総 説 (学会賞受賞)

マウスのビタミン D-24-水酸化酵素遺伝子のクローニングと *in vivo* での発現調節について

明 野 な が こ

奥羽大学歯学部口腔生化学講座

Cloning of Mouse 24-hydroxylase cDNA and Regulation of Vitamin D Metabolism *in vivo*

Nagako Akeno

Department of Biochemistry, Ohu University School of Dentistry,
31-1 Misumido, Tomita-machi, Koriyama, Fukushima 963-8611, Japan

はじめに

1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ [1, 25(OH)₂D₃] は十二指腸でカルシウムとリン酸の吸収を高め、骨組織からの骨塩の動員を促進するカルシウム調節ホルモンである。このため、1, 25(OH)₂D₃ の合成と分解はカルシウム代謝調節において大変重要である。ビタミン D 代謝は、プロビタミン D₃ が皮膚で紫外線照射によりビタミン D₃ に変換され、肝臓に運ばれ 25 位の炭素が水酸化されて 25-hydroxyvitamin D₃ [25OHD₃] に代謝される。25OHD₃ は次に腎に運ばれて、さらに水酸化をうける。血漿カルシウム濃度が低下している場合には 1 α -水酸化酵素により 1, 25(OH)₂D₃ が生成され、十二指腸や骨を標的組織としてカルシウム代謝調節作用を発揮する。そして、作用を発現した後、腎の近位尿細管ミトコンドリアに主として局在するビタミン D-24-水酸化酵素により 1 α , 24, 25-trihydroxyvitamin D₃ [1, 24, 25(OH)₃D₃] に代謝される。一方、血漿カルシウム濃度が正常あるいは上昇している場合には、過剰の 25OHD₃ や 1, 25(OH)₂D₃ は生理活性の低い 24, 25-dihydroxyvitamin D₃ [24, 25(OH)₂D₃] や 1, 24, 25(OH)₃D₃ に代謝される。24, 25(OH)₂D₃ の一部は 1, 24, 25(OH)₃D₃ に代謝され、大部分は側鎖が切断され分解されていく (図 1)¹⁾。この代謝は厳格に血液中のイオンやホルモンによって調節されている。そのなかでも parathyroid hormone (PTH)

は主要な調節因子であり、1 α -水酸化酵素活性を促進し²⁾、24-水酸化酵素活性を抑制する³⁾。

本稿では、骨代謝およびそれを調節するホルモンである 1, 25(OH)₂D₃ の分解機構に深く関与しているビタミン D-24-水酸化酵素の発現調節について詳細な検討を行った。

マウスの 24-水酸化酵素遺伝子

ラットでは血液や組織に 24-水酸化酵素の阻害因子が存在するため⁴⁾、十二指腸を含めた腸管における 24-水酸化酵素活性の測定がきわめて困難である。これに対し、マウスでは腎および腸管での 24-水酸化酵素活性の測定が比較的容易に行え、生体内での遺伝子発現と酵素活性の関係を検討するにはマウスの方が有利であると考えられる。

そこで、マウスを用いて 24-水酸化酵素 cDNA のクローニングを行い、生体内での本酵素の遺伝子発現を検討した。

1. マウスの 24-水酸化酵素 cDNA のクローニング

1, 25(OH)₂D₃ を投与したマウスの腎から cDNA ライブラリーを作製し 24-水酸化酵素を完全にコードするクローンの単離を試みた。さらに、得られたクローンの 5' 末端を 5'-RACE 法により解析を行い、図 2 に示す cDNA 断片を得た。5' 非コード領域は 364 bp、コード領

図 1 ビタミン D の合成と分解過程。

25-OHase, 25-水酸化酵素:1 α -OHase, 1 α -水酸化酵素:24-OHase, 24-水酸化酵素。

[illegible]

図 2 24-水酸化酵素遺伝子の全塩基配列と推定されるアミノ酸配列。

5'-RACE 法により判明した配列を下線で、シグナルペプチドの切断箇所を矢印で、ヘム結合領域を太線で、ヘム結合領域中のシステイン残基を四角で、ポリアデニレートシグナルを二重下線で、ATTTA 配列を波線で示した。(Endocrinology 1997 年 6 月号より転載)

域は1,545 bp (514 アミノ酸：59.5 kDa)，そして、3'非コード領域は1,386 bpであった。推測される開始コドンにはKozack 配列が確認され⁵⁾、N 末端には35 アミノ酸よりなるミトコンドリアのシグナル配列も確認された⁶⁾。太線で示した配列はP 450 ファミリーに特徴的な配列であるヘム結合領域であり、システイン残基が含まれていた。21 アミノ酸からなるヘム結合領域の相同性は、ヒトとマウスは全く同じであり⁷⁾、ラットとは1 アミノ酸違いであった。この領域は種間で大変よく保存されているといえる。3'末端には2つのポリアデニレートシグナル配列(AAUAAA)があり、14 bpのポリA 尾部が結合していた。波線はmRNAの安定性を低下させるAUUUA 配列を示し、5カ所存在した。塩基配列の相同性はラットとは83%⁸⁾、ヒトとは65%⁷⁾であり、アミノ酸レベルではそれぞれ95%、82%の相同性が確認された。

2. 生体内における24-水酸化酵素遺伝子の発現

1,25(OH)₂D₃ を投与したマウスにおける24-水酸化酵素の転写産物は、腎と十二指腸に最も多く存在していた(図3A)。腎と十二指腸はともに1,25(OH)₂D₃の古典的標的組織であり、25OHD₃と1,25(OH)₂D₃の異化代謝に関与している⁹⁾。十二指腸以外にも、空腸、回腸、および結腸で24-水酸化酵素の遺伝子発現が高く、腸管全体で本酵素遺伝子が強く誘導されることが明らかとなった。過剰の1,25(OH)₂D₃に応答して空腸および回腸でも24-水酸化酵素の遺伝子発現が上昇したと推測される。結腸は水分吸収を行う臓器であるが、おそらく過剰の1,25(OH)₂D₃を分解するために24-水酸化酵素のmRNA発現が上昇したと思われる。大腸における24-水酸化酵素誘導の*in vitro*の実験結果として、ヒト大腸癌細胞において1,25(OH)₂D₃は24-水酸化酵素mRNAを細胞増殖時に増加させたという報告がある¹⁰⁾。一方、骨は1,25(OH)₂D₃の古典的標的組織であり、1,25(OH)₂D₃は新生骨の形成に緊密に関与しているだけでなく、骨吸収の強力な誘導因子でもある^{11,12)}。しかし、この組織では少量の24-水酸化酵素mRNAしか発現しておらず(図3A)、*in vivo*においてはビタミンD異化代謝の有力な組織ではないと考えられる。ところで、1,25(OH)₂D₃はラットの骨芽細胞において著しく24-水酸化酵素mRNA量を増加させるが、これは細胞増殖時にのみに現れ、分化段階ではみられない¹³⁾。成長したマウスの骨ではほとんどの骨芽細胞は分化した状態にあり、そのため、1,25(OH)₂D₃による24-水酸化酵素mRNAの上昇が起こらなかった可能性が考えられる。

24-水酸化酵素遺伝子上流にはビタミンD 応答配列

(VDRE)が存在し、遺伝子発現における1,25(OH)₂D₃の促進効果はビタミンD受容体(VDR)によって引き起こされる^{7,8,14,15)}。VDRはほとんどの細胞に存在する。そのため、1,25(OH)₂D₃を処理した動物の24-水酸化酵素mRNA量は組織中のVDRの濃度に依存していると考えられる。ヒト表皮ケラチン細胞および皮膚にはVDRが存在することから¹⁶⁾、ノーザンブロットにより皮膚でmRNAが確認されたことは、VDRの発現の高さに起因すると考えられる。皮膚の次に24-水酸化酵素mRNA量が高かったのは、胸腺であった(図3A)。胸腺は1,25(OH)₂D₃の古典的標的組織ではないが、VDRがかなり発現しているため¹⁷⁾、24-水酸化酵素mRNAが確認されたと思われる。RT-PCR/サザンブロット解析により、肺、脾臓、および睾丸といった組織でも少量の24-水酸化酵素mRNAが検出された(図3B)。これらの組織

図3 24-水酸化酵素の種々の組織における遺伝子発現。

A：マウスに1,25(OH)₂D₃ (24 pmol/g, i. p.)を投与し、4時間後に屠殺した。種々の組織を摘出し、mRNAを精製した後、ノーザンブロットにより解析した。オートラジオグラフィは2日間 (short exposure) または、2週間 (long exposure)行った。B：RT-PCR/サザンブロットによる解析結果を示した。増幅された24-水酸化酵素遺伝子と β -actin 遺伝子の大きさは、それぞれ495 bp および490 bpである。(Endocrinology 1997年6月号より転載)

も同様に古典的なビタミン D の標的組織とは考えられていないが、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与により 24-水酸化酵素遺伝子発現が確認されたことは、生理作用を発現した $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が 24-水酸化酵素により分解されることを示唆している。最近の報告では肺のサルコイドーシスになった患者の肺胞マクロファージが $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を産生すること¹⁸⁾、VDR が妊娠後期のラット胎児の肺や新生児の肺に存在することが示され¹⁹⁾、肺において $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ がカルシウム調節とは異なった何らかの役割を演じていることが推測される。脾臓は肺や睾丸と同様にビタミン D の古典的標的組織ではないが、インシュリン分泌の促進やグルコース耐性の回復が VDR を介して引き起こされることから²⁰⁾、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は脾臓において生物学的効果をもつといえる。以上の結果から、24-水酸化酵素は、腸管、骨および腎のような古典的なビタミン D の標的組織と同様に、非古典的な標的組織においても、ホルモンとしての作用を終えた $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を代謝すると考えられる。

1. $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による 24-水酸化酵素の発現調節

1. 腎と十二指腸における 24-水酸化酵素の発現

$1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与後 4 時間で Dose-response 実験を行った。mRNA 量は 1.2 pmol/g bw で有意に上昇し、 24 pmol/g bw で最高に達した。酵素活性は、 25OHD_3 を基質とした場合は 24 pmol/g bw で最高となり、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を基質とした場合は $3.6 \sim 24 \text{ pmol/g bw}$ で最高となった。これらの結果より、mRNA と活性を最大限に誘導する濃度は 24 pmol/g bw であることが判明した。また、 $^3\text{H}-25\text{OHD}_3$ や $^3\text{H}-1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のような異なった基質でもよく似た Dose-response curve を示したことから、24-水酸化酵素は 25 位に水酸基を有するビタミン D 代謝産物を基質として、触媒反応を起こすことが示された。

図 4 のように、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は腎、十二指腸において 24-水酸化酵素の遺伝子発現を強く誘導するものであった。腎と十二指腸はともに $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の古典的標的組織であり、 25OHD_3 と $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の異化代謝に関与している。これらの組織で 24-水酸化酵素活性が上昇したことは、腎と十二指腸がビタミン D 代謝産物の分解に大切な役割を担っていることを示唆するものである。また、酵素活性の増加は、腎と十二指腸において 24-水酸化酵素 mRNA 量の増加にやや遅れて増加した (図 4 A, B)。この結果は、転写された mRNA はすぐにタンパク質に翻訳されるということを示している。しかしな

がら、投与後数十時間経過すると、腎と十二指腸の酵素活性は減少から増加に転じ第 2 のピークが出現した。おそらく使用したプローブでは検出できない別の 24-水酸化酵素遺伝子による誘導であると思われる²¹⁾。一方、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の薬理量投与 (24 pmol/g) により誘導される 24-水酸化酵素 mRNA および酵素活性の増加は、十二指腸に比べて腎で長時間持続した (図 4 A)。このことは、体内から排泄される前に、腎で大量のビタミン D 代謝産物が異化されることを示唆している^{11, 22)}。また、細胞の代謝活性を考えたとき、十二指腸の代謝活性は腎に比べより速いことが知られている。そのため、十二指腸では $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による最初の刺激に対して 24-水酸化酵素の遺伝子発現と活性が腎ほど長時間持続せず、ピークとなった後徐々に衰退してコントロールレベルに戻ったと考えられる (図 4 B)。この現象は皮膚においても観察された。

2. 24-水酸化酵素遺伝子の発現調節

タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを $400 \mu\text{g/g bw}$ で腹腔内投与し、1 時間後に $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を

図 4 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与したときの腎と十二指腸における 24-水酸化酵素の遺伝子発現と酵素活性の変動。

A: マウスに $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (24 pmol/g, i. p.) を投与し、グラフに示す各時間に屠殺した。腎を摘出し、24-水酸化酵素の mRNA (●) をノーザンブロットにより、酵素活性 (○) を ^3H ラベル基質とインキュベーションすることにより測定した。B: 十二指腸の結果を示した。(Endocrinology 1997 年 6 月号より転載)

3.6 pmol/g bw で投与した。十二指腸では、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 誘導による 24-水酸化酵素活性はシクロヘキシミド投与により完全に抑制された(図 5 A)。mRNA 量はシクロヘキシミド処理および未処理ともに経時的に上昇し、測定したすべての時間で処理群は未処理群に比べ有意に高い値を示した(図 5 B)。このようなシクロヘキシミドの効

果は腎においても同様に認められた。シクロヘキシミドの投与は、24-水酸化酵素 mRNA からの翻訳を阻害し、酵素活性を抑制するだけでなく、酵素複合体を構成するフェレドキシンおよびフェレドキシンリダクターゼのタンパク質量も低下させ、24-水酸化酵素活性をブロックしていると考えられる。しかし、24-水酸化酵素 mRNA

図 5 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により誘導される 24-水酸化酵素の遺伝子発現と酵素活性におけるシクロヘキシミドの効果。

A: マウスにシクロヘキシミド (●) あるいは溶媒 (○) を投与し、1 時間後に $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与した。0, 2, 4 時間後に屠殺し、十二指腸の 24-水酸化酵素 mRNA の変動をノーザンブロットにより測定した。B: 十二指腸の 24-水酸化酵素活性を ^3H ラベル基質とインキュベーションすることにより測定した。****t 検定でシクロヘキシミド未処理 (Vehicle) と有意差あり (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。 (Endocrinology 1997 年 6 月号より転載)

図 6 24-水酸化酵素発現における転写および転写後の調節。

の転写については、抑制するというよりはむしろ 1, 25(OH)₂D₃ の誘導効果をさらに増強させるものであった(図 5 B)。このことは、24-水酸化酵素遺伝子の転写促進には *do novo* のタンパク質合成は必要でなく、短時間に発現してくるリプレッサータンパク質の存在を示唆するものである(図 6)。ストロメラニンや副甲状腺ホルモン関連ペプチドの遺伝子発現においても、短時間に発現してくるリプレッサータンパク質の存在が示唆されている^{23,24)}。

また、マウス 24-水酸化酵素 mRNA の 3'非コード領域には 5 個の AUUUA が含まれていた(図 2)。この配列は mRNA の代謝活性の決定における重要な因子である²⁵⁾。アドレナリン β_2 受容体 mRNA の 3'非コード領域にも AUUUA 配列があり²⁶⁾、アドレナリン β_2 受容体のアゴニストであるイソプロテレノールは DDT1-MF2 ハムスターの平滑筋細胞で AUF1 mRNA 量とタンパク質量を上昇させ、アドレナリン β_2 受容体 mRNA の分解促進に関与する結果となった。24-水酸化酵素遺伝子発現におけるシクロヘキシミド処理は、未処理群に比べて mRNA 量を上昇させた。このことは、シクロヘキシミドにより mRNA の分解に関与している AUF1 の合成が抑制され、結果として 24-水酸化酵素 mRNA の顕著な増加を引き起こしたと思われる。また、標的細胞においてシクロヘキシミド投与によりタンパク質への翻訳を抑制すると mRNA が蓄積されたことは、翻訳後の mRNA は速やかに分解されることを示唆するものである(図 6)。24-水酸化酵素 mRNA の蓄積におけるシクロヘキシミドの効果は、十二指腸、皮膚、および腎で異なっており、その違いはおそらくおのおのの組織において mRNA の分解にかかわる調節タンパク質の濃度の差異によるためと考えられる。したがって、転写後の調節も 24-水酸化酵素の活性発現にとって重要であると思われる。

おわりに

本稿ではビタミン D-24 水酸化酵素に焦点を当て、活性型ビタミン D の分解機構について述べてきた。本研究により、ビタミン D 中毒症や高カルシウム血症予防の道が開かれることが期待される。さらに今後、腎の 1 α -水酸化酵素の発現調節を解明し、活性型ビタミン D の合成過程を明らかにすることにより、骨代謝およびそれを調節するホルモンの合成と分解機構のさらなる解明につながると考えられる。

稿を終えるにあたり、終始ご指導を賜りました奥羽大学歯学部口腔生化学講座堀内 登教授に深甚の謝意を表します。そして、さまざまな形で協力下さいました口腔生化学講座の皆様にも厚く感謝いたします。

文 献

- 1) John, S.A. : Regulation and action of vitamin D. (edited by Fl Cae, MJ Farus, CYC Pak, JH Parks and GM Preminger) pp. 145—173, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
- 2) Horiuchi, N., Suda, T., Takahashi, H., Shimazama, E. and Ogata, E. : In vivo evidence for the intermediary role of 3', 5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in rats. *Endocrinology* **101** : 969—974, 1977.
- 3) Armbricht, H. J. and Boltz, M. A. : Expression of 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase cytochrome P 450 in kidney and intestine. Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D and age. *FEBS Lett.* **292** : 17—20, 1991.
- 4) Botham, K. M., Ghazarian, J. G., Kream, B. E. and DeLuca, H. F. : Isolation of an inhibitor of 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase from rat serum. *Biochemistry* **15** : 2130—2135, 1976.
- 5) Kozak, M. : Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266** : 19867—19870, 1991.
- 6) Douglas, M. G., McCammon, M. T. and Vassarotti, A. : Targeting proteins into mitochondria. *Microbiol. Rev.* **50** : 166—178, 1986.
- 7) Chen, K.-S., Prahl, J.M. and DeLuca, H. F. : Isolation and expression of human 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 4543—4547, 1993.
- 8) Ohyama, Y., Noshiro, M. and Okuda, K. : Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase. *FEBS Lett.* **278** : 195—198, 1991.
- 9) Roy, S., Martel, J., Ma, S. and Tenenhouse, H. S. : Increased renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in phosphate-deprived Hyp mice : a mechanism for accelerated 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ catabolism in X-linked hypophosphatemic rickets. *Endocrinology* **134** : 1761—1767, 1994.
- 10) Zhao, X. I. and Feldman, D. : Regulation of vitamin D receptor abundance and responsiveness during

- differentiation of HT-29 human colon cancer cells. *Endocrinology* **132** : 1808—1814, 1993.
- 11) DeLuca, H. F. : The vitamin D story : a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* **2** : 224—236, 1988.
 - 12) Reichel, H., Koeffler, H. P. and Norman, A. W. : The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* **320** : 980—991, 1989.
 - 13) Nishimura, A., Shinki, T., Jin, C. H., Ohyama, Y., Noshiro, M., Okuda, K. and Suda, T. : Regulation of messenger ribonucleic acid expression of 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase in rat osteoblasts. *Endocrinology* **134** : 1794—1799, 1994.
 - 14) Christakos, S., Raval-Pandya, M., Wernyj, R. P. and Yang, W. : Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem. J.* **316** : 361—371, 1996.
 - 15) Zierold, C., Darwish, H. M. and DeLuca, H. F. : Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 900—902, 1994.
 - 16) Pillai, S., Bikle, D. D. and Elias, P. M. : 1, 25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *J. Biol. Chem.* **263** : 5390—5395, 1988.
 - 17) Maniatis, T., Hardison, R. C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G. K. and Efstratiadis, A. : The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* **15** : 687—701, 1978.
 - 18) Reichel, H., Koeffler, H. P., Barbers, R. and Norman, A. W. : Regulation of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ production by cultured alveolar macrophages from normal human donors and from patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65** : 1201—1209, 1987.
 - 19) Nguyen, T. M., Guillozo, H., Marin, L., Dufour, M. E., Tordet, C., Pike, J. W. and Garabedian, M. : 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in rat lung during the perinatal period : regulation and immunohistochemical localization. *Endocrinology* **127** : 1755—1762, 1990.
 - 20) Cade, C. and Norman, A. W. : Rapid normalization/stimulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin secretion and glucose tolerance in the vitamin D-deficient rat. *Endocrinology* **120** : 1490—1497, 1987.
 - 21) Mandla, S., Boneh, A. and Tenenhouse, H. S. : Evidence for protein kinase C involvement in the regulation of renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. *Endocrinology* **127** : 2639—2647, 1990.
 - 22) Kumar, R. : Metabolism of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. *Physiol. Rev.* **64** : 478—504, 1984.
 - 23) Ikeda, K., Lu, C., Weir, E. C., Mangin, M. and Broadus, A. E. : Regulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by cycloheximide. *J. Biol. Chem.* **265** : 5398—5402, 1990.
 - 24) Otani, Y., Quinones, S., Saus, J., Kurkinen, M. and Harris, Jr. E. D. : Cycloheximide induces stromelysin mRNA in cultured human fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* **192** : 75—79, 1990.
 - 25) Shaw, G. and Kamen, R. : A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46** : 659—667, 1986.
 - 26) Pende, A., Tremmel, K. D., DeMaria, C. T., Blaxall, B. C., Minobe, W. A., Sherman, J. A., Bisognano, J. D., Bristow, M. R., Brewer, G. and Port, J. D. : Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the β -adrenergic receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **271** : 8493—8501, 1996.