

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K11592

研究課題名（和文）トランスポーターから明らかにするビタミン輸送の全体像

研究課題名（英文）Overall picture of vitamin transport revealed by transporter study

研究代表者

松尾 道憲 (Matsuo, Michinori)

京都女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00335308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンの膜輸送を担うタンパク質の全体像を明らかにすることを目的として実験を行い、精製したNPC1L1のN末端がビタミンKと結合することを示し、ABCG5/ABCG8がビタミンKを輸送することを示した。さらに、ビタミンEの細胞内輸送に関わる-TTPがABCG5/ABCG8と相互作用することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンKの排出トランスポーターを世界で初めて同定した。また、その他のビタミントランスポーターについても手掛かりを得て、輸送の実態が明らかとなった。研究成果は、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 reveal overall picture of vitamin transport. We have demonstrated that purified N-terminal region of NPC1L1 bind vitamin K and that ABCG5/ABCG8 transports vitamin K. Furthermore, it was suggested that ABCG5/ABCG8 interacts with -TTP which is involved in the intracellular transfer of vitamin E.

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

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、意外なことに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。全体像が分からない限り、ビタミンの動態を完全に理解したとは言えないことから、本研究でビタミン輸送の包括的な理解を目指す。

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とビタミン K の吸収に重要な役割を果たす (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。ABCD4 がリソソームから細胞質へのビタミン B12 輸送を担い (Nat. Genet., 44, 1152, 2012)、ABCA1 と ABCG1 が細胞質から血液側へのビタミン E 輸送に関与する。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 NPC1L1 がビタミン K や植物アルカロイドを N 末端領域で結合すること (Lipids, 54, 704)、ABCG5/ABCG8 がビタミン K を輸送することを明らかにしてきた。そこで、申請者らが明らかにしたビタミン輸送経路に加え、まだ未解明なビタミンの輸送経路を、輸送機構と制御も含めて明らかにすることとした。

2. 研究の目的

現在まで膜を介したビタミン輸送の全体像は分かっていないため、ビタミン輸送を担うトランスポーターを輸送機構と制御も含めて明らかにすることを本研究の目的とする。そのため、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) 基質特異性、親和性や輸送速度などのビタミン輸送の分子機構を明らかにする。
- 3) リン酸化、食品成分及び腸内細菌成分と膜脂質環境によるビタミン輸送の制御を明らかにする。

3. 研究の方法

1) トランスポーターによるビタミン輸送

a. ABCG5/ABCG8 ノックアウトマウスを用いたビタミン K 蓄積解析

細胞系で見出した ABCG5/ABCG8 によるビタミン K 輸送が生体内でも起こるのかどうかを確認するため、Abcg5/Abcg8 ノックアウトマウスを用いて小腸、肝臓内のビタミン K 蓄積量を野生型と比較する。具体的には、組織から脂質抽出を行い、HPLC 解析によってビタミン K 量を求め、生体内でも ABCG5/ABCG8 がビタミン K 排出に機能していることを示す。

b. ABC トランスポーター発現細胞系を利用したビタミン輸送実験

既に構築済の 48 種の ABC トランスポーター発現系を用いて、ビタミン輸送トランスポーターを探索する。開発済みの MTT アッセイを利用した方法と HPLC 解析によって脂溶性ビタミントランスポーターを同定する。トランスポーターが発現した細胞を回収して、ビタミン B12 量を HPLC 法と微生物法で測定する。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または細胞外へ輸送するトランスポーターをそれぞれ同定する。

c. 精製タンパク質の ATP 加水分解活性を利用したビタミントランスポーターの探索

基質存在下で ATP 加水分解活性が上昇する性質を利用して、ABC トランスポーターの基質を探索できることを既に示している。タグを利用して ABC トランスポーターを精製し、リポソームに再構成して ATP 加水分解活性を測定する。ビタミン B12 または脂溶性ビタミン存在下で ATP 加水分解活性を測定し、ビタミントランスポーターを同定する。

2) ビタミン輸送の分子機構

a. ABCG5/ABCG8 によるビタミン A、ビタミン D とビタミン E の輸送

NPC1L1 タンパク質は、ビタミン K とビタミン E を輸送する。同様に ABCG5/ABCG8 が複数の脂溶性ビタミンを輸送する可能性がある。そこで、ABCG5/ABCG8 を発現する培養細胞を用いて、HPLC 解析によりビタミン A, D, E が輸送されるか調べる。さらに分子種、例えばビタミン E であれば -、-、-トコフェロールまたはトコトリエノールの輸送それぞれについて調べ、基質特異性を明らかにする。

b. 小胞輸送系を用いたビタミン輸送実験

実際にトランスポーターがビタミンを輸送することを直接的に証明するため、精製タンパク質を再構成したリポソームに ATP とビタミンを添加し、小胞内へのビタミン輸送を測定する。小胞を洗浄後に小胞の中に蓄積したビタミン量を測定することで、ビタミン輸送を定量的に測定し、輸送速度を明らかにする。さらに精製タンパク質とビタミンの結合特性を調べ、それぞれのビタミンとの親和性を明らかにする。

3) ビタミン輸送の制御

a. ビタミン輸送のリン酸化による制御の解析

ABCA1 と同様に ABCG1 のコレステロール輸送は PKC によって制御されることを明らかにしている。ビタミン輸送も同様に制御されるか調べるため、キナーゼ阻害剤または活性化剤存在下で ABCA1, ABCG1, ABCG5/ABCG8 によるビタミン輸送を測定する。上記の研究計画で同定できたビタミントランスポーターについても同様に調べる。これによって、ビタミン輸送の細胞内シグナルによる制御を明らかにする。

b. ビタミン輸送の食品成分、腸内細菌成分及び膜脂質環境による制御の解析

既に食品成分や腸内細菌由来成分、膜脂質環境が NPC1L1 や ABC トランスポーターのコレステロール輸送活性を変えることを見出している。そこでそれらの成分がビタミン輸送にも影響するかを調べる。また、スフィンゴミエリン含量を変化させてラフトドメインを変えた細胞を用いて、ビタミン輸送への効果を調べる。これらによってビタミン吸収や動態に対する食品の効果や腸内環境の影響、膜脂質環境による制御を明らかにする。

4. 研究成果

1) トランスポーターによるビタミン輸送

a. ABCG5/ABCG8 ノックアウトマウスを用いたビタミン K 蓄積解析

東京大学病院の高田龍平教授との共同研究で、Abcg5/Abcg8 ノックアウトマウスを用いて肝臓、胆管内のビタミン K 蓄積量を野生型と比較した。組織から脂質抽出を行い、UPLC 解析によってビタミン K 量を求めた。その結果、Abcg5/Abcg8 ノックアウトマウスでは、血清中のビタミン K1 濃度に変化が無い一方で胆汁中のビタミン K1 濃度が低下していた。このことから、生体内でも ABCG5/ABCG8 がビタミン K を輸送する可能性が示唆された。

b. トランスポーター発現細胞系を利用したビタミン輸送実験

NPC1L1 の N 末端ドメインの野生型 (WT) 及びコレステロール結合活性を失う変異体 (Q95A, P215A-L216A) の精製標品を使用し、ビタミン K1 結合とそれに対するコレステロールの効果について検討した。Q95A と P215A-L216A へのビタミン K1 結合量は WT より少なく、ビタミン K1 は NPC1L1 の N 末端ドメインに結合する可能性、及びビタミン K1 結合に Q95、P215 と L216 が関与する可能性が示唆された。コレステロール共存下では、Q95A と P215A-L216A へのビタミン K1 結合量は WT より多く、コレステロールがアロステリックに作用してビタミン K1 結合に影響する可能性が明らかとなった。

ミトコンドリア内へのビタミン B12 の輸送を調べるため、GFP を融合した ABCB6、ABCB7 または ABCB10 を発現させた HEK293 細胞からオルガネラを単離し、ビタミン B12 含有量をビタミン B12 要求株であるラクトバチルスを使用した微生物学的定量法により定量した。GFP-ABCB7 を発現させた細胞のミトコンドリアでビタミン B12 含有量が他の細胞と比べて高い結果が得られた。このことから、ABCB7 がビタミン B12 をミトコンドリアへ輸送する可能性が示唆された。

c. 精製タンパク質の ATP 加水分解活性を利用したビタミントランスポーターの探索

ABC トランスポーターは基質の存在で ATP 加水分解活性が上昇する性質を利用し、ビタミン B12 が基質となるかを調べた。ABCB6、ABCB7、ABCB8、ABCB10、ABCC1、ABCD4 タンパク質を動物細胞に発現させ、ABC タンパク質の精製と ATPase 活性測定を行った。精製の純度を高めるため、Ni レジンをを用いた His タグ精製を行った後、さらに陰イオン交換レジンをを用いた二段階精製を行ったところ、純度の高い精製標品を得ることができた。また、その精製標品を用いた活性測定では ABCD4 においてビタミン B12 の添加で活性が上昇する結果が得られ、コントロールとしての働きを確認できた。この二段階精製で ABCB6、ABCB7、ABCB8、ABCB10、ABCC1、ABCD4、GFP を精製したところ、ABCB6、ABCB10、ABCD4、GFP で高純度の精製標品を得られたため二段階精製は精製方法として有効であると示唆された。

2) ビタミン輸送の分子機構

a. ABCG5/ABCG8 によるビタミン E の輸送

コレステロールを輸送する ABCA1 と ABCG1 はビタミン E の排出に関与することから、ステロールを輸送する ABCG5/ABCG8 もビタミン E の排出に関与する可能性がある。細胞内で α -トコフェロールと特異的に結合し輸送する α -TTP は、ABCG5/ABCG8 と相互作用し、ビタミン E 排出を促進する可能性がある。そこで ABC トランスポータータンパク質と α -TTP との相互作用について検討した。共沈降実験で、ABC タンパク質と α -TTP が一過的に共発現した培養細胞の細胞抽出液から免疫沈降を行い、ABC タンパク質の α -TTP との相互作用を解析した。 α -TTP の発現量が低く相互作用解析の検出が困難であったため、 α -TTP の高発現株を選抜し、樹立した。樹立した α -TTP の高発現株を用いて共沈降実験を行った結果、ABCG5/ABCG8 と α -TTP が相互作用する可能性が示された。ABCG5/ABCG8 を発現する培養細胞を用いて、HPLC 解析によりビタミン E が輸送されるか調べた。ABCG5/ABCG8 発現細胞で α -トコフェロールの輸送が高い傾向にあった。これらのことから、ABCG5/ABCG8 が α -TTP からビタミン E を受け取って細胞外に輸送する可能性を示した。

b. 小胞輸送系を用いたビタミン輸送実験

ABC トランスポーター発現細胞から細胞抽出液を調製し、密度勾配超遠心により小胞画分を調製した。また、精製した ABCB6、ABCB10、ABCD4 をリポソームに再構成した。それらを用いてビタミン輸送を測定しようとしたが、ビタミンの小胞への添加が困難であったため、これらの輸送実験系はさらに検討する必要がある。

3) ビタミン輸送の制御

a. ビタミン輸送のリン酸化による制御の解析

ABCA1 と同様に ABCG1 のコレステロール輸送は PKC によって制御される。ビタミン輸送も同様に制御されるか調べるため、キナーゼ阻害剤または活性化剤存在下で ABCG5/ABCG8 によるビタミン K3 輸送を測定した。キナーゼ阻害剤である Go6976 あるいはキナーゼ活性化剤である TPA 存在下ではビタミン K3 輸送は影響を受けず、少なくとも調べた BHK 細胞では PKC による制御は観察されなかった。

b. ビタミン輸送の食品成分、腸内細菌成分及び膜脂質環境による制御の解析

食品成分を添加して ABCG5/ABCG8 によるビタミン K3 輸送への効果を調べたが、今回の研究において使用した食品成分では輸送への効果が見られものもある一方、発酵食品抽出物はビタミン K3 輸送を促進する傾向があった。スフィンゴミエリン含量の変化ではビタミン K3 輸送は影響を受けなかった。一方、ビタミン E 存在下では ABCG5/ABCG8 によるビタミン K3 輸送は阻害を受けた。このことは、ABCG5/ABCG8 がビタミン E も輸送することを示唆し、複数の脂溶性ビタミンが存在する時に互いの吸収輸送に影響が出る可能性も示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo, M., Ogata, Y., Yamanashi, Y., Takada, T.	4. 巻 15
2. 論文標題 ABCG5 and ABCG8 are involved in vitamin K transport.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15040998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo, M.	4. 巻 148
2. 論文標題 ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci.	6. 最初と最後の頁 197-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.11.005	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Michinori Matsuo
2. 発表標題 Transport of Vitamin K by ABC transporters
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN (国際学会)
4. 発表年 2023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コレステロール排出と脂溶性ビタミン排出
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴谷愛由、高岡志帆、中山魁、府川明佳、後藤浩文、中島章裕、松尾道憲
2. 発表標題 ABCトランスポーターに対するチーズ抽出物の効果の検討
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会関西西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾道憲、高岡志帆、諏訪英里子、西岡紗来
2. 発表標題 ABCトランスポーターを介したコレステロール排出の豆腐抽出物とビフィズス菌抽出物による活性化
3. 学会等名 第94回生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾道憲、高岡志帆、中山魁、府川明佳、後藤浩文、中島章裕
2. 発表標題 カマンベールチーズ抽出物のABCトランスポーターへの効果
3. 学会等名 日本栄養食糧学会第75回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾道憲、福田恭子、藤原未貴
2. 発表標題 NPC1L1の精製と脂溶性物質結合特性
3. 学会等名 第51回日本消化吸収学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松尾道憲	4. 発行年 2022年
2. 出版社 アグリバイオ	5. 総ページ数 5
3. 書名 トランスポーターと健康	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------