

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号： 16101  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23650480  
 研究課題名（和文）食事組成の科学的根拠を提示する栄養素に対するトランスセプターの同定  
 研究課題名（英文）Nutrient transceptor; gate keepers of regulators of nutrient signaling  
 研究代表者 宮本 賢一（MIYAMOTO KENICHI）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
 研究者番号： 70174208

### 研究成果の概要（和文）：

トランスポーター機能と栄養素レセプターの機能を併せ持つトランスセプターの発見から、これらの分子ファミリーの重要性が議論されている。本研究では、カルシウム／リン比を認識するトランスセプター（XPR1 あるいは SLC34A3）の機能を検討した。その結果、XPR1 は細胞外のカルシウム／リンに応答して、cAMP シグナルを変化させる G 蛋白として機能していた。

### 研究成果の概要（英文）：

The discovery of transporter-related receptors, now called transceptors, has raised interesting questions with respect to their functions. In the present study, we investigated whether XPR1 and SLC34A3 functions as calcium/inorganic phosphate transceptor in mammalian cells. Our results indicate that XPR1 is a novel transceptor and that XPR1 participates in G-protein-mediated cAMP signaling.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：カルシウム、リン、トランスセプター、破骨細胞、栄養、腎臓

#### 1. 研究開始当初の背景

食事から摂取した栄養素は消化吸収を受け、単一栄養素として生体内に吸収される。これらには、栄養素の消化に関与する各種消化酵素および、腸管での吸収を経て、各臓器で代謝あるいはプールが制御されて循環中に運ばれて目的臓器で利用され、その後、肝臓および腎臓にて排泄系で処理される。これらの過程において栄養素を細胞内に取り込むトランスポーターの役割は、生体に必須であり、生物が栄養を利用する上で重要な位置を占める。1990年頃より、栄養素トランスポーター／チャンネルの同定が次々に行われ、さらに遺伝病の解明や遺伝子改変

動物を用いた研究も加わり、栄養代謝における栄養素吸収の考え方がトランスポーターの科学的な重要性と合わさり理解されるようになった。一方で各種栄養素に対するセンサーとして G 蛋白結合受容体（GPCR）が次々に発見され、栄養素自身を感受するセンサーとしての役割を各種細胞が有する事で、細胞外の栄養素の状態を認識できる機構が明らかにされた。このように、栄養素は体内に取り込まれた後、消化吸収を受け、さらに循環中に移行後、トランスポーターや GPCR センサーの働きで、栄養素の情報を感知する機構が備わっていると考えられる。しかしながら、栄養センサーと栄養素ト

ランスポーターは異なる分子であり、ある特殊な条件でのみリンクし、通常は独自に機能していると考えられている。日常、我々は食事として栄養素を摂取している。多くの、栄養素が集団で細胞内に流入し、さらには代謝を受け、その後、細胞機能に対応して合目的な利用が行われる。それ故に、特定の栄養素の利用状況をモニターしながら、細胞内に栄養素を取り込む分子の存在が想定されていた。つまり、ある細胞で特定栄養素が過剰な場合には、代謝系をモニターでき、同時に不足している栄養素を細胞内に取り込む分子である。この分子本体の機能は、トランスポーターとレセプター機能を同時に兼ね備えた、トランセプターという分類に整理できる。

## 2. 研究の目的

トランスポーター機能と栄養素レセプターの機能を併せ持つトランセプターの発見から、これらの分子ファミリーは栄養素吸収率と体内代謝をモニターできる重要な因子と想定されている。よって、ヒトにおける栄養素トランセプターの同定は、食事組成を考える上で非常に重要なテーマである。本研究では、食事に含まれるカルシウム／リン比をモニターできる、ミネラルトランセプター (XPR1 あるいは SLC34A3) の生理機能を明らかにし、成長や骨代謝に必要なカルシウム／リン比を算出する科学的な分子基盤を提示する事を目標とする。

## 3. 研究の方法

XPR1 は、マウス白血病ウイルスレセプターとして同定されており、リン代謝に関与する SPX (Suppressor of Yeast gpa1, the yeast Phosphatase 81, XPR1) ドメインをもっている。XPR1 自体は輸送能をもたず、8 回膜貫通型で G タンパク質共役レセプター (GPCRs: G protein-coupled receptors) のシグナルに関与している。このような特性を利用して、細胞外イオンに対する XPR1 からのシグナル解析を行なう。また XPR1 のアミノ酸配列は相同性が高く、動植物に高いレベルで保存されている事を利用して、遺伝子ホモログの存在を調べる。遺伝子改変や、細胞発現を用いて、XPR1 機能の細胞外カルシウム／リン感受機構を調べる。また、破骨細胞を用いて XPR1 機能の解析を行なう。最後に、XPR1 の組織局在を明らかにすることで、各臓器における XPR1 の発現と局在を検討する。

## 4. 研究成果

**野生型マウス臓器別 XPR1 mRNA 発現検討** 野生型マウスの各臓器 cDNA を用いて XPR1 mRNA 発現を RT-PCR で検討した。脳、唾液腺、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓、消化管、精巣、卵巣、骨格筋、大腿

骨で XPR1 mRNA 発現が確認された。さらに real time PCR で XPR1 mRNA 発現量の検討を行ったところ、特に肺、舌下腺および精巣に多く、次いで脾臓、顎下線、耳下腺、胸腺、卵巣、骨格筋、大腿骨に多く発現していることが確認された。脳においては、視床下部で最も多く mRNA 発現がみられ、次いで脳幹、大脳皮質、線条体で多く発現が確認された。

**XPR1 タンパク質発現検討** CHO-K1 細胞に Halo-Tag 融合した XPR1 を強制発現させ、タンパク質発現を検討した。Halo-Tag 抗体を用いて Western Blot 解析を行ったところ、強制発現させた細胞のみで 90 kDa 付近にタンパク質発現が確認された。また、XPR1 抗体で解析を行ったところ、強制発現させていない細胞では CHO-K1 細胞内因性の XPR1 タンパク質発現が確認され、強制発現させた細胞ではより多くの XPR1 タンパク質発現が 90 kDa 付近に見られた。さらに、XPR1 を強制発現させた細胞では、cAMP シグナルの増強が確認された。また、細胞外カルシウム／リン比を変化させた場合に、cAMP シグナルは、有意に影響を受けた。一方で、野生型マウスの脾臓、腎臓、肝臓、小腸、顎下線、精巣、脳からマイクロゾーム画分を精製し、XPR1 タンパク質発現を Western Blot によって解析した。mRNA 発現と同様に、各臓器でタンパク質発現がみられ、特に脾臓、腎臓、小腸、脳で高い発現が確認された。

## 腎臓、唾液腺における XPR1 局在

腎臓、唾液腺での XPR1 の局在を免疫組織化学染色と免疫組織化学染色で検討した。腎臓近位尿細管、唾液腺導管では管腔側、腎臓集合管、唾液腺腺房細胞では血管側に XPR1 の発現が確認された。またデータには示していないが、小腸の XPR1 の局在を免疫組織化学染色で検討した。小腸上部の刷子縁膜では管腔側に、小腸下部の刷子縁膜では血管側に XPR1 の発現が確認された。

## 腎尿細管における XPR1 局在と mRNA 発現

免疫組織化学染色において、腎臓近位尿細管と唾液腺導管では管腔側、腎臓集合管と唾液腺腺房細胞では血液側の膜上皮に XPR1 の発現を確認した。腎臓では Npt2a、Npt2c (SLC34A3)、Pit-2 が近位尿細管刷子縁膜上に、唾液腺では Npt2b が導管管腔膜上に発現し、リン吸収及び再吸収を行っていることが報告されている。このことから、XPR1 は各臓器の管腔側もしくは血液側に発現し、Npt2a、Npt2b、Npt2c や Pit-2 と同様に、リン吸収及び再吸収に関与して

いる可能性が示唆された。しかしながら、XPR1 自体は輸送能をもっておらず、GPCR のシグナルに関与していることが報告されていることから、XPR1 自身が直接リン輸送に関与しているのではなく、管腔側もしくは細胞内のリンを感知するセンサーとして働いている可能性が考えられた。

#### カルシウム／リン食事負荷時における XPR1 の変動

XPR1 が、カルシウム／リン比を認識して、各種変動を引き起こす引き金を演じている可能性を検討する目的で、腎臓における XPR1 の局在および発現変動に関して、検討を加えた。リン含量を増加させた食事を長期間摂取された場合には、膜発現および遺伝子量の低下が観察された。一方、高カルシウム食では、XPR1 の変動は観察されなかった。

#### XPR1 ノックアウト (XPR1-KO)マウスの解析

XPR1-KO マウスのコンストラクトを作製し、遺伝子改変マウスの作製を準備していた。しかしながら、XPR1-KO マウスは、すでに米国企業において作製されており、我々はそれらのマウスの表現型を調べた。しかしながら、XPR1-KO マウスは胎生致死を示し、十分な解析を行なう事ができなかった。そこで、Cre-loxP システムを用いた臓器特異的な遺伝子改変マウスを準備することで、各臓器における XPR1 の生理学的な役割を調べている。

#### 破骨細胞における XPR1 遺伝子機能の役割

破骨細胞は骨を吸収時に、骨を溶解するために、細胞外で高濃度のカルシウム／リンに暴露され、それらを、非常に効率よく、細胞内に取り込み、経細胞内輸送を経て細胞外に排泄する機能を有している。我々は、このような機序が、RAW 細胞を RANKL で刺激した際に、誘導される複数の遺伝子に依存する事を見出した。その候補の1つが XPR1 であり、XPR1 遺伝子発現を siRNA で抑制すると、明らかに分化抑制とリン排泄が低下した。また、リン取り込みおよび排泄能は細胞外 pH に依存しており、酸性下では、著しいリン排泄の亢進が観察された。一方で、細胞外カルシウム／リン比を、それぞれ変化させた場合には、リン排泄能は、著しく変化した。以上より、破骨細胞 XPR1 は、細胞外カルシウム／リンを認識するトランスポーターとしての機能を有している可能性が示唆された。

#### SLC34A3 におけるトランスポーターとして

の機能 SLC34A3 ノックアウトマウスを作製して、カルシウム／リン比の認識機序に関する実験を行なった。SLC34A3 は常染色体性家族性低リン血症性クル病 (HHRH) の患者の原因遺伝子である。本疾患は、腎尿管におけるリン排泄亢進により引き起こされるリン利尿を引き金に、骨のクル病様所見を示し、リン負荷による応答異常があり、また血中活性型ビタミン D の上昇が見られる低リン血症である。一方、SLC34A3-KO マウスでは、リン代謝には異常が無く、カルシウム代謝に異常が観察された。さらに、これまで、報告されている HHRH 遺伝子変異とカルシウム／リン輸送における影響について検討を加えた。HHRH 患者に見られる変異部位は広く分布し、228 番目 c 塩基欠損 (c228 deletion、第一膜貫通ドメイン) により C 末側の異なった蛋白質が生じる変異 (homo、重篤)、第1細胞内ループの137T、138S 変異 (T137M, S138F, hetero、軽度)、第2細胞内ループ192S、196G 変異 (S192L、G196R, hetero、軽度)、第5細胞内ドメインにある468R 変異 (R468W, hetero、軽度)、日本人において発見された C 末細胞内ドメイン564R 変異 (R564C, hetero、軽度) を作製して、その機能を詳細に検討した。その結果、細胞外カルシウム／リン比を認識して、その情報を細胞内に伝達する作用に対して SLC34A3 が、トランスポーターとして機能している証拠は十分、得られなかった。

以上より、XPR1 および SLC34A3 において、トランスポーター機能と栄養素レセプターの機能を併せ持つトランスポーターとして機能している可能性を検討した。In vitro の破骨細胞実験系では、XPR1 はカルシウム／リンをモニターできる分子として機能している可能性が考えられた。しかしながら、XPR1 は多くの組織で発現し、また、どのような機能を担うのかは、十分に明らかではない。

#### 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 17 件)

1) Kido S, Kaneko I, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto K. Vitamin D and type II sodium-dependent phosphate cotransporters. *Contrib Nephrol*. 査読有, 180, 2013, 86-97, doi: 10.1159/000346786.

2) Kayashita A, Yamato H, Yoshida I,

- Matsuzaki K, Niki H, Nagase H, Miyamoto K. Evaluation of questions detecting malnutrition in newly hospitalized patients. The journal of medical investigation 査読有, 60(1-2),2013.138-145, URL:[http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/index\\_1.html](http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/index_1.html)
- 3)Kuriwaka-Kido R, Kido S, Miyatani Y, Ito Y, kondo T, Omatsu S, Dong B, endo I, Miyamoto K, Matsumoto T. Parathyroid Hormone (1-34) Counteracts the Suppression of Interleukin-11 Expression by Glucocorticoid in Osteoblasts: A Possible Mechanism for Stimulating Osteoblast Differentiation against Glucocorticoid Excess. Endocrinology .査読有, 154(3), 2013,1156-1167, doi:10.1210/en.2013-1915,
- 4)Hatano R, Fujii E, Segawa H, Mukaisho K, Matsubara M, Miyamoto K, Hattori T, Sugihara H, Asano S. Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. Kidney Int. 査読有, 83(1),2013,41-49, doi: 10.1038/ki.2012.308.
- 5)Yamada F, Horie D, Nakamura A, Tanimura A, Yamamoto H, Segawa H, Ito M, Miyamoto K, Taketani Y, Takeda E. Role of serine 249 of ezrin in the regulation of sodium-dependent phosphate transporter NaPi-IIa activity in renal proximal tubular cells. J Med Invest, 査読有, 60(1-2),2013, 27-34, URL:[http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/index\\_1.html](http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol60/index_1.html)
- 6)Guo J, Song L, Liu M, Segawa H, Miyamoto K, Bringhurst FR, Kronenberg HM, Jüppner H. Activation of a Non-cAMP/PKA Signaling Pathway Downstream of the PTH/PTHrP Receptor Is Essential for a Sustained Hypophosphatemic Response to PTH Infusion in Male Mice. Endocrinology, 査読有, 154(5),2013,1680-1689, doi: 10.1210/en.2012-2240.
- 7)Van TV, Watari E, Taketani Y, Kitamura T, Shiota A, Tanaka T, Tanimura A, Harada N, Nakaya Y, Yamamoto H, Miyamoto K, Takeda E. Dietary phosphate restriction ameliorates endothelial dysfunction in adenine-induced kidney disease rats. J Clin Biochem Nutr. 査読有, Jul;51(1), 2012,27-32, doi: 10.3164/jcfn.11-96.
- 8)Kido S, Fujihara M, Nomura K, Sasaki S, Shiozaki Y, Segawa H, Tatsumi S, Miyamoto K. Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadomium. Nihon Eiseigaku Zasshi. 査読有,67(4),2012,464-471, [https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjh/67/0/\\_contents](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjh/67/0/_contents)
- 9)Lederer E and Miyamoto K. Clinical consequences of mutations in sodium phosphate cotransporters. Clin J Am Soc Nephrol, 査読有, Jul;7(7),2012, 1179-1187,doi: 10.2215/CJN.09090911.
- 10)Kuwahara S, Aranami F, Segawa H, Onitsuka A, Honda N, Tominaga R, Hanabusa E, Kaneko I, Yamanaka S, Sasaki S, Ohi A, Nomura K, Tatsumi S, Kido S, Ito M, Miyamoto K. Identification and functional analysis of a splice variant of mouse sodium-dependent phosphate transporter Npt2c. J Med Invest. 査読有, 59(1-2), 2012, 116-126, doi:10.2152/jmi.59.116.
- 11)Haito-Sugino S, Ito M, Ohi A, Shiozaki Y, Kangawa N, Nishiyama T, Aranami F, Sasaki S, Mori A, Kido S, Tatsumi S, Segawa H, Miyamoto KI. Processing and stability of type IIc sodium-dependent phosphate cotransporter mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. Am J Physiol Cell Physiol. 査読有, 1;302(9),2011, C1316-1330, doi:10.1152/ajpcell.00314.2011.
- 12)Ohi A, Hanabusa E, Ueda O, Segawa H, Horiba N, Kaneko I, Kuwahara S, Mukai T, Sasaki S, Tominaga R, Furutani J, Aranami F, Ohtomo S, Oikawa Y, Kawase Y, Wada NA, Tachibe T, Kakefuda M, Tateishi H, Matsumoto K, Tatsumi S, Kido S, Fukushima N, Jishage KI, Miyamoto K. Inorganic phosphate homeostasis in sodium-dependent phosphate cotransporter Npt2b<sup>±</sup> mice. Am J Physiol Renal Physiol 査読有, 301(5),2011, F1105-1113, doi:10.1152/ajprenal.00663.2010.

13)Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. Free Radic Biol Med. 査読有,51(7), 2011, 1329-1336, doi:10.1016/j.bbr.2011.03.031.

14)Kuwahata M, Kubota H, Amano S, Yokoyama M, Shimamura Y, Ito S, Ogawa A, Kobayashi Y, Miyamoto K, Kido Y. Dietary medium-chain triglycerides attenuate hepatic lipid deposition in growing rats with protein malnutrition. J Nutr Sci Vitaminol 査読有,57(2),2011,138-143,doi:10.3177/jnsv.57.138.

15)Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. Sodium-dependent phosphate cotransporters: Lessons from gene knockout and mutation studies. J Pharm Sci. 査読有,100(9),2011, 3719-3730,doi:10.1002/jps.22614.

16)Tanimura A, Yamada F, Saito A, Ito M, Kimura T, Anzai N, Horie D, Yamamoto H, Miyamoto K, Taketani Y, Takeda E. Analysis of different complexes of type IIa sodium-dependent phosphate transporter in rat renal cortex using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. J Ned Invest. 査読有, 58(1-2),2011,140-147,doi:10.2152/jmi.58.140.

17)Fukagawa M, Komaba H, Miyamoto K. Source matters:from phosphorus load to bioavailability. Clin J Am Soc Nephrol. 査読有,6(2),2011,239-240, doi:10.2215/CJN.11051210

〔学会発表〕 (計 11 件)

1)Tatsumi S, Mechanisms of hyperphosphatemia in the osteocyte-abelated mice. Americal Society Nephrology, Kidney Week. San Diego, CA, San Diego Convention Center, 2012.11.2 (USA サンデーエコ サンデーエココンベンションセンター)

2)Hatano R, The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is essential for the regulation of phosphate homeostasis in the kidney (oral presentation).. Americal

Society Nephrology, Kidney Week. San Diego, CA, San Diego Convention Center, 2012.10.31 (USA サンデーエコ サンデーエココンベンションセンター)

3)Kido S, Molecular mechanisms of cadmium (Cd) dependent fibroblast growth factor 23 secretion in bone. (oral presentation).

Americal Society Nephrology, Kidney Week. 2012.10.31 (USA サンデーエコ サンデーエココンベンションセンター)

4)Miyamoto K, Phosphorus Management and Clinical Outcomes

XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease 2012, 2012.6.26 (USA ホノルル ヒルトンハワイアンビレッジ)

5)Segawa H, Dietary inorganic phosphorus and intestinal peptide absorption. XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease 2012, 2012.6.29 (USA ホノルル ヒルトンハワイアンビレッジ)

6)Mukai T, The role of salivary glands in phosphate homeostasis.

XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease 2012, 2012.6.29 (USA ホノルル ヒルトンハワイアンビレッジ)

7)Kido S, Muscle atrophy in patients with CKD results from FGF23/Klotho-mediated suppression of Insulin/IGF-I signaling.

XVI International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease 2012, 2012.6.27 (USA ホノルル ヒルトンハワイアンビレッジ)

8)Nomura K, Post-Hepatectomy Hypophosphatemia in Rats.

J Am Soc Nephrol. 2011.11.12 (USA フィラデルフィア ペンシルバニアコンベンションセンター)

9)Segawa H, Role of Sodium-Dependent Phosphate(Pi)Transporter(Npt2b)on Salivary Pi Secretion.

J Am Soc Nephrol. 2011.11.11 (USA フィラデルフィア ペンシルバニアコンベンションセンター)

10)Hatano R, Is Essential for the Phosphate Reabsorption in the Renal Proximal Tubule. J Am Soc Nephrol. 2011.11.10 (USA フィラデルフィア ペンシルバニアコンベンションセンター)

11)Ohi A, Molecular Consequences of the SLC34A3 Mutations of Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria (HHRH). J Am Soc Nephrol. 2011.11.10 (USA フィラデルフィア ペンシ

〔図書〕(計 17 件)

- 1)大井彰子,他、メディカルレビュー社、
- ②リン, 亜鉛, 銅.循環器医のための知っておくべき電解質異常、2011、47-51.
- 2)宮本賢一,中屋豊.メディカルレビュー社、循環器医のための知っておくべき電解質異常、2011、216-220.
- 3)宮本賢一,他、建帛社、栄養・食品機能とトランスポーター、2011、63-80.
- 4)伊藤美紀子,他、日本メディカルセンター、腎不全医療における栄養管理の基礎知識、2011、71-81.
- 5)瀬川博子,他、北隆館、Bio Clinica 腎臓トランスポーター異常による疾患、2011、23-27.
- 6)大井彰子,他、医薬ジャーナル社、CLINICAL CALCIUM 12 月号、2011、171-174.
- 7)桑原煩治,他、東京医学者、腎と透析 Mar2012、2012、311-315.
- 8)宮本賢一,他、共立出版株式会社、栄養生化学実験、2012、149-177.
- 9) 宮本賢一,他、日本医事新報社、改訂第 2 版 カラー図解 人体の正常構造と機能 X 運動器、2012、101P.
- 10)辰巳佐和子,他、科学評論社、循環器内科 Vol.71 No.3 Mar2012、2012、253-259.
- 11)加藤秀夫,他、講談社サイエンティフィック、栄養生化学、2012、192P.
- 12)辰巳佐和子,他、医学図書出版株式会社、透析療法ネクストVIII～新時代の高リン血症治療～、2012、11-20.
- 13)木戸慎介,他、日本メディカルセンター、腎と骨代謝 2012Vol25,No1、2012、25-33.
- 14)野村憲吾,他、中外医薬社、Annual Review 腎臓、2-16.
- 15)瀬川博子,他、医薬ジャーナル社、CLINICAL CALCIUM 2012 Vol.22 No.10、2012、13-20.
- 16)辰巳佐和子,他、医薬ジャーナル社、CLINICAL CALCIUM 2012 Vol.22 No.10、2012、81-85.
- 17)宮本賢一、医薬ジャーナル社、CLINICAL CALCIUM 2012 Vol.22 No.10、2012、11.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 賢一 (MIYAMOTO KENICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：70174208

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：