

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590319
 研究課題名（和文） ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼの肝臓におけるカルシウム
 ホメオスタシスの解析
 研究課題名（英文） Studies on calcium homeostasis of vitamin K dependent
 γ -carboxylase in mouse liver.
 研究代表者
 津久井 通（TSUKUI TOHRU）
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10333006

研究成果の概要：

本研究課題であるビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼの肝臓におけるカルシウムホメオスタシスの解析の研究を行うために、肝臓特異的ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼ（Ggcx）KO マウスを作成した結果、肝臓特異的 Ggcx KO マウスは Ggcx を完全に KO マウスと違い胎生致死ではなく、生後数ヶ月～1年程度生存可能であるが、血液凝固異常を呈し凝固因子活性測定について検討した結果、凝固因子群の活性が顕著に減少していることが判明した。このことは、ビタミン K 欠乏の病態およびワーファリン処置した際の生体での肝臓作用を評価する上でも重要なモデルと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・分子病態栄養学

キーワード：ビタミン K、 γ -カルボキシラーゼ、カルシウムホメオスタシス、血液凝固異常

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K 研究の歴史は古く、約 70 年前から進められており“K”の名前は (Koagulation) に由来する。ビタミン K には幾つかの同族体が存在しその生体作用は、極めて多様と考えられるが、未だその作用は不明な点が多い。代表的な既知の作用としては、血液凝固因子群 (II, VII, IX および X 等) の γ 位のグルタミン酸残基をビタミン K 依存的な反応として γ -カルボキシラーゼ (GC) によりアミノ酸を修飾反応することで γ -カルボキシグルタミン残基 (Gla) に変

換し Gla 残基が Ca^{2+} 結合することにより血液凝固反応が起こることが知られている。つまりビタミン K の主な生体作用は、ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラーゼ Gla 化修飾 Ca^{2+} 結合に見られる一連の Gla 化修飾後の Ca^{2+} 結合をともうタンパク質の質的变化を示す反応と捉えることができる。またビタミン K は、血液凝固系の必須因子としてばかりでなく、 γ -カルボキシラーゼに対する既知の Gla 化修飾の標的因子である BGP (Bone Gla Protein: オステオカルシン) や MGP (Matrix Gla Protein) などの存在、ま

た γ -カルボキシラーゼの発現時期や組織の分布から未知の標的因子群の存在が想定され、そのオーソログは非常に単純な生物種（例えばショウジョウバエからヒト）で進化的に保存されており、ビタミンKを通して生命現象の根元的な作用を保持すると考えられる。実際、妊娠期から新生児においてビタミンKが不足すると吐血・出血傾向がみられ、成体のほ乳類のマウスやラットなどの実験では、ビタミンK欠乏食を与えた動物では、数週間程度しか生存できず、必須なビタミンとして考えられる。それ故、ビタミンKおよびその中心的な作用をもたらす γ -カルボキシラーゼは、未知の作用メカニズムをもち、我々の生命維持に欠くことのできない因子と考えられる。ビタミンKの代表的な既知作用は、血液凝固因子群の γ 位のグルタミン酸残基をビタミンK依存的反応として γ -カルボキシラーゼ(Ggcx)によりアミノ酸を修飾反応することで、 γ -カルボキシグルタミン残基(Gla)に変換しGla残基が Ca^{2+} 結合することにより血液凝固反応が起こることが知られている。またビタミンKは、血液凝固系の必須因子としてばかりでなく、Ggcxに対する既知のGla化修飾の標的因子であるBGP(オステオカルシン)やMGPなどの存在、また γ -カルボキシラーゼの発現時期や組織の分布から未知の標的因子群の存在が想定される。今までに発見されたGgcxの標的因子は、診断マーカーとして利用されており、新規Ggcxのタンパク質修飾の標的因子の検索は極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミンK依存的なGla化タンパク質の生体作用機構の分子基盤を解明することにより、ビタミンK 依存性 γ -カルボキシラーゼ Gla 化修飾 Ca^{2+} 結合に見られる一連の作用と新規ビタミンK 依存性 γ -カルボキシラーゼの標的因子を検索し、新たなビタミンK作用の発見および新規標的因子が創薬の候補因子として考えられ、予防・診断・治療への盤を提供することを目的とする。当該分野における本研究は、ビタミンK 依存性 γ -カルボキシラーゼの分子基盤を解明することで、局所的なカルシウム代謝異常から生ずる病態(動脈硬化、メタボリックシンドローム、骨粗鬆症、糖尿病、ガン等)との関連およびビタミンK作用の有効性について、遺伝子改変マウスを利用することにより個体で時期・組織特異的にその生体作用を検討可能な点で極めて独創性がある。本研究期間内に明らかにするこ

とは、第一にビタミンK 依存性 γ -カルボキシラーゼの発現量が高い肝臓における作用およびそれに伴う病態に焦点を絞り、分子レベルでビタミンK および γ -カルボキシラーゼの作用メカニズムについて検討する。第二に、ビタミンK 依存性カルシウムのホメオスタシスについてコンディショナルに肝臓特異的にビタミンK 依存性 γ -カルボキシラーゼ遺伝子をマウス個体で Loss of function を行い、病態解析、新たな生理作用、およびその生理的意義について焦点を絞って研究を遂行する。

3. 研究の方法

肝臓における組織特異的な γ -カルボキシラーゼの生体作用の解析に焦点を絞るため、アルブミンプロモーター支配下にCreを発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより、肝臓でのみ選択的に γ -カルボキシラーゼの活性を欠失することが可能と考えられる。アルブミンプロモーターの特徴としては、胎生期後期の肝臓のみで発現が得られことから、出生後直ぐに致死となる可能性は低いと考えられる。また、成体における時期特異的に肝臓での γ -カルボキシラーゼの活性を欠失する系に関しては、既にCreを発現する組換えアデノウイルスを作製済みで、この精製ウイルスを心臓から直接接種するか尾静脈から接種することで、成体における肝臓で γ -カルボキシラーゼの活性を欠失させる系を確立可能と考えられる。

肝臓における組織特異的な γ -カルボキシラーゼの生体作用の解析に焦点を絞るため、アルブミンプロモーター支配下にCreを発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより、肝臓でのみ選択的に γ -カルボキシラーゼの活性を欠失させた遺伝子改変マウス作成し、そのマウスの病態解析を行った。

新規Gla化標的タンパク質の検索を行うため、 γ -カルボキシラーゼのコンディショナルKOマウス由来の初代肝細胞または胎児性繊維芽細胞を得て、これにCreを発現する組換えアデノウイルスを *in vitro* で感染することにより、 γ -カルボキシラーゼが欠損した細胞を得ることができ、BGP(オステオカルシン)を陽性コントロールとしてGla化の有無を検討し、ビタミンK付加の有無と比較して二次元電気泳動およびプロテオーム解析を行うことで、新規Gla化標的タンパクの検索を行った。さらに、上記方法で新規Gla化標的タンパク質の候補因子が得られた場

合、ビタミンKおよび組換えアデノウイルスにより γ -カルボキシラーゼを付加した際に、新規 Gla 化標的タンパク質の候補因子が、実際に Gla 化されているかどうか検討した。

4. 研究成果

ビタミンK依存性 Ggcn の肝臓における KO マウスを作製した結果、出産した産仔の 40%程度が生後 200 日前後までは生存することが判明し、急激な出血を伴う血液凝固異常により死亡することが示唆された(図1)。



(図1.肝臓特異的 Ggcn KO マウスの比較
左:ヘテロ Ggcn マウス, 右:ホモ Ggcn KO マウス.)

このことは Ggcn の肝臓における標的因子群と知られる、血液凝固制御因子である (Factor II, VII, IX, X, プロテイン C, S, および Z) もしくはそれ以外の未知の修飾タンパク質の、Ggcn の活性欠損が起因となり、Ggcn の標的タンパク質群が Gla 化修飾できず止血経路が作用しないことが原因として考えられた。ゲノムタイピングのためにマウス尻尾を切断する際に Ggcn KO マウスでは、異常な出血傾向が見られ、止血がほとんど作用していないことが判明した。肝臓特異的 Ggcn の欠損マウスでは、血液凝固異常を呈することから、トロンビン時間および血液凝固因子群の中でもマウスで活性測定が可能な項目について検討した結果、トロンビン時間の延長と、凝固因子群の活性が顕著に減少していることが判明した。このこと

は、ビタミンK欠乏の病態およびワーファリン処置した際の生体内の肝臓作用を評価する上でも重要なモデルと考えられる。

また、新規 Gla 化標的タンパク質の検索を行うため、 γ -カルボキシラーゼのコンディショナル KO マウス由来の初代肝細胞または胎児性繊維芽細胞を得て、代表的な Ggcn の標的タンパク質であるオステオカルシンを過剰発現させた系で、プロテオーム解析を行った結果、明らかに分子量の違うタンパク質のフォームが抗オステオカルシン抗体によるウエスタンブロットの解析により検出可能であった。つまり本研究で作成した Ggcn KO マウスを活用して、Ggcn の標的タンパク質を検出することが可能と示唆された。

それ故、本研究より受けた研究費により解析した Ggcn KO マウスは、将来的に血液凝固制御の作用機構の解明や血栓症発症の新規分子メカニズムの解明を目指す研究、およびその病態の診断・創薬・治療法への開発に有用と考えられる。

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2件)

Ito M, Muraki M, Takahashi Y, Imai M, Tsukui T (他 13 名, 5 番目). Glutathione S-transferase theta 1 expressed in granulosa cells as a biomarker for oocyte quality in age-related infertility, *Fertil Steril*, 90, 1026-35, 2008. (査読有)

Tsukui T, Imazawa Y, Inoue S. Molecular mechanism of vitamin K and its regulators in bone metabolism. *Clin Calcium* (Review), 11, 1685-91, 2007. (査読無)

[学会発表](計3件)

津久井 通, 今澤 由紀子, 井上 聡. ビタミンK依存性 γ -カルボキシラーゼの肝臓作用. 第11回 ビタミンK & Aging 研究会, 2008 (東京).

今澤 由紀子, 津久井 通, 井上 聡. 骨代謝におけるエストロゲンシグナル作用の解析. 第3回 Bone form 2008 (埼玉).

津久井 通, 今澤 由紀子, 井上 聡. ビタミンK依存性 Ggcn コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝作用の解析. 第10回 ビタミン K&Aging 研究会 2007 (東京).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

津久井通 (TSUKUI TOHRU)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10333006

(2)研究分担者

井上聡 (INOUE SATOSHI)

埼玉医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40241251