

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790110

研究課題名（和文） 脳におけるビタミンK生合成機構と脳神経変性疾患との関連性の解明

研究課題名（英文） The vitamin K biosynthetic mechanism in brain and its relevance to neurodegenerative disease

研究代表者

中川 公恵 (NAKAGAWA KIMIE)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90309435

研究成果の概要（和文）：血液凝固や骨形成に重要な役割を担うビタミン K は、これまで栄養素として摂取したものが生体で作用していると考えられていた。しかし、申請者は摂取したビタミン K が生体内でビタミン K<sub>2</sub>（メナキノン-4）に変換されることを明らかにし、それを担う酵素「メナキノン-4 生合成酵素」を見いだすことに世界で初めて成功した (*Nature* 2010)。本研究では、生体内でメナキノン-4 が生合成される生理的意義を解明し、特に脳神経変性疾患との関連性を調べ、「メナキノン-4 生合成酵素」およびそれにより生成するメナキノン-4 が、脳神経細胞の生存性や機能に重要な役割を担うことがわかった。

研究成果の概要（英文）：Vitamin K is a cofactor for  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX), which catalyses the post-translational modifications of several vitamin K-dependent proteins, such as coagulation factors, osteocalcin and matrix Gla protein. We recently confirmed that the PK to MK-4 conversion took place in slice culture of mouse cerebra and primary culture of mouse cerebral hemispheres. Moreover, we identified MK-4 biosynthetic enzyme [UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1)]. In this study, we analyzed the function of MK-4 biosynthetic enzyme in brain and the relationship of vitamin K and neurodegenerative disease. As a result, we indicated that MK-4 and MK-4 biosynthetic enzyme may have a important rule in brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子栄養学

## 1. 研究開始当初の背景

天然に存在するビタミン K は、植物性食品に広く分布するビタミン K<sub>1</sub>（フィロキノン：PK）と乳・獣肉類や発酵食品に分布するメナキノン類（メナキノン-n, MK-n）に大別される。フィロキノンとメナキノン類は、2-メチル-1,4-ナフトキノン環を共通構造として、前者は 3 位にフィチル基、後者は 3 位にイソプレニル基をもつ構造類似体である。いずれも血液凝固因子の活性化（グラ化）に働く  $\gamma$ -

グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として等しい生理活性を有する。通常、食事から摂取するビタミン K の大部分 (90% 以上) はフィロキノンであり、健常者においてビタミン K 同族体の中で最も高い血中濃度を示す。しかし、組織中に存在するビタミン K の大部分 (90~95%) は、イソプレニル単位が 4 個重合した側鎖（グラニルグラニル）をもつメナキノン-4 (MK-4；ビタミン K<sub>2</sub>) である。このことから、古くより摂取したフ

フィロキノンがメナキノン-4に変換されている可能性が高いと示唆されていた。しかし、メナキノン-4が本当に生体内でフィロキノンから合成されるのかという事実およびそのメカニズムは全く解明されていなかった。

そこで申請者らは、メナキノン-4が合成される事実およびその機構を解明するため、フィロキノンおよびイソプレノ単位が多数重合したメナキノン類の重水素標識化合物を独自に合成し、これら化合物すべてが、重水素標識メナキノン-4へ変換され、組織に蓄積することを動物実験で証明した (Nakagawa K., *J.Biol.Chem.* 283, 11270-11279 (2008))。特に、マウスでは大脳内に MK-4 のみが高濃度に存在することを明らかにし、脳組織のスライス培養や神経細胞といった *in vitro* においてもメナキノン-4 が生合成されることを明らかにした。

しかし、生体内でメナキノン-4を生合成する機構やそれを担う酵素に関する研究は全く行われておらず、どのようにメナキノン-4が生合成されているのかは不明であった。そこで申請者は、摂取したフィロキノンやメナキノン類が、メナキノン-4に変換される反応が、菌類がメナキノン類を合成する際に関与する酵素反応と一部共通するのではないかと推察し、菌類におけるメナキノン類合成酵素と相同性の高いヒトの遺伝子をデータベースから検索した。その結果、メナキノン-4を生体内で生合成する酵素遺伝子「MK-4 生合成酵素」を見出すことに世界で初めて成功した。この「MK-4 生合成酵素」は、これまで機能が全く不明であったタンパク質であったが、申請者らの研究により、ヒトの生体内でメナキノン-4を特異的に生合成する酵素であることが初めて明らかとなった。この成果は *Nature* 誌に受理され高い評価を得ている (Nakagawa K., *Nature* 2010)。

申請者が見いだした「MK-4 生合成酵素」は、全身の組織に発現しており、この酵素を欠失させた細胞ではメナキノン-4は全く合成されない。また、「MK-4 生合成酵素」の発現量が非常に高い臓器ではその酵素発現量に比例してメナキノン-4の存在量も高いことから (*Nature* 2010)、各組織において必要量のメナキノン-4を作り出すシステムが存在することが推測される。特に脳では、メナキノン-4が高濃度に存在し、脳神経細胞のニューロンやアストロサイトに「MK-4 合成酵素」が発現しており MK-4 の生合成を行っている。このことから、脳神経細胞や脳機能にメナキノン-4および「MK-4 生合成酵素」が極めて重要な役割を担っていると考えられる。しかし、脳に多く存在するメナキノン-4について、脳における生理作用は全く明らかにされていない。そこで本研究では、メナキノン-4が生体内で生合成される生理的意義を特に脳

に焦点を当てて解明する。

## 2. 研究の目的

本研究では、次に示す点にポイントを絞り、遺伝子・タンパク・細胞レベルからヒト検体を用いた病態との関連性の解析までを網羅的に行う。

●「メナキノン-4 生合成酵素」は全身に発現しているが、その発現がどのような因子により制御されているのかは明らかではない。組織ごとに発現量が大きく異なるから、組織特異的な発現制御がなされていると考えられる。そこで、「メナキノン-4 生合成酵素」遺伝子のプロモーター解析を行い、本遺伝子の発現を特異的に制御する因子・機構を解明する。

●「メナキノン-4 生合成酵素」は、申請者らが初めて機能を明らかにした酵素であることから、その酵素の活性ドメインや基質認識領域などは未だ不明である。そこで、本酵素の構造的特徴および酵素活性中心を解明するため、本酵素の point mutant および deletion mutant を作製し、酵素としての構造的特徴の解明を行う。

●脳におけるメナキノン-4の生理作用が全く明らかにされていないことから、脳に焦点を絞り、脳組織のどの部位に「メナキノン-4 生合成酵素」が存在しているのか、どの部位でメナキノン-4 生合成活性が高いのか、加齢に伴い「メナキノン-4 生合成酵素」量に変化するのかを調べる。

●脳を構成する細胞は、胎生期において神経幹細胞から分化して形成されることから、脳神経細胞の形成過程でメナキノン-4が何らかの作用を担っている可能性が高いと考えられる。したがって、未分化神経幹細胞の神経細胞分化に対する影響を調べ、神経細胞形成に関与しているかを明らかにする。これに加え、神経細胞は酸化ストレスに脆弱であることを考えると抗酸化効果のあるメナキノン-4は、神経細胞を細胞死から保護する役割を担っている可能性は十分にあると推察されることから、酸化ストレスに対する神経細胞保護作用についても検討を行う。

●脳神経変性疾患との関連性については、これまでにアルツハイマー型認知症患者において、健常者に比べ血中ビタミン K 濃度が低値であるという疫学研究報告はあるが、脳内在性ビタミン K が脳神経変性疾患に関与するのことは明らかでない。申請者らの研究成果から、ヒト組織 (特に脳) には MK-4 が高濃度に存在することが予想され、脳神経変性疾患の発症や予防・治療にメナキノン-4および「MK-4 生合成酵素」が関与している可能性は高いと推察される。そこで、ヒトの脳組織におけるビタミン K 含有量 (特に MK-4 濃度) を測定し、同時に「MK-4 生合成酵素」やメ

ナキノ-4 が特異的に作用する核内受容体 (steroid and xenobiotic receptor; SXR)、ビタミン K の酸化還元に関与する酵素の発現を解析し、脳においてメナキノ-4 を生合成する意義および脳内での役割、脳神経変性疾患発症とメナキノ-4 生合成機構の関連性の解明を目指す。また、アルツハイマー型認知症モデルマウスを用いて、脳におけるメナキノ-4 生合成活性の変化を調べると共に、ビタミン K 投与によるアルツハイマー型認知症治療効果を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) 「メナキノ-4 生合成酵素」の発現制御機構およびタンパク質構造の解析

●プロモーター解析：本酵素のプロモーター領域を明らかにし、その発現を制御する因子を同定するため、ゲノム DNA より本酵素の転写開始点上流をクローニングし、Luciferase レポーターベクターに組み込んだ後、5' 末端より deletion を行いプロモーター領域を特定した。転写制御因子については本酵素のプロモーター領域の塩基配列から予想される因子を探索するとともに、特定の領域に変異あるいは deletion を加え、転写活性に変化が見られるかを調べた。また、様々な転写活性化あるいは阻害リガンドを用い、これら化合物による転写活性化あるいは抑制効果を調べた。本酵素は組織特異的に発現量が制御されている可能性が高いことから、種々の組織由来細胞を用いてプロモーター活性を評価した。特に強くプロモーターを活性化する細胞を用いて、DNA-pull down assay によりプロモーター領域に特異的に結合する転写因子を精製し、SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS 解析により、転写因子の同定を行う。

●タンパク質構造解析：本酵素は膜貫通構造を有し細胞小胞体に発現するタンパク質であるが、アミノ酸配列のどの部位がメナキノ-4 の生合成を担う領域であるのか、基質認識領域であるのかは全く不明である。しかし、本酵素のヒトにおける SNP および SNP が原因とされる疾患発症が報告されていることから、本酵素の機能に重要な構造部位が予想される。そこで、SNP データベースおよび本酵素と類似 (あるいは相同性が高い) 酵素とのホモロジー解析によって、鍵となるアミノ酸領域を特定し、その部位に点変異を加えた発現ベクターを構築する。これを昆虫細胞である Sf9 細胞に Baculovirus を用いて遺伝子導入し、タンパク質を精製後、in vitro でのメナキノ-4 生合成活性を評価する。これにより特定の酵素活性変化が得られた領域を中心に基質認識能を解析する。点変異解析の結果を基に、酵素活性発現に重要な領域および基質認識に重要な領域・アミノ酸の同定を行

う。

(2) 「メナキノ-4 生合成酵素」の脳神経細胞における発現およびメナキノ-4 の脳における作用解析

●脳神経細胞は、未分化神経幹細胞から様々な因子によりニューロンやそれを支持するグリア細胞 (アストロサイト, オリゴデンドロサイト) へと分化することで形成される。脳の高次構造が正常に形成されるためにはこれらニューロンやグリア細胞の形成過程は極めて重要である。そこで、神経細胞の分化に対するビタミン K の作用について、マウス胎仔大脳より単離した初代培養神経幹細胞を用いて解析を行う。ニューロンには microtubule-associated preotein 2 (MAP2) が、アストロサイトには glial fibrillary acidic protein (GFAP) が発現することから、これらに対する特異抗体を用いて、蛍光免疫染色により分化の状態を評価する。また、「MK-4 生合成酵素」特異的 siRNA を導入することにより、メナキノ-4 生合成能を欠損させた神経幹細胞を作製し、神経幹細胞の分化とメナキノ-4 生合成との関係を調べる。メナキノ-4 処理により神経幹細胞がニューロンあるいはアストロサイトに分化した場合には、DNA マイクロアレイによりメナキノ-4 処理により発現変動する因子を同定し、作用機序の解明を行う。

●脳は非常に高濃度に酸素を消費する臓器であり、神経細胞は酸化ストレスに対し脆弱である。したがって、脳神経細胞を酸化ストレスから保護することは、神経細胞の生存性を維持する上で極めて重要である。ビタミン K には、ビタミン E などと同様に抗酸化効果があることから、脳内でメナキノ-4 を生合成することは、酸化ストレスの回避に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、酸化ストレス下の神経細胞におけるメナキノ-4 の神経細胞保護作用、「MK-4 生合成酵素」発現を欠損させた神経細胞の酸化ストレスに対する応答性を解析する。

(3) ヒト脳における「メナキノ-4 生合成酵素」の発現およびメナキノ-4 濃度に関するアルツハイマー認知症との関連性解析

ヒト脳検体は、東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンクより提供いただいた。ヒト脳検体からビタミン K を抽出し、LC-APCI-MS/MS により定量を行った。遺伝子発現については、脳組織より RNA を抽出し、「メナキノ-4 生合成酵素」およびビタミン K の生理作用に関与する因子を網羅的に解析する。健常高齢者とアルツハイマー型認知症患者とともに、脳の測定部位としては、アルツハイマー病変が見られる前頭葉に加え、後頭葉、側頭葉、小脳について分析を行う。

### 4. 研究成果

「メナキノ-4 生合成酵素」の組織特異的な発現制御を明らかにするため、本酵素のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターを構築した。これを用いて「メナキノ-4 生合成酵素」遺伝子のプロモーター解析を行った。その結果、プロモーター領域の特定に成功した。エンハンサー領域と予想される配列をデータベース解析し、エンハンサー領域として特定の転写因子が結合する配列を見出した。またこの領域に結合する転写因子について、発現ベクターを構築し、プロモーター活性を促進する因子であることを確認した。

「メナキノ-4 生合成酵素」の酵素活性ドメインや基質認識領域など、本酵素の構造的特徴および酵素活性中心を解明するため、本酵素の point mutant および deletion mutant を作製し、酵素としての構造的特徴の解明を行った。これまでに本酵素について SNP が報告されているアミノ酸をターゲットに point mutation を行い、バキュロウイルス発現系ベクターに導入したのち、Sf9 細胞にインフェクションしてこの細胞におけるメナキノ-4 生合成活性を評価した。その結果、数種の mutant において、活性が上昇するものと逆に活性が消失するものが見いだされた。

脳神経細胞の形成過程におけるメナキノ-4 の作用について、未分化神経幹細胞の神経細胞分化に対する影響を調べた結果、メナキノ-4 をはじめとして、数種のビタミン K 同族体に神経幹細胞をニューロンへ分化誘導する作用があることが明らかとなった。また、酸化ストレスに対する神経細胞保護作用についても検討した結果、メナキノ-4 存在下では細胞の生存率が向上することがわかった。

ヒト脳における「メナキノ-4 生合成酵素」の発現およびメナキノ-4 濃度に関するアルツハイマー認知症との関連性を解析するため、ヒト脳検体を東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンクより提供いただき、健常高齢者とアルツハイマー型認知症高齢者の脳検体におけるビタミン K 濃度の定量を行った。その結果、アルツハイマー型認知症高齢者の脳では健常者に比べ、メナキノ-4 濃度が有意に低下していることがわかった。また、「メナキノ-4 生合成酵素」 mRNA 発現量を定量した結果、その発現量も有意に低いことがわかった。また、脳神経細胞における「メナキノ-4 生合成酵素」の機能を解析し、神経細胞の分化を制御する作用があることがわかった。さらに、「メナキノ-4 生合成酵素」が認識する基質リガンドの特性の解析を行い、メナキノ-4 への変換効率の高いリガンドおよび阻害効果を持つリガンドを見いだした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Yoshitomo Suhara, Masato Watanabe, Kimie Nakagawa, Akimori Wada, Yoichi Ito, Kazuyoshi Takeda, Kazuhiko Takahashi, and Toshio Okano, Synthesis of novel vitamin K2 analogues with modification at the  $\omega$ -terminal position and their biological evaluation as potent steroid and xenobiotic receptor (SXR) agonists. J. Med. Chem. 54(12), 4269-4273 (2011).

DOI: 10.1021/jm200025f

(2) Yoshitomo Suhara, Masato Watanabe, Sayaka Motoyoshi, Kimie Nakagawa, Akimori Wada, Kazuyoshi Takeda, Kazuhiko Takahashi, Hiroaki Tokiwa, and Toshio Okano, Synthesis of New Vitamin K Analogues as Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) Agonists: Insights into the Biological Role of the Side Chain Part of Vitamin K. J. Med. Chem. 54(13) 4918-4922 (2011).

[学会発表] (計 13 件)

① 中川公恵, 廣田佳久, 澤田夏美, 弓削直人, 須原義智, 岡野登志夫 「ビタミン K2 (Menaquinone-4) 生合成酵素の発見」日本ビタミン学会第 63 回大会 (2011 年 6 月 4 日 広島)

② 中川公恵, 廣田佳久, 澤田夏美, 内野由理, 須原義智, 岡野登志夫 「Identification of human menaquinone-4 biosynthetic enzyme.」FASEB SUMMER CONFERENCE 2011 Molecular, Structural & Clinical Aspects of Vitamin K & Vitamin K-Dependent Proteins (2011 年 6 月 26 日 - 7 月 1 日 Carefree, Arizona)

③ 中川公恵, 廣田佳久, 澤田夏美, 内野由理, 須原義智, 岡野登志夫 「ビタミン K2 (Menaquinone-4) 生合成酵素 UBIAD1 の同定」第 29 回日本骨代謝学会 (2011 年 7 月 28 日 大阪)

④ 中川公恵, 廣田佳久, 澤田夏美, 内野由理, 須原義智, 岡野登志夫 「ビタミン K2 (メナキノ-4) 生合成酵素の構造と機能解析」第 14 回日本骨粗鬆症学会 (2011 年 11 月 4 日 神戸)

⑤ 中川公恵 「ビタミン K 代謝の分子機構～メナキノ-4 生合成機構の解明～」日本ビタミン学会第 63 回大会 (招待講演) (2011 年 6 月 4 日 広島)

⑥ 中川公恵 「Biosynthesis of Vitamin K2 (Menaquinone-4) and Its Biological Significance」第 29 回日本骨代謝学会 (招待講演) (2011 年 7 月 29 日 大阪)

⑦ 中川公恵 「New Development of Vitamin K

Research: Identification of human menaquinone-4 biosynthetic enzyme.] 2011 International Conference of Food Factors(招待講演)(2011年11月22日台北,台湾)

⑧中川公恵、山下涼子、大永美智子、須原義智、岡野登志夫「ビタミンKの胎盤通過性および胎盤内変換」日本ビタミン学会第64回大会(2012年06月23日岐阜)

⑨中川公恵、内野由理、須原義智、岡野登志夫「ビタミンKの胎盤通過性および胎盤におけるメナキノ-4生合成活性」第30回日本骨代謝学会(2012年07月19日東京)

⑩中川公恵、内野由理、須原義智、岡野登志夫「Substrate Recognition of Human Menaquinone-4 Biosynthetic Enzyme UBIAD1」ASBMR 2012 Annual Meeting(米国骨代謝学会)(2012年10月14日米国・ミネソタ州)

⑪田代紘章、佐々木 彩、小川真理奈、中原亜紀、中川公恵、岡野登志夫「神経細胞分化におけるビタミンK生合成酵素 UBIAD1 の機能解析」第62回日本薬学会近畿支部大会(2012年10月20日西宮)

⑫中川公恵「ビタミンKの体内変換とその分子栄養学的意義」第20回母子医療センターシンポジウム「病態栄養学のフロンティア」(招待講演)(2013年02月21日大阪)

⑬中川公恵「ビタミンKの生体内活性化とその意義」日本薬学会第133年会(招待講演)(2013年03月30日横浜)

[図書](計1件)

(1) 中川公恵、シーエムシー出版、ビタミンの科学と最新応用技術 [ビタミン K<sub>2</sub> 誘導体の開発] 115-123 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~hygi-sci>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川公恵 (NAKAGAWA KIMIE)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90309435

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし