

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380070

研究課題名(和文) 組織内で変換・生成するビタミンK2の変換機構とその生理的役割に関する研究

研究課題名(英文) Clarification of novel functions of menaquinone-4 converted from vitamin K1 in animal organs

研究代表者

白川 仁 (Shirakawa, Hitoshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40206280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトも含む高等動物の組織内では、摂取されたビタミンKの一部がメナキノン-4(ビタミンK2の一種)に変換・生成される。しかし、この変換機構の詳細と変換の生理的意義については未だ十分に明らかになっていない。本試験では、培養細胞を用いたMK-4変換系を用いて、変換機構の詳細を解析し、側鎖基質がメバロン酸経路由来であることを明らかにした。また、生理的意義については、抗炎症作用の分子機構やインスリン抵抗性改善作用の解析を行い、我々が見出したメナキノン-4の新しい作用(抗炎症効果)の分子機構やインスリン抵抗性改善作用の解析し、ビタミンKの生体内変換と生活習慣病の発症抑制との関連を明確にした。

研究成果の概要(英文)：A part of dietary vitamin K is converted to menaquinone-4, one of vitamin K2, in several organs in animals. However, detail of conversion system and function of synthesized menaquinone-4 have not been well elucidated. In this study, we showed that side chain substrate for menaquinone-4 synthesis is the product of mevalonate pathway. And we also showed that menaquinone-4 enhances formation of signaling complex leading to NFkB activation to express anti-inflammation activity. Vitamin K deficient diet enhanced insulin resistance in liver and showed insufficient glucose-induced insulin secretion. These results indicated that vitamin K deficient condition can promote symptom of diabetes in diabetic model animals.

研究分野：栄養化学

キーワード：栄養学 ビタミンK

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K (以下、VK と略) は、高等動物において血液凝固因子や骨タンパク質の活性化 (グルタミン酸残基の γ -カルボキシル化:Gla 化) に必須の微量栄養成分である。VK の組織における分布を見ると、血液凝固因子の産生の場である肝臓や骨組織以外に脳、生殖腺、膵臓、筋肉、脂肪組織などに多量に含まれている。そのほとんどが、ビタミン K₂ のひとつのメナキノン-4 (以下、MK-4 と略) であることが判っている。これらの MK-4 は、食品に含まれる他の VK から動物組織内で変換・生成される。近年、この変換に関わる酵素 (UBIAD1) が同定されたが、変換機構の詳細は未だ不明である。また、肝臓や骨以外に存在する VK、特に MK-4 の役割についても、不明のまま残されている。

2. 研究の目的

高等動物の組織内で変換・生成される MK-4 の変換機構と変換の生理的意義について解析を行った。生理的意義については、我々が見出したメナキノン-4 の新しい作用 (抗炎症効果) の分子機構やインスリン抵抗性改善作用の解析を通じて、VK の生体内変換と生活習慣病の発症抑制との関連を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MK-4 によるインスリン抵抗性改善効果の解析

型糖尿病モデルマウスである KK_{Ay} マウスに、VK 欠乏飼料、またはコントロール飼料を給餌し、30 日または 60 日間飼育した。飼育期間中、経口糖負荷試験とインスリン負荷試験を実施した。飼育終了後、肝臓、膵臓を摘出し、VK 含量については蛍光 HPLC 法、各種 mRNA 量については定量 RT-PCR 法、各種タンパク質量についてはウエスタンブロット法により測定した。また、膵臓からコラゲナーゼ灌流法でランゲルハンス島を分離し、グルコース刺激により培地中に分泌したインスリン量を ELISA 法で測定した。

(2) MK-4 による抗炎症作用の分子機構の解明

ヒト単球由来 THP-1 細胞をホルボールエステルで刺激し、マクロファージ様細胞へ分化させた。この THP-1 細胞を MK-4 で 24 時間処理し、その後、リポポリサッカライド (LPS) で刺激を行った。その後、細胞溶解液を調製し、抗 IKK 抗体により免疫沈降を行った。沈降物中の TRAF6、TAK1、IKK 量を各抗体を用いたウエスタンブロット法で測定した。また、これらのタンパク質の相互作用に必要な TAK1 の K63 コピキチン化についても、K63 特異的抗体を用いて同様に解析した。

(3) MK-4 生体内変換の反応機構の解析

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞をメナジオン (VK₃) で一定時間処理し、細胞中の MK-4 量を蛍光 HPLC 法で測定した。また、スタチ

ン、タンパク質プレニル化酵素阻害剤、ワーファリン、ゲラニルゲラニルニリン酸、ゲラニルゲラニオール、MK-4 代謝酵素阻害剤で処理した場合の MK-4 量を解析した。また、マウス脳からリニアスライサーを用いて脳切片を作成・培養し、VK₁ 処理した場合の MK-4 量を測定した。

4. 研究成果

(1) MK-4 によるインスリン抵抗性改善効果の解析

経口糖負荷試験とインスリン負荷試験の結果、コントロール食、欠乏食ともに、耐糖能の悪化とインスリン抵抗性が見られたが、欠乏食でより症状が増悪していた。肝臓において、グルコキナーゼ、肝臓型ピルビン酸キナーゼ mRNA 量が欠乏食群で有意に低下していた。さらに、肝臓型ピルビン酸キナーゼ遺伝子の制御因子である ChREBP やインスリンシグナル伝達分子である IRS2 タンパク質量の低下も観察された。以上のことから、VK 欠乏食により肝臓でのインスリン抵抗性がより増悪していることが示唆された。

また、膵臓グルコキナーゼ、インスリン mRNA 量の低下、インスリン分泌量の低下が VK 欠乏食群で見られた。これらのことから、VK 欠乏食は膵臓中の MK-4 量を低下させ、本糖尿病モデル動物で糖尿病の病態の進行を早めることが示唆された。

試験食を 30 日間給餌した KK_{Ay} マウスの膵臓ランゲルハンス島を分離し、グルコース刺激によるインスリン分泌量を測定した。その結果、低グルコース濃度で刺激した場合、VK 欠乏食群においてインスリン分泌量が低下しており、VK 欠乏食マウスで見られた絶食時の血漿インスリン濃度と相関が見られた。一方、糖尿病を発症しない正常マウスを用いて同様の解析を行ったが、VK 欠乏食によるインスリン分泌量の低下が観察されなかった。以上のことから、VK 欠乏食は型糖尿病モデル動物において、肝臓、膵臓の遺伝子発現を変化やそれに伴うグルコース応答の減弱により、病態増悪を促進させることが示唆された。

(2) MK-4 による抗炎症作用の分子機構の解明

MK-4 で処理した後の IKK 複合体形成を免疫沈降法により解析したところ、変化は見られなかった。一方、LPS 刺激後に同様の解析を行ったところ、MK-4 の前処理によって TRAF6—TAK1—IKK γ の相互作用、および TAK1 の K63 コピキチン化量が増加していた。以上のことから、MK-4 による抗炎症作用は、TRAF6 や IKK との結合に必要な TAK1 の K63 コピキチン化を促進させて、TRAF6—TAK1—IKK γ 複合体の形成量を増加し、LPS 刺激後に起こる複合体の形成から解離に至るフィードバックループを阻害することによって起こる可能性が示唆された。

(3) MK-4 生体内変換の反応機構の解析

HepG2 細胞を VK3 で処理し、MK-4 が生成することを、蛍光 HPLC 法、および LC-MS/MS で確認した。次に、細胞をスタチンで処理した場合、MK-4 生成量は減少した。一方、タンパク質プレニル化酵素阻害剤で処理した場合、MK-4 生成量が増加した。このことから、生成した MK-4 の側鎖部分はメバロン酸経路に由来することが示唆された。次に、外因性の側鎖基質候補物質が MK-4 生成に与える影響を解析した。GGPP で処理した場合、変換量に変化は見られなかったが、ゲラニルゲラニオール (GGOH) で処理した場合、変換量が有意に上昇した。細胞内 GGPP、GGOH 量を測定する LC-MS/MS 法を確立し、定量分析したところ、MK-4 変化量と細胞内 GGPP 量との間に正の相関関係が見られた。これらのことから、メバロン酸経路で合成されるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) またはその代謝物が側鎖の基質として利用されていることが明らかになった。

ワーファリン存在下で変換反応を行ったところ、MK-4 生成量は有意に減少した。このことから、本培養細胞における変換反応にビタミン K エポキシ還元酵素が関与していることが示唆された。また、マウス脳をスライス培養し、VK1 から MK-4 が生成することを確認した。この系を用いることによってビタミン K1 の側鎖開裂に関わる因子を検索できると推定された。

MK-4 の代謝酵素の阻害剤を共存させた場合、MK-4 量の増加が観察されたことから、変換生成された MK-4 は、細胞内で速やかに代謝されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

白川仁、桂井朋子、駒井三千夫 ビタミン K の生体内変換と生成したメナキノ-4 の機能 オレオサイエンス (2014) **14**, 547-553. (査読有り)

平原啓甫、白川仁、齋藤正頼、Giriwono PE、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 遺伝的糖尿病モデルマウスの糖代謝に及ぼすビタミン K 欠乏食の影響 無菌生物 (2013) **43**, 110-112. (査読あり)

Giriwono PE, Shirakawa H, Ohsaki Y, Hata S, Kuriyama H, Sato S, Goto T, Komai M. Dietary supplementation of geranylgeraniol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation via the inhibition of NF- κ B activation in rats. *Eur. J. Nutr.*, 2013, **52**, 1191-1199. DOI: 10.1007/s00394-012-0429-y (査読有り)

小口一起、白川仁、駒井三千夫 アトピー性皮膚炎の進展におけるペリオスチンの役割 ビタミン 2012, 86, 685-686. (査読有り)

白川仁 ビタミン K、Functional Food、2012, 5, 340-345. (査読無し)

白川仁、Giriwono Puspo E、大崎雄介、畠修一、栗山宏樹、佐藤祥子、後藤知子、駒井三千夫 ゲラニルゲラニオールは、リポポリサ

ッカライド誘導の炎症性サイトカインの発現を抑制する 無菌生物 (2011) **41**, 123-126. (査読有り)

駒井三千夫、白川仁 無菌ラットにおけるビタミン K 欠乏ストレス応答反応 無菌生物 (2011) **41**, 61-68. (査読有り)

Ito A, Shirakawa H, Takumi N, Minegishi Y, Ohashi A, Howlader ZH, Ohsaki Y, Sato T, Goto M, Komai M. Menaquinone-4 enhances testosterone production in rats and testis-derived tumor cells. *Lipid Health Dis.*, 2011, 10, 158. DOI: 10.1186/1476-511X-10-158 (査読有り)

Takumi N, Shirakawa H, Ohsaki Y, Ito A, Watanabe T, Giriwono PE, Sato T, Komai M. Dietary vitamin K ameliorates the reduction in testosterone production induced by LPS administration in rat testis. *Food Func.*, 2011, 2, 406-411. DOI: 10.1039/C1FO10058K (査読有り)

〔学会発表〕(計 23 件)

加藤綾華、白川仁、後藤知子、駒井三千夫 核内受容体 PXR を介したビタミン K2 による遺伝子発現調節機構の解析 第 48 回日本栄養・食糧学会東北支部大会 2014 年 11 月 1 日 東北大学両宮キャンパス(宮城県・仙台市)

駒井三千夫 血液凝固や骨形成以外にも重要なビタミン K のはたらき 日本油化学会関東支部・日本ビタミン学会共催 市民公開セミナー2014 2014 年 10 月 25 日 アステイ 45 (北海道・札幌市)

加藤綾華、前田美里、白川仁、後藤知子、駒井三千夫 LS180 細胞を用いたビタミン K2 による PXR を介した遺伝子発現調節機構の解析 2014 年 10 月 17 日 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会議場(京都府・京都市)

平原啓甫、白川仁、曾根英行、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビタミン K 欠乏食が、KK-Ay マウスのインスリン分泌能および耐糖能に及ぼす影響 日本ビタミン学会第 66 回大会 2014 年 6 月 13 日 姫路商工会議所(兵庫県・姫路市)

平原啓甫、白川仁、曾根英行、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビタミン K 欠乏食給餌が遺伝的糖尿病モデルマウスの膵臓および肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学 2014 年 5 月 31 日(北海道・江別市)

何欣蓉、吉田理紗、前田美里、白川仁、駒井三千夫 Clarifying the mechanism of enhanced testosterone production by menaquinone-4 and geranylgeraniol. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学 2014 年 5 月 31 日(北海道・江別市)

白川仁、平原啓甫、後藤知子、駒井三千夫 ビタミン K 欠乏食による KK-Ay マウスのインスリン分泌能・感受性の変化 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 30 日 明治

大学(神奈川県・川崎市)

平原啓甫、白川仁、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビタミン K 欠乏食給餌が KK-Ay マウスの膵臓および肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響 日本ビタミン学会第 65 回大会 2013 年 5 月 17 日、一橋大学一橋講堂(東京都・千代田区)

駒井三千夫、白川仁 メナキノ-4 (MK-4) 変換生成の意義とビタミン K 同族体の生理機能 日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム 2013 年 3 月 27 日 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

平原啓甫、白川仁、齋藤正頼、Giriwono PE、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 KK-Ay マウスの糖代謝に及ぼすビタミン K 欠乏食の影響 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 25 日 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

平原啓甫、白川仁、齋藤正頼、Giriwono PE、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 遺伝的糖尿病モデルマウスの糖代謝に及ぼすビタミン K 欠乏食の影響 第 46 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会 2013 年 1 月 25 日フォーラム 246 (神奈川県・伊勢原市)

桂井朋子、白川仁、松塚健太郎、阿部伎、仲川清隆、宮澤陽夫、駒井三千夫 ヒト由来培養細胞を用いたビタミン K 生体内変換反応の側鎖基質の解析 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Giriwono PE、Shirakawa H、Ohsaki Y、Hata S、Kuriyama H、Sato S、Goto T、Komai M Geranylgeraniol supplementation suppresses LPS-induced NF-κB signal transducers activation in THP-1 cells and rats. BioMed Central Conference, Metabolism Diet and Disease 2012 年 6 月 29 - 31 日 Washington DC, USA

吉田理紗、白川仁、伊東あさぎ、Giriwono PE、駒井三千夫 ゲラニルゲラニオールによるテストステロン産生促進 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 2012 年 5 月 19 日 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

桂井朋子、白川仁、松塚健太郎、仲川清隆、宮澤陽夫、駒井三千夫 ヒト由来培養細胞を用いたメナキノ-4 変換生成系の確立とビタミン K 変換機構の解析 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 2012 年 5 月 19 日 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

平原啓甫、白川仁、齋藤正頼、Giriwono PE、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 KK-Ay マウスにおけるビタミン K1 欠乏状態と糖代謝の関係 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 2012 年 5 月 19 日 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

吉田理紗、白川仁、伊東あさぎ、Giriwono PE、駒井三千夫 マウス精巢由来細胞におけるゲラニルゲラニオールの男性ホルモン産生促進 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日 京都女子大学(京都府・京都市)

平原啓甫、白川仁、齋藤正頼、Giriwono PE、桂井朋子、後藤知子、駒井三千夫 ビタミン K 欠乏食給餌が KK-Ay マウスの糖代謝に及ぼす影響 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日 京都女子大学(京都府・京都市)

桂井朋子、白川仁、仲川清隆、宮澤陽夫、駒井三千夫 ヒト培養細胞におけるメナキノ-4 変換生成系の確立と変換機構の解析 第 45 回日本栄養・食糧学会東北支部大会 2011 年 10 月 29 日 岩手大学農学部(岩手県・盛岡市)

桂井朋子、白川仁、仲川清隆、宮澤陽夫、駒井三千夫 ヒト肝癌由来細胞を用いたメナキノ-4 変換生成系の確立と変換機構の解析 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日 国立京都国際会議場(京都府・京都市)

②Giriwono PE、Shirakawa H、Hata S、Kuriyama H、Sato S、Goto T、Komai M Geranylgeraniol improves insulin sensitivity in KK-Ay mice fed high fat diet. 第 63 回日本ビタミン学会大会 2011 年 6 月 4 日 安田女子大学(広島県・広島市)

②Giriwono PE、Shirakawa H、Ohsaki Y、Hata S、Kuriyama H、Sato S、Goto T、Komai M Geranylgeraniol supplementation suppresses LPS-induced NF-κB signal transducers activation in THP-1 cells and rat. 第 65 回日本栄養・食糧学会大会 2011 年 5 月 14 日 お茶の水女子大学(東京都・文京区)

③渡邊貴哉、大崎雄介、白川仁、駒井三千夫 マクロファージ細胞における、ビタミン K の NF-κB 活性化阻害 第 65 回日本栄養・食糧学会大会 2011 年 5 月 14 日 お茶の水女子大学(東京都・文京区)

〔図書〕(計 2 件)

白川仁 -6-5) ビタミン K の抗炎症作用 287 (120-127) ビタミン K と疾患 - 基礎の理解と臨床への応用 - 2014 年 11 月 岡野登志夫編、医薬ジャーナル社

白川仁 第 7 章 ビタミンの栄養 163 (107 - 122) 基礎栄養学 2013 年 3 月 駒井三千夫、正木恭介編 アイ・ケイコーポレーション

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 仁 (SHIRAKAWA, Hitoshi)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40206280

(2) 研究分担者

駒井 三千夫 (KOMAI, Michio)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80143022

後藤 知子 (GOTO, Tomoko)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00342783

(3) 連携研究者

()

研究者番号：