

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 7月 1日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659447

研究課題名（和文）SUMO化—脱SUMO化による腎尿細管トランスポーターの新規機能調節機序

研究課題名（英文）Novel regulatory mechanism of renal tubular transporter function by SUMOylation-deSUMOylation.

研究代表者

安西 尚彦 (ANZAI NAOHIKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70276054

研究成果の概要（和文）：SUMO (small ubiquitin-like protein)はユビキチン様蛋白質の一つで、ユビキチン化と同様な修飾システム(E1, E2, E3)により様々な蛋白質と共有結合し、翻訳後修飾システムとして働く。研究代表者はこれまでに腎尿細管トランスポーターPEPT2とSUMO-1とSUMO化結合酵素E2であるUbc9との結合、およびアミノ酸トランスポーターTAT1とSUMO-1およびE3リガーゼのPIASとの結合を見出している。本研究はSUMO化—脱SUMO化による新しいトランスポーター輸送制御機構およびPDZ結合との拮抗作用の分子機序の解明を目的とした。

これまでに、1. SUMO化関連タンパク質と腎尿細管トランスポーターPEPT2/TAT1との結合の分子機序の解明、を引き続き進めると同時に、2. PEPT2/TAT1の細胞内C末端を介するPDZ相互作用のSUMO化制御機序に対する影響」について以下の検討を行った。

1. トランスポーターPEPT2/TAT1の細胞内C末端領域におけるSUMO化部位の同定：PEPT2およびTAT1の細胞内C末端領域にある ψ KXD/E (ψ は疎水性アミノ酸)というSUMO化のコンセンサス配列がSUMO化関連タンパク質との結合に必須であることを調べるため、同部位のLysの部位指定突然変異体を用いて、酵母Two-hybrid法による検討を行った結果、同部位の変異体では結合が失われることを見出し、同部位が結合に関与することが明らかにされた。
2. SUMO化関連タンパク質のPEPT2及びTAT1の細胞内局在変化の観察：GFP融合PEPT2及びTAT1タンパク質発現ベクターの構築後、同ベクターの哺乳類発現細胞MDCKへのトランスフェクションを行った結果、細胞内TAT1蛋白質は基底側膜に発現することを共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

研究成果の概要（英文）：SUMO (small ubiquitin-like protein), one of the ubiquitin-like proteins, functions as a posttranslational modification system by binding with various proteins with covalent bond similar to ubiquitin system such as E1, E2, E3. Before starting this project, this researcher had already found the interaction of SUMO-1 and Ubc9, E2 SUMOylation enzyme, with renal tubular transporter PEPT2 and that of SUMO-1 and PIAS, E3 ligase with transporter TAT1. The purpose of this study was to clarify the molecular mechanism of novel regulatory system for transporters by SUMOylation-deSUMOylation and antagonism to PDZ interaction.

In this project, we examined the followings: 1. Clarification of molecular mechanism for the interaction of SUMOylation-related proteins with renal tubular transporters PEPT2/TAT1; 2. Effects of PDZ interaction via intracellular C-termini of PEPT2/TAT1 on SUMOylation.

As a result, first, we identified the sites of SUMOylation in the intracellular C-termini of PEPT2/TAT1: we performed the yeast two-hybrid studies using the clones that have mutation of Lysin iposition n SUMOylation consensus sequence ψ KXD/E (ψ : hydrophobic amino acid residue) in C-termini of PEPT2/TAT1 to confirm its importance. We found that

those mutants lost the interaction indicating that those sites are necessary for the bindings. Second, we observed the intracellular localization of PEPT2/TAT1 using GFP-fused PEPT2/TAT1 full-length proteins in gene-overexpressed MDCK cells. After the transfection of those clones, we could confirm the basolateral expression of TAT1 protein by confocal laser-scanning microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：トランスポーター、翻訳後修飾、腎臓

1. 研究開始当初の背景

SUMO(Small ubiquitin-like protein)はユビキチン様蛋白質の一つで、ユビキチン化と同様な修飾システム(E1, E2, E3)により様々な蛋白質と共有結合し、転写制御や細胞内局在、染色体分離など細胞質内および核内の生理現象に關与する翻訳後修飾システムとして働く。しかし近年膜タンパク質である K⁺チャネルの K2P1 が SUMO 化-脱 SUMO 化によるチャネル活性の制御を受けることが判明し、膜タンパク質も SUMO 化を受け、局在や細胞内輸送に加え、その本来の機能が制御される可能性が示された。

研究代表者らの研究室ではこれまで腎臓での薬物排泄に關与する有機酸トランスポーターOATファミリーの分子同定を継続して行うことに加え、アミノ酸およびペプチドのトランスポーター遺伝子を同定し報告している。近年ではトランスポーター輸送機能を制御する分子機序の解明を目指し、酵母Two-hybrid(Y2H)法による腎臓 cDNA ライブラリースクリーニングを行い、細胞内支持タンパク質の PDZK1 が、腎尿細管管腔側膜に存在する尿酸トランスポーターURAT1、有機酸トランスポーターOAT4、そしてペプチドトランスポーターPEPT2 と結合して、これらのトランスポーターの基質輸送活性を増加することを見出し、報告している。この中で PEPT2 のスクリーニングにおいては、PDZK1 以外に SUMO-1 と SUMO 化結合酵素 E2 である Ubc9 と結合することを見出した(第 51 回日本腎臓学会にて発表, 2008)。さらに腎尿細管基底側膜に存在し芳香族アミノ酸を輸送するアミノ酸トランスポーターTAT1 は、SUMO-1 および SUMO 化リガーゼ E3 である PIAS と結合することを見出しているが(20th IUBMBにて発表, 2006)、SUMO 化の腎尿細管トランスポーターに対する役割の解明は未だ手つかずのままである。

ところが 2005 年、K⁺チャネルの K2P1 において SUMO 化-脱 SUMO 化という機能変換が、既報の局在や細胞内輸送という役割以外に、チャネル活性の制御に關与することが初めて報告され、にわかに SUMO 化がこれら膜輸送タンパク質の本来の機能制御に關与する新たな翻訳後修飾システムである可能性が示唆された。2009 年には申請者らは肝臓の薬物トランスポーターMRP2 が SUMO 化を受けることを見出している。そこで今回申請者は、SUMO 化-脱 SUMO 化による新たな腎尿細管トランスポーター輸送制御機構の解明を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

これまでに申請者は腎尿細管管腔側膜のペプチドトランスポーターPEPT2 と基底側膜のアミノ酸トランスポーターTAT1 とがその C 末端側を介してユビキチン様タンパク質の一つ SUMO-1 の結合酵素である Ubc9 と結合することを、Y2H 法により見出した。そこで本研究において、SUMO 化-脱 SUMO 化が PEPT2 及び TAT1 基質輸送に与える影響をその形質膜移行への關与とともに検討する。そのため以下の点を明らかにする。(1) SUMO 化関連タンパク質とトランスポーターPEPT2 及び TAT1 との結合の分子機序(結合部位の同定)、(2) SUMO 化関連タンパク質の共発現/ノックダウンによる PEPT2 及び TAT1 の輸送活性化の有無(基質輸送活性測定)、(3) SUMO 化関連タンパク質の共発現/ノックダウンによる PEPT2 及び TAT1 の細胞内局在の変化(細胞内局在部位の解明)、そして(4)PEPT2 および TAT1 の細胞内 C 末端を介する PDZ 相互作用の SUMO 化制御機序に対する影響(相互作用親和性の変化分析)、などを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

先述のように、申請者はこれまでに腎尿細管管腔側膜のペプチドトランスポーター PEPT2 と基底側膜のアミノ酸トランスポーター TAT1 とがその C 末端側を介してユビキチン様タンパク質の一つ SUMO-1 およびその関連分子と結合することを、酵母 Two-hybrid 法により明らかにしている (未発表)。そこで本研究において、SUMO 化-脱 SUMO 化が PEPT2 及び TAT1 基質輸送に与える影響をその形質膜移行への関与とともに検討することを目的とし、(1) 酵母 Two-hybrid 法、GST プルダウン法および共免疫沈降法を用いた SUMO 化関連タンパク質とトランスポーター PEPT2 及び TAT1 との結合の分子機序の解明、(2) ほ乳類培養細胞ないしアフリカツメガエル卵母細胞に対する SUMO 化関連タンパク質の共発現/ノックダウンによる PEPT2 及び TAT1 の基質輸送活性化の有無、(3) SUMO 化関連タンパク質の共発現/ノックダウンによる PEPT2 及び TAT1 の細胞内局在変化の GFP 融合 TAT1 ないし PEPT2 タンパク質発現ベクターの利用による共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察、そして(4) PEPT2 および TAT1 細胞内 C 末端に存在する PDZ モチーフの突然変異体を用いた SUMO 化関連タンパク質の制御機序に対する PDZ 相互作用への影響、の 4 点を検討する。

4. 研究成果

平成 23 年度は SUMO 化関連タンパク質と腎尿細管トランスポーター PEPT2/TAT1 との結合の分子機序の解明に焦点を当て、a) 人工遺伝子変異体作成とそれを用いた酵母 Two-Hybrid 法による確認と b) SUMO 化関連タンパク質共発現によるトランスポーター輸送活性への影響の解析を行った。a) では蛋白質間相互作用に重要な TAT1 及び PEPT2 の C 末端アミノ酸残基を決定するため、それらの C 末端のアミノ酸欠損体を PCR 法により作成を行い、それをベイト、Ubc9 を持つプレイとの間での酵母 Two-Hybrid 法を行い、結合影響部位推定に至った。b) ではほ乳類培養細胞の HEK293 にトランスポーター PEPT2/TAT1 の正常型と SUMO 化部位変異体のそれぞれに SUMO 化関連タンパク質を共発現させ、PEPT2 および TAT1 の輸送活性を調べた所、輸送活性が変化することを見出した。

平成 24 年度では前年度の成果を元に、1. SUMO 化関連タンパク質と腎尿細管トランスポーター PEPT2/TAT1 との結合の分子機序の解明、を引き続き進めると同時に、2. PEPT2/TAT1 の細胞内 C 末端を介する PDZ 相互作用の SUMO 化制御機序に対する影響」について以下の検討を行った。

1. トランスポーター PEPT2/TAT1 の細胞内 C 末端領域における SUMO 化部位の同定 : PEPT2 および TAT1 の細胞内 C 末端領域にある

φ KXD/E (φ は疎水性アミノ酸) という SUMO 化のコンセンサス配列が SUMO 化関連タンパク質との結合に必須であることを調べるため、同部位の Lys の部位指定突然変異体を用いて、酵母 Two-hybrid 法による検討を行った結果、同部位の変異体では結合が失われることを見出し、同部位が結合に関与することが明らかにされた。

2. SUMO 化関連タンパク質の PEPT2 及び TAT1 の細胞内局在変化の観察 : GFP 融合 PEPT2 及び TAT1 タンパク質発現ベクターの構築後、同ベクターのほ乳類発現細胞 MDCK へのトランスフェクションを行った結果、細胞内 TAT1 蛋白質は基底側膜に発現することを共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Jutabha P, Anzai N, Hayashi K, Domae M, Uchida K, Endou H, Sakurai H. A novel human organic anion transporter NPT4 mediates the transport of ochratoxin A. *J Pharmacol Sci.* 査読有、116 巻、2011、392-396

doi: なし

(2) Miura D, Anzai N, Jutabha P, Chanluang S, He X, Fukutomi T, Endou H. Human urate transporter 1 (hURAT1) mediates the transport of orotate. *J Physiol Sci.* 査読有、61 巻、2011、253-257

doi: 10.1007/s12576-011-0136-0

(3) Jutabha P, Anzai N, Wempe MF, Wakui S, Endou H, Sakurai H. Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,* 査読有、30 巻、2011、1302-1311

doi: 10.1080/15257770.2011.616564

(4) Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Anzai N. c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *査読有, Oncol Rep,* 28 巻、2012、862-866

doi: 10.3892/or.2012.1878

(5) Kojima S, Tohei A, Anzai N. A role for endogenous peptide YY in tachykinin NK(2) receptor-triggered 5-HT release from guinea pig isolated colonic mucosa. *査読有, Br J Pharmacol,* 167 巻、2012、1362-1368

doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02094.x

(6) Vallon V, Eraly SA, Rao SR, Gerasimova M, Rose M, Nagle M, Anzai N, Smith T, Sharma K, Nigam SK, Rieg T. A

role for the organic anion transporter OAT3 in renal creatinine secretion in mice. 査読有、Am J Physiol Renal Physiol. 302 巻、2012、F1293-F1299

doi: 10.1152/ajprenal.00013.2012

(7) Yamamoto S, Kimura T, Tachiki T, Anzai N, Sakurai T, Ushimaru M. The involvement of L-type amino acid transporters in theanine transport. 査読有、Biosci Biotechnol Biochem. 76 巻、2012、2230-2235

doi: なし

(8) Nakanishi T, Ohya K, Shimada S, Anzai N, Tamai I. Functional cooperation of URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate. 査読有、Nephrol Dial Transplant. 28 巻、2013、603-611

doi: 10.1093/ndt/gfs574

(9) Breljak D, Brzica H, Sweet DH, Anzai N, Sabolic I. Sex-dependent expression of Oat3 (Slc22a8) and Oat1 (Slc22a6) proteins in murine kidneys. 査読有、Am J Physiol Renal Physiol. 304 巻、2013、F1114-F1126

doi: 10.1152/ajprenal.00201.2012

(10) Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S. Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. 査読有、J Gastroenterol. 2013、*in press*

[学会発表] (計3件)

(1) 安西尚彦、尿酸トランスポーターの分子同定、第46回日本痛風・核酸代謝学会総会(招待講演)、2013年02月14日~2013年02月15日、新宿区

(2) 安西尚彦、ヒトの尿酸代謝と高尿酸血症治療、第33回日本臨床薬理学会総会(招待講演)、2012年11月29日~2012年12月01日、沖縄県

(3) 安西尚彦、ランスポーター：腎臓からの全身制御を目指して、第47回日本小児腎臓学会学術集会(招待講演)、2012年06月29日~2012年06月30日、千代田区

[図書] (計3件)

(1) 安西尚彦、有機イオンと尿酸の輸送、臨床腎臓内科学、2013、879-882

(2) 安西尚彦、花田健治、林啓太郎、ハートナップ病、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 20 先天性代謝異常症候群(第2版)、2012、784-786

(3) 安西尚彦、岡本和久、堂前真理子、青

いおむつ症候群、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 20 先天性代謝異常症候群(第2版)、2012、790-792

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等: 特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安西 尚彦 (ANZAI NAOHIKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70276054

(2) 研究分担者

児嶋 修一 (KOJIMA SHU-ICHI)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60178267

林 啓太郎 (HAYASHI KEITAROU)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10323106

(3) 連携研究者

JUTABHA Promsuk (JUTABHA PROMSUK)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90541748