

## SLC20A2 が code する PiT-2 の局在・機能解析

研究分担者： 保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）  
研究協力者： 位田雅俊（岐阜薬科大学薬物治療学）  
入山真先（岐阜薬科大学薬物治療学）  
高木麻里（岐阜薬科大学薬物治療学）  
金子雅幸（岐阜薬科大学薬物治療学）

### 研究要旨

近年、中国から、ファール病の原因遺伝子として *SLC20A2* (*PiT-2*) が同定された。*PiT-2* はナトリウム依存性リン酸トランスポーターとして、細胞内のリン恒常性維持に関与していると考えられている。これまで *PiT-2* は体内のほぼ全ての組織に発現すると考えられている。一方、*PiT-2* の脳内における発現分布などは不明である。今後、ファール病の発症機序を考える上で、*PiT-2* の脳内分布に関する知見は非常に重要である。マウス脳を用いて生化学的および免疫組織学的に解析を行った。結果は大脳基底核、小脳を含む脳内全体に *PiT-2* は分布していた。また、*PiT-2* 発現細胞に関しては、主に神経細胞と血管内皮細胞に発現していることが明らかとなった。これらの成果は、現在進行中の *PiT-2* の機能解析と合わせてファール病発症機序の解明に重要である。

### A. 研究目的

中国にて原因遺伝子として報告された *SLC20A2* が code する *PiT-2* について、マウス脳を用いた生化学的および免疫組織学的解析を実施し、脳内における *PiT-2* 発現領域や発現細胞を明らかにする。

### B. 研究方法

*PiT-2* を認識する2つのモノクローナルとポリクローナル抗体を用いて、ラット脳を生化学的および免疫組織化学的に解析した。

（倫理面への配慮）

岐阜薬科大学動物実験審査委員会の承認を得て、施行した。

### C. 研究結果

両抗体で、これまでに *PiT-2* の発現が確認さ

れていた肝臓・腎臓と同様に脳においても、全く同様の発現が確認できた。そこで、各脳領域から抽出したサンプルを用いて Western blotting 法にて検討したところ、大脳皮質、線条体、海馬、黒質、小脳など脳内いずれの脳領域においてもその発現が確認された。その発現領域を詳細に検討するために、ラット脳の凍結切片を用いて、免疫組織学的手法として酵素抗体法を用いて、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 染色を実施した。DAB 染色においても、生化学的解析と同様に脳全体に *PiT-2* の発現が確認され、*PiT-2* の免疫陽性細胞の形態は、主に神経細胞を示していた。そこで、蛍光二重染色法を用いて *PiT-2* 発現細胞の検討を行った。その結果、*PiT-2* 陽性細胞は、大脳皮質では神経細胞のマーカーである  $\alpha$ -III Tubulin 陽性細胞との共局在を示した。また、線条体では中型有棘神経細胞のマーカーである

calbindin と、黒質においてはドパミン神経細胞のマーカーである tyrosine hydroxylase と、小脳においてはプルキンエ細胞のマーカーである calbindin との共局在を確認した。また血管内皮細胞との共局在も確認できた。一方で、これまで PiT-2 の発現細胞として考えられていたアストロサイトではその染色性はやや弱かった。また今回の検討では、ミクログリアやオリゴデントロサイトとの共局在は蛍光抗体法による免疫組織化学的検索でも確認できなかった。

#### D. 考察

SLC20A2 遺伝子の変異が報告され、フェール病発症は、PiT-2 の機能破綻によるリン代謝調節機構の異常が関与すると考えられている。興味深いことに PiT-2 の発現はこれまで考えられてきたアストロサイトや血管内皮細胞以外にも、多く神経細胞に発現していることが明らかとなった。一方で、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターには PiT-2 以外にも、同じファミリー内でも SLC20A1 (PiT-1) などがあるが、我々はすでに PiT-1 が脳内に広く発現していることを確認しており、PiT-2 の機能破綻と他のナトリウム依存性リン酸トランスポーターとの関係性は今後の研究課題である。また現在、PiT-2 変異遺伝子を導入した CHO 細胞のリン酸輸送機能の測定を行っている。これらの研究は、フェール病の発症機序における PiT-2 の機能解明を進展させるものであり、今後の治療法の開発研究の基盤となりうる。

#### E. 結論

PiT-2 は広く脳内に分布し、これまで PiT-2 の発現細胞として考えられていたアストロサイトや血管内皮細胞だけでなく、神経細胞にも強く発現していた。この検索結果はフェール病の発症機序に、他の神経変性疾患と同様、神経細胞の機能異常が関与してすると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

\* J.Neurol Sci に投稿準備中

##### 2. 学会発表

Masatoshi Inden, Masaki Iriyama, Mari Takagi, Masayuki Kaneko, and Isao Hozumi A study on the localization in the mouse brain of type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT2) associated with Fahr 's disease. Neuro2013, Kyoto 2013 年 6月 20-23日 (予定)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし