

助成番号 0846

腸管のカルシウムトランスポーター発現調節機構の解析

佐藤 隆一郎, 井上 順

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

概要 日本人の食生活は概ね理想に近いものとして評価が高い。しかし、ミネラルのうちでカルシウム摂取は所要量の100%に達することはなく、数少ない不足栄養素のひとつとして挙げられる。このような状況において、高齢社会を迎え、高齢者の骨代謝ホメオスタシスを維持することは困難を極めている。乳製品等のカルシウム含量の高い食品の摂取によりカルシウム摂取量を上げる試みはなされているものの、功を奏してはいない。従って、摂取量を高めることと同時に、カルシウム吸収効率を上昇させる試みが有効と考えられる。カルシウムは小腸でその大半が吸収されるが、これに関与するトランスポーターとして CaT1 (calcium transporter protein 1) が発見され、申請者らはこのヒト cDNA をクローニングして既に報告している。CaT1 はビタミン D により発現が制御されており、ビタミン D 様活性を持つ食品成分には CaT1 発現促進を介してカルシウム吸収効率を上昇させる効果が期待できる。ビタミン D の作用機序は細胞内のビタミン D 受容体を介しており、この受容体のビタミン D 結合部位に結合する食品成分はビタミン D 活性を模倣することが予想される。本研究では、ビタミン D 受容体の活性化を介して CaT1 発現を亢進し、カルシウム吸収上昇をもたらす食品因子の探索系の樹立と探索を行うことを目指した。培養細胞にビタミン D 受容体ならびにその応答配列を含むレポーター遺伝子を導入し、luciferase 活性によりリガンド活性を評価するアッセイ系を構築した。活性型ビタミン D は低濃度で強い応答を示し、アッセイ系の高感度が確認された。食品由来精製化合物を 200 種類程度集め、本アッセイ系に供し、ビタミン D 受容体リガンド活性を探索した。その結果、2 種類のフラボノイド類に活性が見出された。これらフラボノイドを用い、小腸上皮様細胞株 Caco-2 の内因性 CaT1 mRNA を上昇させるか検討を行った。その結果、有意な上昇効果が認められた。広範な食品成分の機能探索系として、本アッセイ系は優れた評価系であることが実証された。また、今後はこれらフラボノイド類が実験動物レベルでカルシウム吸収上昇に寄与するかについて検討を重ねる必要がある。

1. 研究目的

日本人の食生活は概ね理想に近いものとして評価が高い。しかし、ミネラルのうちでカルシウム摂取は所要量の100%に達することはなく、数少ない不足栄養素のひとつとして挙げられる。このような状況において、高齢社会を迎え、高齢者の骨代謝ホメオスタシスを維持することは困難を極めている。乳製品等のカルシウム含量の高い食品の摂取によりカルシウム摂取量を上げる試みはなされているものの、功を奏してはいない。従って、摂取量を高めることと同時に、カルシウム吸収効率を上昇させる試みが有効と考えられる。カルシウムは小腸でその大半が吸収されるが、これに関与するトランスポーターとして CaT1 (calcium

transporter protein 1) が発見され、申請者らはこのヒト cDNA をクローニングして既に報告している⁽¹⁾。CaT1 はビタミン D により発現が制御されており、ビタミン D 様活性を持つ食品成分には CaT1 発現促進を介してカルシウム吸収効率を上昇させる効果が期待できる。ビタミン D の作用機序は細胞内のビタミン D 受容体を介しており、この受容体のビタミン D 結合部位に結合する食品成分はビタミン D 活性を模倣することが予想される。本研究では、ビタミン D 受容体の活性化を介して CaT1 発現を亢進し、カルシウム吸収上昇をもたらす食品因子の探索系の樹立と探索を行うことを目指した。

2. 研究方法

培養細胞

ヒト小腸上皮様細胞株 Caco-2 は、定法に従い、培養、経代した。上皮様細胞に分化させる際には、over-confluent 状態の細胞をさらに 14 日間培養し、分化を進行させた。レポーターアッセイ用には、HEK293 細胞を用いた⁽²⁻⁴⁾。

レポーターアッセイ

レポーターアッセイ用のコンストラクトとして下記の 2 種類を用いた⁽⁵⁾。

<ラット Vitamin D 受容体(VDR)発現 plasmid>

<マウス osteopontin VDR 応答配列 reporter plasmid>

マウス osteopontin VDR 応答配列を 3 回重複させた配列を SV40 promoter 上流に挿入したコンストラクト (mSPP-1VDRE)

HEK293 細胞を 12-well plate にセットアップし、翌日に遺伝子導入した。

rVDR 200 ng/well

mSPP-1VDRE 200 ng/well

β-GAL 発現 plasmid 50 ng/well

チャコール処理した子牛血清(FBS)を 10% 含む培地で培養。24 時間後に各種化合物を 10 μM、100 μM となるように添加し、さらに 24 時間培養。その後、細胞を回収し、Luciferase 活性と β-GAL 活性を定法に従い測定。

対照実験として下記の 2 種類の plasmid を用いたレポーターアッセイも行なった。感度の面で上述した mSPP-1VDRE を用いた系が優れていたため、食品成分を用いた探索はその系で行なった。

<Gal4DBD-hVDR-LBD plasmid>

Gal4 DNA-binding domain の後方にヒト VDR ligand-binding domain を連結した。

<Gal4x5 reporter plasmid>

Gal4 結合部位を 5 回繰り返す配列を有するレポーター plasmid。

食品成分試料

各種食品成分の市販精製試料を約 200 種類程度集めた。化合物のカテゴリーを Fig. 2 に示した。

培養 Caco-2 細胞内因性 CaT1 mRNA 測定

通常培養 Caco-2 細胞、ならびに分化細胞より総 RNA を回収した。最終 12 時間、1,25(OH)Vitamin D₃ もしくはフ

ラボノイド化合物を含む培地で細胞を培養した。内因性の CaT1 mRNA は特異的な primer を設計し、Real-time PCR 法により測定した。同一試料を TaqMan probe を用い、GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) mRNA 量を測定し、CaT1/GAPDH 比を算出し、normalize した。

3. 研究結果

レポーターアッセイ系の評価

レポーターアッセイ系として 2 種類のレポーターを用意した。一つは、Gal4DBD を用いた評価系で、利点としてはヒトの VDR ligand-binding domain を挿入したことにより、ヒト VDR に対する食品成分の作用を直接評価できる点が挙げられる。結果として、1,25(OH)Vitamin D₃ 添加 1 nM で 10 倍、30 nM で 30 数倍程度の luciferase 活性の上昇が観察された (Fig. 1)。300 pM ではほとんど亢進が認められなかった。

一方、osteopontin プロモーター中の VDRE を 3 回繰り返したレポーターにおいては、1,25(OH)Vitamin D₃ 添加 1 nM で 50 倍程度の上昇、100~300 pM においても 10 数倍程度の活性上昇が認められた。以上の結果より、強い活性が期待できない食品成分の探索には、感度の良好な osteopontin プロモーター系を用いることに決定した。

食品成分を用いた活性評価

探索に用いた市販食品成分(精製試薬)約 200 種類の化合物のカテゴリーを Fig. 2 に示した。フラボノイド類がもっとも多く、全体の 1/3 強を占め、次いでテルペノイド類、ステロイド類が続く。多くの化合物はアグリコンであり、その配糖体も一部含む。

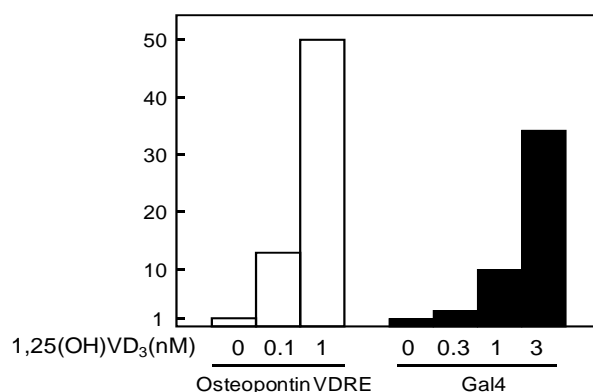


Fig. 1. Luciferase assays using different reporter plasmids

各種化合物を最終濃度 10 mM、100 mM となるように培地に添加し、24 時間培養した後に luciferase 活性を測定した。β-Gal 活性を遺伝子導入効率として評価し、luciferase 活性を β-Gal 活性で割った数値を活性として評価した。

繰り返し行なったアッセイ結果の一つを Fig. 3 に示した。フラボノイド化合物 X ならびにそのアセチル化合物 Y は、10 mM で微弱な、100 mM で相当量の活性上昇が観察された。約 200 種類の化合物のうち、X、Y に匹敵する活性は他には見出せなかった。

Caco-2 細胞の内因性 CaT1 mRNA 発現に及ぼす影響

Caco-2 細胞を 3 日間培養した後、RNA を回収し、mRNA の測定を行なった。同様に分化 Caco-2 細胞からも RNA を回収し、分化前後での内因性 CaT1 mRNA の変動を観察した。その結果、2 週間の分化過程の後、内因性

CaT1 mRNA 量は数倍に上昇することが確認された (Fig. 4)。

分化前後の Caco-2 細胞を用い、1,25(OH)Vitamin D3 への応答性、フラボノイド化合物の CaT1 mRNA 発現誘導効果を追跡した。化合物は細胞回収 12 時間前に培地に加えた。分化前 Caco-2 細胞においては、1,25(OH)Vitamin D3 に応答して CaT1 mRNA は激増した。このような条件下、フラボノイド化合物 X、Y は濃度依存的に内因性 CaT1 mRNA を上昇させた (Fig. 5)。

分化 Caco-2 細胞においては、1,25(OH)Vitamin D3 への応答性は分化前細胞に比べてやや現弱した (Fig. 6)。

フラボノイド化合物への応答性は、コントロール群に比べて有意差は確認できたものの、分化前細胞に比較して応答性は低下していた。

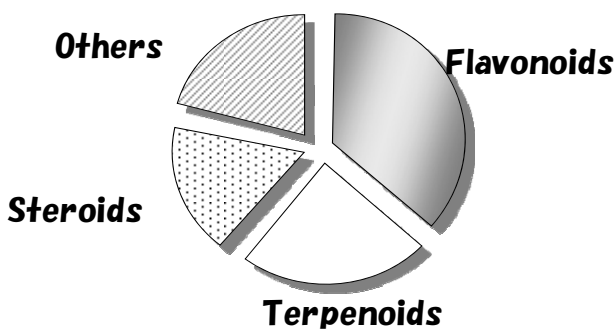


Fig. 2. Classification of food derived compounds (~200) tested in this study

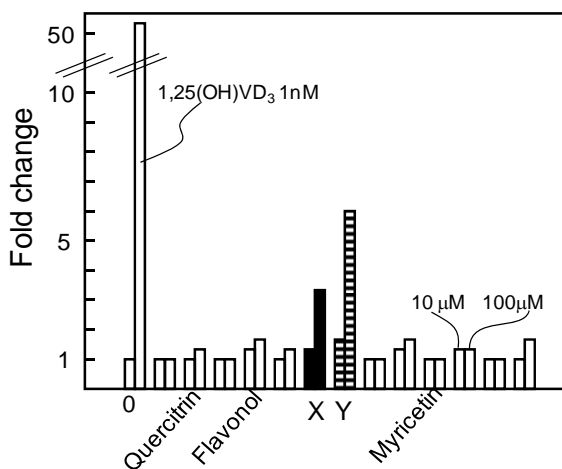


Fig. 3. Luciferase activities stimulated by food factors. X and Y: one of flavonoids.

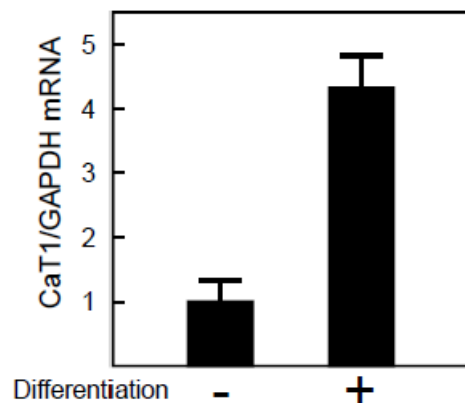


Fig. 4. The mRNA level of CaT1 after differentiation of Caco-2 cells

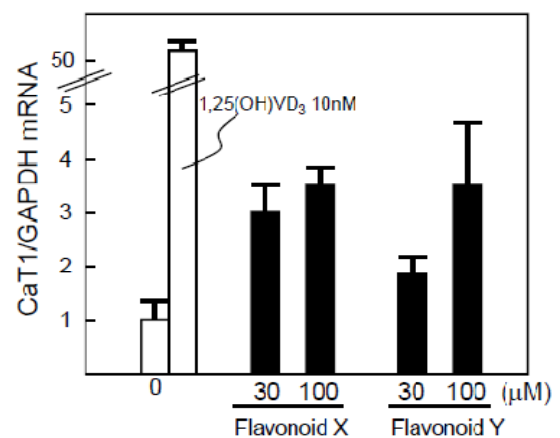


Fig. 5. Flavonoids increased CaT1 mRNA levels in undifferentiated Caco-2 cells

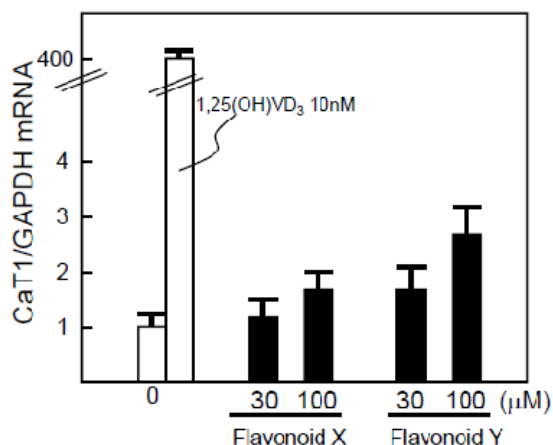


Fig. 6. Flavonoids increased CaT1 mRNA levels in differentiated Caco-2 cells

4. 考察

日本人のカルシウムの摂取量は、所要量を下回る。乳製品の摂取が低いことなどが主な理由であるが、今後ますます高齢化が進行する日本において、骨代謝の恒常性維持と言う点からもカルシウム出納を向上させることが望まれる。このような状況の中、カルシウムの摂取を増加させることと同時に、吸収率を高めることも必要と考えられる。その意味において、小腸上部においてカルシウム吸収に積極的に関与するトランスポーター CaT1 の発現亢進、活性上昇をもたらす食品成分の有効利用は重要となってくる。このような考えのもと、CaT1 発現増加作用を有する食品成分の探索を試みた。CaT1 遺伝子発現は活性型 vitamin D の支配を強く受けることから、VDR リガンド様活性を介して遺伝子発現亢進をもたらす食品成分の探索を分子細胞生物学的手法を用いて探索した。

本研究で着目した CaT1 (別名 TRPV6: transient receptor potential vanilloid type 6) は小腸上部、十二指腸での発現が高い Ca トランスポーターである。低 Ca 食にตอบสนองしてその遺伝子発現が上昇するとともに、活性型 vitamin D による発現制御を強く受ける⁽⁶⁾。VDR KO マウスにおいては、小腸からの Ca 吸収は著しく低下し、その主たる原因は十二指腸部における CaT1 低下によると考えられている。VDR は同じ核内受容体の RXR とヘテロ二量体を形成し、DR-3 (direct repeat-3: 5'-AGGTCA_nAGGTCA-3' 様配列) に結合し、リガンドの存在に依存して応答遺伝子の発現を制御している。ヒト CaT1 遺伝子のプロモーター解析の結果、転写開始点の 4 kb 並びに 2 kb 上流

部位にある複数の VDR 応答配列が転写制御に深く関与していることが示されている⁽⁷⁾。

本研究により、ある種のフラボノイド類には VDR を活性化し、応答遺伝子である CaT1 発現を亢進することが明らかとなった。その活性は活性型 vitamin D に比較すると微弱なものである。しかし、十二指腸は配糖体でなくアグリコンのフラボノイド類の吸収部位と考えられ、その高い膜透過性から高吸収率が期待できる。従って、アグリコンを摂取した際には小腸上皮細胞において、一過的にフラボノイド類が高濃度で存在する可能性は想定される。また、脂溶性ビタミン類は摂取過剰による弊害も生じることから、同様な機能を有する微弱な活性を持つフラボノイド類が小腸でのみ、機能を発揮することはむしろ望ましいことと考えることもできる。機能性食品成分として、またサプリメント用素材として、フラボノイド類の有効活用に期待したい。

本研究で用いた分子細胞生物学的なアッセイ系は、食品由来の化合物に期待される微弱な生理活性を検出するのに精度の高い、有効な評価系と見なすことができる。種々の食品成分について網羅的な活性を評価できる系としても、その利用価値は高いものとする。

5. 今後の課題

本研究で行なった分子細胞生物学的アッセイ系により得られた結果に基づき、細胞レベルで候補フラボノイドが CaT1 依存的なカルシウム吸収を促進するかについて検証する必要がある。さらに、実験動物レベルでも吸収増加について検討を行う必要がある。

また、VDR リガンド様活性は、活性型 vitamin D が低値の病的状況でのみ効果を発揮するのか、正常状況下でも内因性活性型 vitamin D に対して additional な効果を発揮するのかについて検討を重ねることが今後の課題として残っている。

文献

- (1) Takano, Y., Sato, R., Satsu, H. and Shimizu, M. (2003) Characterization of the human intestinal calcium transporter, CaT1, stably expressed CHO cells. *Cytotechnol.* 43, 113-120.
- (2) Arito, M., Horiba, T., Hachimura, S., Inoue, J. and Sato, R. (2008) Growth Factor-induced Phosphorylation of

- Sterol Regulatory Element-binding Proteins Inhibits Sumoylation, Thereby Stimulating the Expression of Their Target Genes, Low Density Lipoprotein Uptake, and Lipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 283, 15224-15231.
- (3) Kanayama, T., Arito, M., So, K., Hachimura, S., Inoue, J. and Sato, R. (2007) Interaction between Sterol Regulatory Element-binding Proteins and Liver Receptor Homolog-1 Reciprocally Suppresses Their Transcriptional Activities. *J. Biol. Chem.* 282, 10290-10298.
- (4) Nakahara, M., Furuya, N., Takagaki, K., Sugaya, T., Hirota, K., Fukamizu, A., Kanda, T., Fujii, H. and Sato, R. (2005) Ileal bile acid-binding protein functionally associated with the farnesoid x receptor or ileal bile acid transporter regulates bile acid activity in the small intestine. *J. Biol. Chem.* 280, 42283-42289.
- (5) Nishikawa, J., Matsumoto, M., Sakoda, K., Kitaura, M., Imagawa, M. and Nishihara, T. (1993) Vitamin D receptor zinc finger region binds to a direct repeat as a dimer and discriminates the spacing number between each half-site. *J. Biol. Chem.* 268, 19739-19743.
- (6) Cromphaut, SJV., Dewerchin, M., Hoenderop, JGJ., Stockmans, I., Herck, EV., Kato, S., Bindels, RJM., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R. and Carmeliet, G. (2001) Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor knockout mice: Functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13324-13329.
- (7) Meyer, MB., Watanuki, M., Kim, S., Shevde, NK. and Pike, JW. (2006) The Human Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6 Distal Promoter Contains Multiple Vitamin D Receptor Binding Sites that Mediate Activation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Intestinal Cells. *Mol. Endocrinol.* 20, 1447-1461.

No. 0846

Study on the Regulation of Gene Expression of an Intestinal Calcium Transporter

Ryuichiro Sato, Jun Inoue

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo

Summary

The daily diet in Japan has been highly evaluated in that it is well balanced. However, the daily intake of one of minerals, calcium, doesn't satisfy a requirement. There are many difficulties for the elderly in aged society to maintain bone homeostasis. In order to solve the issue, it is thought that elevation of calcium absorption rate, not only calcium intake, is also critical. Calcium is absorbed mainly at the small intestine, in which a calcium transporter, CaT1, works. Because gene expression of this transporter is regulated by vitamin D, certain food factors with a vitamin D-like activity are expected to facilitate calcium absorption through an increase in CaT1 gene expression. These factors should bind to the ligand-binding domain in the vitamin D receptor (VDR) to fulfill their biological functions. In the current study we attempted to establish a novel assay system to evaluate the VDR ligand activity of food factors. Using cultured cells expressing VDR and a reporter gene with VDR response elements, luciferase activities were measured. From among approximately 200 purified compounds derived from foods, two molecules of flavonoids were found to be active. These compounds, indeed, elevated CaT1 gene expression in the human cultured intestinal cells, Caco-2. These results demonstrate that this assay system is competent to evaluate the vitamin D-like functions of food factors. Further studies are required to verify that these flavonoids are capable to facilitate calcium absorption from the small intestine.