代謝異常症の 最前線

いちだ きみよし  
市田 公美

東京薬科大学病態生理学教室



市田 公美  
1982年 東京慈恵会医科大学卒業  
1990-1991年  
横浜市立大学生化学教室に留学  
1998年 東京慈恵会医科大学腎臓・  
高血圧内科 講師  
2007年 東京薬科大学病態生理学教室  
教授  
研究テーマ：プリン代謝と腎臓における  
尿酸輸送体

Key words : URAT1, GLUT9 (URATv1), ABCG2,  
OAT4, NPT1, MCT9, 腎性低尿酸血症

### Abstract

血清尿酸値は種々の因子により影響を受け、高尿酸血症は複数の遺伝子と環境因子が関与し発症する多因子遺伝性疾患である。尿酸トランスポーター遺伝子の一塩基多型等が発症に影響を及ぼすことが分かってきた。例えば、尿酸排泄に働く ABCG2 の機能低下が著しくなるのにもない、血清尿酸値の上昇と痛風発症リスクの増加が起こる。一方、低尿酸血症においては、腎臓における尿酸排泄亢進により起こる腎性低尿酸血症で、尿酸再吸収に働くトランスポーター URAT1 または GLUT9 (URATv1) の欠損が原因であることが判明した。

### はじめに

尿酸は、プリン体の最終代謝産物であり、主に腎臓から尿中へ排泄される。血清尿酸値は、尿酸への代謝量（産生量）と腎臓を中心とした排泄能のバランスにより規定されている。その中でも、腎臓における尿酸輸送能は血清尿酸値を大きく規定する因子である。腎臓における尿酸輸送は主に近位尿細管で行われ、尿酸輸送のためには尿酸が尿細管細胞の管腔側膜と血管側膜を通過する必要があり、トランスポーターにより行われている。したがって、腎臓における尿酸排泄能を考える上で、この尿酸を輸送するトランス

ポーターが重要である。それにもかかわらず、近年まで尿酸トランスポーターの詳細は不明であった。しかし、2002年に尿酸の再吸収に働くトランスポーター urate transporter 1 (URAT1) が同定され、このトランスポーターの欠損により腎性低尿酸血症を発症することが明らかになった。この報告を契機に尿酸トランスポーターの同定が報告されるようになった。さらに最近、全ゲノム関連解析 (GWAS) により、血清尿酸値の変動に影響を与える遺伝子の検討がなされ、いくつかの尿酸トランスポーターが新たに同定された。その中で、当初グルコーストランスポーターのファミリーとして同定された glucose transporter 9 (GLUT9) (後に URATv1 の呼称が提案された) や、抗癌剤輸送ポンプで抗癌剤耐性に関与し breast cancer resistance protein (BCRP) として知られていた ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2) が、尿酸トランスポーターであることが明らかになるなどの注目すべき進展がみられた。これらの研究により、遺伝子変異または一塩基多型 (SNP) と尿酸代謝異常症である腎性低尿酸血症や高尿酸血症の遺伝的側面との関係が明らかになってきた。本稿では、現在までに明らかになった高尿酸血症の遺伝的側面と腎性低尿酸血症につき概説する。

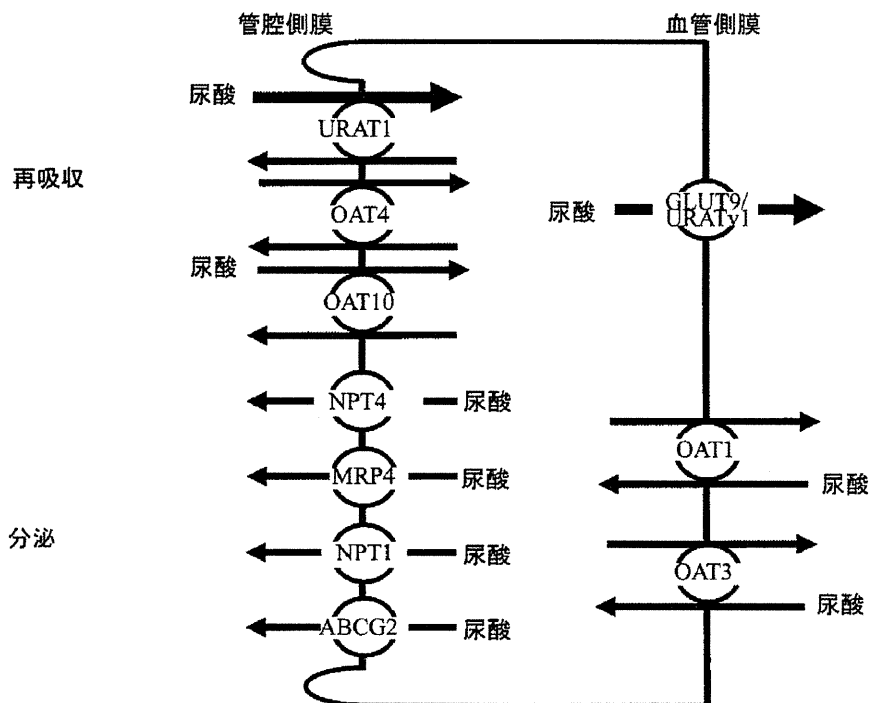


図1 近位尿細管における尿酸トランスポーター

## 1. 尿酸動態と尿酸トランスポーター

通常、食事、生体内のプリン体合成や細胞の分解の結果として、約 700 mg の尿酸が毎日合成される。それと同じ量の尿酸が体外に排泄されることにより、血清尿酸値はほぼ一定に保たれている。排泄される尿酸の約 2/3 は腎臓から、残りのほとんどは消化管から排泄される。腎臓において、蛋白と結合していない血漿中の尿酸は、糸球体濾過膜を自由に通過した後、近位尿細管を中心に再吸収と分泌が両方向性に行われ、最終的には糸球体を通過した尿酸の 6-10% が尿中に排泄される。有機酸トランスポーターである OAT4 の相同体の検索から、2002 年に URAT1 が同定された<sup>1)</sup>。その後、現在までに報告された尿酸トランスポーターを図 1 に示す。この中で、尿酸の再吸収に主に参与しているのが、近位尿細管の管腔側膜の URAT1 と基底側膜の GLUT9/URATv1 である。

## 2. 高尿酸血症

高尿酸血症は、いくつかの遺伝子と環境因子が関与し発症する多因子遺伝性疾患である。多因子遺伝性疾患に関与している遺伝子の同定は困難であるが、最近 GWAS を用いることにより関連遺伝子が同定されるようになった。GWAS による血清尿酸値に関連する遺伝子の検討は、2007 年後半から報告され、多くの遺伝子が報告された (表 1)。

表 1 尿酸関連遺伝子

1. *SLC22A12* (URAT1)
2. *SLC2A9* (GLUT9/URATv1)
3. *ABCG2* (breast cancer resistance protein: BCRP)
4. *SLC22A11* (OAT4)
5. *SLC17A1* (NPT1), *SLC17A3* (NPT4) と *SLC17A4*
6. *PDZK1* (PDZ domain containing 1)
7. *SLC16A9* (MCT9)
8. *LRRIC16A* (CARMIL) と *SCGN*
9. *GKRP* (glucokinase regulatory protein)
10. *LRP2* (lipoprotein receptor related protein-2, megalin)

表2 ABCG2 機能低下と痛風の発生リスク

推定輸送活性	遺伝子型		被験者数		p 値	オッズ比	95%信頼区間
	Q126X	Q141K	痛風	健常者			
機能 1/4以下	<u>T/T</u>	C/C	16	8	$3.39 \times 10^{-23}$	258	10.3-64.6
	<u>T/C</u>	<u>A/C</u>					
機能 1/2以下	<u>T/C</u>	C/C	37	110	$2.23 \times 10^{-9}$	4.34	2.61-7.24
	C/C	<u>A/A</u>					
機能 3/4以下	C/C	<u>A/C</u>	72	308	$2.29 \times 10^{-7}$	3.02	1.96-4.65
機能正常	C/C	C/C	34	439			

オッズ比は、ABCG2の機能低下のない遺伝子型の組み合わせ C/C (Q141K) 及び C/C (Q126X) の場合との比較より計算。機能低下を示すアレルには、下線を引いた。(文献2より改変)

### A. ABCG2

ATP 結合カセット (ATP-Binding Cassette) と呼ばれる共通配列を有し、ATP を利用して物質の能動輸送を行う ABC トランスポーターは、細胞の内から外へ物質を汲み出す排泄ポンプとして働く。ABC トランスポーターである ABCG2 の遺伝子は、当初薬剤耐性に関連する遺伝子として、薬剤耐性の乳がん細胞からクローニングされた。ABCG2 は、小腸、肝臓、腎尿細管等の頂側 (apical) 膜に発現し、有機アニオン系化合物の排泄を行う。2004 年に痛風の関連遺伝子の候補領域が第 4 染色体長腕に存在することが報告されたことから、候補領域内にあったトランスポーターについての検索及び解析が、ABCG2 を含め始まっていた。その後、GWAS によって ABCG2 は血清尿酸値との関連性が指摘された。ABCG2 を HEK293 細胞に発現させ細胞膜小胞を調製して尿酸の輸送能を解析すると、ABCG2 は生理的な尿酸濃度の範囲において、輸送飽和の生じない高容量性の尿酸輸送能を示す<sup>2)</sup>。

日本人の ABCG2 の遺伝子変異の中で、Q126X と Q141K のアレル頻度はそれぞれ、約 3% 及び 32% であり、これら 2 つの一塩基多型が高頻度で認められる。変異体を用いた機能解析の結果、Q126X により尿酸輸送能が消失するのに対し、Q141K は

輸送能が半分に減少することが判明した<sup>2)</sup>。この ABCG2 の機能変化は血清尿酸値に影響を与え、日本人の健康診断受診者において検討すると、Q141K の変異数が多いほど血清尿酸値が上昇する (表 2)。更に ABCG2 の機能低下は、痛風や高尿酸血症の発症リスクを著しく上昇させる<sup>2,3)</sup>。これらの結果から、高頻度に認めるこれら 2 つの ABCG2 の SNP が、痛風・高尿酸血症発症に著しく関与していることが分かる。

### B. OAT4, NPT1 と MCT9

GWAS により血清尿酸値に関連するトランスポーターとして、NPT1, NPT4, OAT4 と MCT9 も、指摘されている。OAT4 は、腎臓の近位尿細管の管腔側膜に発現し、尿酸の再吸収に働いていると考えられている。NPT1 は、主に腎臓の近位尿細管曲部の管腔側膜に発現し、尿酸の分泌を行っていると考えられている。OAT4 と NPT1 とも、*in vitro* において尿酸輸送が報告されたが、生体内においてどの程度尿酸の輸送に寄与しているか不明であった。最近の報告により、両トランスポーターとも、血清尿酸値に影響を与えていることが明らかになった<sup>4,5)</sup>。van der Harst らは、他の一般母集団コホート研究の参加者の内、血清尿酸値等が明らかな 7795 人を対象に、MCT9 をコードする *SLC16A9*、OAT4 をコードする *SLC22A11*、



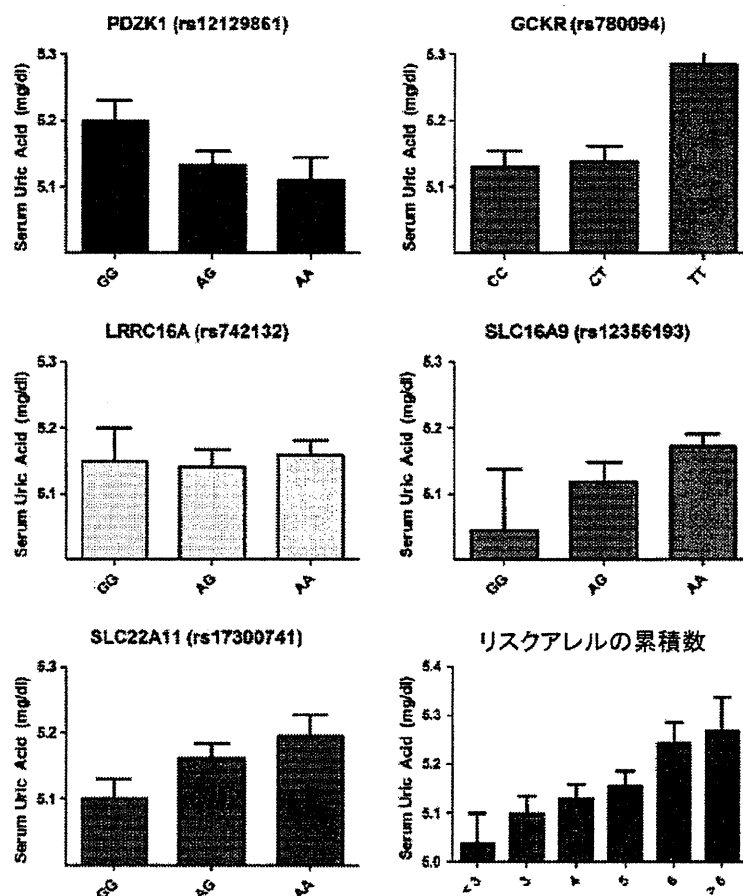


図2 PDZK1, GCKR, LRRC16A, SLC16A9とSLC22A11の遺伝子型による血清尿酸値リスクアレルは、LRRC16Aを除いた集計である。(文献5より改変)

PDZK1, glucokinase regulator protein をコードする GCKR と LRRC16A の遺伝子型による血清尿酸値への影響を検討した。その結果, LRRC16A 以外の遺伝子型に血清尿酸値との関連を認めた (図2)<sup>9)</sup>。そして, 4つの遺伝子の遺伝子型の組み合わせにより, 累積的に血清尿酸値が変動することを示した。なお, この中で PDZK1 はいくつかのトランスポーターを束ね, 尿細管管腔側膜にて機能的複合体を構成する足場蛋白として働き, GCKR は glucokinase の活性を調節している分子である。MCT9 は, 腎臓, 子宮内膜, 精巣, 卵巣や脳等に発現しているが, 機能などの詳細はまだ不明である。

### 3. 腎性低尿酸血症

腎性低尿酸血症は, 他の原因による尿細管

障害を認めないにもかかわらず, 腎臓における尿酸再吸収の低下または分泌の亢進により尿酸排泄が亢進し, 低尿酸血症を示す疾患である。日本では, 日常遭遇する無症状の低尿酸血症のほとんどは本疾患である。

#### A. 臨床症状

腎性低尿酸血症は, 常染色体劣性遺伝形式をとることが多い。低尿酸血症自体による臨床症状は認めないが, 合併症として尿路結石や運動後急性腎不全が多い。尿路結石は, 腎性低尿酸血症患者の 7-10% 程度に認められる<sup>9)</sup>。その原因として, 低尿酸血症により尿酸の腎外排泄が減少し, 結果的に尿中尿酸排泄量が増加しているためと考えられている。

運動後急性腎不全は, 腎性低尿酸血症患者

の10%近くに既往または疑わしい症状の経験を認める。運動して数時間後からの腰背部痛、嘔気、嘔吐、乏尿を主徴とする急性腎不全である。横紋筋融解症と異なり、血清CPKや血清ミオグロビンの上昇は認めないか軽度である。運動後急性腎不全を誘発する運動の種類は、短時間でも激しい運動であることが多い。特徴的な検査所見として、造影剤使用による検査の翌日の再検査、いわゆる delayed CT, MRI や超音波などの画像検査において、造影剤残存、信号強度やエコー強度がまだらな楔形になることである<sup>7)</sup>。また、運動により必ず発症するわけではなく、脱水やNSAID内服などの促進因子が運動に加わったときに発症すると考えられている<sup>7)</sup>。予後は良く、腎機能は1週間から1ヶ月程度で回復するが、再発例も多い。

発症機序として、腎臓の血管れん縮が原因であると推定されている。運動により活性酸素が増加し、腎臓の弓状動脈・葉間動脈がれん縮を起こし虚血状態になり、再還流時に活性酸素による虚血再還流障害を来すためであると考えられている。また、腎性低尿酸血症に運動後急性腎不全を合併しやすい理由は、活性酸素のスカルベンジャーである尿酸が少ないためであると推定されている。

## B. 責任遺伝子

責任遺伝子として、遺伝子 *SLC22A12* と *SLC2A9* が報告されている<sup>1,8,9)</sup>。URAT1 をコードしている *SLC22A12* において W258Stop とする遺伝子変異 G774A のアレル頻度が、日本人では 2.3% 台と高率であるために腎性低尿酸血症が多い。これはアジア大陸から G774A 変異が日本に渡ってくる際に、創始者効果という現象により日本人に URAT1 の G774A の頻度が高くなったためである<sup>10)</sup>。日本人の腎性低尿酸血症の 80-90% に *SLC22A12* の遺伝子変異が認められ、G774A

が *SLC22A12* 変異の 80% 近くを占めている<sup>9)</sup>。

生体内において URAT1 は、乳酸等を交換基質として尿酸の再吸収に働き、尿酸排泄促進薬の作用点になっている。URAT1 の欠損により著しい低尿酸血症を呈することから、URAT1 は管腔側膜で尿酸再吸収の中心的な役割を担っていることが示されている。

GWAS により血清尿酸値と関連がある遺伝子として、グルコーストランスポーターとして分類されていた GLUT9/URATv1 をコードしている遺伝子 *SLC2A9* が報告された<sup>11)</sup>。その後、GLUT9/URATv1 が尿酸を輸送し、その欠損により腎性低尿酸血症を引き起こすことが報告された<sup>8,9,12)</sup>。このことから、GLUT9/URATv1 は尿酸を再吸収する方向に輸送していることが明らかになった。この GLUT9/URATv1 の欠損による腎性低尿酸血症症例の報告はまだ少数であるため、URAT1 欠損による腎性低尿酸血症との臨床上の比較は難しい<sup>8,9,12,13)</sup>。しかし、その少数例を集計すると、尿酸排泄能の指標である CUA/Ccr が GLUT9/URATv1 の完全欠損による腎性低尿酸血症では 1.9 程度と、URAT1 完全欠損による腎性低尿酸血症の 0.45~0.87 よりも明らかに高値である<sup>12,13)</sup>。これは、管腔側膜には URAT1 以外の尿酸再吸収に働くトランスポーターが存在するのに対し、現時点では血管側膜では GLUT9/URATv1 以外のトランスポーターは想定されていないことに一致している(図1)。すなわち、URAT1 欠損では管腔側膜における尿酸再吸収は他のトランスポーターを介してある程度行われるが、GLUT9/URATv1 欠損では血管側膜における尿酸再吸収がほとんど行われなくなる。この結果、GLUT9/URATv1 欠損においては、結果的に近位尿細管における尿酸分泌を観察していると考えられる。GLUT9/URATv1 の完全欠損症例の CUA/Ccr がこの様な著しい高値を示すことは、糸球体で濾過された尿酸の 40-50% 程度