

---

**原 著 (第3回徳島医学会賞受賞論文)**

---

**ヒトビタミンD受容体 (VDR) 遺伝子の腸管特異的発現調節領域の多型と機能**新井 英一, 芳田 美智子, 山本 浩範, 森田 恭子,  
宮本 賢一, 武田 英二

徳島大学医学部病態栄養学教室 (主任: 武田英二教授)

久保田 恵, 吉田 繁子, 池田 己喜子

岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

(平成11年11月1日受付)

ヒトビタミンD受容体 (VDR) 遺伝子のプロモーター上に存在する, 腸管特異的発現に関わる cis-element; hVD-SIF 1 (5'-ATAAACTTAT-3') に遺伝子多型を見出し (Cdx-A: 5'-ATAAACTTAT-3', Cdx-G: 5'-gTAAAACTTAT-3'), それぞれの遺伝子多型の頻度, 多型による VDR 機能への影響および骨密度との関係について検討した。健康な日本人女性261人を対象とし, ダイレクトシーケンス法により頻度を解析した結果, Cdx-A型が18.4%, Cdx-G型が31.4%, hetero型が50.2%であった。それぞれの遺伝子型と骨密度との関係を閉経後の女性で検討した結果, Cdx-G型を有する群は, Cdx-A型よりも有意に骨密度が低値を示した。hVD-SIF 1配列と腸管特異的転写因子である caudal-related homeodomain transcription factor (Cdx-2)との結合能を検討した結果, Cdx-G型はCdx-A型に比して, 有意に結合能が低値を示した。また, 多型とVDRの転写活性との関係を明らかにするため, COS-7細胞にhVD-SIF 1を含むリポーターベクターおよびCdx-2発現ベクターをトランスフェクションして転写活性を調べたところ, Cdx-G型はCdx-A型に比して転写活性が約20%低下していた。今回見いだした多型は, カルシウム代謝に深く関与しているVDRの腸管における発現および骨密度に差異を生じる因子の1つであると考えられた。

骨粗鬆症の発症には, 遺伝因子と環境因子が関与すると考えられている<sup>1-3)</sup>。加齢や閉経に伴う骨密度の減少は個人差が見られることから, その発症機序の解明のために遺伝因子に関する研究が注目されている。1994年にオーストラリアのEismanらはビタミンD受容体

(VDR) 遺伝子のイントロン8に見いだされる多型は, 骨密度との高い相関を示し, 骨密度を規定する遺伝因子の一つであることを報告した<sup>4)</sup>。

VDRはリガンドである1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と複合体を形成して, 標的遺伝子の転写を調節することより, 生理作用を示す。VDRは, 腸管, 腎臓, 骨といった様々な組織に発現しているが, 中でも小腸にもっとも多く発現しており, カルシウムの吸収と小腸上皮細胞の分化に必須の因子である<sup>5)</sup>。とくに, VDR発現量がカルシウム吸収能を規定する因子と考えられており, 腸管でのVDR発現低下や機能異常は, カルシウム吸収能低下から起こる骨粗鬆症の発症に深く関連すると考えられる。これまでに我々は, VDR遺伝子の腸管特異的発現機構の解析を目的としてヒトVDR遺伝子の転写調節機能の解析を行ってきた。小腸上皮系幹細胞として性質を持つヒト大腸癌由来細胞株, Caco-2細胞を用いてVDR遺伝子プロモーター領域上で腸管特異的発現に重要な領域の検索をルシフェラーゼ法により試みた結果, 転写開始点上流-4.0kbから-3.3kbの領域がCaco-2細胞に特異的に反応することを見いだした。また, この領域にはホメオボックス遺伝子であるcaudal-related homeodomain transcription factor (Cdx-2)の結合配列と相同性の高い配列(hVD-SIF 1)が存在し, ゲルシフト法によりhVD-SIF 1にCdx-2が特異的に結合することを確認した<sup>6)</sup>。本研究では, Cdx-2結合配列上に遺伝子多型を見出し, 本多型が腸管におけるVDR発現量を規定し, さらに骨密度を予測する遺伝因子である可能性について検討した。

## 方 法

1) 対象：インフォームドコンセントが得られた岡山県在中の健常な19歳から70歳までの女性261名で、末梢血より DNA を抽出した。骨密度の測定には、腰椎(L2-L4)骨密度を、Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法により model QDR-2000 (Hologic) を使用して測定した。なお、骨疾患、卵巣摘出者、および骨代謝または骨密度に影響を与える薬物を使用している者は外した。

2) hVD-SIF1 と Cdx-2 との結合能：検討にはゲルシフト法を用いた<sup>7)</sup>。図4Bに示す種々のオリゴヌクレオチドを作成し、Maxam-Gilbert 法にて脱リン酸化し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP (160  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) により末端標識を行った。その後、poly (dI-dC), オリゴを加えて4℃にて1時間反応後、dyeを混入し6% polyacrylamide gel [size: 14cm  $\times$  14cm  $\times$  0.1cm] で20mAで2時間、冷却しながら電気泳動を行った。泳動後はゲルを乾燥させ、バイオイメージングアナライザー BAS-1500 (富士フィルム) を用いて解析した。

3) 転写活性の測定：測定はルシフェラーゼ法を利用した<sup>8)</sup>。VDR 遺伝子プロモーターの腸管特異的発現に必要な領域を含む配列を pGL-3 basic vector にサブクローニングした。次に COS-7 細胞に、pGL-3 basic vector, Cdx-2 発現ベクター (pRc/CMV-Cdx-2),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクター pCMV- $\beta$  をそれぞれ TransIT-LT 1 lipofection reagent と共に DEAE-Dextran 法によりトランスフェクションした。細胞を4時間インキュベートした後、血清の入っている DMEM に変え、48時間培養した。細胞を収集し、溶解液のルシフェラーゼ活性、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性およびタンパク濃度を測定した。

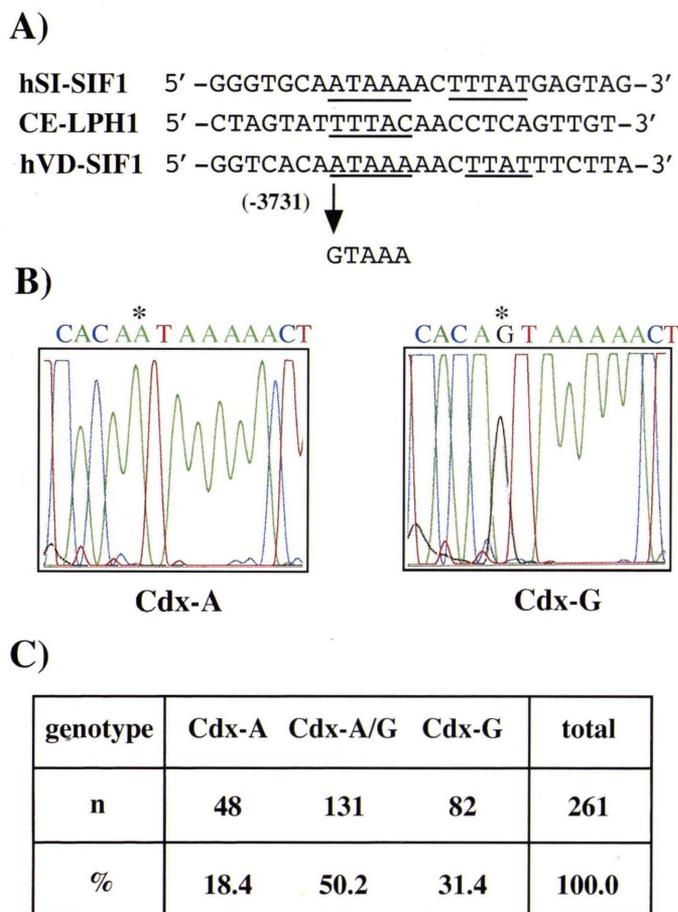
4) 有意差検定：一元配置分散分析後に、Fisher の PLSD 検定を行い、 $p < 0.05$  以下を有意とした。

## 結 果

### 1) hVD-SIF1 配列における多型と頻度

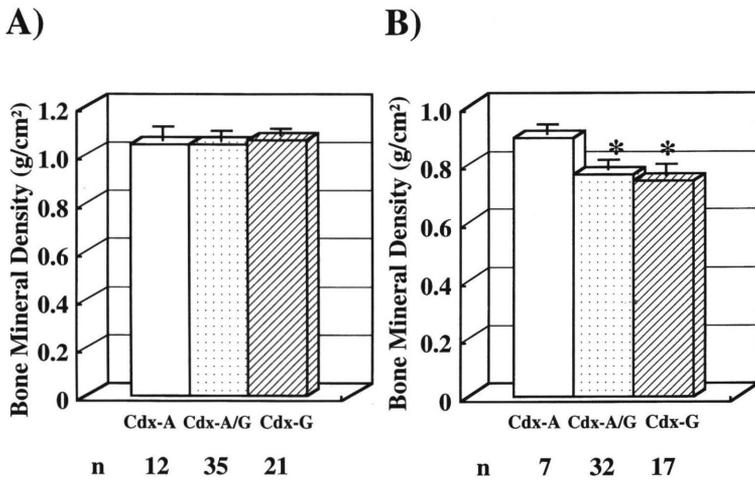
VDR 遺伝子の腸管発現機構にはその遺伝子の上流約 -3,731 から -3,720 の領域に caudal-related homeodomain protein (Cdx-2) である転写調節因子が結合し作用することを報告した。Cdx-2 結合配列 ATAAAACT (Cdx-A 型) に対して gTAAAA ACT (Cdx-G 型) と A から g に変異した多型 (hVD-SIF1 多型) を見出した (図1B)。261名の日本人女性において、本多型の頻度を検討した結果、Cdx-A 型が18.4%, Cdx-G 型が31.4%, ヘテロが50.2%であった (図1C)。

図1. hVD-SIF1 における多型の配列



A) Cdx-2により転写が制御される遺伝子の配列を示す。hSI-SIF1は human sucrose-isomaltase 遺伝子、CE-LPH1は pig lactase-phlorizin hydrolase 遺伝子を示し、下線部位に Cdx-2タンパクが結合する。B) hVD-SIF1 を含む領域を PCR により増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。転写開始点より-3731番目の塩基 A が G に変異していた。C) それぞれの遺伝子多型の頻度を示す。

図2. hVD-SIF 1 多型と腰椎骨密度 (L2-L4) との関連性



腰椎骨密度 L2 ~ L4 の平均値をグラフ化したもので、A) は閉経前の健常女性を、B) は閉経後の健常女性を対象とした。\*p<0.05

2) hVD-SIF 1 多型と骨密度との関係

閉経前の女性68名と閉経後の女性56名の女性を対象に骨密度とこの遺伝子多型との関係を検討した。閉経前の女性では各遺伝子型には有意な差は認められなかったが (図2A), 閉経後の女性においてCdx-G型はCdx-A型に比べ、骨密度が有意に低値を示した (p<0.05) (図2B)。また、それぞれの身長、体重、BMIや血中カルシウム濃度、1週間のカルシウムを含む栄養摂取は、閉経前、閉経後の女性の各遺伝子型について比較検討したが有意な差は認められなかった (表1)。

3) hVD-SIF 1 多型が及ぼす結合能への影響

Cdx-A および Cdx-G の hVD-SIF 1 と Cdx-2との結合能を、ゲルシフト法を用いて行った。核蛋白は、COS-7細胞にマウスのCdx-2発現ベクターをトランスフェクションして、Cdx-2を強制的に発現させたものを用いた。その結果、Cdx-2とhVD-SIF 1との結合能は、Cdx-G型ではCdx-A型に比べ同様な競合阻害が見られないことから、著しく結合能が低下していることが示された (図3)。

4) hVD-SIF 1 多型が及ぼす転写活性への影響

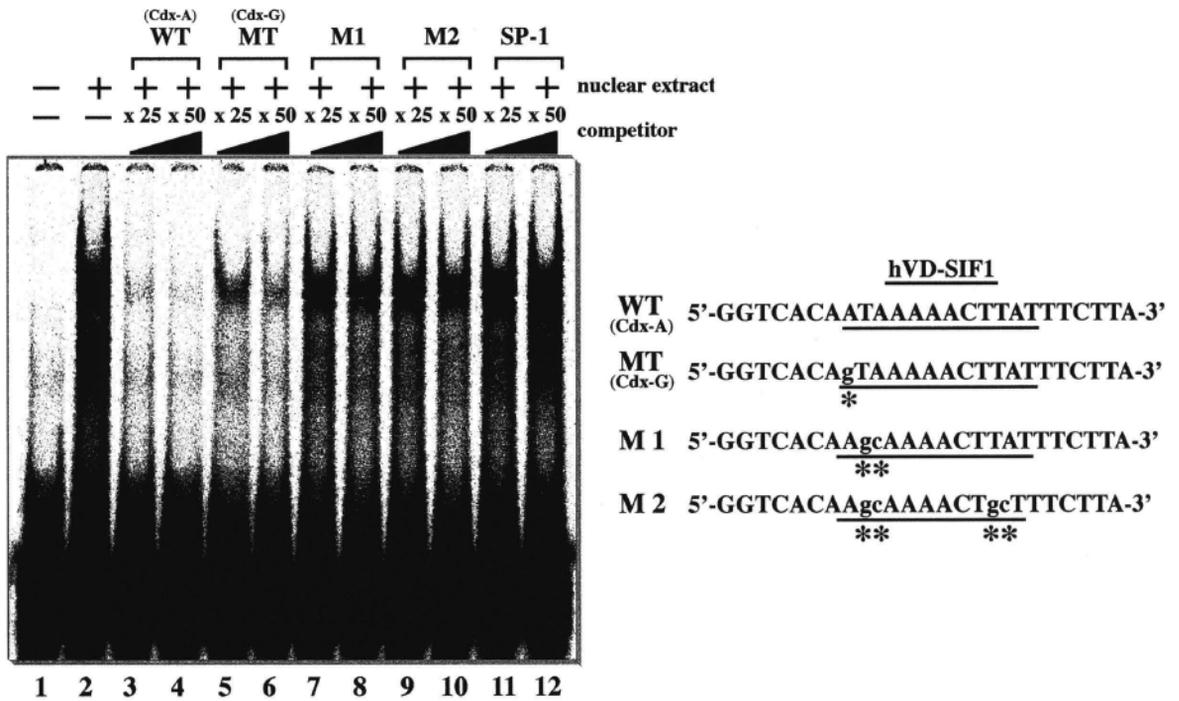
hVD-SIF 1 を含む25bpの合成オリゴヌクレオチド (Cdx-A, Cdx-G) を herpes virus thymidine kinase 遺伝子プロモーターの上流につないだリポーターベクターを作成した。これと共に、Cdx-2発現ベクターをCOS-7細胞にトランスフェクションして、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、Cdx-Aでの活性を100%とした時、Cdx-Gの転写活性は70%から80%を示し、Cdx-GはCdx-Aに比して約20%の発現低下が示された (p<0.01) (図4)。この低下の程度は結合能の結果と一致した。

表1. 閉経前、閉経後女性の身体所見

	閉経前女性				閉経後女性			
	Cdx-A	Cdx-A/G	Cdx-G	P*	Cdx-A	Cdx-A/G	Cdx-G	P*
	n=12	n=35	n=21		n=7	n=32	n=16	
Age (years)	41.1 ± 1.8	41.0 ± 0.9	40.2 ± 1.2	0.86	66.4 ± 2.5	64.2 ± 1.2	62.5 ± 1.0	0.41
Hight (cm)	155.4 ± 1.7	155.9 ± 0.9	155.6 ± 0.7	0.94	148.8 ± 2.0	148.5 ± 0.9	149.6 ± 1.5	0.80
Weight (kg)	55.3 ± 3.9	56.7 ± 1.7	57.0 ± 1.7	0.89	51.9 ± 2.2	51.3 ± 1.4	48.2 ± 1.2	0.30
BMI (kg/cm²)	22.8 ± 1.4	23.3 ± 0.6	23.5 ± 0.6	0.87	23.4 ± 0.7	23.2 ± 0.5	21.5 ± 0.4	0.10
Body fat (%)	29.0 ± 2.1	29.8 ± 1.4	30.2 ± 1.7	0.91	29.8 ± 3.2	30.0 ± 1.1	26.4 ± 1.1	0.18
Body lean (%)	38.4 ± 1.6	38.2 ± 0.9	39.0 ± 0.6	0.83	36.2 ± 1.7	35.5 ± 0.6	35.5 ± 1.1	0.91
Dairy calcium (mg/day)	404.0 ± 65.6	501.0 ± 42.8	485.8 ± 72.8	0.57	592.8 ± 79.4	494.0 ± 44.0	626.6 ± 91.4	0.28
Serum calcium (mg/dl)	8.7 ± 0.2	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.1	0.37	8.5 ± 0.1	8.9 ± 0.1	8.7 ± 0.2	0.23
Age at menopause (years)					51.4 ± 2.0	48.7 ± 1.2	47.0 ± 0.9	0.28

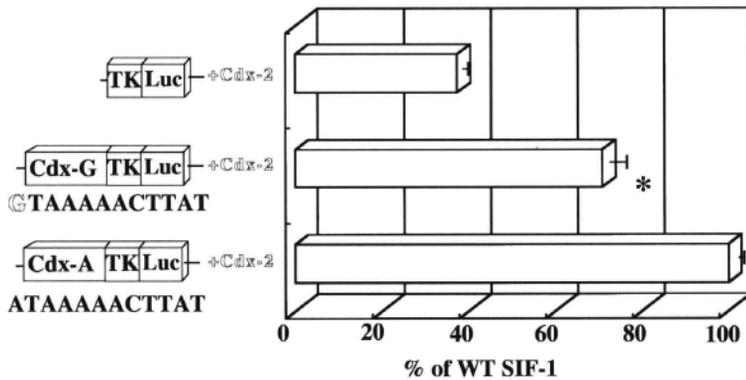
Values are mean ± SEM. \*Significance of differences between the three genotypes.

図3. hVD-SIF1 配列と Cdx-2タンパクとの結合能



hVD-SIF1 配列を含む 2 本鎖のオリゴヌクレオチド (WT;Cdx-A) をプローブとして, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP でラベルし核蛋白と反応させた。核蛋白は COS-7細胞に Cdx-2発現ベクターをトランスフェクションして強制的に発現させたものを用いた。competitor は右図に示す種々のオリゴヌクレオチドを用い, 競合阻害実験を行った。

図4. hVD-SIF1 における多型のプロモーター活性への影響



hVD-SIF1 配列を含む25bp のオリゴヌクレオチド Cdx-A, Cdx-G の 2 種類を作成し, それぞれを herpes virus thymidine kinase 遺伝子プロモーターの上流につないだりポーターベクターを作成した。COS-7細胞に Cdx-2発現ベクターとリポーターベクターをそれぞれトランスフェクションし48時間培養後, ルシフェラーゼ活性を測定した。\*p<0.05

考 察

今回, ヒト VDR 遺伝子において, 腸管特異的発現を規定する cis-element; hVD-SIF1 配列上に多型を見いだ

し, 骨密度との関連性および VDR の発現機能について検討した。Cdx-2のコンセンサス結合配列である ATAAA 型 (Cdx-A 型) を有する配列と, A が g に変異した gTAAA 型 (Cdx-G 型) が多型として存在することが明らかになった。hVD-SIF1 の領域は, sucrase-isomaltase 遺伝子や lactase-phlorizin hydrolase 遺伝子のプロモーター上に見出されている SIF1 配列に類似しており (図1), この領域に腸管特異的転写因子 Cdx-2が結合することで, 転写を促進する<sup>9)</sup>。今回の多型において, Cdx-G 型は Cdx-A 型に対して, 転写因子 Cdx-2との結合能および転写活性が共に有意に低値を示した。hVD-SIF1 配列; 5'-ATAAAAACTTTAT-3'には, Cdx-2 が二量体を形成して結合する。この領域に, 変異を導入したオリゴヌクレオチドを作成して, ゲルシフト法を行ったところ, 5'-ATAAAA-3' 配列が最も重要であることが明らかになった。よって, 5'側の A が G に変異す

る hVD-SIF 1 多型は、腸管での VDR の発現を調節すると考えられた。

小腸上皮細胞において、細胞内でのカルシウム輸送を行うカルビンディン D9K (CaBP 9K) および細胞外へのカルシウムの排出に関与するカルシウムポンプは  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  依存的に発現を調節されている<sup>10,11)</sup>。中でも CaBP 9K はその遺伝子のプロモーター領域に VDR が結合するビタミン D 応答配列 (VDRE) が存在している<sup>12,13)</sup>。このように、VDR の腸管での機能はカルシウム吸収に関連した一連の輸送タンパクの発現を規定していると考えられる。従って今回見いだされた hVD-SIF 1 多型は腸管におけるカルシウム吸収に影響を与えているものと思われる。また高齢者では、血清  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  レベルの減少やカルシウム吸収能低下が知られている<sup>14-16)</sup>。さらに、閉経後骨粗鬆症は、閉経を迎えることで、エストロゲンの低下や  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の反応性の低下、また VDR の発現の低下に伴い腸管でのカルシウム吸収低下を示し、骨密度の減少にいたると考えられる<sup>17-19)</sup>。最近、エストロゲンが腸管での VDR の発現を増加させることが報告された<sup>20)</sup>。この興味深い報告から、我々は hVD-SIF 1 多型による骨密度の差異が、閉経前女性にはなく、閉経後女性に認められる理由ではないかと考えている。

我々のグループはこれまでに、VDR 遺伝子の翻訳開始点において、ATG (M 型) および ACG 型 (m 型) の遺伝子多型を見だし報告した。M 型では Baker らが示した従来の翻訳開始部位より<sup>21)</sup>、m 型では 9 bp 下流に存在する ATG より翻訳が開始されるため、合成されるタンパク質のサイズが異なり、M 型に比べ m 型の方が標的遺伝子の転写活性および閉経前の女性の骨密度ともに有意に高値を示すことを報告した<sup>22)</sup>。しかしながら、閉経後の女性では骨密度は有意な差は認められなかった。この遺伝子多型と骨密度との関係は各国で追試検討が行われているが、我々の知験と同様な結果が得られている<sup>23-26)</sup>。最近の報告によるとこの翻訳開始部位の多型と腸管でのカルシウム吸収に相関が見られることが報告された<sup>27)</sup>。すなわち、翻訳開始部位多型と今回見いだした hVD-SIF 1 多型との組み合わせによって、カルシウム吸収や骨密度をより正確に推定できることが考えられる。

現在までに VDR 以外にエストロゲン受容体<sup>28)</sup>やコラーゲンタイプ I<sup>29)</sup> および IL-6 遺伝子<sup>30)</sup>をはじめ、骨代謝に関係する遺伝子の多型と骨密度の関係が報告され

ている。しかし、これらの遺伝子多型と骨密度の関係は、研究によって結果はまちまちである。今後は VDR 遺伝子多型を考慮した、骨粗鬆症予防に対するカルシウムやビタミン D の効果を検討することが重要と思われる。

## 文 献

1. McKey, H. A., Bailey, D.A., Wilkinson, A.A., Houston, C. S.: Familial comparison of bone mineral density at the proximal femur and lumbar spine. *Bone Miner.*, 24 : 95-107, 1994
2. Kelly, P.J., Nguyen, T., Hopper, J., Pocock, N., et al.: Changes in axial bone density with age.: A twin study. *J. Bone. Miner. Res.*, 8 : 11-17, 1993
3. Sowers, M. R., Boehnke, M., Jannausch, M.L., Crutchfield, M., et al.: Familiality and partitioning the variability of femoral bone mineral density in women of child-bearing age. *Calcif. Tissue. Int.*, 50 : 110-114, 1992
4. Morrison, N. A., Qi, J. C., Tokita, A., Kelly, P. J., et al.: Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 367 : 284-287, 1994
5. Huang, Y. C., Lee, S., Stolz, R., Gabrielides, C., et al.: Effect of hormones and development on the expression of the rat  $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 264 : 17454-17461, 1989
6. Yamamoto, H., Miyamoto, K., Bailing, Li., Taketani, Y., et al.: The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J. Bone. Miner. Res.*, 14 : 240-247, 1999
7. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M. Schaffner, W.: Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells. *Nucleic. Acid. Res.*, 17 : 6419, 1989
8. Taketani, Y., Segawa, H., Chikamori, M., Morita, K., et al.: Regulation of type II renal  $\text{Na}^+$ -dependent Pi transporter by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . *J. Biol. Chem.*, 273 : 14575-14581, 1998
9. Suh, E., Chen, L., Taylor, J., Traber, P. G.: A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 14 : 7340-7351, 1994
10. Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T.A.: Advancing age results in the reduction of intestinal and bone

- 1, 25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*, 126 : 1053-1057, 1990
11. Houward, A., Legon, S., Walter, J. R. : Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms. *Am. J. Physiol.*, 265 : G917-925, 1993
  12. Darwish, H. M., DeLuca, H. F. : Analysis of binding of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor to positive and negative vitamin D response elements. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15 : 223-234, 1996
  13. Li, Y. C., Pirro, A. E., Demay, M. B. : Analysis of vitamin D dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. *Endocrinology*, 139 : 847-851, 1998
  14. Armbrecht, H. J., Blotz, M. A., Wongsurawat, N. : Expression of plasma membrane calcium pump mRNA in rat intestine..effect of age and 1, 25-dihydroxyvitamin D. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1195 : 110-114, 1994
  15. Liang, C. T., Barnes, J., Imanaka, S., DeLuca, H. F. : Alterations in mRNA expression of duodenal 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and vitamin D-dependent calcium binding protein in aged Wistar rats. *Exp. Genetol.*, 29 : 179-186, 1994
  16. Russell, J. E., Morimoto, S., Brige, S. J., Fausto, A., et al. : Effects of age and estrogen on calcium absorption in the rat. *J. Bone. Miner. Res.*, 1 : 185-189, 1986
  17. Gennari, C., Agnusdei, D., Nardi, P., Civitelli, R. : Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in oophorectomized women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71 : 1288-1293, 1990
  18. Civitelli, R., Agnusdei, D., Nardi, P., Zacchei, F. : Effects of one-year treatment with estrogens on bone mass, intestinal calcium absorption, and 25 hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase reserve in postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.*, 42 : 77-86, 1988
  19. Chan, S. D. H., Chiu, D. K. H., Atkins, D. : Oophorectomy leads to a selective decrease in 1, 25-dihydroxycholecalciferol receptors in rat jejunal villous cells. *Clin. Sci.*, 66 : 745-748, 1984
  20. Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P., Schwartz, B. : Estrogen increases 1, 25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology*, 140 : 280-285, 1999
  21. Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M., Crisp, T. M., et al. : Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85 : 3294-3298, 1988
  22. Arai, H., Miyamoto, K., Taketani, Y., Yamamoto, H., et al. : A vitamin D receptor gene polymorphism in the transrnatation initiation codon : Effect on protein activity and relation to bone density in Japanese women. *J. Bone. Miner. Res.*, 12 : 915-921, 1997
  23. Gross, C., Eccleshall, T. R., Malloy, P. J., Luz, Villa, M., et al. : The presense of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J. Bone. Miner. Res.*, 11 : 1850-1855, 1996
  24. Harris, S. S., Eccleshall, T. R., Gross, C., DawsonHughes, B., et al. : The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J. Bone. Miner. Res.*, 12 : 1043-1048, 1997
  25. Eccleshall, T. R., Garnero, P., Gross, C., Delmas, P. D., et al. : Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women The OFELY study. *J. Bone. Miner. Res.*, 13 : 31-35, 1998
  26. Ferrari, S., Rizzoli, R., Manen, D., Slosman, D., et al. : Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density : Interaction with age, dietary calcium, and 3' -end region polymorphisms. *J. Bone. Miner. Res.*, 13 : 925-930, 1998
  27. Ames, S. K., Ellis, K. J., Gunn, S. K., Copeland, K. C., et al. : Vitamin D receptor gene FokI polymorphism predicts calcium absorption and bone mineral density in children. *J. Bone. Miner. Res.*, 14 : 740-746, 1999
  28. Kobayashi, S., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., et al. : Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.*, 11 : 306-311, 1996
  29. Grant, S. F., Reid, D. M., Blake, G., Herd, R., et al. : Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene.. *Nature Genetics*, 14 : 203-

205, 1996

30. Tsukamoto, K., Yoshida, H., Watanabe, S., Suzuki, T., et al.: Association of radial bone mineral density

with CA repeat polymorphism at the interleukin 6 locus in postmenopausal Japanese women. *J. Hum. Genet.*, **44**: 148-51, 1999

### *The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene*

*Hidekazu Arai, Michiko Yoshida, Hironori Yamamoto, Kyoko Morita, Ken-ichi Miyamoto, and Eiji Takeda*

*Department of Clinical Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima  
(Director: Prof. Eiji Takeda)*

*Megumi Kubota, Shigeko Yoshida, and Mikiko Ikeda*

*Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, Okayama*

#### SUMMARY

The major physiological activity of 1,25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) is the regulation of calcium absorption in the small intestine, and the level of vitamin D receptor (VDR) is an important factor in this regulation. In a previous study, we demonstrated that the caudal-related homeodomain Cdx-2 played an important role in the intestine-specific transcription of the human VDR gene. In the present study, the polymorphism was identified in the core sequence 5'-ATAAAA ACTTAT-3' in the Cdx-2 binding site in the VDR gene promoter. In 261 Japanese women with genotyped VDR polymorphisms, 48 were genotype Cdx-A (adenine at-3731 nt relative to the transcription start site of human VDR gene, 5'-ATAAAA ACTTAT-3'), 82 were genotype Cdx-G (guanine at-3731 nt, 5'-GTA AAA ACTTAT-3'), 131 were genotype Cdx-A/G (heterozygote). The bone mineral density (BMD) in the lumbar spine (L2-4) with the Cdx-A homozygote was 12% lower than that with the Cdx-G homozygote ( $P < 0.05$ ). In electrophoretic gel mobility shift assay, the oligonucleotide with Cdx-G allele markedly decreased the binding to Cdx-2 compared with that in the Cdx-A allele. The transcriptional activity of the VDR promoter with Cdx-G allele was decreased to 70% of the Cdx-A allele. In addition, in the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, the Cdx-2 binding element with the G allele showed significantly lower transcriptional activity than that of the A allele. Thus, the polymorphism in the Cdx-2 binding site of the VDR gene (Cdx-polymorphism) would affect the expression of VDR in the small intestine. In addition, this polymorphism may modulate BMD in postmenopausal Japanese women.

Key words: vitamin D receptor (VDR), polymorphism, bone mineral density (BMD), caudal-related homeodomain Cdx-2