

## 論文内容の要旨

Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1  
interacts with the RING finger- and PDZ domain-  
containing protein PDZRN3

ナトリウム依存性モノカルボン酸輸送体 SMCT1 と  
RING フィンガー及び PDZ ドメインを有する PDZRN3 の相互作用

日本医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学分野

大学院生 大塚 裕介

The Journal of Physiological Sciences

2019年 掲載予定



## 【背景・目的】

ナトリウム依存性モノカルボン酸輸送体 SMCT は近位尿細管における乳酸の再吸収を担い、近位尿細管 S1-2 に分布する高効率・低親和性の SMCT2 と S3 に分布する低効率・高親和性の SMCT1 が存在する。SMCT1 の細胞質側の C 末端の 3 塩基・TRL が CLASS1 の PDZ モチーフに該当することから、SMCT1 は PDZ タンパクによる相互作用を受ける可能性がある。我々は既に、SMCT1 の C 末端をベイト、ヒト腎臓の cDNA ライブラリーをプレイとして酵母 two-hybrid 法を施行し、結合蛋白の候補として PDZK1 および PDZRN3 を特定した。さらに PDZK1 については、SMCT1 との結合及び PDZK1 による SMCT1 を介したニコチン酸の取込みを約 1.3 倍に増強することを既に示した。一方、PDZRN3 と SMCT1 の相互作用についての詳細は依然不明である。そこで、今回我々は SMCT1 と PDZRN3 の相互作用について検討した。

## 【方法】

両者の結合については、PDZRN3 及び SMCT1 の野生型 (SMCT1wt) 又は SMCT1 の C 末端の 3 塩基を除去した変異体 (SMCT1d3) を一時的にトランスフェクションした HEK293 細胞を用いて免疫沈降と免疫細胞染色を行った。さらに SMCT1wt の C 末端をベイト、PDZRN3 の PDZ ドメイン 1 および 2 をプレイに用いた酵母 two-hybrid を施行した。機能的変化については、HEK293 細胞に SMCT1wt または SMCT1d3 に PDZK1、PDZRN3 を一時的にトランスフェクションし、トリチウム標識されたニコチン酸の取込み実験を行った。

## 【結果】

免疫沈降では、SMCT1wt と PDZRN3 を一時的に共発現した HEK293 細胞の懸濁液について、PDZRN3 への抗体を用いた免疫沈降物中には SMCT1wt を認め、SMCT1 への抗体を用いた免疫沈降物中には PDZRN3 を認めた。さらに、結合における PDZ モチーフの要否を検討するために、PDZRN3 に SMCT1wt または SMCT1d3 を共発現した場合を比較した。前者では SMCT1 への抗体を用いた免疫沈降物中に PDZRN3 を認めたが、後者では PDZRN3 を認めなかった。

免疫細胞染色では、SMCT1wt と PDZRN3 を HEK293 細胞に共発現し、各々に対する抗体を用いて同時に染色し、共焦点顕微鏡で局在を観察した。SMCT1wt と PDZRN3 は各々細胞膜上に認められ、融合画像で両者の局在は一致した。

SMCT1wt の C 末端 68 塩基をベイト、PDZRN3 の PDZ ドメイン 1 および 2 をプレイとして実施した酵母 two-hybrid 法では、PDZ ドメイン 1 が SMCT1 との結合と認めたが、PDZ ドメイン 2 は結合と認めなかった。

取込み実験では、まず HEK293 細胞に SMCT1wt または SMCT1d3 に PDZRN3 を共発現し、トリチウム標識したニコチン酸の取込みを検討した。SMCT1wt を介したニコチン酸の取込みは PDZRN3 の有無で変化なく、PDZRN3 存在下での SMCT1wt 及び SMCT1d3 を介したニコチン酸の取込みに有意差はなかった。次に、PDZK1 を共発現下での SMCT1wt または SMCT1d3 に PDZRN3 を追加した場合の変化を検討した。SMCT1wt は PDZK1 を共発現時に約 1.3 倍のニ

ニコチン酸取込みを示し、この増加は PDZRN3 を共発現すると減弱した。SMCT1d3 では PDZK1 によるニコチン酸の取込み増加はなく、PDZRN3 追加による変化も認めなかった。

#### 【考察】

本研究では SMCT1 と PDZRN3 の相互作用として、両者の結合と SMCT1 の機能変化について検討した。免疫沈降法と酵母 two-hybrid 法では、SMCT1wt が PDZRN3 と結合することを示した。さらに PDZ モチーフを除去した変異体の SMCT1d3 は PDZRN3 と結合しなかったことから、SMCT1 は PDZ モチーフを介して PDZRN3 と結合していると考えられた。

PDZRN3 のドメイン検索では、PDZRN3 の 2 つの PDZ ドメインのうち PDZ1 のみが SMCT1 と結合を示した。PDZRN3 の PDZ1 のみが相手タンパクと結合を示す他の論文報告もあるが、PDZ ドメインは結合相手により異なることも知られており、さらに詳細な検討が必要である。

取込み実験による機能評価では、SMCT1 を介したニコチン酸取込みは、PDZRN3 の共発現によって変化はなかった。一方で、PDZK1 による SMCT1 を介したニコチン酸の取込み増加に対して PDZRN3 は減弱効果を示した。1 つの蛋白に対して 2 つの PDZ タンパクが競合して機能調整している報告があることから、上記機序として PDZRN3 が PDZK1 と競合して SMCT1 と PDZK1 の相互作用を阻害する可能性が考えられた。

尿酸トランスポーターの URAT1 は SMCT1 と協調して尿酸を再吸収することが知られている。SMCT1 が細胞内に取込むモノカルボン酸が、URAT1 を介して尿酸と逆輸送されることが機序である。PDZRN3 が SMCT1 の機能調整を介して尿酸輸送に関連する可能性も考えられ、今後の研究が待たれる。

#### 【結語】

SMCT1 は PDZ モチーフを介して PDZRN3 と結合し、PDZK1 による SMCT1 を介した取込み増強作用が PDZRN3 によって減弱された。これは SMCT1 と PDZRN3 の相互作用が、SMCT1 と PDZK1 の相互作用を阻害することにより、SMCT1 を介したモノカルボン酸輸送の調整を担うことを示している。