

9838 骨形成に関与するナトリウム依存性リン輸送担体遺伝子の同定 ：破骨細胞におけるナトリウム依存性リン輸送担体

助成研究者：宮本 賢一 (徳島大学 医学部 栄養学科)
共同研究者：森田 恭子 (徳島大学 医学部 栄養学科)
竹谷 豊 (徳島大学 医学部 栄養学科)

骨は、無機リン (Pi) をハイドロキシアパタイト $[(Ca_3(PO_4)_2)_3Ca(OH)_2]$ として Ca とともに貯蔵している体の支持組織であり、成長が停止した後も活発な代謝回転を行っている。この代謝は、破骨細胞によって行われる骨吸収と、骨芽細胞によって営まれる骨形成の両者から成り立っている。このような骨のリモデリングのバランスの破綻は、骨粗鬆症の発症の原因と考えられる。骨リモデリングにおいて破骨細胞の果たす役割は大きいですが、それを高純度で単離し、機能を詳細に解析することは困難であった。本研究では、最近発見された破骨細胞誘導因子を用い、純度の高い破骨細胞を調整すると共に、破骨細胞が骨吸収時に高いエネルギー要求性があることに着目して、ATPの合成に必要なナトリウム依存性Piの輸送担体について検索を試みた。

これまで報告されている、Type I-III リン輸送担体 cDNA 配列を用いて、ウサギ破骨細胞にウサギ腎 II 型 Na^+ 依存性リン輸送担体 (NaPi-6) と完全に一致する配列 (538bp) を確認できた。また、ラット破骨細胞から調整した RNA において、II 型 Na^+ 依存性リン輸送担体 (NaPi-2) は検出できなかったが、相同性のある DNA 断片の増幅が見られた。この DNA 断片をサブクローニングし塩基配列を決定すると、NaPi-2 遺伝子の一部のイントロンをエクソンとして使用していた。また、RT-PCR で増幅できない領域もあることから、破骨細胞 Na/Pi は NaPi-2 と同一のものではなく、NaPi-2 と類似した構造であると考えられた。また破骨細胞前駆細胞では同じプライマーからはバンドが検出されなかった。従って、破骨細胞に発現する NaPi-2 アイソフォームは、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞に分化・融合・活性化される段階において、リン輸送システムが発現すると考えられた。以上より、破骨細胞には腎における中心的なリン輸送担体である、II 型輸送担体に類似の蛋白が細胞内へのリン輸送に関与していることが示唆された。

9838 骨形成に関与するナトリウム依存性リン輸送担体遺伝子の同定 ：破骨細胞におけるナトリウム依存性リン輸送担体

助成研究者：宮本 賢一 (徳島大学 医学部 栄養学科)

共同研究者：森田 恭子 (徳島大学 医学部 栄養学科)

竹谷 豊 (徳島大学 医学部 栄養学科)

「研究目的」

骨は、無機リン (Pi) をハイドロキシアパタイト $[(Ca_3(PO_4)_2)_3Ca(OH)_2]$ として Ca とともに貯蔵している体の支持組織であり、成長が停止した後も活発な代謝回転を行っている。この代謝は、破骨細胞によって行われる骨吸収と、骨芽細胞によって営まれる骨形成の両者から成り立っている。この骨代謝 (骨のリモデリング) は正常時においては、そのバランスが平衡に保たれている。骨吸収をつかさどる破骨細胞は、接着面に波状縁を持ちそこに存在するプロトン (H^+) ポンプから H^+ を放出する。その酸性下で骨の融解が起これ、骨基質であるコラーゲンや Ca, Pi などは、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれ、トランスサイトーシス、エクソサイトーシスという小胞輸送を介して、外側基底膜側から細胞外へ分泌される (1)。これらの骨吸収機構に際して、多くのエネルギーを必要とし、その需要に対して細胞内の ATP プールを恒常的に補充することが必要になる。その中心となるのが、細胞膜に存在する Na^+ 依存性リン輸送担体 (Na/Pi) である (2)。 Na/Pi には、I型、II型、III型があり、II型 Na^+ 依存性リン輸送担体 ($NaPi-2$) は Na^+ 依存的に、また pH 依存的に Pi の輸送活性を持つことが知られている (3)。これらのリン輸送担体は腎近位尿細管での Pi の再吸収に中心的役割を果たしている。また最近、小腸における Na^+ 依存性リン輸送担体として、II型に非常に相同性のある IIb型の同定がなされた (4)。I型は腎臓で発現しており薬物、アニオンのトランスポーター (5)、III型はウイルスレセプター (Glv-1 : gibbon ape leukemia virus, Ram : murine amphotropic retrovirus) として機能している (6)。III型 Na^+/Pi である $NaPi-1$ は骨髄に多く発現しており、また骨芽細胞様細胞における Na^+ 依存性リン輸送担体として骨形成に関わっている (7,8)。しかしながら、骨形成の引き金となる破骨細胞のリン輸送系は全く不明である。

そこで、骨のリモデリングに重要である破骨細胞 Na^+ 依存性リン輸送担体の検索を目的に実験を行った。破骨細胞は本来、骨芽細胞からの因子を受けてその分化、融合、活性化が行われるため、破骨細胞単独での培養が困難であったが、最近、破骨細胞形成因子 : RANKL が同定された (9)。そこで、可溶性 RANKL ともう1つの形成因子 M-CSF を破骨細胞前駆細胞に添加することで、破骨細胞の生成することが可能となった。本研究では、ラ

ット破骨細胞をもちい、各種リン輸送担体cDNAをプローブとしてリン輸送担の検索を行った。

「研究方法」

1.破骨細胞の単離法 (Fig.1)

ラット破骨細胞を調整し、間質細胞およびマクロファージをカラムsephadexG-10に通し除去した後、破骨細胞形成因子であるM-CSF,RANKLを添加して培養を行った(Fig.1)。

2.RNAの調整

ラットから得られた破骨細胞にISOGEN(WACO)を加え、吸引・噴出し、クロロホルムで分離した上層をイソプロパノール沈殿した後、80%エタノールで洗浄した。その後、RNase freeのDEPC waterで溶解させ、抽出されたRNAを用いてアガロースゲルで電気泳動を行った。

3.ノーザンブロット

ラットの破骨細胞、空腸、腎臓total RNA(20 μ g)を1.2%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NYLON TRANSFER MEMBRANE(Amersham)に高塩溶液でトランスファーし、紫外線照射により固定した。プローブとしてtypeII Na⁺/Pi、小腸で同定されたtypeIIb Na⁺/Pi cDNAの全長を³²Pでラベルして、65 $^{\circ}$ C 4時間のハイブリダイゼーションを行った。このフィルターを65 $^{\circ}$ C 5分2 \times SSCP、0.1%SDS、65 $^{\circ}$ C 10分0.5 \times SSCP、0.1%SDSで洗浄した。フィルターの放射活性は、イメージングプレート(Fuji BAS-1500)に約6時間露光させ解析を行った。

4.ラット破骨細胞および破骨細胞前駆細胞RNAを用いたRT-PCR

ラット破骨細胞および破骨細胞前駆細胞totalRNAを逆転写酵素を用いてcDNAに合成した。NaPi-2に対する特異プライマーを用いて(Table 1)、Robocycler(STRATAGENE)で反応を行った。Table 1に増幅に用いたプライマーの配列と増幅領域を示した。1、5における領域はNaPi-2のN末およびC末側の抗体認識領域を含むDNA断片が増幅されるようにプライマーを設定した。増幅バンドの確認は8%polyacrylamidegelにより分析を行った。破骨細胞前駆細胞については、M-CSF、RANKを添加せずに培養した前駆細胞RNAを用いてA(a,b),D(g,h)のプライマーを結合させて増幅した。

5.シーケンシング法

RT-PCRから得られた4つのDNA断片のうちN末側の断片をEasy T vector(Promega社)にサブクローニングし、Thermal Cycle Sequencing Kit(NEW ENGLAND)を用いて、M13 Forward,Reverse/IRD41(LIC-4000-20A,21A)プライマーでPCR[95 $^{\circ}$ C 5min(変性)-1サイクル、95 $^{\circ}$ C 20sec(変性),60 $^{\circ}$ C 20sec(アニーリング),72 $^{\circ}$ C 20sec(伸長)-20サイクル]反応を行い、増幅した。各増幅断片をDNAシーケンサーModel 4000 シリーズ Base Imager Software Version 2.10(LI-COR社)にて、塩基配列を決定した。

「研究結果」

1. ラット破骨細胞のRNA抽出解析

確立した単離法により得たラット破骨細胞から抽出したRNAをアガロースゲルで電気泳動したところ、rRNAの28s(約4.7kb)と18s(約1.8kb)のバンドが確認でき、ラット破骨細胞からのRNAが分解することなく調整できた。得られたRNAをノーザンブロットに用いた(Fig. 2)。

2. 破骨細胞におけるノーザンブロット解析

1で抽出されたラット破骨細胞、空腸、腎臓のRNAを用い、ラット腎II型 Na^+ 依存性リン輸送担体(NaPi-2)と、小腸で同定されたNaPi-2に相同性の高いIIb型NaPiのプロープを用いて解析を行ったところII型は腎臓に発現し、IIb型については空腸のみに発現していた。

以上より破骨細胞には、II型、IIb型のどちらにもtotal RNAでの転写産物を確認することはできなかった(Fig. 3)。

3. NaPi-2特異プライマーによる破骨細胞のRT-PCR

プライマーa,bによって得られる199bp、c,dによって得られる279bp、e,fによって得られる323bp、g,hによって得られる329bpの領域すべてに腎臓と同じサイズのバンドが検出された。また、そのサイズより大きいサイズにもイントロンを含んでいると考えられるバンドが検出された。(Fig.4)

4. 破骨細胞に発現する Na^+ 依存性リン輸送担体の塩基配列の解析

プライマーa,bで得られるDNA断片のシークエンスの結果をラットNaPi-2の塩基配列とホモロジー検索したところ、エクソンの領域ではほぼ100%の相同性があり、イントロンの保存が確認できた。このイントロン領域は、核酸で117bp(+129-+245)、アミノ酸配列では39アミノ酸(+37-+75)を翻訳している。(Fig.5)

5. NaPi-2特異プライマーによる破骨細胞前駆細胞のRT-PCR

プライマーはa,b,g,hを用いて3と同様にRT-PCRを行ったところ、199bpと329bpのバンドはM-CSF,RANKRLを添加せずに培養した破骨細胞前駆細胞では検出されなかった。(Fig.6)

「考察」

骨のリモデリングにおいてリンのトランスポーターの重要性が認識されつつある。破骨細胞は骨吸収時に大量のエネルギー(ATP)合成の促進が必要となり破骨細胞のリン能動輸送機構は、ATP合成の基質の供給役として破骨細胞に必須の機構であると言われている。破骨細胞は、骨の接着面に波状縁ができ骨吸収を行う状態になると、腎近位尿管細胞や小腸と同様、極性のある細胞となる。破骨細胞をin vitroで単離し、骨片に吸着させると、

リン吸収活性が増加する。また、リントランスポーターの阻害剤は、骨吸収能を低下させ、II型Na⁺依存性リン輸送担体(NaPi-2)の抗体は、破骨細胞のリンのトランスポーターと反応するという報告もある(2)。そこで今回、破骨細胞におけるNa⁺依存性リン輸送担体(NaPi)の検索を行ったところ、II型ともIII型の発現は確認されなかった。しかしながら、II型と高い相同性のある分子が確認されたため、破骨細胞にはII型様のNaPiの存在(NaPi-2OC)が考えられた。

リンの能動輸送は、Na⁺輸送と共役することが必須である。このNa⁺依存性リン輸送担体にはI型(5)、II型(10,11)、III型(12,13)の分子がすでに明らかにされている。破骨細胞にもII型に類似したトランスポーターの存在が示唆されているが、II型およびIIb型の特異プローブを用いてノーザンブロット解析をおこなったが、どちらのプローブも破骨細胞のNa⁺/Piを検出することはできなかった。最近、骨芽細胞様細胞(SaOS-2 osteoblast-like cells)においてIII型に分類されているNa⁺依存性リン輸送担体PiT1が発現することを報告した(8)。そこで、III型の破骨細胞における発現についてもII型と同様に特異プライマーを用いて、RT-PCR法により検索を行ったところ、破骨細胞にも腎臓で検出されるサイズと同じ領域(199bp,279bp,323bp,329bp)とイントロンを含む形で増幅されていると思われるDNA断片を検出した。これらの断片の一つN末領域の塩基配列を解析すると、エクソン領域ではほぼ完全にラットNaPi-2と一致しており、NaPi-2では保存されていない117bpのイントロン部位を翻訳する分子であることが分かった。また、III型においてRT-PCR法ではラット腎と同じサイズにバンドが検出されたが、その塩基配列をIII型トランスポーターであるGlv-1とホモロジー検索を行っても高い相同性が見られなかった。これらの結果より、破骨細胞に発現するNa⁺/Piは、II型遺伝子におけるスプライシングの異なるアイソフォームである可能性が示唆された。

破骨細胞のリントランスポーターは細胞内のエンドゾームに局在し、骨吸収の開始と同時に細胞膜へ移動する(2)。今回、破骨細胞前駆細胞におけるNaPi-2OCの発現をRT-PCR法を用いて検索したところ、破骨細胞に分化する前の段階では、NaPi-2OCの発現は見られなかった。破骨細胞前駆細胞はM-CSFがそのレセプターに、ODF/RANKLがODF/RANKレセプターに結合することで、破骨細胞に分化・融合・活性化される(9)。以上のことより、破骨細胞NaPi-2OCは成熟破骨細胞になった段階で、外側基底膜側に発現していることがわかった。これは、ODF/RANKLがレセプターに結合するシグナルが、破骨細胞におけるNaPi-2OCの遺伝子発現調節をしていることも示唆された。

「今後」の課題

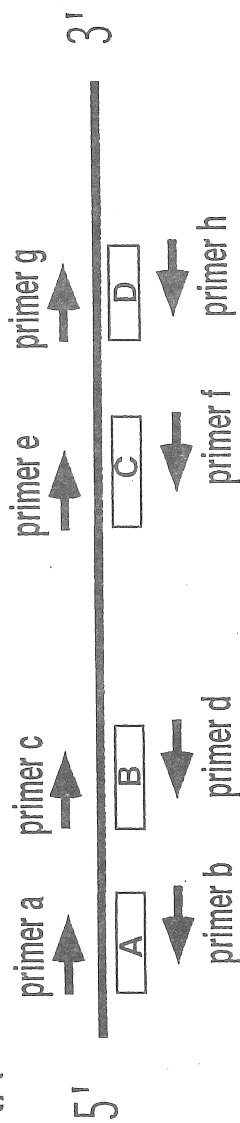
NaPi-2OCの全長のクローニングを行い、機能を明らかにする必要がある。

「文献」

- 1) Palokangas, H., Mulari, M., Vaananen, H. K.: Endocytic pathway from the plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *Journal of cell science*, 110:1767-1780, 1997
- 2) Gupta, A., Li Cuo, X., Alvarez, M. U., Hruska A. K.: Regulation of sodium-

- dependent phosphate transport in osteoclasts. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 100, Number 3, August: 538-549, 1997
- 3) Magagnin, S., Werner, A., Markovich, D., Sorribas, V., Stange, G., Biber, J., Murer, H.: Expression cloning of human and renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, July: 5979-5983, 1993
- 4) Ailfiker, H., Hauer, H.O., Traebert, M., Forster, I., Murer, H., Biber, J.: Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, November: 14564-14569, 1998
- 5) Yabuuchi, H., Tamai, I., Morita, K., Kouda, T., Miyamoto, K., Takeda, E., Tsuji, A.: Hepatic sinusoidal membrane transport of anionic drugs mediated by anion transporter Npt1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286: 1391-1396, 1998
- 6) Miyamoto, K., Sonoda, T., Yamamoto, H., Minami, H., Taketani, Y., 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
- 7) Palmer, G., Zhao, J., Hofstetter, W., Caverzasio, J.: In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone*, 24: 1-7, 1999
- 8) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3597-3602, 1998
- 9) Werner, A., Moore, M.S., Mantei, N., Biber, J., Semenza, G., Murer, H.: Cloning and expression of cDNA for Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9608-9612, 1991
- 10) Murer, H., Biber, J.: A molecular view of proximal tubular inorganic phosphate (Pi) reabsorption and of its regulation. *Pflüger Arch-Eur. J. Physiol.* 433: 379-389, 1997
- 11) Helps, C., Murer, H., McGivan, J.: Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding a putative sodium dependent phosphate transporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1. *Eur. J. Biochem.* 228: 927-930, 1995
- 12) Cross, S.H., Debiec, H., Peterlik, M.: Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner Electrolyte Metab.* 16: 115-124, 1990
- 13) Kavanaugh, P.M., Miller, G.D., Zhang, W., Law, W., Kozak, L.S., Kabat, D., Miller, D.A.: Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7071-7075, 1994

NaPi-2 cDNA



Oligonucleotide primer	Sequence	Position
A	primer a GGAGCTGAGCCATAGTCAAGGACTC primer b CCACCTATGCCATCTCCAGTCTGAG	199bp (from 13 to 211)
B	primer c CACCATTGTGGCCCTGATGCAGGGC primer d CTGTGATTACCAGCATTGCCGTGGG	279bp (from 650 to 928)
C	primer e CCTGAGGGAATCACAGTCTCATTCC GG primer f CACTTGGGTCCACAGGCTACTTTG	323 bp (from 938 to 1260)
D	primer g CGGGCACCTCCCCAAGTGGCTGCAG primer h CACCACAATGCCACCCGGCTCTAGG	224 bp (from 1745 to 1968)

Table 1 破骨細胞RNAによるRT-PCRに用いた、NaPi-2(TypeII)特異プライマー

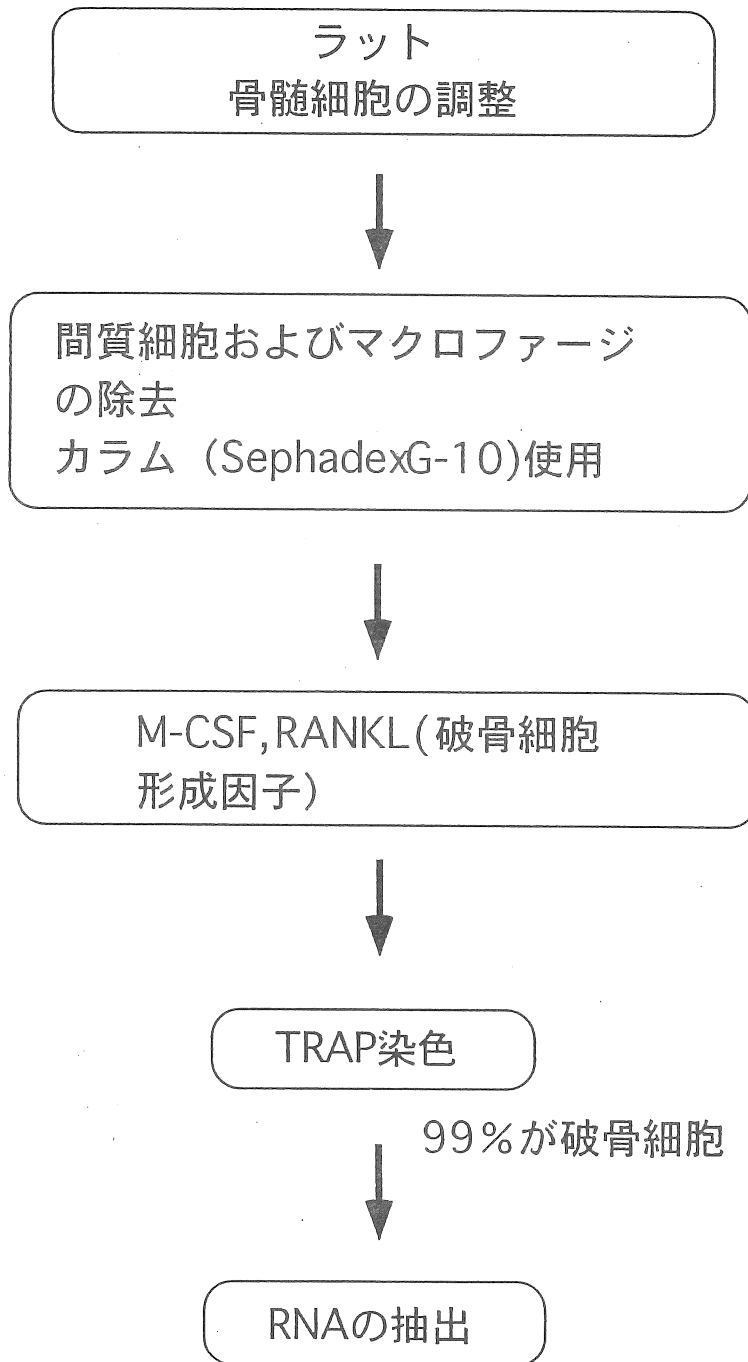


Fig.1 破骨細胞単離方法

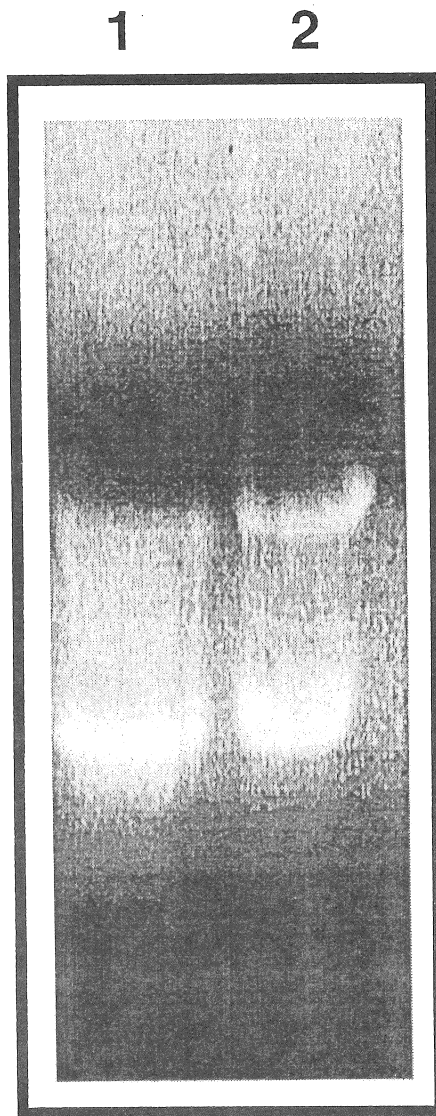


Fig. 2 破骨細胞total RNAの単離
Lane1. 腎臓皮質、Lane2.破骨細胞

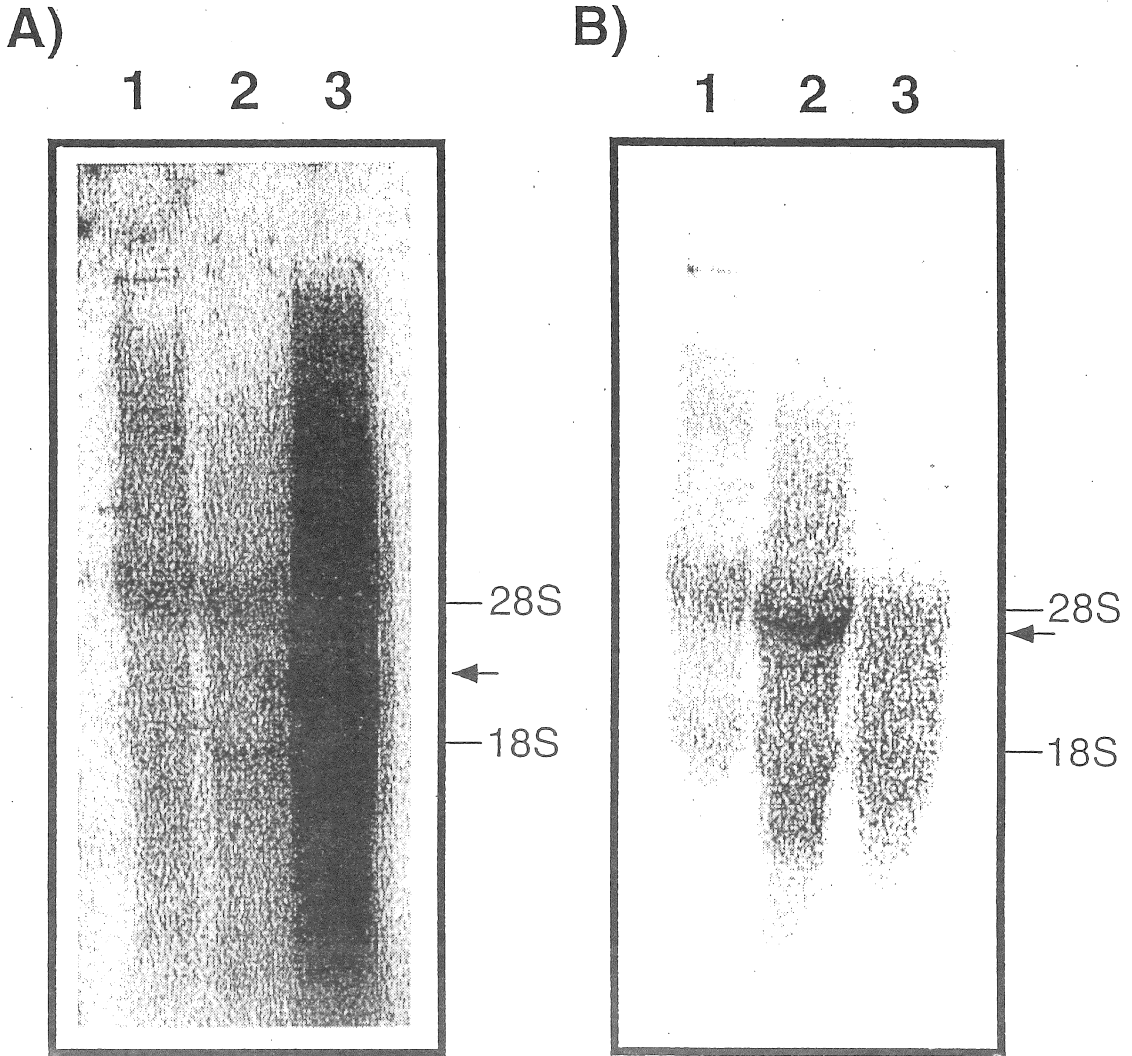


Fig.3 ノーザンブロット法を用いた破骨細胞RNAにおける、
Na⁺依存性リン輸送担体転写産物の検索

Lane 1. 破骨細胞 total RNA、Lane 2. 空腸 total RNA、
Lane 3. 腎臓皮質 total RNAであり各々、20 μ g/lane

A) NaPi-2 (type II) 特異プローブ を用いた結果、Lane 3に
のみバンドが検出された。B) NaPi-2b (type IIb) 特異プローブを
用いた結果、Lane 2にのみバンドが検出された。

両者共に、破骨細胞total RNAでの転写産物は確認できなかった。

A) Primer 設定

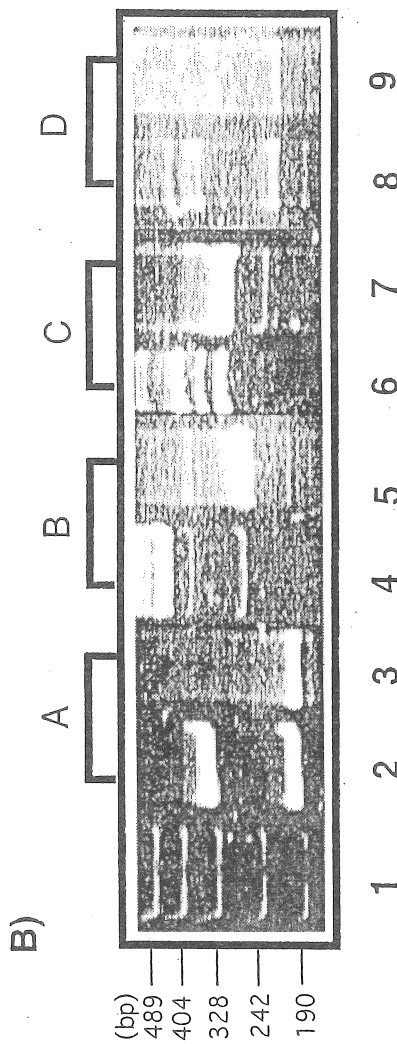
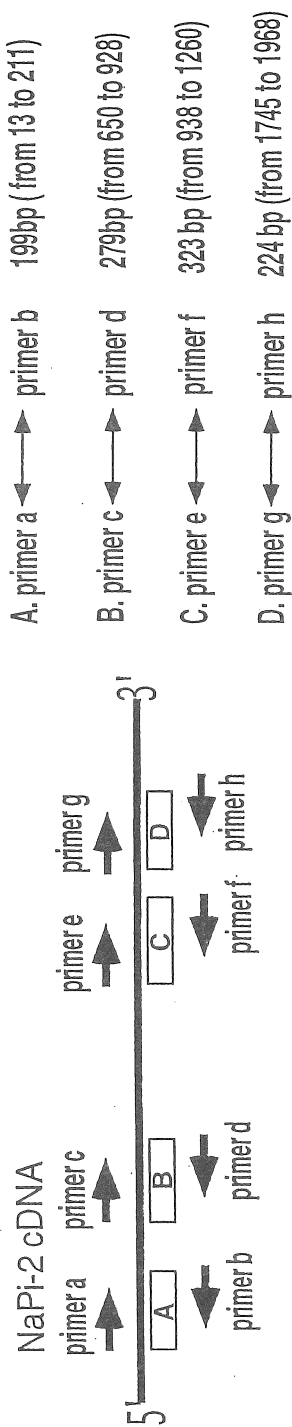


Fig.4 破骨細胞RNAによるRT-PCR
 A) RT-PCRに用いた、NaPi-2(TypeII)特異プライマー
 B) 8%ポリアクリルアミドゲルをもちいた、PCR産物の泳動
 Lane1 はマーカ、Lane2、4、6、8は破骨細胞RNAを用いたRT-PCR。Lane3、5、7、9は腎臓RNAを用いたRT-PCR。

A

```

NaPi-2OC      1'          CTCATTGTGGGTGCCCATCATGATGT
                *****
NaPi-2        1 "AGCAGTCGAGCTGGAGCTGAGCCATAGTCAAGGACTCATTTGTGGGTGCCCATCATGATGT
NaPi-2OC     27 'CCTACAGCGAGAGATTGGGGGGACCGGCTGTCTCCCCACTTCCAGTCCGTGGGAGACACA
                *****
NaPi-2        61 "CCTACAGCGAGAGATTGGGGGGACCGGCTGTCTCCCCACTTCCAGTCCGTGGGAGACACA
NaPi-2OC     87 'TGGTGCATGGGGCAGCCTTTGCTTATGTCCCCAGCCACAAGGTAAGCATCACTCCCATA
                *****
NaPi-2       121 "TGGTGCATGGGGCAGCCTTTGCTTATGTCCCCAGCCACAA-----
NaPi-2OC    147 'CCGAGGCCTGTGTCCACAGTTGCCTACTGTGTCCCTCTACCTATTTCTCCTGGGCTG
NaPi-2       -----
NaPi-2OC    207 'CTGAGGCCTCTGAGAACTCCAATCAGACTCCCTCCTCAGAGTCCTGCACAGGATTCCTGG
                *****
NaPi-2       162 -----TCCTGCACAGGATTCCTGG
NaPi-2OC    267 'GACAACCACCTATGCCATCTCCAGTCTGAGCCCGGTAGCCCTCACAGAGCACAGCTGTCC
                *****
NaPi-2       183 'GACAACCACCTATGCCATCTCCAGTCTGAGCCCGGTAGCCCTCACAGAGCACAGCTGTCC
NaPi-2OC     334' CTATGGGGAG
                *****
NaPi-2       243 "CTATGGGGAGTCTGGAATGTCATGACCCGCTCCCTGCCAAGCTGGCCAGGAAG
    
```

B

```

NaPi-2OC     1' MMSYSERLGGPAVSPLPVRGRHMVHGAAFAYVPSQKHHSHTEACCPTVAYCCPSTYFS
                *****
NaPi-2       1 " MMSYSERLGGPAVSPLPVRGRHMVHGAAFAYVPSQ-----
NaPi-2OC     61' WAAEASENSNQTPSSVLHRIPGTTTYAISSLSPVALTEHSCPYPE
                *****
NaPi-2       61" -----VLHRIPGTTTYAISSLSPVALTEHSCPYPE
    
```

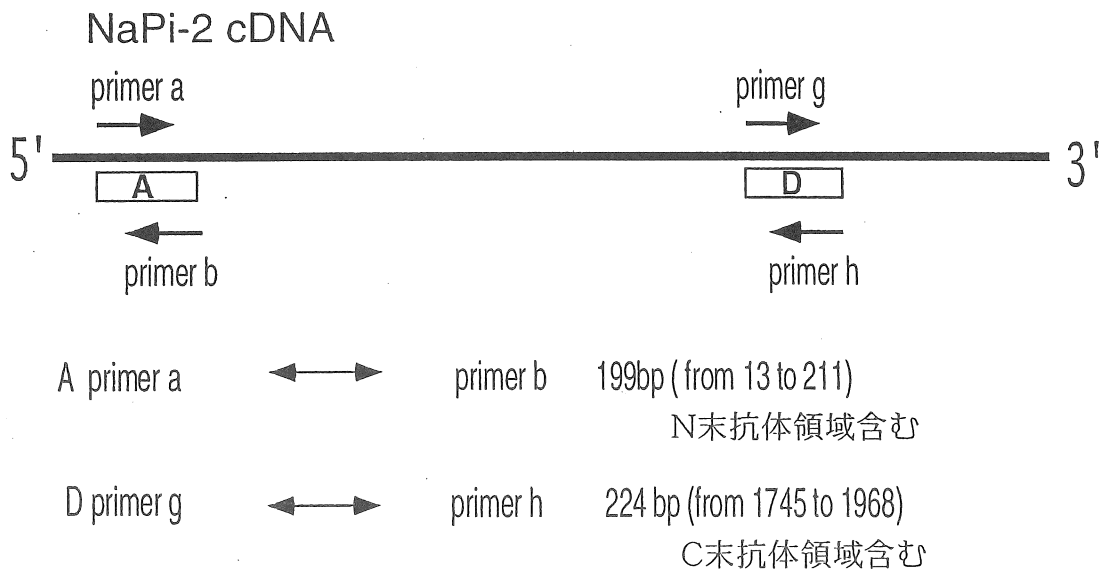
Fig. 5 破骨細胞Na/Pi輸送担体遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列

A) プライマーa, bにより増幅された破骨細胞NaPi-2アイソフォーム

B) アミノ酸配列の比較

NaPi-2は腎、NaPi-2 OCは破骨細胞のN末端シーケンスを示す。

A) Primer 設定



B)

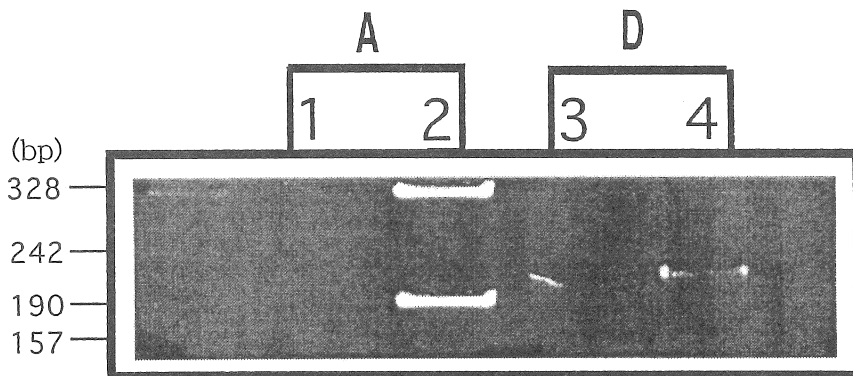


Fig6. ラット破骨細胞前駆細胞および、破骨細胞total RNAを用いたRT-PCR法によるNaPi-2(TypeII)の発現の比較

A) RT-PCRに用いたNaPi-2 (TypeII)primerの設定

B) Lane 1, Lane3は破骨細胞前駆細胞total RNA (M-CSF, RANKL -)を用いて、RT-PCRを行った。

Lane 2, Lane4は破骨細胞total RNA (M-CSF, RANKL +)を用いて、RT-PCRを行った。

Identification of Na⁺-dependent phosphate transporter in the bone
: Na⁺-dependent phosphate transporter in osteoclast

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

Osteoclasts are polarized cells involved in bone resorption. They are exposed to high ambient concentrations of inorganic phosphate (Pi) during the active process of bone resorption. We developed the purification of osteoblasts using RANL and M-CSF and isolated osteoclast-specific mRNA from rat and rabbit. In Northern blot analysis, the type I-III Na/Pi cotransporter transcripts were not detected in osteoclast mRNA of rat and rabbit. The specific primer for the type II Na/Pi cotransporter NaPi-2 amplified the 538 bp of the DNA fragment which is partially identical to rabbit type II transporter. Similar results were obtained from rat osteoclast mRNA. The DNA fragment contained the third intron of the type II transporter NaPi-2 gene, suggesting the presence of NaPi-2 isoforms in the osteoclast mRNA. The transcripts of this isoform was not detected in the mRNA of pre-osteoclast cells. These results indicate that the isoform for type II Na/Pi cotransporters may function as phosphate transporter in the plasma membrane of mature osteoclast.