

総 説

成人型乳糖不耐症とラクターゼ遺伝子の転写調節

佐久間 慶 子*

Adult-type Hypolactasia and Regulation of Lactase Gene Expression

Keiko SAKUMA*

はじめに

ヒトを含む哺乳動物は、生まれてから離乳期まで乳によってすべての栄養を供給される。その中で乳糖は主要な炭水化物源であり、図1に示す小腸絨毛の刷子縁膜に存在する乳糖加水分解酵素のラクターゼ（LPH, 正確にはラクターゼ-フロリジン加水分解酵素）によってグルコースとガラクトースに分解され吸収される。ヒトを含むすべての哺乳動物において、離乳期以降ラクターゼ活性および遺伝子発現は低下するが、奇妙なことにヒトだけは離乳期以降も一生を通して乳を理想的な栄養源としてとり続ける。哺乳動物の本来の在り方と異なったこの食習慣を成り立たせるためには、ラクターゼの遺伝子発現が続き酵素が活性であり続けることが必要である。し

かし、ヒトには離乳期後、突然変異によりこの酵素活性を維持できるようになった型と哺乳類本来の出来ない2つの型が世界中に分布している¹⁾。出来ない成人型乳糖不耐症（MIM-#223100）では3歳頃から活性は次第に低下し、大人になると1/3～1/20になる。遺伝性欠損症（CLD, MIM-#223100）や消化器疾患、感染によるものと区別する意味で成人型と表わされ、常染色体劣性遺伝する²⁾。

人類と密接な関わりを持ち続けてきたラクターゼであるが、不耐症は深刻な病気ではないことで研究の競争は緩やかであったと思われる。しかし、ヒトを含む哺乳類の発生分化において、離乳期に起こる負の遺伝子発現調節の機構、遺伝子型と表現型の関係、遺伝性欠損症の治療、および牛乳が良質なカルシウム源であり、さらにカルシウム吸収促進効果がある³⁾ ことなどにより栄養学の視点からも、ラクターゼ発現調節の解明は重要で興味ある課題である。長い研究の歴史と、特に最新の遺伝子レベルの研究による成果を総説としてまとめてみたい。

成人型乳糖不耐症とは

成人型乳糖不耐症の人では、乳糖は加水分解されずに大腸に達し、そこで腸内細菌による発酵を受け、ガスや有機酸の発生、それによる浸透圧のアンバランスにより下痢や腹痛などの腹部異常を生ずる。不耐症の診断は小腸から生体組織採取された組織のラクターゼ活性を測定し、他の二糖類加水分解酵素、主にスクラーゼとの活性の比（L/S比）であらわす方法が最も信頼されている⁴⁾。しかし、生体組織採取のような侵襲性の方法は通常は避けなければならない。そこで間接的にはなるがラクトース摂取後の血液中のグルコース濃度の上昇や呼気中H₂ガスの濃度を測定する方法がとられている⁵⁾。厚生省（当時の）特定疾患吸収不良症候群調査研究班診断基準によると乳糖20g（牛乳約2本分）を経口投与し、血糖上昇が20mg/dl以下と定められたが、数値に関しては論

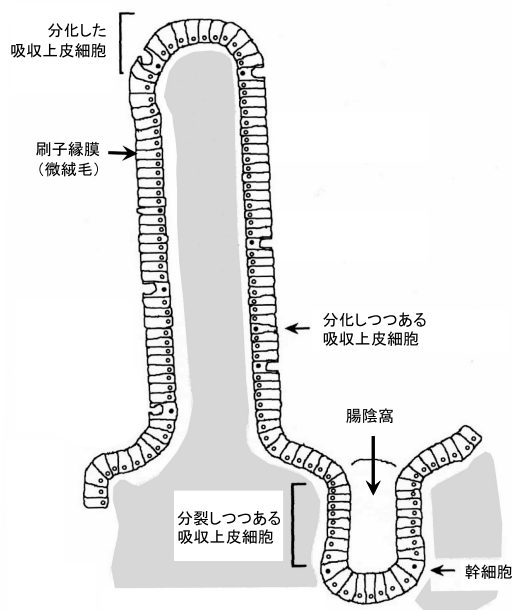


図1 絨毛の構造

* 分子栄養学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Molecular Nutrition, Kagawa Nutrition University

議もあり、他の基準も提唱されている。

成人型乳糖不耐症は哺乳類として正常な分化の結果であり、地球上で 1/2~1/3 の人がこの症状を示す。大人になっても高いラクターゼ活性を維持し、多量の牛乳を飲み続けられる突然変異は 5,000 から 10,000 年前頃に起こったと推定され、これは家畜の飼育が始まった時期とほぼ一致する。乳を成人になっても飲み続けられることは栄養的に強い利点となり生存に優位性をあたえ、変異遺伝子は選択され優性遺伝によって広がったと考えられる⁶⁾。現在、耐性の人種は北ヨーロッパの国々、北そして中央アフリカとアラビアの乾燥地帯の遊牧民にみられ、一方不耐症はオーストラリアやアメリカの原住民、太平洋岸アジア、東アジア、東南アジア、熱帯アフリカにおいて多く見られる。難民キャンプや災害時の救援に真っ先にミルクが支給されるが、民族の遺伝的特徴を正確に把握してから行う必要がある。ラクターゼ活性の低下が生ずる生後の時期についても人種による差が報告されている。

不耐症は食習慣で変わるか

ラクターゼ活性の発現に乳の摂取が関与するか否かについても長い論議があった。1960 年代に Stanford 大学の N. Kretchmer 博士らはナイジェリアに住む 4 部族について⁷⁾ (図 2)、生活形態、部族の起源や移動、部族間の結婚の状態などとラクターゼ活性との関係を調べたところ、遊牧部族のフラニ族はラクトースを消化できる耐性を持ち、農耕部族のヨルバ、イボ、ハウザ族は不耐症であった。さらに不耐症の人が耐性の人と結婚すると子孫は耐性になり、遺伝的に耐性は優性であることもわかった。フラニ族が耐性である由来は、牧畜生活で乳を多く摂取したことが原因ではなく、ラクターゼ遺伝子に突然変異を獲得し生涯乳を飲めるようになったため牧畜生活を選択する結果になり、反対にラクターゼ活性の低いヨルバ、イボ、ハウザ族は牧畜生活に適さないため海辺に近い地域に移り、農耕生活を営むようになったと推論した。不耐症であったが長いヨーロッパ生活によって乳を



図 2 ナイジェリアの人種分布⁸⁾

飲めるようになった人についても、乳によって血糖は上昇せず、ラクターゼ発現の変化ではなく腸内細菌叢の変化によって考えられている。以上の結果は、ラクターゼの活性発現が遺伝子レベルの調節に支配されていることを示唆している。

出生後に遺伝子発現が急上昇し、離乳期に急激に減少するというラクターゼ特異的パターンは遺伝子発現調節の研究対象としても興味深い。ラットは、生後 21 日頃の離乳期に母乳以外の飼料を食べ始め、ラクターゼ活性、ラクターゼタンパク質量およびラクターゼ遺伝子発現は

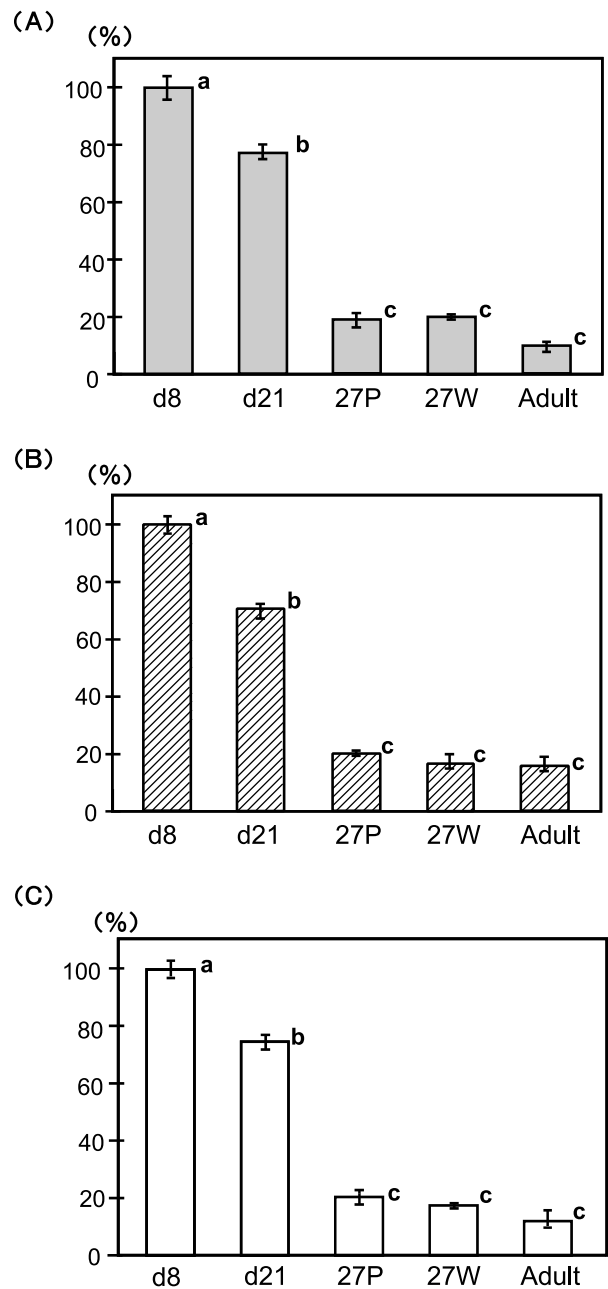


図 3 強制的離乳延長の影響⁹⁾

ラクターゼの比活性 (A)、タンパク量 (B)、mRNA 量 (C) (d8 と d21 は生後 8 日と 21 日のラット (離乳前)、27P は離乳を延ばした 27 日目のラット、27W は離乳した 27 日目のラット) 有意差がないデータは同じアルファベットで示す (a, b, c)。

急激に低下する。どこで調節が起こるかについては、離乳期に急激に多種多様のタンパク質合成が始まることによるタンパク質や mRNA の濃度の希釈によるという説や、転写、転写後、翻訳、翻訳後など⁸⁾ 多くの仮説が出されてきた。筆者らは餌の変化が調節に影響を与え得るかどうか、離乳をさせずに母乳だけの飼育を強制的に 27 日まで継続させ、ラクターゼ活性、ラクターゼタンパク質量、mRNA 量の測定を行ったところ、図 3 に示すように、ラクターゼ活性、タンパク質量、mRNA 量はいずれも対照の離乳ラットと同様の低下を示した。3 測定値の変化が相関を示すことよりラクターゼの発現調節は転写レベルで行われ、さらにその調節は発生分化の過程で強固に決定されており、食餌成分には影響されないこと結論した⁹⁾。

ラクターゼタンパク質について

ラクターゼーフロリジン加水分解酵素 (LPH) の名前が示すように、ラクトースとフロリジンを加水分解する二つの酵素活性部位 (ラクターゼ [EC.3.2.1.108] とフロリジン加水分解酵素 [EC.3.2.1.62]) は一続きのタンパク質上に存在する¹⁰⁾。はじめに、小腸粘膜細胞において 49,300 塩基対の遺伝子から 6,200 塩基の mRNA が転写され、翻訳により 1,927 アミノ酸よりなるプレープロ LPH が生合成される。これは図 4 に示すように、4 部位 (I ~ IV) より構成され、N 末端にある 19 アミノ酸のシグナルペプチドは小胞体膜通過に働き、その後小胞体内で分離される。これによって I, II, III (フロリジン加水分解酵素), IV (ラクターゼ) 部位が C 末端で小胞体膜を貫通し、細胞質内に短い末端部分を差し込んでいるプロ LPH が形成される。I, II の大きなプロ部位には酵素活性はなく、プロ LPH の立体構造の維持に関与するのではと推定されている。小胞体内でさらに N-グリコシル化、ホモダイマー化がおこる。その後、プロ LPH はゴルジ体で O-グリコシル化、高次構造形成を受け、小腸粘膜刷子縁膜に移送される前に大きなプロの部位 (I,

II) が切り離され LPH が完成する。さらなるプロセッシングは腓トリプシンが行い、活性を示す LPH は III, IV 部位よりなる分子量 135,000 の糖タンパク質となる。C 末端側を小腸粘膜刷子縁膜の吸収上皮細胞内に入れ (26 アミノ酸)、刷子縁膜を 1 回貫通して (疎水性アミノ酸 19 個)、N 末端までの 1,014 アミノ酸よりなる腸管腔に存在する部分が酵素作用を行う。完成した LPH タンパク質の III 部位はフロリジン加水分解、IV 部位はラクターゼという二つの酵素活性を示す。ラクターゼは乳糖をグルコースとガラクトースに加水分解するが、それ以外にもセロビオースやセロトリオース、セロテトロース、その他セルロースもいくらか分解する。フロリジン加水分解酵素の自然の基質は乳にも存在するグリコシルセラミドであろうと推測されている。この酵素活性はすべての脊椎動物に認められるのに対し、ラクターゼの活性は哺乳動物のみに限られているという特徴がある。

ラクターゼ遺伝子について

LPH 遺伝子は染色体上 2q21 に存在し、1988 年に mRNA より作成した cDNA の塩基配列と 1,927 のアミノ酸配列が決定された¹¹⁾。1991 年にはさらに 17 エクソンを含む 70,000 塩基対にわたる LPH の染色体遺伝子 (ゲノム上の遺伝子) の塩基配列と転写開始点の上流 1,000 塩基対の塩基配列も決定された¹²⁾。そこには数種類の転写因子認識配列 (シス因子) も同定され¹³⁾ (図 5)、ラクターゼ遺伝子の転写調節および乳糖不耐症の解明も近いように期待された。

転写因子の研究

進化的によく保存されてきた遺伝子の 5' 側 150 塩基対のプロモーター部分が調節に重要であることがわかってきた。

図 5¹²⁾ に示すように、この部分で Cdx2, HNF-1 α , GATA グループなどの転写因子と結合する。これらの転写因子はラクターゼの発現のみでなく腸上皮細胞の分

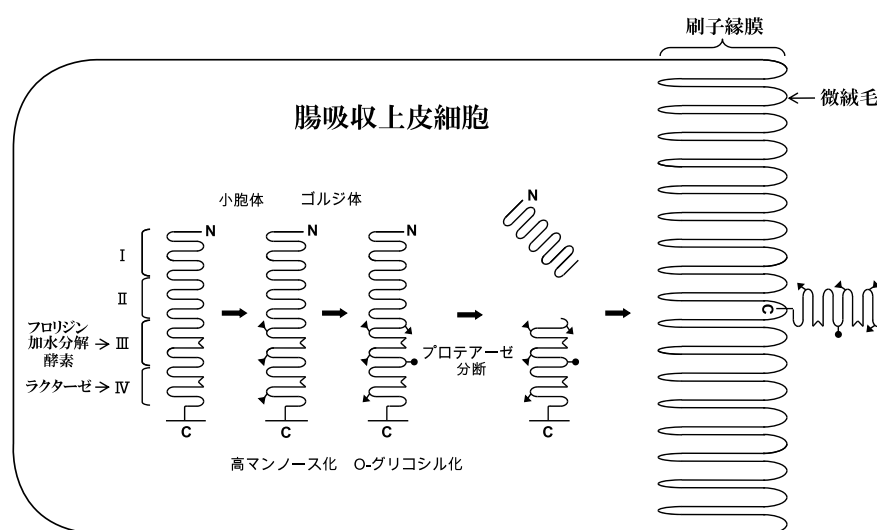


図4 LPHの生合成とプロセッシング

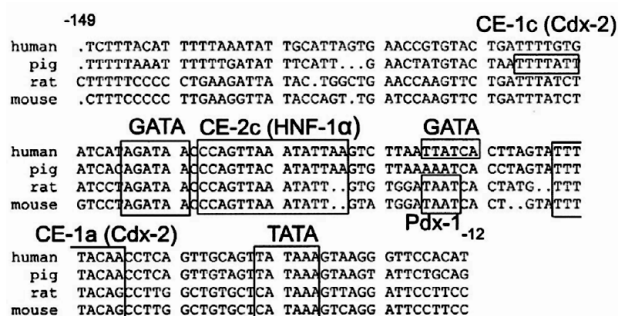


図5 LPH 遺伝子上流プロモーター部位の150塩基対の塩基配列¹²⁾

シスの因子をボックスで囲み、それに結合する転写因子を()内に示す。

化や保護にも欠くことが出来ない因子である。そして、これらのプロモーターの活性はさらに上流にあるエンハンサーやサイレンサーによって調節されている。転写因子についても、Caco-2細胞系を用いて、レポーターアッセイ法(後述)又は過剰発現実験で調べられた。

Cdx2は小腸に発現する遺伝子の転写因子である故にラクターゼの発現に大きく関与すると予想されたが、ラクターゼ発現のない大腸で最も高い発現を示し、微絨毛についてもラクターゼ発現のない腸陰窩の部分で発現が見られるなど予想に反する結果であった。HNF-1 α は小腸全域で発現し、GATA-4は小腸前部での発現が高く、回腸後部に向かって下がるパターンでラクターゼと同調しているように見えるが、ラクターゼの空腸前部と十二指腸後部の低い発現とは同調していない。培養細胞系でラクターゼ発現を抑制するPdx-1については、ラクターゼ発現の低い十二指腸と空腸前部で働くのではと期待されたが、ヒトのラクターゼ領域にPdx-1結合配列は見つからなかった。

離乳期に発現を下げる因子についても、ラクターゼのプロモーター領域において検索されたが、上がるもの、下がるもの、変化しないものとそれぞれであり、ラクターゼ発現の変化を説明できるものは残念ながら発見されていない。

ラクターゼの複雑な調節

ラクターゼの調節は非常に複雑である。それは、腸上皮幹細胞から分化して吸収上皮細胞になる細胞レベルの調節、消化管の十二指腸から空腸、回腸に至る部位特異的発現調節、出生から離乳期を経る発生分化的調節などが同時に行われているからである。さらに一つの絨毛においてさえ、吸収上皮細胞の細胞分裂と分化に同調してラクターゼの発現を変化させる。図1は小腸壁の粘膜の絨毛をあらわしているが、吸収上皮細胞は幹細胞から由来し、腸陰窩から細胞分裂と分化を進めながら絨毛のトップへ

進行する。それに伴いラクターゼの発現は次第に高められ、吸収上皮細胞は絨毛のトップに到達したところで腸管腔に脱落するという3~5日の寿命を持つ。1つの吸収上皮細胞には、約600個の微絨毛(microvillus)が密に規則正しく配列しており刷子縁(brush border)とよばれる形態に分化している。

ラクターゼ遺伝子発現調節

世界の人類を2つの型に分類する成人型乳糖不耐症と耐性を決めている要因は何であろうか。耐性か不耐症かは小腸から生体組織採取により採取した組織の酵素活性を測定し、他の二糖類加水分解酵素、主にスクロースとの活性の比(L/S)であらわす方法が最も正確とされている⁴⁾。生体組織より得られたL/S比は3つの型を示し、つまり不耐症では低く、耐性のヒトでは中間値と高値の2型を示した¹⁴⁾(図6)。耐性の2つの型とは変異ラクターゼ遺伝子のヘテロ型が中間値を、変異のホモ型が高値を示すと考えられ、成人型不耐症が常染色体劣性遺伝であることと矛盾しない。遺伝子発現の調節にはDNAの配列上の要因と(シス因子)、DNAの外からタンパク質の転写因子などが行う要因とがあるが(トランス因子)、図6の結果はシス因子の存在を示唆するものである。さらにヘテロ型耐性のヒトにおけるmRNAを調べたところ、ヘテロの遺伝子の片方からのみ転写されたものであった。つまりヘテロのもう片方はサイレンシングによって転写が抑制されていることを示す。サイレンシング機能を持つ配列がラクターゼ遺伝子の近隣領域に存在すると推察される。

このような目的の研究の常套手法として、まずラクターゼ遺伝子および周辺領域のSNP(一塩基多型)が検索され^{14, 15)}、L/S比との関連が調べられた。ヒト・ラクターゼ遺伝子の翻訳領域には不耐症と関連する変異は発見されなかったが、転写開始点の5'上流3k塩基対の調節領域において強く不耐症と関連するSNPが二カ所発見された^{16, 17)}。-13910C>Tと-22018G>Aであり、共にMCM6遺伝子(細胞周期に関する遺伝子)のイントロ

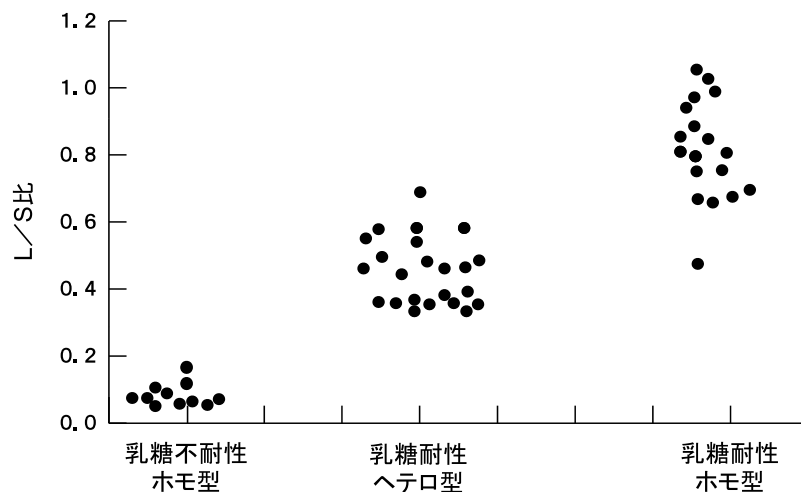


図6 耐性と不耐性のL/S比¹⁴⁾

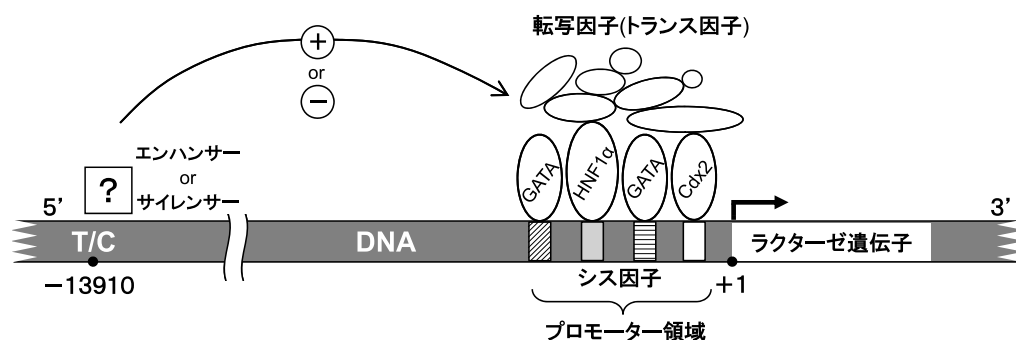


図7 ラクターゼ遺伝子の発現調節

ンに存在する (SNP の記述法: -13910C>T では転写開始点の 5' 上流 13910 番目の塩基 C が T に変異している。同様に -22018G>A では転写開始点の 5' 上流 22018 番目の塩基 G が A に変異している)。

インドの子供 176 人について行われた研究では¹⁸⁾, -13910C>T の SNP 型とラクターゼの比活性, ラクターゼの mRNA 量, タンパク質量との関係が調べられた。CC 型は 56.8% でラクターゼの比活性は 15.9U/g タンパク質で不耐症を示した。CT 型と TT 型は耐性を示し, 各型の出現割合は 40.9% と 2.3% で, 両型の比活性は 30.9 であった。ラクターゼの mRNA 量, タンパク質量も 3 つの型において同様の傾向を示した。

この二カ所の SNP がラクターゼ遺伝子の発現に作用を及ぼすのなら, 図 7 に示すようにプロモーター領域 (ラクターゼ遺伝子の 5' 上流にある領域でラクターゼ遺伝子の転写を調節する) にこの SNP の領域が働くはずである。そこで, ラクターゼのプロモーター領域を既知の遺伝子につなぎ, レポーターアッセイ法によってその働きが調べられた¹⁹⁾。つまり, ヒトのラクターゼ遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子をつないだものにさらにヒトの C-13910 又は T-13910 を含む DNA 断片をつなぎ, ヒト大腸ガン由来の培養細胞 Caco-2 細胞に導入し, レポーター遺伝子の転写を調べる方法である。レポーター遺伝子の転写が T-13910 によって上がれば, T-13910 にはプロモーターを活性化させたエンハンサー作用があるということになる。その結果, T-13910 を含む DNA を取り入れて分化した Caco-2 細胞では, T-13910 領域のエンハンサー作用は 40 倍を示した。

もう一つの SNP の -22018G>A も成人型不耐症の発症と関連し, -13910C>T よりも影響が強いという報告もあり²⁰⁾, 人種による特異性もあると思われる。しかし, 同様に培養細胞によるレポーターアッセイ法を用いて遺伝子発現に及ぼす調節を調べたが, ラクターゼ遺伝子発現に調節効果は示さなかった。

乳児期の子供は必ず耐性で, 耐性か不耐症かに関わる多型はラクターゼ遺伝子の発現に働いていない。Caco-2 細胞の結果より説明すると次のようになる。離乳時期に, 転写のレプレッサー (抑制因子) が活性化されるか又は重要な活性化因子の抑制が起こるのであろう。Caco-2

細胞において -13910 の調節の働きが T と C とで異なることは C-13910 よりも T-13910 の方に活性化因子が結合しやすく, 離乳後もラクターゼ発現の活性化が継続するのであろう。これは -13910 部位が行う直接的な作用なのか又はラクターゼ遺伝子周辺部分のクロマチンが構造変化をして転写因子を受けやすくなったことによるのかもしれない。

しかしながら, 以上の結果は Caco-2 細胞をモデル系として使う培養細胞の証明にすぎないことである。Caco-2 はヒトの大腸由来の細胞であり, ラクターゼの低い発現を示すが, 当然ながらヒトや他の動物に見られる離乳という分化過程は全くもたない。Caco-2 細胞にはないが -13910C>T に結合する別の転写因子がヒトの *in vivo* には存在するはずである。C-13910 にレプレッサーが結合して, 離乳期そしてそれ以降, ラクターゼ遺伝子発現を抑制するかもしれない。

結 論

ヒトや動物におけるラクターゼ発現の研究は消化管の部位特異性, 離乳という分化特異性等があり非常に複雑である。研究は主として実験動物と腸の培養細胞を用いて行われてきた。進化的によく保存されている遺伝子の 5' 側 150 塩基対のプロモーター部分に Cdx2, HNF-1α, GATA グループなどの転写因子が結合するが, これらのプロモーターの活性はさらに上流にあるエンハンサーやサイレンサーによって調節されている。おもしろいことに, ヒト, ラット, プタのこのエンハンサーの配列に相同性がないことである。

成人型乳糖不耐症と耐性は遺伝的に決定されており, それを決める要因はシス因子として DNA 上に存在するはずである。SNP 検索より T-13910 型が成人型乳糖不耐症および耐性を決めている分子的要因であることが分ってきた。培養細胞を用いた SNP 解析より -13910 部位はエンハンサー機能があり, その部位の多型によって調節されることが明らかになった。つまり T-13910 が培養細胞において明らかに機能し, それが *in vivo* においても乳糖不耐症の成因となっているのではないかと推定されている。しかし, T-13910 のエンハンサー機能が乳糖耐性に働いているというためには -13910 領域が特異的

に作用する転写因子を明らかにしなければならない。

ヒトのラクターゼ遺伝子調節領域に関する研究は、培養細胞系の SNP 解析つまり人工的に構成したプロモーター・レポーターを組み込んだプラスミドのトランスフェクション実験から得られたものである。培養細胞を用いた結果は、まずトランスジェニックマウス²¹⁾において実証し、さらに先にはヒトに適用できるかどうかという問題がある。ヒトには人種による特異性も報告されており、まだまだ未知の因子や新しい SNP の可能性を検索しなければならない。

文 献

- 1) Flatz G, Rotthauwe HW.: The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog Med Genet.* **2**, 205-249 (1977)
- 2) Sahi T, Isokoski M, Jussila J. *et al.*: Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet.* **2**, 823-826 (1973)
- 3) Uenishi K, Ishida H, Toba Y, Aoe S. *et al.*: Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women. *Osteoporos Int.* **18**, 385-390 (2007)
- 4) Harvey CB, Wang Y, Hughes LA, Swallow DM, Thurrell WP. *et al.*: Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut.* **36**, 28-33 (1995)
- 5) Nose O, Iida Y, Kai H, Harada T. *et al.*: Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. Prevalence of lactose malabsorption in Japanese children and adults. *Arch Dis Child.* **54**, 436-440 (1979)
- 6) Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson NT, Vanderploeg. *et al.*: Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet.* **74**, 1111-1120 (2004)
- 7) Kretchmer N, 大田次郎 訳: サイエンス, pp21-29 (1972-2012)
- 8) Buller HA, Kothe MJC, Goldman DA, Grubman SA. *et al.*: Coordinate expression of lactate-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development. *J Biol Chem.* **265**, 6978-6983 (1990)
- 9) Motohashi Y, Fukushima A, Kondo T, Sakuma K.: Lactase decline in weaning rats is regulated at the transcriptional level and not caused by termination of milk ingestion. *J Nutr.* **127**, 1737-1743 (1997)
- 10) Montgomery RK, Krasinski SD, Hirschhor JN, Grand RJ.: Lactose and Lactase-Who Is Lactose Intolerant and Why?: *J Pediatric Gastroenterology Nutr.* **45**, S131-S137 (2007)
- 11) Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H. *et al.*: Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* **7**, 2705-2713 (1998).
- 12) Boll W, Wagner P, Mantai N.: Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet.* **48**, 889-902 (1991)
- 13) Troelsen JT.: Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta.* **1723**, 19-32 (2005)
- 14) Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E. *et al.*: Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut.* **52**, 647-652 (2003)
- 15) Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, Sams VR. *et al.*: The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet.* **4**, 657-662 (1995)
- 16) Swallow DM.: Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet.* **37**, 197-219 (2003)
- 17) Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger Jd. *et al.*: Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet.* **30**, 233-237 (2002)
- 18) Kuchay RAH, Thapa BR, Mahmood A, Mahmood S.: Effect of C/T-13910 cis-acting regulatory variant on expression and activity of lactase in Indian children and its implication for early genetic screening of adult-type hypolactasia. *Clinica Chimica Acta.* **412**, 1924-1930 (2011)
- 19) Troelsen JT, Olsen J, Møller J, Sjöström H.: An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology.* **125**, 1686-1694 (2003)
- 20) Matter R, Monteiro MS, Silva Kinoshita JM, Carrilho FJ.: LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *CLINICS.* **65**, 1399-1400 (2010)
- 21) Krasinski SD, Upchurch BH, Irons SJ, June RM. *et al.*: Rat lactase-phlorizin hydrolase/human growth hormone transgene is expressed on small intestinal villi in transgenic mice. *Gastroenterology.* **113**, 844-855 (1997)