

プロシーディング (第13回徳島医学会賞受賞論文)

ナトリウム依存性リン酸トランスポーター a型 (NaPi-IIa) の副甲状腺ホルモン (PTH) による調節機構

梨木 邦剛, 武市 朋子, 竹谷 豊, 武田 英二

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野

(平成16年10月20日受付)

(平成16年10月22日受理)

PTHは, NaPi-IIaのエンドサイトーシスを促進することで急速にリン輸送活性を抑制する。しかしながら, その詳細な調節メカニズムについては明らかになっていない。今回, PTHによって活性化されるPKAとPKCに共通のターゲット分子の同定を試みた。その結果, PKAとPKCの両方に共通な80kDaと250kDaのリン酸化タンパクを検出した。これらのうち80kDaのタンパクについてアミノ酸シークエンサーによる解析を行ったところ, ERM (ezrin-radixin moesin)ファミリータンパクの一つであるezrinであると同定した。以上のことから, NaPi-IIaのエンドサイトーシスを引き起こすPTHのシグナルは, カベオラ様ドメインにおいてPKAおよびPKCに伝達され, PKAおよびPKCがリン酸化するターゲット分子の一つがEzrinであると考えられた。

NaPi-IIaは, 近位尿細管におけるリン再吸収を担う最も重要なナトリウム依存性リン酸トランスポーターである。PTHは, NaPi-IIaのエンドサイトーシスを促進することで急速にリン輸送活性を抑制する。しかしながら, その詳細な調節メカニズムについては明らかになっていない。われわれは, これまでNaPi-IIaのエンドサイトーシスには, 細胞骨格アクチンとカベオラ様ドメインが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。今回新たに, PTHがリン酸化するターゲット分子の一つが明らかとなったためここに報告する。

目的

本研究では, PTHによって活性化される細胞内シグナルがNaPi-IIaのエンドサイトーシスを調節する過程においてカベオラ様ドメインが重要な役割を果たしてい

ることに注目し, NaPi-IIaのエンドサイトーシスを調節するPKC及びPKAに共通なターゲット分子の同定を試みた。

実験方法

NaPi-IIaを恒常的に発現するOK-N2細胞 (opossum proximal tubular cells) を樹立し, PTH (100nM) によって刺激した。その後, 密度勾配遠心法を用いて, 核除去画分, 細胞質, 細胞膜, カベオラ様ドメイン, 非カベオラドメインに分画した。採取した試料は, ウェスタンブロット法によって解析した。また, SDS-PAGEにて分離したバンドをリジルエンドペプチターゼにてゲル内消化し, さらに得られたペプチドを逆相HPLCにて分離し, ペプチドのアミノ酸シークエンス解析を行った。

結果

PTH刺激にตอบสนองして, NaPi-IIaの膜発現は低下し, PKC α (85KDa) がカベオラ様ドメインにおいて活性化された。PKCによる基質タンパク質のリン酸化はカベオラ様ドメインにおいて顕著であり, 特に80KDa, 110kDa, 190kDa, 250KDaの著明なリン酸化タンパク質を検出した。同様にPTHにตอบสนองしてPKAも活性化された。PKAによってリン酸化されたタンパク質の大きさは, カベオラ様ドメインにおいてPKCによってリン酸化されたタンパクと同じであった (80KDaおよび250KDa)。80kDaリン酸化タンパクの同定をアミノ酸シークエンサーによって解析したところ, ラット, マウスおよびヒトのezrinと同一であったことから, 80kDaのタンパクはOpossumのezrinであると判明した。

考 察

今回われわれは、NaPi-IIa の PTH によるエンドサイトーシス調節において、PTH に応答して活性化される細胞内シグナル伝達分子を制御する場としてカベオラ様ドメインが重要であることを示し、標的タンパクとして Ezrin を同定した。Ezrin は、刷子縁膜直下に存在する ERM (Ezrin-radixin-moesin) タンパクファミリーの一つであり、Ezrin のリン酸化はアクチンとの結合を促進させたり、microvilli の形成を促進することが指摘されている。したがって、PTH により Ezrin がリン酸化さ

れることにより、NaPi-IIa とアクチンとの相互作用が増強すると考えられる。アクチン重合阻害剤を用いた研究報告では、NaPi-IIa のエンドサイトーシスにアクチン骨格が必要であることが明らかになっていることから、Ezrin とアクチンの結合は、NaPi-IIa のエンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たしているものと考えられる。

今後、250kDa 基質分子の同定とともに、アクチン結合タンパクである spectrin や Arp2/3 などの関与を明らかにすることで、NaPi-IIa のエンドサイトーシス調節機構の全貌が解明されると考えられる。

Translocational regulation of type IIa sodium-dependent phosphate transporter by parathyroid hormone.

Kunitaka Nashiki, Tomoko Takeichi, Yutaka Taketani and Eiji Takeda

Department of Clinical Nutrition, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Parathyroid hormone (PTH) is the most potent and important regulator of the type IIa sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-IIa) which plays a key role in renal phosphate reabsorption and maintaining inorganic phosphate homeostasis. PTH inhibits the NaPi-IIa activity by stimulation of translocation from the apical plasma membrane to the intracellular organelle. In this paper, we investigated the mechanism of the translocation of NaPi-IIa from the apical plasma membrane by cell fractionation analysis using OK-N2 cells that stably express human NaPi-IIa established from opossum kidney cells (OK-P cells). NaPi-IIa was mostly localized in the caveolae-like membrane domains of the plasma membrane in OK-N2 cells. We also clarified that PTH activated both PKA and PKC, and these kinases markedly increased the phosphorylation of their 80kDa and 250kDa substrates on the caveolae-like membrane domains; we identified ezrin as a candidate protein for the 80kDa substrate. We conclude that caveolae-like membrane domains play an important role in the targeting, translocation, and signal compartmentalization for the translocational regulation of NaPi-IIa in renal proximal tubular cells.

Keywords : caveolae-like membrane domains, NaPi-IIa, phosphate transporter, PTH, PKA, PKC

備考：受賞対象となった研究内容は現在、他誌に投稿準備中のため、本誌編集委員会は徳島医学会賞贈与規程第2条「本賞は本会において優れた研究を発表し、かつ受賞後速やかに四国医学雑誌にその研究成果を原著、総説、プロシーディング等論文として発表する本会会員に授与する」にのっとりプロシーディングとして受理しました。