

助成番号 0721

新たな PDZ 蛋白質と Na⁺ 依存性乳酸輸送体 SMCTs の結合による 腎尿酸輸送への影響

安西 尚彦, 木村 徹

杏林大学医学部薬理学教室

概要 腎尿細管における尿酸取込みは、間接的に尿細管での Na⁺ 取り込みとリンクするとされる。すなわち Na⁺ 依存性モノカルボン酸取込み機構により細胞内に乳酸およびニコチン酸が蓄積し、その外向きの濃度勾配を利用して、urate/anion exchanger により尿酸が取込まれる。腎尿酸トランスポーター URAT1 は、乳酸等の細胞内アニオンを交換基質として尿酸再吸収を行う。最近乳酸等のモノカルボン酸を Na⁺ 依存性に尿細管に取り込む分子 SMCT1 (Sodium-dependent monocarboxylate transporter 1) が同定された。我々は SMCT1 C 末端が PDZ モチーフを持つことから、腎近位尿細管管腔側膜で、PDZ タンパク質を介して URAT1 と SMCT1 が物理的にリンクされ、尿酸輸送分子群がユニットとして存在し、Na⁺ 依存性尿酸輸送機構の分子実体となる可能性を予測した。そこでソルト・サイエンス研究財団より平成 17 年度に受けた助成金(0524)により、この乳酸を介した「Na⁺ 依存性尿酸輸送分子複合体」の実証を目指し、第一段階として SMCT-PDZK1 結合の解明を前記研究期間内に試みた。

SMCT1 の C 末端配列をベイトとし、ヒト腎臓 cDNA library に対して酵母 Two-hybrid screening を行い、PDZK1 が多数同定されることを確認した。SMCT との結合が PDZK1 第三 PDZ ドメインとの間で生じることから、URAT1-PDZK1-SMCT という三者複合体が形成される可能性を示した。このスクリーニング施行時に我々は同時に RING domain を持つ新規 PDZ タンパク質 PDZRN3 の同定に成功した。PDZRN3 は URAT1-PDZK1-SMCT の三者の複合体により形成される「Na⁺ 依存性尿酸輸送分子複合体」との関連性が示唆された。本研究では乳酸を介した Na⁺ 依存性尿酸輸送機構の解明を最終目的とし、その準備段階として本研究期間内に、SMCT-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響の解明を試みた。

まず SMCT1 C 末端が PDZRN3 の二つの PDZ ドメインのうちどれと結合するかを明らかにするため、単一の PDZ ドメインだけを持つ vector construct を作成し、酵母 Two-hybrid 法を行い、ドメイン 1 と結合することを確認した。続いて腎臓内での局在を確認するため、PDZRN3 N 末端および C 末端に対するペプチドを合成し、これを抗原として用いウサギを免疫して抗 PDZRN3 ポリクローナル抗体を作成した。本抗体を用いた免疫組織化学染色法により、PDZRN3 腎臓内局在の検討を行ったが、ヒト cDNA パネル(Clontech 社)を用いた RT-PCR 法では腎臓を含む広汎な組織に mRNA 発現を認めたものの、腎臓での immunoreactivity は十分には観察されなかった。さらに PDZRN3 発現の SMCT1 輸送活性に及ぼす影響を哺乳類細胞 HEK293 への SMCT1 と PDZRN3 共発現により検討したが、SMCT1 輸送活性に与える影響は観察されなかった。これらのことは PDZRN3 は既存の PDZ タンパク質と性質が異なることを示唆しているものと考えられ、今後のさらなる解析が必要である。

1. 研究目的

ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素を欠損しているため、尿酸は代謝を受けずに腎臓より排泄される。ヒト腎臓では尿酸再吸収に働く urate/anion exchanger の存在により腎尿

酸輸送は再吸収優位となり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高い。そこで尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる¹⁾。申請者らのグループではこれらの病態に関与が推測され

る尿酸トランスポーター(Urate transporter 1: URAT1)遺伝子同定に成功し、これが腎尿細管管腔側膜の *urate/anion exchanger* であり、URAT1 遺伝子変異が特発性腎性低尿酸血症の一因となることを報告した²⁾。同患者の尿中尿酸排泄率は90%以上であるため、腎臓の尿酸再吸収の大部分が URAT1 により行われ、URAT1 は血中尿酸調節に関与すると予測された²⁾。そこで本助成研究者らは URAT1 のC末端配列をベイトとして利用した酵母 Two-hybrid 法をヒト腎臓 cDNA ライブラリーに対して行い、細胞内 PDZ 蛋白質の PDZK1 を同定することに成功した³⁾。PDZK1 は URAT1 C 末端にある PDZ モチーフ(T-Q-F)を介したタンパク質間相互作用により URAT1 と結合すること、また四つある PDZK1 の PDZ ドメインのうちドメイン 1、2、4 と結合することがわかった。URAT1 安定発現細胞に PDZK1 の遺伝子導入を行うと、腎臓の尿酸輸送活性を増加させることが明らかになり、これは PDZK1 の発現により URAT1 の細胞膜上での発現増加を伴ったことから、URAT1 分子の膜上での発現の安定化により、見かけ上の尿酸輸送活性が観察されたものと考えられた³⁾。

腎尿細管における尿酸取り込みは、従来間接的に尿細管での Na⁺ 取り込みとリンクしていることが示されていた⁴⁾。その機序として Na⁺依存性モノカルボン酸取り込み機構により、細胞内に蓄積した乳酸およびニコチン酸外向きの濃度勾配を利用して、尿酸/陰イオン交換輸送体が尿酸を取込むという機能連関が想定されていた。我々の研究グループにより2002年に同定された尿酸/陰イオン交換輸送体 URAT1 による尿酸輸送は、乳酸やニコチン酸などの細胞内の交換基質の外向きの濃度勾配の存在により増強された²⁾。2004年にこの乳酸を Na⁺依存性に尿細管に取り込む新規トランスポーター SMCT (Sodium-dependent monocarboxylate transporter) が同定された⁵⁾。我々は SMCT C 末端が PDZK1 と結合することを酵母 Two-hybrid 法により確認したことより⁶⁾、腎近位尿細管管腔側膜における PDZK1 を介したタンパク質間相互作用による URAT1 と SMCT による尿酸輸送分子複合体がユニットとして存在し、従来から指摘されてきた細胞外液量変動による血中尿酸値変化を説明する Na⁺依存性尿酸輸送機構の解明につながると予測した。そこでソルト・サイエンス研究財団より平成17年度に受けた助成金(0524)により、この乳酸を介した「Na⁺依存性尿酸輸送分子複合体」の実証を目指し、

第一段階として SMCT-PDZK1 結合の解明を前記研究期間内に行った。

SMCT1 の C 末端配列をベイトとし、ヒト腎臓 cDNA library に対して酵母 Two-hybrid screening を行い、PDZK1 が多数同定されることを確認した。SMCT1 との結合が PDZK1 第三 PDZ ドメインとの間で生じることから、URAT1-PDZK1-SMCT1 という三者複合体が形成される可能性を示した。このスクリーニング施行時に我々は同時に RING domain を持つ新規 PDZ タンパク質 PDZRN3 の同定に成功した。PDZRN3 は URAT1-PDZK1-SMCT1 の三者の複合体により形成される「Na⁺依存性尿酸輸送分子複合体」との関連性が示唆された。本研究では乳酸を介した Na⁺依存性尿酸輸送機構の解明を最終目的とし、その準備段階として平成19年度の研究期間内に、SMCT1-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響の解明を試みた。

2. 研究方法

2.1 PDZRN3 と SMCT1 とのタンパク質間相互作用の解析

URAT1/PDZK1/SMCT1 三者により形成される「Na⁺依存性尿酸輸送分子複合体」に対する、新たな PDZ タンパク質 PDZRN3 の影響の解明を目指し、第一段階として SMCT1-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する効果を検討した。

2.1.1 SMCT1-PDZRN3 相互作用の解明

2.1.1.1 SMCT1 C 末端 PDZ モチーフの PDZRN3 結合への意義

SMCT1 C 末端のアミノ酸配列は G-T-R-L であり、Type I PDZ モチーフに分類される。そこでこの最後の3アミノ酸残基の欠損変異体(Δ3)と、2箇所(結合必須アミノ酸)のアラニン置換変異体(T608A, L610A)を作成し、PDZRN3 全長プレイベクターとの結合性を酵母 Two-hybrid assay⁷⁾を用いて検討した。

2.1.1.2 PDZRN3 単一 PDZ ドメインの SMCT1 C 末端との結合プロファイルの解明

本研究では SMCT1 C 末端が PDZRN3 の二つの PDZ ドメインのうちどれと結合するかを明らかにするため、新たに PDZRN3 の単一の PDZ ドメインだけを持つ vector construct を用いて、酵母 Two-hybrid 法により結合ドメイン

を特定した。

2. 1. 1. 3 他の腎近位尿細管管腔側膜トランスポーターと PDZRN3 結合の確認

我々は既に PDZK1 が腎近位尿細管管腔側膜に存在する尿酸トランスポーターの URAT1 および有機酸トランスポーターの OAT4 と結合することを報告している^{3,8)}。そこで、それらの C 末端が PDZK1 の時と同様に URAT1 や OAT4 の C 末端と結合するかどうかを検討した。

2. 1. 2 抗ヒト PDZRN3 抗体の作成

今後行われる免疫組織染色および生化学的実験への利用のため、ヒト PDZRN3 細胞内 N 末端配列および C 末端配列部分のアミノ酸配列の一部を用いて、抗原ペプチドを合成し、それに対するウサギ・ポリクローナル抗体を作成した。

2. 1. 3 PDZRN3 腎臓内局在の確認

PDZRN3 が、URAT1/PDZK1/SMCT1 三者により形成される「Na⁺依存性尿酸輸送分子複合体」に対し、影響することの証明の一つとして、PDZRN3 の同一ネフロンセグメント内共発現を確認するため、ヒト腎臓切片を材料に、抗ヒト PDZRN3 抗体を用いた免疫組織染色⁸⁾を行った。

2. 2 SMCT 遺伝子一過性発現細胞を用いたモノカルボン酸輸送に与える PDZRN3 効果の検討

URAT1 および SMCT など個々の単一遺伝子だけではその概念が確立できなかった、腎近位尿細管の尿酸を介する Na⁺依存性尿酸輸送機構を、URAT1/SMCT 共発現細胞という再構成系を用いて検討することを目的とし、その第一段階として SMCT-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響を解明する。

2. 2. 1 PDZRN3 全長 cDNA 哺乳類発現用ベクターコンストラクト作成

我々は EST クローンを購入し、既に PDZRN3 全長を含むクローンが利用可能であった。そこで同クローンを pcDNA3.1 にサブクローニングし、pcDNA3.1-PDZRN3 コンストラクトを作成した。

2. 2. 2 PDZRN3 overexpression によるモノカルボン酸輸送活性への影響

2. 2. 1 で作成したベクターを Lipofection 法により HEK293 細胞導入する。さらに同時に SMCT1 遺伝子導入を行い、その有無によるモノカルボン酸輸送活性変化を調べる⁹⁾。

3. 研究結果

3. 1 PDZRN3 と SMCT1 とのタンパク質間相互作用の解析

3. 1. 1 SMCT1-PDZRN3 相互作用の解明

3. 1. 1. 1 ヒト SMCT1 C 末端 PDZ モチーフの PDZRN3 結合への意義

ヒト SMCT1 C 末端の最後の 3 アミノ酸残基の欠損変異体(Δ3)、および 2 箇所の結合必須アミノ酸のアラニン置換変異体(T608A, L610A)ベイトと PDZRN3 全長プレイベクターとの結合性の結果を Fig. 1 に示す。

本実験結果で示されたように、C 末端の 3 種の変異体において、PDZRN3 との結合が失われたことから、SMCT1 と PDZRN3 との結合には SMCT C 末端の PDZ モチーフが重要であることが確認された。

3. 1. 1. 2 PDZRN3 単一 PDZ ドメインの SMCT1 C 末端との結合プロファイルの解明

PDZRN3 は二つの PDZ ドメインを持つが、SMCT1 C 末端が PDZRN3 の二つの PDZ ドメインのうちどれと結合するかを明らかにするため、PDZRN3 の単一の PDZ ドメインだけを持つ vector construct を用いて、酵母 Two-hybrid 法を行った。結果を Fig. 2 に示す。

以上の結果より、SMCT1 と PDZRN3 との結合にはその第一 PDZ ドメインが重要であることが確認された。

3. 1. 1. 3 他の腎近位尿細管管腔側膜トランスポーターと PDZRN3 結合の確認

PDZK1 の場合は、SMCT1 だけでなく、尿酸トランスポーターの URAT1 および有機酸トランスポーターの OAT4 と結合することを報告している^{3,8)}。PDZRN3 が、他の二つのトランスポーターと結合するか否かを明らかにするため、URAT1 および OAT4 C 末端配列を持つベイトと PDZRN3 をプレイとした、酵母 Two-hybrid 法を行った。結果を Fig. 3 に示す。

以上の結果より、PDZRN3 は OAT4 とは結合するものの、URAT1 とは直接結合せず、PDZRN3 が尿酸輸送に影響するとしても、それは SMCT1 結合を介した間接的なものであることが示唆された。

3. 1. 2 抗ヒト PDZRN3 抗体の作成

ヒト PDZRN3 細胞内 N 末端配列 ELDRFDGDVDPD LKC (4 - 18) および C 末端配列 HGTKSPDGTRVYNS (1046 - 1059) 部分のアミノ酸配列の一部を用いて、抗原

| | | C terminal | | | | LEU | GFP |
|----------------------|---|------------|---|---|----|-----|-----|
| hSMCT1-CTwt | N | G | T | R | L* | + | + |
| hSMCT1-CT Δ 3 | N | G* | | | | - | - |
| hSMCT1-L610A | N | G | T | R | A* | - | - |
| hSMCT1-T608A | N | G | A | R | L* | - | - |

Fig. 1. Interaction between SMCT1 C-term mutants and PDZRN3

| | | PDZ1 | PDZ2 |
|----------------------|----------|------|------|
| hSMCT1-CTwt | SNG TRL* | + | - |
| hSMCT1-CT Δ 3 | SNG* | - | - |

Fig. 2. Interaction between SMCT1 C-term and PDZRN3 single PDZ domains

| | C terminal | LEU | GFP |
|-------------|----------------|-----|-----|
| hURAT1-CTwt | V L K S T Q F* | - | - |
| hOAT4-CTwt | T V E S T S L* | + | + |

Fig. 3. Interaction of PDZRN3 to URAT1 and OAT4 C-termini

ペプチドを合成し、それに対するウサギ・ポリクローナル抗体を作成した。

3. 1. 3 PDZRN3 腎臓内局在の確認

「Na⁺依存性尿酸輸送分子複合体」を形成する、三つのタンパク質 URAT1/PDZK1/SMCT1 と PDZRN3 が同一ネフロンセグメント内に共発現するか否かを確認するため、ヒト腎臓切片を材料に、抗ヒトPDZRN3抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果を Fig. 4 に示す。

ヒトPDZRN3のN末端に対する抗体では染色性が認め

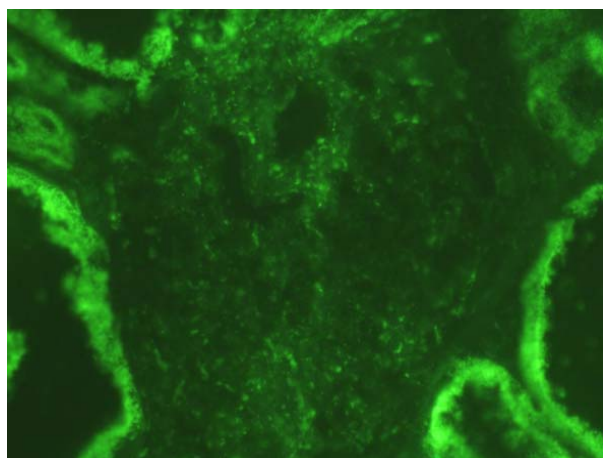


Fig. 4. Intrarenal localization of human PDZRN3

られなかったが、C末を認識する抗体では、Fig. 4 に示すように糸球体陰性で、その周囲の近位尿細管に陽性の所見を認めた。しかしながらその染色性は細胞質に diffuse に認められた。三つのタンパク質 URAT1/PDZK1/SMCT1 が主に局在する管腔側膜ではなかったものの、同一の近位尿細管細胞に PDZRN3 も存在する事が明らかになり、三者複合体と相互作用する可能性が示唆された。

3. 2 SMCT 遺伝子一過性発現細胞を用いたモノカルボン酸輸送に与える PDZRN3 効果の検討

3. 2. 1 PDZRN3 全長 cDNA 哺乳類発現用ベクターコンストラクト作成

購入した EST クローンに含まれる PDZRN3 全長 cDNA 配列を pcDNA3.1 にサブクローニングし、pcDNA3.1-PDZRN3 コンストラクトを作成した。

3. 2. 2 PDZRN3 overexpression によるモノカルボン酸輸送活性への影響

2. 2. 1 で作成したベクターを Lipofection 法により HEK293 細胞導入する。さらに同時に PDZRN3 遺伝子導入を行い、その有無によるモノカルボン酸輸送活性変化を調べる。結果を Fig. 5 に示す

Fig. 5 に示すように、PDZRN3 による SMCT1 輸送活性増加効果は認められなかった。

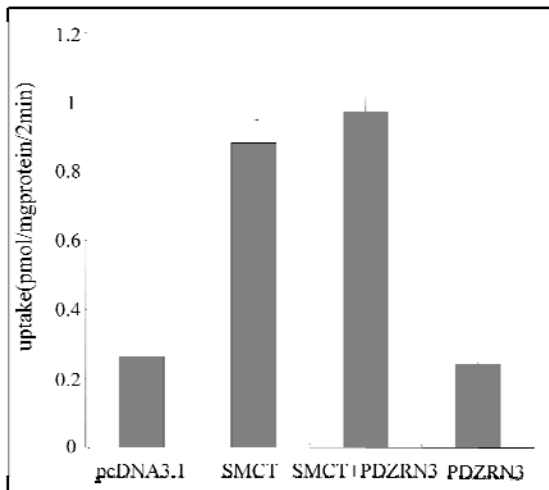


Fig. 5. The effect of PDZRN3 coexpression on transiently-expressed hSMCT1 on HEK293 cells

4. 考察

以前より腎臓における尿酸の取込みは、間接的に尿細管での Na^+ 取り込みとリンクしていることが示されていた⁴⁾。その機序として Na^+ 依存性モノカルボン酸取込み機構により、細胞内に蓄積した乳酸およびニコチン酸外向きの濃度勾配を利用して、尿酸/陰イオン交換輸送体が尿酸を取込むという機能連関が想定されていた。2002年の尿酸/陰イオン交換輸送体 URAT1 の同定²⁾に続く、 Na^+ 依存性モノカルボン酸輸送体 SMCT (Sodium-dependent monocarboxylate transporter) の同定⁵⁾は、 Na^+ 依存性尿酸輸送機構の分子機序の解明に大きな手がかりを与えたと言える。さらに近位尿細管における尿流量を考慮に入れた際に、これら二つのトランスポーター分子が、効率的な機能協間を達成するためには、近位尿細管管腔側膜において機能的に連関するだけでなく、物理的にも近傍に存在している、という仮説のもと行った酵母 Two-hybrid 法で、我々は SMCT C 末端が PDZK1 と結合することを確認した⁶⁾ ことより、腎近位尿細管管腔側膜における PDZK1 を介したタンパク質間相互作用による URAT1 と SMCT による尿酸輸送分子複合体がユニットとして存在することが、 Na^+ 依存性尿酸輸送機構の分子機序であることを着想した (Fig. 6)。そこでソルト・サイエンス研究財団より平成 17 年度に受けた助成金 (0524) により、この乳酸を介した「 Na^+ 依存性尿酸輸送分子複合体」の実証を目指し、第一段階として SMCT-PDZK1 結合の解明を前記研究期間内に行

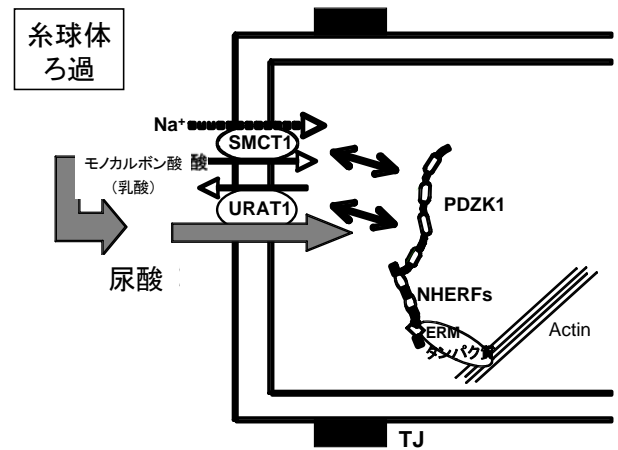


Fig. 6. Model of sodium-dependent urate transport at the apical membrane of the renal proximal tubules

った。その中での成果として、新たな PDZ タンパク質 PDZRN3 が SMCT1 結合タンパク質であることが挙げられる。PDZRN3 は URAT1-PDZK1-SMCT1 の三者の複合体により形成される「 Na^+ 依存性尿酸輸送分子複合体」との関連性が示唆された。それを受けた本研究では乳酸を介した Na^+ 依存性尿酸輸送機構の解明を目指し、その第一段階としての SMCT-PDZRN3 結合のモノカルボン酸輸送に対する影響を解明した。

SMCT-PDZRN3 結合は、SMCT1 C 末端の PDZ モチーフと、PDZRN3 の第一 PDZ ドメインが重要であった (Figs. 1, 2)。興味深いことに、三者複合体 URAT1-PDZK1-SMCT1 を形成し、尿酸輸送の重要分子である URAT1 とは結合しなかった (Fig. 3)。この結果は、三者複合体との関連および PDZRN3 の生理的役割を考える上で重要である。URAT1-PDZK1-SMCT という三者複合体が担う「 Na^+ 依存性尿酸輸送機構」は、尿酸輸送を担う責任分子の URAT1 にダイレクトに PDZ 相互作用が及ぼされる訳ではなく、その調節因子となる乳酸輸送のレベルで制御を受ける可能性を示唆する。すなわち Fig. 7 に示すように、PDZRN3 が SMCT1 C 末端との結合を PDZK1 と競合する中で、PDZK1 との結合がはずれ PDZRN3 と結合すると、細胞内への内在化が起り、細胞膜上に発現する SMCT1 量が減少し、引いてはそれが担っていた乳酸輸送が減少する事で、駆動力の低下から尿酸輸送も低下するのではないかと推察される。それを考慮に入れると、SMCT1 と

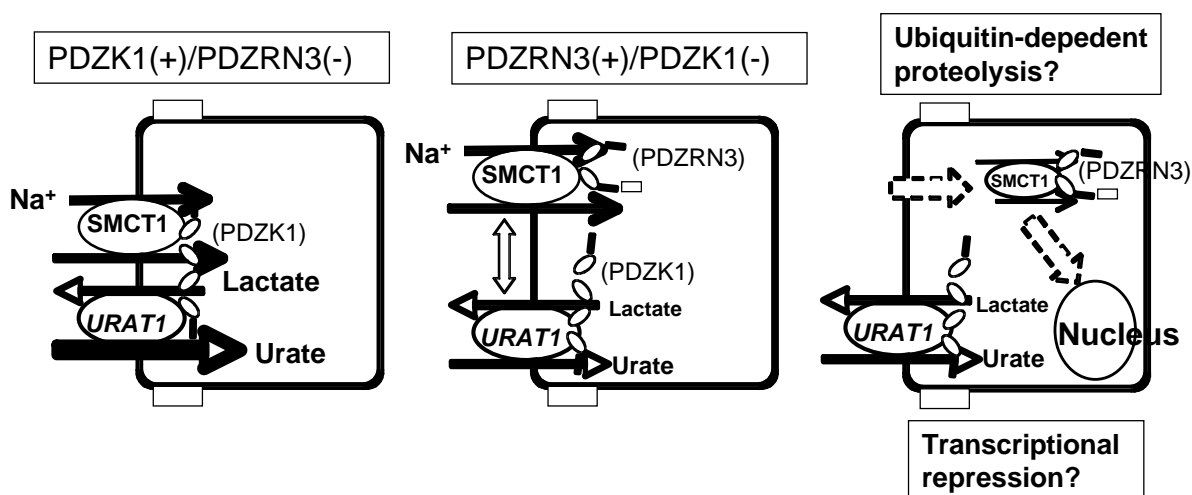


Fig. 7. Role of PDZRN3 in the regulation of sodium-dependent urate transport unit at the apical membrane of the renal proximal tubules

PDZRN3 の結合が、SMCT1 の輸送活性自体に影響しないとしても何ら驚く事にはならない。さらに PDZRN3 と結合した SMCT1 はユビキチン化を受けて分解されるか、あるいは核内に移行して、何らかの遺伝子の転写調節に関与することも考えられる。

この可能性は PDZRN3 のヒト腎臓に対する免疫組織化学染色結果によっても示された (Fig. 4)。腎近位尿細管の特に管腔側膜には尿酸トランスポーター URAT1、PDZ タンパク質の PDZK1、そしてモノカルボン酸トランスポーター SMCT1 が局在していることが明らかになっている。この三者による複合体が形成されるのと同じネフロンセグメントに PDZRN3 があることは、ホルモンや様々な病態時などに上述の現象が生じる可能性を示唆しているのではないかと考えられる。

5. 今後の課題

当初より検討をしながら、実現に至らなかった問題として URAT1/SMCT1 の二重発現細胞を用いた Na⁺依存性尿酸輸送の検討があげられる。以下の二点は今後の検討課題と言える。

1. URAT1/SMCT1/PDZK1 三重発現細胞の樹立

平成 17 年度に受けた助成金 (0524) により、申請者はこれまでに URAT1 と SMCT1 を共発現する HEK293-URAT1/SMCT1 細胞の樹立を行った。この二重発現細胞に pcDNA3.1/Hygro-PDZK1 を Lipofection 法により導入し、

Hygro 耐性を利用して、URAT1/SMCT1/PDZK1 三重発現細胞を樹立する。URAT1/PDZK1/SMCT 三者が共存する安定発現細胞の確立は、次項の PDZRN3 の影響を検討するのみでなく、今後の生理実験への展開を考えた際に重要な課題であると考えられ、今後継続して検討してゆく予定である。

2. PDZRN3 overexpression による Na⁺依存性尿酸輸送の影響

上記 1 項で言及した三重発現細胞に PDZRN3 遺伝子導入を行い、その有無による RI 標識 Na⁺ ないし尿酸輸送活性変化を調べる。更に細胞外に乳酸を添加した状態におけるそれぞれの輸送活性の変化を調べ、URAT1-PDZK1-SMCT1 複合体の制御に関する PDZRN3 の役割の解明を目指す。本共発現細胞株を用いて、今後も複合体の機能的役割の解明を目指してゆくことを予定している。

文献等

- (1) Anzai N, Enomoto A, Endou H.: Renal urate handling: clinical relevance of recent advances. *Curr Rheumatol Rep.* 7(3):227-234, 2005.
- (2) Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H.: Molecular identification of a renal urate anion exchanger

- that regulates blood urate levels. *Nature*. 417 (6887): 447-452, 2002.
- (3) Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H.: The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem*. 279(44): 45942-45950, 2004.
- (4) Roch-Ramel F, Guisan B, Schild L.: Indirect coupling of urate and p-aminohippurate transport to sodium in human brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol*. 270(1 Pt 2):F61-F68, 1996.
- (5) Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V.: Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J Biol Chem*. 279(43): 44522-44532, 2004.
- (6) Anzai N, Jutabha P, Kanai Y, Endou H.: Integrated physiology of proximal tubular organic anion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 14(5):472-479, 2005.
- (7) Anzai N, Deval E, Schaefer L, Friend V, Lazdunski M, Lingueglia E.: The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem*. 277(19): 16655-16661, 2002.
- (8) Miyazaki H, Anzai N, Ekaratanawong S, Sakata T, Shin HJ, Jutabha P, Hirata T, He X, Nonoguchi H, Tomita K, Kanai Y, Endou H.: Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins. *J Am Soc Nephrol*. 16(12): 3498-3506, 2005.
- (9) Anzai N, Miyazaki H, He X, *et al.*: Identification of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate cotransporter 1 (SMCT1) [abstract]. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2006) **17**:753A.

No. 0721

Effect of the Interaction between a Novel PDZ Protein and Na⁺-Dependent Lactate Transporter SMCT1 on Renal Urate Transport

Naohiko Anzai, Toru Kimura

Department of Pharmacology and Toxicology,
Kyorin University School of Medicine

Summary

Urate is the major end product of purine degradation in humans because of the genetic silencing of hepatic oxidative enzyme uricase. The kidney plays a dominant role in urate elimination. Therefore, it is important to understand renal urate handling mechanism because the underexcretion of urate has been implicated in the development of hyperuricemia that leads to gout. In 2002, we identified the urate-anion exchanger URAT1 (*SLC22A12*) in the human kidney and found that defects in *SLC22A12* lead to idiopathic renal hypouricemia. URAT1 is targeted by uricosuric and antiuricosuric agents that affect urate excretion. Using yeast two-hybrid approach, we identified the multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 as an apparent partner of URAT1 in the kidney. Co-expression experiments demonstrated that URAT1 transport activities are increased by PDZK1/URAT1 interactions. In 2004, Ganapathy and his colleagues identified that SLC5A8 is a sodium-coupled monocarboxylate transporter1 (SMCT1). Through the Na⁺-coupled reabsorption of lactate, the counterion for URAT1, the modulation of SMCT function may affect the URAT1-mediated urate transport. Because we found that SMCT1 C-terminal that has PDZ motif binds to PDZK1, physical coupling between URAT1 and SMCT via PDZK1 forms a single functional complex and mediates Na⁺-dependent reabsorption of urate in the renal proximal tubules. In this study, we characterized the interaction of a novel PDZ protein PDZRN3 with SMCT1 in the yeast two-hybrid system. Localization of PDZRN3 was detected at the cytoplasmic region of the proximal tubules in human kidney. The association of hSMCT1 with PDZRN3 did not enhance SMCT1-mediated [³H] nicotinate transport activity in HEK293 cells. Based on these results, we speculate that the interaction of PDZRN2 with SMCT1 is involved in the regulation of Na⁺-dependent urate transport.