

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5月31日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790952

研究課題名（和文）新規尿酸排泄トランスポーターNPT4のPDZK1による尿酸輸送制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of urate transport mechanism of a novel urate transporter NPT4 by PDZ Domain Containing 1(PDZK1)

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）：

本研究において、腎臓における尿酸排泄を担う輸送体 NPT4 と細胞内支持タンパク質である PDZK1 の結合およびその様式を明らかにした。また、NPT4 と PDZK1 の両者に結合するタンパク質を同定した。特に、NPT4 と同様に尿酸を輸送する ATP 結合カセットタンパク質 MDR1 と NPT4 および PDZK1 がそれぞれ結合することを明らかにした。これらより、NPT4、PDZK1 および MDR1 は複合体を形成し、尿酸排泄に関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We found that multivalent PDZ-domain protein PDZK1 interacted with NPT4 by Yeast two hybrid assay and immunoprecipitation. The interaction of PDZK1 with NPT4 requires C-terminal PDZ motif of NPT4 and PDZ domain2 of PDZK1. In addition, it is found by proteomic approach that both NPT4 and PDZK1 interact with MDR1. MDR1 belongs to ABC transporter family, and MDR1 transports urate. It suggests that NPT4, PDZK1 and MDR1 to form a complex, and the complex is involved in urate transport.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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：尿酸、尿酸排泄、尿酸トランスポーター、NPT4、PDZK1

1. 研究開始当初の背景

尿酸は、ヒトにおいてアデノシンやグアノシンといった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その近縁の類人猿に特有のものである。高濃度の尿酸は高尿酸血症という病態をもたらし、さまざまな合併症を誘発する。代表的なものには尿酸結晶が関節に沈着して起こされる痛風性関節炎などがある。このほか、腎機能障害を引き起こすことや動脈硬化の危険因子となる。悪性物質として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、尿酸の排泄・

再吸収を行うシステムは生体にとって重要である。血中尿酸値は尿酸の産生と排泄のバランスによって決定されるが、日本における高尿酸血症患者の60%が尿酸排泄低下型、10%が尿酸産生過剰型、30%が混合型である。つまり、高尿酸血症患者の90%が尿酸の排泄機構に異常をきたしていることになる。また、尿酸排泄は70%が腎臓で、残りが腸管で行われていることより、主要排泄器官の腎臓における尿酸排泄の制御機構を明らかにすることは、高尿酸血症の発症機序の解明に非常に重要である。

2. 研究の目的

尿酸の代謝経路はヒトおよび近縁の類人猿

に特有なもので、尿酸はプリン体の最終代謝産物である。腎臓の尿酸排泄低下は高尿酸血症を引き起こし、痛風や腎機能障害などの合併症を誘発する。その為、尿酸排泄機構は生体にとって極めて重要な機構である。最近我々は、オーファントランスポーターのNPT4が腎近位尿管管腔側で尿酸排泄を担い、その機能不全が高尿酸血症を惹起することを明らかにした。腎尿酸排泄の制御機構の解明は、高尿酸血症の発症機序解明およびその治療法の確立に必須である。そこで本研究は、当研究室で新たに見出された尿酸排泄トランスポーターNPT4の機能調節に関わる結合タンパク質を同定し、それに伴う尿酸の排泄制御機構の解明を目的として行った。

これまでに、Yeast two hybrid screeningより、NPT4の結合タンパク質候補として、PDZK1を見出した。PDZK1は細胞内支持タンパク質であり、PDZモチーフを持つトランスポーターの輸送活性に影響を及ぼすことが知られている。NPT4もPDZモチーフを持つことからPDZK1がNPT4の尿酸輸送制御に関与する可能性が高い。そこで、本研究は、高尿酸血症の発症機序の解明につながる腎尿酸排泄トランスポーターNPT4の尿酸の排泄制御機構の解明を目的とし、PDZK1によるNPT4の機能制御の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Yeast two hybrid (Y2H) 法によるNPT4とPDZK1結合確認および結合部位の同定。

BaitにNPT4のPDZモチーフを含むC端とpreyにPDZK1全長のコンストラクトを用いて、Y2H法により結合を検討した。また、PDZK1は4つのPDZドメインを有することから、NPT4がPDZK1の4つのPDZドメインのうちどのドメインと結合するかをY2H法に検討した。preyに各ドメイン(PDZ1, PDZ2, PDZ3, PDZ4)ごとのコンストラクトを用いて、Y2H法により結合を検討した。

(2) 免疫沈降法によるNPT4とPDZK1の結合確認。

腎臓由来の細胞であるHEK細胞とCOS細胞を用いた。細胞を可溶化し、NPT4またはPDZK1抗体により免疫沈降した。沈降物を電気泳動し、PDZK1またはNPT4抗体によりウェスタンブロットを実施し、結合を検討した。

(3) PDZK1によるNPT4輸送機能への影響の検討。

アフリカツメガエルの卵母細胞にNPT4のみを発現したものと、NPT4とPDZK1の両者を発現させたものを用いてNPT4の輸送特性解析を行った。輸送特性解析には、NPT4の基質として腎臓の代表的な有機酸であるパラアミノ馬尿酸の放射性ラベル体を用い

て行い、その取り込んだ放射エネルギーにより検討した。

(4) プロテオミクスによるNPT4およびPDZK1の結合タンパク質の同定

上記(2)と同様に免疫沈降を行い、その沈降物のプロテオーム解析を行った。免疫沈降に用いた抗体は(2)と同様にNPT4とPDZK1の抗体を用いた。得られた沈降物は、消化酵素であるトリプシンにより酵素消化し、HPLCで分離後、質量分析計により質量解析を行った。質量解析の結果を用いて、タンパク質データベースSwiss-Protによりタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) NPT4とPDZK1の結合確認と結合部位の同定。

NPT4とPDZK1の結合を検討する為、NPT4のPDZモチーフを含むC端側(CTwt)とPDZK1の全長を用いてY2H法を行った。加えて、NPT4とPDZK1の結合にPDZモチーフが本当に関与するかを検討するため、NPT4のC端のPDZモチーフ全てをデリベーションしたもの(CTΔ3)、PDZモチーフを決定づけるのに重要なC末端と-2のポジションをアラニンに置換したもの(L498A, T496A)を用いてPDZK1との結合をY2H法により検討した。その結果、野生型のNPT4のC端のみがPDZK1と結合した。(図1.)

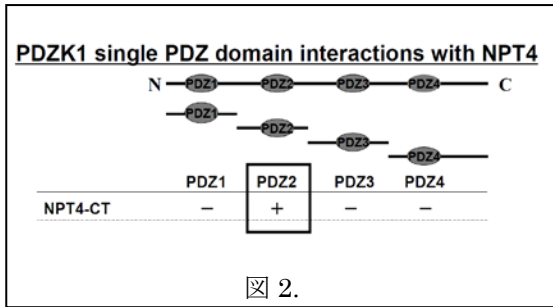
よって、NPT4とPDZK1は結合し、その結合には、NPT4のPDZモチーフが必須である。

Interaction of PDZK1 with NPT4 C-terminal wild type and mutants

	C terminal	LEU	GFP
hNPT4-CTwt	R K L T R L*	+	+
hNPT4-CTΔ3	R K L*	-	-
hNPT4-L498A	R K L T R A*	-	-
hNPT4-T496A	R K L A R L*	-	-

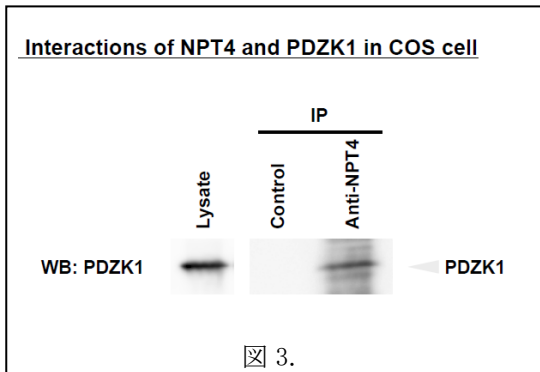
図1.

次に、NPT4がPDZK1の有する4つのPDZドメインのどこに結合するかを検討した。PDZK1の各ドメイン(PDZ1, PDZ2, PDZ3, PDZ4)ごとのコンストラクトと上記のNPT4-CTwtを用いてY2H法により結合を検討した。その結果、NPT4-CTwtは、PDZK1のN端から2つ目のPDZドメイン(PDZ2)とのみ結合することが明らかになった。(図2.)



(2) 免疫沈降法による NPT4 と PDZK1 の結合確認。

NPT4 と PDZK1 の結合確認と結合様式を同定することができたため、次に、実際の細胞中における NPT4 と PDZK1 の結合を検討した。内在的に NPT4 と PDZK1 を発現するサル腎臓由来の COS 細胞を用いて、免疫沈降法により検討した。結果を図 3 に示す。図 3 は、COS 細胞を可溶化し、抗 NPT4 により免疫沈降した後、その沈降物を電気泳動し、抗 PDZK1 を用いてウェスタンブロットを行った結果である。コントロールには、ラビット IgG を用いた。抗 NPT4 の免疫沈降物に PDZK1 が観られることから、細胞中においても NPT4 と PDZK1 の結合を確認することができた。



(3) PDZK1 による NPT4 輸送機能への影響の検討。

NPT4 の機能に対する PDZK1 の影響を検討する為、アフリカツメガエルの卵母細胞に NPT4 のみを発現させたものと NPT4 と PDZK1 の両者を共発現させたものを用いて、パラアミノ馬尿酸の取込量を指標とし、NPT4 の輸送特性解析を行った。NPT4 のみを発現させた条件においても NPT4 と PDZK1 を共発現させた条件においても、NPT4 のパラアミノ馬尿酸の取込量に有意な変化がみられず、輸送特性の有意差は検出できなかった。(data not shown)

(4) プロテオミクスによる NPT4 および PDZK1 の結合タンパク質の同定。

PDZK1 のみでは、NPT4 の輸送特性に有意な

影響を与えなかったため、次に、さらなる分子の関与を検討するため、NPT4 と PDZK1 の両者に結合するタンパク質の同定をプロテオミクスにより行った。抗 NPT4 で免疫沈降したものをトリプシン消化し、HPLC で分離後、on-line にて質量分析を行い、タンパク質データベースを用いて、NPT4 結合タンパク質を同定した。また、PDZK1 結合タンパク質も同様の手法を用いて同定した。次に、同定したタンパク質を比較し、NPT4 および PDZK1 の両者に結合するタンパク質を同定した。同定されたタンパク質の一部を以下の表 1. に示す。特にすべき同定結合タンパク質は、multidrug resistance protein 1 (MDR1) である。MDR1 は、ABC トランスポーターファミリーに属するトランスポーターで、NPT4 と同様に腎臓へ発現し、尿酸を輸送する。

表 1. NPT4-PDZK1 結合タンパク質

- Multidrug resistance protein 1 (MDR1)
- Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
- Myosin-9
- A-kinase anchor protein 8
- ADP/ATP translocase 4
- Transmembrane protease serine 13
- StAR-related lipid transfer protein 3
- Tublin alpha-1A chain
- Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
- Interleukin enhancer-binding factor 2
- Caprin-1
- Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase

e.t.c

以上の結果より、NPT4 と PDZK1 の結合は in-vitro および細胞中において確認することができ、その結合様式も明らかとなった。また、NPT4 および PDZK1 の両者の結合タンパク質として MDR1 を同定することに成功した。このことから、これら三者が、複合体を形成している事が示唆された。また、NPT4 および MDR1 は、尿酸を輸送する機能を有することから、複合体として、尿酸排泄に関与する可能性が示唆された。

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) Kimura T, Amonpatumrat S, Tsukada A, Fukutomi T, Jutabha P, Thammapratipt T, Lee EJ, Ichida K, Anzai N, Sakurai H.

Increased expression of SLC2A9 decreases urate excretion from the kidney. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2011, 30: 1295-1301. 査読有
doi: 10.1080/15257770.2011.628354

(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. 2011, 61: 253-257. 査読有
doi: 10.1007/s12576-011-0136-0

[学会発表] (計3件)

(1) 木村徹、上皮細胞における尿酸輸送と claudin の発現、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日～30 日、横浜市

(2) 塚田愛、胎盤上皮細胞における claudin の発現と尿酸輸送、第 46 回日本痛風・核酸代謝学会総会、2013 年 2 月 14 日～15 日、新宿区

(3) 福富俊之、新規ヒト有機酸排出トランスポーター-NPT4 とPDZタンパク質との相互作用、第 54 回日本腎臓学会学術総会、2011 年 6 月 15 日～17 日、横浜市

[図書] (計0件)

[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

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

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：