

平成 22 年 03 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790594
 研究課題名 (和文) 腎におけるリン酸輸送担体 Npt2a 依存的な新規ビタミン D 代謝調節機構の解明
 研究課題名 (英文) The novel mechanism of the phosphate transporter Npt2a dependent regulation of vitamin D homeostasis in kidney
 研究代表者
 山本 浩範 (YAMAMOTO HIRONORI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：60314861

研究成果の概要 (和文)：本研究では、腎における甲状腺ホルモン T3 による新規ビタミン D 代謝調節の分子機構を解析した。T3 によるビタミン D 合成酵素 Cyp27b1 発現の抑制には甲状腺ホルモン受容体 beta1 および VDIR が重要であるが、VDR および Klotho は必須ではないこと、さらに、Npt2a 欠損マウスを用いた研究において T3 依存的 Cyp27b1 発現抑制機構にはリン酸輸送担体 Npt2a が重要な役割をしていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanism of new regulation of vitamin D metabolism by thyroid hormone T3 in kidney. We demonstrated that thyroid hormone receptor beta1 and VDIR is important factor for the T3-dependent repression of the vitamin D synthesis enzyme Cyp27b1 gene. And, we found that the neither VDR nor Klotho was essential to the Cyp27b1 gene control by T3, furthermore, we demonstrated that the phosphate transporter Npt2a gene play a critical role for the T3-dependent renal Cyp27b1 gene repression using the Npt2a deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,310,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	990,000	4,490,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：腎臓内科学
 キーワード：水・電解質代謝学

1. 研究開始当初の背景
 慢性腎不全および長期透析患者においては血清無機リン (以下、リン) および活性型ビタミン D (1,25(OH)₂D₃) のコントロールは、腎不全病態の進行の阻止および治療を考え

る上できわめて重要である。リンは生体内において骨石灰化だけでなく、ATP 基質としてエネルギー代謝、酸性イオンとして酸塩基平衡など重要な役割を果たしている。その生体リン恒常性維持には腎近位尿細管の IIa 型ナ

トリウム依存性リン酸輸送担体 (Npt2a) が最も重要である。一方、1,25(OH)₂D₃ は、カルシウム、リン代謝および骨代謝を調節する脂溶性ホルモンであり、Npt2a 同様、腎近位尿細管でビタミン D 合成酵素 (Cyp27b1) により合成される。興味深いことに、近年、エネルギーおよびコレステロール代謝調節因子である甲状腺ホルモン (T₃) の血清濃度が慢性腎不全患者において低下していること、甲状腺機能亢進症 (バセドウ病) 患者において血清リン濃度および FGF-23 濃度の上昇、そして 1,25(OH)₂D₃ 濃度の低下が報告された。既に我々は、T₃ は Npt2a 遺伝子プロモーターを活性化することで、Npt2a 発現を促進し、血中リン濃度を上昇させることを明らかにした。しかしながら、Npt2a 依存的な Cyp27b1 発現制御に関わるリン応答性調節因子群および、それらの活性化シグナル経路については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、腎におけるリン酸輸送担体 Npt2a 依存的な新規ビタミン D 代謝調節機構を解明することを目的とする。既に、T₃ 投与による腎 Npt2a 発現促進および Cyp27b1 発現抑制には FGF-23 非依存的であることを確認している。また、腎近位尿細管細胞において Npt2a を介した細胞内へのリン流入が Cyp27b1 遺伝子プロモーター活性に影響を与えることを見出している。そこで、我々独自の Cyp27b1 転写活性評価システムを用いてリン応答性転写因子群を同定し、新たなビタミン D 代謝調節の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

1) ヒト Npt2a 発現ベクターおよびヒトおよびマウス Cyp27b1 遺伝子転写調節領域を有するルシフェラーゼリポーターベクターを最もリン代謝研究に活用され、またリン応答性を示すとされているフクロネズミ由来腎近位尿細管細胞株 (OK-P 細胞) に導入しリンによる転写応答を検出する。さらにデリーション解析により Cyp27b1 転写活性の抑制に必須なリン応答エレメントを同定する。

2) 同定した Cyp27b1 遺伝子のリン応答配列を含む合成 DNA 断片をビオチン化し、OK-P 細胞より抽出した核蛋白質と反応させ、アビジンビーズを用いて応答配列に結合する因子群の精製を行う。その際、コア配列に変異導入した変異 DNA 断片を用いて非特異的因子を除去することにより特異的結合タンパク質を得る。また、精製タンパク質中に既知の転写抑制関連因子 HDAC や NCoR などの存在をウエスタン法により確認する。

3) ビオチン化 DNA を用いて精製したタンパ

ク質画分をそれぞれディファレンシャル 2 次元 (2D)-電気泳動で分離し、銀染色法にて染色後、得られたスポットのパターンをゲル解析ソフトで分析し、それらスポットについて LC-MS/MS 解析にて分子を同定する。

4. 研究成果

これまでに我々は、甲状腺ホルモン (T₃) 投与による血中リン濃度の上昇は、腎ビタミン D 合成酵素 (Cyp27b1) 遺伝子の発現量および血中 1,25(OH)₂D₃ 濃度を低下させることを見出した。ビタミン D 受容体 VDR 欠損マウスおよび Klotho 変異マウスで見られる Cyp27b1 発現上昇は T₃ 投与により低下することを明らかにし、腎における T₃ による Cyp27b1 発現抑制には VDR および Klotho は必須ではないことを見出した。また、ルシフェラーゼ法を用いて T₃ による CYP27b1 遺伝子転写調節の作用機構を検討した結果、T₃ はプロモーター上の活性型ビタミン D による負の抑制領域 (nVDRE) に bHLH 型転写因子 VDR および甲状腺ホルモン受容体 TR-beta1 を介して作用することを見出した。興味深いことに、Npt2a 欠損マウスにおいては、T₃ 依存的な Cyp27b1 発現抑制が見られなかった。このことから、T₃ 依存的 Cyp27b1 発現抑制機構には Npt2a が重要な役割をしていることが明らかになった。さらに、T₃ 依存的 Cyp27b1 発現抑制機構には、クロマチンの脱アセチル化およびメチル化が関与することから、Npt2a を介した細胞内へのリン酸の流入は、クロマチン修飾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 5 件)

① Ishiguro M, Yamamoto H, Masuda M, Kozai M, Takei Y, Tanaka S, Sato T, Segawa H, Taketani Y, Arai H, Miyamoto K, Takeda E. Thyroid hormones regulate phosphate homeostasis through transcriptional control of the renal type IIa sodium-dependent phosphate co-transporter (Npt2a) gene. *Biochem J.* 427(1):161-9. 2010 査読有

② Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y, Nakaya Y, Takeda E. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *J Am Soc Nephrol.* 20(7):1504-12. 2009 査読有

③ Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S,

Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Rokutan K. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. *Free Radic Biol Med.* 47(2):189-99. 2009 査読有

④ Uebanso T, Taketani Y, Fukaya M, Sato K, Takei Y, Sato T, Sawada N, Amo K, Harada N, Arai H, Yamamoto H, Takeda E. Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed obese rats via two pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(1):E76-84. 2009 査読有

⑤ Tsuji M, Yamamoto H, Sato T, Mizuha Y, Kawai Y, Taketani Y, Kato S, Terao J, Inakuma T, Takeda E. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab.* 27(6):673-81. 2009 査読有

〔学会発表〕(計7件)

① 中橋乙起、山本浩範、田中更紗、菊地浩子、金子一郎、竹谷豊、宮本賢一、加藤茂明、武田英二 食餌性リン制限および活性型ビタミンD3によるFibroblast growth factor 15 遺伝子の発現調節、第32回日本分子生物学会、平成21年12月9-12日、横浜

② 増田真志、山本浩範、田中更紗、香西美奈、竹井 悠一郎、竹谷豊、宮本賢一、武田英二 レチノイン酸受容体アイソフォーム (RARs) によるナトリウム依存性リントランスporter遺伝子の異なる転写調節を介した小腸と腎臓でのリン恒常性維持機構、第32回日本分子生物学会、平成21年12月9-12日、横浜

③ Taketani Y, Shuto E, Shiota A, Tanimura A, Watari E, Kitamura T, Yamamoto H, Takeda E. Dual Role of Type III Sodium-Dependent Phosphate Transporter in the Pathogenesis of Arteriosclerosis Caused by Hyperphosphatemia. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 平成21年9月11-15日 Denver, Colorado, USA

④ Masuda M, Yamamoto H, Tanaka S, Kozai M, Takei Y, Taketani Y, Miyamoto K, Takeda E. All-trans retinoic acid regulate phosphate homeostasis through transcriptional control of the renal type

II sodium-dependent phosphate co-transporter (Npt2a and Npt2c) genes. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)、平成21年9月11-15日、Denver, Colorado, USA

⑤ Takei Y, Yamamoto H, Nguyen Trong Hung, Masuda M, Taketani Y, Takeda E. Different Regulation of the Stanniocalcin Family (STC1 and STC2) Gene Expression by Parathyroid Hormone in the Renal Proximal Tubular Cells. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)、平成21年9月11-15日、Denver, Colorado, USA

⑥ 香西美奈、山本浩範、竹井悠一郎、金子一郎、竹谷豊、宮本賢一、加藤茂明、武田英二 甲状腺ホルモン受容体β1を介したビタミンD合成酵素(CYP27b1)遺伝子の転写抑制機構、第61回日本ビタミン学会、平成21年5月30-31日京都

⑦ 香西美奈、山本浩範、増田真志、田中更紗、竹谷豊、宮本賢一、加藤茂明、武田英二 ビタミンD一位水酸化酵素遺伝子(CYP27b1)の甲状腺ホルモン受容体β1を介した転写抑制機構 第63回日本栄養・食糧学会大会、平成21年5月20-22日 長崎

〔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

山本 浩範 (YAMAMOTO HIRONORI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：60314861

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者