

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21700751

研究課題名（和文）

L-アスコルビン酸の転写調節機構解明

研究課題名（英文）

The effect of L-ascorbic acid on transcriptional regulation

研究代表者 曾根 保子 (SONE YASUKO)

お茶の水女子大学・生活環境教育研究センター・助教

研究者番号：80452027

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、アスコルビン酸（AsA）レベルの違いが肝臓中の遺伝子発現にもたらす影響を検討し、その遺伝子発現変化が体内レドックス制御と関与するかを検討した。さらに、AsAを特異的に細胞内へ輸送するナトリウム依存性ビタミンCトランスポーター（SVCTs）の転写調節機構の検討も行った。その結果、肝臓中のAsA濃度が低下した際には、SVCTsの遺伝子発現を上昇させ、AsAの肝臓細胞内への取り込みと酸化型AsAの還元能を亢進させることで肝細胞内のAsA貯留量を維持する可能性が示唆された。また、SVCTsは還元剤や酸化剤の負荷による細胞内レドックスにも影響を受けることが認められた。ChIP法による特定転写調節因子結合アッセイの結果から、ヒト肝癌由来細胞株の定常状態においてSVCT2の転写調節領域近傍でC/EBPが結合している可能性も示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the effects of L-ascorbic acid (AsA) administration (0, 5 and 100 mg/day) on the expression levels of sodium-dependent vitamin C transporters (SVCTs) and that of other genes in ODS rat livers. Similarly, the effect of AsA addition into the medium on the transporters expressions in rat primary hepatocyte and HepG2 was examined. Moreover, to examine the interaction between the promoter regions of *SVCTs* and the transcriptional factors, ChiP IP & qPCR assay was conducted.

As a result, the *SVCT1* levels increased in the livers of rats not administered AsA and decreased in the livers of rats administered 100 mg/day AsA, indicating that these transporter levels can be influenced by the amount of AsA administered. Also, these transporter levels can be associated with redox *in vivo*. The ChiP IP & qPCR assay exhibited the binding between of C/EBP and the promoter region of *SVCT2*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：L-アスコルビン酸, ナトリウム依存性ビタミンCトランスポーター, デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ, ChIP

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種やフリーラジカルは、発癌、動脈硬化症などを含む多くの疾患発症のリスクファクターとして知られている。これに対し、還元能をもつアスコルビン酸は生体内において活性酸素種やフリーラジカルを補足し、これらの疾患発症の予防に深く関与することが指摘されている。しかし、生体内におけるアスコルビン酸の効果は現在も完全に明らかとなっておらず、更なる検討が必要とされている。

これまでのDNAマイクロアレイ解析から、組織中のアスコルビン酸貯留量は多くの遺伝子発現に影響をもたらすことを明らかとしており、なかでも、アスコルビン酸を体内へ特異的に輸送するナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターは、組織中のアスコルビン酸貯留レベルによって発現制御を受けることを確認している。

さらに、遺伝子配列データベース解析により、ナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターのプロモーター領域にはCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )、hepatocyte nuclear factor (HNF) などを含む複数の転写因子結合サイトが見つかっており、その中のいくつかの転写調節エレメントは、周囲のアスコルビン酸レベルにより変動を示した遺伝子に共通して存在するものもあった。これらの転写調節因子はアスコルビン酸の組織内貯留量に強く影響を受け、ナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターの発現制御に深くかかわっている可能性が高いと推測される。

## 2. 研究の目的

(1) 組織細胞内に貯留するアスコルビン酸レベルによって変動する遺伝子発現を *in vivo*、*in vitro* のそれぞれの系において検証すること、(2) これらの遺伝子発現調節がアスコルビン酸の抗酸化性に基づくものであるか否かを検証すること、(3) 既にアスコルビン酸レベ

ルによって変動することが確認されているナトリウム依存性ビタミンCトランスポーターの転写調節領域と転写促進因子との相互作用を分析し、アスコルビン酸レベルによる遺伝子転写調節の機序を詳細に明らかにすることで、アスコルビン酸の取り込み機構や新たな作用の解明につがる知見を得ることとした。

## 3. 研究の方法

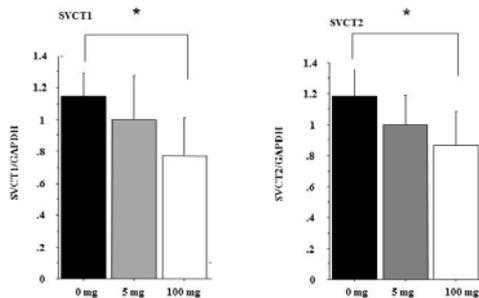
アスコルビン酸合成のできない雄性 ODS ラットに、1日当たり 0、5、100 mg 等量のアスコルビン酸をゾンデにより強制的に経口投与し、2週間の飼育を行ったのち、組織中アスコルビン酸濃度、肝臓中の各種遺伝子発現レベルを検討した。また、ODS ラットの初代肝細胞をコラーゲナーゼ消化により採取し、アスコルビン酸濃度をそれぞれ 0、0.05、5 mM とした培養液中で 48 時間培養後、細胞内のアスコルビン酸濃度と各種遺伝子発現レベルを解析した。ヒト肝癌由来細胞の HepG2 でも同様の検証を行った。

さらに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、プロモーター領域の特定転写調節因子結合サイトと転写因子 C/EBP、PPAR $\gamma$  の結合アッセイを行い、定常状態におけるヒトナトリウム依存性ビタミンCトランスポーター遺伝子の転写調節機構を検証した。

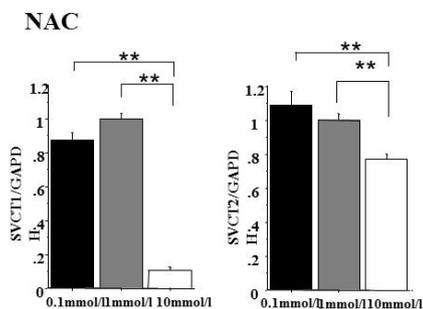
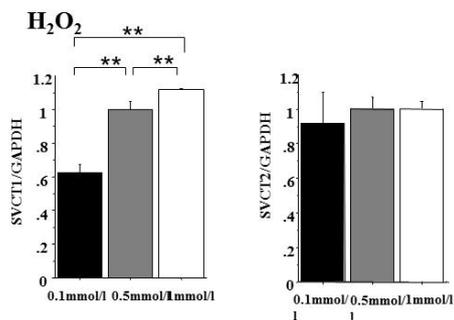
## 4. 研究成果

- (1) 肝臓中のナトリウム依存性ビタミンCトランスポーター (SVCT1、SVCT2) やデヒドロアスコルビン酸トランスポーター (GLUT1、GLUT3) の遺伝子発現はアスコルビン酸無摂取群で発現が上昇し、100 mg 摂取群で減少した。一方、組織中のアスコルビン酸レベルは、アスコルビン酸の経口摂取量に依存して増加した。これらの結果から、経口摂取量に依存して変動する組織中のアスコルビン酸濃度は、アスコルビン酸の輸送にかかわる遺伝子発現に影響をもたらすこと、また、アスコルビン酸レベルが低下した際には、これらのトランスポーターの発現を上昇させ、アスコルビン酸の取り込みと細胞内の酸化型アスコ

ルビンの還元能を上昇させることで、肝細胞内のアスコルビン酸貯留量を維持する可能性が示唆された。



- (2) 加えて、アスコルビン酸輸送に関わるトランスポーターの発現は、培養系において安定型ビタミンCであるアスコルビン酸-2-グルコシドや還元剤である N-アセチルシステインを添加させた場合にも増加し、酸化剤である過酸化水素の添加により、減少する傾向が認められた。これらのことから、アスコルビン酸輸送に関わるトランスポーターの発現は、細胞内レドックスにも影響を受けることが認められた。



- (3) 他方、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によるプロモーター領域の特定転写調節因子結合サイトと転写因子の結合アッセイの結果から、HepG2 の定常状態に

おいては、ナトリウム依存性ビタミン C トランスポーター1 遺伝子の転写調節領域に PPAR $\gamma$  や C/EBP の結合が検出されなかったものの、ナトリウム依存性ビタミン C トランスポーター2 遺伝子の転写調節領域に C/EBP が結合している可能性が示唆された。しかし、転写因子の抗体結合能の差も認められたことから、本結果については更なる検討が必要と考えられる。

## 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 5 件)

- ① The level of orally ingested vitamin C affected the expression of vitamin C transporters and vitamin C accumulation in the livers of ODS rats. Sone Y, Ueta E, Kodama S, Sannoumaru Y, Miyake N, Sone H, Fujiwara Y, Otsuka Y, Kondo K, Inagaki M, Namba E, Kurata T, Suzuki E. Biosci Biotechnol Biochem. 75: 2394-7, 2011. 査読有

- ② Dose of 3-methylcholanthrene enhances vitamin C accumulation and mRNA expression of its transporter in the liver of ODS rats and in HepG2 cells. Sone Y, Ueta E, Sannoumaru Y, Miyake N, Sone H, Otsuka Y, Kondo K, Kurata T, Suzuki E. J Biochem Mol Toxicol. 25: 369-76, 2011. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Influence of Dose Level of Vitamin C on the Expression of Vitamin C Transporters in ODS Rats. Sone Y, Midorikawa A, Taniguchi S, Watanabe M, Shu M, Onitake F, Kodama S, Saito K, Sannoumaru Y, Ueta E, Miyake N, Sone H, Namba E, Otsuka Y, Kondo K, Inagaki M, Kurata T, Suzuki E. 19<sup>th</sup> International Congress of Nutrition. P90-08, Bangkok, Thailand. Oct; 2009.
- ② Effect of 3-MC and L-Ascorbic Acid on Gene Expression of Primary Human Hepatocyte. Sone Y, Iwaki E, Otsuka Y. 第 32 回日本分子生物学会, 横浜, Dec; 2009.

- ③ アスコルビン酸濃度の違いによる遺伝子発現変化の検討. 曾根保子、丑田晴菜、児玉 暁、齋藤和美、山王丸靖子、三宅紀子、曾根博仁、倉田忠男、鈴木恵美子. 日本ビタミン学会第 61 回大会, 京都, May; 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hles.ocha.ac.jp/food/eiyoken/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾根 保子 (SONE YASUKO)

お茶の水女子大学・生活環境教育研究センター・助教

研究者番号 : 80452027

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し