

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890093

研究課題名（和文） ナトリウム—リン酸共輸送体の分子異常と機能の解析

研究課題名（英文） The analysis of the function of mutated sodium-phosphate co-transporter

研究代表者

岩城 孝行 (IWAKI TAKAYUKI)

浜松医科大学 医学部 助教

研究者番号：70509463

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性マーカーと誘導型の Npt2a 遺伝子を同一のベクターに組み込むことで、細胞への形質転換後の薬剤耐性細胞の獲得と、細胞継代維持期間中は Npt2a 遺伝子の発現を限りなく抑えることが可能となったため、Npt2a の過剰発現が原因と推定される細胞死を輸送体機能解析する直前まで回避できるようになった。Npt2a 遺伝子にはその N 末端に GFP を融合させた融合タンパク質も解析に用いるため、細胞生存下での Npt2a のトラフィックが可能となり、安定発現体による誘導発現のため、再現性のある機能解析が可能となった。安定発現体を作成することにより Slc34a1 の Wt、A499V、V528M、DM の発現をリアルタイムで観察した結果、Wt 及び V528M の発現は確認できたが A499V と DM の発現は一切確認できなかった。RT-PCR の結果では mRNA の発現はいずれの変異体発現細胞において同程度に確認できているため転写後の翻訳過程において A499V を含む変異体は安定したタンパクとなることできないことが証明された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new expression system to avoid unintended cell death triggered by constitutive over expressions of Slc34a1 to analyze the functions of mutated Npt2a. The mutations, viz. A499V, V528M, and double mutations (DM), were expressed with the new system in OK-P cell line. The recombinant proteins were fused to GFP at its N-terminal; hence, the trafficking of the expressions was enabled in the living cells. The cells transfected with wt and V528M were positive with green fluorescence. However, those transfected with A499V and DM were negative. The real time microscopical analysis revealed that indelibly expressed A499V and DM was immediately degraded in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生理学・薬理学・産婦人科学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：HHRH・Npt2a・Slc34a1・機能異常・遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

現在 3 種類のアミリン酸共輸送体ファミリー (Sodium-Phosphate Transporter: NPT1-3) が同定されているが、腎臓で無機リン酸の輸送を制御しているものは NPT2 ファミリーであり、その中でも Npt2a (遺伝子名: Slc34a1) と Npt2c (遺伝子名: Slc34a3) の発現が確認されている。これらのタンパク質は腎臓の近位尿細管の刷子縁膜に発現し、原尿からナトリウム濃度勾配に依存し無機リン酸の再吸収を促進する (1)。

家族性高カルシウム尿症を伴う低リン血症性くる病 (hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria; HHRH) の原因遺伝子は、Npt2a ノックアウトマウスの成績 (2) や Prie 等の報告 (3) により、当初は Slc34a1 であるものと思われたが、その後の詳細な発症家系の遺伝子調査により、原因遺伝子としては Slc34a3 と考えられるようになってきているが、特定できないものもまだ多い (4)。

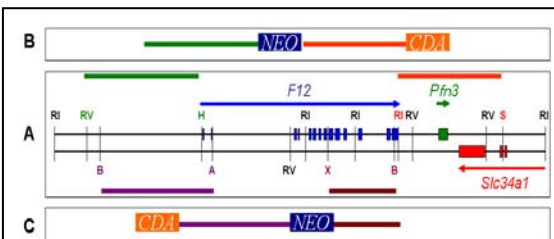


Figure 1. (A) 血液凝固第 XII 因子 (遺伝子名: *F12*) とその近傍の遺伝子配置及び、相同組み換えに利用した配列。緑線は一番目の *F12*^{-/-}マウス作成のための 5' の、赤線は 3' の位置を示す。紫線は二番目の *F12*^{-/-}マウス作成のための 5' の、茶線は 3' の位置を示す。青色ボックスは *F12* の各エクソン (全 14)、緑色ボックスは *Pfn3* の各エクソン (全 1)、赤色ボックスは *Slc34a1* の各エクソン (全 13) を示す。(B) 一番目の *F12*^{-/-}マウス作成のためのターゲティングベクターの構造。ターゲティングの為に配列が *F12* の外側に存在し、3' 側では他の遺伝子領域に存在する。その為、3' 側の遺伝子構造に直接的な影響を及ぼす可能性がある。(C) 二番目の *F12*^{-/-}マウス作成のためのターゲティングベクターの構造。ターゲティングの為に配列は *F12* の内側に存在するため、3' 側の遺伝子構造に直接的な影響を及ぼす可能性はない。

申請者の前所属先であるノートルダム大学理学部生化学科の Castellino 博士の研究室では、血液凝固線溶因子の機能を、タンパク質の機能解析といった古典的生化学的アプ

ローチから遺伝子改変マウスを使用した生体内での機能解析まで手掛けている。

Figure 1A にあるようにマウス血液凝固因子第 XII 因子 (遺伝子名: *F12*) の 3' の約 1kb 下流にはヒト同様 *profilin 3* (遺伝子名: *Pfn3*) と *Slc34a1* が存在する。Figure 1B にあるように、*F12* をコードする 14 のエクソン全てを染色体上から消去する目的で、*F12* 遺伝子の 5' と 3' 非翻訳領域を含む配列をターゲティングベクターとして構築し、マウス胚性幹細胞を改変し得られたマウスを解析した結果、血液凝固因子第 XII 因子の欠損は確認されたが、合わせて HHRH 様の症状も呈することが判明した (5)。その後、Figure 1C にあるように、*F12* 遺伝子の一部 (エクソン 3 から 8 まで) のみ破壊する形でマウス胚性幹細胞を改変し得られたマウスを解析した結果、血液凝固因子第 XII 因子の欠損のみ確認され、HHRH 様の症状は呈さなかった (6)。

遺伝子解析の結果、一番目に作成した *F12*^{-/-}マウスは *Slc34a1* 遺伝子の 2 か所に偶発的な点突然変異が導入されていた。それらの変異は、第 499 番目のアミノ酸がアラニンからバリンへ置換されているもの (A499V) と、第 528 番目のアミノ酸がバリンからメチオニンへ置換されているもの (V528M) であり、共に *Slc34a1* 遺伝子の第 13 エクソンに位置しており、ターゲティングに使用した配列の中に存在した。当該マウスの腎臓においては mRNA の発現は野性体と同等に認められるが、免疫染色にてタンパクの存在が確認できないため、転写後のタンパク合成若しくはタンパク輸送において何らかの障害を受けていることが推測された。Opossum Kidney (OK) 細胞を使用した一過性発現実験により、A499V 変異タンパクは発現することができず、V528M 変異は発現には影響しないことが判明した。また、*Npt2a* の機能異常は血液凝固因子第 XII 因子の欠損には全く影響されていないことも判明した (5)。このように、動物レベルで *Npt2a* の点突然変異が HHRH 様の症状を引き起こすことが判明した以上、ヒトで *Npt2a* の遺伝子異常が家系解析で判明しないという理由のみで、*Slc34a1* が原因遺伝子でないと結論付けるのは時期尚早であり、よりいっそうの詳細な解析が必要であると考えられる。

(参考文献)

1. Forster IC, Kohler K, Biber J, Murer H: Forging the link between structure and function of electrogenic cotransporters: the renal type IIa Na⁺/Pi

cotransporter as a case study. *Prog Biophys Mol Biol* 80:69-108, 2002

2. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS: Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5372-5377, 1998

3. Prie D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, Hulin P, Benque-Blanchet F, Silve C, Grandchamp B, Friedlander G: Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med* 347:983-991, 2002

4. Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Osti JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, Frappier D, Burkett K, Carpenter TO, Anderson D, Garabedian M, Sermet I, Fujiwara TM, Morgan K, Tenenhouse HS, Juppner H: SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet* 78:179-192, 2006

5. Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Tenenhouse HS, Castellino FJ: A Missense Mutation in the Na⁺/Pi Cotransporter Gene, *slc34a1*, Leads to Symptomatic Impaired Phosphate Homeostasis in Mice. *J Am Soc Nephrol* in press, 2008

6. Iwaki T, Castellino FJ: Plasma levels of bradykinin are suppressed in factor XII-deficient mice. *Thromb Haemost* 95:1003-1010, 2006

7. Hernando N, Forgo J, Biber J, Murer H: PTH-Induced Downregulation of the Type IIa Na/Pi-Cotransporter Is Independent of Known Endocytic Motifs. *J Am Soc Nephrol* 11:1961-1968, 2000

2. 研究の目的

Npt2a の輸送体としての機能解析には、専ら *Xenopus* の Oocyte に *in vitro* で合成した RNA を導入してパッチクランプや放射線標識した無機リン酸の取り込み等を利用して行うが、遺伝子導入効率が実験毎に異なるため、実験結果を標準化することに難点があり、また質の良い Oocyte を継続して取り出す事も困難であった。OK 細胞は不死化細胞ゆえ、培養が容易で取り扱いやすい細胞であるが、

Npt2a に関しては一過性発現でしか導入できない。過去に他研究者により同細胞を用いた Npt2a 安定発現体の構築が試みられたが、成功にいたっていない (7)。OK 細胞において Npt2a 安定発現体構築に成功しない原因としては、強制発現により無機リン酸の細胞内バランスが攪乱され、細胞死が誘導されるためと推測している。その推測に至る間接的な知見としては、強制発現系において、陽性コントロールとして使用した green fluorescent protein (GFP) の発現体に比較して、Npt2a 発現体の細胞数が圧倒的に少ないこと、Npt2a 発現体が培養時間の経過に伴い肥大化してくること、があげられる (未発表データ)。従って、この点を克服できれば、OK 細胞において Npt2a 安定発現体の構築が可能になり、再現性のある安定した Npt2a 機能試験が可能になるのではないかと考えられる。

一番目に作成した F12^{-/-}マウスにおける Npt2a の研究において解決していない疑問点として、以下の二つが挙げられる。

(1) A499V 変異のタンパク発現への影響はどの時点で障害されているか。

(2) V528M 変異の機能は正常であるか。

これらの問題を解決する為の実験系の構築における課題として、以下の四つが挙げられる。

(3) Npt2a の安定発現体の構築。

(4) 安定発現体構築後の誘導的発現導入。

(5) 発現誘導後のリアルタイム検出。

(6) パッチクランプによる輸送体機能の解析。

3. 研究の方法

(1) クロンテック社から発売されている pTet-On Advanced は単純ヘルペスウイルスの 3 つの最小 VP16 活性化ドメイン (AD) に Tet 抑制因子変異体 (rtetR-M2) を融合させた融合体である rtTA-Advanced を CMV プロモーターを用いて発現させるベクターである。同じくクロンテック社から発売されている pTRE-Tight は最適化されたテトラサイクリン応答配列 (TREmod) により、その下流に導入した遺伝子を誘導的に発現することを可能とするベクターである。これらのベクターを併用することで、ドキシサイクリンの存在下で、rtTA-Advanced は TRE-Tight と結合し、下流遺伝子の転写を活性化するため、誘導的発現が可能となる。Figure 2 にあるように、pTet-On Advanced を改変し Puromycin 耐性マーカー及び赤色蛍光色素である DsRED2 を恒常的に発現するユニットと pTRE-Tight 下流に GFP を導入したベクターを同一ベクターとして再構成をした。そのベクターを OK 細胞に導入し、Puromycin で選択した後、ドキシサイクリンで誘導した場合、GFP の誘導的発現を確認することができた (Figure 2)。

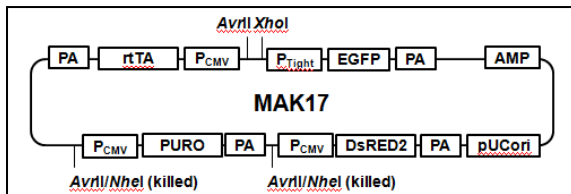


Figure 2. 改変後の一体化ベクター。

(2) Figure2で示したベクターのGFPのストップコドン除去し、Npt2aの野生型、A499V変異、V528M変異、及びA499V+V528M変異を持つ配列を、GFPの下流に挿入。

(3) 作成したベクターをOK細胞に導入しPuromycinで選択するとともに細胞分離装置によりDsRED2による赤色蛍光を発する細胞を選択。

(4) 細胞の選択後に、細胞を100%コンフルエントな状態まで培養した後に誘導発現を行い、発現パターンを蛍光顕微鏡にてリアルタイムに観察。

(5) 同時に適当なタイムポイントを設定し、細胞内局在をレーザー共焦点顕微鏡にて確認。

4. 研究成果

(1) 発現ベクターの構築は問題なく完遂し、rtTA、Dsred2、PUROは恒常的に発現しドキシサイクリンで誘導することでGFPまたはGFP融合タンパクはOK-P細胞において正常に発現することが分かった。

(2) 誘導発現後に共焦点蛍光顕微鏡で融合タンパクの発現を確認したところ、Figure3にあるようにGFPは細胞質に均一に存在するのに対して、Npt2aのWtとV528Mは細胞膜の培地接触面（即ち基底膜とは逆の方向）に局在することが判明した。これは発現タンパクが正所性に発現していることを意味していた。A499V及びDMはそもそも融合タンパクとして発現を確認することができなかった。

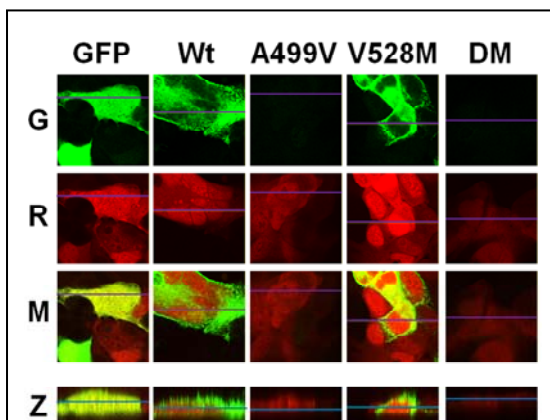


Figure 3. 共焦点蛍光顕微鏡による細胞内での発現タンパクの局在。(G) green、(R) red、(M) marge、(Z) z-stacking。

(3) リアルタイム顕微鏡において観察したところA499VとDMは誘導開始直後から蛍光を発する細胞が存在しないことが確認できた。このことからこれらの変異タンパク質は翻訳直後に正常なタンパクとして折りたたまれることなく細胞質内で処理されてしまっていることを示唆していた。WtやV528Mは同程度に蛍光タンパクを発現するが、培養後に細胞が肥大化しやがて細胞が破裂し消滅することが分かった。このことは誘導発現したWtとV528Mは機能的にリン酸の共輸送体として働き細胞内でのリン酸の恒常性をかく乱していることを間接的に示唆していた。

(4) 残念ながら発現しリン酸の共輸送体としての機能があると考えられるWtやV528Mであるが、パッチクランプ法にてリン酸の移動を見るためには発現レベルの調節及び低リン酸培地等を含めた培地の改良などを行い、発現レベルを安定させながら細胞の恒常性を維持しなければならないことが分かった。今後はこの点について改良を加えたいと考えている。しかしながら、ほぼ予定した研究結果は得られたと考えられるため現在2本の論文をまとめている段階である。

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4件)

- ① Furuta T, Iwaki T, Umemura K, [13C]pantoprazole breath test as a predictor of the anti-platelet function of clopidogrel, Eur J Clin Pharmacol, 2010 May;66(5):457-63, Epub 2010 Mar 27, 査読有。
- ② 岩城孝行、線溶因子の動脈硬化における役割—遺伝子改変マウスからの知見、血栓止血誌、21(1)、16-20、2010、査読有。
- ③ 岩城孝行、*Procr* 遺伝子改変マウスから見たEPCRの生理-病的機能、血栓と循環、17(3)、4-9、2009、査読無。
- ④ 岩城孝行、FibrinogenノックアウトマウスからみたFibrinogenの生理-病的機能、血栓と循環、17(1)、4-9、2009、査読無。

[学会発表] (計5件)

- ① 岩城孝行、梅村和夫、A Plasminogen Deficiency Attenuates Atherosclerosis、第34回日本血栓止血学会、鹿児島、2010
- ② 岩城孝行、The role of fibrinogen It's role in hemostasis and beyond、第71回日本血液学会、京都、2009
- ③ Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Donahue DL, Castellino FJ, Ploplis VA. (2009). A PLASMINOGEN DEFICIENCY ATTENUATES ATHEROSCLEROSIS AS A RESULT OF ALTERED

LIPOPROTEIN PROCESSING. XXII
Congress of the International Society
on Thrombosis and Haemostasis. Boston.

- ④ 岩城孝行、フィブリノーゲンの生理・病理学的役割について、大阪大学蛋白質研究所セミナー(凝固系、補体系、レクチンドメインによるディフェンスシステム)、大阪、2008
- ⑤ 岩城孝行、梅村和夫、PAI-1 deficiency reduces the progression of atherosclerosis、第32回日本血栓止血学会、大阪、2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 孝行 (IWAKI TAKAYUKI)

浜松医科大学 医学部 助教

研究者番号：70509463

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：