

<令和元年度助成>

食事由来ビタミン K の生体内変換による生体機能制御機構の解析

中川 公恵

(神戸学院大学 薬学部 社会薬学部門衛生化学研究室)

背景および目的

血液凝固や骨形成に重要な役割を担う脂溶性ビタミンであるビタミン K には、植物で合成されるビタミン K₁ (フィロキノロン: PK) と動物性食品に含まれるビタミン K₂ (メナキノロン-4: MK-4)、細菌類が合成するメナキノロン類 (MK-n) の他、合成品であり PK の尿中代謝物であるビタミン K₃ (メナジオン: MD) が存在する。ヒトや哺乳類における MK-4 摂取量は他の同族体に比べて非常にわずかであるが、組織中には MK-4 が最も高濃度に存在している。これは、摂取した PK や MK-n、MD が体内で MK-4 に変換されているからである。著者らは、安定同位体である重水素で標識した PK (PK-d₇) を独自に合成し、摂取した PK-d₇ がマウス体内で重水素標識 MK-4 (MK-4-d₇) に変換されることを世界で初めて証明し、さらにこの変換反応を担う酵素が UbiA prenyltransferase domain containing 1 protein (UBIAD1) であることを見出すことに成功してきた¹⁾。

この UBIAD1 は、ヒトにおいて角膜にコレステロールが蓄積する遺伝疾患であるシュナイダー角膜ジストロフィーの原因遺伝子であるが、全組織に発現するにもかかわらず、UBIAD1 の生理機能は MK-4 を合成する酵素であるということ以外、明らかにされていない。著者らはこれまでに、全身性 UBIAD1 欠損マウスの作出を行なったところ、このマウスは胎生早期に致死となり、UBIAD1 が個体発生に必須の因子であることが判明した²⁾。UBIAD1 は各組織に発現しており、MK-4 も各組織に存在するが、それらがなぜ各組織に必要であるのか、どのような生理機能を担っているのかは明らかではない。申請者は、

UBIAD1 には MK-4 を合成する機能以外にも重要な生理作用があるのではないかと推察している。

本研究では、UBIAD1 を時期組織特異的に欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウスを作出し、発育過程ごとにおける全身での UBIAD1 欠損の影響や、成熟後における UBIAD1 欠損の影響を評価した。また、超高齢化社会の中で問題となる脳疾患、骨血管疾患に関連する組織として、脳・血管・骨特異的に UBIAD1 を欠損させたマウスの作出にも着手し、組織特異的 UBIAD1 欠損マウスの表現型を解析することにより、UBIAD1 およびビタミン K が担う生体機能の解明を試みた。

方 法

UBIAD1 を時期組織特異的に欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウス (CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウス) は、Tamoxifen 誘導型全身性 cre 発現マウス (CAG-cre-ERT) を用いて、cre/loxP システムにより作出した。CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウスに生後すぐあるいは成熟後に Tamoxifen を 5 日間連続腹腔内投与し、UBIAD1 欠損を誘導した。UBIAD1 欠損誘導後は、時期を追って各組織における種々の遺伝子の mRNA 発現量の変化を Real time RT-PCR にて評価した。また、各組織の組織標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色および免疫組織染色を行うことにより、種々のタンパク質の発現変化を組織学的に解析した。Tamoxifen 投与 CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウスにおいて、特に顕著な組織的变化が認められた組織については、初代培養細胞を単離し、UBIAD1 欠損に伴う細胞機能

への影響を解析した。

組織特異的な UBIAD1 欠損マウスについては、心血管系特異的に cre を発現するマウス (SM22 α -cre) を用いて、心筋細胞および血管平滑筋細胞特異的 UBIAD1 欠損マウス (SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウス) を作出し、表現型解析を行なった。

結果と考察

(1) 成熟後の UBIAD1 欠損による影響

成熟後 (11 ~ 13 週齢) に Tamoxifen 投与により UBIAD1 を全身欠損させた CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウスでは、投与 2 週間目以降で全身の組織で UBIAD1 の欠損が確認された。全身の組織のうち、特に膵臓では著明な組織萎縮が認められた³⁾。そこで、膵臓の萎縮状態を観察するため組織標本作製し、HE 染色および免疫組織染色を行なった。その結果、膵島の組織構造や細胞構成は維持されていたが、膵腺房細胞の消失が認められ、多くの空胞が形成されていることが観察された (図 1)。膵腺房細胞の消失要因を明らかにするため、アポトーシスの有無を調べた結果、Caspase-3 の発現亢進が認められたことから、アポトーシスによる細胞死による消失であると判断された。さらに、新たに形成された空胞が何に起因するものであるのかを明らかにするた

め、免疫組織染色により調べた結果、空胞は脂肪滴の膜タンパク質 perilipin や脂肪酸結合タンパク質 FABP4 の抗体で特異的に染色されたことから、脂肪細胞であることがわかった。このことから、膵臓における UBIAD1 の欠損により、膵腺房細胞がアポトーシスによって死滅消失し、その後脂肪細胞が形成されていると推察された。脂肪細胞は未分化間葉系幹細胞から分化して形成されるが、Tamoxifen 投与 CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウスの膵臓では、膵腺房細胞の消失と共に間葉系幹細胞が多く侵入していることも認められたことから、間葉系幹細胞が膵島より分泌されているインスリンの作用を受けて脂肪細胞に分化した可能性が高いと推察される。本結果より、膵腺房細胞では UBIAD1 が細胞機能にとって極めて重要な役割を担っていると考えられることから、さらに UBIAD1 欠損の影響を細胞レベルで解析するため、膵腺房細胞を初代培養して解析を行なった。4-hydroxy-tamoxifen (4-OH-Tam) 処理により UBIAD1 欠損を誘導した CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウス由来膵腺房細胞では、アミラーゼ分泌量の増加が認められ、さらに細胞内に空胞の形成が認められた。この細胞内の空胞は、Oil-red O 染色では染まらないことから脂肪滴ではなく、何らかの細胞機能の異常に伴い生じていることが示唆された。この空胞の要因が何によるのかは現在のところ明らかではな

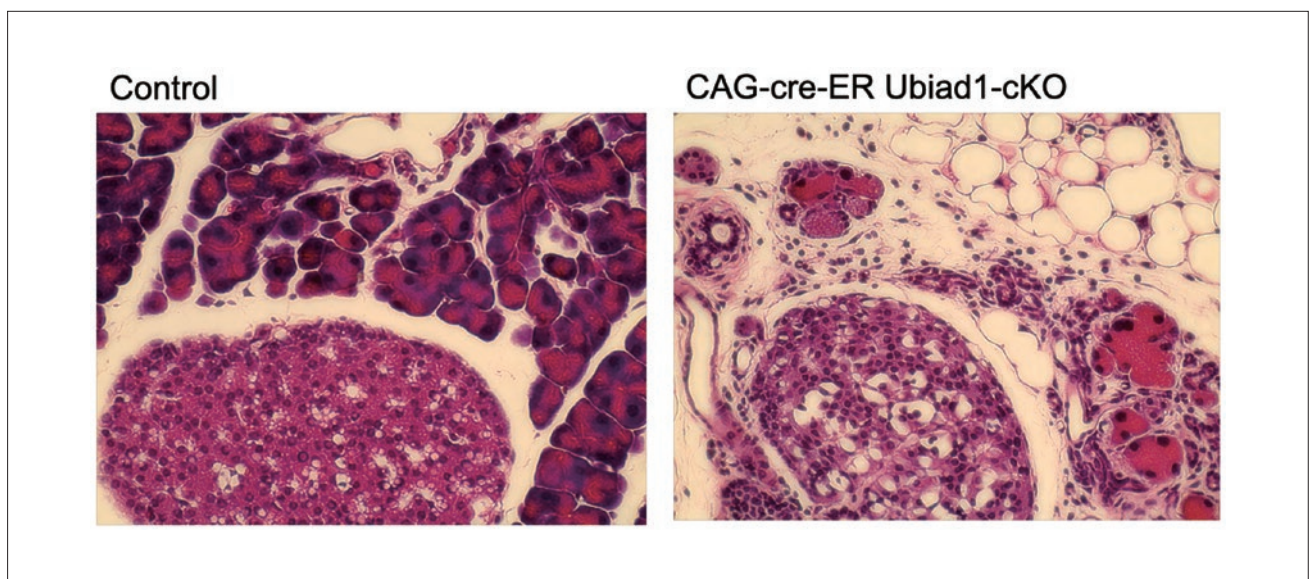


図 1 Tamoxifen 投与 40 日後の CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウス膵臓の組織像

く、今後の解析が必要である。

これまで、膵臓ではビタミンKのうちMK-4の含有量が非常に多いことは明らかであったが、膵臓におけるビタミンKの役割は解明されていなかった。今回の著者らの結果より、ビタミンKおよびUBIAD1は、膵臓の外分泌機能の重要な役割を担っている膵腺房細胞の生存性と機能維持に必須の因子であることが明らかとなった。今後さらに解析を進め、膵臓におけるビタミンKの役割の全貌を解明したいと考えている。

(2) 心血管特異的 UBIAD1 欠損による影響

心血管特異的に UBIAD1 欠損を誘導した SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスは、正常に出生したが、雄性 SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスでは 5~7 週齢、雌性 SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスでは 6~8 週齢の間ですべての個体が死亡した。離乳後以降の体重は、死亡する 1 週間前までは Control マウスとの間に差異は見られなかったが、死亡直前の数日の間には有意な差が認められた。摂餌量を調査した結果、死亡直前の体重減少は、摂餌量の低下によることが示唆された。血圧測定においては、雌雄ともに 5~8 週齢の間で、Control マウスに比べて有意な血圧の低下が認められた。そこで、6 週齢の雌雄 SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスについて、心臓の CT 解析を

行なったところ、収縮期・拡張期ともに左心室体積が有意に拡張しており、心拡大を起こしていることがわかった。6 週齢の雄性 SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスについて、心臓の組織標本を作製し、組織像の解析を行なった結果、心筋線維の断裂像が認められ、心筋細胞の伸展異常並びに細胞内空胞形成が観察された(図 2)。また、血管についても同様に血管平滑筋特異的に UBIAD1 欠損が誘導されており、血管の組織標本の解析では、SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウスの大動脈において、エラスチン線維の特徴的な波打った構造が見られず伸展した状態となり、コラーゲン線維層の減少が観察された。これらのことから、心筋細胞および血管平滑筋細胞における UBIAD1 の欠損は、心臓や血管の細胞および組織構造の異常を起こすことが明らかとなった。現在は、UBIAD1 欠損により心血管に生じている種々の遺伝子発現の変化を解析し、ビタミンKによる発現制御を受けている因子の探索同定を進めている。

以上の結果より、心筋細胞および血管平滑筋細胞における UBIAD1 の欠損とそれに伴う MK-4 の欠乏は、これら細胞の機能異常を引き起こし、組織構造と機能の低下を起こすことが明らかとなった。このことから、心血管において UBIAD1 および MK-4 は、組織機能維持に必須の役割を担っており、ビタミンKは心血管機能を正常に保つ上で必要な栄養素である

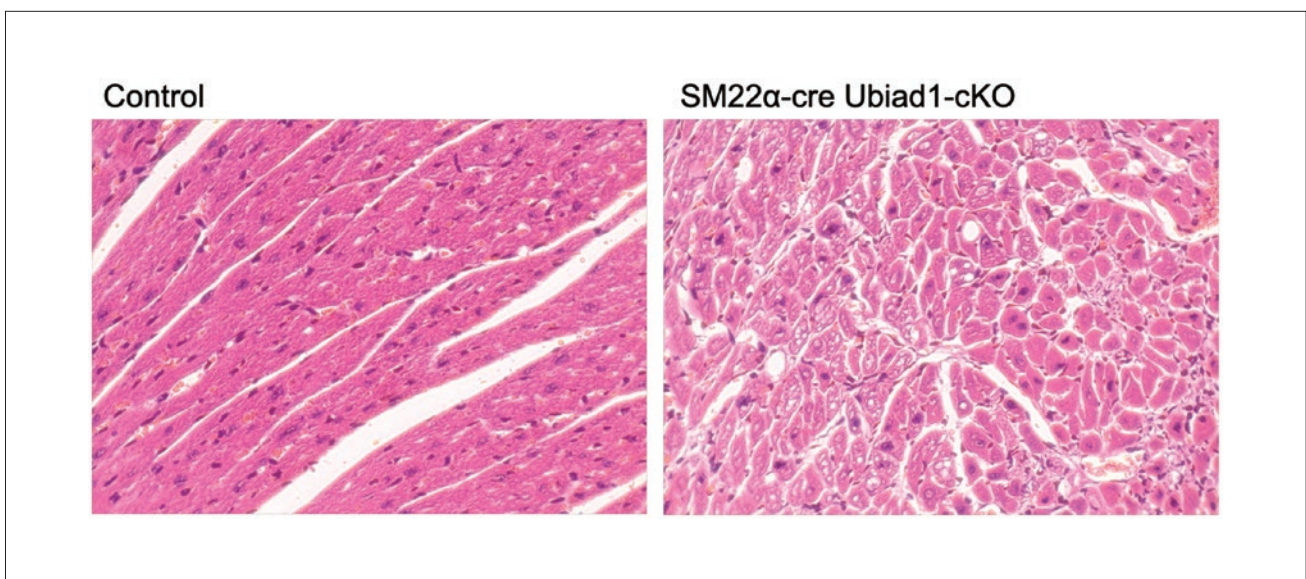


図 2 SM22 α -cre Ubiad1-cKO マウス心臓の組織像

と推察される。

(3) まとめ

ビタミンKをMK-4に変換する酵素であるUBIAD1の全身での欠損は、成熟後でもその影響は大きく、特に膵臓の機能にはUBIAD1およびMK-4が必須であるといえる。また、心血管機能に関しては、組織構造の形成や維持にビタミンKが関連している可能性が高く、今後さらに解析することによって、ビタミンKおよびUBIAD1が担う役割も明らかになると考えられる。ビタミンKが担う生体での役割はまだまだ広く大きいと予想されることから、今後さらに多くの組織特異的なUBIAD1欠損マウスを作出・解析し、その全貌解明を目指したいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, 468, 117-21 (2010).
- 2) Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, et al. Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One*, 9, e104078 (2014).
- 3) Nakagawa K, Fujiwara K, Nishimura A, Murakami C, Kawamoto K, Ichinose C, Kunitou Y, Suhara Y, Okano T, Hasegawa H. UBIAD1 Plays an Essential Role in the Survival of Pancreatic Acinar Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1971 (2019).

Analysis of biological function control mechanism by *in vivo* conversion of dietary vitamin K

Kimie NAKAGAWA

*Laboratory of Hygienic Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kobe Gakuin University*

Vitamin K, a fat-soluble vitamin that plays important roles in blood clotting and bone formation, includes vitamin K₁ (phylloquinone, PK), which is synthesized in plants, vitamin K₂ (menaquinone-4, MK-4), which is found in animal foods, menaquinones (MK-n), which are synthesized by bacteria, and vitamin K₃ (menadione, MD), which is a synthetic product and urinary metabolite of PK. Although the intake of MK-4 is very small in humans and mammals compared to other homologues, MK-4 is present in the highest concentration in tissues. This is because ingested PK, MK-n, and MD are all converted to MK-4 in the body. We demonstrated, for the first time, that PK is converted into MK-4 in the mouse. In addition, we have succeeded in determining that the enzyme responsible for this conversion reaction is UbiA prenyltransferase domain-containing protein-1 (UBIAD1). UBIAD1 is the causative gene of Schneider's corneal dystrophy, a genetic disorder in which cholesterol accumulates in the human cornea. Although UBIAD1 is expressed in all tissues, and MK-4 is present in various tissues, as well, the physiological functions of UBIAD1 have not been clarified, other than that it functions as an enzyme that synthesizes MK-4. We speculate that UBIAD1 may have other important physiological effects, in addition to its function of synthesizing MK-4.

In this study, we generated conditional knockout mice, in which UBIAD1 can be deleted in a tissue-specific manner, and evaluated the effects of the resulting UBIAD1 deficiency throughout the body, both during development and after maturation. In addition, we also generated mice lacking UBIAD1 specifically in the brain, blood vessels, and bone, as tissues related to brain diseases and bone vascular diseases, which are problems in the super-aging society, and attempted to elucidate the biological functions of UBIAD1 and vitamin K.