

血中短鎖脂肪酸濃度を決定する 肝細胞膜の短鎖脂肪酸輸送分子制御機構の解明

福 富 俊 之

杏林大学医学部薬理学

【背景と目的】

短鎖脂肪酸は、ヒトの体内では合成されず腸内細菌による植物繊維成分の分解によって生成される。生成された短鎖脂肪酸の99%以上は大腸粘膜細胞により取込まれ、同細胞の生理機能維持に重要な役割を果たし、同時にエネルギー源として大量に消費されることが知られている。さらに、吸収された一部が門脈系に入り、肝臓へと達する。そのうち90%以上は肝臓に取込まれ分解され、残りが血中に向かう。従って、肝臓における短鎖脂肪酸の取込みが血中の短鎖脂肪酸の濃度決定に重要である。血中短鎖脂肪酸は、全身諸臓器におけるエネルギー源の維持や成長、脂肪合成に重要な役割を果たしている。さらに最近これらの短鎖脂肪酸は、シグナル分子としての役割や血中コレステロールへの関与も示唆され、注目されるようになった。このように、血中の短鎖脂肪酸濃度は生体にとって極めて重要であり、その調節機構を明らかにすることは、生理現象や高脂血症などの疾患の分子基盤の理解に非常に有用である。これまでに当研究室では、ヒト肝臓特異的に発現し、肝細胞血管側膜上に存在する短鎖脂肪酸、特に酪酸を輸送する新規有機酸トランスporter OAT7の分子同定に成功している。しかしながら、現在までにその調節機構は未だ不明である。いくつかの有機酸トランスporterの輸送機能制御には、相互作用タンパク質が関与し、輸送機能発現に重要である。最近、我々はOAT7の相互作用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porterの輸送活性に影響を及ぼす。OAT7もPDZモチーフを持つことからPDZK1がOAT7の輸送活性に影響を及ぼす可能性が高い。そこで、本研究は短鎖脂肪酸の肝臓における取込み調節機構の解明を目指し、PDZK1によるOAT7の

機能調節機構の解明を目的として研究を行った。

【方法】

- (1) OAT7とPDZK1の結合検討および結合部位の同定
OAT7の細胞内C末端配列をbaitとし、PDZK1全長およびドメイン毎の配列をpreyとして、Y2H法により結合確認と結合部位の同定を行った。同時に、同じOATファミリーである他のトランスporter (OAT1, OAT2, OAT3そしてOAT4)のC末端をbaitとしてPDZK1との結合を同様の方法により検討した。さらに、ヒト肝細胞由来Huh7細胞を用いた共免疫沈降法により、細胞中におけるOAT7とPDZK1の相互作用を検討した。
- (2) PDZK1によるOAT7の輸送機能調節の検討

アフリカツメガエル卵母細胞系(oocyte)を用いてPDZK1を共発現した時とsiRNAを用いてHuh7細胞の内在性のPDZK1遺伝子ノックダウンした時のOAT7の輸送活性の変化を検討した。輸送活性は、有機酸トランスporterの代表的基質であるエストロン硫酸の取込量を指標とした。

【結果および考察】

- (1) 結合および結合部位の検討

OATファミリーとPDZK1の結合をY2H法により検討した。baitに用いた配列とY2H法の結果を図1に示す。PDZK1との相互作用はOAT4およびOAT7に確認された。これらのトランスporterは共にC末端にPDZモチーフを持ち、相互作用が確認されなかったトランスporterはPDZモチーフを持たないことから、PDZK1との結合にはPDZモチーフが関与することが示唆された。さらに、PDZK1の各ドメイン配列をpreyとして、OAT7との相互作用をY2H法により検討した結果、PDZK1の3番目のPDZドメインとのみ結合が確認された。よって、OAT7とPDZK1の相互作用には、OAT7の

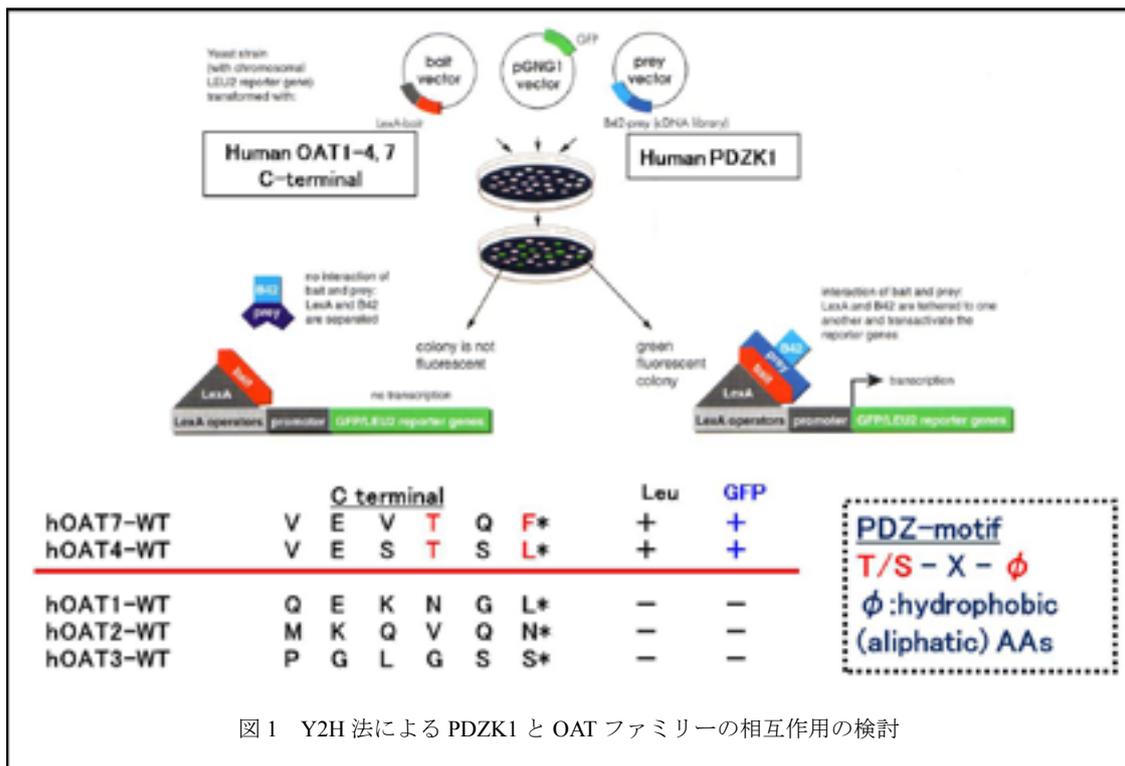


図1 Y2H法によるPDZK1とOATファミリーの相互作用の検討

PDZモチーフとPDZK1の3番目のPDZドメインが大きく関与し、それらの部位が直接結合する可能性を強く示唆した。加えて、OAT7のPDZK1の相互作用は、免疫沈降法により、Huh7細胞中でも確認された。

(2) 輸送機能調節の検討

PDZK1によるOAT7の輸送活性への影響を検討した。oocyteにOAT7を単独発現した時とOAT7とPDZK1を共発現した時のOAT7の輸送機能を検討した結果、OAT7単独発現に対して、PDZK1を共発現することにより、有意にエストロン硫酸の取込量が減少した。また、Huh7細胞中の内在性PDZK1遺伝子をノックダウンすることにより、Huh7細胞のエストロン硫酸の取込量の有意な上昇がみられた。現在検討中ではあるが、PDZK1の発現に応じて、エストロン硫酸の取込量が変化した機序を解明するため、細胞膜上のOAT7の発現量を cell surface biotinylation を行い検討した。Huh7細胞において、

PDZK1を過剰発現することにより細胞膜上OAT7の発現は減少し、PDZK1遺伝子をノックダウンすることにより細胞膜上OAT7の発現が増加した。

以上の結果から、酪酸輸送を担うOAT7の輸送機能は、PDZK1による細胞膜上のOAT7の発現量を通じて、調節される可能性が示唆された。

List of publications

- Kimura T, Amonpatumrat S, Tsukada A, Fukutomi T, Jutabha P, Thammapatip T, Lee EJ, Ichida K, Anzai N, Sakurai H. Increased expression of SLC2A9 decreases urate excretion from the kidney. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011 Dec;30(12):1295-301.
- 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 May;61(3):253-7. Epub 2011 Feb 25.