

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560072

研究課題名(和文) ビタミンK体内動態の解明と尿中代謝物を指標とするビタミンK栄養状態評価法の創成

研究課題名(英文) Studies on disposition of vitamin K and development of novel method for nutritional assessment of vitamin K using urine metabolite

研究代表者

鎌尾 まや (Kamao, Maya)

神戸薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：40299087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンK1 (phyllloquinone, PK) 等からビタミンK2 (menaquinone-4, MK-4) への変換過程の中間体であるビタミンK3 (menadione, MD) のLC-MS/MSによる測定法を確立した。本法を用いて、肝臓、腎臓、腸、骨由来の細胞でPKあるいはMK-4からMDが産生することを明らかにした。従って、ビタミンKの側鎖切断反応は比較的広範囲の組織で普遍的な反応であると考えられた。また、MDはヒト尿中では半分程度がグルクロン酸抱合体として、マウス血漿ではグルタチオンあるいはN-アセチルシステイン抱合体の形で存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Determination method for vitamin K3 (menadione, MD) by LC-MS/MS was developed. MD is thought to be an intermediate in the conversion from vitamin K1 (phyllloquinone, PK) to vitamin K2 (menaquinone-4, MK-4). Using this method, we demonstrated that MD was generated from PK or MK-4 in liver, kidney, intestine and bone derived cells. Thus, side-chain cleaving toward vitamin K is assumed to be universal reaction in various tissues. Our results raise the possibility that MD might exist as a glucuronide in human urine mainly and a glutathione or N-acetylcysteine conjugate in mouse plasma.

研究分野：衛生薬学、栄養化学

キーワード：ビタミンK phylloquinone menaquinone-4 menadione 抱合体 尿中排泄

1. 研究開始当初の背景

食事から摂取されるビタミン K は主に緑色野菜に含まれるビタミン K₁ (phylloquinone、PK) であるが、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 は古典的作用である血液凝固のみならず、骨形成やニューロンへの分化誘導など特徴的な作用を持つことから、最近では活性型ビタミン K と位置づけられている。我々は、重水素標識体を用いて、マウス生体内で PK の側鎖が置換されて MK-4 となり、脳、脾臓、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 geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) が結合し、MK-4 が産生すると考えられる。しかし、MD は活性酸素種を発生し毒性を示すことや、血中で未変化体の形でほとんど検出されないことから、何らかの形に変化して血中を循環すると予想される。現在までの研究により、MD が抱合体の形で血中を循環する可能性が示唆されているが詳細は不明である。一方、PK や納豆中に多く含まれるビタミン K 類縁体である MK-7 を摂取したヒトにおいて尿中に MD 抱合体が排泄されること、PK サプリメント摂取者では非摂取者に比べて尿中 MD 抱合体排泄量が増加することが報告されている。従って、尿中 MD 量は総ビタミン K 摂取量および体内でのビタミン K 利用率を反映すると考えられる。また、骨代謝を指標にしたビタミン K 必要量は血液凝固を指標にした場合に比べて多いという疫学調査結果が出ており、骨の健康に配慮したビタミン K 必要摂取量の設定にはより多くの疫学研究が必要である。従って、ビタミン K 摂取量および生体内利用性を反映する簡便なマーカーの開発が望まれる。

2. 研究の目的

ビタミン K の体内動態を解明するために、MK-4 への変換過程における中間体である MD の高感度かつ特異的な測定法を確立する。また、培養細胞を用いた実験系あるいはヒトや実験動物の生体試料中における MD の検出を試みると共に、MD がどのような形で血中を循環しているのか、抱合体に焦点をあてて検討する。さらに、尿中 MD のビタミン K 摂取量マーカーとしての利用可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) MD 測定法の確立

特異性の点で問題が多かった蛍光検出 HPLC 法に代わり、感度、特異性の向上が期

待出来る LC-MS による MD 測定法を検討した。内部標準物質としては、重水素標識体である MD-d₈ を用いた。

(2) 培養細胞における PK あるいは MK-4 からの MD の産生

Hep-G2 細胞 (ヒト肝癌由来)、CL-8 細胞 (ヒト腎臓由来)、LLC-PK₁ 細胞 (ブタ腎臓由来)、Caco-2 細胞 (ヒト結腸腺癌由来)、IEC-6 細胞 (ラット小腸上皮由来)、UMR-106 細胞 (ラット骨芽肉腫由来) および MC3T3-E1 細胞 (マウス骨由来) を用いた。各細胞に、PK あるいは重水素標識体である PK-d₇ あるいは MK-4-d₁₂ を添加し、24 時間培養後、細胞および培地を回収し、MD あるいは重水素標識された生成物である MD-d₇ および MK-4-d₇ 量を LC-APCI/MS 法により測定した。

(3) ヒトおよび実験動物の生体試料中における MD の検出

ヒト尿およびマウス、ラット血漿サンプルにおける MD 検出を試みた。K₂Cr₂O₇ による加水分解処理および β-glucuronidase 処理をおこない、前処理無しの場合と MD の検出量を比較した。

4. 研究成果

(1) MD 測定法の確立

MD は 3 位に側鎖を有する他のビタミン K 化合物とは異なり、ネガティブイオンモードでイオン化した。しかし、MD の構造上、多重反応モニタリング (MRM) に適したフラグメントイオンが得られなかった。そのため、Q1、Q3 共に分子イオンを検出する疑似 MRM により感度、特異性でほぼ満足できる測定法を確立することができた。

(2) 培養細胞における PK あるいは MK-4 からの MD の産生

PK 添加により生成した MD は LC-APCI/MS 法により良好に測定することが可能であった (図 1)。

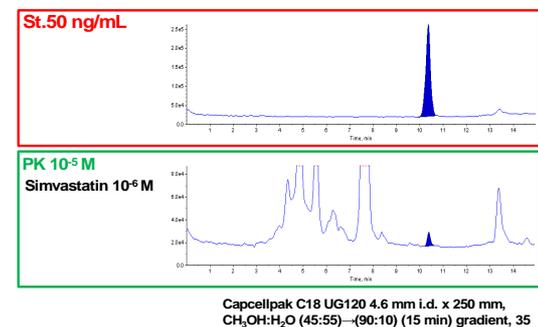


図 1. LLC-PK₁ 細胞より生成した MD の MRM クロマトグラム

HMG-CoA 還元酵素阻害剤である simvastatin により、MK-4 の側鎖構造に相

当する GGPP の供給を抑制した条件で PK を添加したところ、今回検討した全ての細胞において MD の生成が認められた(図 2)。MD は加水分解処理 (-) より (+) で、細胞中より培地中で多く検出された。また、MD の生成は腎臓や小腸由来の細胞で多い傾向を示した。また、骨由来の UMR-106 および MC3T3-E1 細胞でも PK から MD が生成したが、その産生能は他の細胞に比べて低かった。

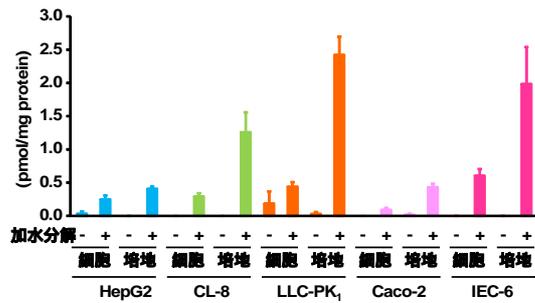


図 2 . PK 添加時の MD 検出量

次に、重水素標識体を用いて、側鎖切断反応を検出したところ、全ての細胞において PK-d₇、MK-4-d₁₂ 添加により MD-d₇ および MK-4-d₇ が生成した(図 3、4)。また、MK-4-d₁₂ 添加時の MD-d₇ 検出量は、小腸由来の IEC-6 細胞で特に高い値を示した。

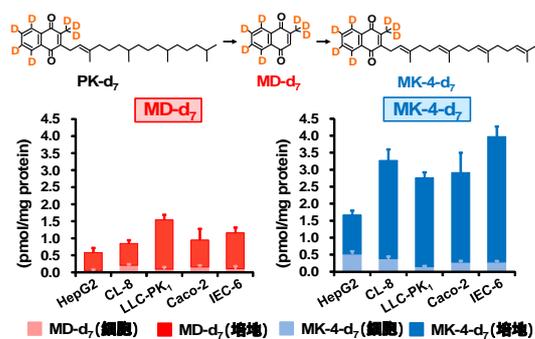


図 3 . PK-d₇ 添加時の MD-d₇ および MK-4-d₇ 検出量

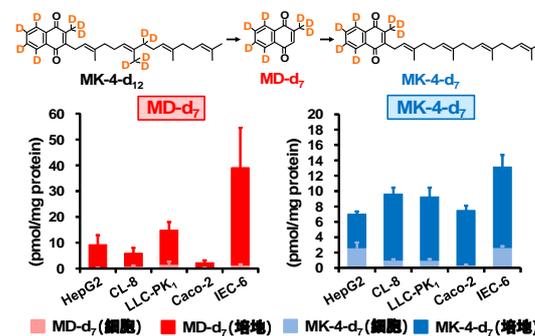


図 4 . MK-4-d₁₂ 添加時の MD-d₇ および MK-4-d₇ 検出量

各細胞における MD-d₇ および MK-4-d₇ 検出量は、PK-d₇ を添加した場合に比べ MK-4-d₁₂ を添加した場合で高い値となった(図 5、6)。

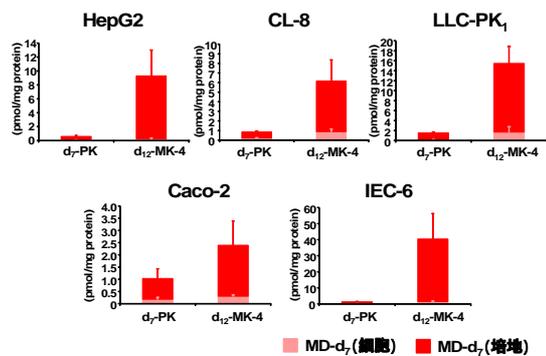


図 5 . PK-d₇、MK-4-d₁₂ 添加時の MD-d₇ 検出量比較

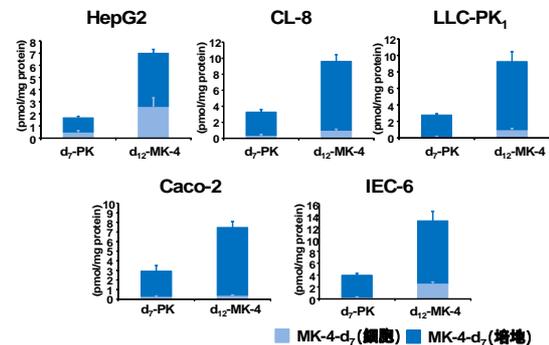


図 6 . PK-d₇、MK-4-d₁₂ 添加時の MK-4-d₇ 検出量比較

以上より、PK、MK-4 の側鎖切断および MD のプレニル化は比較的広範囲の組織で普遍的な反応であると考えられた(図 7)。また、細胞への取り込みあるいは側鎖切断活性は PK より MK-4 で高く、組織での利用性は PK より MK-4 で高いと判断された。

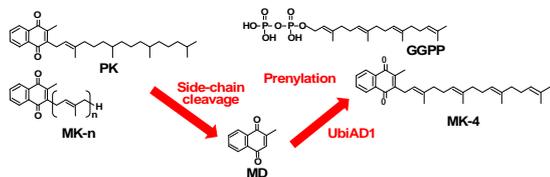


図 7 . PK、MK-n からの MK-4 への変換機構

(3) ヒトおよび実験動物の生体試料中における MD の検出

ヒト尿において、未処理ではわずかな MD しか検出されなかったが、β-glucuronidase 処理および加水分解処理したサンプルではより多くの MD が検出された(図 8)。加水分解処理による MD 検出量が最も多く、

β -glucuronidase 処理による MD 検出量は加水分解処理の 1/3~1/2 程度であった。また、納豆摂取により、尿中 MD 排泄量が増加する傾向が認められたことから、ビタミン K 摂取量のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

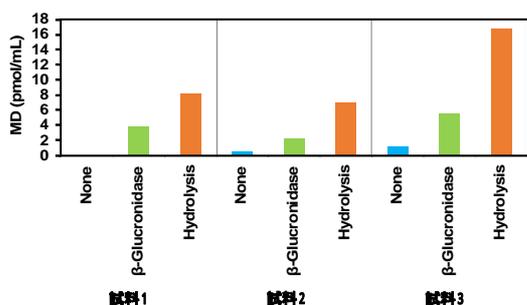


図 8 . 尿中 MD の検出

一方、ヒト血漿では、全ての処理において MD は全く検出されなかった。また、マウス血漿では加水分解処理により、少量の MD が検出されたが、 β -glucuronidase 処理では全く検出されなかった (図 9)。

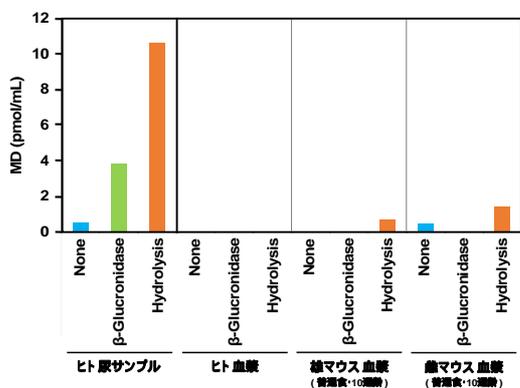


図 9 . 血漿中 MD の検出

これらの結果より、血漿中で MD は加水分解処理により遊離の MD が産生しにくい形態で存在している可能性が考えられたため、その候補化合物として、グルタチオン抱合体 (MD-GS) および アセチル抱合体 (MD-NAC) の合成を試みた (図 10)。合成産物を高分解能 MS を用いて分析した結果、それぞれの分子量から予想される水素イオン付加ピークおよびナトリウムイオン付加ピークが検出されたため、これらの合成に成功したと判断した。

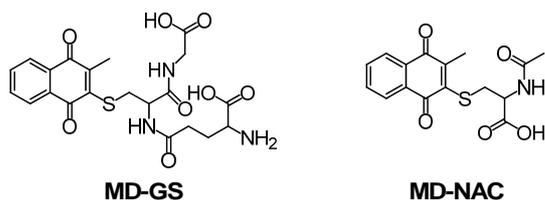


図 10 . MD-GS および MD-NAC の構造式

今後、血漿をはじめとした生体試料中における MD-GS および MD-NAC の存在を確認すると共に、標的組織における脱抱合の有無についても検討をすすめる必要がある。

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 1 件)

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, 査読有, 10, 2015, e0125737

DOI: 10.1371/journal.pone.0125737

〔学会発表〕(計 1 件)

鎌尾 まや, 神谷 有紀, 長尾 真里, 佐方 俊介, 山村 翔太, 須原 義智, 岡野 登志夫, 中川 公恵, 培養細胞におけるビタミン K の Menaquinone-4 への変換反応と変換中間体 Menadione の生成, 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 27 日 ~ 2016 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (横浜)

〔図書〕(計 1 件)

鎌尾 まや 他, 医薬ジャーナル社, ビタミン K と疾患, 2014, 9(31-39)

〔産業財産権〕

出願状況 なし

取得状況 なし

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鎌尾 まや (Maya Kamao)
神戸薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 40299087

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし