

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17081013

研究課題名（和文）無機リン酸トランスポートソームの機能制御とその破綻

研究課題名（英文）Inorganic phosphate transportsome and human disease

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）：細胞外リン濃度の調節は、腎近位尿細管リン再吸収システムが担っており、このうち type IIa および type IIc ナトリウム依存性リントランスポーター (Npt2a/Npt2c) は、その機能を担う中心的分子である。我々は、Npt2a と Npt2c のノックアウトマウス (KO) を作製して、その生理学的な役割を明らかにするとともに、Npt2c 遺伝子変異は、遺伝性低リン血症 (HHRH) の原因遺伝子であることを証明した。また、Npt2a および Npt2c は sodium-hydrogen exchange-regulating factor (NHERF)1 および NHERF4 との作用を明らかにした。これらの研究により、腎臓におけるリントランスポートソームの機能調節を解明し、新しいリン代謝の局面を発見した。

研究成果の概要（英文）： The maintenance of constant circulating levels of Pi depends on the activity of the kidney. Two types of Na/Pi co-transporters (Npt2a, Npt2c) have been identified in the kidney. The abundance of Npt2a and Npt2c in the apical membrane of the renal epithelial cells is a major determinant for Pi homeostasis. Npt2a knockout (KO) mice exhibit increased urinary Pi excretion, a 50% to 70% decrease in renal BBM vesicle Na/Pi cotransport, and hypophosphatemia. Npt2a KO mice also overexpress Npt2c, which may support residual renal Pi reabsorption function. Laboratory and bone abnormalities are more profound in Npt2a^{-/-}Npt2c^{-/-} double knockout (DKO) mice than in animals with ablation of only one transporter (Npt2a or Npt2c), indicating that both molecules have similar non-redundant roles in Pi homeostasis in rodents and humans. In addition, we found that the mutations of human Npt2c cause hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria (HHRH)

After correct targeting and insertion into the plasma membrane of epithelial cells, specific protein-protein interactions may be required to stabilize the final localization of membrane proteins. Classical yeast two-hybrid screens performed against the C-terminus of NaPi-II (Npt2a and Npt2c) revealed interactions of this cotransporter with several PDZ domain containing proteins that may contribute to the stabilization of NaPi-II at the apical membrane. NaPi-IIc (Npt2c) was shown to interact with NHERF1 and NHERF4. The consequences of these interactions for apical positioning and regulation of NaPi-IIc remain to be clarified. In this study, we discovered new aspect of the regulation of the Pi transportsome in the kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,900,000	0	6,900,000
2006年度	14,700,000	0	14,700,000
2007年度	13,000,000	0	13,000,000
2008年度	13,000,000	0	13,000,000
2009年度	13,000,000	0	13,000,000
総計	60,600,000	0	60,600,000

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：無機リン酸、腎臓、ナトリウム依存性、輸送体、リン利尿因子

Inorganic phosphate, Kidney, Sodium-dependent, transporter, phosphaturic factor

1. 研究開始当初の背景

生体における無機リン酸（以下リン）は、生体膜、エネルギー、核酸、細胞内シグナル、酵素活性化、骨格素材などに利用される極めて重要な生体構成成分である。細胞外リン濃度の調節は、腎近位尿細管リン再吸収システムが担っており、このうち type IIa および type IIc ナトリウム依存性リントランスポーター(Npt2a/Npt2c)は、その機能を担う中心的分子である。これらのトランスポーターは、近位尿細管上皮細胞の Apical 膜に局在し、リン輸送の律速段階を担っている。従って、血中のリン濃度は、このトランスポーターの活性により決定されており、また、種々のリン代謝調節ホルモンは、このトランスポーターの遺伝子発現あるいは細胞内局在を調節することで、血中のリン濃度の恒常性維持に関わっている。しかし、これらの調節における分子機序は明らかにはされていない。

2. 研究の目的

本研究では、無機リン酸トランスポーターをモデルとして(1)リントランスポートソーム(Npt2a 複合体および Npt2c 複合体)の構成成分の同定、(2)トランスポートソームの構造と細胞内局在との関係、(3)PTH/FGF23/klotho をはじめとする各種ホルモンによる活性調節とトランスポートソームとの関係、(4)トランスポートソームの破綻とリン代謝異常症との関係を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

リントランスポートソームの構造と機能調節

●Npt2a リントランスポートソームの構成蛋白の解明（平成17年-平成18年度）

Opti-prep 密度勾配超遠心分離法によるマイクロドメイン分画および免疫沈降法によりトランスポートソームを精製し、プロテオミクス解析法によりリントランスポートソーム構成蛋白の同定を行う。同定したタンパク質のGST又はHis-tag融合タンパク質を調整し、Pull-down アッセイ法による蛋白相互作用解析あるいは分子表面プラズモン法によるタンパク質相互作用解析によるリントランスポートソーム構造解析を行う。

●細胞膜 Targeting に必要な蛋白/脂質との相互作用（平成17年-19年度）

Npt2a トランスポートソーム構成蛋白のRNAi あるいはドミナントネガティブ体の作成を行い、トランスポートソームのマイクロドメインへの Targeting に必要なコンポーネントを同定する。

免疫沈降法により分離したリントランスポートソームより脂質抽出を行いHPLCによる脂質組成の分析を行い、リントランスポートソームと相互作用する脂質を同定し、マイクロドメインへの targeting に必要な脂質成分の同定と脂質と相互作用するタンパク質の同定

●Npt2c の Apical 局在化とトランスポートソームの解明（平成18-19年度）

Npt2c の腎近位尿細管上皮細胞への膜移行シグナルを同定する。さらに、Npt2c のC-末およびN-末に結合する蛋白質について、

Yeast-Two hybrid 法を用いて、候補蛋白を明らかにする。得られた Npt2c トランスポートソーム構成タンパク質を RNAi 法あるいはドミナントネガティブ体を用い、リントランスポートソームの Apical 膜への局在に必要な分子の同定を行う。

●トランスポートソームを介したエンドサイトーシスの調節機能の解明 (PTH/FGF23/Klotho によるトランスポートソーム分解制御機構を解明する) (平成18-20年度) PTH 受容体/ FGF 受容体などリントランスポートソームをエンドサイトーシスする受容体とリントランスポートソーム間の相互作用を解明する。 NHERF1, NHERF4 などの PDZ タンパク群の役割を明らかにする。

受容体シグナルにより活性化されるキナーゼ群の同定と標的リン酸化タンパク質の同定をホスホプロテオミクス解析により行う。

リントランスポートソームに含まれる ezrin は、アクチンの再構築による細胞膜エンドサイトーシスを起こす重要な分子の一つと考えられており、受容体シグナルによる ezrin リン酸化と活性化のメカニズムを明らかにする。トランスポートソームと細胞骨格を介した無機リン酸トランスポーターの細胞内トラフィッキング調節について検討する。

●トランスポートソーム異常と疾患の解明 (平成18-21年度)

トランスポートソーム構成成分の異常と疾患に関する研究では、リントランスポートソーム構成成分の一つと考えられる Npt2c-KO マウスにおける骨代謝異常の分子機構を明らかにする。さらに、常染色体性低リン血症クル病 (HHRH) の患者解析から得られた遺伝子異常が、Npt2c の機能異常を引き起こす原因について解明する。さらに、Npt2a および Npt2c のダブル KO マウスを作製することにより、HHRH 患者の病態が再現できるかを検討する。さらに、骨代謝異常の分子機構を明らかにする。さらに、常染色体性低リン血症クル病 (HHRH) の患者解析から得られた遺伝子異常が、Npt2a 機能異常を引き起こす原因について解明する。リントランスポートソーム (Npt2a および Npt2c) の病態生理学的な側面から、リントランスポートソームの分子マシーン全貌解明に取り組む。

4. 研究成果

●Npt2a リントランスポートソームの構成蛋白の解明 Npt2a が apical 膜上の脂質マイクロドメインに局在し、分子複合体を形成していることを明らかにした (文献21)。そこで、これらの分子複合体の構成成分を明らかにするため、脂質マイクロドメインを分画後 Blue Native PAGE 法によりできるだけ細胞膜上の複合体を壊さずに分離し、さらにこのゲルを1次元目とし2次元目を SDS-PAGE を用いて分子量ごとに分離した後 western blot 法により複合体構成成分の分析を試みた。その結果、NaPi-IIa を含む複合体は、Blue Native PAGE 法による分析では 1100kDa、920kDa、480kDa、220kDa の4つ検出された。この4つの複合体について SDS-PAGE-Western Blot 分析を行ったところ、これまで報告されている PDZ-K1、NHERF-1 および ezrin は、480kDa および 220kDa の複合体には含まれるが、1100kDa および 920kDa の複合体には含まれなかった。従って、Npt2a のトランスポートソームには少なくとも NHERF-1-ezrin を含む複合体と含まない複合体の2種類存在すると考えられた。この、新たに見いだした 1100kDa の巨大複合体は、全複合体の中でもっとも Npt2a のシグナルを強く示すことから、Npt2a トランスポートソームの機能・局在制御に重要であると考えられる。そこで、この 1100kDa の構成成分の同定とこれらの複合体のスポットについてプロテオミクスによる解析を進め、一つがメガリンであることを明らかにし、さらに細胞骨格タンパクである spectrin が含まれることを見いだした。

●細胞膜 Targeting に必要な蛋白/脂質との相互作用 (平成17年-19年度) および Apical 局在化とトランスポートソームの解明 Npt2a および Npt2c の発現調節とくに膜移行シグナルについて検討を加えた (文献1、5、9、10、11、16、19)。ERM タンパクの1つである Ezrin は、NaPi-IIa 複合体の形成に重要と考えられた。そこで、ezrin のドミナントネガティブ体を発現させ、Npt2a の脂質マイクロドメインへの局在および細胞膜表面への局在について検討したところ、ezrin のドミナントネガティブ体を過剰発現すると脂質マイクロドメインへの局在および細胞膜表面への局在の両者とも抑制されることを明らかにした。さらに、Npt2a の C-末端は、ezrin と直接結合することを見いだした。Npt2c の各種変異体を作製して、その膜局在化について調べた。その結果、従

来の PDZ 結合モチーフではなく、全く新しいモチーフ WLHSL モチーフを明らかにした (文献1)。また、この配列は Npt2a の C 末にも保存されていた。この配列は、Ezrin との結合や NHERF1 との結合は極めて弱く、新しい介在蛋白の存在が明らかになった。

●トランスポートソームを介したエンドサイトーシスの調節機能の解明 (PTH/FGF23/Klotho によるトランスポートソーム分解制御機構を解明する) (平成18-20年度)

各種ホルモンによる Npt2a および Npt2c トランスポートソームの調節機序について検討を加えた (文献2、3、6、7、12、13、15、17、18)。副甲状腺ホルモン (PTH) などは、近位尿細管に作用し、Npt2a のエンドサイトーシスを急速に引き起こし、リン再吸収活性を調節している。PTH からのシグナルは、Npt2a を直接リン酸化しないことから、他のトランスポートソームの構成分子を標的としていると考えられた。PTH により活性化されるシグナルには、PKA および PKC があるが、いずれかが活性化されることで Npt2a のエンドサイトーシスがみられることから、我々は、PKA および PKC により共通にリン酸化される分子が重要なターゲットであると考え、ホスホプロテオミクス解析により検索したところ ezrin が標的分子であることを同定した。そこで、ezrin のどの部位がリン酸化されると Npt2a 複合体の細胞膜局在が変化するかを決定するため、リン酸化されるアミノ酸残基をアスパラギン酸に置換した phosphomimetic 変異を導入し、Npt2a の活性および細胞膜局在への影響を検討した。その結果、249 番目のセリンをアスパラギン酸に置換した変異体では、Npt2a の活性が低下すること、Npt2a の細胞膜への局在が抑制されることを見いだした。さらに、この変異体は、NHERF-1 との相互作用も消失することから、PTH のシグナルは主に、ezrin の 249 番目のセリンのリン酸化を介して Npt2a 複合体の形成を阻害し、細胞膜への局在を抑制し、Npt2a によるリン輸送活性を抑制するものと考えられた。一方、FGF23 による Npt2c 抑制作用を検討し、Npt2c の不活性化の機序を明らかにした。この作用には、遠位尿細管に発現する Klotho の作用が必要であり、klotho 遺伝子を欠損する KL/KL マウスでは、FGF23 によるリン利尿効果は観察されなかった。FGF23 を投与後、血中に増加する solubleKlotho にはリン利尿作用が観察された。また、In vitro において klotho を作

用させると Npt2c の機能低下が観察された。

●トランスポートソーム異常と疾患の解明 (平成18-21年度)

1) リントランスポートソーム構成成分の異常と疾患について検討を加え、リントランスポートソーム構成成分の一つと考えられる Npt2c の異常が、FGF23/klotho シグナル系の破綻とリンクしていることを明らかにした。また、Npt2c は PTH や食餌性リンにより、エンドサイトーシスされることを明らかにした (文献2、7、12、16、20)。

2) klotho 遺伝子欠損マウスの高リン血症の原因を明らかにし、FGF23 の異常高値に加え、Npt2a および Npt2c リントランスポートソームの細胞内トラフィッキングを調節する機能異常が高リン血症の原因である可能性を明らかにした (文献12)。

3) 遺伝性低リン血症クル病 HHRH の患者解析を行い、FGF23 の分泌異常および Npt2c トランスポーターの C 末端異常を明らかにした (文献8)。

4) Npt2a および Npt2c ノックアウトマウスを作製し、ヒトとマウスにおける遺伝性低リン血症くる病の病態の違いを解明した。これらの結果、ヒトでは Npt2c が中心的な腎臓におけるリントランスポーターであり、Npt2a は何らかの理由で細胞内にエンドサイトーシスされていることが見出された。又、Npt2a/Npt2c ダブル KO マウスを作製し、高リン食で骨代謝異常などの表現型が回復することより、遺伝性低リン血症クル病 HHRH の動物モデルに利用できることが明らかになった (文献4、7)。

5) FGF23 の分泌臓器である骨細胞を破壊したマウスを作製して、リン代謝異常および骨解析を行い、FGF23 のリン利尿効果を検討した (文献14)。

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 21 件)

(1) Ito M, Sakurai A, Hayashi K, Ohi A, Kangawa N, Nishiyama T, Sugino S, Uehata Y, Kamahara A, Sakata M, Tatsumi S, Kuwahata M, Taketani Y, Segawa H, Miyamoto K. An apical expression signal of the renal type IIc Na⁺-dependent phosphate cotransporter in renal prithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Apr 21. (Epub ahead of print) 査読(有)。

(2) Tomoe Y, Segawa H, Shiozawa K, Kaneko I, Tominaga R, Hanabusa E, Aranami H,

Furutani J, Kuwahara S, Tatsumi S, Matsumoto M, Ito M, Miyamoto K. Phosphaturic action of fibroblast growth factor 23 in Npt2 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun;298(6), F1341-50. 2010. 査読(有).

(3) 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. *Biochem J*. Mar15;427(1), 161-9. 2010. 査読(有).

(4) Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol Renal Physiol*. Sep;297(3), F671-8, 2009. 査読(有).

(5) Breusegem SY, Takahashi H, Giral -Arnal H, Wang X, Jiang T, Verlander JW, Wilson P, Miyazaki-Anzai S, Sutherland E, Caldas Y, Blaine JT, Segawa H, Miyamoto K, Barry NP, Levi M. Differential regulation of the renal sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa, NaPi-IIc, and PiT-2 in dietary potassium deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug;297(2), F350-61, 2009. 査読(有).

(6) Segawa H, Aranami H, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone*. Vol. 45, S2-S7. 2009. 査読(有).

(7) Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami H, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Nephrol*. Jan 20(1). 104-113. 2009. 査読(有).

(8) Yamamoto T, Michigami T, Aranami F, Segawa H, Yoh K, Nakajima S, Miyamoto K, Ozono K. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a study for the phosphate transporter gene type IIc and osteoblastic function. *J Bone Miner Metab*. 25(6), 407-13. 2007. 査読(有).

(9) Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, Kuwahata M, Segawa H. New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter. *Am J Nephrol*. 27(5), 503-15, 2007. 査読(有).

(10) Sawada N, Taketani Y, Amizuka N, Ichikawa M, Ogawa C, Nomoto K, Nashiki K, Sato T, Arai H, Isshiki M, Segawa H, Yamamoto H, Miyamoto K, Takeda E. Cavelin-1 in extracellular matrix vesicles secreted from osteoblasts. *Bone*. Jul;41(1), 52-8, 2007. 査読(有).

(11) Segawa H, Yamanaka S, Onitsuka A, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Taketani Y, Miyamoto K. Parathyroid hormone-dependent endocytosis of renal type IIc Na-Pi cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan;292(1), F395-403, 2007. 査読(有).

(12) Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Tatsumi S, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto K. Correlation between hyperphosphatemia and type II Na/Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb;292(2), F769-79, 2007. 査読(有).

(13) Ito M, Haito S, Furumoto M, Uehata Y, Sakurai A, Segawa H, Tatsumi S, Kuwahata M, Miyamoto K. Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, Jan; 292(1). C526-34. 2007. 査読(有).

(14) Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takehita S, Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*. 2007 Jun;5(6):464-75. 査読(有).

(15) Matsuo A, Negoro T, Seo T, Kitao Y, Shindo M, Segawa H, Miyamoto K. Inhibitory effect of JTP-59557, a new triazole derivative, on intestinal phosphate transport in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, Jul4;517(1-2), 111-119. 2005. 査読(有).

(16) Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, Furutani J, Ito M, Kuwahata M, Saito H, Fukushima N, Kato S, Kanayama HO, Miyamoto K. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J*. Aug15;390, 325-31, 2005. 査読(有).

(17) Ito M, Sakai Y, Furumoto M, Segawa H, Haiso S, Yamanaka S, Nakamura R, Kuwahata M, Miyamoto K. Vitamin D and phosphate regulate fibroblast growth factor-23 in

K-562 cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, Jun;288(6),E1101-9, 2005. 査読(有).

(18) Ito M, Matsuka N, Izuka M, Haito S, Sakai Y, Nakamura R, Segawa H, Kuwahata M, Yamamoto H, Wesley J.Pike, Miyamoto K. Characterization of inorganic phosphate transport in osteoclast like cells. Am J Physiol. Apr;288(4),C921-31,2005. 査読(有).

(19) Segawa H, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Shono M, Yamamoto T, Miyamoto K. Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a high-phosphate diet. Am J Physiol Renal Physiol. Mar;288(3),F587-96,2005. 査読(有).

(20) Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. J Biol Chem. Jan28;280(4),2543-9,2005. 査読(有).

(21) Nashiki K, Taketani Y, Takeichi T, Sawada N, Yamamoto H, Ichikawa M, Arai H, Miyamoto K, Takeda E. Role of membrane microdomains in PTH-mediated down-regulation of NaPi-IIa in opossum kidney cells. Kidney Int. Sep;68(3):1137-47,2005. 査読(有).

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

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

竹谷 豊 (TAKETANI YUTAKA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：30263825

辰巳 佐和子 (TATSUMI SAWAKO)
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：80420545

瀬川 博子 (SEGAWA HIROKO)
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：70325257

伊藤 美紀子 (ITOH MIKIKO)
兵庫県立大学・環境人間学部・准教授
研究者番号：50314852