

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380071

研究課題名 (和文) ビタミンKの生体内変換機構および変換の生理的意義に関する研究

研究課題名 (英文) Physiological role of vitamin K2 (menaquinone-4) that is generated from other vitamin K analogues in animal organs

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

研究成果の概要 (和文)：

高等動物の組織内で変換・生成されるビタミンK (メナキノン-4、以下MK-4) の変換機構と生理的意義の解明を目的として、MK-4の新しい作用 (抗炎症効果、性ホルモン産生調節) とビタミンK3からMK-4への変換の分子機構を解析した。MK-4処理によって炎症シグナルを仲介する分子の活性化が阻害され、性ホルモン産生を活性化させるリン酸化酵素の活性化が明らかになった。また、MK-4変換には昨年報告のあった酵素の必須性が再確認された。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the physiological role of de novo synthesized menaquinone-4 (MK-4) in mammal, and also molecular mechanism of anti-inflammation and regulation of steroidogenesis by MK-4.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2009年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 2010年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,500,000 | 4,050,000 | 17,550,000 |

研究分野：栄養化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ビタミンK

1. 研究開始当初の背景

ビタミンKは、2-メチル-1,4-ナフトキノンを基本骨格として、天然型としてフィロキノン (ビタミンK1) とメナキノン類 (ビタミンK2) が存在する。ビタミンK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:G1a化) に必須の微量栄養素である。その組織分布を見ると、血液凝固因子の産生場である肝臓や骨組織以外に脳、生殖腺、膵臓などに多量に含まれており、それらの臓器において未知の作用を発揮している可能性が示唆されている。一方、脳、生殖腺に含まれ

るビタミンKのほとんどは、ビタミンK2のひとつであるメナキノン-4 (MK-4) であるが、ヒトを含め動物組織内において、他のビタミンK類から変換・生成されたものであることが明らかとなっている。近年になり、MK-4が特異的に有する作用が報告されている。即ち、破骨細胞、前骨髄性白血病細胞、肝癌細胞へのアポトーシス誘導、核内受容体PXRのリガンド活性、などである。我々は、組織中のビタミンK含量に依存して発現量が変化する遺伝子を指標として、MK-4の新規作用の検索を行い、MK-4が炎症性サイトカインの産生を抑制することによって、抗炎症作用を

示すこと、さらに、精巣中の MK-4 量とテストステロン産生との間に正の相関関係が見られ、ビタミン K 欠乏時には、血漿中のテストステロン濃度が低下することをはじめで見出した。しかし、これらの作用の分子機構については十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞における MK-4 変換、核内受容体 PXR を介した遺伝子発現調節機構、我々によって見出された MK-4 の新しい作用（抗炎症効果、ステロイドホルモン産生調節）の分子機構の解析を通じて、組織内 MK-4 生成機構とその生理的意義について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗炎症作用の作用点の解析

マクロファージ様細胞に分化させたヒト由来 THP-1 細胞、およびマウス由来 RAW 細胞を MK-4 で 24 時間処理した後、リポポリサッカライド (LPS) で刺激した。一定時間後、細胞から総 RNA、総タンパク質を調製し、炎症性サイトカインの mRNA 量を定量 RT-PCR 法で、LPS 刺激のシグナル伝達に関わるタンパク質量をウェスタンブロット法により測定した。また、シグナル分子の複合体形成の有無を共免疫沈降法により解析した。

(2) ステロイドホルモン調節機構の作用点の解析

マウスおよびラット精巣由来細胞 (I-10、R2C) を MK-4 で処理し、培養液中に分泌されるテストステロンを ELISA 法で測定した。また、MK-4 で処理した後、細胞から総タンパク質を調製し、ステロイドホルモン産生に関わるタンパク質の発現量をウェスタンブロット法により解析した。

(3) PXR のリガンド活性

ヒト大腸癌由来 LS180 細胞を MK-4 で処理し、PXR 標的遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR 法によって測定した。また、ヒト MDR1 遺伝子プロモーター上の PXR 結合配列を有するレポーター遺伝子を作成し、レポーター活性に及ぼす MK-4 の影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 抗炎症作用の作用点の解析

THP-1 細胞を MK-4 存在下で、LPS 刺激した場合、LPS によって誘導される炎症性サイトカインの発現量がコントロール (MK-4 非存在下) に比ベ有意に減少した。LPS は転写因子 NF κ B の活性化を介して炎症性サイトカインを誘導することから、NF κ B の活性化経路における MK-4 の作用点を解析したところ、LPS 刺激による IKK α/β のリン酸化が著しく阻

害されていた (Fig. 1)。一方、TAK1 のリン酸化が阻害されないことから、TAK1 による IKK α/β の基質としての認識が阻害されていることが示唆された。IKK は 3 つのサブユニット (α 、 β 、 γ) からなり、 γ サブユニットが TAK1 との相互作用に必要である。そこで、MK-4 処理が IKK の複合体形成に与える影響を免疫沈降法により解析した。その結果、MK-4 処理は IKK 複合体形成に影響を与えなかった。このことから、MK-4 は IKK のユビキチン化を阻害している可能性が示唆された。MK-4 の側鎖構造体であるゲラニルゲラニオールも、MK-4 と同様に LPS 誘導の炎症性サイトカインの発現量を低下させることを確認した。しかし、作用点について解析したところ、IKK α/β のリン酸化阻害ではなく、さらに上流のシグナル分子への影響が見られた。このことから、MK-4、GGOH ともに抗炎症作用を示すものの、その作用機構が異なることが明らかになった。

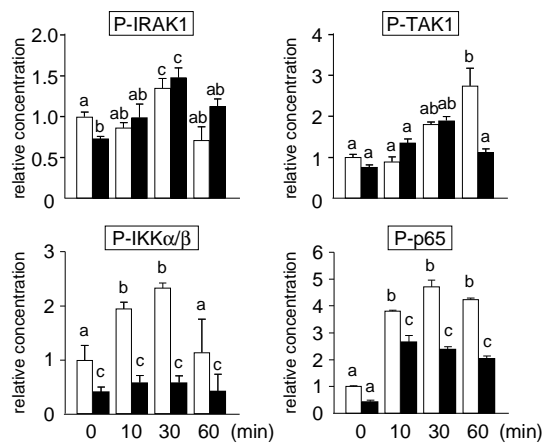


Fig. 1

(2) ステロイドホルモン調節機構の作用点の解析

I-10 細胞を MK-4 で処理した場合、培地中に分泌されるテストステロン量が MK-4 の処理濃度に依存して増加することが明らかになった。また、このテストステロン分泌上昇は cAMP 非依存的に起こること、タンパク質 Glu 化の阻害剤であるワーファリンで阻害されないことから、MK-4 の未知の作用によって、テストステロン産生が上昇することが示唆された。さらに、この作用は他のビタミン K2 同族体では弱いながら検出されるものの、ビタミン K1 では見られないことから、メナキノン類特有の作用であることが示唆された。また、GGOH をラットに給餌し、テストステロン産生に及ぼす影響を解析したところ、血漿テストステロン値の上昇が観察された。また、I-10 細胞を GGOH 処理した場合、培地中へのテストステロン分泌量が上昇した。以上のことから、MK-4 で見られたテストステロン産生

上昇には、MK-4 のもつゲラニルゲラニル基の関与が示唆された。

(3) PXR のリガンド活性

LS180 細胞をリファンピシン、または MK-4 で 24 時間処理し、PXR の標的遺伝子である MDR1、および CYP3A4 mRNA 量を測定した。その結果、リファンピシンでは両遺伝子の発現上昇が観察された。一方、MK-4 処理では MDR1 mRNA は上昇したが、CYP3A4 mRNA は変化しなかった。このことから、本細胞において、MK-4 は遺伝子選択的な発現誘導を行うことが示唆された。次に、MDR1 の PXR 結合配列を有するレポーター遺伝子を作製し、MK-4 がレポーター遺伝子活性に及ぼす影響を解析した。レポーター遺伝子を LS180 に導入後、MK-4 処理し、ルシフェラーゼ活性を測定すると、MK-4 の添加量に依存したルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。このことから、MK-4 による MDR1 遺伝子の活性化は PXR を介した発現上昇であると推察された。次に、同様の実験系を用いて MK-4 以外のビタミン K 同族体について検討すると、ビタミン K1 ではレポーター遺伝子の活性化は見られなかったが、MK-3 を用いた場合、MK-4 と同程度のレポーター活性の上昇が観察された。また、側鎖の長い MK-7、MK-9 においては、若干上昇傾向は見られたが、有意な変化ではなかった。これらのレポーター遺伝子の活性化の違いが、細胞へ取り込まれるビタミン K 量に依存している可能性があったことから、添加後の細胞内ビタミン K 量を測定した。その結果、MK-3 については MK-4 の約 2 倍の取り込み量であったが、K1、MK-7 は MK-4 とほぼ同程度であった。レポーター活性の結果と併せて判断すると、MK-3、MK-4 は PXR のリガンドとして機能して MDR1 遺伝子の活性化を行うことが示唆された。

(4) MK-4 変換機構の解析

肝癌由来 HepG2 細胞を用いたビタミン K3 から MK-4 への *in vitro* 変換反応系を構築した。この変換系において、MK-4 の変換・生成量は、ビタミン K3 濃度やインキュベーション時間の増加に従って上昇した。また、側鎖の基質として内在性のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) が使用されると推定されたことから、スタチンにより GGPP 生成を阻害したところ、MK-4 生成が減少した。また、タンパク質プレニルトランスフェラーゼの阻害剤で処理した場合、MK-4 生成量が増加した。さらに、昨年同定された、この変換に関わる UBIAD1 を siRNA でノックダウンさせた場合、MK-4 生成量が低下した。以上のことから、

HepG2 細胞においてビタミン K3 から MK-4 への変換には、UBIAD1 が関与し、側鎖の基質として、GGPP が使用されることが示唆された。

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 5 件)

1. Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, Iribe M, Goto T, Komai M. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor κ B through the repression of IKK α / β phosphorylation. *J. Nutr. Biochem.* 査読有、21 巻、2010 年、1120-1126

2. 大崎雄介、工直史、伊東あさぎ、白川仁、駒井三千夫、精巢ビタミン K がテストステロン産生に及ぼす影響、無菌生物、査読有、40 巻、2010 年、80-81

3. 白川仁、齋藤正頼、佐藤祥子、駒井三千夫、新しい Gla タンパク質ファミリー、ビタミン、査読有、47 巻、2009 年、17-18

4. 駒野悠太、齋藤正頼、大崎雄介、佐藤俊郎、白川仁、駒井三千夫、無菌マウスへのビタミン K1 誘導体 (ジヒドロフィロキノン) 給餌の影響、無菌生物、査読有、39 巻、2009 年、65-68

5. 大崎雄介、伊東あさぎ、白川仁、駒井三千夫、無菌ラットを用いたビタミン K 欠乏動物の作製と欠乏症の性差について、無菌生物、査読有、38 巻、2008 年、112-115

[学会発表] (計 29 件)

1. 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、メナキノン-4 の IKK 活性化阻害、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学

2. Giriwono PE, Shirakawa H, Ohsaki Y, Hata S, Kuriyama H, Sato S, Goto T, Komai M, Geranylgeraniol inhibits LPS-induced inflammation by suppressing expressions of IRAK1 and TRAF6 in THP-1 cells 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学

3. 白川仁、大橋和、高島理恵、佐藤祥子、駒井三千夫、LS180 細胞におけるビタミン K の PXR 標的遺伝子発現への影響、第 14 回 Vitamin K & Aging 研究会、2011 年 2 月 19 日、経団連会館

3. 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、第 44 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2011 年 1 月 14 日、北海道大学

4. Giriwono PE、白川仁、大崎雄介、梶修一、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、第 44 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、2011 年 1 月 14 日、北海道大学

5. Giriwono PE、白川仁、大崎雄介、佐藤祥子、梶修一、栗山弘樹、後藤知子、駒井三千夫、ゲラニルゲラニオールはヒトマクロファージ細胞において LPS による NF- κ B の活性化を阻害する、BMB2010、2010 年 12 月 7 日、神戸国際会議場

6. 渡邊貴哉、大崎雄介、三浦聡仁、Giriwono PE、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、マクロファージ様細胞におけるメナキノ-4 の IKK 活性化阻害、日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部大会、2010 年 9 月 28 日、東北大学

7. 駒井三千夫、天然型ビタミン K 類の血液凝固因子活性化以外の生理活性、第 9 回生体キノン研究会、2010 年 9 月 17 日、東京

8. 渡邊貴哉、大崎雄介、三浦聡仁、Giriwono PE、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、メナキノ-4 による NF- κ B の活性化阻害、日本ビタミン学会第 62 回大会、2010 年 6 月 11 日、盛岡

9. Giriwono PE、Shirakawa H、Ohsaki Y、Sato S、Hata S、Kuriyama H、Goto T、Komai M、Natural isoprenoid geranylgeraniol (GGOH) inhibit NF- κ B signaling cascade in LPS induced inflammation 日本ビタミン学会第 62 回大会、2010 年 6 月 11 日、盛岡

10. 大橋和、高島理恵、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、イソプレノイドが薬物代謝酵素遺伝子発現に与える影響、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日東京大学

11. Giriwono PE、Shirakawa H、Ohsaki Y、

Hata S、H Kuriyama H、Sato S、Goto T、Komai M、Natural plant isoprenoid geranylgeraniol suppresses LPS induced inflammation by inhibiting phosphorylation of TLR4 signaling molecules 日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日東京大学

12. 白川仁、伊藤あさぎ、工直史、大橋和、大崎雄介、駒井三千夫、メナキノ-4 によるテストステロン産生上昇、第 13 回 Vitamin K & Aging 研究会、2010 年 2 月 20 日、経団連会館

13. 大崎雄介、工直史、伊東あさぎ、白川仁、駒井三千夫、精巢ビタミン K がテストステロン産生に及ぼす影響、第 42 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2010 年 1 月 21 日、日本大学歯学部

14. 白川仁、伊東あさぎ、工直史、駒井三千夫、ビタミン K2 は PKA の活性化を介してテストステロン産生を上昇させる、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21 日、神戸国際会議場

15. 渡邊貴哉、大崎雄介、三浦聡仁、Giriwono PE、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、ビタミン K による NF- κ B 活性化の阻害、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 21 日、神戸国際会議場

16. Giriwono PE、Ohsaki Y、Shirakawa H、Hata S、Kuriyama H、Sato S、Goto T、Komai M、The isoprenoid geranylgeraniol suppresses LPS inflammation in rat b down regulating signaling molecules downstream of TLR4, The 9th World Congress on Inflammation、2009 年 7 月 8 日、京王プラザホテル

17. 伊東あさぎ、工直史、白川仁、駒井三千夫、ビタミン K が精巢中のステロイド産生に及ぼす影響、日本ビタミン学会第 61 回大会、2009 年 5 月 29 日、京都

18. 大橋和、高島理恵、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、ビタミン K が PXR 標的遺伝子発現に与える影響、日本ビタミン学会第 61 回大会、2009 年 5 月 29 日、京都

19. Giriwono PE、Ohsaki Y、Shirakawa H、Miura A、Sato S、Goto T、Komai M、Menaquinone-4, a vitamin K2 analogue, suppresses inflammation through the inhibition of NF- κ B activation. 3rd International Congress on prediabetes and the metabolic syndrome. 2009 年 4 月 3 日、

ニース国際会議場

20. 伊東あさぎ、工直史、大崎雄介、白川仁、駒井三千夫、ビタミンKがテストステロン合成に及ぼす影響、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡国際会議場

21. Giriwono PE、大崎雄介、三浦聡仁、白川仁、佐藤祥子、後藤知子、駒井三千夫、ビタミン K2 は LPS 誘導の NF κ B の活性化を阻害する、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡国際会議場

22. 白川仁、大崎雄介、三浦聡仁、Giriwono PE、駒井三千夫、メナキノン-4 による抗炎症作用、第 12 回 Vitamin K & Aging 研究会、2009 年 2 月 14 日、経団連会館

23. 駒野悠太、齋藤正頼、大崎雄介、佐藤俊郎、白川仁、駒井三千夫、無菌マウスへのビタミン K1 誘導體 (ジヒドロフィロキノン) 給餌の影響、第 41 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会、2009 年 1 月 22 日、住友クラブ

24. 伊東あさぎ、峯岸慶彦、工直史、大崎雄介、白川仁、駒井三千夫、ビタミンKがステロイドホルモン産生に及ぼす影響の解析、BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場

25. 大橋和、高島理恵、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、ビタミンKによる PXR 標的遺伝子の発現変化、BMB2008、2008 年 12 月 11 日、神戸国際会議場

26. 伊東あさぎ、工直史、大崎雄介、白川仁、駒井三千夫、メナキノン-4 がテストステロン産生に与える影響の解析、日本農芸化学会東北支部第 143 回大会、2008 年 10 月 11 日、弘前大学

27. 大橋和、高島理恵、佐藤祥子、白川仁、駒井三千夫、日本農芸化学会東北支部第 143 回大会、2008 年 10 月 11 日、弘前大学

28. Giriwono PE, Ohsaki Y, Shirakawa H, Hata S, Kuriyama H, Komai M, Supplementation of geranylgeraniol (GGOH) effectively reduced LPS stimulated liver damage in rat. 第 62 回日本栄養・食糧学会大会 2008 年 5 月 3 日 女子栄養大学

29. 三浦聡仁、大崎雄介、白川仁、駒井三千夫、白川仁、駒井三千夫、ビタミンKによる炎症性サイトカイン発現抑制作用、第 62 回日本栄養・食糧学会

大会 2008 年 5 月 3 日 女子栄養大学

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