

9843 腎ナトリウム／リン輸送担体の発現制御による血中無機リン濃度調節機構

助成研究者：大野 博司 (金沢大学 がん研究所 分子薬理学)

共同研究者：斉藤 隆 (千葉大学大学院 医学系研究科 遺伝子制御学)

体内のリン酸 (Pi) 濃度の恒常性の維持には、腎近位尿細管での Pi 再吸収が重要な役割を担っている。この再吸収は、上皮細胞の頂側 (管腔側) 膜に存在する Na/Pi 輸送担体により行われる。Na/Pi 輸送担体の活性の調節は、個々の Na/Pi 輸送担体の比活性を制御するのではなく、細胞表面に発現している輸送担体の分子数を増減することによって行われていることが近年明かになってきた。しかし、この発現調節のメカニズムは不明である。そこで本研究では、血中 Pi の恒常性を保つための Na/Pi 輸送担体の発現制御機構の分子レベルでの解明の端緒として、マウス Na/Pi 輸送担体 NaPi-7 に輸送シグナルが存在するかを検討した。

マウスの Na/Pi 輸送担体 NaPi-7 は、他の NaPi 同様その N 末および C 末の両者を細胞質側に向けた、8 回膜貫通型の膜蛋白質であり、5 つの細胞質領域を持つと考えられている。そこで我々は、NaPi-7 の 5 つの細胞質領域 C1 から C5 の各々を取り出して解析することにより、これらの領域に輸送シグナルが存在するか否かを検討することにした。

その結果、C4 領域を持つキメラ蛋白のみがエンドサイトーシスされることから、この領域にエンドサイトーシス・シグナルが存在することが示唆された。C4 領域のアミノ酸配列の C 末に YRWF というチロシン・シグナル配列が存在した。

チロシン・シグナルは AP 複合体の μ 鎖と結合することにより、そのシグナルを持つ蛋白質をクラスリン輸送小胞に選択的に濃縮し、輸送する。したがって今回の結果から、NaPi-7 の C4 領域にチロシン・シグナルが存在し、このシグナルが NaPi-7 のエンドサイトーシスに寄与している可能性が示唆された。今回の結果は各細胞質領域を取りだしてキメラ蛋白として検討したものであり、NaPi-7 全長においても YRWF 配列がエンドサイトーシス・シグナルとして機能しているかどうか今後検討してゆかなければならない。

9843 腎ナトリウム／リン輸送担体の発現制御による血中無機リン濃度調節機構

助成研究者：大野 博司 (金沢大学 がん研究所 分子薬理学)

共同研究者：斉藤 隆 (千葉大学大学院 医学系研究科 遺伝子制御学)

1. 研究目的

選択的蛋白輸送は、輸送される蛋白質の細胞質領域に存在する輸送シグナル依存的に行われる。われわれは、最もよく見られる輸送シグナルの一つであるチロシン・シグナルが、エンドサイトーシスやリソゾームへの輸送を担うクラスリン輸送小胞の構成成分であるAP複合体の μ 鎖と結合することにより、エンドサイトーシスやリソゾーム局在シグナルとして機能することを明らかにしてきた(図1)¹⁻⁴⁾。また、別の輸送シグナルであるジロイシン・シグナルもAP複合体と結合することが知られている¹⁾。AP複合体には現在までにAP-1、AP-2、AP-3A、AP-3BおよびAP-4の5種類が知られており、それぞれ異なる細胞内輸送系への関与が示唆されている(表1)。さらに最近、われわれは上皮細胞特異的に発現する μ 鎖ホモログを同定し、 $\mu 1$ と最も相同性が高いことから $\mu 1B$ と命名した⁵⁾。

体内のリン酸(Pi)濃度の恒常性の維持には、腎近位尿細管でのPi再吸収が重要な役割を担っている⁶⁾。血中のPiは、糸球体で全てが一度尿中へと排泄され、通常その約80%が近位尿細管上皮から血中へと再吸収される。この再吸収は、上皮細胞の頂側(管腔側)膜に存在するNa/Pi輸送担体により、Na依存的に行われる。Na/Pi輸送担体の活性は、血中Pi濃度やホルモンにより調節されている。すなわち、低Pi状態では活性は高く、高Piでは逆に低くなるし、また副甲状腺ホルモンはやはり輸送活性を低下させることが知られている。このようなPi再吸収活性の調節は、個々のNa/Pi輸送担体の比活性を制御するのではなく、細胞表面に発現している輸送担体の分子数を増減することによって行われていることが近年明かになってきた。しかし、この発現調節のメカニズムは不明である。そこで本研究では、血中Piの恒常性を保つためのNa/Pi輸送担体の発現制御機構の分子レベルでの解明の端緒として、マウスNa/Pi輸送担体NaPi-7に輸送シグナルが存在するかを検討した。

2. 研究方法

2.1 発現ベクター

マウスNa/Pi輸送担体NaPi-7のC1からC5の5つの細胞質領域のそれぞれに相当するcDNA断片を酵母2-hybrid用ベクター(GAL4bd-TGN38 Tail $\Delta 1$)に組み込むことによりGAL4bd-C1, -C2, -C3, -C4および-C5を、また哺乳動物細胞用Tacキメラ蛋白発現ベク

ター (pCDLSR α -Tac) に組み込むことにより Tac-C1, -C2, -C3, -C4 および -C5 を得た。C1 領域はマウス腎臓から精製した RNA を材料とした RT-PCR により、また C5 領域は EST クローンを鋳型にした PCR によりそれぞれ cDNA 断片を得た。C2, C3 および C4 領域には合成オリゴヌクレオチドを用いた。得られたベクターの cDNA 断片は全て塩基配列を確認した。2-hybrid 用の AP 複合体 μ 鎖、 α 鎖、 β 2 鎖、 γ 鎖および σ 鎖のベクターは以前に作製済みのものを使用した。

2.2 Tac-キメラ蛋白の発現および免疫蛍光法

HeLa 細胞を 6 穴プレートに 50-70% コンフルエントになるように培養し、2.1 で作製した Tac-細胞質領域キメラベクター 2 μ g を磷酸カルシウム法にて遺伝子導入し、15-20 時間後に培養液を交換した。遺伝子導入 40-48 時間後に、細胞を 2% ホルムアルデヒド/PBS 溶液で 20 分間固定し、抗 Tac モノクローナル抗体 (7G7) と Cy-3 標識抗マウス Ig 抗体にて染色した。一部のサンプルでは、固定前にリソソーム酵素阻害剤である 50mM 酢酸アンモニウム存在下で 4 時間培養した。抗体の取り込みを観察する場合は、生きた細胞をまず 7G7 抗体の存在下で 37°C で 4 時間培養した後、2% ホルムアルデヒド/PBS 溶液で 20 分間固定し、Cy-3 標識抗マウス Ig 抗体にて染色した。蛍光は蛍光顕微鏡にて観察した。

2.3 酵母 2-hybrid 法

2.1 で作製したベクターを用いて、各細胞質領域が AP 複合体 μ 鎖あるいは σ 鎖と結合するかを酵母 2-hybrid 法にて検討した。ヒスチジン合成遺伝子を欠損する出芽酵母 HF7c 株に細胞質領域ベクターおよび AP 複合体ベクターを 1 μ g ずつ用いて遺伝子導入し、ヒスチジンを含む His+ 培地および含まない His- 培地にて培養した。2 つのベクターにコードされる遺伝子産物が結合する場合にのみ HF7c は His- 上でも生育できる。

3. 研究結果

マウスの Na/Pi 輸送担体 NaPi-7 は、他の NaPi 同様その N 末および C 末の両者を細胞質側に向けた、8 回膜貫通型の膜蛋白質と考えられている (図 2A)。そこで我々は、図 2B に示すように、NaPi-7 の 5 つの細胞質領域の各々を取り出して解析することにより、これらの領域に輸送シグナルが存在するか否かを検討することにした。

Tac-C1 から Tac-C5 のそれぞれを HeLa 細胞に一過性に遺伝子導入し、Tac キメラ蛋白の発現を免疫蛍光法により観察した。Tac-C1, Tac-C2, Tac-C3 および Tac-C5 は細胞表面に発現するのに対し、Tac-C4 は主に細胞質に顆粒状に分布していた。酢酸アンモニウム存在下では顆粒状の染色像が増強することから、Tac-C4 はエンドソームおよびリソソームの両者に分布すると考えられた。(図 3)。次にこれらの細胞を生きた状態で抗 Tac 抗体存在下で培養することにより、抗体の取り込みを観察した (図 4)。その結果、

Tac-C4でのみ抗体の取り込みが認められ、取り込まれた抗体は図3D、Eと同様な顆粒状の分布を示した。以上の結果より、C4領域にはエンドサイトーシス・シグナルが存在することが示唆された。

チロシン・シグナル、ジ-ロシイン・シグナルなどの輸送シグナルはAP複合体のサブユニットと結合することにより作用すると考えられている。そこで、NaPi-7の5つの細胞質領域とAP複合体のサブユニットとの結合性を酵母2-hybrid法を用いて検討した。2回の遺伝子導入実験を行ったが、陽性の結果は得られなかった。

4. 考察および今後の課題

NaPiは腎近位尿細管細胞表面から素早くエンドサイトーシスされ、リソソームで分解されることが知られている。NaPi-7の4番目の細胞質領域C4を持つキメラタンパク Tac-C4を遺伝子導入したHeLa細胞では抗Tac抗体が細胞表面から細胞内に取り込まれたこと、またTac-C4はエンドソーム、リソソームに分布することから、C4領域にはエンドサイトーシスおよびリソソーム局在シグナルが存在することが示唆された。C4領域のアミノ酸配列を見ると、そのC末にYRWFというチロシン・シグナル配列が存在する(図2B参照)。チロシン・シグナルはAP複合体 μ 鎖と結合することによりエンドサイトーシス・シグナルやリソソーム局在シグナルとして機能する。したがって、Tac-C4のリソソームへの局在はこのC4のYRWF配列に依存している可能性がある。酵母2-hybrid法で陽性の結果が得られなかったことに関しては、この方法の検出感度が実際の細胞内でのシグナル活性に比べかなり低いことから、弱いシグナルが検出できなかった可能性がある。この点に関しては、現在さらに解析を進めているが、いずれにせよ、YRWF配列の輸送シグナルとしての活性はかなり弱いと考えられる。

今回の研究から、NaPi-7のC4領域にチロシン・輸送シグナルが存在し、このシグナルがNaPi-7のエンドサイトーシスに寄与している可能性が示唆された。今回の結果は各細胞質領域を取りだしてキメラ蛋白として検討したものであり、NaPi-7全長においてもYRWF配列がエンドサイトーシスシグナルとして機能しているかどうか今後検討してゆかなければならない。

5. 文献

- 1) 大野博司：分泌系およびエンドサイトーシスにおける蛋白質輸送機構。蛋白質 核酸 酵素、42、2072-2080、1997。
- 2) Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M-C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. Interaction of tyrosine-based sorting signals with the medium chains of clathrin-associated protein complexes. Science, 269, 1872-1875, 1995.

- 3) Ohno, H., Fournier, M.-C., Poy, G., Bonifacino, J.S.: Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J. Biol. Chem.*, 271, 29009-29015, 1996.
- 4) Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T., Bonifacino, J. S.: The Medium Subunits of Clathrin Adaptor Complexes Recognize Distinct but Overlapping Sets of Tyrosine-based Sorting Signals. *J. Biol. Chem.*, 273, 25915-25921, 1998.
- 5) Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T., Bonifacino, J.S.: μ 1B: a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.*, 449, 215-220, 1999.
- 6) Biber, J., Custer, M., Magaganin, S., Hayse, G., Werner, A., Lötscher, M., Kaissling, B., Murer, H.: Renal Na/Pi-cotransporters. *Kidney Int.* 49, 981-985, 1996.

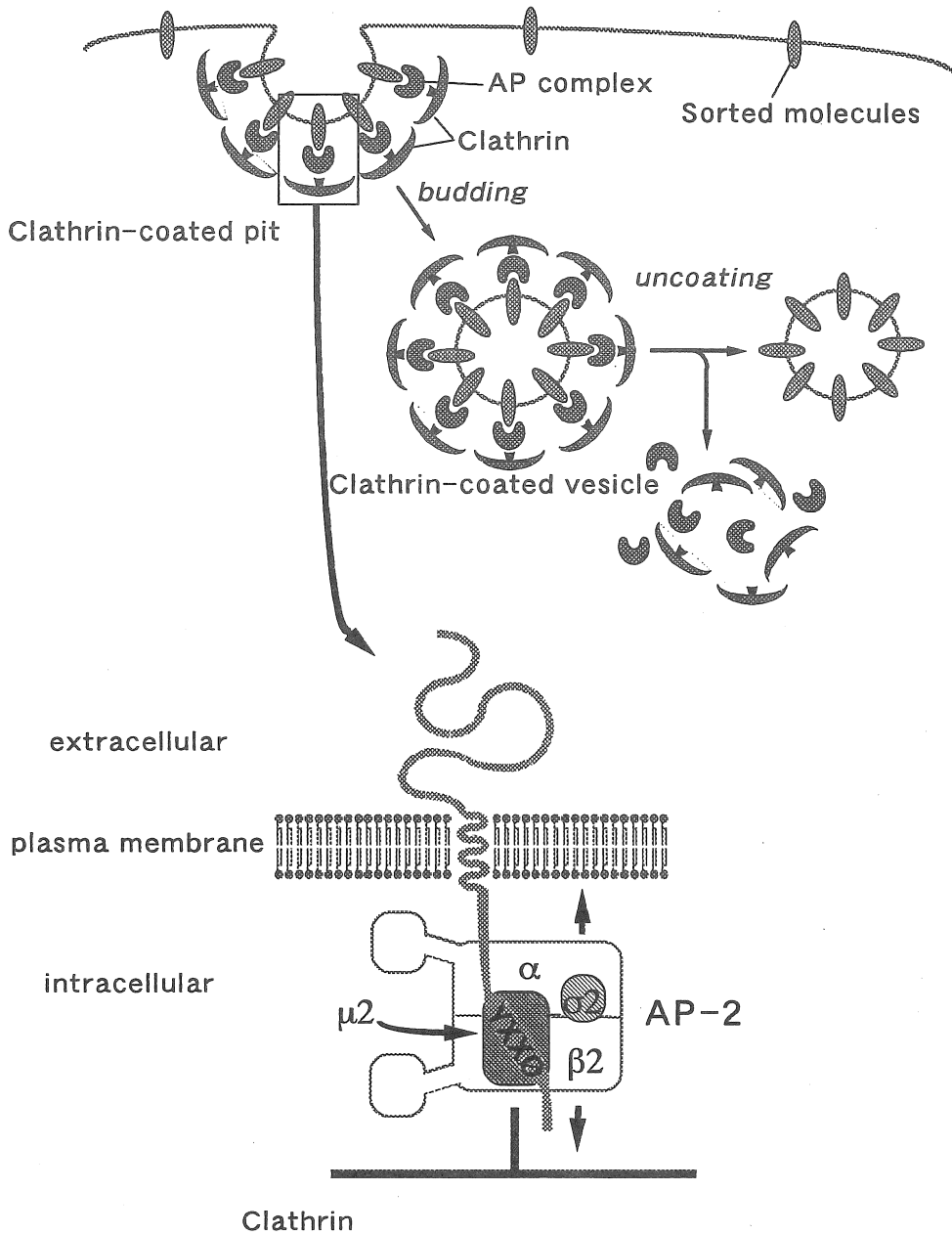
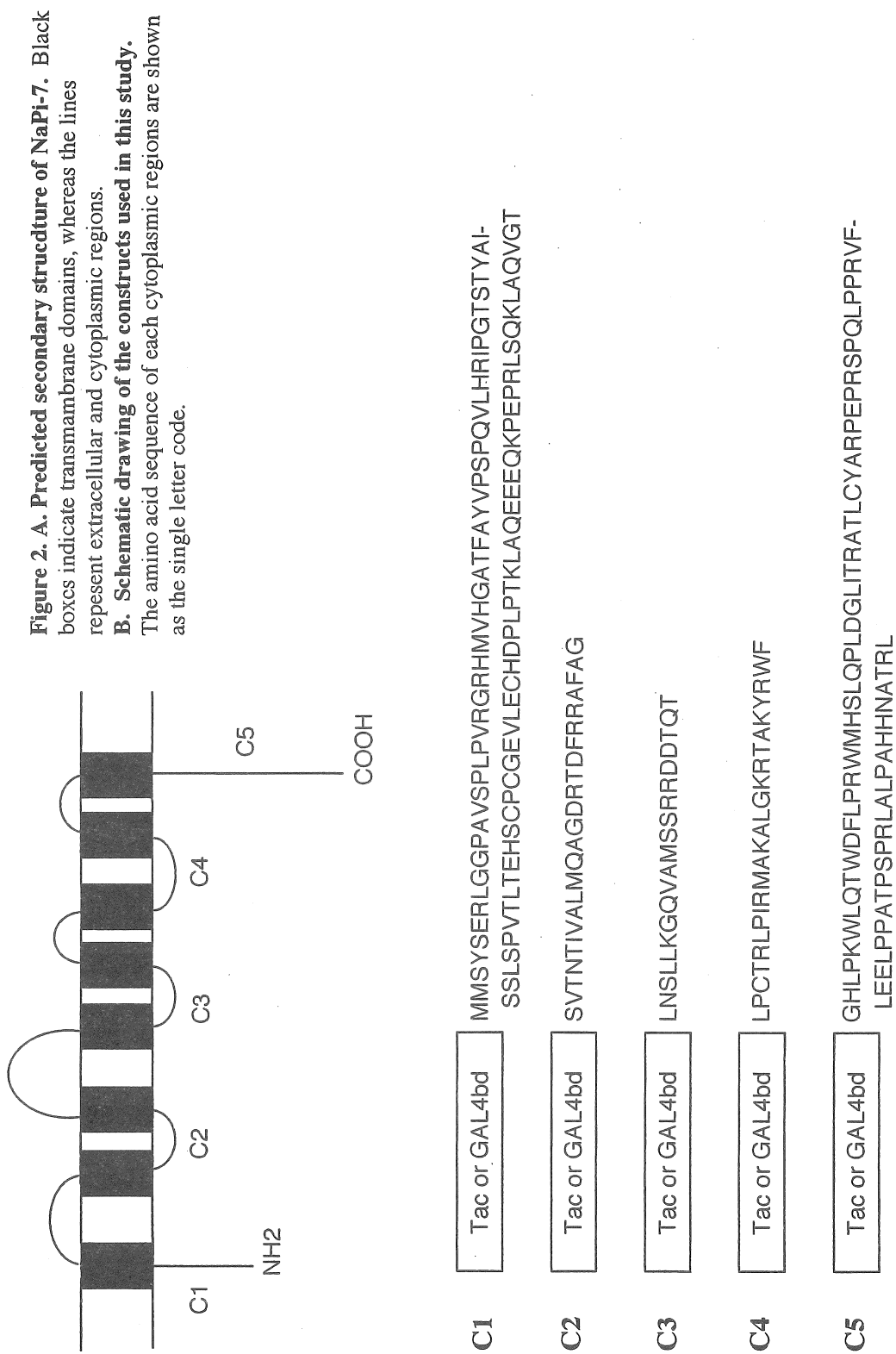


Figure 1. Schematic representation of the function of AP complexes.

AP-2 recruits clathrin to the plasma membrane by binding of $\beta 2$ to clathrin and α to the membrane. On the membrane, $\mu 2$ binds to the tyrosine signals (shown as YXXØ) in the cytoplasmic tail of sorted molecule, and this interaction traps the molecule in the developing clathrin-coated vesicles. Function of AP-2 is shown in this figure, but the other AP complexes function similarly.

Table 1. AP complexes

	Distribution	Molecular weight (kDa)	Localization/Function
AP-1	ubiquitous		
	γ	100	TGN. Recruitment of clathrin to the TGN membrane. Formation of clathrin coated pit.
	β1	100	Binding to the TGN membrane.
	μ1	47	Binding to clathrin.
	σ1	19	Recognition of tyrosine signals. ?
AP-2	ubiquitous		
	α	100	Plasma membrane. Recruitment of clathrin to the plasma membrane. Formation of clathrin coated pit.
	β2	100	Binding to the plasma membrane.
	μ2	50	Binding to clathrin
	σ2	17	Recognition of tyrosine signals. ?
AP-3A	ubiquitous		
	δ	160	TGN/endosomes. Recruitment of clathrin to the TGN membrane. Formation of clathrin coated pit (?)
	β3A	140	Binding to the TGN/endosome membranes.
	μ3A	47	Binding to clathrin (?)
	σ3A/B	22	Recognition of tyrosine signals. ?
AP-3B	neuron		
	δ	160	TGN/endosomes. Recruitment of clathrin to the TGN membrane. Formation of clathrin coated pit (?)
	β3B	140	Binding to the TGN/endosome membranes.
	μ3B	47	Binding to clathrin (?)
	σ3A/B	22	Recognition of tyrosine signals. ?
AP-4	ubiquitous		
	ε	140	Golgi complex? unknown function.
	β4	83	Binding to the TGN membrane.?
	μ4	50	Binding to clathrin?
	σ4	17	Recognition of tyrosine signals ?



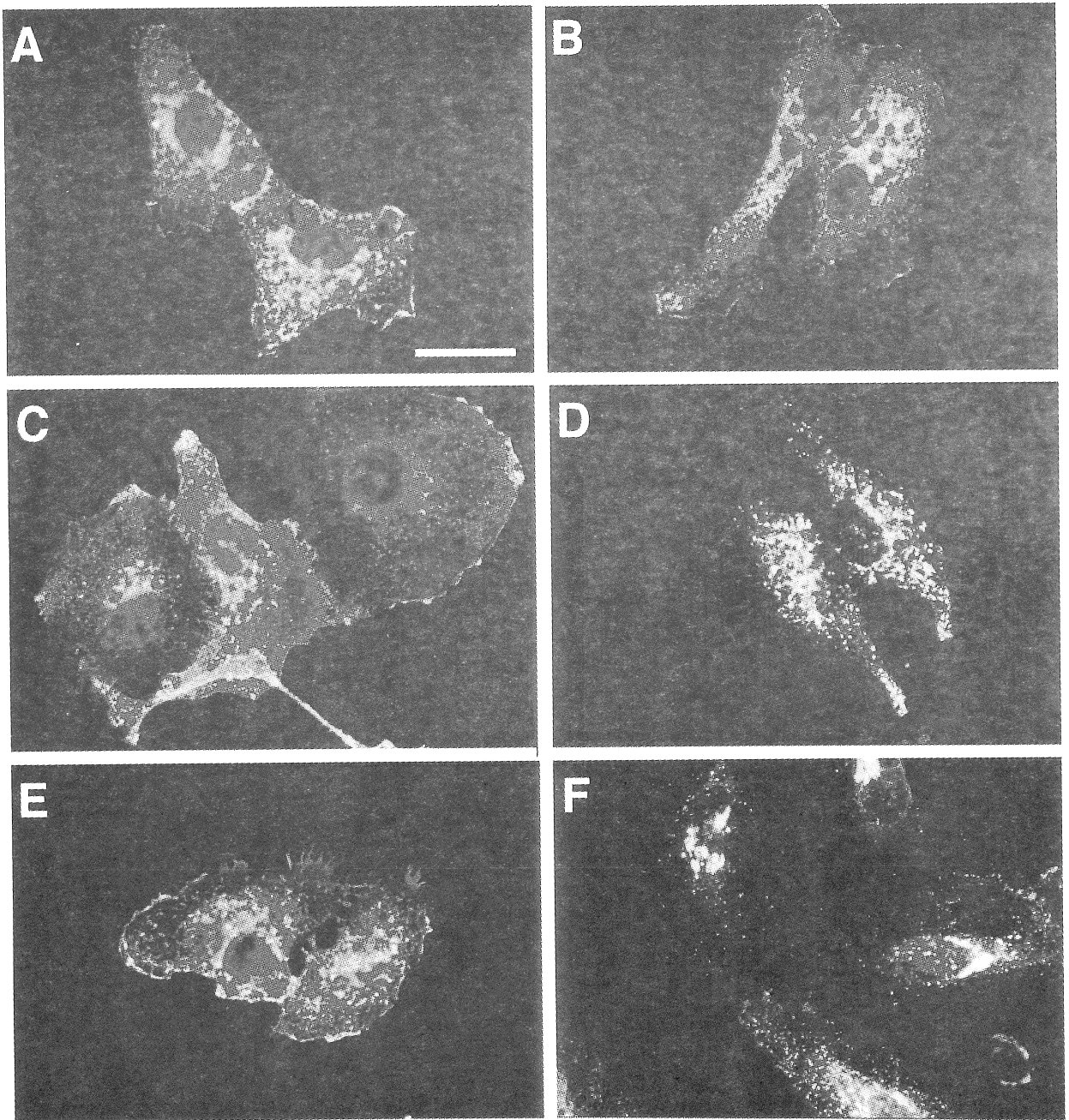


Figure 3. Immunofluorescence microscopy of HeLa cells expressing Tac chimeras. HeLa cells were transiently transfected with Tac-C1 (A), Tac-C2 (B), Tac-C3 (C), Tac-C4 (D and F), or Tac-C5 (E). Two days later, cells were cultured for 4 hours in the presence (A, B, C, D and E) or absence (F) of 50 mM ammonium acetate, fixed, and stained with anti-Tac antibody and Cy3-conjugated anti-mouse Ig. Scale bar: 10 μ m.

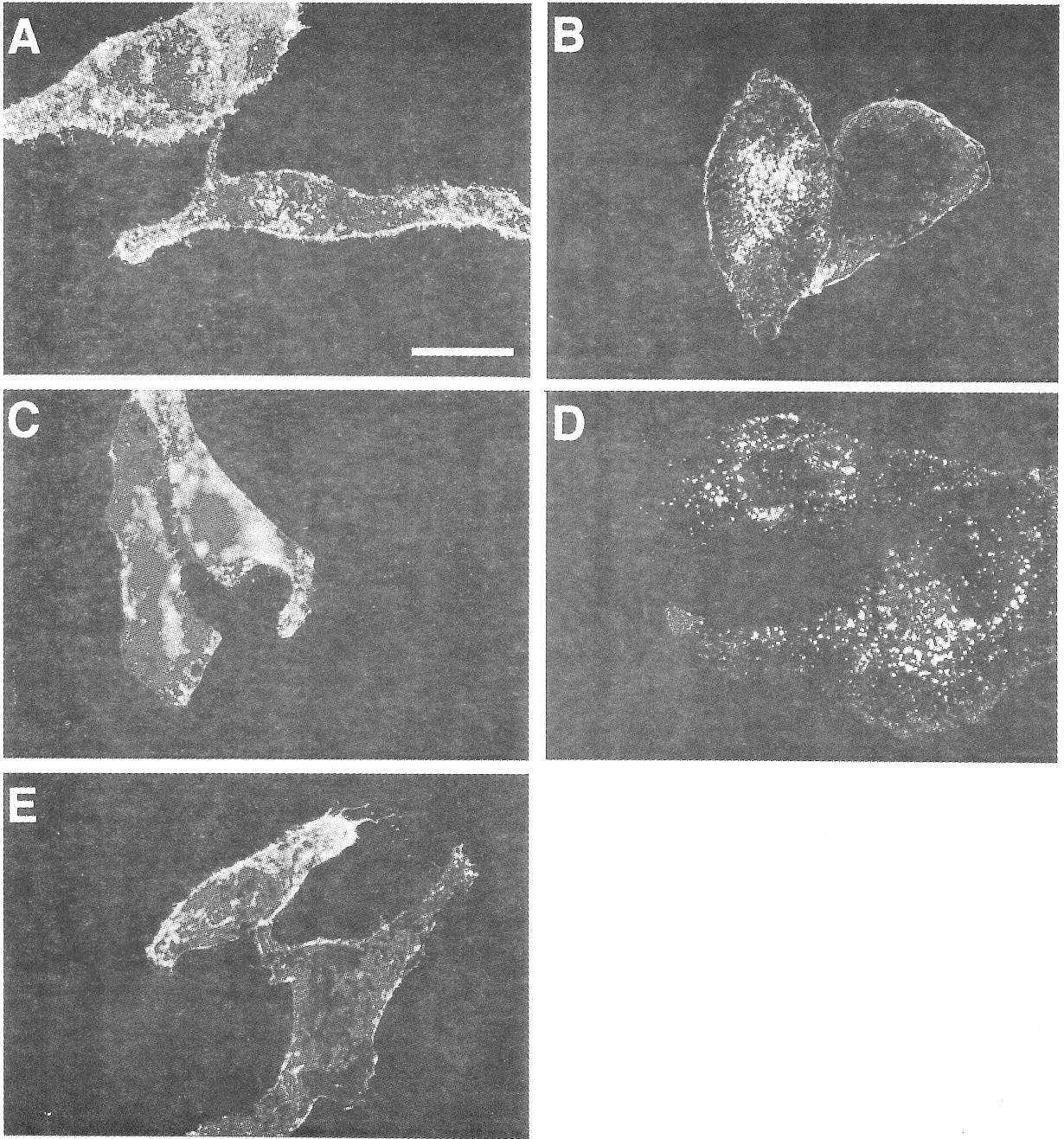


Figure 4. Antibody uptake by HeLa cells expressing Tac chimeras. HeLa cells were transiently transfected with Tac-C1 (A), Tac-C2 (B), Tac-C3 (C), Tac-C4 (D), or Tac-C5 (E). Two days later, cells were cultured for 4 hours in the presence of anti-Tac antibody, washed to remove unbound antibody, fixed, and stained with Cy3-conjugated anti-mouse Ig. Scale bar: 10 μm .

Mechanism of regulation of blood phosphate level: regulation of surface expression the renal Na/Pi-cotransporter

Hiroshi Ohno, Cancer Research Institute, Kanazawa University

Takashi Saito, Graduate School of Medicine, Chiba University

Summary

Phosphate (Pi) reabsorption at the renal proximal tubules play an important role in the homeostasis of Pi concentration in the body. Pi reabsorption is performed by the type-2 Na/Pi-cotransporter expressed on the apical surface of the epithelial cells of the proximal tubule. The Pi uptake is regulated by changing the expression level of Na/Pi-cotransporter, rather than by changing the activity of the transporter. However, little is known about how the cells increase or decrease the level of the transporter. For the first step toward the complete understanding of the mechanism of regulation of Na/Pi-cotransporter, we studied whether endocytosis signals exist in the mouse type-2 Na/Pi-cotransporter, Na/Pi-7.

Na/Pi-7 is thought to have 8 transmembrane domains, with both N- and C-termini exposed to the cytoplasm. Therefore, Na/Pi-7 has 5 cytoplasmic regions including N- and C-termini; C1, C2, C3, C4 and C5, from N- to C-terminus. We made chimeric proteins which have each of Na/Pi cytoplasmic regions to study which of them to have endocytosis signals. Only the chimera with C4 was endocytosed when expressed in HeLa cells, suggesting the existence of an endocytosis signal in C4. When the amino acid sequence of C4 was examined, we found YWRF sequence, a possible tyrosine-based sorting signal, at the C-terminus of C4.

Tyrosine-based sorting signals act as the sorting signal through the interaction with μ subunits of AP complexes. This interaction concentrates the molecules with tyrosine-based sorting signals in their cytoplasmic region in clathrin coated vesicles. Our results suggest that Na/Pi-7 has a tyrosine-based sorting signal in the C4 region, and that this signal act as the endocytosis signal for Na/Pi-7. The present study was done by using chimeric molecules having excised cytoplasmic regions of Na/Pi-7, and further studies have to be done to see whether YWRF signal act as the endocytosis signal in the context of the whole Na/Pi molecule.