

氏 名：山口 範晃

学位の種類：博士（栄養学）

学位記番号：博甲第2号

学位授与年月日：平成21年3月17日

学位授与の要件：学位規程第3条第3項該当

論文題目：The study of the regulation of vitamin A and β -carotene
metabolism-related gene expressions in human small intestine
ヒト小腸におけるビタミン A 及び β カロテン代謝関連遺伝子の発現調節に
関する研究

論文審査委員：主査 教授 四童子 好廣

副査 教授 山口 義彦

教授 古場 一哲

ヒト小腸におけるビタミン A 及び β カロテン代謝関連遺伝子の発現調節に関する研究

The study of the regulation of vitamin A and β -carotene metabolism-related gene expressions in human small intestine

人間健康科学研究科 栄養科学専攻
栄養生理学研究室 山口 範晃

緒言

ビタミン A はヒトの体内で様々な生理作用を有する必須栄養素である。ビタミン A の主要供給源として、動物性食品に含まれるレチニルエステルと、植物性食品に含まれる β カロテンがある。ビタミン A や β カロテンは、ヒトの体内では合成できないので、それらの食品から過不足なく摂取しなければならない。その食事由来のビタミン A と β カロテンが小腸で吸収・代謝される過程で、細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II (CRBP II) や、 β カロテン中央開裂酵素 (BCMO1) が中心的な役割を担っている。しかし、ヒト小腸でのこれらの発現調節の機序については、十分に明確にされていない。そこで、本研究は、ヒト小腸吸収上皮細胞のモデルとして Caco-2 BBe 細胞株を用い、1) ビタミン A 代謝関連遺伝子の発現性、2) CRBP II 遺伝子発現に及ぼす核内受容体 hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α の影響、3) BCMO1 遺伝子発現に及ぼす HNF-1 α と HNF-4 α の影響、4) ビタミン A 代謝関連遺伝子に及ぼす甲状腺ホルモン T₃の影響について検討した。

方 法

研究1): コンフルエント 2 日前 ~ 14 日後までの Caco-2 BBe 細胞中のビタミン A 代謝関連遺伝子をリアルタイム RT-PCR により測定した。

研究2): ヒト CRBP II 遺伝子 5' 上流に内在する核内受容体応答配列ダイレトリピート 1 型 (DR-1) 配列に対する HNF-4 α 結合活性をゲルシフト法 (EMSA) とクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) により解析した。Caco-2 BBe 細胞に HNF-4 α 発現ベクター及び siRNA トランスフェクションし、HNF-4 α の過剰発現及び発現低下時の CRBP II 遺伝子のプロモーター活性と mRNA 発現量を測定した。また、CRBP II DR-1 に近傍する GATA や CDX2 の応答配列に対する結合性と、その両者のトランスフェクションによる CRBP II プロモーター活性の変動も測定した。

研究3): ヒト BCMO1 遺伝子プロモーター領域内の HNF-1 α と HNF-4 α の結合性を調べた。また、この両者の発現ベクター及び siRNA のトランスフェクションによる BCMO1 プロモーター活性及び遺伝子発現量を測定した。

研究4): Caco-2 BBe 細胞に T₃ を添加して培養した時のビタミン A 代謝関連遺伝子の発現量を測定した。

結 果 と 考 察

研究1): ヒト小腸に発現が報告されているビタミン A 代謝関連遺伝子は、Caco-2 BBe 細胞でも発現した。特に、Caco-2 細胞では BCMO1 発現がヒト小腸吸収細胞よりも極めて低いことが報告されているが、Caco-2 BBe 細胞では有意に高かった。また、Caco-2 BBe 細胞の分化に伴い、ビタミン A 代謝関連遺伝子の発現量は上昇した。このように、Caco-2 BBe 細胞は、ヒト小腸吸収細胞のビタミン A と β カロテンの吸収・代謝のモデルとして適していると考えられた。

研究2): Caco-2 BBe 細胞核内の内因性 HNF-4 α がヒト CRBP II 遺伝子のプロモーター領域に結合していることが示された。また、HNF-4 α 発現を過剰発現及び発現低下させた場合、それに伴ってヒト CRBP II mRNA 量及びプロモーター活性が変動した。さらに、HNF-4 α は GATA や CDX2 と共に CRBP II プロモーター活性を上昇させることを示した。このように、ヒト小腸の CRBP II 遺伝子発現には、HNF-4 α 、GATA 及び CDX2 がその転写因子として作用していると考えられた。

研究3): Caco-2 BBe 細胞核内の内因性 HNF-1 α 及び HNF-4 α がヒト BCMO1 遺伝子 5' 上流の TATA ボックス近傍の同じ配列に競合的に結合することが示された。また、HNF-1 α はヒト BCMO1 遺伝子のプロモーター活性及び mRNA 量を促進的に調節し、逆に、HNF-4 α はその発現を抑制することが明らかになった。これらの結果から、ヒト小腸の BCMO1 遺伝子発現

の調節は、HNF-1 α とHNF-4 α の量的及び活性変動に依存すると考えられた。

研究4): Caco-2 BBe 細胞の BCMO1 mRNA 量は T₃により増大した。同時にレチノールを輸送型のエステルに転換するレシチン：レチノールアシル転移酵素 (LRAT) の mRNA 量も T₃により増大した。これらの結果から、T₃は、 β カロテンからビタミン A への転換、更にレチニルエステルの腸管吸収に関わる一連の遺伝子発現の調節に関わる可能性を示した。

結 語

本研究は、HNF-4 α など転写調節因子を中心とした様々な機構が、ヒト小腸の CRBP II や BCMO1 の遺伝子発現を調節していることを明らかにした。従って、これらの因子はヒト小腸のビタミン A と β カロテンの生体内利用効率と生体全体のビタミン A 栄養状態の調節に寄与する可能性が考えられた。