

腎臓におけるビタミンD代謝の調節に及ぼす 食事中的カルシウムとリン量の影響に関する 分子生物学的研究

昭和大学歯学部生化学教室 歯学部長 須田立雄

近年、本邦でも急激な高齢者人口の増加に伴い、骨粗鬆症を初めとする代謝性骨疾患を患う患者の増加が大きな社会問題となっている。その結果、骨密度を増やし骨折頻度を低下させる薬剤の開発が急がれている。骨折頻度は骨塩含量と密接な関係がある。代謝性骨疾患は生体のカルシウムのバランスが負に陥ることにより発症することから、本邦では欧米に比べてカルシウムの摂取量が少ないことが原因と考えられているが、その詳細は明らかでない。生体のカルシウムのバランスは小腸からのカルシウムの取り込み、腎臓における再吸収、骨からのカルシウムの溶出と蓄積によって巧妙に調節されている。これらの組織には活性型ビタミンD [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$] と副甲状腺ホルモン (PTH) の受容体が存在し、両ホルモンが相互に作用してカルシウムのバランスを正に保っている。

抗クル病因子として発見されたビタミンDは、その後の研究によって肝臓と腎臓で2段階の水酸化を受けて生成するビタミンDの活性型代謝産物、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$] によってその作用が発現することが明らかになっている¹⁾。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はビタミンとして発見されたが、その作用が $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に特異的に結合するタンパク質 (受容体, VDR) との結合を介して発現することから、現在ではステロイドホルモンの一種と考えられるようになった。また、近年の分子生物学技術の急速な進展にともなって、ビタミンD研究の分野も急速な進展を遂げ受容体ならびに代謝酵素の構造解析が勢力的に行われている。従って、活性型ビタミンDの作用は、内分泌器官である腎臓での合成とその標的器官 (小腸、腎臓ならびに骨組織) に存在する受容体との結合の2段階で調節されている。合成されたホルモンは血流を介して標的器官 (Endocrine) に運ばれて作用を発現するが、同じ物質が分泌された周囲の細胞 (Paracrine)、あるいはそれ自身の細胞 (Autocrine) に作用することもある。活性型ビタミンDの場合も腎臓以外の組織で合成されることが知られているが、腎以外で合成される活性型ビタミンDは血中濃度に影響を及ぼさない程度の量であることから、局所で作用していると考えられている。

1. ビタミンDの生成とその活性化

ビタミンDにはD₂系とD₃系のものが存在するが、生体内で合成することが出来るのはD₃だけである。ビタミンD₃はコレステロール合成の前駆体である7-デヒドロコレステロール (これをプロビタミンD₃と呼ぶ) から、表皮中の主にマルピギー層で、230~320nmの波長の紫外線によってB環が開裂してプレビタミンD₃を生成し、これが体温により徐々に異性化して生成される。生成したビタミンD₃は血漿中に存在するビタミンD結合タンパク質 (DBP) と結合して血流中に入り、まず

肝臓に運ばれる。肝臓では、肝細胞のミトコンドリアに存在するチトクローム P450を terminal oxidase とした25-水酸化酵素により、側鎖の25位が水酸化されて25-ヒドロキシビタミン D₃ (25(OH)D₃) に代謝される。肝で合成され血中に分泌された25(OH)D₃は、次に腎臓に運ばれて、血中のカルシウム代謝調節ホルモンやカルシウムの濃度に応じて1α位、23位、24位または26位が水酸化され、それぞれ1α,25(OH)₂D₃、23S,25(OH)₂D₃、24R,25(OH)₂D₃、25S,26(OH)₂D₃に変換される。腎で合成されるこれら4つの代謝産物の内、ビタミンDの活性を示す代謝産物は活性型ビタミンDと呼ばれる1α,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [1α,25(OH)₂D₃]である。1α位以外の水酸化反応は、生成した代謝産物の活性が1α,25(OH)₂D₃に比べ極めて低いことから、不活性化の経路と考えられているが、不活性化は1α,25(OH)₂D₃の分解を意味するのか、それとも基質である25(OH)D₃の代謝を主とするのかその意義は明らかでない。

2. 肝臓における25位の水酸化

皮膚で合成または食物として摂取されたビタミンD₃はまず肝臓のミトコンドリアに存在する25-水酸化酵素により25位が水酸化され25(OH)D₃に変換される。本酵素はビタミンDの25-水酸化反応以外にも、コレステロールから胆汁酸への合成過程の5β-cholestane-3α,7α,12α-triolの27(26)位の水酸化反応も触媒することから、ビタミンDの活性化における生理的役割の重要性は考えられない。

スエーデンの Andersson ら²⁾が、胆汁酸の27(26)-水酸化酵素として精製した535個のアミノ酸からなるタンパク質が、ビタミンDの25-水酸化酵素と同一のタンパク質であることもわかった。彼等はクローニングしたcDNAをプローブとしてmRNAの局在を調べたところ、肝臓以外に十二指腸、副腎ならびに肺で強い発現が見られ、腎臓、脾臓にも十分な量の発現があると報告した。これらの結果からも、25-水酸化反応は肝臓以外の組織でも十分に起っている可能性が示唆された。このことから、ビタミンDの25位の水酸化はビタミンD代謝の面から考えると調節が行われていないと考えられる。

3. 腎臓における水酸化と調節因子

肝臓あるいは他の25(OH)D₃生成器官で生合成された25(OH)D₃は、DBPと結合して腎臓に運ばれ1α,25(OH)₂D₃あるいは24,25(OH)₂D₃に代謝される。腎臓における1α位あるいは24位の水酸化は、以下の因子によって巧妙に調節されている。

a. 血清Caと1α,25(OH)₂D₃濃度

1971年 Boyle らは、低Ca血症の際には腎臓で25(OH)D₃から主として1α,25(OH)₂D₃が合成されるのに対し、正常あるいは高Ca血症の際にはCa上昇作用の弱い24,25(OH)₂D₃が合成されることを見出した³⁾。その後、ビタミンD欠乏の動物に1α,25(OH)₂D₃を投与して代謝を調べた実験から、この代謝のスイッチは1α,25(OH)₂D₃自身による1α-水酸化酵素のフィードバック

調節と、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与により血清 Ca 濃度が上昇するので Ca レベルの上昇を介して調節が起こるといふ、2つの機序で制御されていることがわかった。

b. 血清 PTH と CT

1977年堀内らは、甲状腺と副甲状腺を摘出(TPTX)したD-欠乏ラットにCaを持続的に注入する手法を用いて、ビタミンD欠乏TPTX動物を数日間生存させ、腎における $25(\text{OH})\text{D}_3$ の代謝に対するPTHとCTの効果を検討した⁹⁾。その結果、TPTX処置により $25(\text{OH})\text{D}_3$ から $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ への変換は低下するが、PTHあるいはcAMPを持続注入することによってTPTX前のレベルに回復することが明らかになった。よって、低Ca血症に伴う $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生の亢進は、低Ca血症の刺激が直接 1α -水酸化酵素の誘導に関与するのではなく、血清Caの低下が原因となる副甲状腺からのPTHの分泌亢進の結果として、腎の $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素活性が賦活化されるという機序が明らかになった。

一方、CTの $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生に対する作用も同様の実験系で検討され、CTも腎の 1α -水酸化反応を賦活するが、CTによる 1α -水酸化酵素の促進効果はPTHあるいはcAMP促進効果と相加性を示す。それらは、腎の $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 産生に対するCTの効果がPTHの作用とは異なり、cAMPをセカンドメッセンジャーとしない別の作用機序によって起こると考えられた⁹⁾。このPTHとCTの作用機序の相違は、ネフロン分節を用いて行ったアデニル酸シクラーゼ活性の局在とビタミンD-水酸化酵素活性を調べた川島らの実験結果からも支持される⁹⁾。PTH応答性のアデニル酸シクラーゼは、 1α -水酸化酵素と 24 -水酸化酵素の局在部位(近位尿細管直部と近位尿細管曲部)と一致するが、CT応答性のアデニル酸シクラーゼは腎皮質のヘンレの上行脚と遠位曲尿細管に局在するという結果もこの作用機序の違いを示唆すると考えられる。1980年代に入り、PTHやCTの作用機序がさらに詳細に検討され、PTHは腎臓の 1α -水酸化酵素を賦活するだけでなく $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与により亢進する 24 -水酸化酵素活性を抑制することが明らかになった⁷⁾。しかも、PTHの 24 -水酸化酵素活性抑制効果は 1α -水酸化酵素の活性化に要するPTHの濃度より低濃度で発起し、この抑制効果もcAMPをセカンドメッセンジャーとして機能していることが明らかになった。

4. 腎臓の水酸化酵素

肝臓で合成された $25(\text{OH})\text{D}_3$ は、腎臓の 1α または 24 -水酸化酵素によって $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ あるいは $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に代謝される。これらの二種類の水酸化酵素は、細胞内含量が極めて低く従来より精製が困難とされてきた。しかし、 24 -水酸化酵素はビタミンDあるいは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与によって著しく酵素量が誘導されることから、大量のビタミンDを投与したラットの腎臓のミトコンドリアから精製が行われた⁹⁾。その結果、1989年広島大学の大山らは 24 -水酸化酵素の完全精製を成し遂げた。本酵素は分子量53,000のタンパク質で、再構成実験からミトコンドリア型のP450であることも示された。その後、 24 -水酸化酵素の抗体を用いたスクリーニングからそのcDNAが

クローニングされ、3.2Kbp の長さの24-水酸化酵素 cDNA が単離された。この cDNA の解析から、24-水酸化酵素は514個のアミノ酸からなる分子量59,000のタンパク質として合成されるが、成熟の過程でN-末端の35個のアミノ酸残基からなるプレペプチドがプロセッシングされて、成熟した479個のアミノ酸よりなるタンパク質 (55, 500) になることが明らかになった⁹⁾。また、本タンパク質の462 (成熟型の427) 番目のシステインがヘムの第5結合部位に配位すると推定されることから、典型的なミトコンドリア型 P450であることも判明した。

5. 活性型ビタミン D の代謝

これまでのビタミン D 代謝の研究が、in vivo あるいは腎臓を用いての検索が中心であったため、酵素反応の基質として25(OH)₂D₃が用いられていた。従って、1α,25(OH)₂D₃が標的器官でどのように代謝されるかについての詳細な検討はなされていない。これまでに得られている知見からまとめると、1α,25(OH)₂D₃はビタミン D が存在する状態では23位、24位あるいは26位に水酸基が導入され、1α,23,25(OH)₃D₃、1α,24,25(OH)₃D₃、1α,25,26-(OH)₃D₃へと代謝される。その後、1α,23,25(OH)₃D₃は1α,25(OH)₂D₃-26,23S-lactol、1α,25(OH)₂D₃-26,23S-lactone の順に、1α,25,26-(OH)₃D₃は、1α,23(OH)₂-tetranorD₃にそれぞれ代謝される。

一方、24位に水酸基が導入された1α,24,25(OH)₃D₃は1α,25(OH)₂-24-oxo-D₃、1α,23,25(OH)₃-24-oxo-D₃の順に代謝された後、最終的に calcitric acid になり排泄される。23位と24位の水酸化反応は、腎臓以外に小腸でも同様に起こるが、23位と24位の水酸化の割合は約1:20であることから、1α,25(OH)₂D₃の代謝は24位の水酸化を経て起こると考えられる。特に、24-水酸化酵素は1α,25(OH)₂D₃の標的組織で共通して検出されることも、この可能性が起こりうることを示唆している。1α,25(OH)₂D₃は標的器官で23位、24位あるいは26位の水酸化を受けるが、これまでに酵素蛋白質が精製されたのは24-水酸化酵素のみである。今後、1α,25(OH)₂D₃の代謝を解明する上で23位と26位の水酸化酵素の精製は重要であり、早期に酵素タンパクとその cDNA の配列が決定されることを期待する。

6. 24-水酸化酵素の発現とその調節

腎臓の24-水酸化酵素活性が1α,25(OH)₂D₃によって調節されていることは in fusion の実験系や細胞を用いた実験によって十分な検討がされてきた。しかし、近年、24-水酸化酵素の基質特異性を調べてみると25(OH)D₃を基質として用いた場合に比べ、1α,25(OH)₂D₃を用いた場合の方が生成物が多いこと、また Km の値からも1α,25(OH)₂D₃の方が24-水酸化酵素の良い基質となるという結果が得られている¹⁰⁾。我々は、24-水酸化酵素の cDNA を用いて1α,25(OH)₂D₃による24-水酸化酵素の誘導をノーザンブロット法で調べた¹¹⁾。ビタミン D 欠乏ラットに1α,25(OH)₂D₃を投与すると24-水酸化酵素の誘導が起こるが、この誘導は転写レベルで調節されていることが明らかになった。また、1α,25(OH)₂D₃による24-水酸化酵素の誘導は腎臓以外に小腸でも起こり、1α,25

(OH)₂D₃に対する反応性は腎臓よりも小腸の方が高く、はるかに低濃度の1α,25(OH)₂D₃によって小腸での24-水酸化反応の誘導が起こることがわかった。また、時間的にも早く起こることなどから、小腸の方が腎臓より1α,25(OH)₂D₃に対し反応性が高いと考えられた。この原因を調べるため、PTHと1α,25(OH)₂D₃を同時に投与して調べたところ、PTHは1α,25(OH)₂D₃による24-水酸化酵素のmRNAの誘導を著しく阻害した。さらに、甲状腺および副甲状腺の摘除(TPTX)を行った動物で1α,25(OH)₂D₃の反応性を調べると、腎も小腸も1α,25(OH)₂D₃に対し同等の反応性を示した。従って、この反応性の差はPTHの受容体が腎には存在するが、小腸にはないために生ずるのではないかと考えた。さらに、ラットをビタミンD含有の低Ca食で飼育して、腎と小腸における24-水酸化酵素のmRNAの発現を調べたところ、低Ca食飼育によって血中1α,25(OH)₂D₃レベルが上昇するため、小腸の24-水酸化酵素のmRNAは正常Ca食飼育の動物に比べて著しく上昇した。一方、腎での発現は低Ca刺激によりPTHレベルが上昇するため、血中の1α,25(OH)₂D₃レベルが高まったにも拘らず阻害されていた。この結果は、腎の24-水酸化酵素の誘導に関してPTHが1α,25(OH)₂D₃より重要な役割をしている可能性(低Ca食実験)を示すと共に、24-水酸化酵素の役割が25(OH)D₃の24-水酸化にあるのではなく、1α,25(OH)₂D₃の24-水酸化であることを示唆している。

7. 24-水酸化酵素とVDRの発現に対する血清カルシウムならびにリンの作用

腎臓は、1α,25(OH)₂D₃を産生すると共に副甲状腺ホルモンに依存してカルシウムとリン酸の再吸収を行う。小腸は、血中1α,25(OH)₂D₃のレベルにตอบสนองして食物中のカルシウムを積極的に取り込み、骨へのカルシウムの蓄積を促進させる。しかし、生体のカルシウムのバランスを正に保つための重要な因子であるビタミンDが、腎臓においてどのような活性化の制御を受けているか、またその調節機構に対するカルシウム摂取量とPTHの作用に関しては充分解析されていない。我々はこれまでに、腎臓、骨ならびに小腸におけるビタミンDの作用を1α,25(OH)₂D₃によって、特異的に発現が調節されているビタミンDの24-水酸化酵素の誘導を指標として調べてきた。その結果、腎臓と骨はPTH受容体を有する点では共通しているが、1α,25(OH)₂D₃による24-水酸化酵素の誘導に関しては腎臓と骨は全く発現機構が異なることが明らかになった¹²⁾。そこで、食事中的カルシウムならびにリン量が腎のビタミンD代謝に及ぼす影響を分子レベルで検討した。

腎臓は高度に分化した細胞が集合して一つのネフロンを形成していることから、各セグメントの機能も部位によって著しく異なっている(図.1)。特に、ビタミンDの代謝に関しては近位曲尿細管、ならびに近位直尿細管が重要な役割を果している。一方、1α,25(OH)₂D₃の受容体(VDR)の局在に関しては近位尿細管から遠位尿細管の細胞に至るほぼ全域に存在するが、ビタミンD代謝ならびに作用に対するVDRの役割については明らかでない。そこで、ビタミンDの代謝状態が異なる種々のモデル動物を作製して、ビタミンD代謝とVDRとの関係を検討した。動物は、3週齢のS.D.系ラットをビタミンDを含む低カルシウム食(0.02%, Ca)あるいは低リン食(0.1%, P)を摂餌させて、

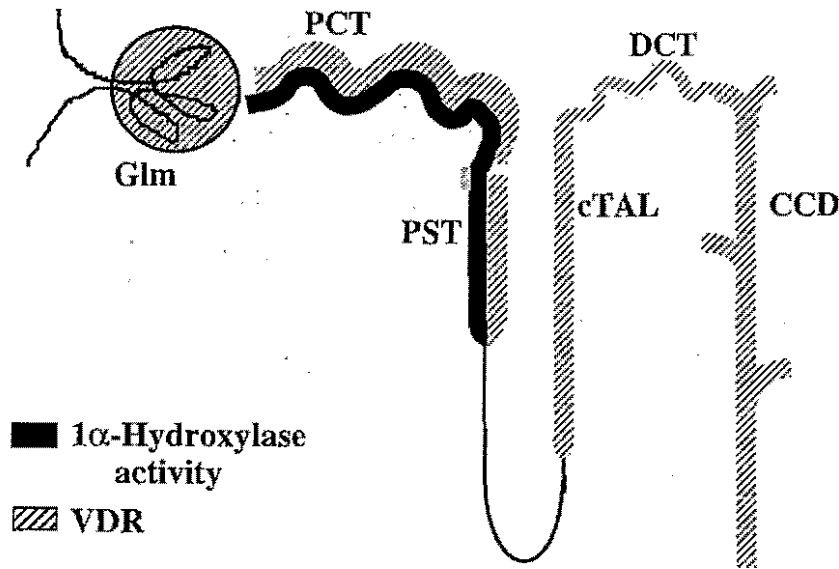


図1. 腎臓のネフロンにおけるビタミンD-水酸化酵素とビタミンD受容体の発現の関係
 VDR: ビタミンD受容体、1 α -Hydroxylase activity: 1 α -水酸化酵素活性、Glm: 糸球体、PCT: 近位曲尿細管、PST: 近位直尿細管、cTAL: ヘンレの上行脚、DCT: 遠位曲尿細管、CCD: 皮質部集合管

活性型ビタミンDの合成が亢進している動物、ならびにビタミンD欠乏食で飼育して1 α -水酸化酵素活性は亢進しているが活性型ビタミンD合成が起こっていない動物、ならびに正常のカルシウムを含む飼料を摂餌させて活性型ビタミンDの合成が低下している動物を作製して用いた(表.1)。

表1. 各種モデル動物の血清カルシウム、リンおよび副甲状腺ホルモン濃度と腎臓の1 α -水酸化酵素活性

Diet	Vit D status	Operation	Feeding period (weeks)	Serum Parameters			Renal 1 α -OHase activity (fmol/min.mg prot)
				Ca (mg/dl)	Pi	PTH (pg/ml)	
Normal	+		2	10.1	8.4	22.3	<10
Low Ca	+	Sham	2	8.6	8.0	56.2	101.5
Low P	+		2	13.4	3.9	<10	31.3
Normal	+	TPTX	2	5.1	11.6	<10	<10
Low P	+		2	13.6	3.4	<10	41.5
Normal	+	Sham	4	9.9	8.6	21.5	<10
Low Ca	-		4	5.0	6.9	355.0	494.5

Sham: 偽手術、TPTX: 甲状腺副甲状腺摘除術、PTH: 副甲状腺ホルモン、Normal: 正常食飼育群、Low Ca*: ビタミンDを含む低カルシウム(0.02%, Ca)食飼育群、Low P*: ビタミンDを含む低リン(0.1%, P)食飼育群

それぞれの動物より摘出した腎臓は、コラゲナーゼ溶液によって消化後、実体顕微鏡下でネフロンを取り出すマイクロダイセクション法により、各ネフロンを採取した。得られたネフロンより RNA を回収後、24-水酸化酵素と VDR の mRNA 発現を Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって調べた。その結果、正常食を摂餌している動物のネフロンでは、近位尿細管ならびに遠位の皮質部集合管の両ネフロンに VDR の発現が検出されたが、24-水酸化酵素は近位尿細管には検出されるものも、遠位皮質部集合管では検出されなかった (図.2)¹⁹⁾。一方、低リンならび

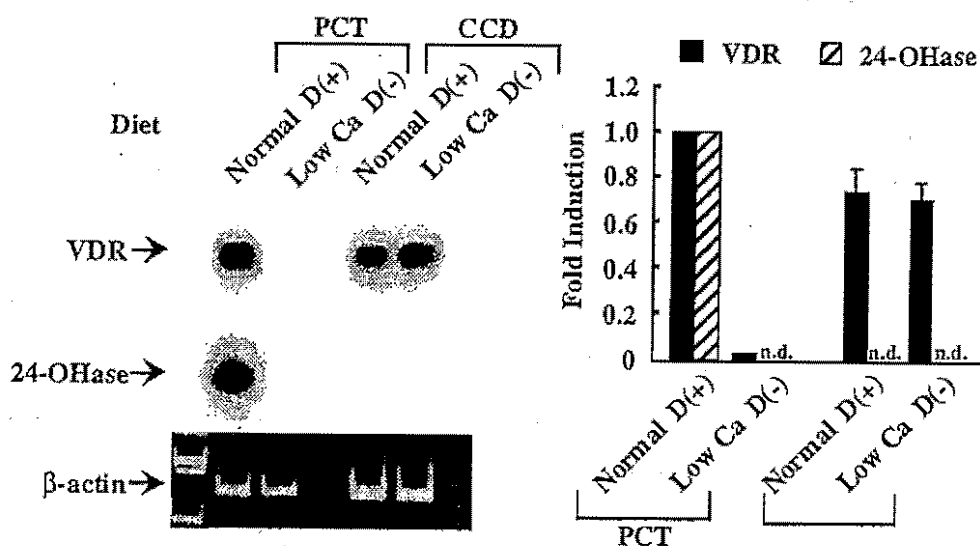


図2. 腎臓のネフロンにおけるビタミンD受容体 (VDR) と24-水酸化酵素 (24-OHase) の発現の関係

PCT: 近位曲尿細管、CCD: 皮質部集合管、コントロールとしてアクチン(β -actin) の発現を調べた。

に低カルシウム食で飼育した動物の腎臓は 1α -水酸化酵素が亢進して $25(\text{OH})\text{D}_3$ から $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を合成するようになるが、 1α -水酸化酵素が発現している近位尿細管細胞に VDR が存在すると、合成された $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は即座に24位が水酸化されて $1\alpha, 24, 25(\text{OH})_3\text{D}_3$ に代謝されるため、活性型ビタミンDの産生器官として機能できないと考えられる (図.3)。しかし、血清中の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ をラジオレセプターアッセイ法によって測定してところ、これらの動物は正常動物に比べ3~5倍に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が上昇していたことから、腎臓は内分泌器官として機能していると考えられた。

そこで、本動物の VDR と24-水酸化酵素の mRNA 発現を、同様の RT-PCR 法によって調べた。その結果、低カルシウム食で飼育した動物の近位尿細管細胞は VDR の発現が完全に抑制され、低リン食飼育動物でも著しく発現が低下していた (図.2)。これらの結果は、腎臓がビタミンDの内分泌器官として機能する場合には、近位尿細管細胞は合成される $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を速やかに血流に放出できるように VDR の発現が抑制され、逆に $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の合成を必要としない状態になっ

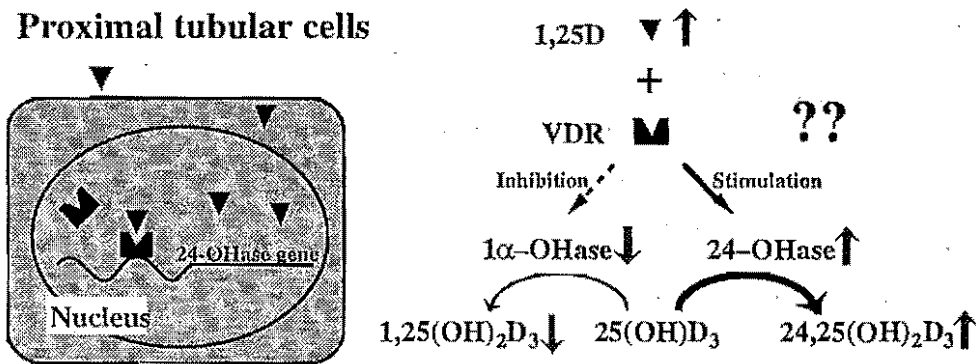


図3. 腎臓の近位尿細管細胞がビタミンD受容体(VDR)を発現していると、内分泌器官として機能するために障害となる模式図

1 α -OHase: 1 α -水酸化酵素、24-OHase: 24-水酸化酵素、Stimulation: 促進、Inhibition: 阻害。Nucleus: 核、Proximal tubular cells: 近位尿細管細胞

たときは VDR を発現して、ビタミン D の標的器官として小腸ならびに骨組織と同様に機能すると考えられた (図.4)。また、低カルシウム状態における VDR の発現抑制は、腎臓の近位尿細管細胞に特異的に起こる現象であり、遠位の皮質部集合管ならびに小腸の上皮細胞では起こらなかった。このことから、近位尿細管における VDR の発現調節は腎臓の機能と密接に関与することが示唆された。

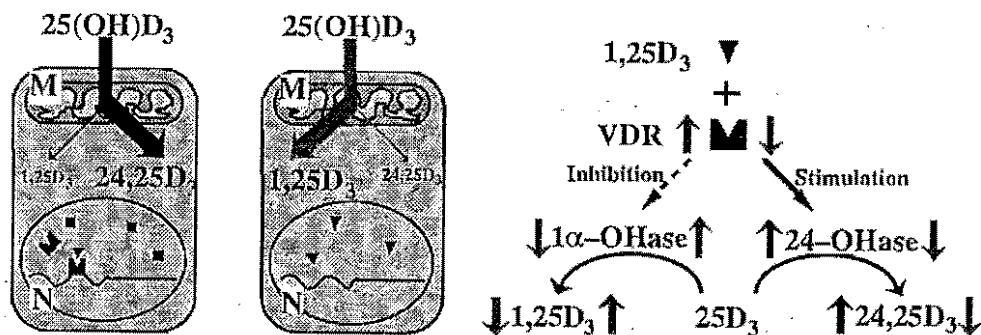


図4. 腎臓の近位尿細管細胞における1 α -水酸化酵素と24-水酸化酵素の発現スイッチの機序

1 α -OHase: 1 α -水酸化酵素、24-OHase 24-水酸化酵素、Stimulation: 促進、Inhibition: 阻害。VDR: ビタミンD受容体、N: 核、1,25D₃: 1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃、24,25D₃: 24,25-ジヒドロキシビタミンD₃

そこで、生体のカルシウムの要求性が高まる状況下では腎臓の1 α -水酸化酵素活性の上昇と VDR の発現の低下が普遍的に起こるか否かを調べるため、以下の実験を行った。鳥類は産卵時には多量のカルシウムを必要とするため、骨髓に骨髓骨の形でカルシウムを貯蔵する。骨髓骨の形成は、性ホルモン投与によって雄の鳥類にも形成されることから、ウズラにエストロゲンを投与する

ことにより、 1α -水酸化酵素活性を上昇させた場合にも共通して VDR の発現抑制が起こるか否かを検討した。その結果、成熟した雄性ウズラにエストロゲンを単独あるいはエストロゲンとテストステロンを併用投与すると、腎臓の 1α -水酸化酵素活性は著しく亢進した。その動物より、RNA を採取してノーザンブロット法で VDR の発現を調べたところ、腎臓の VDR 発現は正常に比べ、エストロゲンを単独ならびにエストロゲンとテストステロンを併用投与した群で著しく低下していた (図.5)。また、性ホルモン投与による VDR の発現抑制は、腎臓に特異的な現象であり、十二指腸部位では起こらなかった。

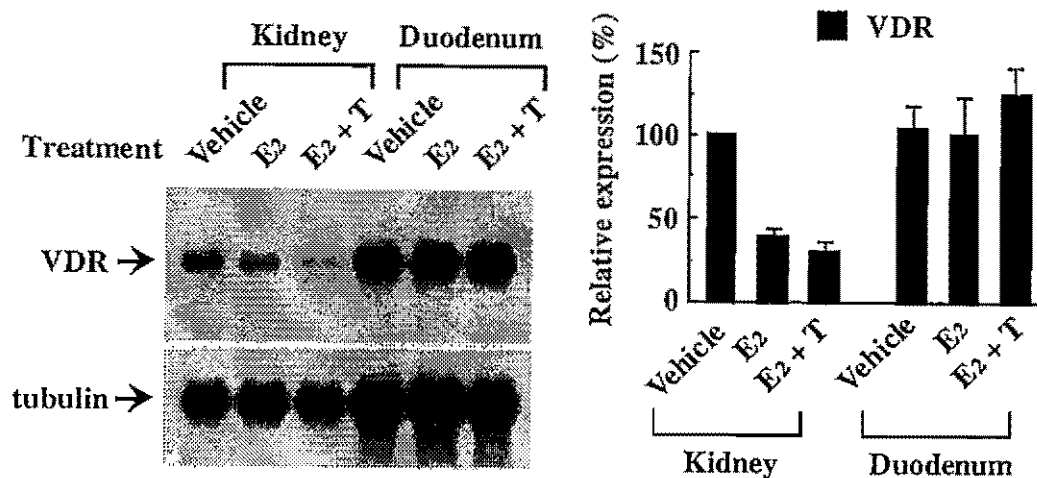


図5. 腎臓のビタミンD受容体(VDR)の発現に対する性ホルモンの効果
成熟した雄性ウズラに屠殺48時間前にエストロゲンあるいはテストステロンを皮下投与した。
Kidney: 腎臓、Duodenum: 十二指腸、tubulin: チュブリン、E₂: 17 β -エストラジオール、T: テストステロン。VDR: ビタミンD受容体

8. 腎臓の VDR の発現を制御する因子について

腎臓の近位尿細管細胞の VDR の発現は、機能と密接に関与しているが、その因子が何であるかは明らかではない。そこで、ラットをビタミンD欠乏食で飼育して 1α -水酸化酵素活性を上昇させ、VDR の発現と PTH との関連性を検討した。その結果、ビタミンD欠乏ラットの副甲状腺を摘除すると 1α -水酸化酵素活性は著しく低下したが、VDR の発現は低下したままであった。一方、TPTX ラットに投与するカルシウム濃度を 5 mM から 10 mM に変えることによって VDR の発現は上昇した。このことから、近位尿細管細胞の VDR 発現には血清中のカルシウム濃度が重要な役割をしていることが明らかになった。このことは、正常動物に高濃度の PTH を投与しても近位尿細管細胞の VDR の発現量に変化しないことから、VDR の発現抑制には PTH 受容体を介した A-キナーゼと血清カルシウムが重要な役割を果していることが示唆される。

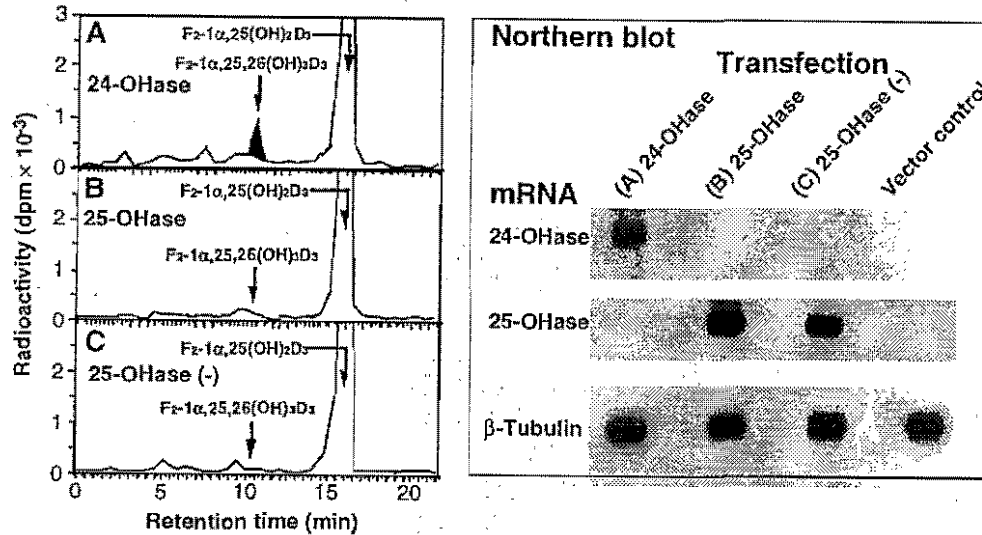


図6. 24-水酸化酵素ならびに25-水酸化酵素の発現ベクターを導入した骨芽細胞 (ROS17/2.8) における24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃の代謝

24(OH)ase: 24-水酸化酵素の発現ベクターを導入、25(OH)ase: 25-水酸化酵素の発現ベクターを導入、25(OH)ase(-): 25-水酸化酵素の遺伝子を逆方向で移入した発現ベクターを導入、mRNA: メッセンジャーリボ核酸、Northern blot: ノーザンブロット解析、Transfection: 遺伝子導入

9. 活性型ビタミンDの安定誘導体の代謝について

我々は、腎臓における1α-および24-水酸化の代謝スイッチが、近位尿細管細胞におけるVDRの発現制御によって行われていることを明らかにした。そこで活性型ビタミンDの安定誘導体である24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃の代謝とその反応を司る酵素の同定を試みた。24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃の代謝は正常動物の腎臓のホモジェネートを用いた場合には殆ど起こらなかったが、予め1α,25(OH)₂D₃を投与したラットの腎臓より調製したホモジェネートを用いて反応させると、24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃より極性が高い位置に溶出する代謝物に代謝されることが明らかになった(図.6)¹⁰。また、24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃の代謝は1α,25(OH)₂D₃の添加によって用量依存的に阻害されることから、1α,25(OH)₂D₃の代謝を司る酵素と同一の酵素によって代謝されていることが示唆された。そこで、24-水酸化酵素の発現ベクターを全く24-水酸化酵素活性を有しない骨芽細胞ROS17/2.8に導入して、24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃の代謝を調べた¹⁰。その結果、24,24-F₂-1α,25(OH)₂D₃は腎臓で代謝された物質を全く同一の保持時間を有する代謝物に代謝されることが明らかになった。また、本化合物の構造を調べたところ、26位に1分子の水酸基が導入された24,24-F₂-1α,25,26(OH)₃D₃であることが明らかになった。

まとめ

腎臓におけるビタミンDの代謝は血清のカルシウム濃度によって厳格に調節されていることが知

られているが、その調節機構の詳細はこれまで明らかでなかった。また、腎臓は活性型ビタミンD合成の内分泌器官であると共に、VDRを発現する標的器官としての性質を兼ね備えた組織であるが、この二つの性質がどのように制御されているかについても明らかでない。今回我々は、ビタミンDの主作用が小腸からのカルシウムの取り込み促進であることに着目して、カルシウムならびにリン含量を変化させた飼料を摂餌させることにより、腎臓におけるビタミンDの代謝状態の異なる種々のモデル動物を作製し、腎臓の各ネフロンにおけるビタミンD代謝酵素とVDRの発現を分子レベルで検討した。その結果、内分泌器官として機能している近位尿細管細胞はVDRの発現が完全に抑制され、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の分解系の律速酵素である24-水酸化酵素が発現できない状態になっていることが判明した。一方、VDRを発現している腎臓は他の標的器官と同様に、24-水酸化酵素の発現が起こることを明らかにした。さらに、性ホルモン投与による鳥類の腎臓のビタミンD代謝酵素の発現とVDRの関係を調べ、腎臓の 1α -水酸化酵素活性が亢進している状況では必ずVDRの発現が抑制されることを見出した。以上の結果から、腎臓におけるビタミンD代謝の方向性は、VDRの発現を介して制御されていることが明らかになった。

参考文献

- 1) 須田立雄、尾形悦郎、小椋陽介、西井易穂：ビタミンD—その新しい流れ。講談社、東京、p. 70, 1982.
- 2) Bhattacharyya, M. H. and DeLuca, H. F.: Subcellular location of rat liver-25-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 160:58-62, 1974.
- 3) Boyle, I. T., Gray, R. W. and DeLuca, H. F.: Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalciferol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:2131-2134, 1971.
- 4) Horiuchi, N., Suda, T., Takahashi, H. and Shimazawa, E.: In vivo evidence for the intermediary role of 3',5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 synthesis in rats. *Endocrinology*, 101:969-974, 1977.
- 5) Horiuchi, N., Takahashi, H., Matsumoto, T., Takahashi, N., Shimazawa, E., Suda, T. and Ogata, E.: Salmon calcitonin-induced stimulation of $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol synthesis in rats involving a mechanism independent of cyclic AMP. *Biochem. J.*, 184:269-275, 1979.
- 6) Kawashima, H., Torikai, S. and Kurokawa, K.: Calcitonin selectively stimulates 25-hydroxyvitamin D_3 - 1α -hydroxylase in proximal straight tubules of rat kidney. *Nature*, 291:327-329, 1981.

- 7) Shigematsu, T., Horiuchi, N., Ogura, Y., Miyahara, T. and Suda, T.: Human parathyroid hormone inhibits renal 24-hydroxylase activity of 25-hydroxyvitamin D₃ by a mechanism involving adenosine 3'5'-monophosphate in rats. *Endocrinology*, 118: 1583-1589, 1986.
- 8) Ohyama, Y., Hayashi, S. and Okuda, K.: Purification of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase from rat kidney mitochondria. *FEBS Lett.*, 255:405-408, 1989.
- 9) Ohyama, Y., Noshiro, M. and Okuda, K.: Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase. *FEBS Lett.*, 278:195-198, 1991.
- 10) Burgous-Trinidad, M., Ismail, R., Ettinger, R. A., Prah, J. M. and DeLuca, H. F.: Immunopurified 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase and 1,25-dihydroxyvitamin D-24-hydroxylase are closely related but distinct enzymes. *J. Biol. Chem.*, 267:3498-3503, 1992.
- 11) Shinki, T., Jin, C. H., Nishimura, A., Nagai, Y., Ohyama, Y., Noshiro, M., Okuda, K. and Suda, T.: Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Biol. Chem.*, 267: 13757-13762, 1992.
- 12) Nishimura, A., Shinki, T., Jin, C. H., Ohyama, Y., Noshiro, M., Okuda, K. and Suda, T.: Regulation of messenger ribonucleic acid expression of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase in rat osteoblasts. *Endocrinology*; 134:1784-1799, 1994.
- 13) Iida, K., Shinki, T., Yamaguchi, A., DeLuca, H. F. and Suda, T.: A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6112-6116, 1995.
- 14) Miyamoto, Y., Shinki, T., Ohyama, Y., Kasama, T., Iwasaki, H., Hosotani, R., Sato, T. and Suda, T.: Regulation of vitamin D-responsive gene expression by fluorinated analogs of calcitriol in rat osteoblastic ROB-C26 cells. *J. Biochem.*, 118:1068-1076, 1995.
- 15) Miyamoto, Y., Shinki, T., Yamamoto, K., Ohyama, Y., Iwasaki, H., Hosotani, R., Kasama, T., Takayama, H., Yamada, S. and Suda, T.: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase hydroxylates the carbon at the end of the side chain (C-26) of the C-24-fluorinate analog of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. (投稿中)