

研究課題 (テーマ)		ビタミン D の可視化技術を利用した新規作用機序の解明	
研究者	所属学科等	職	氏名
代表者	医薬品工学科	准教授	安田佳織
分担者	医薬品工学科	特別研究教授	榊利之
研究結果の概要			
<p>ビタミン D は骨形成や免疫機能に加え、アルツハイマー病などの脳神経変性疾患とも深く関与する重要な栄養素である。その作用機序には、代謝酵素で生成された活性型ビタミン D がビタミン D 受容体 (VDR) に結合する古典的な機序の他にも、複数存在し、各種疾患に対する機序が未解明な部分が多い。我々は、複数のビタミン D 関連遺伝子改変ラットを作成し、個体レベルでのマクロな視点から、各組織に対する作用点を捉えることに成功している。今後、より詳細な作用機序解明を行う上で、ビタミン D が「どこで」「いつ」「どのように」作用するのか、よりミクロな視点で解析が重要である。細胞や組織内における活性型ビタミン D 類の空間的・時間的分布を高感度・リアルタイムで捉える技術は皆無であることから、本研究で、活性型ビタミン D を高感度で可視化する新規技術開発を目指した。</p> <p>今回、近接した 2 つの色素分子間で励起エネルギーが電子共鳴により直接移動する FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 現象を利用した新規バイオセンサーの作製を試みた。具体的には、オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (AcGFP) とクサビライシ由来橙色蛍光タンパク質 (Kusabira Orange2) を利用し、供与体 (AcGFP) に吸収された光エネルギーが活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>) 存在下でのみ受容体 (Kusabira Orange2) に移動することで蛍光を示すバイオセンサーである。VDR のリガンド結合領域 (LBD) および LXXLL 配列の両端に AcGFP 遺伝子および Kusabira Orange2 遺伝子をそれぞれ連結させたキメラタンパク質発現プラスミドを構築し、ヒト胎児腎細胞 (HEK293T) にトランスフェクションした。発現ベクターを細胞内に導入後、1,25D<sub>3</sub> を添加して 10 分後に固定化した細胞を観察したところ、100 nM 1,25D<sub>3</sub> の存在下、緑色の蛍光が移動することでオレンジ色の蛍光が観察された。1,25D<sub>3</sub> の結合により生じる LBD の構造変化が AcGFP と Kusabira Orange2 の距離を近づけ、FRET 現象が起こったと考えられる。</p>			
今後の展開			
<p>今回 100 nM 存在下の 1,25D<sub>3</sub> が検出可能になった。生体内の 1,25D<sub>3</sub> 濃度を考慮すると、より低濃度で検出できるように改良していく必要がある。検出感度、定量性、pH 感受性などの課題点を解決していくことで、組織や細胞内の 1,25D<sub>3</sub> の時間的・空間的分布を明らかにし、ビタミン D の詳細な作用機序解明、さらには、各種疾患に適したビタミン D 製剤へとつなげていきたい。</p>			