

機関番号：33905

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590163

研究課題名 (和文) プロトン/葉酸共輸送担体の発現制御機構及びエタノール  
関与の解明を目指して研究課題名 (英文) Regulation of intestinal expression of proton-coupled folate  
transporter and its relevance to folate malabsorption in  
alcohol consumption.

研究代表者

林 弥生 (HAYASHI YAYOI)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：00117847

研究成果の概要 (和文)：長期のアルコール摂取は葉酸欠乏を引き起こすため、葉酸吸収を司るプロトン/葉酸共輸送担体 (PCFT) に対するアルコール飲料中に含まれる成分の影響を検討した。Caco-2 細胞における PCFT による葉酸輸送はエタノール前処置で変化が認められなかったが、ワイン等に含まれる myricetin の前処理で有意に低下した。また、ヒト PCFT の発現制御機構に関する検討より、その主要な転写因子として KLF4 を同定し、その発現制御が HNF4 $\alpha$  (活性化因子) と CDX2 及び C/EBP $\alpha$  (抑制因子) により制御されていることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：Chronic alcohol consumption have been suspected to cause malabsorption of folates by decreasing the function of folate transporter(s) in small intestine. Therefore, we examined the effects of ethanol and several flavonoids on the function of proton-coupled folate transporter (PCFT). Pretreatment of Caco-2 cells with myricetin, which is included in wines, caused inhibition of the uptake of folate mediated by PCFT, but not with ethanol. We also examined human PCFT promoter activity with several transcriptional factors to elucidate transcriptional regulation mechanism involved in intestinal PCFT expression. It was found that KLF4 is a major nuclear factor involved in the activation of PCFT promoter, and the KLF4-induced activation is likely to be synergistically regulated by HNF4 $\alpha$ , CDX2 and C/EBP $\alpha$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：葉酸，メトトレキセート，トランスポーター，PCFT，転写活性化因子，転写抑制因子，エタノール，フラボノイド

## 1. 研究開始当初の背景

最近、我々は、葉酸（ビタミンB<sub>9</sub>）の腸管吸収を担うとみられる輸送担体（トランスポーター）の分子実体としてプロトン/葉酸共輸送担体（proton-coupled folate transporter, PCFT）を見出した。PCFTは小腸に多く発現しており、プロトン依存的に酸化型を含む葉酸類及びメトトレキサート（葉酸拮抗薬）を特異的に輸送することから、従来より腸管で知られていた葉酸輸送系の特性とよく合致していた。さらに、Qiu *et al.* による第1報では、葉酸吸収を担うトランスポーターとしてのPCFTの役割を決定付ける証拠として、その遺伝子変異による機能欠損が先天性葉酸欠乏症の原因となっていることが示されている。このようにして、PCFTの基本的な特性が明らかとなり、また、腸管吸収に働く葉酸トランスポーターとしての役割に疑いの余地はないとみられるに至った。

## 2. 研究の目的

葉酸は体内で合成されないため、その体内への供給は食物中の葉酸に依存しており、葉酸の欠乏は巨赤芽球性貧血や神経障害を惹起することが広く知られているが、特に、長期のアルコールの摂取においては血漿中葉酸濃度の低下が認められており、葉酸欠乏による健康障害が引き起こされることが危惧されている。この血漿中葉酸濃度の低下の要因の一つとして、腸管での葉酸吸収の低下が示唆されており、腸管における葉酸吸収の分子メカニズムやその発現制御機構を解明することは、葉酸の吸収不良に起因する疾患の予防や治療の観点からも極めて重要な課題である。

そこで、本研究では、アルコールによるPCFT発現抑制の可能性を探りながら、PCFTの発現制御機構の解明に取り組むこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) ルシフェラーゼアッセイ

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むpGL4.10ベクターに、hPCFTのプロモーター領域を組み込んだコンストラクトを作成し、レポーター遺伝子とした。また、哺乳動物発現ベクターであるpCI-neoベクターに、各種転写因子やコアクチベーターのcDNAを組み込んだプラスミドも作成した。細胞はヒトPCFT (hPCFT) の発現が高く、関与する転写

因子の発現も高いとみられるCaco-2細胞とhPCFTの発現が低く、関与する転写因子の発現も低いとみられるHEK293細胞を用い、これらにhPCFTのプロモーター領域を含むレポーター遺伝子と各種した一過性に発現させ、トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、hPCFTのプロモーター領域における転写活性について検討を行った。

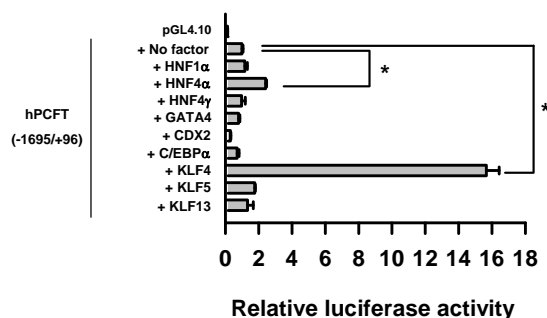
### (2) 葉酸及び葉酸類似薬の輸送評価

4日間培養しコンフルエントに達したCaco-2細胞を用い、<sup>3</sup>H]methotrexate (5 nM)及び<sup>3</sup>H]folate (5 nM)を含む取り込みHanks'緩衝液(pH 5.5)で、37°C、10分間の細胞内取り込みを評価した。アルコール及びアルコール飲料に含まれるフラボノイドの影響に関する検討においては、急性暴露の影響は取り込み緩衝液に試験薬物等を添加して、上述の輸送活性測定により評価を行い、長期暴露の影響は、試験薬物を含む細胞培養液で48時間培養した細胞を用いて同様に評価を行った。

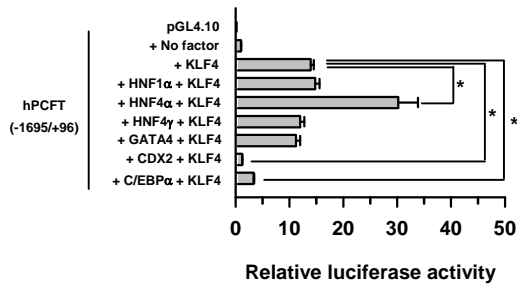
## 4. 研究成果

### (1) PCFTの発現制御に関わる転写因子の同定

腸管におけるPCFTの発現は、小腸上中部に限局し、下部及び結腸ではほとんど認められないことから、腸管部位に特異的な発現調節を受けていることが考えられる。そこで、PCFTと同様に小腸上部での限局的分布の顕著な転写因子及びエタノールにより発現あるいは機能が低下する可能性のある転写因子を



**Fig. 1. Effect of Various Transcription Factors on the Activity of hPCFT Promoter in HEK293 Cells**  
Mean ± S.E. (n = 4); transfection (200 ng of total plasmid DNA) of a reporter construct and a transcription factor (or empty pCI-neo vector for no factor) with 1:1 ratio; luciferase activity normalized to that for pGL4.10; \* p < 0.05 compared with control (no factor).



**Fig. 2. Effect of Cooperative Interaction between KLF4 and Various Transcription Factors on the Activity of hPCFT Promoter in HEK293 Cells**

Mean  $\pm$  S.E. (n = 4); transfection (200 ng of total plasmid DNA) of a reporter construct, KLF4 and a second factor with 1:1:1 ratio; luciferase activity normalized to that for pGL4.10; \* p < 0.05 compared with KLF4 alone as a transcription factor.

取り上げ、ルシフェラーゼアッセイにより PCFT のプロモーター領域の活性制御のメカニズムを検討した。転写因子としては、エタノールによる発現量の低下が示唆されており、かつ小腸での発現量が多いとされている CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) が特に注目される。また、小腸での発現量が多いとされている GATA binding protein 4 (GATA4), Krueppel-like factor 4 (KLF4), caudal type homeobox 2 (CDX2), hepatic nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) 等の関与の可能性を探った。

その結果、有意なプロモーター活性の増加が HNF4 $\alpha$  及び KLF4 の導入により認められ、特に KLF4 による活性が顕著に高いことが示された (Fig. 1)。一方、C/EBP $\alpha$  を含むその他の転写因子による活性化は観察されなかった (Fig. 1)。次に、PCFT のプロモーター領域に KLF4 が直接結合していることを確認するため、クロマチン免疫沈降法による検討を行ったところ、KLF4 は転写開始部位近傍のプロモーター領域に直接結合することが示された。したがって、小腸における PCFT の発現調節に関わる主要な転写因子は KLF4 である可能性が示唆された。次に他の因子が協働的に関わっている可能性について検討することにした。KLF4 に依存する PCFT プロモーター活性に対する各種転写因子の影響を検討した結果、HNF4 $\alpha$  により相乗的に活性化されることが明らかとなった (Fig. 2)。また、CDX2 及び C/EBP $\alpha$  については、KLF4 に依存した PCFT プロモーター活性の顕著な低下が認められた (Fig. 2)。Western blotting により各種転写因子の腸管内分布を検討した結果、KLF4 は小腸全域に発現が認められたのに対し、HNF4 $\alpha$  は上部、CDX2 及び C/EBP $\alpha$  は中部～下部で発現が高いことが示された。

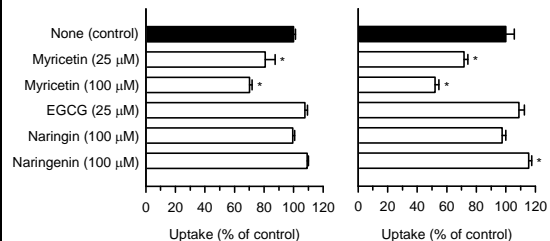
以上の結果から、PCFT の腸管部位特異的な

発現は、KLF4 を主体とする転写活性に加え、小腸上中部に存在し転写促進因子として働く HNF4 $\alpha$  と、小腸中下部に存在し抑制因子として働く CDX2 及び C/EBP $\alpha$  により制御されている可能性が示唆された。

(2) アルコール及びアルコール飲料に含まれるフラボノイドによる PCFT の機能制御

当初、エタノールによる葉酸及び葉酸拮抗薬の吸収不良は、エタノールによる発現低下が認められていた C/EBP $\alpha$  に依存すると考えていたが、上述のように C/EBP $\alpha$  の影響は PCFT の発現には抑制的に働くことが明らかとなったため、アルコール飲料の連用摂取により惹起される葉酸欠乏を PCFT の転写調節因子の変動で説明するのは困難となった。そこで、PCFT の発現制御機構に加えて、PCFT の機能低下に起因する葉酸吸収不良が関わっている可能性を検討するために、エタノール及びフラボノイド類暴露に伴う PCFT の葉酸輸送活性の変化について細胞レベルでの評価を行った。

Caco-2 細胞をエタノール (5%) 含有 DMEM で前処理した場合には、葉酸及び methotrexate (MTX) の取り込みに対する影響はなかったが、ワイン等のアルコール飲料に含まれる myricetin (100  $\mu$ M) 含有緩衝液での前処理で、葉酸及び MTX の取り込みが有意に低下し、葉酸類の取り込みに働く PCFT に対する活性低下作用が示唆された (Fig. 3)。myricetin は、取り込み試験液に添加した検討により PCFT に対する直接的な阻害作用も示唆された。さらに、glucose transporter を介する glucose 取り込みは影響を受けなかったことから、フラボノイド類の作用は PCFT に特異的と考えられた。今後、葉酸類の吸収低下の問題については、当初に予想したエタノールではなく、アルコール飲料中のフラボノイド類の PCFT 阻害作用に注目する必要があると考えられる。



**Fig. 3. Effect of Flavonoids (1 h Pretreatment) on the Uptakes of Folate and MTX in Caco-2 Cells**

Mean  $\pm$  S.E. (n = 4); uptakes of [ $^3$ H]folate (5 nM) and [ $^3$ H]MTX (5 nM) for 10 min at pH 5.5; pretreatment with a test compound in buffer for 1 h at pH 5.5; EGCG, epigallocatechin 3-gallate; control values were 242 and 129 fmol/10 min/mg protein, respectively, for folate and methotrexate; \* p < 0.05.

また、本知見は腸管における PCFT の発現調節機構を分子レベルで把握する上で重要であり、薬剤学的には、PCFT によって輸送される MTX 等の吸収変動に対応した投薬調節のための基礎情報を提供するものである。今後、PCFT を介した葉酸吸収機能変動のより詳細な分子メカニズムの解明により、関連病態等の理解の進展、新たな治療法の考案等の応用的展開を期待したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Molecular and functional characteristics of proton-coupled folate transporter. Hiroaki Yuasa, Katsuhisa Inoue, Yayoi Hayashi. *J. Pharm. Sci.*, 98, 1608 - 1616, 2009. (査読有)
2. 湯浅博昭, 高橋絢子, 太田欣哉, 井上勝央, 畠山 舞, 林 弥生: プロトン/葉酸共輸送担体の発現制御に関わる転写因子の検索. *薬剤学*, **69**, S212, 2009. (査読無)
3. Katsuhisa Inoue, Yasuhiro Nakai, Sayaka Ueda, Shunsuke Kamigaso, Kinya Ohta, Mai Hatakeyama, Yayoi Hayashi, Masaki Otagiri, Hiroaki Yuasa. Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am. J. Physiol.*, **294**, G660 - G668, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. PCFT を介する葉酸類の輸送に対するフラボノイド類の影響. 西嶋千尋, 畠山 舞, 林 弥生, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭. 日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011. 3. 29
2. Effects of flavonoids on proton-coupled folate transporter. Hiroaki Yuasa, Chihiro Nishijima, Mai Hatakeyama, Yayoi Hayashi, Kinya Ohta, Katsuhisa Inoue. Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (4th), (New Orleans, Louisiana, U.S.A.) 2010. 11. 16
3. PCFT の転写調節における KLF4 と HNF-4 $\alpha$  の関与. 畠山 舞, 太田欣哉, 井上勝央, 林 弥生, 湯浅博昭. 第 25 回日本薬物動態学会年会 (さいたま) 2010. 10. 8
4. Caco-2 細胞における葉酸類の取り込みに対

するエタノール及びフラボノイド類の影響. 西嶋千尋, 畠山 舞, 林 弥生, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭. 日本薬学会第 130 年会, (岡山) 2010. 3. 28

5. プロトン/葉酸共輸送担体の発現制御に関わる転写因子の検索. 湯浅博昭, 高橋絢子, 太田欣哉, 井上勝央, 畠山 舞, 林 弥生. 日本薬剤学会第 24 年会 (静岡) 2009. 5. 23
6. 小腸に存在する転写因子による葉酸/H<sup>+</sup>共輸送担体 (PCFT) の発現制御. 高橋絢子, 畠山 舞, 林 弥生, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭. 第 23 回日本薬物動態学会年会 (熊本) 2008. 10. 30
7. Functional characteristics of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 (hPCFT/HCP1) heterologously expressed in mammalian cells. Misato Sugiura, Katsuhisa Inoue, Yasuhiro Nakai, Naoki Abe, Kinya Ohta, Mai Hatakeyama, Yayoi Hayashi, Hiroaki Yuasa. Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference), (Nagoya, Japan) 2008. 2. 22

[その他] (計 1 件)

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/yzg/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

林 弥生 (HAYASHI YAYOI)  
金城学院大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00117847

### (2)研究分担者

井上 勝央 (INOUE KATSUHISA)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・  
准教授  
研究者番号: 50315892

畠山 舞 (HATAKEYAMA MAI)  
金城学院大学・薬学部・助教  
研究者番号: 20454340