

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390022

研究課題名(和文)新規ビタミンK2合成酵素(UBIAD1)の遺伝子欠損動物の作出と表現型解析

研究課題名(英文) Generation and characterization of genetically-altered mice lacking a novel vitamin K2 synthesis enzyme Ubiad1

研究代表者

岡野 登志夫 (OKANO, TOSHIO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20131542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：組織中に存在するビタミンK2は、摂取したビタミンK1から小腸で遊離したビタミンK3がリンパ管系および血流を経て組織へ移行し、酸化還元酵素により還元され、酵素Ubiad1によってプレニル化されて生成したものであることを証明した。Ubiad1の機能を明らかにするため、全身性Ubiad1遺伝子欠失マウスの作出を試みたが、胎生致死であった。Ubiad1 flox/floxマウスとNestin-Cre発現マウス、Osterix-Cre発現マウスあるいはSynapsin-Cre発現マウスとの交配により造血・神経組織特異的、骨組織特異的あるいはニューロン特異的Ubiad1遺伝子欠失マウスの作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：It was demonstrated that tissue vitamin K2 originates from oral vitamin K1 by a mechanism that involves the release of vitamin K3 from vitamin K1 in the intestine followed by delivery of vitamin K3 through the mesenteric lymphatic system and blood circulation to tissues, and then reduced by an unknown redox enzyme in the tissues and converted into vitamin K2 by the prenylating enzyme Ubiad1. To investigate the function of ubiad1, we attempted to generate mice lacking Ubiad1 by gene targeting, but it was found that Ubiad1-deficient mouse embryos failed to survive beyond embryonic day 7.5. We have succeeded in generating hematopoietic and nerve tissue-specific, bone specific- or neuron-specific Ubiad1-deficient mice by intercrossing Ubiad1 flox/flox mice with Nestin-Cre expressing mice, Osterix-Cre expressing mice or Synapsin-Cre expressing mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子改変動物 ウト 神経 骨 ビタミンK2 合成酵素 UBIAD1 全身性ノック・アウト コンディショナル・ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミン K₁は、グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として血液凝固因子の活性化 (グラ化) のみならず、骨形成や血管石灰化に關与する様々な蛋白質の活性化にも重要な役割を果たす。また、その活性型であるビタミン K₂ (メナキノン-4, MK-4) は、核内受容体 (SXR/PXR) の特異的リガンドとしてステロイドホルモンや生体異物などの代謝酵素の遺伝子発現を調節することが知られている。

(2) 食物中のビタミン K₁は、小腸で酵素によりフィチル側鎖が切断されて中間体ビタミン K₃ (メナジオン) を生じ、これがリンパ管系から血中を経て末梢組織に運ばれ、そこで酵素によってビタミン K₂ に変換され、蓄積すると考えられている。酵素は現在もなお未同定であるが、酵素は UbiA prenyltransferase containing domain 1 (Ubiad1) であることを我々が初めて同定した。

(3) Ubiad1 については、MK-4 合成酵素であること以外にその構造 / 機能を含めて生理的役割についてほとんど不明である。

2. 研究の目的

(1) Ubiad1 siRNA 発現ベクターを設計・構築し、脳・神経系、骨格系の各種株化細胞に導入し、Ubiad1 siRNA を恒常的に発現する細胞を樹立し、Ubiad1 の機能解析を行う。

(2) マウスゲノムから遺伝子 *Ubiad1* をコードする DNA を取得し、ターゲットベクターを構築し、*Ubiad1* 遺伝子を全身的に欠損したノックアウトマウスを作成する。

(3) *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスが胎生致死となった場合は、*Ubiad1*^{+/+} 雌雄マウスの精子および卵子を IVF 法により受精後、偽妊娠 *Ubiad1*^{+/+} 雌マウス子宮に着床させ、胎生期の各段階における成長・発達異常の有無を解析する。また、*Ubiad1* 遺伝子欠損マウス胎児 MEF あるいは *Ubiad1*^{-/-} ES 細胞を樹立し、*Ubiad1* の機能解析を行う。*Ubiad1* 遺伝子欠損マウスが胎生致死でなかった場合は、胎仔および出生後の個体について、成長・発達段階ごとに個体および組織・細胞レベルでの表現型解析を行う。

(4) Nestin-Cre 発現マウス、Synapsin-Cre 発現マウス、Osterix-Cre 発現マウスとの交配により、それぞれ造血系幹細胞特異的、神経細胞特異的および骨芽細胞特異的に *Ubiad1* 発現が欠損したコンディショナルな *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスを作成し、表現型解析を行う。

(5) 高分解能質量スペクトル解析法および昆虫細胞 Sf-9 で発現させ調製した *Ubiad1* タンパクを用いて、体内循環あるいは組織へ移行したビタミン K₃ の同定と定量を行い、ビタミン K₁ からビタミン K₃ を経てビタミン K₂ へ代謝変換される全過程を証明する。

3. 研究の方法

(1) *Ubiad1* 遺伝子ノックダウン細胞として、

常法に従い *Ubiad1* siRNA を設計・構築し、脳・神経系および骨格系の株化細胞に導入し、*Ubiad1* siRNA を恒常的に発現し、*Ubiad1* タンパク発現が著しく低下した細胞株を樹立する。

(2) *Ubiad1* 遺伝子欠損マウス作製のための ES 細胞クローンを以下の方法により取得する。マウスゲノム DNA を用いてマウス *Ubiad1* 遺伝子をクローニングする。*Ubiad1* 遺伝子は 2 つの Exon から成り立っているが、このうち Exon 1 をネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを作成する。129/SvEv 系統マウスの受精卵から樹立した ES 細胞株に、直鎖の *Ubiad1* 遺伝子ターゲティングベクターを導入し、G418 耐性 ES 細胞株を樹立する。ES 細胞株ゲノム DNA を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行い、ターゲティングを受けたクローンを選択する。ターゲティングを受けた ES 細胞の染色体 DNA に異常がないかを確認し、問題のなかった ES 細胞株を用いて次のステップへ進む。

(3) 上記 ES 細胞株を C57BL/6 系統マウスの胚盤胞期胚に注入して、偽妊娠マウスの子宮に移植する。得られる産子の中から ES 細胞に由来する体細胞を持つ雄性キメラマウスを選択する。このキメラマウスと野生型 C57BL/6 系統マウスを交配させ、産仔の毛色判別により ES 細胞から分化した精子に由来する F1 マウスを選択する。F1 マウスを離乳まで哺育した後、その尾部組織を採取してゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーション法によりヘテロ変異体であるか否かを確認する。サザンハイブリダイゼーション法により選択された UBIAD1 ヘテロ変異体マウスの雌雄を交配し、目的の UBIAD1 ホモ変異体マウスを作成する。この変異体マウスを野生型マウスと交配を重ね、バッククロスしたものを *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスとし、表現型解析と *Ubiad1* 遺伝子の欠損に伴う発生・形態異常、代謝異常、機能異常などの MK-4 生合成の破綻に起因する疾患の探索研究に用いる。

(4) Nestin-Cre 発現マウス、Synapsin-Cre 発現マウス、Osterix-Cre 発現マウスとの交配により、それぞれ造血系幹細胞特異的、神経細胞特異的および骨芽細胞特異的に *Ubiad1* 発現が欠損したコンディショナルな *Ubiad1* 遺伝子欠損マウスを作成し、表現型解析を行う。

(5) 胆管、リンパ管、門脈、大静脈にカニューレを挿入したラットに重水素標識化ビタミン K₁ を経口投与し、投与後 6 時間目まで 1 時間ごとに胆汁、リンパ液あるいは血液を採取し、ビタミン K₁ およびその代謝物 (重水素標識化ビタミン K₃ および MK-4) を LC-APCI-MS/MS および昆虫細胞 Sf-9 で発現させたリコンビナント *Ubiad1* タンパクを用いて定量する。また、リンパ液中に存在すると予想されるビタミン K₃ を HPLC で精製後、高

分解能質量スペクトル分析法にて構造決定を試みる。

4. 研究成果

(1) *Ubiad1* 遺伝子 exon 1 ターゲティングベクター導入 ES 細胞 3 クローン (a3037, a3096, a3097) を作成し、それぞれのクローンからキメラ率 100% のキメラマウスを取得した。キメラマウス (雄) と C57BL/6J 雌マウスの交配により 22 匹のヘテロ F1 産仔を得た。

(2) *Ubiad1* ヘテロコンディショナルノックアウトマウスとの交配に使用するため、B6;CBA-Tg(CAG-Cre)47Imeg (以下 CAG-Cre) ヘテロマウスおよび B6;D2-Tg(CAG-Flp)8Imeg (以下 CAG-Flp) ヘテロマウスの増産を行った。

(3) *Ubiad1* 遺伝子コンディショナル・ノックアウトマウスの F1 ヘテロ接合体マウス (*Ubiad1*^{floxE1+neo/+}) と、CAG-Cre ヘミ接合体マウスとの交配により、F2 マウスを作出した。遺伝型解析の結果、a3097 から 3 匹の F2 マウスが、a3037 からは 7 匹の F2 マウスが Cre による組換えで flox 遺伝子領域が除去されたヘテロ接合体マウス (exon 欠損ヘテロ接合体マウス: *Ubiad1*^{dE1/+}; CAG-Cre) として得られた。

(4) *Ubiad1* 遺伝子コンディショナル・ノックアウトマウスの F1 ヘテロ接合体マウス (*Ubiad1*^{floxE1+neo/+}) と、CAG-Flp ヘミ接合体マウスとの交配により、F2 マウスを製作した。遺伝型解析の結果から、a3037 からは 2 匹の F2 マウスが、a3097 からは 4 匹の F2 マウスが Flp による組換えで neomycin 耐性遺伝子が除去されたマウス (*Ubiad1*^{floxE1/+}; CAG-Flp) として得られた。

(5) *Ubiad1* 遺伝子 exon 1 ターゲティングベクター導入 ES 細胞 2 クローン (a3037 および a3097) から、それぞれキメラマウスの作出を経て全身性 *Ubiad1* 遺伝子欠失ヘテロマウスの作出に成功した。更に、ヘテロマウス同士の交配によりホモマウスの作出を試みたが、全例が胎生致死であった。

(6) 体外受精妊娠マウスを用いて胎生期における胎児の生存性について詳細に解析した結果、胎生 7-10 日齢の間で全例が死亡することが判明した。死亡原因については不明である。

(7) 妊娠マウスにコエンザイム Q またはビタミン K を経口投与することにより、極めて低い確率ながら胎生期マウスの生存期間を延長させることができた。現在のところ、この理由については不明である。

(8) *Ubiad1* flox/flox マウスと *Nestin-Cre* 発現マウスの交配により *Nestin* 発現組織特異的 *Ubiad1* 遺伝子欠失ホモマウスの作出に成功した。出生時および生後数週間におけるホモマウスの外観および行動性において野生型と比べて異常は認められなかった。

(9) 骨芽細胞あるいは神経細胞特異的 *Ubiad1* 遺伝子欠失ホモマウスの作出と表現型・機能解析を行うため、*Osterix-Cre* 発現

マウスと *Synapsin-Cre* 発現マウスのジャームライントランスミッションを行った。

(10) 全身性 *Ubiad1* 遺伝子欠失マウスは全例が胎生致死であったため、*Ubiad1*^{-/-} ES 細胞塊を製作し、mRNA およびタンパクレベルで *Ubiad1* が発現していないことを確認した。さらに、MK-4 合成能を欠失し、一方、野生型と同程度の CoQ9/10 合成能を保持していることを確認した。さらに、*Ubiad1*^{-/-} マウスの組織中 MK-4 濃度および MK-4 合成活性が野生型のほぼ半分に低下していることを確認した。

(11) *Ubiad1* flox/flox マウスと *Nestin-Cre* 発現マウスの交配により出生した *Nestin* 発現組織特異的 *Ubiad1* 遺伝子欠失ホモマウス (*Nestin-CKO*) は、出生後 12 週齢で野生型に比べて体重、骨密度および筋肉量が有意に低かった。また、野生型に比べて水平棒・平行棒試験および自発的交替行動変化率は有意に低く、一方、自発行動量は有意に高く、不安定な情動行動を呈した。*Nestin* が高発現している中枢神経系で、*Ubiad1* の遺伝子発現は殆ど認められなかった。*Nestin-CKO* の脳 (大脳、小脳、中脳、間脳、延髄、嗅球) 内 MK-4 濃度は野生型に比べて著しく低く、一方、CoQ9/10 濃度に有意な差異は認められなかった。

(12) *Ubiad1* flox/flox マウスと *Osterix-Cre* 発現マウスあるいは *Synapsin-Cre* 発現マウスとの交配により *Osterix* 発現組織特異的 *Ubiad1* 遺伝子欠失ホモマウス (*Osterix-CKO*) および *Synapsin* 発現組織特異的 *Ubiad1* 遺伝子欠失ホモマウス (*Synapsin-CKO*) の作出に成功した。現在、詳細な表現型解析と神経組織および骨における MK-4 合成能および CoQ9/10 合成能について検討中である。

(13) ラットを用いたカニューレシオン実験により、ビタミン K₁ は主に小腸リンパ管からその大部分が未変化体として体内に吸収され、また、小腸で一部がビタミン K₃ となって体循環に入り、組織に運ばれビタミン K₂ に代謝されることを証明することに成功した。

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 11 件)

Okano T (12) 他 13 人 Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of hyp mice. *J Bone Miner Res.* 2014 査読あり doi: 10.1002/jbmr.2186. [Epub ahead of print]

K Nakagawa (5), T Okano (6) 他 9 人 Liver-specific -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One.* 2014; 9(2): e88643 査読あり

doi:
10.1371/journal.pone.0088643.
eCollection 2014.
Okano T(13) 他 13 人 The UBIAD1
prenyltransferase links menaquinone-4
synthesis to cholesterol metabolic
enzymes. *Hum Mutat.*, 2013;34(2):317-329 査読あり
doi: 10.1002/humu.22230. Epub 2012
Nov 27.
Tanaka K, Terao J, Shidoji Y, Tamai
H, Imai E, Okano T. Dietary Reference
Intakes for Japanese 2010:
fat-soluble vitamins. *J Nutr Sci
Vitaminol*, 2013;59:S57-S66 査読あり
http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.59.S
57
Okano T(6) 他 7 人 Effects of
gamma-glutamyl carboxylase gene
polymorphism (R325Q) on the
association between dietary vitamin K
intake and gamma-carboxylation of
osteocalcin in young adults. *Asia Pac J
Clin Nutr.*, 2013;22(4):646-654 査読あり
doi: 10.6133/apjcn.2013.22.4.01.
Nakagawa K (3), Okano T (12) 他 10
人 Menadione (vitamin K₃) is a
catabolic product of oral
phyloquinone (vitamin K₁) in the
intestine and a circulating precursor
of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂)
in rats. *J Biol Chem.*, 2013;288(46):33071-33080 査読
あり doi: 10.1074/jbc.M113.477356.
Epub 2013 Sep 30.
Okano T (5) 他 6 人 Cytochrome
P450-Dependent Catabolism of vitamin
K: -hydroxylation catalyzed by human
CYP4F2 and CYP4F11.
Biochemistry, 2013;52(46):8276-8285
査読あり doi: 10.1021/bi401208m.
Epub 2013 Nov 7.
Okano T(10) 他 9 人 A novel method
based on curvature analysis for
estimating the dietary vitamin K
requirement in adolescents. *Clin Nutr*,
2012 ;31(2):255-60 査読あり doi:
10.1016/j.clnu.2011.10.006. Epub
2011 Nov 9.
Nakagawa K(5), Okano T(6) 他 7 人
Replacement of the hydrophobic part of
9-cis-retinoic acid with cyclic
terpenoid moiety results in
RXR-selective agonistic activity.
Bioorg. Med. Chem., 2011;19(9):2939-2949 査読あり
doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.033. Epub
2011 Mar 21.
Nakagawa K(4), Okano T(9) 他 7 人
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.*,
2011;54(13):4918-4922 査読あり doi:
10.1021/jm200201k. Epub 2011 Jun 20.
Nakagawa K(3), Okano T(8) 他 6 人
Synthesis of novel vitamin K2
analogues with modification at the
-terminal position and their
biological evaluation as potent
steroid and xenobiotic receptor (SXR)
agonists. *J. Med. Chem.*,
2011;54(12):4269-4273 査読あり doi:
10.1021/jm200025f. Epub 2011 May 26.

[学会発表](計 23 件)

新規ヒト膜結合型ビタミン K 合成酵素
UBIAD1 の構造と機能 岡野 登志夫 第
52 回日本薬学会東北支部大会
2013.10.20 東北大学川内北キャンパ
ス(仙台)

Expression of Cardiovascular
System-Related Genes in Vitamin D
Receptor Knockout Mice. 岡野 登志夫
2013 Annual Meeting of the American
Society for Bone and Mineral Research
2013.10.7 ボルチモア(米国)

Plasma Concentration and Expression
of Matrix Gla Protein (MGP) in Ectopic
Calcification Model Rats. 津川 尚
子, 岡野 登志夫(4) 他 2 人 2013
Annual Meeting of the American Society
for Bone and Mineral Research
2013.10.6 ボルチモア(米国)

Accumulation of Menaquinone-4 in the
Bones of Mice Orally Given K vitamers
and Its Biological Activity in
Osteoblasts. 中川 公恵(1), 岡野登
志夫(3) 他 1 人 2013 Annual Meeting
of the American Society for Bone and
Mineral Research 2013.10.6 ボルチ
モア(米国)

ビタミン K の生合成と生理機能: 新たな
展開 岡野 登志夫 フォーラム 2013
衛生薬学・環境トキシコロジー
2013.9.14 九州大学医学部百年講堂(福
岡)

ビタミン D およびビタミン K の新たな作
用メカニズム 岡野 登志夫 第 28 回
ROD-21 研究会 2013.9.7 ホテル阪急エキ
スポパーク(大阪)

Structure and Function of a Novel
Human Vitamin K Biosynthetic
Enzyme, UBIAD1. 岡野 登志夫 National
Institutes of Health (NIH), National
Cancer Institute (NCI) 2012.10.17 フ
レデリック(米国)

Statins and Bisphosphonates Inhibit
Menaquinone-4 Biosynthesis in Bone.

岡野登志夫 他 American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting 2012.10.15 ミネアポリス(米国)

ビタミン D と K は骨で何をしているのか? ~骨代謝調節における分子機構~ 岡野登志夫 第3回ライフサイエンスセミナー 2012.10.1 摂南大学理工学部(大阪)

新規ヒト膜結合型ビタミン K 合成酵素 UBIAD1の構造と機能 岡野登志夫 第13回 ERATO タンパク質関連情報交換会 2012.7.30 大阪大学理学研究科(大阪)

骨で脂溶性ビタミンは何をしているのか? 新たな機能の発見と創薬標的分子の検索 岡野登志夫 第3回骨バイオサイエンス研究会 2012.07.14 岡山コンベンションセンター(岡山)

The conversion of phylloquinone(vitamin K1) to menaquinone-4 (vitamin K2) in the body and its role in vitamin K nutrition. 岡野登志夫 第2回国際ビタミン会議 2012.5.23 コペンハーゲン(デンマーク)

ビタミンKの体内変換と骨代謝における役割 岡野登志夫 第85回日本内分泌学会学術総会 2012.4.19 名古屋国際会議場(愛知)

脂溶性ビタミンの活性化とホルモン応答の多様性 岡野登志夫 日本薬学会第132年会 2012.03.30 北海道大学(北海道)

ビタミン K2 研究の国際的な動向 岡野登志夫 第15回 Vitamin K & Aging 研究会 2012.02.18 経団連会館(東京)

ビタミンDおよびKと骨代謝研究:最近の進歩と将来展望 岡野登志夫 第15回多摩骨代謝研究会 2012.1.28 吉祥寺東急イン(東京)

ビタミンKの体内変換とその分子栄養学的意義 岡野登志夫 日本栄養食糧学会近畿支部大会 支部創立50周年記念シンポジウム 2011.10.15 近畿大学(奈良県)

ビタミンDの骨作用:基礎研究および臨床研究の新たな展開 岡野登志夫 岩手県病院薬剤師会・盛岡薬剤師会・大正富山医薬品 共催講演会 2011.8.27 盛岡グランドホテル(岩手県)

ビタミンDおよびビタミンK-骨代謝に関する最近の話題 - 岡野登志夫 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011.7.29 大阪国際会議場(大阪府)

Enzyme Responsible for the Conversion of Phylloquinone to Menaquinone-4 in Animal Tissues. 岡野登志夫 FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES Molecular, Structural & Clinical Aspects of Vitamin K & Vitamin K-Dependent

- Proteins 2011.6.28 ケアフリー(米国)
- 21 新規ヒト型ビタミン K2(MK-4)合成酵素の発見とその栄養学的意義 岡野登志夫 第14回ビタミンKフォーラム 2011.6.10 大阪国際会議場(大阪府)
- 22 世界をリードするわが国の脂溶性ビタミン研究:現状と今後の展望 岡野登志夫 日本ビタミン学会第63回大会 2011.6.4 安田女子大学(広島県)
- 23 ビタミンDとビタミンKの基礎研究領域における新たな展開 岡野登志夫 第11回日本抗加齢医学会総会 2011.5.28 国立京都国際会館(京都府)

〔図書〕(計5件)

岡野登志夫, 中川公恵 他, 医薬ジャーナル社, ビタミンDと疾患 改訂版 - 基礎の理解と臨床への応用, 2014, 248(16-21, 48-59, 109-116, 130-138)

岡野登志夫 他, 診断と診断社, 副甲状腺・骨代謝疾患診療マニュアル, 2013, 210(13-15)

岡野登志夫 他, 日本メディカルセンター, CKD-MBDハンドブック2ndEdition, 2013, 320(46-52)

岡野登志夫 他, 講談社サイエンティフィック, ビタミンの新栄養学, 2012, 253(16ページ)

岡野登志夫 他, 朝倉書店, ビタミン・ミネラルの科学, 2011, 210(80-86)

〔その他〕

ホームページ等
神戸薬科大学ホームページ
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
岡野登志夫 (OKANO TOSHIO)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 20131542

(2)研究分担者
中川公恵 (NAKAGAWA KIMIE)
神戸薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 90309435