

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：34305
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K00894
研究課題名（和文）ビタミン輸送のミッシングリンクをつなぐ

研究課題名（英文）Missing link in vitamin transport

研究代表者

松尾 道憲 (Matsuo, Michinori)

京都女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：00335308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：未だに未解明なビタミン輸送の分子機構を明らかにすることを目的として、どのトランスポーターがどのビタミン及び分子種を輸送するのかを検討した。その結果、ABCB6とABCG5/ABCG8がそれぞれビタミンB12とビタミンKを輸送すること、NPC1L1がビタミンE、ビタミンKとシフォナキサンチンを結合することを明らかにした。NPC1L1とABCG5/ABCG8がそれぞれ吸収と排出に働くことで、脂溶性ビタミンの体内量を制御しているモデルを提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、未解明であるビタミン輸送担体の実態が明らかになり、ビタミン吸収の分子機構におけるミッシングリンクをつなぐこととなる。トランスポーターに着目したビタミンの効率的な吸収を可能にする食品、健康食品の開発や、トランスポーターによる輸送も考慮に入れた食生活の提案への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the transporter proteins in order to clarify molecular mechanisms of vitamin transport. We have demonstrated that ABCB6 and ABCG5/ABCG8 transport vitamin B12 and vitamin K respectively and that NPC1L1 binds vitamin E, vitamin K, and siphonaxanthin. These findings suggest that ABCG5/ABCG8 and NPC1L1 may play important roles in regulation of hydrophobic vitamins absorption.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミン 輸送 トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

数多くのビタミン輸送研究によって、それぞれのビタミンの吸収効率と動態は詳細に分かっている。しかし、ビタミンの膜輸送を担うタンパク質は、全体像が未だ分かっていない。

NPC1L1 は細胞膜に発現する膜タンパク質であり、小腸でのコレステロール吸収に重要な役割を果たす(図1)。NPC1L1 がビタミン K も輸送することが報告された(*Sci. Transl. Med.*, 7, 275, 2015)。ATP-binding cassette(ABC)トランスポーターは、ATP 加水分解のエネルギーを使って様々な基質を輸送する膜タンパク質である(図1)。ABCD4 の変異が、リソソームから細胞質へのビタミン B12 輸送異常による遺伝性のビタミン B12 欠乏症を引き起こす(*Nat. Genet.*, 44, 1152, 2012)。ABCA1 と ABCG1 がそれぞれ腸管上皮細胞と末梢細胞において、細胞質から血液側へのビタミン E 輸送に関与している。しかし、ノックアウトマウスで顕著な表現型が見られないものも多く、他の ABC トランスポーターもそれらのビタミンの輸送に働く可能性が高い。

我々は NPC1L1 と ABC トランスポーターによるリン脂質、コレステロール輸送を明らかにしてきた(*J. Lipid Res.*, 47, 1791, 2006, *J. Biol. Chem.*, 282, 14868, 2007, *PLoS ONE*, 9, e116162, 2014, *PLoS ONE*, 19, e0155400, 2016)。その過程で発現ベクターと安定発現株を樹立してきた。特に、ABC トランスポーターについては、ヒト 48 種の cDNA 全てを揃え、N 末端、C 末端融合 GFP 発現ベクターをそれぞれ保有している。上記のように複数の ABC トランスポーターが相補しながら機能している可能性が高いことから、トランスポータータンパク質によるビタミン輸送活性を網羅的に調べることにした。

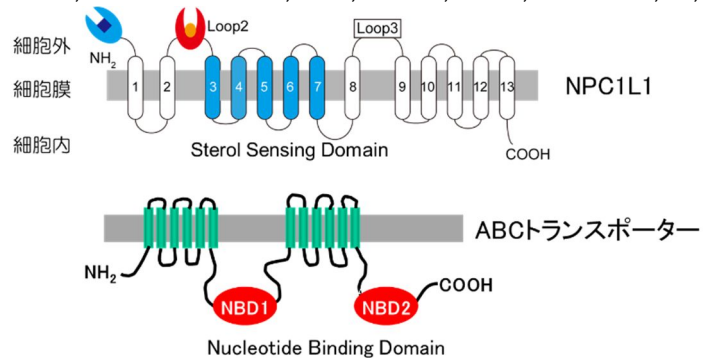


図1 NPC1L1とABCトランスポーターの模式図

2. 研究の目的

未だに未解明なビタミン輸送の分子機構を明らかにすることを目的として以下の研究を行う。

- 1) どのトランスポーターがどのビタミン及び分子種を輸送するのかを明らかにする。
- 2) 精製タンパク質を用いた実験及び GFP 融合トランスポータータンパク質の発現量で補正して、それぞれのトランスポーターのビタミン輸送活性を定量的に明らかにする。
- 3) 小腸上皮細胞、肝細胞、腎尿細管細胞におけるトランスポータータンパク質の発現量を調べ、それぞれのトランスポーターのビタミン輸送への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

1) ビタミン B12, E, K を輸送するトランスポーターの同定

a. 細胞からのビタミン検出限界の検討

組織中のビタミン B12 (コバラミン)、ビタミン E (アルファトコフェロール)、ビタミン K (メナキノン) を HPLC で検出する系は確立されているが、培養細胞及び培地での検出ができることを確認する。また、ビタミン B12 については、微生物法でも検出を確認する。輸送を検出し易くする目的で、ビタミン類を細胞外から添加して、細胞内のビタミン保持量の増加が可能か検討する。さらに、検出限界を検討し、逆算して以下の実験に必要な細胞量と培地量を見積もる。

b. ABC トランスポーター及び NPC1L1 の発現

ABC トランスポーター発現ライブラリーと NPC1L1 発現ベクターを用いて、HEK293 細胞と COS7 細胞で一過的にタグ無し、N 末 GFP 融合、C 末 GFP 融合トランスポーターを発現させる。発現レベルは、トランスポーターに対する抗体及び GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングと GFP 蛍光を利用して FACS で測定する。発現レベルとビタミン測定の検出限界から計算して多量の細胞が必要なものについては、BHK 細胞を用いた誘導発現系を用いる。いくつかの ABC トランスポーターについては既に誘導発現細胞株が存在するが、無いものについては細胞株を樹立する。

c. トランスポーター発現細胞でのビタミン輸送の測定

トランスポーターを発現させた細胞を用いて、ビタミン B12、ビタミン E、ビタミン K の輸送を測定する。網羅的に行うだけでなく、小腸上皮、腎尿細管で高発現することが報告されているトランスポーターについては狙い撃ちで重点的に解析する。

細胞膜にトランスポーターが発現した細胞の条件培地を回収して、細胞中と培地中のビタミン B12 量を HPLC 法と微生物法で、ビタミン E 量とビタミン K 量を HPLC で測定する。これにより、小腸上皮細胞や末梢細胞でビタミン B12 を細胞外へ輸送するトランスポーター、小腸上皮細胞や末梢細胞でビタミン E およびビタミン K を排出するトランスポーターを同定する。

このようにして、小腸での吸収と吸収抑制、肝臓での胆管への排出、末梢での血中への排出、腎臓での再吸収に働きうるトランスポーターを同定する。

ミトコンドリアに局在するトランスポーター (ABCB8, ABCB10 など) が発現した細胞を回収して、細胞中のビタミン B12 量を HPLC 法と微生物法で測定する。さらに、ミトコンドリアを超遠心分離で単離し、同様にビタミン B12 量を測定する。これにより、末梢細胞でビタミン B12 をミトコンドリア内へ輸送するトランスポーターを同定する。

2) 精製タンパク質を用いたトランスポーターの生化学的解析

a. 精製タンパク質の調製

NPC1L1 の N 末端ドメイン又は全長を安定発現させた FreeStyle 293F 細胞株の培養上清又は細胞から NPC1L1 をヒスチジンタグで精製する。なお、この可溶性は既に確立しており、1L の培養液から約 4.5 mg の精製 N 末端ドメイン標品が得られる。上記の実験で明らかになったビタミンを輸送する ABC トランスポーターも同様に 293F 細胞に発現させ、精製する。

b. 精製タンパク質を用いたビタミン結合実験

精製した各タンパク質とビタミンとの結合を調べる。洗浄後にタンパクと結合したビタミン量を野生型と輸送機能を失った変異体と比較し、親和性も含めて結合能を明らかにする。

c. 精製タンパク質を用いた輸送実験

精製した各タンパク質をリポソームに再構成し、ATP 存在下で ATP 加水分解依存的なビタミン輸送活性を定量的に測定する。

3) ビタミン輸送特性と寄与度の解明

a. 各分子種の輸送活性比較

ビタミン E には トコフェロール、トコフェロールといった分子種が、ビタミン K には K1 (フィロキノ)、K2 (メナキノ)、K3 (メナジオン) といった分子種が存在することから、それぞれの分子種の輸送活性を調べる。

4. 研究成果

1) ビタミン B12, E, K を輸送するトランスポーターの同定

a. 細胞からのビタミン検出限界の検討

組織中のビタミン B12 (コバラミン)、ビタミン E (アルファトコフェロール)、ビタミン K (メナキノ) を HPLC で検出する系は確立されているが、培養細胞及び培地での検出ができるかは不明なため、それを確認した。脂溶性ビタミンを添加した培養細胞及び培地から脂質抽出し、HPLC で検出することができた。また、ビタミン B12 については、微生物法で培養細胞及び培地中の量を感度よく測定することができた。

b. ABC トランスポーター及び NPC1L1 の発現

ABC トランスポーター発現ライブラリーと NPC1L1 発現ベクターを用いて、HEK293 細胞と COS7 細胞で GFP 融合トランスポーターを発現させた。GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングと GFP 蛍光を利用して、発現を確認できた。そこで、さらに G418 で選抜することでそれらの GFP 融合トランスポーターを発現した HEK293 細胞と COS7 細胞の安定発現株を構築した。また、ビタミン E は TTP が細胞内の輸送に関わるため、BHK 細胞で TTP と ABC トランスポーターの共発現株も構築した。

c. トランスポーター発現細胞でのビタミン輸送の測定

ビタミン B12 については、GFP 融合 ABCD4 発現細胞をポジティブコントロールとして微生物法で輸送を測定したところ、ビタミン B12 量の変動が見られたが、再現性が悪かった。ビタミン B12 の輸送実験は、細胞内のビタミン B12 量が少ないため、そこからの輸送を測定するのは困難であった。そこで、培地中にビタミン B12 を添加して細胞内濃度を高めた後に輸送を測定した。

ビタミン E については、GFP 融合 ABCA1、GFP 融合 ABCG1 発現細胞をポジティブコントロールとして HPLC で排出を測定したが、排出活性が見られなかった。そこで、TTP と ABC トランスポーターの共発現株を樹立し、HPLC でビタミン E 量の測定を行った。ABC タンパク質を発現した BHK 細胞に TTP を発現させることによりビタミン E の排出量は上がったことから、ABC トランスポーターと TTP による協調的な輸送が示唆された。

ビタミン K については、合成ビタミン K であるビタミン K3 は高濃度で細胞毒性を示すことから、細胞に対するビタミン K3 の細胞毒性を調べることで、間接的にビタミン K 輸送を検討した。NPC1L1 がステロールとビタミン K を輸送すること、ABCG5/ABCG8 がステロールを輸送することから、ABCG5/ABCG8 も NPC1L1 と同様にビタミン K も輸送するのではないかと仮説を立てて検証した。ABCG5/ABCG8 を発現する BHK 細胞と HEK293 細胞はコントロール細胞に比べビタミン K3 の細胞毒性が低下していたことから、ABCG5/ABCG8 が細胞内から細胞外へビタミン K3 を輸送

することが示唆された。

2) 精製タンパク質を用いたトランスポーターの生化学的解析

a. 精製タンパク質の調製

FreeStyle 293F 細胞株に GFP と His タグを融合した全長 NPC1L1 および NPC1L1 の N 末端ドメインを安定的に発現させた。また、同様に ABCB1 及び ABCB6 を安定的に FreeStyle 293F 細胞で発現させるとともに、ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB10 を一過的に発現させた。それぞれのタンパク質について、His タグを利用して精製を行った。銀染色やウェスタンブロッティングで精製標品の取得が確認できた。

b. 精製 NPC1L1 タンパク質を用いたビタミン結合実験

上記で発現に成功した NPC1L1 の N 末端ドメインを His タグを利用して精製し、さらに精製標品を用いて脂溶性ビタミンとの結合能を検討した。ビタミン E とビタミン K のいずれも N 末端ドメイン NPC1L1 の野生型で結合が高い傾向にあり、NPC1L1 の N 末端ドメインはステロールのみと特異的に結合するのではなく、他の脂溶性物質とも結合する可能性を示した。

海藻由来のカロテノイドであるシフォナキサンチンの吸収にも NPC1L1 が関与するか調べたところ、シフォナキサンチンの吸収は NPC1L1 阻害剤によって減少することが分かった。さらに、精製した NPC1L1 の N 末断片がシフォナキサンチンを結合したことから、NPC1L1 が N 末領域でシフォナキサンチンを結合し輸送することが示された (*Lipids*, 54, 707, 2019)。NPC1L1 はビタミン E とビタミン K の腸管吸収に関わることが知られており、NPC1L1 はステロール、脂溶性ビタミン、カロテノイドの吸収に関わるマルチトランスポーターであると考えられる。

c. 精製タンパク質を用いた輸送実験

ABC トランスポータータンパク質は、輸送基質存在下で ATP 加水分解活性が上昇することが知られていることから、得られた精製 ABC トランスポータータンパク標品を egg lecithin のリポソームに再構成し、ビタミン B12 を添加し ATPase 活性の測定を行った。その結果、ABCB1 ではビタミン B12 存在下でも basal (基質がない状態での) ATPase 活性と変化がなかったことからビタミン B12 の輸送に関与していないと考えられる。一方、ABCB6 ではビタミン B12 濃度が 300 nM と 1 μM において basal ATPase 活性に対して 1.2~1.3 倍の活性が得られた。ABCB6 はミトコンドリアに発現し、ポルフィリンの生合成やヘム代謝に関与している事が示唆されていることから、今回の結果と合わせて考えると金属ポルフィリンの錯体であるビタミン B12 を輸送する可能性がある。本研究により、FreeStyle 293-F 細胞を用いた ABC タンパク質の発現・精製、またその精製標品を用いた ATPase 活性測定方法を確立する事ができた。また、それを用いて ABCB6 がビタミン B12 の輸送に関与している可能性を提示することができた。

3) ビタミン輸送特性と寄与度の解明

a. 各分子種の輸送活性比較

上記の様に ABCG5/ABCG8 を発現する細胞では、ビタミン K3 による細胞毒性が低下していた。ここにビタミン K1 を添加すると、コントロール細胞と同様の細胞毒性を示した。このことはビタミン K1 が競合的にビタミン K3 輸送を阻害したことを示す。そこで、ABCG5/ABCG8 によるビタミン K1 輸送の可能性を検討した。ABCG5/ABCG8 発現細胞はコントロール細胞に比べて細胞内のビタミン K1 蓄積量が低く、細胞外への排出量が高かった。従って、ABCG5/ABCG8 はビタミン K3 のみならず、植物由来の脂溶性ビタミンであるビタミン K1 の輸送にも関与することが示された。NPC1L1 タンパク質が頂端膜側でコレステロール、植物ステロール、脂溶性ビタミンを吸収することが知られている。従って、小腸と肝臓においては NPC1L1 と ABCG5/ABCG8 がそれぞれ吸収と排出に働くことで、ステロールと脂溶性ビタミンの体内量を制御していると考えられる (図 2)。

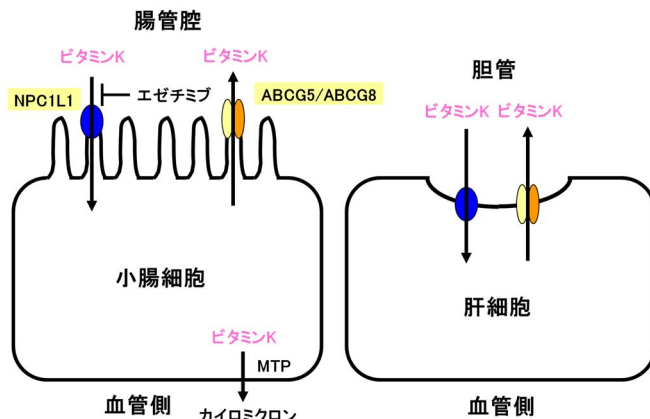


図2 小腸と肝臓におけるビタミンK輸送モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagasato, A., Yamashita, H., Matsuo, M., Ueda K., and Kioka, N.	4. 巻 81
2. 論文標題 The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in sensing stiffness of extracellular matrix.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1136-1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1289074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe, T., Kioka, N., Ueda K., and Matsuo, M.	4. 巻 166
2. 論文標題 Phosphorylation by protein kinase C stabilizes ABCG1 and increases cholesterol efflux.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 309-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manabe, Y., Ichihara M., Fukuda, K., Li, Z, Takada, T., Suzuki, H., Matsuo, M., and Sugawara T.	4. 巻 54
2. 論文標題 Niemann-Pick C1-like 1 promotes intestinal absorption of siphonaxanthin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 707-714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lipd.12194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高岡志帆、松尾道憲
2. 発表標題 食品成分によるABCタンパク質の活性化効果
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第503回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾道憲、吉井未貴、岸野重信、植田和光、小川順
2. 発表標題 乳酸菌による脂肪酸代謝物がABCA1とABCG1を活性化する分子機構の解析
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中里美、松尾道憲、植田和光、木村泰久
2. 発表標題 KATPチャンネルの複合体形成における薬剤とヌクレオチドの効果
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾道憲、岡崎沙耶、浅見花菜、小松桃子、岸野重信、小川順
2. 発表標題 乳酸菌による脂肪酸代謝物の神経突起伸長促進作用の解析
3. 学会等名 第91回生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuo, M.
2. 発表標題 Regulation of ABC transporters involved in cholesterol transport
3. 学会等名 Bridging discovery research to therapies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田恭子、千場智尋、植田和光、松尾道憲
2. 発表標題 NPC1L1の脂溶性ビタミン結合活性の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Michinori Matsuo, Taro Watanabe, Kazumitsu Ueda
2. 発表標題 Regulation of ABCA1 and ABCG1 by phosphorylation and fatty acids
3. 学会等名 7th FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾道憲、田中里実
2. 発表標題 ABCトランスポーターによるビタミン輸送の解析
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾道憲
2. 発表標題 ABCトランスポーターによる植物ステロール及びビタミンK輸送
3. 学会等名 第50回日本消化吸収学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michinori Matsuo
2. 発表標題 Vitamin K transport by ABCG5 and ABCG8
3. 学会等名 8th FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases" (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考