

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 11 年度博士課程入学

氏 名 高野 義彦

指導教官 清水 誠

論文題目 ヒト小腸カルシウムトランスポーターCaT1の機能解析と食品由来の制御物質の探索

序論

カルシウムは、骨の形成や生体内の情報伝達系等において、重要な役割を担っているイオンの一つである。食事由来のカルシウムは、その大半が小腸から吸収され、その吸収経路は、カルシウムの供給量により異なると言われている。例えば、カルシウムの供給量が十分な時は、小腸上皮の細胞間経路を通過する単純拡散輸送が行われ、カルシウムの供給が不足している時は、細胞内を通過する能動輸送が積極的に行われている。この細胞内を通過する際に関わっているキャリアとして、1999年に、ラビットにおいてカルシウムチャンネル(ECaC)が、ラットにおいてカルシウムトランスポーター(CaT1)が各々初めてクローニングされた。ラビット ECaC は胃に近い十二指腸で、ラット CaT1 は小腸上部から下部、すなわち十二指腸、空腸、盲腸等で発現していることが確認されたことから、ECaC は酸性条件下、CaT1 は中性条件下においてカルシウム吸収を担っていると考えられている。カルシウムチャンネルとしては、電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)や受容体活性化カルシウムチャンネル(RACC)、カルシウム遊離チャンネル等が報告されているが、ラット CaT1 は、その遺伝子情報や解析結果から、上記既知カルシウムチャンネルに類似しているものの、新規なファミリーに属すると考えられる。現在までに、CaT1 を介したカルシウム吸収の詳細な制御機構の解析は、ほとんどなされていない。本研究では、ヒト CaT1 の新たなクローニングとその機能解析、ヒト CaT1 を定常的に発現した動物細胞の樹立、およびそれを用いた食品由来の制御因子の探索を行い、最終的には、CaT1 を介したカルシウム吸収性を向上させる機能性食品開発を目指した。

1. ヒトカルシウムトランスポーターCaT1のクローニング及び解析

まず、データベース(EST)より、ラット CaT1 の cDNA シークエンスの情報を得た (GenBank™ AF467068)。次いでヒト前立腺 cDNA(AA447311,AA469437,AA579526),ヒト胎児肝脾 cDNA(WW88570),ヒト肺 cDNA(T92755)の情報を入手し、各々についてラット CaT1 cDNA とのホモロジーサーチを行った。ホモロジーの高い配列部分からセンス、アンチセンスプライマーを設計し、RT-PCR を行った。テンプレートとして、ヒト小腸上皮細胞 CaCO-2 より total RNA を回収し、First strand cDNA を合成して使用した。また、ヒト CaT1 の N 末端側については、ラット CaT1 のそれとホモロジーの高いヒト cDNA の情報が得られなかったため、ヒト小腸 cDNA ライブラリー(Clontech)を用いて、5'-RACE PCR を行った。得られた各 PCR フラグメントは、pGEM-T ベクターにサブクローニングを行い、DNA 配列を解析した。その結果、開始コドン付近 4 塩基分を除いた、ヒト CaT1 のほぼ全長約 2.2kbp をクローニングした。塩基レベルでは、ラット CaT1 とは約 85%、ヒト ECaC とは約 85%の相同性が確認された。しかし、C 末端領域約 300bp におけるヒト ECaC との相同性は約 50%と低い特徴を示した。さらに、ヒト CaT1 はそのアミノ酸配列の解析から、6 回膜貫通型で、TM-5,6 の間に pore 領域の存在が示唆された。次に、特異性の高いヒト CaT1cDNA の C 末端領域の配列からプローブを作製し、各消化器官組織におけるヒト CaT1 の発現量を、human digestive system MTN Blot(Clontech)を用いたノーザンブロットングにて確認した。その結果、ヒト CaT1 は胃や十二指腸、腔腸、回腸、盲腸、大腸といった、消化器官全般に幅広く発現が確認された。

2. ヒト CaT1 の定常発現細胞の樹立

ヒト CaT1 の機能解析や制御因子の探索を目的として、本来 CaT1 を発現していない動物細胞にヒト CaT1 の定常的な発現を試みた。すなわち、制限酵素サイトを付加させたプライマーを設計し、ヒト CaT1 のほぼ全長約 2.2kbp を RT-PCR で取得し、発現ベクターpME-His にサブクローニングした。得られたコンストラクトを DEAE-dextran 法にて、まず Cos-1 細胞に一過的にトランスフェクションした。細胞を 1% NP-40 にて緩やかに可溶化した後、lysate を Ni-resin にて処理し、吸着画分についてウエスタンブロット法を用いてヒト CaT1 の発現確認を行った。抗ヒト CaT1 抗体の作製を目的として、ヒト CaT1 の C 末端側から上流約 300bp を RT-PCR で取得し、pET28-a ベクターにサブクローニングした後、大腸菌 BL-21 に形質転換し、5mM IPTG にてその発現を誘導した。大腸菌を 6M グアニジンにて可溶化させ、Ni-resin にてリコンビナントタンパク質を精製した。これを、ウサギに約 4 ヶ月間免疫注射し、目的の抗血清を得た。ウエ

スタンブロットの結果、Cos-1 細胞中に約 75KDa のヒト CaT1 のバンドを確認した。さらに、定常的に発現させるため、発現コンストラクト pMEHis-hCaT1 を CHO 細胞にリポフェクション法にて導入し、ブラストサイジンを含む選択培地でクローンを選択して、安定発現細胞株 CHO-CaT1 を獲得した。Cos-1 細胞同様、抗ヒト CaT1 抗体を用いたウエスタンブロットにて、約 75KDa のヒト CaT1 の発現を確認した。

3. ヒト CaT1 による細胞外カルシウムの取り込みおよびその制御因子の探索

3.1. ヒト CaT1 による細胞内への ^{45}Ca の取り込みおよびその特徴

ヒト CaT1 定常発現 CHO 細胞(CHO-CaT1)を用いて、細胞内へのカルシウム吸収量の測定を行った。すなわち、 1×10^5 cells/well の細胞を 24well plate にまき、 37°C 、5% CO_2 環境下で 4 日間培養した後、PBS, HBSS で洗浄した。次に $5.68 \mu\text{M}^{45}\text{Ca}^{2+}$ を含む HBSS を well に添加して、10 分間、 37°C でインキュベーションした後、HBSS を取り除き、細胞を PBS(+ 0.05% NaN_3 , 0.02mM CaCl_2)にて洗浄後、1% Triton X-100 で可溶化後回収して、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。その結果、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みは、ヒト CaT1 の発現に依存して増加すること、0~10 分の間に経時的に上昇し、その後飽和することが認められた。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取込みは、 La^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} の重金属イオンにて抑制されたが、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} では影響されなかった。また、酸性側(pH5.5)では抑制され、中性以上(pH6.5、7.5、8.5)では増加した。

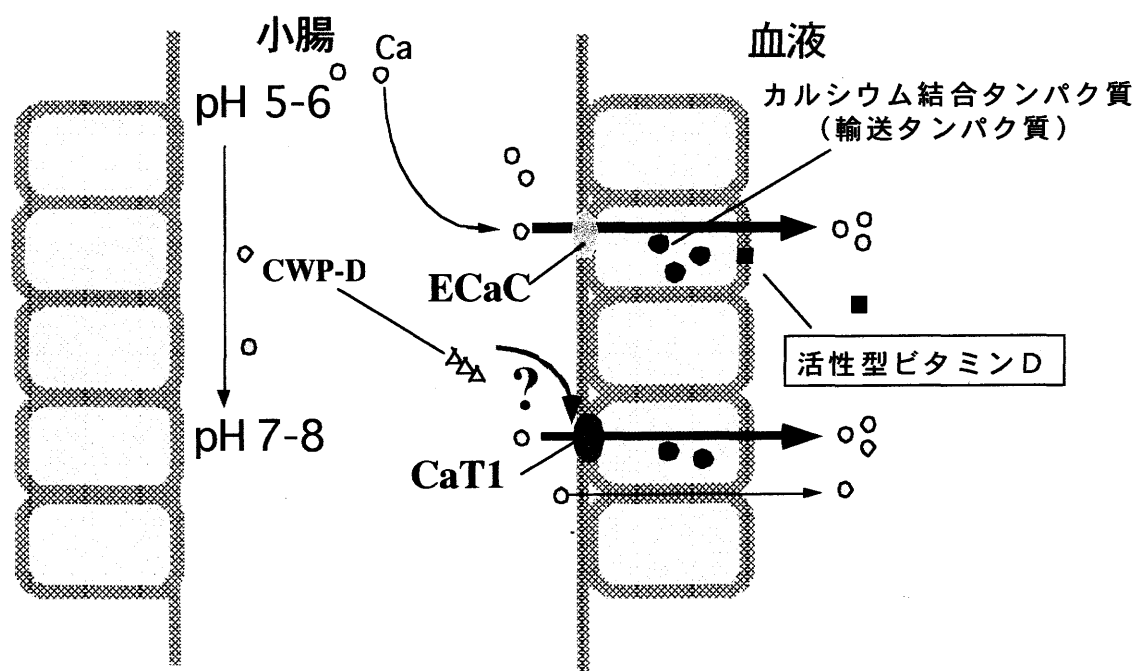
3.2. ヒト CaT1 を介したカルシウム取り込みを制御する食品因子の探索

上記カルシウム吸収実験系を用いて、様々な食品因子のヒト CaT1 によるカルシウム取り込みへの影響を調べた。食品試料として、大豆タンパク質分解物、CPP(カゼイン酵素分解ペプチド)、卵黄タンパク質分解ペプチド、グアガム加水分解物、テアニン、チーズホエー酵素分解物(CWP-D)を用意した。各種試料を 1% (w/v)含む培地で CHO-CaT1 を 4 時間前処理し、その後直ちに $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への取り込みを 10 分間測定した。大豆タンパク質分解物では取り込みが抑制されたが、CPP、卵黄タンパク質分解ペプチド、グアガム加水分解物、テアニンによる取り込み増加が観察され、特に CWP-D による有意な取り込みの増加が確認された。また、カルシウム吸収促進効果が知られているラクトースを含む(7%)培地による前処理では $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みが増加したが、7% ガラクトースは取り込みに影響せず、このことから、2 糖類であるラクトースの構造が必要であることが示唆された。CWP-D による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み促進効果は、前処理時間に依存して増大し、また、前処理時間を 4 時間に固定した場合、CWP-D の濃度に依存(0.2%で飽和)した。さらに、1% CWP-D による 4 時間前処理により、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り

込みの V_{max} は変化せず(1.728→1.600 pmol/mg/10min)、 K_m は低下(0.042→0.020 mM)したことから、CWP-D 前処理による CaT1 のコンフォメーション変化が示唆された。尚、CWP-D は、CaT1 を発現している Caco-2 細胞内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みも増加させた。CWP-D について、その CaT1 制御因子の特定を目的とし、ODS カラム吸着画分の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みへの影響を調べた。吸着画分を 1%含む溶液中で 4 時間前処理することにより、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みが有意に増加したことから、ヒト CaT1 のカルシウム取り込みを増加させる因子は、ODS 吸着性を有するペプチドであることが示唆された。

総括

本研究では、ヒトカルシウムトランスポーターCaT1 をクローニングし、その構造につき検討した。ヒト CaT1 を CHO 細胞に定常的に発現させたことにより、CaT1 のカルシウム取り込みに関する諸性質を調べ、食品由来の制御因子を探索することが可能となった。それにより、ラクトースやチーズホエー酵素分解物(CWP-D)等について、CaT1 を介したカルシウム吸収性の上昇作用が認められた。その制御因子の特定および制御機構の解明については、今後の課題としたい。



カルシウムの腸管吸収