

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780144

研究課題名（和文） ビタミンB-12の腎臓における栄養素再吸収制御機能の解明

研究課題名（英文） Studies on the regulation of the reabsorption of nutrition by vitamin B-12 in the Kidney

研究代表者

小林 謙一（KOBAYASHI KENICHI）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：80434009

研究成果の概要（和文）：

腎臓における Megalin を介した栄養素再吸収にビタミン B<sub>12</sub> が必須であることを実験的に証明することを目的として本研究を実施した。

その結果、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的な血中ビタミン A の変動を見出した。そのメカニズムは、(1) 腎臓における Megalin を介したレチノール結合タンパク質（RBP）の再吸収、(2) 肝臓における RBP mRNA 発現ともに、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的であることが明らかとなった。また、ビタミン D 結合タンパク質（DBP）も RBP と同様の傾向を示したが、血中ビタミン D の変動は認められなかった。また、無機リン濃度の変動も、血中ビタミン B<sub>12</sub> に応じて変化することを明らかにした。また、そのメカニズムが、Megalin を介したエンドサイトーシスがビタミン B<sub>12</sub> 依存的であることによる可能性が示唆された。また、培養細胞レベルの実験で、ビタミン B<sub>12</sub> が細胞内輸送機構にも影響を与えていることなど、これまで報告されていなかったビタミン B<sub>12</sub> の新規機能について明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

This research project aimed to prove that vitamin B-12 is essential to reabsorb nutrition via Megalin in the Kidney.

Here we found serum vitamin A concentration's change depending on vitamin B-12 status. It was shown that (1) the reabsorption of retinol-binding protein (RBP) via Megalin in the Kidney and (2) the transcription of RBP mRNA in the Liver change according to serum vitamin B-12 concentration. Also, we found that the reabsorption of vitamin D binding protein was decreased in the Kidney of vitamin B-12 deficiency, but serum concentration did not change. Interestingly, serum concentration of inorganic phosphorus also changed dependent on the vitamin B-12 status. It is suggested that the endocytosis of Megalin may be controlled by vitamin B-12 or the urinary condition by Vitamin B-12 deficiency.

And in the experiment using cultured cell, we found the effect of Vitamin B-12 on cellular transport system.

These results suggest that vitamin B-12 is linked to membrane traffic including Megalin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：栄養生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ビタミン B-12、ビタミン A、ビタミン D、腎臓、メガリン、リン代謝、骨代謝、エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病とメタボリックシンドロームとの関連性が注目を集めるようになり、腎臓栄養学の重要性が高まってきている。これまで、腎臓は、もっぱら尿を作り出す排泄器官として位置づけられてきたが、近年肝臓と並ぶ栄養素の蓄積器官であることが明らかになってくると、腎臓が生体恒常性維持にとって重要な臓器であると認知されるようになった。その代表的な栄養素にビタミン B<sub>12</sub> がある。しかし、その腎臓における栄養素の再吸収メカニズムについては、長らく不明のままであった。

近年、腎臓において Megalin と呼ばれる分子サイズ 600 kDa の 1 回膜貫通型タンパク質が、ビタミン B<sub>12</sub>、ビタミン A、そしてビタミン D の再吸収受容体として機能していることが明らかとなった。具体的には、これらのビタミンに特異的な結合タンパク質（トランスコバラミン II (TCII) やレチノール結合タンパク質 (RBP)、ビタミン D 結合タンパク質 (DBP)) が、Megalin と相互作用することで、エンドサイトーシスを介したビタミンの再吸収が起こるものと考えられる。これらは、Megalin ノックアウトマウスの解析で、ビタミン B<sub>12</sub> やビタミン A、ビタミン D の腎臓における再吸収が停止し、尿中に排出されたことから明らかになった。しかし、Megalin を介したビタミンの再吸収の調節メカニズムおよびビタミン同士の関連性については全く不明であった。

そこで申請者は、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットの腎臓組織を用いて、Megalin の局在変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏によって、Megalin が近位尿細管上皮細胞の尿細管腔側細胞膜に蓄積していることを見出した。また、興味深いことにビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の腎臓では、RBP の細胞内への取込みが抑制されていることを見出した。また、ビタミン A 欠乏ラットでは、このような顕著な変化が現れないことから、Megalin を介したエンドサイトーシスには、ビタミン B<sub>12</sub> の存在が重要である可能性が示唆された。

もし、この可能性が事実であれば、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏腎では、ビタミン A のみならずビタミン D の再吸収も減少していることが予想される。また最近、Megalin が尿中の無機リンの再吸収に関与する NaPi 共輸送体と相互作用することも明らかとなり、血中リン濃度との関連も示唆されている。そう考えると、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏によって NaPi 共輸送体が細胞膜上に大量に蓄積された結果、リン再吸収が促進している可能性も予想される。これらを合わせて考えると、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏腎では、骨代謝に関連するビタミンやミネラルの再吸収にも重篤な影響がある可能性が考え

られる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腎臓における Megalin を介した栄養素再吸収にビタミン B<sub>12</sub> が必須であることを実験的に証明することである。具体的には、①ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットを作製し、腎臓におけるビタミン A およびビタミン D、そしてリンの再吸収に及ぼす影響を検討する、②培養細胞を用いその分子メカニズムを検討するという 2 点を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットの作製

妊娠・授乳期を通してビタミン B<sub>12</sub> 欠乏飼料で飼育した Wistar 系雌ラットから産まれた仔ラットを用い、100 日間ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏飼料で飼育したラットをビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットとした。このラットを用い、①対照群、②欠乏群、③ビタミン B<sub>12</sub> 再供給群 (7 日間) を設定し、飼育を実施した。

### (2) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルの血清ビタミン A およびビタミン D、無機リン濃度の生化学的検討

上記のラットを用いて、血清ビタミン A およびビタミン D、無機リン濃度を、常法に従って、検討した。

### (3) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットの組織学的検討

上記のラットの腎臓組織を、ホルマリンで固定した後に、常法に従って、パラフィン包埋を行った。また、凍結切片の作製も同時に行った。その後、RBP、DBP、NaPi 共輸送体の抗体を用いて、免疫染色を行った。その後、ヘマトキシリン染色で核染色を行い、検鏡した。

### (4) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットにおける RBP、DBP のタンパク質存在量の解析

上記のラットの血清、肝臓及び腎臓における RBP 及び DBP の存在量を Western Blotting を行い、比較検討を行った。

### (5) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットにおける RBP、DBP の遺伝子発現量解析

上記のラットの肝臓及び腎臓における RBP 及び DBP mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットが体内のビタミン A に及ぼす影響

ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットを用いて、各群（対照群、欠乏群、24 時間再供給群、7 日間再供給群）の血中ビタミン A 濃度を検討した結果、対照群と比べ欠乏群で有意に減少し、再供給群で回復するという、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的なビタミン A の変動を明らかにできた。

次に、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏が、腎組織におけるレチノール結合タンパク質 (RBP) の再吸収に及ぼす影響についての検討を行った。まず、組織学的検討を行った結果、対照群では、RBP の近位尿細管上皮細胞内で陽性像が確認されたのに対し、欠乏群で陽性像が顕著に減少していた。これは、これまでの実験と同結果であった。また、Western Blotting 法でも確認した結果、組織学的結果と同様、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的な変動を明らかとした。しかし、RBP は、腎臓でも生合成されていることが知られている。この事実から、この RBP が、腎組織での生合成によるものか、再吸収によるものかを判断するために、RBP 遺伝子発現量を比較した結果、各群間で有意な変化は認められなかった。以上の結果から、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的なビタミン A 濃度の変動は、腎臓における RBP の再吸収の抑制によることが示唆された。

血中の RBP は、肝臓における RBP によって大部分は合成されることから、肝臓における RBP のタンパク質レベルでの存在量の検討を行った結果、腎臓と同様ビタミン B<sub>12</sub> 依存的な変動を明らかとした。それを踏まえて、肝臓における RBP 遺伝子発現量の検討を行った結果、興味深いことに、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的に肝臓 RBP 遺伝子発現量が変動することを明らかにした。

##### (2) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットが体内のビタミン D に及ぼす影響

Megalin は、ビタミン B<sub>12</sub> のみならずビタミン A およびビタミン D の再吸収受容体として機能している。上記の結果より、ビタミン B<sub>12</sub> 依存的なビタミン A の腎臓における再吸収の変動が観察された。そこで、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態では、ビタミン D の腎臓における再吸収にも影響があることが予想される。そこで、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットを用いて、腎臓におけるビタミン D の結合タンパク質である DBP の再吸収に及ぼす影響について組織学的な検討を行った。その結果、DBP は、対照群の腎臓では DBP のビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態の腎臓では近位尿細管細胞の上皮細胞の尿細管腔膜上に DBP の強い陽性像が確認され、再供給群では回復傾向が認められた。しかし、血中ビタミン D 濃度の変動は認められなかった。この理由は、肝臓の DBP 遺伝子発現量の

変化がなかったことが示唆された。

##### (3) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルラットが腎臓における無機リン再吸収に及ぼす影響

近年、Megalin が尿中の無機リンの再吸収に関与する NaPi 共輸送体と相互作用することも明らかとなり、血中リン濃度との関連も示唆されている。

そこで、まず血中無機リン濃度の変動について検討した。その結果、興味深いことに、血中無機リン濃度もビタミン B<sub>12</sub> 依存的であることを見出した。

次に、NaPi 共輸送体への影響について検討したが、明確な結論を得るまでには至らなかった。

##### (4) ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデル細胞の作製と RBP の輸送に及ぼす影響の解析

培養細胞レベルでの影響を検討する目的で、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットの血清を用いた実験を計画していたが、充分量血清を得ることができなかった。そこで、ビタミン B<sub>12</sub> をアデノシル型とメチル型の 2 つの誘導型に変換する重要な酵素である MMADHC 遺伝子を、siRNA を用いてノックダウンさせた安定発現株を構築した。その細胞内における RBP の挙動を検討した結果、RBP がシス・ゴルジ体に顕著に蓄積していることが認められ、細胞内輸送が阻害されていた。また、その細胞に、SAM を添加すると輸送能が回復した。従って、ビタミン B<sub>12</sub> が細胞内輸送機構にも何らかの機能を有する可能性が示唆された。

以上の研究結果から、血中ビタミン B<sub>12</sub> 濃度もしくはビタミン B<sub>12</sub> 欠乏に起因する尿中の生理条件の変化（メチルマロン酸尿など）が、腎臓における Megalin を介したエンドサイトーシスに密接に関連していることを明らかにすることができた。また、Megalin を介したさまざまな栄養素輸送に、ビタミン B<sub>12</sub> が重要であることを示すことができた。

#### 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 2 件）

(1) Kobayashi K., Cheng D, Huynh M, Ratnac KR, Thordarson P, Braet F.

Imaging fluorescently labeled complexes by means of multidimensional correlative light and transmission electron microscopy: a practical approach. *Methods Cell Biol.* (査読有), **111**, 1-20 (2012)

(2) K.A. Jahn, D.A. Barton, K. Kobayashi, K.R. Ratnac, R.L. Overall, F. Braet.

Correlative microscopy: providing new

understanding in the biomedical and plant sciences. *Micron*, (査読有), **43**, 565-582. (2012)

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 小林 謙一、志賀 孝宏、滝 拓也、石井 京子、石田 香織、河田 哲典、瀬川 博子、宮本 賢一、竹谷 豊、田所 忠弘、松井 芳光、山本 祐司: ビタミン B-12 欠乏が腎臓におけるビタミン D や無機リンの再吸収に及ぼす影響: 第 85 回日本生化学会大会 福岡 2012 年 12 月

(2) 志賀 孝宏、田中 はるか、石田 香織、古庄 律、河田 哲典、松井 芳光、小林 謙一、山本 祐司:

ビタミン B12 がビタミン A の輸送に及ぼす影響  
第 85 回日本生化学会大会 福岡 2012 年 12 月

(3) 橋本 知壮、松本 麻未、松井 芳光、小林 謙一、山本 祐司

変異型 TSC2 による Rac1 活性変動メカニズムの解析  
第 85 回日本生化学会大会 福岡 2012 年 12 月

(4) 加藤 延郎、志知 雄太、松井 芳光、小林 謙一、山本 祐司

Ketogenic diet による SIRT1 を介した代謝変化の解析  
第 85 回日本生化学会大会 福岡 2012 年 12 月

(5) 津村 孝之、松井 芳光、松本 雄宇、廣田 弥里、遠田 昂史、貴家 康尋、福井 勝、田所 忠弘、小林 謙一、山本 祐司、DNA マイクロアレイ法を用いた大豆乳酸菌発酵物(FiLact<sup>®</sup>)摂取による有用性の探索

日本食生活学会第 45 回大会 福岡 2012 年 11 月

(6) Nakanishi Y., Okado M., Takagi Y., Yamamoto Y., Kobayashi K., Matsui Y., and Homma S.

Separation of microbes to degrade melanoidin formed in cane molasses and model system

11<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard Reaction (ISMR) Nancy,

France, 2012 September 16-20

(7) 志賀 孝宏、滝 拓也、石井 京子、石田 香織、河田 哲典、田所 忠弘、松井 芳光、山本 祐司、小林 謙一:

ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏が腎臓における Megalin を介したビタミン A およびビタミン D の再吸収に及ぼす影響、第 6 回トランスporter 研究会九州部会 福岡 2012 年 9 月

(8) 志賀 孝宏、滝 拓也、石井 京子、石田 香織、河田 哲典、瀬川 博子、宮本 賢一、竹谷 豊、田所 忠弘、山本 祐司、小林 謙一: Megalin を介したビタミン・無機リンの再吸収機構におけるビタミン B<sub>12</sub> の重要性、第 7 回トランスporter 研究会 京都 2012 年 6 月

(9) 山本 祐司、白井 智美、小林 謙一、田所 忠弘; Eker rat (結節性硬化症モデル) のコーヒ摂取による腎腫瘍および代謝への影響解析、第 66 回日本栄養・食糧学会大会 仙台 2012 年 5 月

(10) Kobayashi K., Huynh M, Cheng D, Thordarson P, Braet F. : Correlative light and electron microscopy studies on human colorectal cancer cells in vitro.

*Focus on Microscopy 2012*. Singapore 2012 年 4 月

(11) 志賀 孝宏、田中 はるか、石田 香織、谷岡 由梨、古庄 律、河田 哲典、小林 謙一、山本 祐司、田所 忠弘

ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏は体内レチノール結合タンパク質 (RBP) を減少させる 日本ビタミン学会 第 63 回大会 広島 2011 年 6 月

〔図書〕(計 3 件)

(1) 江頭祐嘉合・真田宏夫 編著 小林 謙一 他 9 名著 基礎栄養の科学 (栄養管理と生命科学シリーズ)(分担執筆) 理工図書 2012 年 3 月 総ページ数 335 ページ

(2) 寺本明子、James W. Hove、田所忠弘 編修 小林 謙一、佐藤英一、沼波秀樹、山本祐司 共著、英語で読み解く生命科学 Learning Life Science in English 建帛社 2012 年 3 月 総ページ数 88 ページ

(3) 大村正史、本 三保子、山田一哉 編著 小林 謙一 他 10 名著 化学・生化学 人体の構造と機能 (栄養管理と生命科学シリーズ) (共著) 総ページ数 345 ページ

〔その他〕

受賞(学生優秀発表賞) 第 7 回トランスporter 研究会 京都 2012 年 6 月

志賀 孝宏、滝 拓也、石井 京子、石田 香織、河田 哲典、瀬川 博子、宮本 賢一、竹谷 豊、田所 忠弘、山本 祐司、小林 謙一: Megalin を介したビタミン・無機リンの再吸収機構におけるビタミン B<sub>12</sub> の重要性

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 謙一 (KOBAYASHI KENICHI)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号: 80434009