

## 9741 小腸のナトリウム依存性リン輸送担体の同定とビタミンDによる活性化の解明

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 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】

活性型ビタミンDは、カルシウムと同様に腸管のリン輸送システムを調節している。哺乳類では少なくとも3種類のナトリウム依存性リン(Na/Pi)輸送担体が明らかにされており、I型とII型は主に腎近位尿細管に発現し、III型は多くの組織に発現していた。一方、MurerらによってクローニングされたPiUSはNa/Pi輸送を促進するが、一次構造からは膜貫通領域がなく、極めて親水性の高い蛋白であった。したがって、PiUSはNa/Pi輸送活性化蛋白と考えられている。

そこで、活性型ビタミンDによる小腸リン輸送活性の促進機構を解明するため、ラット小腸に発現しているNa/Pi輸送担体を同定するとともに、ラットPiUS cDNAのクローニングを行い、ビタミンDによるNa/Pi輸送促進機構について検討した。

### 【方法】

ウサギPiUS cDNAをプローブとして、ラットPiUS cDNAをクローニングし、構造、機能および発現部位の解析を行った。また、ビタミンD欠乏ラットを用いてビタミンDによる小腸のNa/Pi輸送活性調節の分子機構について検討した。

### 【結果】

ラット小腸よりクローニングしたPiUSは、425個のアミノ酸をコードし、2カ所のPKAおよび6カ所のPKCによるリン酸化部位を有する極めて親水性の高い蛋白であった。さらに、5カ所のPrenyl group binding siteが存在し、RAS蛋白などと同様、細胞膜の内側にPrenyl基を介して結合していることが考えられた。ノーザン分析の結果、ラットPiUSは小腸をはじめ、解析したすべての組織に分布していた。

ビタミンD欠乏ラットに活性型ビタミンDを投与すると、小腸刷子縁膜のNa/Pi輸送活性は投与前に比べて約7倍増加した。ラット小腸にはI型およびII型は発現していないが、III型のPiT-1およびPiT-2の発現を確認した。次に、活性型ビタミンDを投与後、経時的に遺伝子発現パターンについて検討した。PiT-1 mRNAは12時間後にわずかに増加したが、24時間および48時間後は変動はみられなかった。PiT-2 mRNAは24時間および48時間後に増加したが、PiUS mRNAは増加しなかった。

### 【考察】

活性型ビタミンDにより調節される小腸Na/Pi輸送担体としてPiT-2の関与が考えられた。ラットPiUSは活性型ビタミンDにより反応しない蛋白であり、小腸でのNa/Pi輸送活性化蛋白と考えられた。



## 9741 小腸のナトリウム依存性リン輸送担体の同定とビタミンDによる活性化の解明

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 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】

無機リン酸(リン)は、生体内のエネルギー代謝産生などの、細胞機能の維持に必須である。血中リン濃度の調節は腸管でのリン吸収および腎尿細管における再吸収調節機構により、その恒常性が保たれている。このうち、腸管におけるリン吸収機構には、ナトリウム勾配を利用したナトリウム依存性リン輸送システムとリン濃度勾配による促通拡散型のナトリウム非依存性リン輸送システムが存在する(1,2)。また、小腸リン輸送システムは十二指腸から回腸にまで存在し、食事時のリンを効率的に取り込むために機能している。小腸リン輸送システムの調節は、主に骨におけるリンのプールを維持するため、さまざまなミネラル調節ホルモンにより輸送機能が制御されている(3)。とくに活性型ビタミンDは、カルシウムと同様に腸管のリン輸送システムを調節している(3,4,5)。活性型ビタミンDは遺伝子レベルでリン輸送システムを調節し、カルシウム吸収系に対する作用とは全く異なっている(4)。これまでの研究で、ビタミンD欠乏動物における腸管でのリン吸収能は正常動物に比べ低下しており、ビタミンD投与後には、本来のリン輸送機構とは全く性質の異なるリン輸送系が誘導されることが報告されている(5)。

最近、哺乳類には少なくとも3種類のナトリウム依存性リン(Na/Pi)輸送担体が発現していることが明らかにされた(6,7)。I型とII型は、主に腎近位尿細管に発現しており、III型はこれらとは構造や性質などが全く異なる輸送担体である(7)。Murerらのグループはウサギ小腸より発現クローニング法を用いて、小腸Na/Pi輸送活性化蛋白(PiUS) cDNAのクローニングを報告した(8)。卵母細胞で発現させたPiUSは明らかにNa/Pi輸送を促進した。しかし、アミノ酸配列より推定される一次構造には膜貫通領域がなく、極めて親水性の高い蛋白であった。これらの事実は、PiUSはリン輸送の本体ではなく、むしろNa/Pi輸送に対する活性化蛋白であることが推察された(8)。しかし、小腸におけるナトリウム依存性リン輸送担体はクローニングされていない。

今回、活性型ビタミンDによる小腸リン輸送活性の促進機序を解明するため、ラットPiUS cDNAのクローニングを行い、ビタミンDのPiUS遺伝子発現に及ぼす作

用について検討した。

## 【研究方法】

### 1. ラットPiUSのクローニング(9)

ラット小腸 cDNA ライブラリー (CLONTECH)を用い、E.coli (C600)を宿主菌として、プラークハイブリダイゼーション法によってスクリーニングを行った。プローブ用のDNA断片は、既に報告されているウサギPiUS cDNAの塩基配列をもとに作成したプライマー 5'-ATGAGCCCAGCCTTCAGGGCCATGG-3' (174~198), 5'-GCGCGTGCCCATCTTGAGGTCCAGG-3' (824~848)を用いてPCR法で増幅した。このDNA断片をメガプライムDNA標識システム (Amersham)を用いてランダムプライマー法により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (ICN社)で標識した。cDNAライブラリー中の  $\lambda$  phageを SM buffer (0.1M NaCl, 16mM MgSO<sub>4</sub>, 50mM Tris/HCl pH7.5, 0.01%ゼラチン)でLB寒天培地 1プレートあたり約  $3 \times 10^4$  pfuとなるように希釈し、E.coli (C600)を宿主菌としてプラークを形成させた。37°Cで一晩培養し、plaqueの形成を確認後、レプリカを製作した。

メンブレンは、Hybod-C extra (Amersham)を使用し、1枚のプレートにつき2枚のレプリカを作成した。1枚目は1分間、2枚目は3分間プレートのアガロース表面にのせ、ファージプラークの一部をメンブレンに移した。これをDNA denaturing solution (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)に1分間浮かべてアルカリ変性させ、Neutralizing solution (1.5M NaCl, 0.5M Tris/HCl pH8.0)に5分間2回、更に3×SSC (0.45M NaCl, 45mM Trisodium Citrate)に5分間浮かべることにより中和した。その後、メンブレンを乾燥させ、80°Cで2時間ベーキングすることによりDNAをメンブレン上に固定した。これを hybridization buffer (50% formamid, 5×SSPE, 5×Denhardt's, 0.7% SDS, 0.1mg/ml サケ精子DNA)を用いて、65°Cで2時間プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを含む hybridization bufferで42°Cで12時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、2×SSC/0.1% SDSで室温5分を3回、1×SSC/0.1% SDSで60°C 10分を2回の洗浄を行い、非特異的なプローブを除去した。メンブレンを乾燥後、バイオイメージングアナライザー BAS-1500を用いてオートラジオグラフィーを行い、陽性クローンを得た。この陽性クローンを完全に単離できるまでスクリーニングを繰り返した。

### 2. 塩基配列の決定

塩基配列の決定はダイレクトシーケンス法を用いて行った。PCR法により増幅したDNAをテンプレートとし、Table.1に示したプライマー5pmolを用い、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)を用いてシーケン

ス反応を行った。反応後サンプルをローディング溶液 (脱イオンホルムアミド: ブルーデキストラン溶液=5:1) に溶かして、6M尿素を含む5% LongRangerゲルにローディングし、電気泳動した。ABI PRISM377DNA Sequencerによる解析を行い、塩基配列を決定した。

### 3. ノーザンブロット

ラットの各組織 (心臓、肺、肝臓、腎臓(皮質・髄質)、空腸、回腸、大腸、骨格筋) のtotalRNA (約20  $\mu$ g) および脳Poly(A)<sup>+</sup>RNA (約5  $\mu$ g) を1%ホルムアミド変性アガロースゲルを用いて電気泳動し、その後ナイロンメンブレンに一晩トランスファーし、UVリンク法によりメンブレン上に固定した。Rapid-hybridization Buffer (Amersham) を用い、65°Cで2時間プレハイブリダイゼーションを行った後、65°Cで7時間ハイブリダイゼーションを行った。その際プローブは、ラットPiUscDNAをメガプライムDNA標識システム (Amersham) と[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (ICN社) を用いてランダムプライマー法にて作製したものを用いた。その後、2×SSPE/0.1% SDSで室温5分間の洗浄を3回、1×SSPE/0.1% SDSで65°C10分間の洗浄を3回行い、イメージングプレート (Fuji Bas-1500) に12時間感光させた後、バイオイメージングアナライザーBAS-1500で解析した。

同様に、PiT-1, PiT-2, VDRはそれぞれのcDNAをプローブに用いて行った。

### 4. ビタミンD欠乏ラットの作成 (10)

Wister系の3週齢雄性ラット (体重約40g) をJapan SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、最初6週間はビタミンD欠乏食 (Diet 11) (11) を、その後の1週間はDiet 11からCaCO<sub>3</sub>を除いたビタミンD・カルシウム欠乏食 (Diet 11-Ca) を自由摂取により与えた。ラットの血中カルシウム、リンおよび1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>値を測定して低カルシウム・低ビタミン状態を確認した後、静脈に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (6.25  $\mu$ g/kg, 体重) を投与した。すべてのラットは組織を摘出する前に一晩絶食させた。

### 5. 刷子縁膜小胞を用いた輸送活性 (12)

刷子縁膜小胞 (BBMV<sub>s</sub>) はCa<sup>2+</sup>沈殿法によりラット小腸から得た。ラット小腸BBMV<sub>s</sub>におけるリンの取り込みはラジオリラベルされたリンの取り込みを急速濾過法により測定した。小胞混濁液 100  $\mu$ l に80  $\mu$ l の Incubation solution (100mM NaCl, 100mM mannitol, 20mM Hepes/Tris, 0.1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を加え、20°Cでインキュベートした。輸送は 1mM ice-cold solution (100 mM mannitol, 20 mM Hepes/Tris, 0.1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM cholin chloride) で止めた。その反応液はただちにバキューム下におかれたフィルターにトランスファーさせ、液体シンチレーターによりリン輸送活性を測定した。

## 【研究結果】

### 1. ラット PiUS のクローニング (Fig.1)

ウサギ PiUS cDNA をプローブとして、ラット小腸より PiUS をクローニングした。得られたクローンは 425 個のアミノ酸をコードし、2カ所の PKA および 6カ所の PKC によるリン酸化部位を有していた。さらに、5カ所の Prenyl group binding site が存在し、RAS 蛋白などと同様、細胞膜の内側に Prenyl 基を介して結合していることが予想された。また、ウサギ PiUS とそのアミノ酸配列を比較すると、95% の高い相同性が見られた。

### 2. ノーザンブロット解析 (Fig.2)

ラット PiUS の発現組織を調べるために、ノーザンブロット解析を行った。Fig.2 に示すように、その転写産物は約 2.0, 4.0 および 5.0 kb のサイズを有していた。発現は小腸を含む検討した全ての組織に認められた。

### 3. ビタミン D 欠乏ラット小腸 BBMVs におけるリン輸送活性 (Fig.3)

ビタミン D 欠乏ラット小腸より調整した BBMVs を用いて、リン輸送活性を測定した。その結果、活性型ビタミン D 投与 24 時間後に Na/Pi 輸送活性は投与前の約 7 倍に上昇した。しかし、Na 非存在下で測定したリン輸送活性は変化しなかった。

### 4. mRNA 量の経時的変化 (Fig.4)

これまで報告されているラット Na/Pi 輸送担体 cDNA プローブ (RNapi-1, Napi-2, rPiT-1, rPiT-2) を用いて、小腸での発現を検討したところ、III 型の PiT-1 および PiT-2 が発現していた。そこで、ビタミン D 欠乏ラット小腸における各輸送担体 mRNA 量の経時的変化を検討した。その結果、PiT-1 は活性型ビタミン D 投与 12 時間後にわずかな上昇がみられたが、24 時間から 48 時間後までは有意な変化はみられなかった。一方、PiT-2 は投与 24 時間および 48 時間後に mRNA 量は著しく増加した。しかし、PiUS は投与 24 時間後に mRNA 量は著明に低下した。

## 【考察】

小腸におけるリンの吸収機構を解明するためにリン輸送活性化蛋白であるラット PiUS cDNA をクローニングした。ラット PiUS cDNA は 425 個のアミノ酸をコードし、ウサギ PiUS のアミノ酸配列と比較すると 95% の相同性が認められた(8)。また推定膜貫通領域および糖鎖付加部位は存在しておらず、2カ所の PKA および 6カ所の

PKCによるリン酸化部位を有していた。さらに、5カ所のPrenyl group binding siteが存在し、RAS蛋白などと同様、細胞膜の内側にPrenyl基を介して結合していることが予想された。このようなPiUSの特性は、基底膜における様々なシグナルを、細胞膜内側に局在するPiUSのリン酸化部位を介して、本来のリン輸送担体に伝達しうる機能を有している可能性が考えられた。ラットPiUS mRNAの組織分布は、空腸、回腸の他、検討した全組織に発現が確認された。またラットPiUSのサイズは約2.0 kb, 4.0 kbおよび5.0 kbであり、各転写産物の比率が各組織ごとに異なることより、組織特異的な転写およびプロセッシングを受けている可能性が示唆された。このような性質は、ウサギPiUSにも確認された(8)。

PiUSのような輸送担体に対する活性化蛋白は他の輸送システムでも報告されている(13)。たとえば、中性塩基性アミノ酸輸送機構では、neutral basic amino acid transporter (NBAT)という膜貫通一回の活性化蛋白が存在し、本来の輸送担体と相互作用することでその機能を調節している(13)。一方、PiUSは膜貫通領域を有さないことより、Prenyl基を介して細胞質側から本来のリン輸送担体の機能を調節していることが考えられた。

今回、ビタミンD欠乏ラットの小腸BBMVを用いて、リン輸送活性におよぼす活性化型ビタミンD投与の作用を経時的に検討したところ、投与24時間後にNa/Pi輸送活性の有意な上昇が確認された。これらは、ビタミンD欠乏ニワトリ小腸により報告されている結果と一致した(14, 15)。次に、ラット小腸におけるI型、II型およびIII型のNa/Pi輸送担体 cDNAの発現を検討した結果、III型のPiT-1およびPiT-2の発現が確認できた。III型Na/Pi輸送担体は、レトロウィルスレセプターとしてクローニングされ、その発現は小腸に限らず、脳や骨にも発現している(7)。最近、BoyerらはIII型輸送担体の抗体を作成し、腎、脳および心臓における局在を報告している(16)。しかし、各組織において細胞内の局在性は未だ不明である。ビタミンD欠乏ラット小腸におけるこれら輸送担体の mRNA量の経時変化を検討した結果、小腸リン吸収能の亢進はPiT-2 mRNA量の上昇と一致していた。以上より、PiT-2が腸管でのビタミンDに反応するリン輸送担体の一つと考えられた。

#### 【今後の課題】

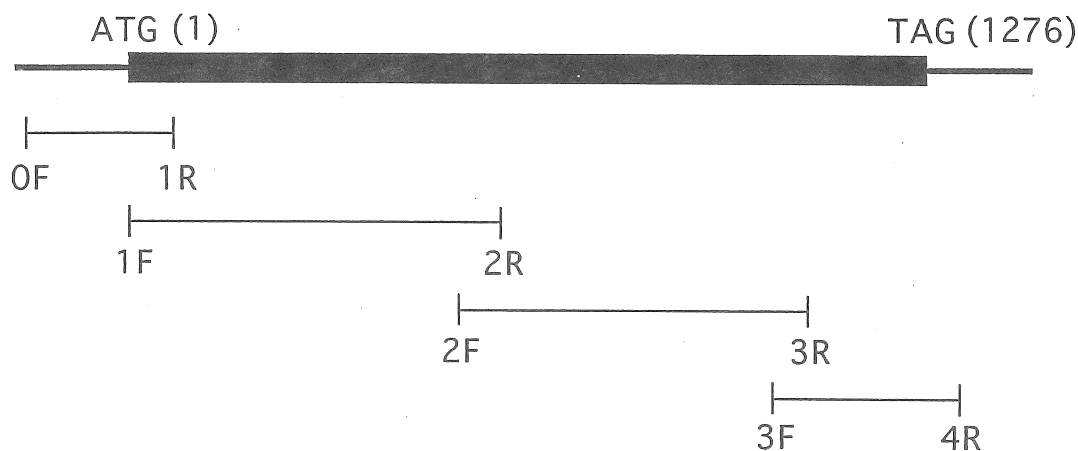
PiT-2の局在部位およびPiUSが小腸Na/Piリン輸送機能を調節する分子機構を明らかにすることが重要と考えられる。

#### 【文献】

1. Berner W, Kinne R and Murer H: Phosphate transport into brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biochem J* 160: 467-474, 1976.

2. Borowitz SM and Ghishan FK: Maturation of jejunal phosphate transport by rat brush border membrane vesicles. *Pediatr Res* 19: 1308-1312, 1985.
3. Rizzoli R, Fleish H and Bonjour J-P: Role of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on intestinal phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. *J Clin Invest* 60: 639-647, 1977.
4. Chen TC, Castillo L, Korycka-dahl M and Deluca HF: Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine. *J Nutr* 104: 1056-1060, 1974.
5. Ghishan FK: Phosphate transport by plasma membranes of enterocytes during development: role of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Am J Clin Nutr* 55: 873-877, 1992.
6. Biber J, Custer M, Magagnin S, Hayes G, Werner A, Lotscher M, Kaissling and Murer H: Renal Na/Pi-cotransporters. *Kidney Int* 49: 981-985, 1996.
7. Kavanaugh MP and Kabat D: Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter /retrovirus receptor family. *Kidney Int* 49:959-963, 1996.
8. Norbis F, Boll M, Stange G, Markovich D, Verrey F, Biber J and Murer H: Identification of a cDNA/protein leading to an increased Pi-uptake in *Xenopus leavis* oocytes. *J. Membrane Biol.*, 156, 19-24, 1997.
9. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular cloning* 2nd ed. Cold Spring Harbor lab. Press, 1989.
10. Kimura T, Okano T, Tsugawa N, Okamura Y and Kobayashi T: Effects of dietary supplementation of calcium and vitamin D on bone growth in growing male rats. *J Bone Miner Met* 12 (Suppl 1): S7-S11, 1994.
11. Suda T, Deluca HF and Tanaka Y: Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats. *J Nutr* 100: 1049-1052, 1970.
12. Fayez K, Ghishan and Wilson FA: Developmental maturation of D-glucose transport by rat jejunal brush border membrane vesicles. *Am J Physiol* 248: G87-G92, 1985.
13. Miyamoto K, Segawa H, Tatsumi S, Katai K, Yamamoto H, Taketani Y, Haga H, Morita K and Takeda E: Effects of truncation of the COOH-terminal region of a Na<sup>+</sup>-independent neutral and basic amino acid transporter on amino acid transport in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 271: 16758-16763, 1996.
14. Fuch R and Peterlik M: Vitamin D-induced phosphate transport intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 98: 87-92, 1980.
15. Murer H and Hildmann B: Transcellular transport of calcium and inorganic phosphate in small intestinal epithelium. *J Physiol* 240: G409-G416, 1981.
16. Boyer CJC, Baines AD, Beaulieu E and Beliveau R: Immunodetection of a type III sodium-dependent phosphate cotransporter in tissues and OK cell. *Biochem Biophys Acta* 1363: 73-83, 1998.





Primers	Sequence	Position (5': 3')
0F	CGAACAATAGGACGGAAACGCC	(-153 : -132)
1R	TGGTGAACAAAGGGCTCCAG	(74 : 55)
1F	ATGAGCCCAGCCTTCAGGGCCATGG	(1 : 25)
2R	GCGCGTGCCCATCTTGAGGTCCAGG	(675 : 651)
2F	CGCAAAGCATCGGAACCAGTAC	(579 : 560)
3R	GCAGGTGGTGTGTGCAAAGTCG	(1164 : 1143)
3F	GTGCCTATGCCTACAAACCCA	(1091 : 1111)
4R	TAAAAGACTCCAAGCGCAGC	(1448 : 1429)

Table.1 Primers for rat PiUS cDNA cloning

```

Rabitt      1 MSPAFRAMDVEPRTKGILLEPFVHQVGGHSCVLRFNETHLCKPLIPREHQFYETLPAEMRKFTPOYKGVVSVCFEEDR 80
*****
Rat         1 MSPAFRAMDVEPRTKGILLEPFVHQVGGHSCVLRFNETHLCKPLVPREHQFYETFPAMRRFIPQYKGVVSVRFEEDR 80
*****

Rabitt      8 INLCILAYPLKGDHGTVDLVDNSDCEPKSKVLRWTKKHHVLESEKTPKEWVRQHRKEEKMKSHKLEEFELWKKSEVLYI 60
*****
Rat         8 INLCILAYPLKGDHGPVDIVDNSDCEPKSKLLRWTNKKHHVLETEKSPKDWVRQHRKEEKMKSHKLEEFELWKKSEVLYI 60
*****

Rabitt      16 ISVEKKGNVSSQLKHYNPWSMKCHQQLQRMKENAKHRNQYKFI LLENLTSRYEVP CVLDLKMGTFRQHGDDASEEKAANQ I240
*****
Rat         16 ISVEKKGTVSSQLKHYNPWSMKCHQQLQRMKENPKHRNQKFI LLENLTCRYEVP CVLDLKMGTFRQHGDDASEEKAANQ I240
*****

Rabitt      24 IRKCOQSTSAVIGRVCGMQVYQAGSGQLMFMNKYHGRKLSVQGFKEALFQFFHNGRYLRRRELLGVPV LKLAELKAVLERQ320
*****
Rat         24 IRKCOQSTSAVIGRVCGMQVYQAGTGQLMFMNKYHGRKLSVQGFKEALFQFFHNGRYLRRRELLGVPV LKLLTELKALLERQ320
*****

Rabitt      32 IESYRFYSSLLVIYDGKEWPEVALDSDAEDLEDLSEESADESAGAYAYKPIGASVDVRMIDFAHTTCRLYGEDSVVHEG400
*****
Rat         32 IESYRFYSSLLVIYDGKEWPEVTLSDAEDLEDLSEESADESAGAYAYKPIGASMDVRMIDFAHTTCRLYGEDSVVHEG400
*****

Rabitt      401 QDAGYIFGLQSLIDIVTEISEDSGE Term 425
*****
Rat         401 QDAGYIFGLQSLIDIVTEISEESGE Term 425
*****

```

Fig.1 Comparison of amino acid sequence of rabbit and rat PiUS

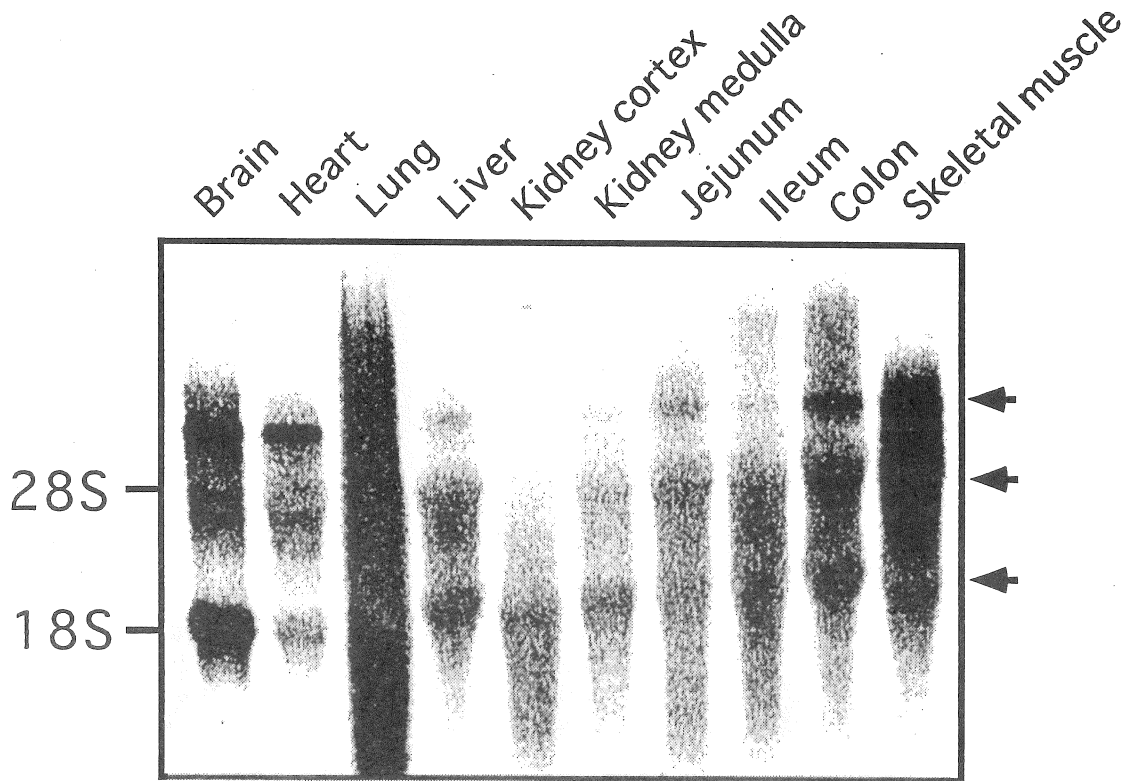


Fig.2 Tissue distribution of rat PiUS mRNA

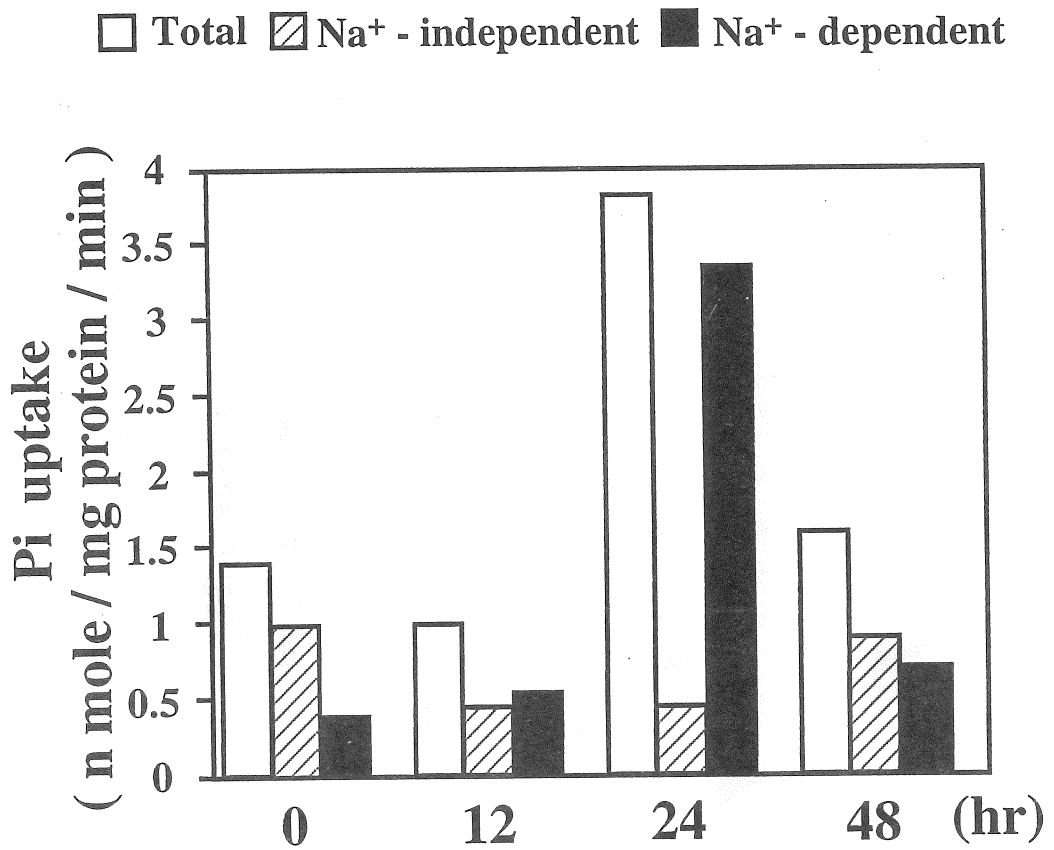


Fig.3 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> administration on Pi transport activity in brush border membrane vesicles isolated from vitamin D deficient rat intestine

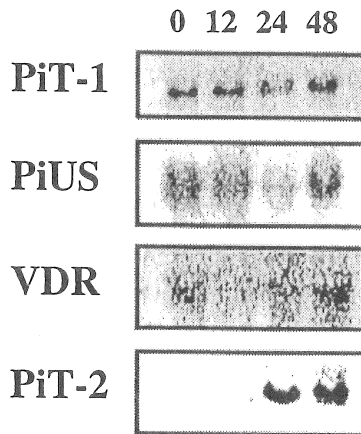
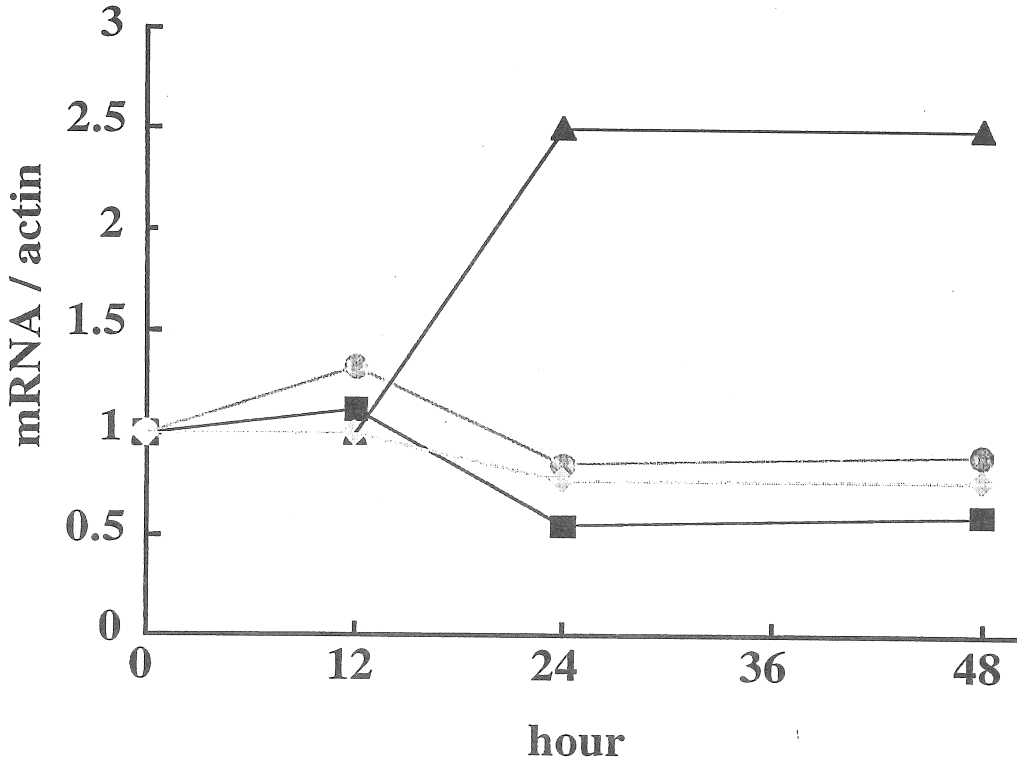


Fig.4 Effect of 1,25(OH)2D3 administration on mRNA levels of PiT-1, PiT-2, PiUS and VDR in vitamin D deficient rat intestine

● : PiT-1 mRNA, ▲ : PiT-2 mRNA, ◆ : PiUS mRNA,  
 ■ : VDR mRNA

## Identification of intestinal sodium dependent phosphate transporter and its activation by vitamin D

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

### Summary

Transcellular inorganic phosphate (Pi) in the small intestine is increased in animals with increased 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) levels. Three sodium dependent phosphate (Na/Pi) transporters have been identified as type I and II mainly expressed in renal proximal tubule and type III ubiquitously expressed in many organs. Recently, Murer et al have cloned from a rabbit small intestinal cDNA library a novel cDNA (PiUS) encoding a protein stimulating Na/Pi uptake into *Xenopus laevis* oocytes, but which is not a Na/Pi transporter itself. In this study, Na/Pi transporters expressed in intestine were identified and the mechanism by which vitamin D stimulated intestinal Na/Pi transport was elucidated in the rat.

We have used homology cloning technique to search for rat cDNA using rabbit PiUS cDNA as a probe. The identified rat PiUS cDNA codes for a protein of 425 amino acids. Hydropathy analysis suggests a lack of transmembrane segments. The derived protein sequence has multiple consensus sites: For cyclic nucleotide dependent kinase (2 sites), for protein kinase C (6 sites) and for prenyl group binding site (5 sites). The expression of type III Na/Pi transporters such as PiT-1 and PiT-2 were also observed in rat intestine and the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on Na/Pi transport activity and on the expression of related molecules were investigated. Administration of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> into vitamin D deficient rat lead to 7-fold stimulation of intestinal Na/Pi uptake. After 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> administration, PiT-1 mRNA level slightly increased at 12 h but not changed at 24 h and 48 h, PiT-2 mRNA level significantly increased at 24 h and 48 h. However, rat PiUS mRNA level was not affected by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

It is concluded from present study that PiT-2 is regulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and that PiUS is suggested to be Na/Pi transport regulating protein in rat intestine.