

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高野 義彦

カルシウムは、骨の形成や生体内の情報伝達等において重要な役割を担うイオンの一つである。カルシウムの体内への吸収の場は主に小腸であり、その吸収経路は、腸管上皮細胞の細胞間経路を通過する単純拡散輸送と、細胞内を通過する能動輸送とされ、カルシウムの供給量に依存し平行して行われている。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、ウサギ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。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。本論文は序論、総合討論含めて5章から成る。

第1章の序論において本研究の背景となる知見について述べた。

第2章では、ヒトカルシウムトランスポーターCaT1のクローニングおよび発現制御について述べている。すなわち、ヒトCaT1のクローニングについて、ラットCaT1のcDNAの情報とそれと相同性の高いhuman cDNAの情報をESTから入手し、RT-PCR用のprimerの設計を行った。ヒトcDNAの情報 that 得られなかったN末端側の領域の解析については、ラットCaT1 cDNAの情報からプライマーを設計した後RT-PCRにて解析し、さらに解析が出来ない領域についてはヒト小腸cDNAライブラリーを用いた5'-RACEを行った。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。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ティングにて確認した。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。

第3章では、ヒトCaT1高発現細胞株の樹立について述べている。すなわち、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。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、吸着画分について抗hCaT1抗体を用いたウエスタンブロット法によりヒトCaT1の発現確認を行った。その結果、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、プラスサイズ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。

第 4 章では、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について述べている。まず、CHO-CaT1 を用いた細胞内へのカルシウム吸収評価実験系に確立を行い、次細胞内へのカルシウム吸収の特徴について調べた。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 $5.28 \mu\text{M}^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みは、 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。次に、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 ($1.728 \rightarrow 1.600 \text{ pmol/mg/10min}$)、 K_m は低下 ($0.042 \rightarrow 0.020 \text{ mM}$) 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。

以上本論文は、新規カルシウム吸収評価実験系の確立および食品由来の新規カルシウム吸収促進因子の発見により、学術上、応用上貢献することが少なく無い。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。