

9635 ヒト腎尿細管 Na^+ /リン酸共輸送担体遺伝子の無機リン酸による発現調節機構

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 医学部)
森田 恭子(徳島大学 医学部)
竹谷 豊(徳島大学 医学部)

【緒言】

血中無機リン酸濃度は主に腎近位尿細管における Na^+ /リン再吸収機構によって調節されている。この再吸収を担う Na^+ /リン酸共輸送担体が種々の動物で同定されているが、遺伝子発現の調節機構および分子構造が異なるI型及びII型の2種類が存在する。そこで、本研究では血中リン濃度による Na^+ /リン酸共輸送担体遺伝子の発現調節の分子機構について検討した。

【方法】

ラットを低リン食で飼育してI型及びII型遺伝子の発現について検討した。つぎにヒトのNPT-1及びNaPi-3遺伝子の5'-非翻訳領域の構造を決定し、リン応答配列の存在を確認し、その意義について検討した。

【結果】

1、血中リン濃度に対する応答は、主としてII型のリン輸送担体により行われ、I型は応答しないことが明らかになった。

2、ヒトII型 Na^+ /リン輸送担体であるNaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域に、酵母のリン応答システムにおいて重要であるリン応答配列(5'-CACGTG-3'; -997から-992)が存在した。しかし、NPT-1遺伝子には認められなかった。

3、低リン食で飼育したラットの腎皮質より抽出した核タンパクを用いてゲルシフトアッセイにより検討したところ、このリン応答配列に結合するタンパクが存在した。さらに本タンパクの結合活性と細胞外リン濃度との間に負の相関が見られた。

4、OK細胞(フクロネズミ由来腎近位尿細管細胞)を用いて転写活性に及ぼすリン応答配列の意義について検討したところ、CACGTG配列に変異を導入したルシフェラーゼリポーターベクターでは、変異を導入しないものの約50%を示した。

【考察】

以上より、低リン血症により活性化あるいは誘導され、ヒトNaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域のCACGTG配列に結合する核タンパクは、酵母のリン応答性転写調節因子(Pho4)のホモログであり、哺乳類にも存在することが示唆された。さらに、CACGTG配列がNaPi-3遺伝子の基本的な発現においても重要であると考えられた。

9635 ヒト腎尿細管 Na^+ /リン酸共輸送担体遺伝子の無機リン酸による発現調節機構

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 医学部)
 森田 恭子 (徳島大学 医学部)
 竹谷 豊 (徳島大学 医学部)

【研究目的】

血中無機リン酸濃度は、主として腎近位尿細管におけるリン再吸収機構によって調節されている。副甲状腺ホルモンやビタミンDなどの血中リン濃度を調節する因子は、このリン酸再吸収機構を調節することが知られている(1)。食事性リンは、このリン酸再吸収を調節する重要な因子の一つであり、低リン食で飼育すると、腎近位尿細管でのリン酸再吸収が促進される(1, 2)。また、近位尿細管培養細胞を用いた検討により、培地中のリン酸濃度を減少させるとリン酸輸送活性が促進することが示されている(3, 4)。以上より、無機リン酸濃度が調節因子として作用することが示唆される。

近年、腎近位尿細管でのリン酸を再吸収する分子として Na^+ /依存性のリン酸共輸送担体および遺伝子がクローニングされているが、遺伝子発現の調節機構および分子構造が異なる、I型及びII型の2種類が存在する(1, 4, 5)。

そこで本研究において、I型及びII型 Na^+ /リン酸輸送担体の発現および遺伝子の5'-転写調節領域の解析を行い、無機リン酸による遺伝子発現調節機構について検討した。

【研究方法】

1、実験用ラットの飼育法及び粗核抽出液の調製
 ウイスター系ラット(体重約200g)を1日2時間0.02%の低リン含有食で10日間飼育し、つづいて低リン食群と1.2%の高リン食群に分け、摂食後腎臓を摘出し、RNAおよび腎尿細管刷子縁膜小胞を分離した。粗核抽出液は低リン食で2週間飼育した腎からFrainらの方法を一部修正して調製した(6)。

2、ヒトI型 Na^+ /リン酸輸送担体(NPT-1)およびII型(NaPi-3)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(7, 8)を基に5'-末端付近にプライマーを設定し、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、 λ EMBL3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のち、塩基配列を決定した。

3、ゲルモビリティシフトアッセイ

NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域に見られたCACGTG (-997 ~ -992) 配列を含む一対のオリゴヌクレオチド hNaPi-PHO-S; 5'-TCGAGAGAGAAACAG GTCACGTGGGCCCGGG-3' (-1010から-984)、及びhNaPi-PHO-AS; 5'-TCGACCCGGCCACGTGACCTGTTTCTCTC-3'を合成した。また競合物として、CACGTG配列より3塩基上流のGGをTTに変異したPHO-MT1 (5'-GAGAGAAACATTTACGTGGGCCCGGG-3')、及びCACGTG配列内の最後のTGをAAに変異したPHO-MT2 (5'-GAGAGAAACAGGTCACGAAGGCCCGGG-3')の2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。抽出した粗核抽出液(5 μ g)と標識したオリゴヌクレオチド(100,000 cpm)とゲルモビリティシフトアッセイを行った。

4. ルシフェラーゼリポーターベクターの作成及びルシフェラーゼアッセイ

NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域 (-2409 ~ +53) を含むルシフェラーゼリポーターベクターp3P2400 (9)より制限酵素Sac Iを用いて切断することによりp3P450 (-448 ~ +53) を作成した。野生型、あるいはCACGTG配列に変異を有した変異体(mt)、すなわちSac Iで切断したDNA断片 (-1168 ~ -448) をp3P450のSac I部位にサブクローンを行い、p3p1170WT及びp3P1170mtを作成した。

OK細胞(フクロネズミ由来腎近位尿細管細胞)に、ルシフェラーゼリポーターベクター及びpCMV- β をトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した(10)。

【研究結果】

1) リン酸濃度によるI型及びII型Na⁺/リン酸共輸送担体の発現調節

食事性リンあるいは細胞外リン濃度の変動によって、II型のリン輸送担体の発現量は変動するが、I型は変動しないことが示された(11)。

2) NPT-1およびNaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域の構造

NPT-1遺伝子の5'-上流領域には、2ヶ所のHNF-1結合配列(HNF-1; -1482 ~ -1469, -1086 ~ -1075)、C/EBP結合配列(C/EBP; -632 ~ -624)などが見いだされ

た。

一方、NaPi-3遺伝子では転写開始点より上流領域に、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3ヶ所のダイレトリピート様構造(DR-like)が見出された(9)。さらに、酵母のリン応答システムにおいて重要であるリン応答配列 (5'-CACGTG-3' ; -997から-992) が存在することが明らかになった (Fig. 1)。

酵母は最もリン応答機構の解析が進んでおり、このリン応答配列にはPho4pと呼ばれるリン応答性転写調節因子が結合することが知られている(12)。そこで、次にラットを用いて、II型Na⁺/リン酸共輸送担体(NaPi-3)遺伝子上に見られたCACGTG配列に結合するタンパクについて検討した。

3) ゲルシフトアッセイによるリン応答因子の検出

NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域に見いだされたCACGTG配列 (Fig. 1)に結合するタンパクについてゲルシフトアッセイを行い検討した。プローブとしてCACGTG配列を含む³²Pで標識したオリゴヌクレオチド(hNaPi-PHO)を用いた。正常食あるいは低リン食で飼育したラットの腎皮質より抽出した粗核抽出液とプローブと反応させた。また、競合物として100倍量の未標識のhNaPi-PHOをプローブと反応させる前にプレインキュベートした。低リン食で飼育したラットの粗核抽出液では、有意にDNA-タンパク複合体形成によるバンドが増加した(Fig. 2)。また、競合物を加えることによってバンドが消失したことから、このタンパクはプローブに特異的に結合したタンパクと考えられた。

4) コンペティションアッセイ

変異オリゴヌクレオチドPHO-MT1, PHO-MT2を用いてコンペティションアッセイを行い、リン応答因子の結合配列の検討を行った。プローブとしてCACGTG配列を含むhNaPi-PHOを³²Pでラベルしたものをを用いた。低リン食で飼育したラットの腎皮質より抽出した粗核抽出液とプローブを反応させた。また競合物としてhNaPi-PHO、及びPHO-MT1, PHO-MT2をプローブと反応させる前にプレインキュベーションした。競合物としてPHO-MT1を用いた場合は、hNaPi-PHOに比べて弱いながらも濃度依存的に競合反応を示したが、PHO-MT2では全く競合反応が見られなかった(Fig. 3)。

5) リン応答因子と血中リン濃度との相関

ゲルシフトアッセイによって検出されたDNA-タンパクの結合活性が、血中リン濃度との間に相関があるかを検討した。³²PでラベルしたhNaPi-PHOプローブと、

低リン食で飼育したラットの腎皮質より抽出した粗核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。血中リン濃度とDNA-タンパク結合量との関係を見ると、血中リン濃度の低下に伴い、相対的にこの因子のDNAへの結合量は増加した (Fig. 4)。しかし、DNA結合量と低リン食摂取期間との間には相関は認められなかった。

6) UV-クロスリンクによるリン応答因子の分子サイズの同定

ゲルシフトアッセイによって検出されたリン応答因子の分子サイズを同定するために、プロモデオキシウリジン (BrdU)、及び [α - 32 P]dCTPを取り込ませたプローブ (PHO-BrdU) と、低リン食で飼育したラットの腎皮質より抽出した粗核抽出液とを用いてUV-クロスリンクアッセイを行った。その結果、70kDa, 50kDa, 43kDa, 34kDa, 及び24kDaのサイズにDNA-タンパク複合体形成によるバンドが認められ、しかし、競合物を加えることによって70kDa、50kDa及び24kDaのバンドは消失した。

7) NaPi-3 遺伝子の転写活性に及ぼす CACGTG 配列の意義

OK細胞 (フクロネズミ由来腎近位尿細管細胞) にp3P1170及びp3P1170mtの2種類のルシフェラーゼリポーターベクターをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。OK細胞において、p3P1170WTはコントロールベクター (pGL2) に比べて約5倍のルシフェラーゼ活性を示したが、p3P1170mtでは、p3P1170の約半分にまで転写が抑制された (Fig. 5)。

【考察】

今回、II型Na⁺/リン酸共輸送担体遺伝子はリン酸濃度の変動により発現が調節されていることが明らかになった。そこでヒトII型Na⁺/リン酸共輸送担体であるNaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域の構造を解析したところリン応答性転写調節因子 (Pho4) の結合配列と高い相同性を有するCACGTG配列を見いだした (Fig. 1)。

Pho4は、細胞外リン濃度の変化に応じて活性化あるいは不活性化され、高親和性無機リン酸輸送担体 (Pho84) や抑制性酸性フォスファターゼ (rAPase) などの遺伝子発現を調節する (13, 14)。本研究において、NaPi-3 遺伝子の5'-転写調節領域にPho4結合配列と同様のCACGTG配列に特異的に結合するタンパク質が存在すること、さらに血中リン濃度とこのタンパクの結合活性に相関が見られることが明らかになった (Fig. 2, Fig. 4)。すなわち、この配列に結合する蛋白質がリン応答性転写調節因子である可能性が示唆された。一般にbHLH (basic helix loop helix) 型のタンパクは5'-CANNTG-3'を基本とした6塩基から構成される自己相補的配列 (E-

box) を認識することが知られている(15, 16)。酵母のPho4はX線構造解析より、bHLH構造を有し二量体を形成してCACGTG配列に結合することが確認されている(17, 18)。さらに、Pho4のDNA結合にE-box以外の塩基認識が必要であることが確認されている(18)。そこで、今回ゲルシフトアッセイによって出されたタンパクがCACGTG配列を含むオリゴヌクレオチドのどの配列を認識しているかを変異オリゴヌクレオチド (PHO-MT1, PHO-MT2) を用いた競合実験を行った。その結果、CACGTG配列内の最後のTGをAAに変えることで結合能が消失したことから、新たに検出されたタンパクがE-boxの構成塩基を認識していることが考えられ、さらにbHLHの構造を有することが示唆された (Fig. 3)。さらにCACGTG内の配列だけでなく、その上流の配列も、このタンパクがDNAに結合するために重要であると考えられた (Fig. 3)。

また、このリン応答因子の分子サイズを、UV-クロスリンクアッセイにより検討したところ、50kDa及び24kDaの2つのDNA-タンパク複合体が見られた。bHLH型のタンパクは二量体を形成してDNAに結合することから、24kDaのタンパクがモノマーで、50kDaがダイマーと考えられた。酵母のPho4は約40kDaであるが、ラットでは24kDaであり、種の違いと考えられた。以上、同じCACGTG配列を認識し、二量体を形成する可能性があり、細胞外リン濃度に応答するタンパクは、ほ乳類におけるPho4のホモログである可能性が考えられる。

さらに、このCACGTG配列の転写活性能への影響について検討したところ (Fig. 5)、この配列に変異を導入したベクター (p3P1170mt) では変異を導入しないもの (p3P1160WT) に比べて転写活性は約50%を示し、CACGTG配列はNaPi-3遺伝子の基本的な転写にとっても重要であることが示された。

【今後の課題】

今回見いだされたリン応答性のDNA結合タンパクは、細胞外リン濃度の変化に応答する機構に関わる数多くの因子のうちの1つであり、リン調節タンパクは、他にも存在すると考えられる。また、細胞外リン濃度の変動を感知し、そのシグナルの細胞内への伝達機構について、今後検討すべき課題である。

【文献】

- 1) Murer H and Biber J: Molecular mechanisms of renal apical Na/phosphate cotransport. *Annu Rev Physiol* 58: 607-18, 1996.
- 2) Cheng L, Liang C T and Sacktor B: Phosphate uptake by renal membrane vesicles of rabbits adapted to high and low phosphorus diets. *Am J Physiol* 14: F175-F180, 1983.
- 3) Escoubet B, Djabali K and Amiel C: Adaptation to Pi deprivation of cell Na-dependent Pi uptake: a widespread process. *Am J Physiol* 256: C322-C328, 1989.
- 4) Caverzasio J, Brown CDA, Bonjour JP and Murer H: Adaptation of phosphate transport in phosphate deprived LLC-PK₁ cells. *Am J Physiol* 248: F122-F127, 1985.
- 5) Biber J, Custer M, Magagnin S, Hayes G, Werner A, Löscher M, Kaissling B and Murer H: Renal Na/Pi-cotransporters. *Kid Int* 49: 981-985, 1996.
- 6) Frain M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R and Cortese R: The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding protein. *Cell* 59: 145-57, 1989.
- 7) 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.
- 8) Miyamoto K, Tatsumi S, Sonoda T, Yamamoto H, Minami H, Taketani Y and Takeda E: Cloning and functional expression of a Na⁺-dependent phosphate cotransporter from human kidney cDNA: cloning and functional expression. *Biochem J* 305: 81-85, 1995.
- 9) Taketani Y, Miyamoto K, Tanaka K, Katai K, Chikamori M, Tatsumi S, Segawa H, Yamamoto H, Morita K and Takeda E: Gene structure and functional analysis of the human Na⁺/phosphate co-transporter (NaPi-3). *Biochem J*: in press, 1997.
- 10) Arakawa T, Nakamura M, Yoshimoto T and Yamamoto S: The transcriptional regulation of human arachidonate 12-lipoxygenase gene by NFκB/Rel. *FEBS Lett* 363: 105-110, 1995.
- 11) Katai K, Segawa H, Haga H, Morita K, Arai H, Tatsumi S, Taketani Y, Miyamoto K, Hisano S, Fukui Y and Takeda E: Acute regulation by dietary phosphate on the sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-2) in rat kidney. *J. Biochem.* 121: 50-55, 1997.
- 12) 小川暢男: 酵母の無機リン酸による遺伝子発現調節機構、蛋白質・核酸・酵素、39: 493-502, 1994.
- 13) Kaffman A., Herskowitz I, Tjian R and O'Shea EK: Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* 263: 5150, 1994.

- 14) Hayashi N and Oshima Y: Specific *cis*-acting sequence for PHO8 expression interacts with PHO4 protein, a positive regulatory factor, in *saccharomyces cerevisiae*. *Am J Microbiol* 1: 785-794, 1991.
- 15) Murre C, McCaw PS and Baltimore D: A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56: 777-783, 1989.
- 16) Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL and Weintraub H: The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61: 49-59, 1990.
- 17) Hakoshima T, Teranishi Y, Ohira T, Suzuki K, Shimizu M, Shirakawa M, Kyogoku Y, Ogawa N and Oshima Y: Crystallographic characterization of a PHO4-DNA complex. *J Mol Biol* 229: 566-569, 1992.
- 18) 清水敏之、東本篤樹、清水真人、京極好正、小川暢男、大嶋泰治、箱嶋敏夫：酵母のリン酸代謝調節における転写因子PHO4のDNA認識機構、*生化学*: 68: 744, 1996.

-2409 GGATCCCTGG GCTTTATGCT AAGTGTTAG CAGGGGCAGG TTTCGAAAGG AAGAGGAGGT GACNTGATTA
 Bam HI AP-1
 -2339 ACTTGGCCTT TTTTTTTTTT TCTTTTTGAG ACAGAGTTTT GCTCTTGTG CCCAGGCTGG AGTGAATGT
 -2269 GCGATCTCGG CTCACTGCAA CCTCTGCCTC CTGAGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTCAGCC TCCCAGATAA
 -2199 CTGGGATTAC GGGTGCCCGC CACCACGCC CGCTAATTTT TTTGTATTTT TAGTAGACAT GGGGTTTCAC
 SP-1
 -2129 CATGTTGGCC AGGCTGGTCT CGAACTCCTG ACCTCAGGTG ATCCACCTGC CTTGGCCTCC CAAAGTGC TG
 -2059 GGATTACAGG CGTGAGCCAC CGCGCCCGC CTAGTTTGGC ATTTTGAAAA GATTGCTGTC TGCTGCTTTG
 -1989 GAGCATGGAT CAGGGGCAGG AAGGGCAGAA ATGGACAGAG CACTTGGGAA GTGACCCGAA TGACCCAGGG
 DR-C
 -1919 GAGATGACAG GCCCAGTCCA GGGAGGTGGC CACAGAGATG GCTAACAGCA AAAGATCAGG GAGCTCCTGG
 -1849 AGCAATAAAA TTGGGAGAAT TGAGGACTGA GTTGAAAACG AGGAAGTGA GGGGAAGGAA ACAGCAAGGA
 -1779 TGTCTGCTTG GTGCCGACC CAGATGGATG GACGGTGTGC CGCTACCAA GATCAGGAAG AAGGAGGAGG
 -1709 CCCAGGTTTG GGGTGAGAAG CACAGTGCCT GCTTCTGGCT TGACAGCCA ACTGCTCGTG CCAGAGGCCG
 -1639 CTCAGAAAAG CTGAGCAGAC GGAGCTTGGC ACCTTCCCTC CAAAACAGCT CCTCCTGCTG GGTTCCTTTC
 -1569 TCAACGCGAG ACACCCCAA CCAGGCAGGC TCTCAGCCA GAAAAGGTCT GGGGAGGCCA TGGCCAGAGC
 -1499 CCAGGTGCAC AGACAAGGTG GGACTACCA CCCAGGGGGA CACACAGACT CTGTACTGG CCAGGGAGGA
 -1429 GGCAGGCAGT AGGCAGGGAG GTGCTGAAAT GGCAGAGAGG CTGGCAAGAG ATACGTGGT GCTGGAATGG
 -1359 AGCTGCCTTC TCTGCTGCTT GTATGAGTCC CAACAGCAGC TCTGGTCAGA TCCAGCATTT TCTCACTTTC
 -1289 ACTAGGGCTG TAGCCCCAAA ATAAATCTTT AGAAGTGGTG GCTGTGTAAT TCAGCAGCAT TTTGGAATTA
 -1219 TATCTCTTGA TGGATTTGAT CGATAGCTAA CTGCCTCCCT CACTAAACCC AGAGCTCCGT GACAGCAGGG
 -1149 AAGGCAAAC TCAAAAATAT CAAAAAGCAC AACCTTATTA AAAAGGAGAA ACACCCCCAG TTCACCAGGA
 -1079 GCACCTTGGA TTCAGCTGCT CCTGCCAAG TCTGAACTGC ACGGGGGAAT GGAGAGAAAC AGGTCACGTG
 Pho4 binding site
 -1009 GCGCGGGTC TCTGGCCCCG CTGTGGGGGT GTCAGTTTGC TCATAGGTGG AGACACTCGA TGTGACATTA
 -939 ACAGCACCTT CAAGCCCAAG GACCCAGAGA TTCTGACACA AGAACTGAGA ACTGATTGCA TTTCGTGACT
 AP-1
 -869 CACGCACACC CTCCTACCTG GGCATGAACC CAGCCCTAGC CAAAGATCCA GAGACCCGAC TCCCATCTAT
 -799 TTCTTTTTC TCTCTCCCTC CCCGTCACCA ATTCTACTGG TCAGATGTCC CTGGGATGCA CCTGTCCTCC
 CRE CCAAT
 -729 CCAGCCCCTC CGTTCCTATC GGAGTTCAGG CCTCATCATC TCCTGCCTGG ACCATTAGCC TCTTAACTGG
 AP-2
 -659 CCCCTCCGCT TCCAGGCTCC CTTCCATATA TCCGGGTTCC ACCCCGGGCG CGATTCTAAA AGGCAGATCA
 Sma I
 -589 GGCCCATCCC AGTCTGGCCA GCGGCTCCAC ATTCACTCAG ACTCACATCC TGGACCCATG GTCGGGCATT
 -519 AGAGACCTGC CACGATTCAA CATTCCACGG CCTTCCAGC TTAGGTCCTC ATCTCACACT CCCTCTCCTC
 -449 TGAGTCCCC CTGGGAGACT TACAGACACC CCGACGCTTG GCAAGGCCAT AGGATGTTTT TGTTGGTTTT
 -379 GGTTTGGTTT TTCTGAGACA GTCTCACTCT GTCACCCAGG CTGGAGTCAG TGGCAGGATC TTGGCTCACT
 -309 GCAACCTCCG AAGGCCATAG GATGTTTGGG TCATTCCTCG GGGAGTCCCTG TCAGGCCAGG AACGAGGGGA
 -239 CCCTGGGAAC AAGGTGCTGA GTGGCATCAG GGTCTCTGCC TGCAGGGCGG GGATGTGTCT GGGTCTGTGT
 DR-B Pst I SP-1
 -169 TGATGGGAAG AACCTGACCA TAGATTCCCC ATGCAGAGCT GACGATTAGC AATTAAGTGG GAGGAATCTC
 -99 AGGGGTGAGG TTAATTGGGG GACAGAGGGA GGCAGCTAG GGTTCAGGG ACTTTGCCCT TGACCCAAGA
 DR-A
 -29 GTATAAAGAG GAGGGTCTCA GTTCTCTCA GGGTCTGGA GGCTTCATTG AGTCTCTGAG CAGAAGCTGA
 TATA-Box +1
 AACACAGAAT TCTAAGgtgagccagga-----
 Eco RI Intron 1

Fig. 1 NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域の配列

AP-1 or 2 (AP-1 or 2 binding site), SP-1 (SP-1 binding site), CRE (cAMP response element), CACGTG (Putative Pho4 binding site)

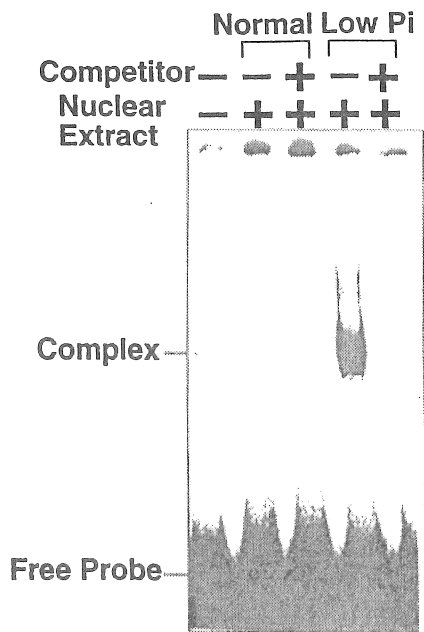


Fig.2 NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域に見いだされたCACGTG配列に結合するリン応答性DNA結合タンパクの検出

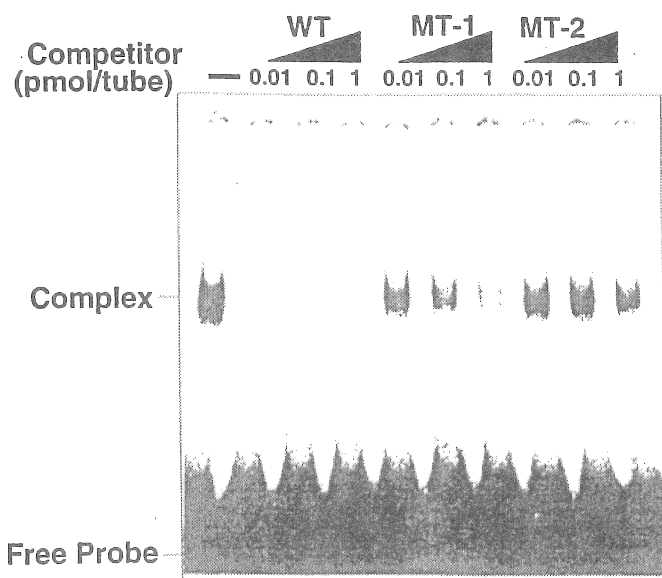


Fig.3 CACGTGを含む変異オリゴヌクレオチドを用いた競合実験

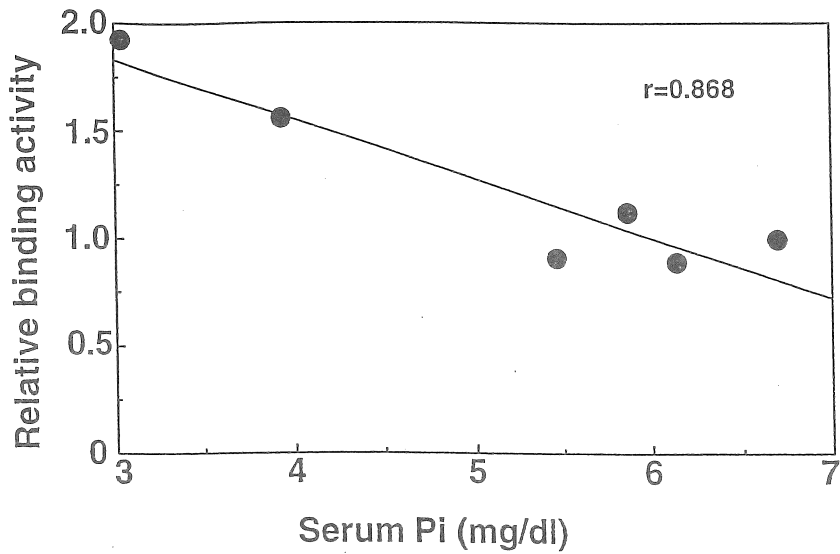


Fig.4 リン応答因子のDNAへの結合量と血中リン濃度の関係

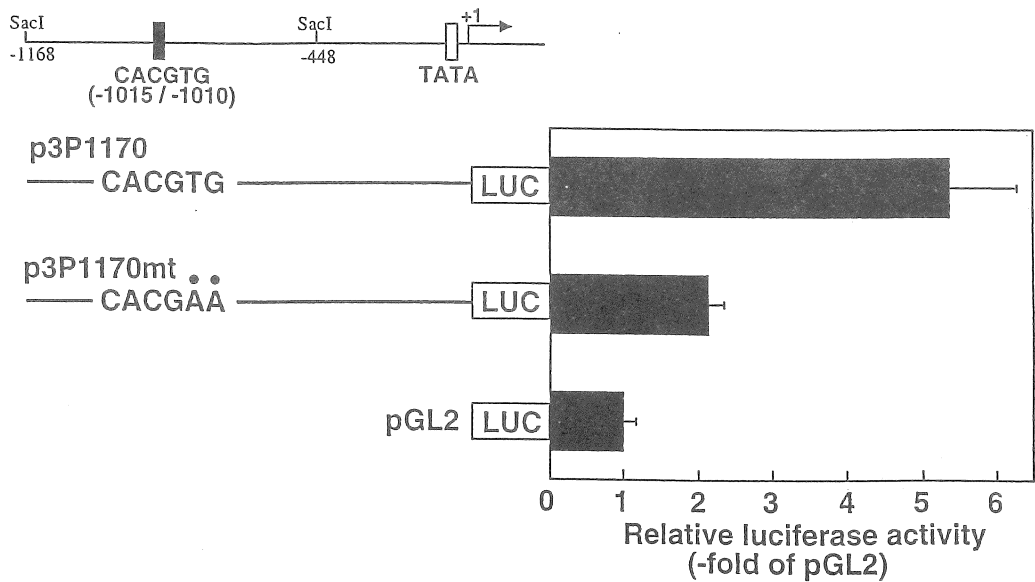


Fig.5 NaPi-3遺伝子の5'-転写調節領域のCACGTG配列およびその変異体の転写活性への影響

Mechanism of human renal sodium dependent phosphate transporter gene expression regulated by inorganic phosphate

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

Summary

Reabsorption of inorganic phosphate (Pi) in the kidney is mediated largely by sodium dependent phosphate (Na^+/Pi) transporters in the brush border membrane of the proximal tubule, and is regulated by a variety of hormones such as parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, or growth hormone, and dietary Pi. Na^+/Pi transporters have been divided into types I and II on the basis of their predicted amino acid sequence.

In this study, the mechanism of Na^+/Pi transporter gene expression regulated by Pi was investigated. Type II transporter mRNA was increased by dietary Pi depletion, while the level of type I transporter mRNA remained unchanged in these conditions. Thus, type II transporters were hypothesized to play an important role to maintain Pi homeostasis in the kidney.

Sequence analysis of human type II Na^+/Pi transporter (NaPi-3) gene indicated the presence of Pho 4 binding motif (CACGTG) which was identified as Pi responsive sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. Binding protein to this sequence was detected in nuclear extracts of Pi depleted rat kidney by gel mobility shift assay. Furthermore, the binding activity of protein to Pho 4 binding motif was reciprocally proportional to serum phosphorus concentrations. Transient transfection study with OK cells demonstrated that luciferase gene expression showed 5-fold of control vector in CACGTG driving vector, and lower in mutant CACGAA driving vector.

These findings indicated that CACGTG sequence in NaPi-3 gene had important role in basal expression of type II Na^+/Pi transporter gene and its regulation by Pi.