

46

助成番号 0046

リンセンサー機能をもつナトリウム依存性リン輸送担体の同定

助成研究者：宮本 賢一(徳島大学 医学部 栄養化学)
共同研究者：伊藤 美紀子(徳島大学 医学部 栄養化学)
桑波田 雅士(徳島大学 医学部 栄養化学)

〈助成研究概要〉

慢性腎不全時にみられる二次生副甲状腺機能亢進症において、低リン食はPTHの分泌および副甲状腺増殖を低下させる。また、単離した副甲状腺において、細胞外のリン濃度を上昇させた場合に、PTHの分泌が亢進する。つまり、カルシウム濃度の変化に依存しない、リン独自の調節系の存在が想定されている。これらの調節系には、リン濃度を感知するナトリウム依存性リン輸送担体の存在が、副甲状腺に想定されている。本研究助成金によりリン濃度感知に関与するナトリウム依存性リン輸送担体について検討した。

ラット副甲状腺を単離し、リン輸送特性を調べた。その結果、Na⁺存在下にリンの取り込みは促進され、上述したNa⁺依存性リントランスポーターの存在が予想された。そこで、副甲状腺cDNAライブラリーをスクリーニングした結果、タイプ3に属するPiT1をクローニングした。卵母細胞を用いて機能を調べた結果、リンに対する親和性は約0.14mMであった。高リン食を負荷したラットにおいて、PiTの発現は著しく低下し、細胞内へのリン流出低下が見られた。また、ビタミンD欠乏動物への活性型ビタミンDの投与はPiTの発現を高め、細胞内へのリン取り込みを促進した。また、高リン食摂取やビタミンD欠乏状態でPTH分泌亢進が確認された。さらに、副甲状腺細胞にナトリウム依存性リン輸送担体の阻害剤を処理した際に、PTH分泌の抑制が見られた。これらの研究より、副甲状腺に発現するナトリウム依存性リントランスポーターPiT1の機能がPTH分泌の調節に関与する可能性が示唆された。

11

助成番号 0046

リンセンサー機能をもつナトリウム依存性リン輸送担体の同定

助成研究者：宮本 賢一 (徳島大学 医学部 栄養化学)

共同研究者：伊藤 美紀子 (徳島大学 医学部 栄養化学)

桑波田 雅士 (徳島大学 医学部 栄養化学)

「研究目的」

慢性腎不全末期患者は、糖尿病性腎症の著しい増加や社会の高齢化により、年々増加の一途をたどり、現在18万人を数えている。このほとんどが、血液透析患者であるが、透析技術の進歩に伴い長期生存が可能となった。それと同時に、はじめは問題とされなかった二次性副甲状腺機能亢進症などによりもたらされる骨合併症が新たに出現し、患者の予後を左右する重大な問題となっている。とくに高リン血症は、副甲状腺細胞を刺激して副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を亢進し、その結果二次性副甲状腺機能亢進症の発症をもたらす(1-6)。これらは、副甲状腺細胞におけるリンセンサーの機能異常による可能性が推定されているが、リンセンサーの実体は不明である。

近年、細胞外カルシウムイオン濃度を感知する受容体がクローニングされ、細胞外イオンもまた、情報伝達の担い手であることが確認された (7)。我々は、細胞内へのリン輸送系が PTH 分泌において細胞外リン濃度を感知するリンセンサーとして機能していることを明らかにした (8)。本研究は、ラット副甲状腺細胞において機能しているナトリウム依存性リン輸送担体を同定するとともに、細胞外リンセンサーとしての役割を検討するため、副甲状腺ホルモン (PTH) 合成を指標にその役割を明らかにした。

方法

1) 副甲状腺細胞の単離および cDNA ライブラリーの作成

ウイスター系雄ラットを16日間、0.6%Ca,0.6%Pi食で飼育し、実験に用いた。副甲状腺の摘出は、顕微鏡下で microdissection を行った。67匹分の副甲状腺をプールし、mRNA を抽出した。得られた mRNA を材料として、常法に従い cDNA

ライブラリーを作成した (8)。

2) 副甲状腺リン酸トランスポーター PiT-1 の同定

typeI-typeIII Na/Pi cotransporter の cDNA をプローブとして、ラット副甲状腺 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、typeIII に属する PiT-1 を同定した。得られた cDNA は 2980 bp のサイズを持ち、681 個のアミノ酸をコードしていた (8)。

3) ビタミンD欠乏動物の作成

3週令のウイスター系雄ラットを 0.6%Ca を含むビタミンD欠乏食(Diet 11)で6週間飼育し、血中ビタミンDおよびカルシウムの有意な低下を確認後、実験に用いた (8)。

4) 低リン食および高リン食摂取

体重 120 g のウイスター系雄ラットに 0.6 % calcium, 1.2% Pi (高リン食) および 0.6% Ca, 0.02% Pi (低リン食) で7日間飼育後、実験に用いた (8)。

5) 血中 PTH 濃度の測定

血中 intact PTH レベルは immunoradiometric assay (Nichols, Sam Clemente,CA)キットを用いて測定した。

結果

1) 副甲状腺細胞におけるリン輸送特性

ラット副甲状腺を単離し、リン輸送特性を調べた。その結果、Na⁺存在下にリンの取り込みは促進され、上述した Na⁺依存性リントランスポーターの存在が予想された。また、ナトリウム依存性リントランスポーターの特異的阻害剤である PFA 処理においてナトリウム依存性リン輸送活性は有意に低下した。

2) 副甲状腺リントランスポーター PiT1 の同定と卵母細胞における機能

副甲状腺 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、typeIII に属する PiT-1 をクローニングした (図1)。卵母細胞を用いて機能を調べた結果、リン

に対する親和性は約 0.14mM であった。また、リンの取り込み活性は 60 分まで直線的に増加した (図 2)。これらの特性は、ラット副甲状腺由来の poly(A)RNA を注入した卵母細胞によるリン輸送特性に類似していた。

3) PiT1 mRNA の発現組織

PiT1 mRNA の発現組織を調べた結果、副甲状腺に 2.8 kb の転写産物が確認された。また、脳および骨芽細胞に発現が確認された。しかし、腎を含む多くの組織では、PiT1 mRNA の発現は確認できなかった (図 3)。

4) ビタミンDによる発現調節

ビタミンD欠乏動物を作成し、副甲状腺における PiT1 mRNA の発現を検討した。ビタミンD欠乏動物では、PTH レベルの高値が見られた (図 4)。この動物における PiT1 mRNA レベルはコントロールと比べて有意に低下していた。次に、活性型ビタミンDを欠乏動物に投与した結果、PTH レベルの急激な低下と PiT1 mRNA 量の増加が確認された (図 5)。

5) 食事性リンによる PTH および PiT1 mRNA 量の調節

低リン食で7日間ラットを飼育すると、副甲状腺における PTH mRNA 量の著しい減少が見られた。一方、副甲状腺における PiT1 の発現レベルは有意に上昇した。反対に、高リン食で飼育した動物では、PTH mRNA レベルの増加と、PiT1 mRNA レベルの有意な低下が見られた。

考察

副甲状腺におけるリン感受機構は未だ明らかではない。しかし、リン自身が細胞内外のシグナルとなりうる多くの証拠が累積されつつある (7,9,10)。事実、ラット副甲状腺細胞を高リン状態で培養すると、PTH 分泌が促進される (7)。さらに高リン食を負荷したラットにおいて、PTH 分泌は亢進し、反対に低リン食で飼育した動物では、副甲状腺における PTH レベルは有意に低下する (8)。このような、細胞外リン濃度の変化は、いかにして PTH 分泌を調節しているかは明確にされていない。本研究において副甲状腺に発現しているナトリウム依存性リントランスポーターを同定し機能解析を行うとともに、PTH 発現調節に

関与するか否か検討した。高リン食摂取やビタミンD欠乏時などのPTH発現の亢進している状態では、PiTの発現は著しく低下し、細胞内へのリン流出阻止が予想された。また、ビタミンD欠乏動物への活性型ビタミンDの投与はPiTの発現を高め、細胞内へのリン取り込みを促進すると考えられる。さらに、副甲状腺細胞にナトリウム依存性リン輸送担体の阻害剤を処理した際に、PTH分泌の亢進が見られた。これらの研究より、副甲状腺において細胞内へ能動的にリン流入を行う機構と、PTH分泌との間に密接な関連性が示唆された。現在、PiT1が細胞外リン感受に関与している可能性について検討を行っている。

References

1. Arnaud CD 1973 Hyperparathyroidism and renal failure. *Kidney Int* 4:89-95
2. Combe C, Aparicio M 1994 Phosphorus and protein restriction and parathyroid function in chronic renal failure. *Kidney Int* 46:953-961.
3. Slatopolsky E, Caglar S, Gradowska L, Canterbury JM, Reiss E, Bricker NS 1972 On the prevention of secondary hyperparathyroidism in experimental chronic renal disease using proportional reduction of dietary phosphorous intake. *Kidney Int* 2:147-151
4. Kaplan MA, Canterbury JM, Bourgoignier VG, Gavellas E, Reiss E, Bricker NS 1979 Reversal of hyperparathyroidism in response to dietary phosphorus restriction in uremic dogs. *Kidney Int* 15:43-48
5. Bover J, Rodriguez M, Trinidad P, Jara A, Machado L, Llach F, Felsenfeld AJ 1994 Factors in the development of secondary hyperparathyroidism during graded renal failure in the rat. *Kidney Int* 41:953-961.
6. Kilav R, Silver J, Naveh-Many T 1995 Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest.* 96:327-333.
7. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M 1996 Direct effect of phosphorus on PTH secretion from rat parathyroid glands in vitro.

J Bone Miner Res 11:970-976.

8. Tatsumi S, Segawa H, Morira K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani Y, Miyamoto K, Takeda E. 1998 Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 139: 1692-1699.

9. Lenburg ME, O'Neill EM, Shea EK 1996 Signaling phosphate starvation.

TIBS 21:383-386

10. O'Neill EM, Kaffman A, Jolly ER, O'Shea EK 1996 Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex.

Science 271:209-212

Figure Legends

Fig. 1. Comparison of the predicted amino acid sequence of rat PiT-1 with those of human and mouse.

Amino acids are indicated by single-letter abbreviations. Residues identical to those in PiT-1 are indicated by asterisks. Hyphens represent gaps introduced to optimize alignment. The 10 predicted transmembrane regions (M1-M10) are indicated by single lines.

Fig. 2. Na⁺-Dependent Pi transport in *Xenopus* oocytes injected with rat PiT-1 cRNA. (A) Oocytes were injected with 50 nl of water, 50 nl of water containing 2.5-5.0 ng of rat PiT-1 cRNA, or 50 nl of poly (A)+RNA (1 µg/µl) from rat parathyroid glands and were then assayed 3 days later for the uptake of KH₂³²PO₄ in the absence or presence of 100 mM Na⁺. Uptake measurements were performed over a period of 60 min at 18 ° C, after which individual oocytes were washed and assayed for associated radioactivity. Data are means ± SEM of 6 to 10 oocytes. (B) Concentration-dependence of [³²P] Pi uptake. Oocytes were injected 5 ng of PiT-1 cRNA or 50 ng of poly (A)+RNA. The apparent Km was obtained using the Michaelis-Menten equation. The data represent means SEM, obtained from six to eight oocytes per group of a representative experiment.

Fig. 3. Tissue distributions of rat PiT-1 and PiT-2 mRNAs.

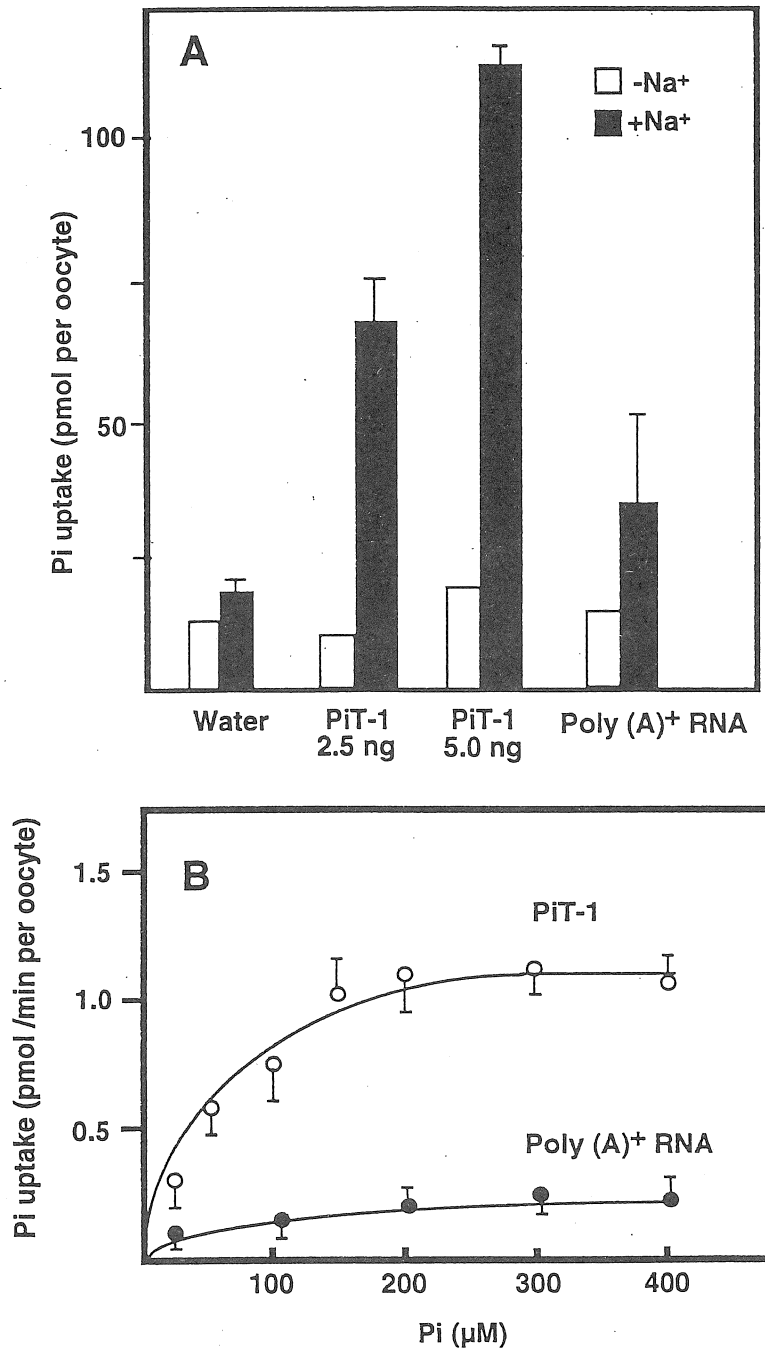
Total RNA (~20 µg) from tissue or cells was resolved on a 1.2% agarose gel containing

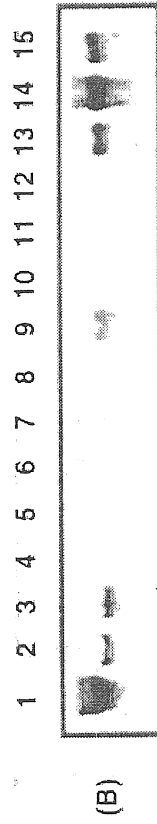
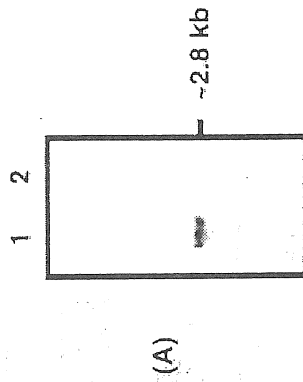
formaldehyde, transferred to a nylon membrane, and subjected to hybridization with a ^{32}P -labeled rat PiT-1 and PiT-2 cDNA probes. The positions of the 2.8-kb PiT-1 (A,B) and 3.9-kb PiT-2 (C) mRNAs are indicated. (A) lane 1, parathyroid glands; lane 2, thyroid glands. (B) lane 1, osteoblast-like cells (ROS 17/2.8); lane 2, ileum; lane 3, jejunum; lane 4, duodenum; lane 5, kidney cortex; lane 6, muscle; lane 7, kidney medulla; lane 8, thyroid glands; lane 9, parathyroid glands; lane 10, liver; lane 11, lung; lane 12, heart; lane 13, medulla oblongata; lane 14, cerebellum; lane 15, cerebrum.

Fig. 4. Effects of dietary Pi and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on plasma Ca^{2+} , Pi and PTH levels. Time-course changes in plasma Ca^{2+} (A), Pi (B), and PTH (C) levels of vitamin D-deficient rats. After $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ injection to the vitamin D-deficient rats, plasma Ca^{2+} , Pi, and PTH levels were determined at 0, 1, 3, 6, 12, 24, and 48 h. Effect of dietary Pi on plasma Ca^{2+} (D), Pi (E) and PTH (F) levels. Rats received a diet containing a high- Pi (1.2%), control (0.6%), or a low- Pi (0.02%) diet for 14 days ad libitum. Rats were killed at the end of the 14-day period and determined each plasma parameters. Results are shown as mean \pm SEM for five rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n=5): significance difference from the values at 0 h (A-C) or from the value of rats fed the control Pi diet (D-F).

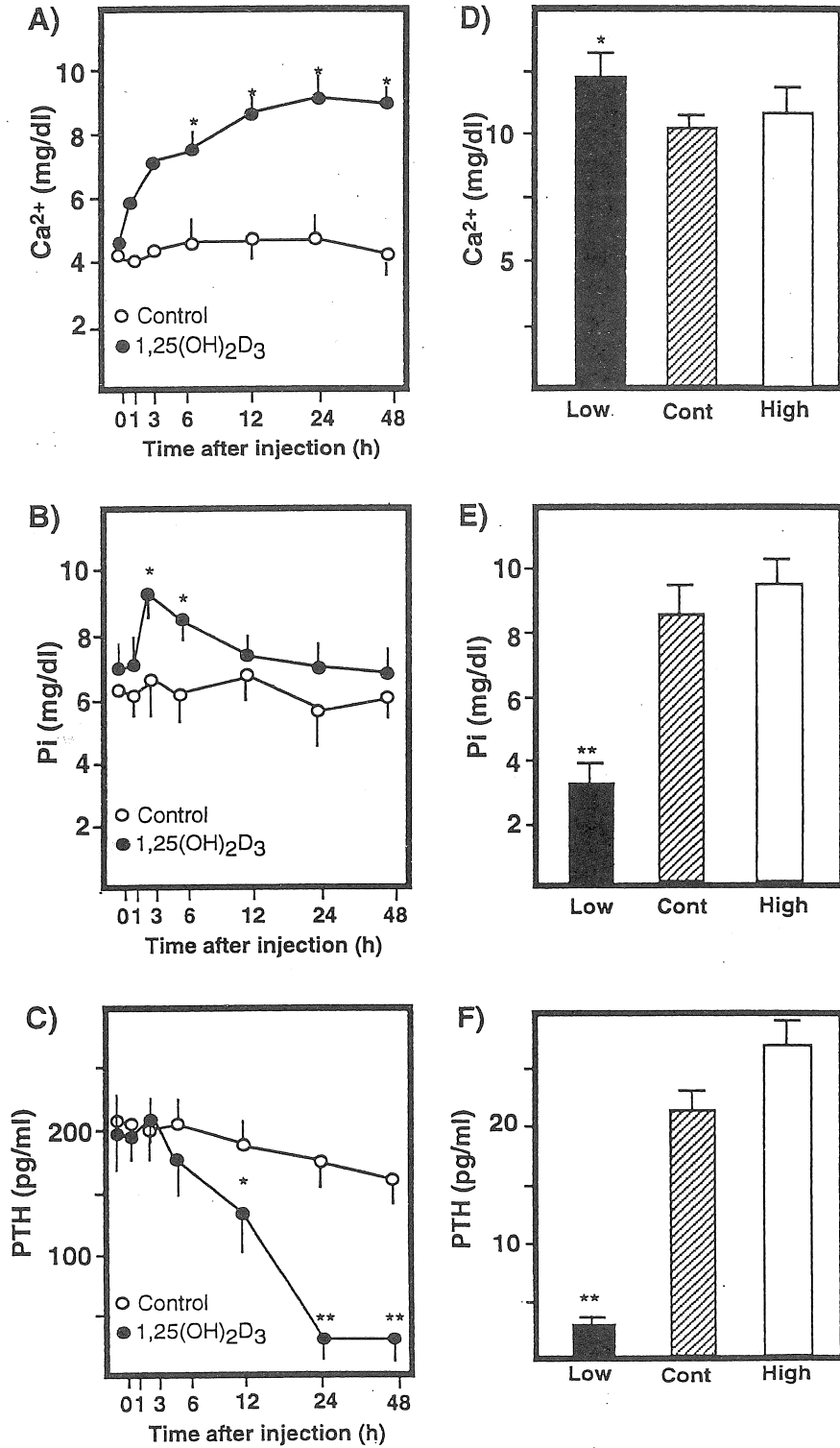
Fig 5. Effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on PTH and PiT-1 mRNA levels in thyroparathyroid tissue.

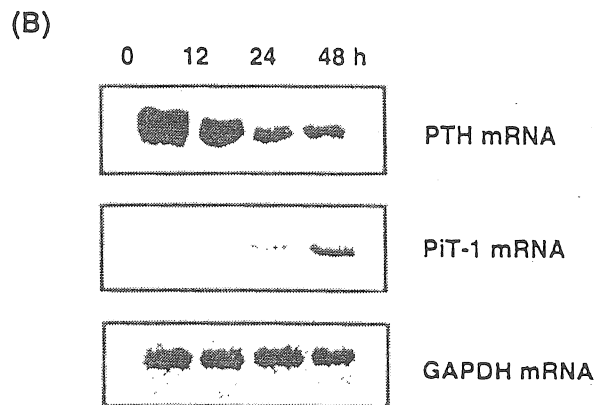
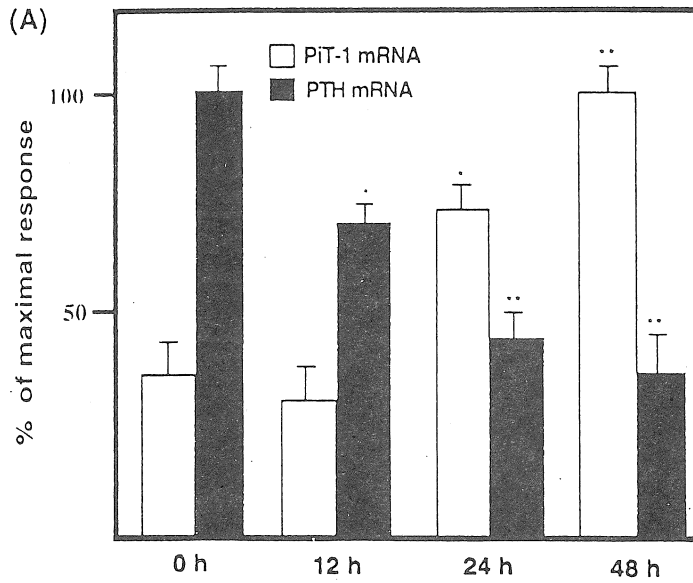
(A) Time course of the effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on mRNA levels for PTH and PiT-1. The thyroparathyroid tissue were visualized under a dissecting microscope and dissected free of thyroid tissue. Thyroparathyroid RNA were prepared from pooled thyroparathyroid tissue (4 rats), which contains small amount of thyroid gland, was prepared as described previously (8). Densitometric scanning was done at 2, 12 and 24 h exposure for parathyroid PTH, PiT-1 and GAPDH mRNA, respectively. The results of densitometric scanning are demonstrated as means \pm SE of PTH/GAPDH and PiT-1/GAPDH ratios in rats injected $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (n=4 for individual time point). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (B) Northern blot analysis of PTH, PiT-1 and GAPDH mRNA.





☒ 3





**Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1,
a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands**

Ken-ichi Miyamoto, Mikoko Ito, Masashi Kuwahata

Department of Nutrition, School of Medicine, Tokushima University

The extracellular concentration of inorganic phosphate (P_i) is an important determinant of parathyroid cell function. The effects of P_i may be mediated through specific molecules in the parathyroid cell membrane, one candidate molecule for which would be a Na^+ -dependent P_i cotransporter. A cDNA encoding a Na^+ - P_i cotransporter, termed rat PiT-1, has now been isolated from rat parathyroid. The 2890-bp cDNA encodes a protein of 681 amino acids that shows sequence identities of 97 and 93% with the type III Na^+ - P_i cotransporters mouse PiT-1 and human PiT-1, respectively. Expression of rat PiT-1 in *Xenopus* oocytes revealed that it possesses Na^+ -dependent P_i cotransport activity. PiT-1 mRNA is widely distributed in rat tissues and is most abundant in brain, bone, and small intestine. The amount of PiT-1 mRNA in the parathyroid of vitamin D-deficient rats was reduced compared with that in normal animals, and increased markedly after administration of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . Furthermore, the abundance of PiT-1 mRNA in the parathyroid was much greater in rats fed a low- P_i diet than in those fed a high- P_i diet. Thus, rat PiT-1 may contribute to the effects of P_i and vitamin D on parathyroid function.