

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00900

研究課題名（和文）活性型ビタミンKへの生体内変換中間体、menadioneの体内動態に関する研究

研究課題名（英文）Studies on the disposition of menadione, a intermediate of conversion into active form of vitamin K

研究代表者

鎌尾 まや（Kamao, Maya）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40299087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：活性型ビタミンKへの変換中間体であるmenadione（MD）の測定法の高感度化について検討し、cysteamine（CA）誘導体化が有用であることを見出した。培養細胞中でMDの一部はグルクロン酸抱合体に代謝されることを明らかにした。また、側鎖切断酵素はビタミンKの側鎖の二重結合を認識する可能性が示唆された。ビタミンK誘導体を用いて、側鎖切断に関わる分子の候補となるタンパク質を同定すると共に、ビタミンKと結合した核内受容体SXRの核内移行および核外へ排出される様子を可視化することができた。また、ビタミンKの側鎖二重結合ならびに酸素原子を含む環構造が神経分化誘導作用を高めることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンK摂取源の大部分を占めるビタミンK1（phyllloquinone、PK）は体内で側鎖切断により生じたMDを経て、活性型であるビタミンK2（menaquinone-4、MK-4）に変換される。MDがどのように各組織に運搬されるのかは不明であり、その解明に本研究で見出された高感度測定法が利用できる。また、ビタミンKの側鎖切断に関わる酵素は同定されていないが、本研究で側鎖切断に関わる分子の候補となるタンパク質が同定できたことは学術的意義が大きい。さらに、本研究で明らかとなった神経分化誘導作用を高める構造モチーフに関する成果は、神経変性疾患等の治療薬開発に有用な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：It was found that derivatization of cysteamine (CA) is useful for the measurement of menadione (MD), an intermediate for conversion to active form of vitamin K. It was revealed that a part of MD was metabolized to glucuronide conjugate in cultured cells. It was also suggested that the side chain cleaving enzyme may recognize the double bond of the side chain of vitamin K. Using a vitamin K derivative, we can identify a protein that is a candidate for a molecule involved in side chain cleavage, and visualize the nuclear translocation of the nuclear receptor SXR bound to vitamin K and its export to the nucleus. In addition, it was clarified that the double bond in side chain of vitamin K and the ring structure containing oxygen atom enhance the neural differentiation inducing action.

研究分野：栄養科学

キーワード：ビタミンK menadione menaquinone phylloquinone 体内動態 側鎖切断 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K 摂取源の大部分はビタミン K₁ (phylloquinone, PK) であるが、多くの組織中には側鎖構造が異なるビタミン K₂ (menaquinone-4, MK-4) が多く存在している。MK-4 は血液凝固等に関与するビタミン K 依存性タンパク質の γ -カルボキシル化の補因子活性が最も強く、骨形成促進作用や神経分化誘導作用など特徴的な作用を持つことから、活性型ビタミン K であると位置づけられている。我々は、重水素標識した PK をマウスに投与し、生体内で PK の側鎖部分が置換されて MK-4 となり、脳、膵臓、精巣などに蓄積されることを明らかにした。また、この変換の中間体として、PK の phytyl 側鎖の切断により生じたビタミン K₃ (menadione, MD) が小腸で遊離することを証明した。MD はリンパ管から血液に移行して各組織に運ばれ、MK-4 合成酵素である UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) により MK-4 の側鎖構造に相当する geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) が結合し、MK-4 が産生すると考えられる。これらの PK から MK-4 への変換過程のうち、側鎖切断により生じた MD がどのように各組織に運搬されるのかは明らかにされていない。MD は活性酸素種を発生し細胞毒性を示すことや、血中では未変化体 MD が検出されないという事実から、何らかの形に変化して血中を循環すると考えられる。研究代表者の平成 26 ~ 27 年度科学研究費助成事業 (課題番号: 26560072) の研究により、マウスやラットの血漿中 MD の多くは硫酸抱合体、グルタチオン抱合体、N-アセチルシステイン抱合体であると考えられた。しかし、生体試料中におけるこれらの抱合体を対象とした直接測定法は十分に確立されておらず、PK から遊離した MD がいずれの抱合体の形で血漿あるいは組織中に存在するのかは化学的に証明されていない。また、ビタミン K の側鎖切断に関わる生体内分子は明らかにされておらず、MK-4 に特徴的な神経分化誘導作用についても詳細な機序は解明されていない。

2. 研究の目的

以上のような背景から本研究では、PK から遊離した MD の体内動態を明らかにするため、MD の高感度測定法の開発を試みた。また、培養細胞あるいはマウスを用いてビタミン K の体内動態について検討した。さらに、ビタミン K の側鎖切断に関わるたんぱく質の同定や体内動態の解析を目的として各種ビタミン K 誘導体を合成し、それらを用いた解析を行うと共に、様々なビタミン K 誘導体を用いて、神経分化誘導作用に関する構造活性相関について検討した。

3. 研究の方法

(1) MD 高感度測定法の検討

MD の高感度測定法の確立を目指して、GC-FID および cysteamine (CA) 誘導体化 UPLC-ESI-MS/MS 法について検討した。また、以前の検討で血中における MD 存在形態の候補であると考えられた MD-グルタチオン抱合体および MD-N-アセチルシステイン抱合体の測定法を検討した。

(2) 培養細胞およびマウスを用いたビタミン K 動態の検討

ビタミン K 利用組織の一つである肝臓由来の HepG2 細胞を MD あるいは PK、MK-4 共存下で培養し、細胞および培地中の MD 量を測定した。また、PK 含有量が異なる 3 種類の餌 (Low PK diet : 0 μ g/100 g, Medium PK diet : 75 μ g/100 g, High PK diet : 750 μ g/100 g) を 7 ~ 12 週齢 C57BL/6J 系雄マウスに 2 週間摂食させ、尿および血漿を採取し、PK および MK-4 濃度を測定した。

(3) 各種ビタミン K 誘導体を用いたビタミン K 結合たんぱく質の同定、細胞内動態の解析

超音波破砕により HepG2 細胞あるいはマウス小腸上皮細胞から得られた細胞破砕液と磁気ビーズを標識した MK-4 をインキュベートし、avidin-biotin complex (ABC) 法により MK-4 が特異的に結合するたんぱく質を精製した。得られたたんぱく質を SDS-PAGE で分離後、銀染色を行い、MALDI-TOF/TOF MS を用いてたんぱく質の同定を行った。また、ビタミン K の側鎖に蛍光基である 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を有する新規蛍光プローブを合成し、ビタミン K と結合する核内受容体 steroid and xenobiotic receptor (SXR) を過剰発現した細胞へ添加し、SXR の取り込みや核内への移行を経時的に観察した。さらに、レチノイン酸の側鎖構造を有するビタミン K 等様々な誘導体を用いて、マウス胎仔大脳由来神経幹細胞に対する神経分化誘導作用について検討した。

4. 研究成果

(1) MD 高感度測定法の検討

MD は側鎖が無く両親媒性を有し、揮発性が高いことから GC でより有利に測定できる可能性がある。そこで、GC による MD 測定法の確立を試みた。まず、GC-MS を用いてライブラリ検索を行ったところ、MD の質量数のピークが観察されたことから、GC による MD の測定が可能であると判断された。次に GC-FID を用いて MD 溶液を測定した結果、検出限界は 0.3 ng であり LC-MS/MS に比べて低感度であった。固相マイクロ抽出で濃縮することによる高感度化を試みたが、同時再現性が低く、生体試料の測定に耐えうる MD 測定法の確立には至らなかった。次に、MD を CA と反応させ、誘導体化した後、UPLC-ESI-MS/MS により測定する方法を検討したところ、非誘導体化 MD に比べてより高い感度で検出することができた。また、MD-グルタチオン抱合体および MD-N-アセチルシステイン抱合体を合成し、LC-MS/MS による定量法を

確立するためのイオン化法を検討した結果、エレクトロスプレーイオン化法が適切であると判断された。

(2) 培養細胞およびマウスを用いたビタミン K 動態の検討

HepG2 細胞を用いて MD の代謝およびビタミン K の側鎖切断反応について検討したところ、MD 添加後 24 時間目において未変化体 MD として検出されたのは添加量のわずか 1% 程度であり、大部分が速やかに代謝されることが明らかとなった。添加量の 5~6% 相当量は加水分解処理により、1% 相当量は β -グルクロニダーゼ処理により MD として検出されたことから、一部はグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に代謝されるものと推察された。残りの MD はグルタチオン抱合体や N-アセチルシステイン抱合体等に代謝されている可能性が考えられる。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチン類共存下で PK および MK-4 から側鎖が切断された MD の産生について検討したところ、PK と MK-4 から同程度の MD が産生すること、スタチンの用量依存的に MD 量が増加することが明らかとなった。また、ビタミン K の側鎖切断に関わる酵素の性質についても検討した。PK の側鎖二重結合に水素付加した化合物は MK-4 への変換がみられなかったことから、側鎖切断酵素は PK の二重結合を認識している可能性が示唆された。

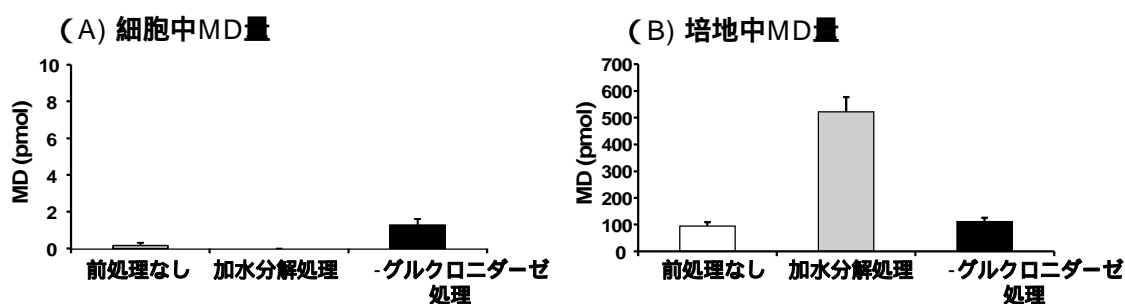


図1. MD 添加時の MD 残存量 (10,000 pmol 添加、24 時間培養後)

さらに、PK 含有量が異なる 3 種類の餌を用いて飼育したマウスの血漿および尿中の PK、MK-4 濃度を測定したところ、PK 摂取量の違いによる PK および MK-4 濃度への影響は認められなかった。従って、PK は変換中間体である MD として体内に存在しているかあるいは尿中へ排泄されたものと考えられた。

(3) 各種ビタミン K 誘導体を用いたビタミン K 結合たんぱく質の同定、細胞内動態の解析

ビタミン K の側鎖切断に関わる生体内分子を明らかにする目的で合成した磁気ビーズ標識 MK-4 を用いて、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞破砕液より MK-4 特異的に結合するタンパク質を精製、同定した。その結果、既に MK-4 と特異的に結合することが報告されている 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 4 であることが確認できた。同様に、マウス小腸上皮細胞の破砕液より、側鎖切断に関わる分子の候補となる複数の MK-4 結合タンパク質を同定することができた。

また、新規蛍光プローブである MK-4-NBD を用いてビタミン K の細胞内動態を観察したところ、MK-4-NBD と核内受容体 SXR が経時的に細胞核内へ移行した後、核外へ排出される様子を可視化することに成功した。

さらに、様々な誘導体を用いてビタミン K の構造活性相関を評価し、側鎖の二重結合ならびに酸素原子を含む環構造が神経分化誘導作用を高めることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maya Kamao, Yoshihisa Hirota, Yoshitomo Suhara, Naoko Tsugawa, Kimie Nakagawa, Toshio Okano, Hiroshi Hasegawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Determination of Menadione by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Pseudo Multiple Reaction Monitoring.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 863-867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.33.863.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Yoshimura, Yoshihisa Hirota, Seiya Soda, Mayu Okazeri, Yuta Takagi, Atsuko Takeuchi, Chisato Tode, Maya Kamao, Naomi Osakabe, Yoshitomo Suhara	4. 巻 30
2. 論文標題 Study on structure-activity relationship of vitamin K derivatives: Conversion of the naphthoquinone part into another aromatic ring and evaluation of their neuronal differentiation-inducing activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 127059-127062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 佐野翔, 伊東優貴, 中川公恵, 鎌尾まや, 須原義智, 廣田佳久
2. 発表標題 ビタミンKに蛍光基NBDを導入した新規蛍光プローブによるSXRの細胞内局在変化
3. 学会等名 第71回 日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林正知, 古川絢子, 須原義智, 鎌尾まや, 廣田佳久
2. 発表標題 磁気ビーズを標識したビタミンK誘導体による結合するタンパク質の探索
3. 学会等名 第71回 日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤大輝, 廣田佳久, 鎌尾まや, 和田昭盛, 須原義智
2. 発表標題 レチノイン酸の側鎖構造を有する新規ビタミン 誘導体の合成
3. 学会等名 第71回 日本ビタミン学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasuku Arai, Takeshi Matsunaga, Maya Kamao, Seiji Komeda, Yoshihisa Hirota
2. 発表標題 Evaluation of azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes cytotoxicity in human prostate cancer cells.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factor/ The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Asano, Maya kamao, Yoshitomo Suhara, Yoshihisa Hirota
2. 発表標題 Evaluation of the vitamin K side-chain cleavage mechanism by use of hydrogenated vitamin K1.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factor/ The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanaru Kobayashi, Satoshi Asano, Ayako Furukawa, Maya Kamao, Yoshitomo Suhara, Yoshihisa Hirota
2. 発表標題 Identification of vitamin K binding protein by using magnetic beads to reveal vitamin K metabolic mechanism.
3. 学会等名 he 7th International Conference on Food Factor/ The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Sano, Yuki Ito, Maya Kamao, Yoshitomo Suhara, Yoshihisa Hirota
2. 発表標題 The exploration of Vitamin K binding protein using the novel fluorescent probes.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factor/ The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaro Yamashita, Mayu Okazeri, Taiki Sato, Maya Kamao, Yoshitomo Suhara, Yoshihisa Hirota
2. 発表標題 Structure-activity correlation of vitamin K revealed by neural differentiation activity.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factor/ The 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 大輝、荒川 実樹乃、鎌尾 まや、和田 昭盛、廣田 佳久、須原 義智
2. 発表標題 レチノイン酸の側鎖構造を融合した神経分化誘導作用を有する新規ビタミンK誘導体の創製
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	廣田 佳久 (Hirota Yoshihisa) (70724277)	芝浦工業大学・システム理工学部・准教授 (32619)	

