

平成 22 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500694

研究課題名 (和文) ビタミン K と腸管カルシウム吸収に関する分子レベルの解析

研究課題名 (英文) Effect of vitamin K on the calcium channel (TRPV6) and calbindin-D9k genes in the gastrointestinal tract of rats and Caco-2 cells.

研究代表者

福島 亜紀子 (FUKUSHIMA AKIKO)

女子栄養大学・栄養学部・准教授

研究者番号：50327962

研究成果の概要 (和文)：

ビタミン(V)KにはステロイドX受容体(SXR)を介した転写レベルの作用がある。腸管でのCa吸収に関与する遺伝子はいずれもVDにより制御され则认为されている。VD受容体結合配列とSXR結合配列は類似しており、VKにより腸管のCa吸収に関連する遺伝子の転写促進の可能性が考えられる。ヒト結腸腺癌由来細胞であるSW480細胞にビタミンKを処理すると、Caチャネル発現量の有意な増加が確認され、ラット腸管においても遺伝子変動が観察された。

研究成果の概要 (英文)：

Recently, a novel mechanism of vitamin K functions via transcriptional regulation as a ligand for steroid and xenobiotic receptor (SXR) in osteoblastic cells was reported. Three genes, TRPV6, calbindin-D9k and PMCA1b were determined to be involved in the process of calcium absorption in the mucosal cells of intestine and induced gene expression by vitamin D. SXR is also expressed at high level in intestine and SXR-binding site contains binding motifs for vitamin D receptor (VDR). Therefore we expected that vitamin K bound to VDR binding motif and regulated the expression of genes that were involved in calcium absorption in intestine. Colon cancer cell line SW-480 revealed the increase of the TRPV6 mRNA expression by the addition of vitamin K2. In this study, we fed rats vitamin K supplemented diet and analyzed the change of expression of TRPV6 and calbindin-D9k mRNA. The vitamin K diet increased expression of TRPV6 and calbindin-D9k.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：遺伝子発現、ラット、カルシウム吸収、ビタミンK、カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

| (1)日本におけるカルシウム摂取の現状

骨粗鬆症患者は、高齢化が加速する現在の日本において1,000万人を超え、寝たきりなど高齢者の生活の質を低下させる原因として深刻な社会問題になっている。カルシウム (Ca) は、日本人の成人で慢性的に不足している栄養素であり、成人の吸収率は、25~35%以下と低く、さらに加齢とともに吸収率は低下する。Ca を多く含む牛乳や小魚等の食品の摂取が推奨されて久しいが、摂取量は未だ改善されていない。摂取量そのものを増やすのには限界があるため、Ca の吸収率を上げることも真の摂取量を増やす有効な手段である。骨粗鬆症の予防に有効と考えられる栄養素、食品素材としては、Ca、ビタミンD、ビタミンK、ビタミンC、乳塩基性タンパク質 (MBP)、大豆イソフラボン、フラクトオリゴ糖などがあげられる。特に、ビタミンKは骨粗相治療薬として臨床の場でも用いられ、骨折予防効果が報告されている (Effect of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis., Orimo H et al., J. Bone Miner. Metab., 16, 106-112 (1998))。

(2) ビタミンKの骨粗相症に対する現在の知見

ビタミンKは納豆や海藻などの食品に多く含まれ、疫学的な研究では納豆消費量の多い地域では骨折率が低いことが報告されている (Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk., Kaneki M et al., Nutrition, 17(4), 315-321 (2001))。また、臨床試験において、ビタミンKの単独投与で骨量増加作用を有することが確認されており (Effect of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis., Orimo H et al., J. Bone Miner. Metab., 16, 106-112 (1998))、ビタミンKの骨折予防効果が評価されている。ビタミンKの作用としては、二つの分子機構が報告されており、タンパク質のグルタミン酸残基が γ -カルボキシル化される際の補酵素としての役割と核内受容体の一つであるステロイドX受容体 (SXR) を介して転写レベルで遺伝子の発現調節を行う作用機構がある (Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR., Tabb MM et al., J. Biol. Chem., 278(45), 43919-43927 (2003))。

(3) ビタミンKのステロイドX受容体 (SXR) を介する転写調節機構

ステロイドX受容体 (SXR) は、レチノイドX受容体とヘテロ二量体を形成し、遺伝子上のSXR応答配列に結合し、標的遺伝子の転写を調節すると考えられている。SXR

は肝臓、腸管に強く発現しており、チトクローム P450 3A 等の薬物代謝関連遺伝子の発現調節が知られていたが、最近、骨芽細胞様細胞株においても発現していることが明らかになり、ビタミンKがSXRを介して骨形成に關与する遺伝子を発現誘導することが報告された (Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells., Ichikawa T et al., J. Biol. Chem., 281(25), 16927-16934 (2006))。

(4) カルシウム吸収の分子機構

腸管のカルシウム吸収促進に、ビタミンDが関わることは広く知られた事実となっている。このCa吸収促進機構には、消化管内のCa結合タンパク質の変動が関わりとされており、高等学校の教科書にも載っているが、驚くことにそのメカニズムは未だ解明されていない。このCa結合タンパク質、これは腸管に特異的に発現しているビタミンD誘導性のカルビンディン D9k であり、1987年の発見以来研究の蓄積がある。実験動物にビタミンDを投与すれば、腸管のカルビンディン D9k 発現量が増加し、ビタミンD受容体 (VDR) ノックアウト動物では、カルビンディン D9k 発現量が減少することより、ビタミンDがVDRを介してカルビンディン D9k 発現量を調節していることが示唆された。しかし、転写調節領域にあるべきVDRが結合するDNA配列でさえも、培養細胞を用いた解析とトランスジェニック動物を用いた解析で矛盾があり、統一した見解が未だ得られていない。

食餌中のCaは小腸で吸収され、小腸粘膜細胞を通過し、血管に送られる。現時点で腸管のCa吸収に關わるタンパク質として報告があるのは、小腸粘膜細胞微絨毛膜上に発現するCa輸送体 (TRPV6) 細胞内を輸送するカルビンディン D9k タンパク質、小腸粘膜細胞の漿膜側に発現しているCa ATPase 1 (PMCA1) のみであり、その発現調節機構はいずれも明らかにされていない。

日本人におけるカルシウム摂取量を増やすためには、まず、理論背景としてCa吸収機構の解明が不可欠と考えられる。

(5) ビタミンKによる腸管内カルシウム吸収関連遺伝子発現調節の可能性

ビタミンKの骨粗相症に対する作用は現在までに骨作用を中心に解析が進んでおり、腸管からのCa吸収との検討はされていない。腸管でのカルシウム吸収には、TRPV6、カルビンディン D9k、PMCA1の關与が報告されており、いずれの遺伝子もビタミンDにより転写促進されると報告されており、VDRを

介した転写調節機構が考えられている。VDR 応答配列は、5'-AG(G/T)TCA-3'の6塩基のハーフサイトが直列型に3塩基のスペーサーをはさんで2つ並んだ配列であり、この配列は、SXR 応答配列に含まれる (The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism., Kliewer SA et al., Endocr. Rev., 23(5), 687-702 (2002))。また、SXR は腸管に高発現しており、ビタミンKにより腸管内のカルシウム吸収に関連する遺伝子の転写促進の可能性が示唆される。

2. 研究の目的

ビタミンK (VK) は納豆や海藻などの食品に多く含まれ、疫学的な調査では納豆消費量が多い地域では骨折率が低いことが報告されている。また、臨床試験においてビタミンKの単独投与で骨量増加作用を有することが確認されており、VKの骨折予防効果が評価されている。VKの作用は補酵素としての役割と核内受容体の一つであるステロイドX受容体 (SXR) を介した転写レベルの作用が報告されている。現在までにVKの骨折予防効果は骨作用を中心に解析が進んでおり、腸管からのカルシウム (Ca) 吸収との検討はなされていない。

腸管でのCa吸収にはCaチャネル (TRPV6)、カルピンディン D9k (CaBP)、Ca ATPase 1 (PMCA1) の関与が報告されており、いずれの遺伝子もビタミンDにより制御されると考えられているが、VDR結合配列はSXR結合配列に含まれ、また、SXRは腸管で高発現していることより、ビタミンKが腸管のCa吸収に関連する遺伝子の転写促進の可能性が考えられる。本研究では、この可能性を培養細胞と実験動物を用いて検証した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた解析

ビタミンK₂添加実験 (濃度と時間の検討)
ヒト結腸腺癌由来細胞株であるSW480細胞とCaco-2細胞を1.8×10⁶/10cm dishの条件でまき、培養24時間後より培地中にビタミンK₂ (メナキノ-4; MK-4) を添加して培養した。ビタミンK₂は10、20、40、80 μmol/Lの濃度で添加し、添加後、24、48、72時間後のTRPV6 mRNA量を定量的RT-PCR法により調べた。

TRPV6遺伝子VDR結合配列 (VDRE) を用いた解析

ラットTRPV6遺伝子の翻訳開始点から上流-2kb、-4kbに存在するVDREをtkプロモーターでドライブしたルシフェラーゼ遺伝

子の上流に挿入し、レポータープラスミドを作成した (-2ktkLuc、-4ktkLuc)。各レポータープラスミドをSW480細胞にトランスフェクションし、その後、ビタミンK₂を40 μmol/Lの濃度で添加し、60時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、同時に、SXR発現プラスミドを導入する解析も行った。

(2) 実験動物を用いた解析

SD系雄性ラット6週齢16匹を実験に供し、まず、AIN-93G精製飼料のCa量を0.2%に減じた飼料 (低Ca食) を与え、10日間予備飼育を行った。次に、VK投与群 (コントロール群) には、メナテトロン (MK4) を75mg/kg dietを含む低Ca食を与え続け、VK欠乏群の飼料からはVKを除いた低Ca食を供与した。飼育開始後、10日、に上部小腸 (1/4) を取り出し、総RNAを抽出し、TRPV6、CaBPのmRNA量を定量した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた解析

ビタミンK₂添加実験 (濃度と時間の検討)
SW480、Caco-2細胞共に20 μmol/LビタミンK₂添加、48時間後に有意にTRPV6 mRNA量が増加した。40 μmol/LビタミンK₂を添加すると24時間では変化がないが、48、72時間後に有意にTRPV6 mRNA量が増加した。更に、SXRを強制発現させたSW480細胞にビタミンK₂を添加すると、TRPV6 mRNA量の増加が更に増強した。

TRPV6遺伝子VDR結合配列 (VDRE) を用いた解析

-2ktkLuc、-4ktkLucをSW480細胞にトランスフェクション後、40 μmol/LビタミンK₂添加、60時間後のルシフェラーゼ活性に変化はなかった。しかし、SXR発現プラスミドを同時にトランスフェクションすることにより、TRPV6遺伝子のVDREを介した転写促進が確認された。

(2) 実験動物を用いた解析

VK投与群、VK欠乏群は、摂食量、体重変化、上部小腸粘膜重量に両群間で差はなかった。TRPV6、カルピンディンD9k mRNA量は、VK投与群で高い傾向が見られた。

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)

[学会発表] (計4件)

福島亜紀子、佐久間慶子、ビタミンK₂のラット腸管カルシウムチャネル及びカルピンディン

D9k 遺伝子への影響、第 32 回日本分子生物学会
年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

福島亜紀子、佐久間慶子、ビタミン K に
よる腸管カルシウムチャネル(TRPV6)遺伝子
発現変動、第 62 回日本栄養・食糧学会大会、
2008 年 5 月 3 日、女子栄養大学

福島亜紀子、佐久間慶子、ビタミン K に
よるカルシウムチャネル(TRPV6)遺伝子の
活性化、第 30 回日本分子生物学会年会第 80
回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月
13 日、パシフィコ横浜

福島亜紀子、佐久間慶子、カルシウムチ
ャネル(TRPV6)発現に及ぼすビタミン K の
影響、第 61 回日本栄養・食糧学会大会、2007
年 5 月 20 日、国立京都国際会館

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福島 亜紀子 (FUKUSHIMA AKIKO)

女子栄養大学・栄養学部・准教授

研究者番号：5 0 3 2 7 9 6 2

(2)研究分担者

佐久間 慶子 (SAKUMA KEIKO)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：2 0 0 7 6 1 6 0

(H19 H20 : 連携研究者)