

25-ヒドロキシビタミンD-1 α -水酸化酵素のクローニングと発現調節

昭和大学歯学部生化学教室 教授 須田立雄

はじめに

抗ケ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活性型ビタミンD[1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$]によって、その作用が発現することが明らかになった。1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ の作用は細胞内に存在する特異的結合タンパク質(受容体)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ている。従って、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ の作用は内分泌器官である腎臓での合成と、その標的器官に存在する受容体との結合という2段階で作用の調節がされている。これまでに、ビタミンDの代謝酵素として側鎖の25位を水酸化するビタミンD-25-水酸化酵素と25-ヒドロキシビタミンD[25(OH)D $_3$]、ならびに1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ の24位を水酸化する1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -24-水酸化酵素が精製・クローニングされているが、活性型ビタミンDの合成に関して最も重要な25(OH)D $_3$ -1 α -水酸化酵素は、細胞内含量が極めて低いことから精製が困難とされてきた。我々は、これまでにクローニングされているビタミンD-25-水酸化酵素ならびに1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -24-水酸化酵素が、共にミトコンドリア型シトクロムP450であることに着目して、遺伝子工学の手法を用いて25(OH)D $_3$ -1 α -水酸化酵素遺伝子をクローニングし、その発現調節機構を明らかにしたので報告する。

I. ビタミンD代謝の概要

高等動物の血清Caレベルは、ビタミンD、副甲状腺ホルモン(PTH)、およびカルシトニン(CT)という3種のカルシウム代謝調節ホルモンが、小腸、骨組織および腎臓に働いて10mg/dl(2.5mM)という正常値を巧妙に維持している。

食物として摂取されたビタミンDと皮膚で生合成されたビタミンD $_3$ は、まず肝臓に運ばれて側鎖の25位が水酸化され25-ヒドロキシビタミンD $_3$ [25(OH)D $_3$]となる。25(OH)D $_3$ は次いで腎臓に運ばれ、血中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1 α 位または24位が水酸化され、それぞれ1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ あるいは24,25-ジヒドロキシビタミンD $_3$ [24,25(OH) $_2$ D $_3$]に変換される。腎臓で合成されるこれらの代謝産物の内、ビタミンDの活性を示す代謝産物は1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ である。近年、ビタミンDの25位ならびに24位の水酸化反応を司る酵素が精製され、それらの遺伝子もクローニングされた。そして、これらの水酸化酵素のcDNAを用いた研究から、ビタミンD-25-水酸化酵素(CYP27)は肝臓以外にも、腎臓、十二指腸、脾臓、副腎、肺等の組織でも発現していることが明らかとなり、ビタミンDの25-水酸化反応は種々の組織で起こっている可能性が示唆された。また、25-水酸化酵素

はビタミンDの25-水酸化反応の外にコレステロールから胆汁酸への合成過程の5 β -コレスタン-3 α , 7 α , 12 α -トリオール26(27)位の水酸化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ていない。

一方、24-水酸化酵素(CYP24)の役割は、腎臓で1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 合成の前駆体である25(OH)D $_3$ の24位を水酸化して活性の弱い24, 25(OH) $_2$ D $_3$ に変換することにより、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の過剰生成を防ぐことが本来の役割と考えられていた。しかし、遺伝子発現の面から24-水酸化酵素の役割も再検討され、今日では、本酵素がビタミンDのすべての標的細胞で共通して1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ によって発現が誘導されること、ならびに本酵素は25(OH)D $_3$ に比べ1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ を良い基質とすることが明らかになり、本来の役割は標的器官における1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ の過剰反応を防止するため、1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ を1 α , 24, 25(OH) $_2$ D $_3$ に異化するために誘導される酵素であるとする考えが有力となっている。

II. 活性型ビタミンDの生合成に影響を及ぼす因子

1. 副甲状腺ホルモンとカルシトニン

1971年、Boyleらは、低Ca血症の際には腎臓で25(OH)D $_3$ から主として1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 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) $_2$ D $_3$ が合成されることを見出した。その後、1977年、堀内らは、甲状腺と副甲状腺を摘出(TPTX)したラットを用いて腎における25(OH)D $_3$ の代謝に対するPTHとCTの効果の詳細に検討した。その結果、TPTX処置により低下した25(OH)D $_3$ から1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ への変換は、PTHあるいはcAMPの持続注入によってTPTX前のレベルにまで回復することが明らかになった。従って、低Ca血症に伴う1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 産生の亢進は、低Ca血症の刺激が直接1 α -水酸化酵素の誘導に關与するのではなく、血清Caの低下に伴う副甲状腺からのPTHの分泌亢進を介して腎の25(OH)D $_3$ -1 α -水酸化酵素が賦活化された結果起こることが明らかになった。

一方、CTの1 α , 25(OH) $_2$ 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1 α -水酸化反応を賦活するが、CTによる1 α -水酸化酵素の促進効果はPTHあるいはcAMPの促進効果と相加性を示すことから、腎の1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 産生に対するCTの効果は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。このPTHとCTの作用機序の相違は、ネフロンにおけるPTH応答性のアデニル酸シクラーゼの局在は、1 α -水酸化酵素および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-上行脚と遠位曲尿細管に局在して、1 α -水酸化酵素の局在とは異なる川嶋らの結果からも示唆される。

Ⅲ. 1 α -水酸化酵素のクローニング

ビタミンD代謝酵素の発現調節機構を分子レベルで解明するためには、25-水酸化酵素、24-水酸化酵素ならびに1 α -水酸化酵素の遺伝子のクローニングが必須である。これまでに広島大学のグループによって25-水酸化酵素と24-水酸化酵素が精製され、その遺伝子の構造も明らかとなった。特に、24-水酸化酵素の発現調節に関しては1 α , 25(OH)₂D₃によって特異的に発現が促進される機序、ならびに24-水酸化酵素の生理的意義についてもほぼ完全に解明されたと考えられる。しかし、ビタミンDの代謝酵素の中で最も重要な25(OH)D₃-1 α -水酸化酵素に関しては、これまでに国内外の多くの研究者が単離を試み、数施設から精製に関する論文が発表された。しかし、採られた蛋白質の性質ならびに比活性の面から1 α -水酸化酵素とは考えにくい点が多かった。我々は、これまでにクローニングされたビタミンD-水酸化酵素(CYP27及びCYP24)がミトコンドリア型シトクロムP450であり、1 α -水酸化酵素もこれまでの酵素学的な解析からミトコンドリア型P450であること、シトクロムP450はファミリーを形成しており特にヘムおよびフェレドキシン結合部位の相同性は高く共通した配列を有していることに着目し、遺伝子工学的な手法を用いて1 α -水酸化酵素をクローニングをすることを計画した。CYP27ならびにCYP24は共にミトコンドリア型P450であり全配列においては約30%の相同性であるが、ミトコンドリア型P450の特徴であるフェレドキシン結合部位ならびにヘム結合部位は約60%の高い相同性を有することが明らかになっている。そこで、我々はCYP27とCYP24のフェレドキシン結合部位ならびにヘム結合部位からdegenerate primerを作製し、RT-PCR法によって1 α -水酸化酵素の部分DNAをクローニングすることにした。

RNAは1 α -水酸化酵素活性が著しく亢進しているビタミンD欠乏ラットの腎臓、ならびに最も強い活性を有する活性型ビタミンDの誘導体である26, 27-F6-1 α , 25(OH)₂D₃を試料採取前に投与して、完全

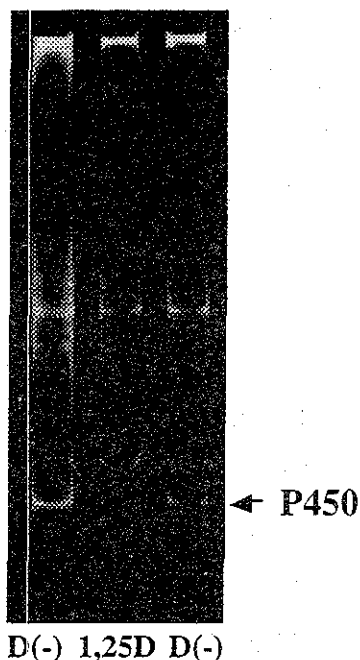


図1. Degenerate primerを用いて行ったPCR産物の電気泳動による解析。

D(-): ビタミンD欠乏のラットの腎臓より調製したmRNAを元に、1, 25D: ビタミンD欠乏ラットに実験48時間前に活性型ビタミンDを投与したラットより調製したmRNAを用いてRT-PCRを行った。

に 1α -水酸化酵素活性を抑制したラットの腎臓から調製した。その後、逆転写酵素によって相補的DNA (cDNA)を調製し、ヘム結合部位とフェレドキシン結合部位から作製したdegenerate primerを用いてPCRを行った。その結果、ビタミンD欠乏ラットの腎臓に特異的に発現する約250塩基長のバンドが検出された(図1)。

このDNAをTA-ベクターにクローニングして塩基配列を決定した後、3'-rapid amplification of cDNA end(3'-RACE)法を用いて、1.2kb長の遺伝子をクローニングした。ここで、採取した1.2kbのcDNAを用いてビタミンD欠乏ラットの腎臓より調製したZAP-cDNAライブラリーをスクリーニングして、全長2469bpのcDNAを単離した。単離した遺伝子は501個のアミノ酸をコードし、P450に特徴的なフェレドキシンならびにヘム結合領域を含む蛋白質で、ホモロジー検索の結果これまでに報告されていない新規P450であることが明らかになった。また、全長cDNAを発現ベクターに組み込みCOS-7細胞に移入して25(OH) D_3 の代謝を調べた結果から、本遺伝子が 1α -水酸化酵素であることが確認された。また、ホモロジー検索の結果から、最も高い相同性を有するのはミトコンドリア型P450であるCYP27であり、 1α -水酸化酵素はCYP27サブファミリーに属すると考えられCYP27B1と命名された。次いで、ラットの 1α -水酸化酵素cDNAをプローブしてヒト腎臓より採取したmRNAから調製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、全長2469bp、508個のアミノ酸をコードするヒト 1α -水酸化酵素をクローニングした。また、カナダのSt-ArnaudらはラットCYP24のヘム結合領域をプローブにして、ビタミンD欠乏ラットの腎臓より調製したcDNAライブラリーを緩和な条件でスクリーニングして、我々と同一の遺伝子をクローニングしている。東大分生研の加藤らも、先に作製したビタミンD受容体ノックアウトマウスの血中 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ 濃度が高いことに着目して、ノックアウトマウスの腎臓より調製したcDNAの中から発現クローニング法を用いて 1α -水酸化酵素のクローニングに成功している。Fuらもケラチノサイトが酵素活性の実験から 1α -水酸化酵素を強く発現していることに着目して、我々と同様のdegenerate PCR法でクローニングした。従って、1997年に米国、カナダならびに日本の4施設ではほぼ同時期に遺伝子工学の手法によって 1α -水酸化酵素がクローニングされたことになる。また、宮崎医科大学のグループもラット 1α -水酸化酵素の部分精製に成功しており、今後、完全精製の暁には遺伝子工学の手法によって採られた 1α -水酸化酵素と活性を指標に精製された蛋白質との比較によって、ミトコンドリアへの移行シグナル等の詳細な解析が可能となることが期待される。

IV. 1α -水酸化酵素の発現とその調節

1α -水酸化酵素は25(OH) D_3 から活性型ビタミンDである $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ を合成する酵素であり、 $1\alpha, 25(OH)_2D_3$ の作用が小腸からのカルシウム吸収の促進ならびに骨からの骨塩動員促進によって生体のカルシウム恒常性を保つことであるから、血清カルシウムが低下した状態ならびにビタミンDが欠乏した状態の腎臓でその発現の促進が起こることが、代謝実験から報告されている。そこで我々は、ビタミンD欠乏食あるいはビタミンDを含む低カルシウムならびに低リン食で飼育し、 1α -水酸化酵素活

性の亢進したモデル動物を作製して、腎臓における本酵素のmRNAの発現をNorthern blot法により解析した。その結果、ビタミンD欠乏食で飼育することにより 1α -水酸化酵素mRNAの発現が増強し、本発現は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与により完全に抑制されることが明らかとなった。一方、 24 -水酸化酵素のmRNAの発現は 1α -水酸化酵素の発現と逆相関して変化することも明らかになった(図2)。また、低カルシウム食ならびに低リン食による 1α -水酸化酵素mRNAの発現は、飼育期間に伴って増加することが明らかになった(図3)。

腎臓の 1α -水酸化酵素は主として近位尿細管に局在することが報告されている。そこで、マイクロダイセクション法によって得た近位曲尿細管からRNAを調製後、RT-PCR法によって 1α -水酸化酵素

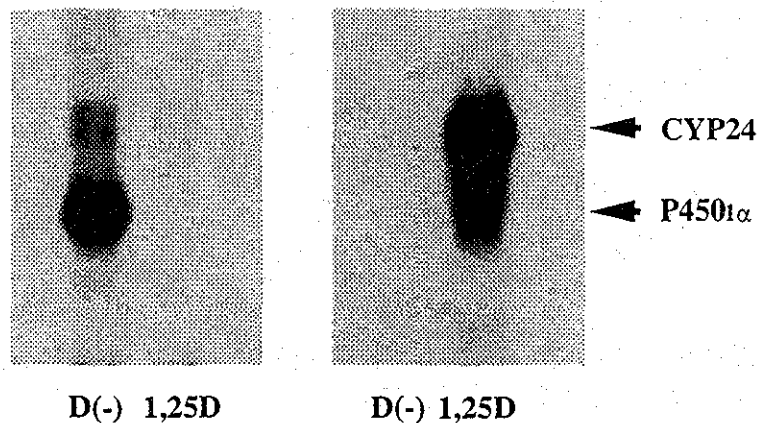


図2. $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素(P4501 α)ならびに $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - 24 -水酸化酵素(CYP24)mRNA発現に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果。

RNAはビタミンD欠乏低カルシウム食で3週間飼育したラットの腎臓D(-)、あるいは実験48時間前に $1\mu\text{g}$ の $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を静脈内投与したラットの腎臓より調製した。

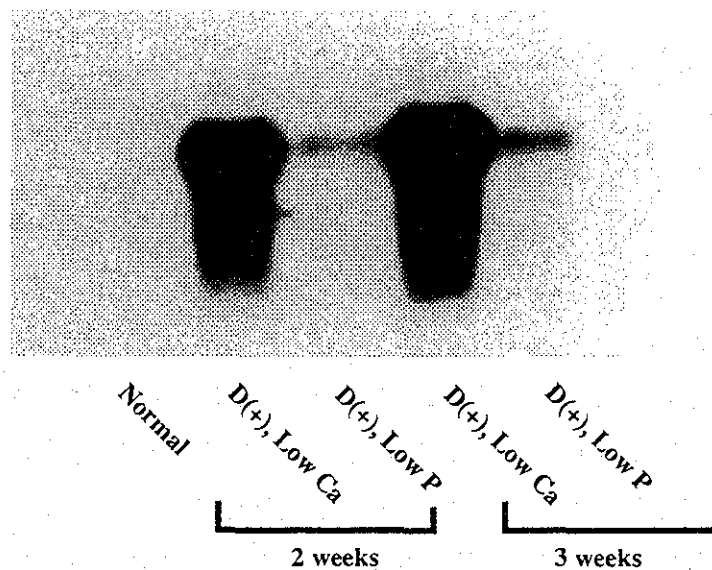


図3. ラット腎臓における $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素mRNAの発現に対する低カルシウムならびに低リン食飼育の効果。

3週齢のラットをビタミンDを含む 1.2% Ca, 0.6% P(Normal), 0.03% Ca, 0.6% P(D(+), Low Ca), 1.2% Ca, 0.1% P(D(+), Low P)食で2ないし3週間飼育した。mRNAの発現はNorthern blot法で調べた。

mRNAの局在を検討した。その結果、 1α -水酸化酵素の発現亢進モデルである、ビタミンD含有低カルシウムならびにビタミンD欠乏低カルシウム食飼育ラットの近位曲尿細管で、 1α -水酸化酵素のmRNAの発現亢進が確認された(図4)。一方、24-水酸化酵素は 1α -水酸化酵素と発現が逆相関して変化することが示された。

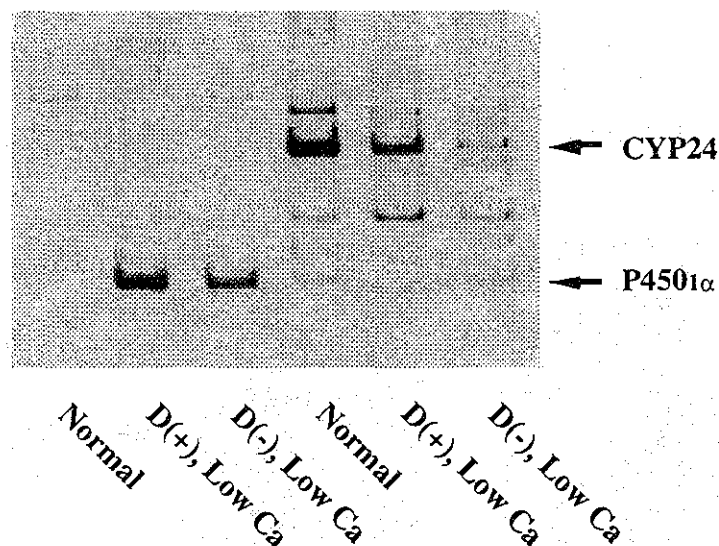


図4. ラット腎臓における $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素ならびに24-水酸化酵素mRNAの発現に対する低カルシウム食飼育の効果。

3週齢のラットをビタミンD欠乏あるいはビタミンDを含む低カルシウム飼料(0.03%Ca, 0.6%P)で2週間飼育した。Normal: ビタミンDを含む1.2%Ca, 0.6%P飼料で、D(+), Low Ca: ビタミンDを含む0.03%Ca, 0.6%P飼料で、D(-), Low Ca: ビタミンDを欠乏させた0.03%Ca, 0.6%P飼料でそれぞれ飼育した。CYP24: $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -24-水酸化酵素、p4501 α : $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -水酸化酵素。左の3レーンはP4501 α に、右の3レーンはCYP24に対するプライマーを用いてRT-PCRを行った。

V. 1α -水酸化酵素の発現促進機構の解析

1α -水酸化酵素は血清カルシウムが低下し、PTHの分泌が促進された状況で発現が促進される。そこで、PTHがどのようにして 1α -水酸化酵素の発現を促進するのか、分子レベルで調べることにした。我々は、ラットの 1α -水酸化酵素cDNAを用いてマウスのゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、5'-上流1.7kbpをクローニングした。この1.7kbpをルシフェラーゼレポーター遺伝子に繋いで、LLC-PK1細胞にPTH受容体を強制発現させた細胞(AOK-B50)に移入してPTHによる転写活性を調べた。その結果、PTHは容量依存的に 1α -水酸化酵素遺伝子の転写を促進させることが明らかとなった(図5)。また、本細胞をアデニレートシクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンで処理した場合にもPTHと同様に 1α -水酸化酵素の転写が促進されたことから、PTHはcAMPをセカンドメッセンジャーとして 1α -水酸化酵素の転写を促進していることが明らかになった。1.7kbpの上流領域には典型的なCREが3カ所に存在することから、細胞内で合成されたcAMPがCREを介して転写を促進していると考えられる。しかし、3個のCREが 1α -水酸化酵素の転写に必須であるのか、どのCREが 1α -水酸

化酵素遺伝子の発現に最も重要な役割を果たしているのか等は、今後の研究の進展を待たなければならない。

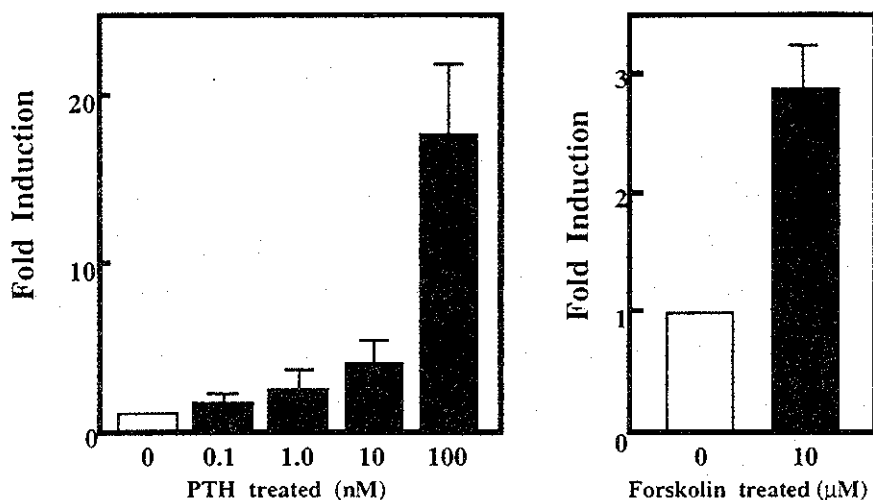


図5. 25(OH)D₃-1α-水酸化酵素遺伝子の転写活性に対する副甲状腺ホルモンの効果。

25(OH)D₃-1α-水酸化酵素遺伝子の転写開始点上流1.7kbをルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、PTH受容体を強制発現させた腎臓の近位尿細管細胞AOK-B50に移入して転写活性を調べた。右図はアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリンを処理して同様に調べた。

VI. ビタミンD依存性クル病I型の疾患原因

ビタミンD依存性クル病I型は、腎臓における活性型ビタミンDの合成過程に異常があることによって発症するクル病で、ビタミンDの投与では治癒しないが生理量の活性型ビタミンDの投与によって容易にクル病症状が改善することが知られている。このことから、本疾患は1α-水酸化酵素の遺伝子発現あるいは蛋白質への翻訳の過程に何らかの障害があると考えられていた。ヒト1α-水酸化酵素は全長6kbに亙る9個のエクソンによってコードされ、508個のアミノ酸からなるP450遺伝子であり、本遺伝子のクローニングはI型クル病の発症機序を分子レベルで明らかにすることを可能にした。また、ヒト1α-水酸化酵素のcDNAを用いて1α-水酸化酵素の発現を調べたところ、腎臓以外にも肺、脳、精巣ならびに皮膚のケラチノサイトで発現していることが判明している。我々は、ビタミンD依存性クル病I型の患者の末梢血を用いて1α-水酸化酵素の遺伝子に異常があるか否かを調べた。その結果、本酵素遺伝子の翻訳領域(エキソン2)に1塩基の脱落があり、その結果フレームシフトが起こり蛋白質への翻訳の過程で途中でストップコドンが生じるため、活性を有する完全な蛋白質が出来ない障害、あるいはエキソン8に7塩基の挿入が起こり活性に必要なフェレドキシン結合、ならびにヘム結合部位以前で蛋白質への翻訳が停止してしまうことが原因でクル病が発症する変異の存在することが明らかになった。また、本疾患が1α-水酸化酵素遺伝子の翻訳領域にフレームシフトを起こし、1α, 25(OH)₂D₃の合成障害が起こったことが原因でクル病が発症していたことは、1α, 25(OH)₂D₃の投与によって容易に治癒する臨床成績からも支持される。さらに、1α-水酸化酵素遺伝子の局在は他の遺伝子との

関連性で調べた結果から、第12染色体に位置することが予想されていたが、 1α -水酸化酵素の遺伝子がクローニングされたことにより、fluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いて詳細な検討がなされ、第12染色体の長腕(12q13.1-q13.3)に局在することも証明された。

おわりに

25(OH) D_3 - 1α -水酸化酵素遺伝子のクローニングと発現調節について概説したが、ビタミンDの代謝酵素が全てクローニングされたことにより、代謝調節機構の全容が分子レベルで明らかにされる日も近いと予想される。 1α -水酸化酵素遺伝子のクローニングの成功は、ビタミンD依存性クル病の発症機序を明快に説明したに留まらず、腎外性 1α -水酸化酵素が腎臓の酵素と同一であることも明らかにした。また、本遺伝子上流解析によってPTHによる 1α -水酸化酵素の遺伝子発現は、cAMPの合成促進の結果、CREを介して転写が起こる機序を説明した。更に、 1α -水酸化酵素と24-水酸化酵素は同一のネフロンに局在するにも拘わらず、両酵素が同時に発現することは確認されない。この原因も、 1α -水酸化酵素が発現している腎臓では24-水酸化酵素の発現に必須の因子であるVDRが消失していることから、説明できる段階になったと考えられる。特に今後は、 1α -水酸化酵素が発現している腎臓の近位尿細管でVDRが特異的に発現の抑制が起こる機序と、 1α -水酸化酵素の遺伝子発現との関連性が明らかとなることを期待する。

参考文献

1. Gao Y-H, Shinki T, Suda T, et al: Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). **Biochem Biophys Res Commun**, 252: 697-702, 1998.
2. Iwasaki H, Hosotani R, Suda T, et al: Stereoselective synthesis and structural establishment of a major metabolite of 24, 24-difluoro- 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3 , (25S)-24, 24-difluoro- 1α , 25, 26-trihydroxyvitamin D_3 . **Tetrahedron**, 55: 14705-14724, 1998.
3. Yoshida T, Monkawa T, Suda T, et al: Two novel 1α -hydroxylase mutations in French-Canadians with vitamin D dependency rickets type I. **Kidney International**, 54: 1437-1443, 1998.
4. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Suda T, et al: Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D_3 - 1α -hydroxylase gene promoter. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95: 1387-1391, 1998.
5. Shinki T, Shimada H, Suda T, et al: Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D_3 - 1α -hydroxylase cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 12920-12925, 1997.
6. Monkawa T, Yoshida T, Suda T, et al: Molecular cloning of cDNA and genomic DNA for human 25-hydroxyvitamin D_3 1α -hydroxylase. **Biochem Biophys Res Commun**, 239: 527-533, 1997.