

平成22年5月27日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790597
 研究課題名 (和文) 腎尿酸輸送分子複合体形成とその動的制御機構の解明
 研究課題名 (英文) Clarification of urate transporter molecular complex and dynamic regulation in the kidney.
 研究代表者
 福富 俊之 (FUKUTOMI TOSHIYUKI)
 杏林大学・医学部・助教
 研究者番号：30439187

研究成果の概要 (和文)：

血中尿酸レベル維持に重要である尿酸輸送機能制御の解明を目指し、尿酸トランスポーター URAT1 を中心とした腎臓尿酸輸送分子複合体の解明を行った。その結果、URAT1 が細胞内支持タンパク質 PDZK1 を介して有機酸トランスポーターOAT4 と結合することを明らかにした。また、PDZK1 は各々に結合し輸送活性を増加させるが、トランスポーターとの結合部位を擬似的にリン酸化することにより、URAT1 と PDZK1 の結合能が失われた。

研究成果の概要 (英文)：

Renal urate transport system plays an important role in the regulation of plasma urate level. URAT1 is one of the major urate transporters in the kidney. Therefore, this study focused on elucidating URAT1-interacting protein(s) and their dynamic regulation through phosphorylation. URAT1 was shown to be bound to an organic anion transporter, OAT4, via a scaffold protein, PDZK1. In addition, increased transport activity was observed when each transporter interacted with PDZK1. Together with the fact that a phosphomimetic mutation in the URAT1 binding site of PDZK1 abolished the URAT1-PDZK1 interaction suggest a novel regulation mechanism for a URAT1 containing "urate transportsome".

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

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、尿酸、PDZ タンパク質、タンパク質間相互作用、URAT1、PDZK1

1. 研究開始当初の背景

尿酸は、ヒトにおいてプリン体の最終代謝産物である。この尿酸の代謝経路はヒトおよ

び近縁な類人猿に特有のものであり、他の種において尿酸はウリカーゼによって開裂される。ウリカーゼはマウス等の下等な生物の

生命維持に必要な不可欠な酵素である。高濃度の尿酸は生体にとって極めて危険な物質であり、ヒトにおいて尿酸は高尿酸血症という疾患をもたらす。高尿酸血症は進行すると痛風結節により急性痛風性関節炎を引き起こし、慢性痛風性関節炎となる。また、尿路結石を伴うことも明らかにされている。しかし、負の側面のみが強調されてきた尿酸であるが、近年ではラジカルスカベンジャーとなり、中枢神経保護作用として生体にとって正の方向に働いているという報告も相次いでいる。すなわち、生体内における尿酸の排泄・再吸収を行うシステムの機能解析が生体にとって重要である。これまでに、当研究室において、URAT1 のクローニングがなされ、この URAT1 が腎近位尿細管腔膜に存在し、尿酸の再吸収を行っている尿酸トランスポーターであることが証明された。また、URAT1 は腎性低尿酸血症の原因遺伝子であることを明らかにした。加えて、URAT1 は C 末端の PDZ モチーフを介して細胞内支持タンパク質 PDZK1 と結合し、尿酸輸送活性が増加することも報告しており、尿酸輸送機能制御において、URAT1 のみならず細胞内支持タンパク質である PDZK1 の重要性を見出した。PDZK1 は URAT1 以外にも複数のトランスポーターとの結合が報告されている。当研究室でも有機酸トランスポーターの 1 つである OAT4 と結合し、輸送機能発現に重要であることを報告している。PDZK1 との PDZ 結合は URAT1 および OAT4 の腎臓での輸送機能発現に重要であるが、その結合の制御機構は未だ不明である。近年、PDZ 相互作用はリガンドであるタンパク質の C 末端、ないし PDZ タンパク質の PDZ ドメイン内のリン酸化により動的な制御を受ける可能性が示唆されている。しかし、URAT1 および OAT4 さらに PDZK1 におけるリン酸化の PDZ 結合に対する効果は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、血中尿酸レベル維持に重要である尿酸輸送機能制御の解明を目指し、尿酸トランスポーター URAT1 を 1 つの輸送体分子としてだけ考えるのではなく、それに伴う機能調節タンパク質の複合体、つまり腎臓尿酸輸送分子複合体として考え、その機能調節機構の解明を目的とする。特にトランスポーターと細胞内支持タンパク質 PDZK1 の PDZ 結合のリン酸化による動的制御の解明に着目する。そこで、本研究は、腎臓における尿酸輸送分子複合体の解明および細胞内支持タンパク質 PDZK1 の PDZ 結合のリン酸化による動的制御の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腎臓における尿酸輸送分子複合体の解

明

①尿酸輸送分子複合体の構成因子の解明。

flag タグを付加した URAT1 を安定発現させた HEK293 細胞およびアフィニティタグの付加した URAT1 をノックインしたマウスを用いた。URAT1 と会合するタンパク質を共免疫沈降法およびプルダウン法と LC/MS システムを用いたタンパク質同定によって、URAT1 トランスポーター複合体の構成因子を同定し、尿酸輸送分子複合体の構成因子の解明を行った。

②PDZK1 を介した分子集積・相互作用の解明。

URAT1 と結合する足場タンパク質 PDZK1 を介した機能の異なるトランスポーター URAT1 と OAT4 の分子集積・相互作用の解明を目指し FRET 法を利用し、*In vivo* での解析を行った。FRET とは、エネルギー供与体からエネルギー受容体へ蛍光のエネルギーが移動する現象であり、この現象を応用することで細胞内外の生体分子の相互作用を可視化することができる。この技術を培養細胞に用いることで、*In vivo* における分子集積・タンパク質相互作用の解析が可能となると共に相互作用のイメージング化が可能である。また、免疫沈降法を用いて PDZK1 を介した URAT1 と OAT4 の結合を確認した。HEK293 細胞を用いて flag タグを付加した URAT1 と YFP-OAT4 を共発現したものと flag-URAT1 と YFP-OAT4 に加えて PDZK1 を共発現したものの細胞抽出液に GFP (YFP) 抗体を用いて免疫沈降法を行う。この免疫沈降法により精製された YFP-OAT4 結合タンパク質を flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により flag-URAT1 検出し、OAT4 と URAT1 の共沈量を比較した。

(2) 細胞内支持タンパク質 PDZK1 の PDZ 結合のリン酸化による動的制御の解明

URAT1 および OAT4、さらに PDZK1 におけるリン酸化の PDZ 結合に対する効果は不明であるが、PDZ 結合はリガンドの PDZ モチーフの近傍のリン酸化および PDZ タンパク質の PDZ ドメイン内のリン酸化により制御されるという報告がある。そこでリン酸化による PDZ 結合の動的制御を検討した。

①リン酸化による PDZ 結合能への影響の検討。

リン酸化推定部位に、リン酸化を mimic するアスパラギン酸変異を部位指定突然変異法により導入し、酵母 Two-hybrid 法および生化学的な結合実験により、リン酸化変異体における URAT1 と PDZK1 の PDZ 結合能の変化を検討した。

②PDZK1 のリン酸化の検討。

PDZK1 の MBP タグを付加した単一 PDZ ドメインタンパク質を作成し、*In vitro* リン酸化法による PDZK1 の人工的リン酸化法を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎臓における尿酸輸送分子複合体の解明

①尿酸輸送分子複合体の構成因子の解明。

免疫沈降の効率を上げるために flag エピトープタグを繰り返し付加した URAT1 のコンストラクトを作製し、そのコンストラクトをヒト腎由来細胞である HEK293 細胞に安定発現させた。その細胞抽出液に flag 抗体を用いて免疫沈降法を行い、URAT1 複合体を精製・濃縮した。この試料を SDS-PAGE による分離後、LC/MS システムによって URAT1 複合体の構成タンパク質を同定した。その結果、calnexin、heat shock 90kDa protein 1 beta、solute carrier family 3、solute carrier family 1 member 5、organic anion transporter 4 (OAT4) like protein、RIO kinase 1 isoform 1、serine/threonine kinase 38、sel-1 suppressor of lin-12-like、serine palmitoyltransferase subunit 1 isoform a などを同定した。また、アフィニティータグ (flag および HA) の付加した URAT1 をノックインしたマウス腎臓を用いて、上記と同様に、URAT1 複合体の構成タンパク質を同定した結果、PDZ domain containing 1 (PDZK1)、solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter) member 12、solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger) isoform 3 regulator 1、aldolase 2, B isoform、aflatoxin B1 aldehyde reductase 1 が URAT1 の結合タンパク質として得られた。

②PDZK1 を介した分子集積・相互作用の解明。

蛍光タンパク質 CFP を付加した URAT1 と蛍光タンパク質 YFP を付加した OAT4 および PDZK1 のみのコンストラクトを作製した。HEK293 細胞を用いて CFP-URAT1 と YFP-OAT4 を共発現したものと CFP-URAT1 と YFP-OAT4 に加えて PDZK1 を共発現したものの FRET 現象の変化を解析した (図 1)。その結果、CFP-URAT1 と YFP-OAT4 を発現した時 (図 1C) に比べ、PDZK1 を共発現した時 (図 1D) の方が YFP の蛍光強度は有意に増加し、FRET 現象の効率は高い。つまり、PDZK1 発現時に URAT1 と OAT4 は結合することより URAT1 と OAT4 は PDZK1 を介して結合する。通常、CFP を励起させる光を当てると CFP の蛍光が観測されるが、FRET 現象が起こるとその効率に従い YFP の蛍光が観測される。

また、PDZK1 を介した URAT1 と OAT4 の結合を免疫沈降法により検討した。HEK293 細胞を用いて flag-URAT1 と YFP-OAT4 を共発現したものと flag-URAT1 と YFP-OAT4 に加えて PDZK1 を共発現したものの細胞抽出液に GFP (YFP) 抗体を用いて免疫沈降法を行い

YFP-OAT4 結合タンパク質を精製した後、flag 抗体を用いたウエスタンブロッティングより flag-URAT1 検出し、OAT4 と URAT1 の共沈量を比較した (図 2)。その結果、PDZK1 非発現時に比べ PDZK1 共発現時の URAT1 と OAT4 の共沈量は有意に増加した。

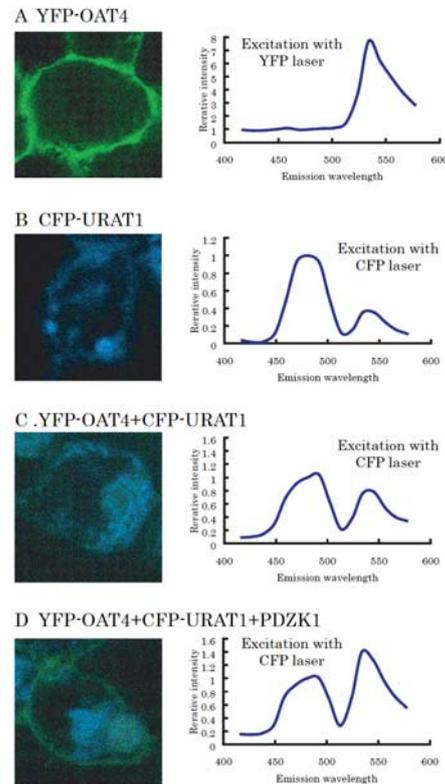


図 1 PDZK1 共発現時における CFP-URAT1 と YFP-OAT4 の FRET 現象の解析

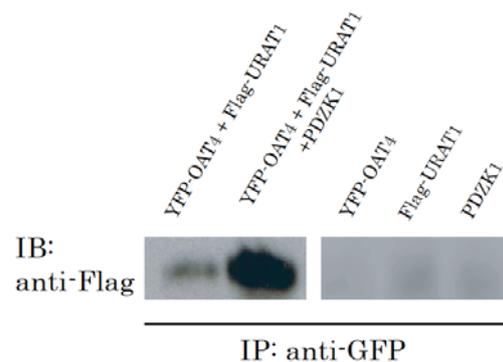


図 2 PDZK1 発現における flag-URAT1 と YFP-OAT4 の共沈量の変化

(2) 細胞内支持タンパク質 PDZK1 の PDZ 結合のリン酸化による動的制御の解明

①リン酸化による PDZ 結合能への影響の検討。

PDZK1 のリン酸化推定部位の 148 残基目セリン、216 残基目スレオニン、446 残基目セ

リンのそれぞれに、リン酸化を mimic するアスパラギン酸変異を部位指定突然変異法により導入し、PDZ ドメインごとに酵母 Two-hybrid 法およびプルダウン法による結合実験により、リン酸化変異体における URAT1 と PDZK1 の PDZ 結合能の変化を検討した。コントロールとしてアラニン置換体も用いた。

酵母 Two-hybrid 法の結果、148 残基目セリンをアスパラギン酸に置換した第 2PDZ ドメインと URAT1 の結合能が消失した(図 3)。また、プルダウン法による結合実験においても同様の結果を得た(図 4)。

Bait	Prey	LEU	GFP
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ2 WT	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ2 S148A	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ2 S148D	-	-
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ2 T216A	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ2 T216D	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ4 WT	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ4 S446A	+	+
hURAT1-wt	hPDZK1 PDZ4 S446D	±	±

図 3 酵母 Two-hybrid 法による URAT1 と PDZK1 置換体の結合確認

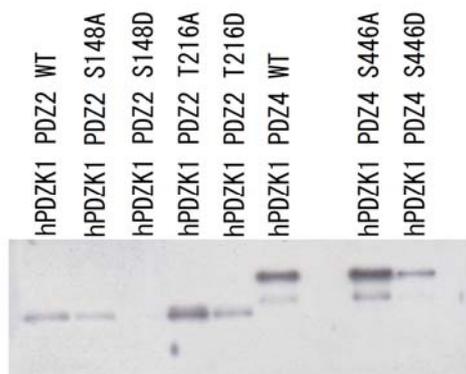


図 4 プルダウン法による URAT1 と PDZK1 置換体の結合確認

②PDZK1 のリン酸化の検討。

PDZK1 の MBP タグを付加した単一 PDZ ドメインタンパク質と全長を作成し、*In vitro* リン酸化法による PDZK1 の人工的リン酸化法を検討した。大腸菌により各試料を発現した後 MBP にてタンパク質精製を行った。リン酸化酵素は PKC、PKA、CK II を用いて、精製した MBP タグ付 PDZK1 および各ドメインを *in vitro* リン酸化法によりリン酸化し、蛍光標識タグによりリン酸化を検出した。PKC および CK II においてリン酸化を示唆するシグナルを得たが、MBP タグもリン酸化されてしまい、詳細な解析が不可能であった。

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 2 件)

① Babu E., Takeda M., Nishida R., Noshiro-Kofuji R., Yoshida M., Ueda S., Fukutomi T., Anzai N., and Endou H. Interactions of human organic anion transporters with aristolochic acids *JPS* (in press)

②安西尚彦、福富俊之、櫻井裕之
特集「アンモニア代謝と酸塩基調節」近位尿細管のグルタミン輸送とアンモニア代謝 腎と透析、(2009) 67: 39-43.

[学会発表] (計 4 件)

①木村徹、塚田愛、Sirirat Amonpatumrat、福富俊之、Promsuk Jutabha、市田公美、河原克雅、金井好克、安西尚彦、櫻井裕之
尿酸輸送機構の解明を目的とした尿酸トランスporter過剰発現マウスの解析
第 83 回日本薬理学会年会、大阪、平成 22 年 3 月 17 日

②Sunena Srivastava, Naohiko Anzai, Seiji Miyachil, Daisaku Miura, Toru Kimura, Toshiyuki Fukutomi, Vadivel Ganapathy2, Hiroyuki Sakurai (1 北海道大・薬, 2Georgia 医科大) (ポスター): PDZK1 is a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12) in human kidney
36th International Congress of Physiological Sciences、京都、平成 21 年 7 月 31 日

③塚田愛、木村徹、福富俊之、Promsuk Jutabha、金井好克、市田公美、安西尚彦、櫻井裕之 (ポスター)
URAT1 セミノックインマウスを用いた尿酸代謝機構の解析、第 4 回トランスporter研究会年会、文京区、平成 21 年 5 月 23 日

④福富俊之、安西尚彦、木村徹、櫻井裕之
尿酸トランスporter-URAT1 と PDZ ドメインタンパク質 PDZK1 との相互作用のリン酸化による動的制御の可能性
トランスporterワークショップ in 鶴岡、山形、平成 20 年 11 月 15 日

[図書] (計 1 件)

①安西尚彦、福富俊之
第 1 章 8) 27. SLC22A12 (URAT1)
薬物トランスporter 最新ライブラリ

一株式会社羊土社（2009） p. 96-98

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福富 俊之 (FUKUTOMI TOSHIYUKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30439187