

## 9534 ヒト腎尿細管 $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体遺伝子の発現調節機構の解明

助成研究者：武田 英二 (徳島大学 医学部)

共同研究者：宮本 賢一 (徳島大学)

森田 恭子 (徳島大学)

竹谷 豊 (徳島大学)

### 【緒言】

伴性低リン酸血性くる病(XLH)は、腎リン酸再吸収システムの異常により低リン酸血症およびくる病を呈する疾患である。腎尿細管における $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体遺伝子には異常なく、担体の発現とリン酸輸送活性を低下させる液性因子の関与が考えられている。そこで、ヒト腎臓の $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体(NaPi-3およびNPT-1)遺伝子の発現調節機構について検討した。

### 【方法】

ヒトゲノムDNAライブラリーから、NaPi-3およびNPT-1遺伝子の5'-非翻訳領域を含むクローンを得て塩基配列を決定した。つぎに、両遺伝子の転写開始点上流をルシフェラーゼ遺伝子とヒトビタミンD受容体発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションし、転写活性を測定した。

### 【結果】

1、NaPi-3およびNPT-1遺伝子の5'-転写調節領域の構造：NaPi-3遺伝子の転写開始点より上流領域には、典型的なTATA-boxが存在するほか、cAMP応答配列、AP-1結合配列、Pho-4結合配列、レチノイン酸応答配列、2カ所のビタミンD応答配列(VDRE)に似たダイレトリピート様構造および複数のVDREのハーフサイトが見られた。一方、NPT-1遺伝子の5'-上流領域には、TATA-boxはなく、2ヶ所のCCAAT-box、オクタマー配列および複数のVDREのハーフサイトが見いだされた。

2、ルシフェラーゼアッセイによる5'-転写調節領域の検討：NaPi-3およびNPT-1遺伝子の5'-転写調節領域に対する $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を検討したところ、両遺伝子とも $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とその受容体が存在したときに、ルシフェラーゼ活性が著しく上昇した。この $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用は、プロテインキナーゼC(PKC)活性化剤であるフォルボルエステルおよびデキサメサゾンによって抑制された。また、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写活性化能は、NaPi-3のほうが強かった。

### 【考察】

NaPi-3およびNPT-1遺伝子の基本的な発現に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が関与している可能性が示唆された。また生理的濃度の副甲状腺ホルモン(PTH)は、PKCを介する経路を活性化し、リンの再吸収を抑制すると考えられている。従って、PTHおよびデキサメサゾンのリン酸再吸収抑制作用の1つの機序として、 $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体の発現における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の転写促進作用を抑制していることが示唆された。



9534 ヒト腎尿細管 $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体遺伝子の発現調節機構の解明

助成研究者：武田 英二 (徳島大学 医学部)

共同研究者：宮本 賢一 (徳島大学)

森田 恭子 (徳島大学)

竹谷 豊 (徳島大学)

## 【研究目的】

生体内のリン酸の作用として細胞の構造保全、酵素活性の調節、脂質・糖質・核酸蛋白代謝およびエネルギー代謝、酸塩基平衡調節、骨基質の石灰化、血漿カルシウムイオンレベルの調節がある。血漿リン酸濃度を調節する機序として小腸からの吸収、細胞内外の移行、骨からの動員、腎臓からの排泄があるが、腎尿細管のリン酸再吸収活性が最も重要な役割を果たしている。

伴性家族性低リン酸血症ビタミンD抵抗性くる病(XLH)は、腎尿細管におけるリン酸再吸収システムの異常による低リン酸血症と、それに伴うカルシウム・リン酸イオン積の低下により、くる病または骨軟化症を呈する先天性疾患である。近年、XLHのモデル動物であるHypマウスを用いた研究から、本疾患は、腎近位尿細管刷子縁膜における $\text{Na}^+$ /リン酸輸送担体の発現量の低下とそれに伴うリン酸輸送活性の低下に起因することが示唆されている<sup>1),2)</sup>。しかしながら、 $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体発現量の低下あるいは活性の低下を引き起こす因子は未だ不明である。

近年、ウサギ腎近位尿細管における $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体遺伝子であるNaPi-1遺伝子<sup>3)</sup>、ラットNaPi-2遺伝子および、ヒトNaPi-3遺伝子がMurerらによってクローニングされた<sup>4)</sup>。また我々はNPT-1をクローニングした<sup>5)</sup>。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いてNaPi-3およびNPT-1の機能特性を検討したところヒト腎近位尿細管上皮細胞ではNPT-1およびNaPi-3が $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体として機能していることが明らかになった<sup>5)</sup> (図1)。さらに、ヒト、マウスおよびハムスター由来の雑種細胞DNAよりなる染色体パネルよりPCR法を用いて検討したところ、NaPi-3遺伝子およびNPT-1遺伝子の染色体座位はそれぞれ5番および6番染色体であることが判明した<sup>6)</sup>。したがって、NaPi-3遺伝子およびNPT-1遺伝子とも、XLHの直接の原因遺伝子ではないことが明らかとなった。

Tenenhouseらは、XLHのモデル動物であるHypマウスと正常マウスとの体液が交流出来るようにした実験システムを用いて、正常マウスにもリン酸輸送異常が起こることを示している<sup>7)</sup>。さらに、Griffithsらは正常マウスの腎臓をHypマウスに移植しても低リン酸血症は改善されないことを報告している<sup>8)</sup>。これらの結果も、Hypマウスが $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体の機能を低下させる液性因子を有することを示している。この液性因子を同定することがXLHの原因

を明らかにするためだけでなく、生体内でのリン酸の代謝調節機構を明らかにするために重要と考えられる。

そこで生体におけるリン酸恒常性維持機構の分子機序およびXLHの病因を明らかにするためにNaPi-3およびNPT-1のゲノム遺伝子構造を決定し、転写調節領域における転写調節因子を介した遺伝子発現調節機構について検討した。

## 【研究方法】

### 1、NaPi-3およびNPT-1遺伝子の5'-転写調節領域のクローニング

両遺伝子のcDNA配列<sup>4),5)</sup>を基に5'-末端付近にプライマーを設定し、ヒトゲノム遺伝子、あるいはSau3AIカセットを用いたヒトゲノム遺伝子ライブラリーを鋳型としてPCR法により両遺伝子の一部を含むDNA断片を得た。その後、このDNA断片をプローブとして、IEMBL3をベクターとしたヒトゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、両遺伝子の5'-非翻訳領域を含むクローンを得た。得られたクローンは、サザンブロット法による解析後、適当な制限酵素で切断し、pBluescript IIにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。さらに、決定した両遺伝子の転写調節領域の塩基配列をもとに、腎臓のmRNAを抽出し、プライマー延長法およびS1マッピング法を用いて転写開始点を決定した。

### 2、ルシフェラーゼアッセイ法によるプロモーター活性の検討

NaPi-3遺伝子の転写開始点上流2.4kbの断片とNPT-1遺伝子の転写開始点上流1.5kbの断片をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子をリポーター遺伝子としたベクター(Pica Basic vector)に組み込みリポーターベクターを作製した。リポーターベクターとヒトビタミンD受容体発現ベクター、さらに発現効率を調べるためのb-ガラクトシダーゼ発現ベクターをDEAE-デキストラン法を用いてCOS-7細胞にトランスフェクションした。48時間通常培地にて培養した後、さらに15時間、50nMの1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、100nMのフォルボルエステルおよび10μMのデキサメサゾンを含むDMEM培地で培養した。細胞を回収した後、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターにて測定した。

## 【研究結果】

### 1) NaPi-3およびNPT-1遺伝子の5'-転写調節領域の構造 (図2)

NaPi-3遺伝子のエクソン1より上流2.4kbおよびNPT-1遺伝子の翻訳開始点より上流1.8kbについてその塩基配列を決定した。NaPi-3遺伝子の転写開始点より上流領域には、典型的なTATA-boxが存在するほか、cAMP応答配列(CRE; -760~-756)、AP-1結合配列(AP-1; -857~-849, -2322~-2316)およびPho-4結合配列(Pho-4; -992~-997)が見いだされた。さらに、3ヶ所のダイレトリピート様構造(DR-like)が見出された。1つは、5'-GGGGGA ca GAGGGA-3' (-

68～-55)で2塩基のスペーサーを持つレチノイン酸応答配列に似た構造であった。あとの2つは、それぞれ5'-GGGGAC cct GGGAAC-3' (-229～-216)、5'-GGGCAG caa GGGCAG-3' (-1956～-1940)で3塩基のスペーサーをもつビタミンD応答配列に似た構造であった。また、これら以外にもビタミンD応答配列のハーフサイトが複数見いだされた。一方、NPT-1遺伝子の5'-上流領域には、2ヶ所のCCAAT-box(CCAAT; -762～-758, -817～-813)やオクタマー配列(Oct-1 binding site; -590～-583)が見いだされたが、典型的なTATA-boxは見いだされなかった。さらに、NaPi-3に見られたようなダイレトリート構造は見られなかったものの、複数のビタミンD応答配列のハーフサイト(DR-half)が見いだされた。これらの結果から、両遺伝子がビタミンDによる発現調節を受けている可能性が想定された。

## 2) ルシフェラーゼアッセイによる5'-転写調節領域の検討。

NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域に対する1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] の効果を検討したところ、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とその受容体が存在したときに、ルシフェラーゼ活性が著しく上昇した(図3 a)。また、この1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の作用は、プロテインキナーゼC活性化剤であるTPAおよびデキサメサゾンによって抑制された(図3 b)。NPT-1遺伝子の5'-転写調節領域についても同様の検討を行った結果、NaPi-3と同様な結果が認められた(図4)。また、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による転写活性化能は、NaPi-3のほうが強い傾向にあった。このように1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の作用がないと、発現はほとんど促進されなかったことから、両遺伝子の基本的な発現に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が関与している可能性が示唆された。また、デキサメサゾンは腎臓でのリン輸送活性を抑制することが報告されている<sup>9)</sup>が、その作用機序の1つとして、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>による転写レベルでの促進化能の抑制が考えられた。また、プロテインキナーゼCの活性化剤であるフォルボールエステル (TPA) の共存下では、これらの遺伝子発現に対する1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の作用が抑制された。これまでにPTHは、生理的濃度においては、プロテインキナーゼAを介する経路よりもむしろプロテインキナーゼCを介する経路を活性化し、リンの再吸収を抑制すると考えられている<sup>10)</sup>。従って、この結果から、PTHのリン再吸収抑制作用の1つの機序として、リン輸送担体の発現における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の転写促進作用を抑制していることが示唆された(図5)。

## 【考察】

血漿リン酸は糸球体で濾過されるが、このうち70%から90%が近位尿細管曲部および直部で再吸収され、ヘンレ系蹄で再吸収されず、遠位尿細管で5%から15%、集合管で4%から8%が再吸収される。リン酸の再吸収は近位尿細管上皮細胞での刷子縁膜(brush border membrane: BBM)を通して細胞内に入り基底側膜(baso-lateral membrane: BLM)を通過して細胞から血中へと移行する。BBMにおいてリン酸はNa<sup>+</sup>依存性に輸送され、BLMのNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseにより

$\text{Na}^+$ が細胞外に輸送される結果、細胞内外に $\text{Na}^+$ 勾配が生じ、BBMから持続的に $\text{Na}^+$ が細胞内に流入する。BBMでのリン酸輸送はこの $\text{Na}^+$ 勾配による $\text{Na}^+$ の流入に伴っておこると考えられる。

Haffmanら<sup>11)</sup>は刷子縁膜小胞(BBMvesicle:BBMV)を用いた研究により、BBMに $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体が存在することを明らかにした。腎近位尿細管に存在する $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送システムは、腎近位尿細管の曲部(S1、S2)に存在する高親和性で低容量のシステムと直部(S3)に存在する低親和性で高容量のシステムより構成されている<sup>12),13),14),15)</sup>。特に近位尿細管曲部に存在するリン酸輸送システムは、副甲状腺ホルモン(PTH)や血漿リン酸レベルにより厳密な調節を受け、生体内リン酸レベルを調節している<sup>16)</sup>。さらに、リン酸再吸収は種々の因子によって調節されている。

本研究において、ヒト腎近位尿細管に発現がしている2種の $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体であるNaPi-3およびNPT-1の遺伝子の5'-転写調節領域のクローニングを行い、その転写活性に及ぼす $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を検討した。NaPi-3遺伝子の転写調節領域には、TATA-boxが存在し、さらに2ヶ所のビタミンD応答配列様配列、およびこれまでに報告されているビタミンD応答配列のハーフサイトが見いだされた。また、NPT-1遺伝子には、典型的なTATA-boxは見いだせなかったが、複数のビタミンD応答配列のハーフサイトが見いだされた。そこで、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の両遺伝子に対する転写活性化能をルシフェラーゼアッセイ法を用いて検討した。その結果、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、受容体の存在下にNaPi-3およびNPT-1遺伝子の発現を促進した。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用がないときには、両遺伝子の発現はほとんど促進されなかったことから、基本的な発現に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が関与している可能性が示唆された。

一方、デキサメサゾンと共存させた際には、リン酸輸送担体遺伝子の転写活性が抑制された。これまでに、デキサメサゾンは腎臓のリン酸輸送活性を抑制することが報告されている<sup>9)</sup>。本実験結果より、その作用機序の1つとして、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による転写レベルでの促進作用を抑制する機序が考えられた。また、プロテインキナーゼCの活性化剤であるTPAの共存下でも、これらの遺伝子発現に対する $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用が抑制された。これまでにPTHは、生理的濃度においては、プロテインキナーゼAを介する経路よりもむしろプロテインキナーゼCを介する経路を活性化し、リン酸の再吸収を抑制すると考えられている<sup>10)</sup>。従って、この結果から、PTHのリン酸再吸収抑制作用の1つの機序として、 $\text{Na}^+$ /リン酸共輸送担体の発現における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の転写促進作用を抑制していることが示唆された。

#### 【今後の課題】

リン輸送担体は大腸菌からヒトに至るまで全てに存在し、細胞外リンレベルの変化に応じて、遺伝子発現が調節されていることが明らかとなっている。特に、大腸菌や酵母などではリン酸枯渇時の適応機構に関する詳細な検討から、

リン酸濃度が細胞増殖を調節していることも明らかにされている<sup>17)</sup>。

本年度の我々の研究で明らかになったNaPi-3遺伝子プロモーター配列でみられたPho-4結合配列は酵母のリン代謝を調節する転写因子結合配列であることからヒトでも重要な意義を有しているものと考えられる。今後は、Pho-4結合配列に結合して転写を調節する因子を同定することがXLHおよびHypマウスにおける低リン酸血症の病因解明およびほ乳類における無機リン酸代謝調節の分子機構を明らかにするためにも重要と考えられる。

#### 【文献】

- 1) Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, and Murer H : Renal Na<sup>+</sup>-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets: Molecular characterization. *J Clin Invest* 93: 671-676, 1994.
- 2) Rasmussen H and Tenenhouse HS : Mendelian hypophosphatemias. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D eds) 7th Ed, McGraw-Hill, New York, 1995, pp 3717-3745.
- 3) Werner A, Moore ML, Mantei N, Biber J, Semenza G and Murer H : Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9608-9612, 1991.
- 4) Magagnin S, Werner A, Markovich D, Sorribas V, Stange G, Biber J and Murer H: Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5979-5983, 1993.
- 5) Miyamoto K, Tatsumi S, Sonoda T, Yamamoto H, Minami H, Taketani Y and Takeda E : Cloning and functional expression of a Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporter from human kidney cDNA: cloning and functional expression. *Biochem J* 305: 81-85, 1995.
- 6) Miyamoto K, Tatsumi S, Yamamoto T, Katai K, Taketani Y, Morita K, and Takeda E : Chromosomal assignments of genes for human Na<sup>+</sup>-dependent phosphate co-transporters NaPi-3 and NPT-1. *Tokushima J exp Med* 42: 5-9, 1995.
- 7) Meyer Jr RA, Tenenhouse HS, Meyer MH and Klugerman AH : The renal phosphate transport defect in normal mice parabiosed to X-linked hypophosphatemic mice persists after parathyroidectomy. *J Bone Miner Res* 4: 523-528, 1989.
- 8) Nesbitt T, Coffman TM, Griffiths R and Drezner MK : Cross-transplantation of kidneys in normal and hyp mice: Evidence that the Hyp phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect. *J Clin Invest* 89: 1453-1459, 1992.
- 9) Levi M, Shayman JA, Abe A, Gross SK, McCluer RH, Biber J, Murer H, Lötscher M and Cronin RE : Dexamethasone modulates rat renal brush border

- membrane phosphate transporter mRNA and protein abundance and glycosphingolipid composition. *J Clin Invest* 96: 207-216, 1995.
- 10) Berndt TJ and Knox FG : Renal regulation of phosphate excretion. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology* (Seldin DW and Giebisch G eds.) 2nd Ed, Raven Press, New York, 1992, pp 2511-2531.
- 11) Hoffman H, Thees M and Kinne R : Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles. *Pflugers Arch* 362: 147-156, 1976.
- 12) Tenenhouse HS, Klugerman A H and Neal JL :Effect of phosphonoformic acid, dietary phosphate and the hyp mutation on kinetically distinct phosphate transport processes in mouse kidney. *Biochim Biophys Acta* 984: 207-213, 1989.
- 13) Brunette MG, Chan M, Maag U and Beliveau R: Phosphate uptake by superficial and deep nephron brush border membranes. *Pflugers Arch* 400: 356-362, 1984.
- 14) Bindels RJM, Van den Broek LAM and Van Os CH : Effect of pH on the kinetics of Na<sup>+</sup>-dependent phosphate transport in rat renal brush-border membranes. *Biochem Biophys Acta* 897: 83-92, 1987.
- 15) Walker JJ, Yan TS and Quamme GA : Presence of multiple sodium-dependent phosphate transport processes in proximal brush-border membranes. *Am J Physiol* 252: F226-F231, 1987.
- 16) Gmaj P and Murer H : Cellular mechanisms of inorganic phosphate transport in kidney. *Physiol Rev* 66: 36-70, 1986.
- 17) 小川暢男 : 酵母の無機リン酸による遺伝子発現制御機構 39: 493-502, 1994



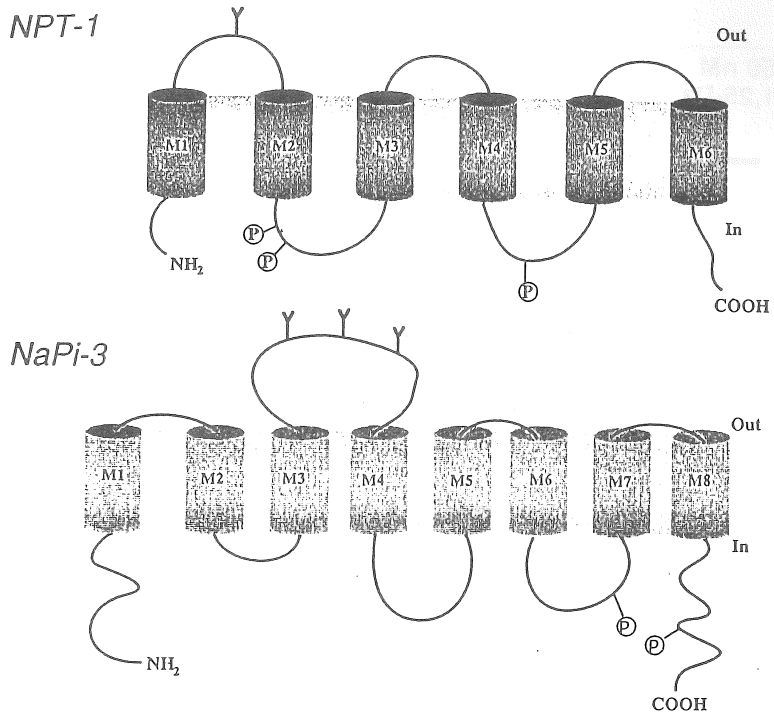


図1、ヒト腎近位尿細管上皮細胞刷子縁膜のNa<sup>+</sup>/リン酸共輸送担体(NaPi-3およびNPT-1)

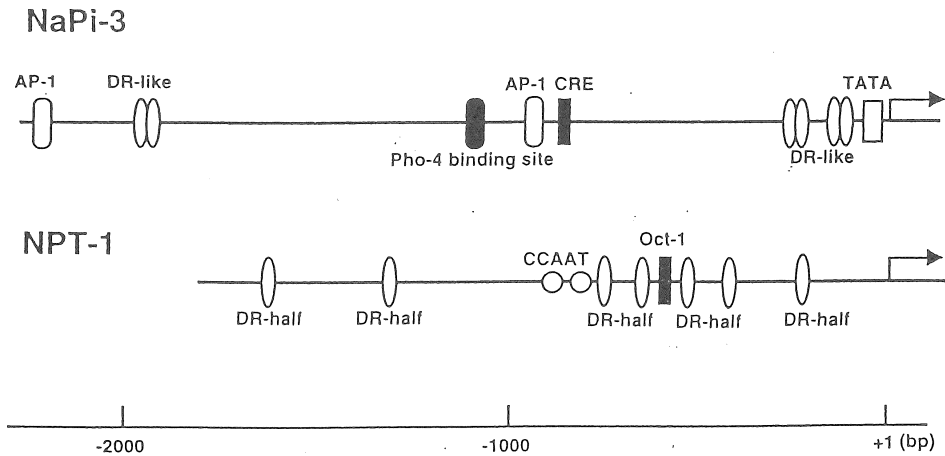


図2、ヒト腎Na<sup>+</sup>/リン酸共輸送担体(NaPi-3およびNPT-1)遺伝子の5'-転写調節領域の構造

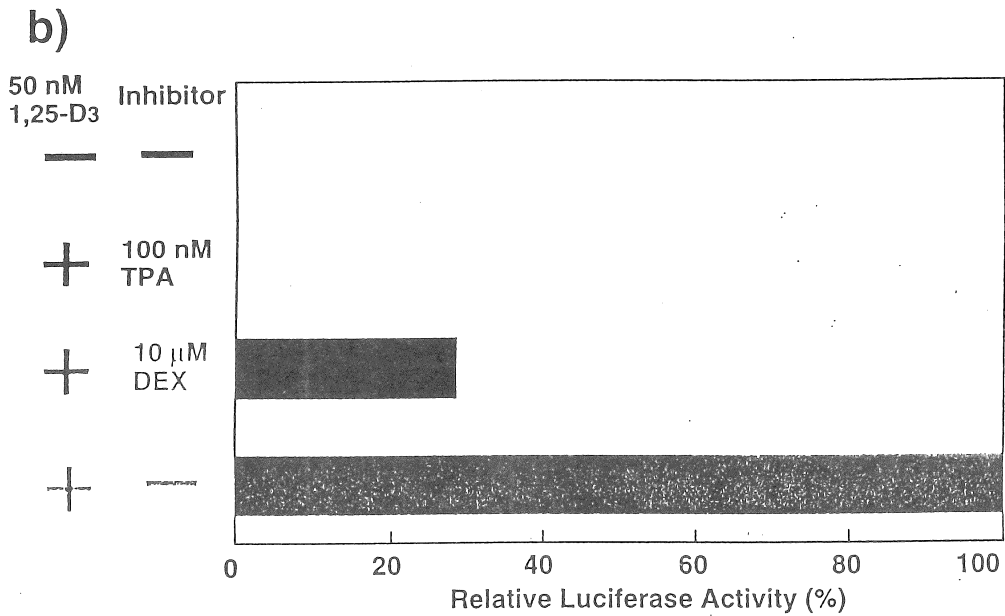
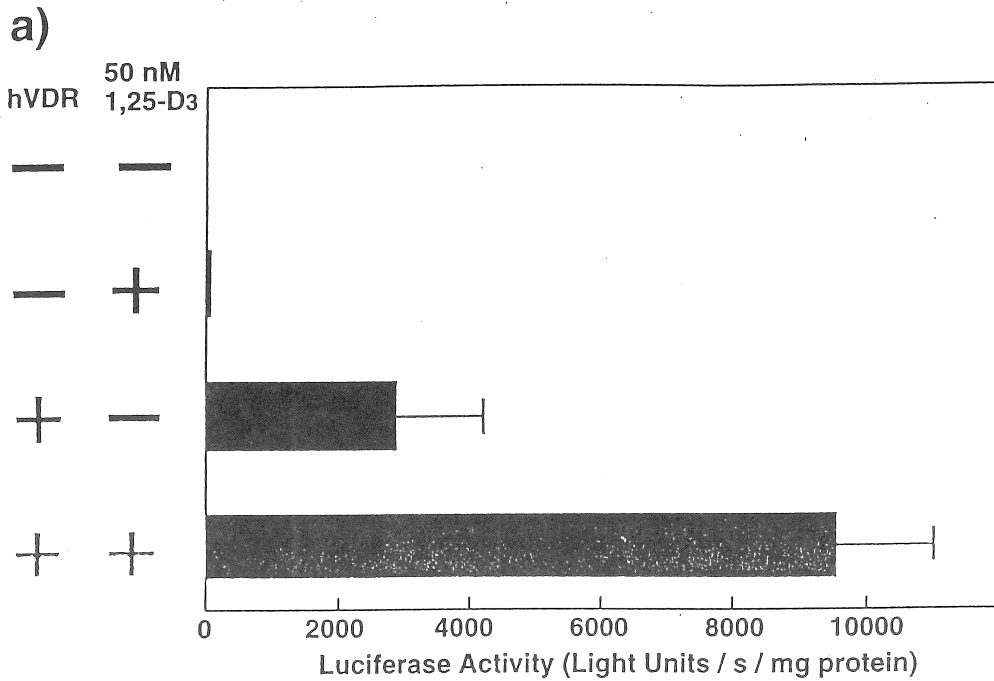


図3、ルシフェラーゼアッセイ法によるNaPi-3遺伝子の転写活性  
 a) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によるNaPi-3遺伝子の転写活性促進  
 b) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によるNaPi-3遺伝子の転写活性におよぼすプロテインキナーゼC活性化剤(TPA)およびグルココルチコイド(DEX)の効果

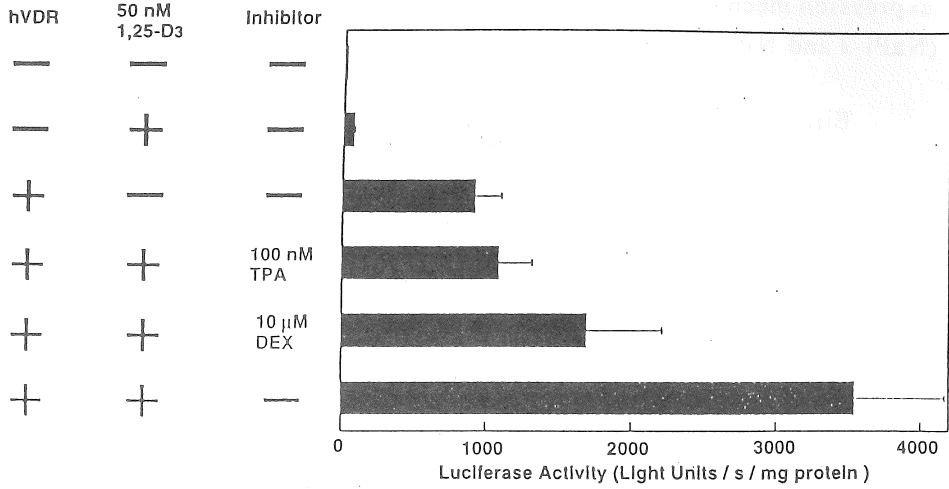


図4、ルシフェラーゼアッセイ法によるNPT-1遺伝子の転写活性におよぼす1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、プロテインキナーゼC活性化剤(TPA)およびグルココルチコイド(DEX)の効果

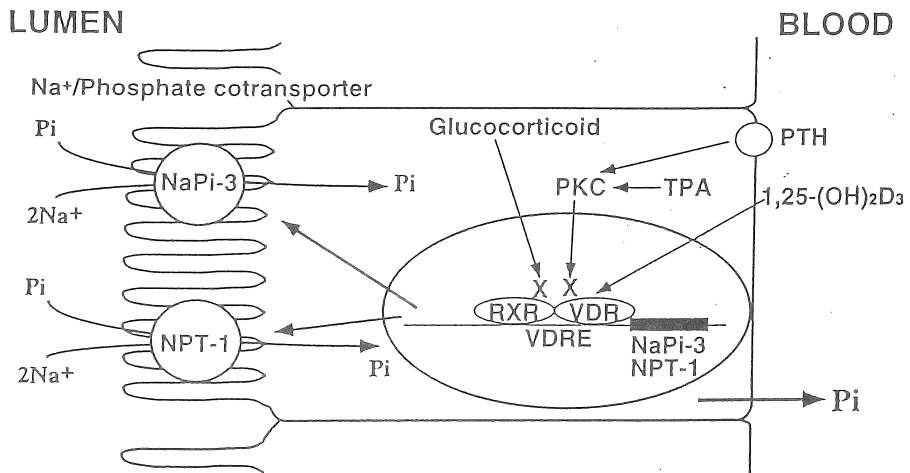


図5、ヒト腎近位尿管上皮細胞のNaPi-3およびNPT-1遺伝子発現の調節機構

Expression mechanism of human renal sodium dependent phosphate transporter (NaPi-3 and NPT-1) genes

Eiji Takeda, Ken-ichi Miyamoto, Kyoko Morita, Yutaka Taketani  
Department of Clinical Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima

Summary

Human X-linked hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets (XLH) is characterized by impaired renal tubule reabsorption of phosphate. Recent reports suggest that a humoral factor that affects gene expression of the Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter is the abnormality underlying murine Hyp (an animal model of XLH). To identify factors that may mediate this transcriptional repression of the cotransporter gene, we characterized the genomic structure of human Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter (NaPi-3, NPT-1) genes.

Human genomic libraries Lambda EMBL3 were screened with human NaPi-3 and NPT-1 cDNA fragments as probes. Isolated lambda DNA were sequenced. Sequence analysis of NaPi-3 gene encompassing 2.4kb upstream from exon 1 indicated a TATA box-like sequence about 30 bp upstream of the corresponding mRNA cap site. We also identified a cAMP-responsive element, AP-1 binding site, Pho-4 binding site and three direct repeat motifs. The 5' flanking region of NPT-1 gene contains an octamer motif, two CCAAT boxes and several VDRE half-sites, but TATA-like sequence was not observed.

Transient transfection study with COS-7 cells demonstrated that luciferase gene expression driven by the NaPi-3 or NPT-1 gene promoter was induced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] in a vitamin D receptor-dependent manner. Dexamethasone or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), which is protein kinase C inhibitor, markedly inhibited promoter activity induced by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Functional analysis of NaPi-3 and NPT-1 gene promoters indicated that vitamin D may play an important role in transactivation of both genes.

These data raise the possibility that abnormal metabolism in XLH is closely related with the underexpression of phosphate transporter genes.