

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460085

研究課題名(和文) 脳神経特異的新規ビタミンK2合成酵素欠損マウスを用いたビタミンKの脳機能解析

研究課題名(英文) Generation and characterization of brain-specific UBIAD1-deficient mice using a nestin

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経幹細胞の時点からUbiad1欠損となるNestin-cre Ubiad1-CKO (CKO) マウスを作成した。このCKOマウスは、正常に出生したが成長遅延が認められた。10週齢における脳組織中Ubiad1発現およびMK-4濃度は著しく低値が検出限界以下であり、CKOマウスでは、脳組織全体でUBIAD1が欠損しMK-4欠乏となった。また、脳機能では短期記憶能力、恐怖心、運動協調性の低下が観察され、脳組織解析により小脳萎縮とプルキンエ細胞の消失が観察された。このことから、脳神経系においてUBIAD1およびMK-4は特に小脳の構造機能維持に必須の役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we created Nestin-cre Ubiad1-CKO mice which were Ubiad1 deficient from the time of neural stem cell. Nestin-cre Ubiad1-CKO was born normally, but these mice were slightly smaller than that of the wild type mice. We measured the Ubiad1 expression and MK-4 concentration in brain tissue at 10 weeks of age. Ubiad1 expression was remarkably low or below the detection limit in any brain tissues. MK-4 concentration was also remarkably low or below the detection limit. We evaluated the brain functions by behavior analysis for 9 to 10 week old Nestin-cre Ubiad1-CKO mice. As a result, short-term memory, anxiety and motor coordination was decreased in Nestin-cre Ubiad1-CKO mice. Moreover, the brain tissue of Nestin-cre Ubiad1-CKO mouse revealed cerebellar atrophy and disappearance of cerebellar Purkinje cells. Therefore, it was suggested that UBIAD1 and MK-4 play an essential role in maintaining structural and function in the cerebellar.

研究分野：分子栄養学

キーワード：ビタミンK UBIAD1 メナキノン-4 Nestin-cre 脳神経 コンディショナルノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は、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、天然に存在するビタミン K は、植物に含まれるビタミン K₁ (フィロキノン:PK) と細菌が合成するメナキノン類 (MK-n) がある。両者は、2-メチル-1,4-ナフトキノン環を共通構造とし、3 位炭素に PK ではフィチル側鎖が、MK-n ではイソプレニル単位の繰り返し構造 (n=1~14) からなるイソプレニル側鎖が結合した構造を持つ。一般に、ビタミン K は血液凝固に必要で、骨形成にも働いているということは認識されているが、脳機能に関連するの否かについては十分な解析がなく、全くわかっていない。

ヒトは、主に緑黄色野菜に由来する PK や納豆などの発酵食品に含まれる MK-7 を食事から摂取しており、動物性食品に含まれる MK-4 の摂取量は極めて微量である。ラットやマウスでは、飼育飼料中のビタミン K はメナジオン (K₃) である。しかし、ヒトやマウス、ラットの組織中には摂取量が極めて微量である MK-4 が最も高濃度に存在する。特に脳内の MK-4 濃度は非常に高い。しかしなぜ摂取していない MK-4 が組織内に多く存在するのかは全く解明されていなかった。そこで申請者らは、重水素で 1,4-ナフトキノン環や側鎖を標識した PK および MK-n を独自に合成し、これをマウスに経口投与して脳内で MK-4 への変換が起こることを科学的に証明 (Nakagawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2008) した。さらに 2010 年には、この変換を担う鍵酵素が UbiA prenyltransferase containing 1 (UBIAD1) であることを世界に先駆けて初めて同定することに成功した (Nakagawa *et al.*, *Nature*, 2010)。MK-4 合成酵素である UBIAD1 は、338 個のアミノ酸からなる 36.8kDa の小胞体およびゴルジ体膜上に局在する膜タンパク質で、この酵素をコードする遺伝子は、ヒト 1 番染色体 1p36.22 に存在する。UBIAD1 はゲノムデータベースにその存在は登録されていたが、機能については全く未知であり、申請者の研究により「MK-4 を生合成する酵素」であることが明らかとなった。申請者らの研究から、UBIAD1 はほぼ全身の組織に発現すること、その発現量と MK-4 合成活性および組織内 MK-4 濃度が極めてよく相関することなどが判明している。これまでに、UBIAD1 はヒトのシュナイダー角膜ジストロフィー (Schnyder crystalline corneal dystrophy: SCD) の原因遺伝子であることが報告されており、その点変異により角

膜実質にコレステロールが沈着して白く濁り、視力障害が発生することが報告されている。ヒトでは眼以外の臓器で機能異常は報告されていない。しかし、UBIAD1 は種を超えて高度に保存されている遺伝子であり、菌類では、MK-n が膜における電子キャリアとして機能するため、UBIAD1 ホモログである MenA が欠如すると菌は生育不能となる。また、ショウジョウバエでは、UBIAD1 のホモログである Heix が変異することで、パーキンソン病関連遺伝子である Pink1 を変異させた場合と全く同様にミトコンドリアの電子伝達が破綻する (Vos M. *et al.*, *Science* 2012,)。また、この Heix 変異体と Pink1 変異体で認められるミトコンドリア破綻は、MK-4 を供給することで完全に抑制されることも報告されている。これは、MK-4 がミトコンドリアにおける電子伝達系の維持に重要な役割を担っていることを示すものであり、UBIAD1 や MK-4 がパーキンソン病発症予防に関与することが示唆されている。この他に、ビタミン K とパーキンソン病を関連づける報告としては、パーキンソン病患者では血中のビタミン K 濃度が有意に低値であることも挙げられる。また、UBIAD1 の変異や欠損により細胞内にコレステロールが高濃度に蓄積するが、アルツハイマー病の発症要因の 1 つに高コレステロールが関係することが報告されていることを考えると、UBIAD1 の機能がアルツハイマー病の発症にも何らかに関連すると考えられる。申請者は、これまでに未分化神経幹細胞に対し MK-4 を処理すると、用量依存的にニューロンへの分化が促進されること、神経細胞の生存性が著しく更新することを見出している。これらのことから、脳における UBIAD1 および MK-4 の機能を解明することは、パーキンソン病やアルツハイマー病などの脳神経変性疾患に新たな知見を与えるだけでなく、ビタミンという栄養素の観点から見た予防・治療法の提示に繋がる。

申請者らが 2010 年の *Nature* 誌に UBIAD1 が MK-4 合成酵素であることを報告して以降、UBIAD1 遺伝子変異に関する研究やゼブラフィッシュおよびショウジョウバエでの UBIAD1 ホモログに関する研究報告は、相次いで *Science*、*Cell*、*Development*、*PLoS One* などの雑誌で発表されている。しかしながら、哺乳動物の UBIAD1 に関する研究や遺伝子欠損マウスに関する報告は未だなく、細胞から個体レベルまで UBIAD1 と MK-4 の機能に特化した研究を行っているのは国内外を通して他にはない。とりわけ、UBIAD1 と MK-4

の脳神経における機能の解明を行う本研究は、ビタミン K の新たな作用メカニズムや生理的意義の解明、UBIAD1 遺伝子の変異に伴う脳疾患の探索や病態解明にも繋がるものであるといえる。

2. 研究の目的

申請者は、全身性に UBIAD1 を欠損させたマウスの作出を試みたが、UBIAD1 が全身で欠損すると胎生 7 日までに致死となる結果が得られている。このことは、正に UBIAD1 が個体発生および生存に必須の因子であることを示している。そこで本研究では、この全身性 UBIAD1 ヘテロ欠損マウスの受精卵より ES 細胞（野生型、ヘテロ、ホモ）を樹立し、細胞レベルでの機能解析を試みる。ES 細胞は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの神経細胞へ分化させることができることから、神経細胞分化能を評価し UBIAD1 欠損に伴う変化を解析する。また、全身性 *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスが胎生致死であること、UBIAD1 および MK-4 の脳における機能に絞った解析を行う必要性から、脳神経細胞で特異的に UBIAD1 が欠損したコンディショナルノックアウトマウスの作出を行う。脳神経特異的 UBIAD1-CKO マウスの作出は、Cre/loxP システムにより脳神経特異的に UBIAD1 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(CKO マウス)を作製し、個体レベルで UBIAD1 および MK-4 の脳における機能の解析を行う。CKO マウスについては、胎生期から成熟期まで経時的に脳における UBIAD1 の発現レベルおよび発現部位を解析するとともに、UBIAD1 欠損に伴う MK-4 合成能低下状況の解析、脳機能変化の解析、CKO マウス脳組織および神経細胞の発現遺伝子の網羅的解析を行う。また、脳組織特異的に UBIAD1 が欠損したマウスは、脳内で MK-4 合成が起これないと予想されるため、この CKO マウスを用いてビタミン K の脳内移行機構の解明も行う。

3. 研究の方法

Ubiad1 遺伝子は 2 つの exon から成るが、この exon1 を挟む形で loxP 配列を組み込んだ floxed マウス (flox/+マウス) の作出をすでに実施し、flox/+マウスを得ている。この flox/+マウスの雌雄を交配することにより flox/flox マウスを作出するとともに、flox/+マウスと脳神経細胞で特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配し、flox/+, cre/+のダブルヘテロマウスを作製した。この flox/flox マウ

スと flox/+, cre/+マウスの雌雄を交配し、UBIAD1 コンディショナルノックアウトマウス(CKO マウス)を作出した。脳神経系特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとしては、神経幹細胞で Cre を発現する Nestin-cre マウスを用いた。Nestin-cre マウスでは、ニューロンだけでなくグリア系の細胞も含めて脳神経細胞全般で UBIAD1 を欠損させることができるため、個体発生段階からの UBIAD1 欠損の影響を評価することができる。またこれに加え、ニューロン特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Synapsin-cre マウスを用いて、ニューロンにおける UBIAD1 の機能を解析した。Nestin-cre、Synapsin-cre のいずれの CKO マウスについても、まず出生後の発育状態を観察するとともに、8~10 週齢の時点で脳機能の解析を行った。行動解析として、探索行動や危険評価行動などの情動行動が評価する新奇ケージテスト、不安様行動を測定する高架式十字迷路テスト、Y 字迷路テスト、平衡感覚を評価する平行棒試験および水平棒試験などを実施する。また、組織化学的解析としては組織標本を作製し、神経細胞の分布状態および神経細胞ネットワークの形成状態をニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトなどに対する特異抗体で免疫染色することにより評価解析する。脳における UBIAD1 の欠損状態の評価は、免疫組織染色、Real-time PCR により解析した。脳内の MK-4 濃度については、脳組織部位ごとに分けて LC-APCI-MS/MS により定量分析した。

また、これまでに神経幹細胞は MK-4 の刺激により選択的にニューロンへと分化誘導することを明らかにしていることから、UBIAD1 の欠損により神経細胞分化に異常が認められる可能性が非常に高い。そこで、細胞レベルでの解析として、胎生 14 日齢のマウス胎仔大脳より神経幹細胞を単離培養し、ニューロンおよびアストロサイトへの分化能を評価した。分化の程度については、ニューロン特異抗体(抗 MAP2 抗体)やアストロサイト特異抗体(抗 GFAP 抗体)を用いて免疫蛍光染色により評価した。また、初代培養細胞における MK-4 合成活性についても重水素標識ビタミン K 同族体を用いて評価した。

Nestin-cre による UBIAD1 の CKO マウスにおいて、脳機能異常が認められたことから、MK-4 投与のレスキュー効果について検討を行った。レスキュー方法としては、胎生早期から MK-4 を供給するため、雌雄マウスを交配する時点から MK-4 の投与を行い、産仔に

についても投与を継続し、脳神経細胞特異的 UBIAD1 欠損に伴う異常に対する是正効果を評価解析した。しかし、MK-4 の脳への移行性は現在でも全く明らかでなく、申請者らの研究により PK や MK-n などの投与したビタミン K のほとんどは、腸内で側鎖構造が切断された K₃ に代謝されて各組織へ運ばれ、その組織内で UBIAD1 により MK-4 に変換されることが明らかとなっている (Okano T, *et al.* JBC, 2013) のみである。脳内に MK-4 そのものが移行するのであれば、MK-4 投与により脳機能がレスキューされる可能性があるが、MK-4 の脳移行性が低いのであれば、脳内に直接 MK-4 を供給しなければレスキューされないことになる。ビタミン K の脳移行性を明らかにすることは、脳におけるビタミン K の役割を解明するためにも極めて重要である。申請者らは、独自に合成したビタミン K の重水素標識化合物(ビタミン K のナフトキノンの水素を重水素に置換した化合物)を所有しているので、これをマウスに投与し内因的に存在する MK-4 と区別して体内動態の追跡を試みた。

4. 研究成果

本研究において作出した組織特異的 Ubiad1 遺伝子欠損マウスである Nestin-cre Ubiad1-CKO マウス (Nestin-cre Ubiad1-CKO) は、正常に出生したが生後 1 週齢頃より成長遅延が見られ、野生型マウスに比べやや小さく、離乳後以降は常に体重は野生型マウスよりも低値であった。10 週齢における脳組織中 Ubiad1 発現および MK-4 濃度を定量した結果、大脳、中脳、間脳、小脳などいずれの脳組織においても Ubiad1 発現は著しく低値あるいは検出限界以下であった。また、MK-4 濃度も著しく低値あるいは検出限界以下であった。このことから、Nestin-cre Ubiad1-CKO マウスでは、脳組織全体で UBIAD1 が欠損し MK-4 欠乏の状態となっていることが明らかとなった。9~10 週齢の Nestin-cre Ubiad1-CKO マウスを用いて行動解析により脳機能を評価した結果、Y 字迷路試験により短期記憶能力の低下が、高架式十字迷路試験により恐怖心の低下が、平行棒試験および水平棒試験により運動協調性の低下が観察された。そこで、脳組織標本を作製し、組織変化の有無を観察した結果、ヘマトキシリンエオジン染色像において、小脳プルキンエ細胞の消失が観察された。プルキンエ細胞マーカーである Calbindin に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、プルキンエ細胞が

細胞体のみならず軸索も消失していることが観察された。他の神経細胞のマーカーについても免疫組織染色を行ったところ、バークマングリア細胞の減少、アストロサイトマーカーである GFAP の発現の亢進が観察された。さらに、40 週齢の高週齢のマウス脳についても検討した結果、Nestin-cre Ubiad1-CKO マウスでは、小脳の萎縮が著しく亢進し、プルキンエ細胞がほぼ完全に消失していた。このことから、UBIAD1 欠損により脳では特に小脳に異常が発生し、加齢性にその影響が進行することがわかった。

Nestin-cre Ubiad1-CKO マウスは神経幹細胞の時点で UBIAD1 欠損となることから、このマウス胎仔より神経幹細胞を単離し、ニューロンおよびアストロサイトへの分化能を評価した。その結果、ニューロンおよびアストロサイトへの分化は野生型マウスと同様に起こり、分化した細胞の形態にも差異は認められなかった。したがって、UBIAD1 欠損は細胞の分化能には大きな影響はないものと判断された。

また、Nes-cre Ubiad1-CKO マウスにおける脳機能異常が、MK-4 投与により改善されるかについて、雌雄マウスを交配する時点から雌マウスに MK-4 を高用量投与してレスキューを行い、出生後・離乳後には仔マウスへの MK-4 補給を行って評価した。その結果、経口投与によるレスキューでは脳機能異常は全くレスキューされなかった。これは経口投与では脳への MK-4 の移行量が非常に少ないことによると推察された。今後は、脳に直接 MK-4 を持続的に投与する手法により、Nestin-cre Ubiad1-CKO マウスにおける脳機能異常が改善されるかについての評価を試みたいと考えている。

以上、本研究により脳神経における UBIAD1 の欠損は脳機能異常を引き起こし、特に小脳の構造機能維持に必須の役割を担っていることが明らかとなった。

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 4 件)

Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, Uchino Y, Suhara Y, Hasegawa T, Amizuka N, Okamoto T, Tsugawa N, Kamao M, Funahashi N, Okano T. Vitamin K₂ biosynthetic enzyme,

UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One*, 2014; **9**: e104078. 査読あり

Funahashi N, Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Watanabe M, Suhara Y, Okano T. YY1 positively regulates human UBIAD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015; 460: 238-44. 査読あり

Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Okuda N, Suhara Y, Uchino Y, Kimoto T, Funahashi N, Kamao M, Tsugawa N, Okano T. Functional Characterization of the Vitamin K2 Biosynthetic Enzyme UBIAD1. *PLoS One*, 2015; 10: e0125737. 査読あり

Suhara Y, Hirota Y, Hanada N, Nishina S, Eguchi S, Sakane R, Nakagawa K, Wada A, Takahashi K, Tokiwa H, Okano T. Synthetic small molecules derived from natural vitamin K homologues that induce selective neuronal differentiation of neuronal progenitor cells. *J Med Chem* 2015; 58(17), 7088-92. 査読あり

[学会発表](計 9件)

Nakagawa K. 4th International Conference on Clinical and Experimental Ophthalmology (2014.7.15 Baltimore, USA). "Generation and characterization of brain-specific UBIAD1-deficient mice using a nestin promoter-driven cre/loxP strategy"

Nakagawa K., Hirota Y., Tsugawa N., Uchino Y., Suhara Y., Okano T. 2014 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2014.9.14 Houston, USA). "Menaquinone-4 (Vitamin K2) in Bone Originates from Menadione (Vitamin K3) Released from Oral

Phylloquinone (Vitamin K1) During Intestinal Absorption."

中川公恵, 澤田夏美, 廣田佳久, 内野由理, 須原義智, 岡野登志夫 日本薬学会 135 年会 (2015.3.28, 神戸)「ビタミン K₂ 合成酵素 Ubiad1 遺伝子欠損マウスは胎生致死となる」

中川公恵, 澤田夏美, 廣田佳久, 内野由理, 須原義智, 岡野登志夫 日本ビタミン学会第 67 回大会 (2015.6.6, 奈良)「ビタミン K₂ 合成酵素 Ubiad1 遺伝子欠損マウスの表現型解析」

Nakagawa K. FASEB Conference Molecular, Structural & Clinical Aspects of Vitamin K and Vitamin K-Dependent Proteins (July 16, 2015 Itasca, Illinois (USA)) "UBIAD1 knockout mice for insights into the elucidation of MK-4 function in brain"

中川公恵, 澤田夏美, 須原義智, 岡野登志夫 日本薬学会第 136 年会(2016.3.29 横浜)「脳神経系におけるビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 の機能解析」

中川公恵, 澤田夏美, 木本貴士, 須原義智, 岡野登志夫 日本ビタミン学会第 68 回大会 (2016.6.17 富山)「ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 の脳神経系における機能解析」

中川公恵, 泰井麻由奈, 横田衣利, 原香織, 三宅智子, 澤田夏美, 須原義智, 岡野登志夫, 長谷川 潤 日本ビタミン学会第 69 回大会 (2016.6.17 横浜)「脳神経特異的ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの脳機能解析」

中川公恵, 原香織, 三宅智子, 泰井麻由奈, 横田衣利, 澤田夏美, 須原義智, 長谷川 潤, 岡野登志夫 日本薬学会第 137 年会 (2017.3.27 仙台)「脳神経特異的ビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 欠損マウスの表現型解析」

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()