

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

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

Journal of Physiological Sciences, volume 69, number 4, 2019 掲載

DOI: 10.1007/s12576-019-00681-w

腎近位尿細管は尿酸の再吸収部位として重要である。ここでの尿酸の再吸収はナトリウム依存性モノカルボン酸輸送体 (SMCT) によるモノカルボン酸の吸収と共役して行われることから、SMCT の制御をターゲットとした高尿酸血症治療法の開発が行われつつある。一方 SMCT をはじめとした細胞膜蛋白は各種の裏打ち蛋白と共に存在することで細胞膜における安定性を保っている。近位尿細管 S3 に発現するアイソフォームである SMCT1 については、その C 末端に PDZ モチーフというアミノ酸配列があるため、PDZ 蛋白質と呼ばれる裏打ち蛋白質と結合して機能制御を受ける可能性が以前から考えられており、なかでも PDZRN3 および PDZK1 と呼ばれる蛋白質がそれに該当する可能性が報告されていた。本研究は裏打ち蛋白候補のうち PDZRN3 に着目し、SMCT1 が PDZRN3 と結合するか否か、またその結合の変化により機能にも変化が生じるか否かを明らかにした。

研究方法としては、HEK293 細胞に PDZRN3 とともに SMCT1 の野生型又は SMCT1 の C 末端の 3 塩基を除去した変異型をトランスフェクションし、免疫沈降法および免疫細胞染色による検討を行った。また PDZRN3 には結合関わる可能性のある PDZ ドメインが 2 か所あるため、そのどちらと SMCT1 が結合するのかを明らかにするため、更に酵母 two-hybrid 法による検討も併せて行った。一方機能評価として、 H^3 -標識されたニコチン酸を基質として細胞内取り込み実験を行った。

結果として、SMCT1 野生型と PDZRN3 を共発現した細胞懸濁液において PDZRN3 への抗体を用いた免疫沈降物中には SMCT1 を確認し、SMCT1 への抗体を用いた免疫沈降物中には PDZRN3 を確認した。一方 C 末端のない SMCT 変異型を共発現させた場合には、SMCT1 への抗体を用いた免疫沈降物中に PDZRN3 を認めなかった。免疫細胞染色では、野生型と PDZRN3 を共発現させた細胞において共焦点顕微鏡で局在を観察すると、SMCT1 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。更に酵母 two-hybrid

法による検討では、PDZRN3 に存在する PDZ ドメインのうちドメイン 1 のみが SMCT1 との結合を認めた。機能評価実験では、SMCT1 野生型とともに PDZRN3 を導入した細胞におけるニコチン酸の取込みは PDZRN3 を導入しないものと比して有意な変化が見られなかった。しかし SMCT1 野生型にもう一つの裏打ちタンパク質候補である PDZK1 を導入するとニコチン酸取込みが有意に増加し、PDZK1 とともに PDZRN3 を導入すると PDZK1 導入時に見られた増加を抑制した。一方 SMCT1 変異型を導入した場合には PDZK1 共発現により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。以上のことから、SMCT1 はその PDZ モチーフにおいて PDZRN3 のドメイン 1 を介して PDZRN3 と結合すること、さらにこの結合が SMCT1 と PDZK1 の相互作用を阻害することにより SMCT1 の機能調整を担うことをも明らかになった。

本研究は培養細胞系を用いて SMCT1 の裏打ち蛋白が何か、またその生理学的な意義をも明らかにしたという点で新規性がある。SMCT1 の制御が高尿酸血症治療の新しい介入点と考えられているので、PDZRN3 を介した SMCT1 の制御をターゲットとした新しい高尿酸血症治療の可能性をも示している点でも将来性の高い研究と考えられる。

学位論文第 2 次審査では、特に SMCT1 や PDZRN3 の全身での発現を含めた研究の背景、結果の解釈、本研究の限界などを中心に慎重な質疑がなされた。また今後の臨床的な観点からの研究発展性などについても深く討論がなされたが、いずれも的確な回答が得られた。以上のことから本論文は学位論文として価値のあるものと認定した。