

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460180

研究課題名(和文)血管特異的ビタミンK2合成酵素遺伝子欠損マウスの作出と表現型解析

研究課題名(英文) Generation of vascular smooth muscle specific Ubiad1 gene knockout mice and phenotype analysis

研究代表者

津川 尚子 (Tsugawa, Naoko)

大阪樟蔭女子大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：30207352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：UBIAD1は、摂取されたビタミンK類縁体を体内でメナキノン4に変換する酵素である。本研究では血管におけるUBIAD1の生理的意義を解明することを目的として、Transgelin(SM22⁺)-Creリコンビナーゼ発現マウスにUbiad1 flox/flox マウスを交配させて血管特異的Ubiad1遺伝子欠損マウス(Ubiad1-V-KO)を作出した。Ubiad1-V-KOはメンデルの法則に従って出生したが、生後6～8週目には胸水貯留で全てのUbiad1-V-KOが死亡した。また、Ubiad1-V-KOでは大動脈の弾性繊維異常と心室心筋形成不全が起こり、血圧上昇と心拍数の低下も観察された。

研究成果の概要(英文)：UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) is a novel vitamin K2 biosynthetic enzyme. To investigate the function of UBIAD1 in vascular smooth muscle cells, we attempted to generate vascular specific conditional Ubiad1 knockout mice (Ubiad1-V-KO). Ubiad1-V-KO was generated with conditional deletion of Ubiad1 gene in cells expressing the smooth muscle cell-specific protein SM22⁺. Ubiad1-V-KO were born according to Mendel's theory of heredity, however all Ubiad1-V-KO were died with pleural effusion at 6-8 weeks-old. Also, we confirmed that abnormality of aortic elastic fiber, ventricular myocardial hypoplasia, hypertension and decrease of heart rate in Ubiad1-V-KO.

研究分野：衛生化学

キーワード：ビタミンK UBIAD1 血管特異的遺伝子欠損 血管平滑筋 Transgelin-Cre

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K は、 γ -glutamylcarboxylase (GGCX) の補因子として働き、ビタミン K 依存性タンパク質 (VKDP) のグルタミン酸残基位をカルボキシル化 (Gla 化) することで血液凝固や骨形成・骨質維持作用を発揮する。VKDP には肝臓に存在する血液凝固第 II (プロトロンビン)、VII、IX、X 因子や、抗凝固因子であるプロテイン C・プロテイン S、骨基質タンパク質のオステオカルシン (OC)、血管石灰化抑制因子であるマトリックス Gla タンパク質 (MGP) などがある。

ビタミン K には側鎖構造の異なる類縁体が存在し、食事から摂取されるビタミン K の大部分は、ビタミン K₁ (フィロキノン: PK) とメナキノン-7 (MK-7) である。しかし、ヒトを含めて哺乳類の組織内に存在するビタミン K の大部分は側鎖構造の異なるビタミン K₂ (メナキノン-4: MK-4) である。MK-4 は、ビタミン K の標的組織である肝臓や骨、またビタミン K 作用が十分に明らかにされていない血管、脳、膵臓、精巣において高濃度に検出される。組織中 MK-4 の由来については長い間明らかにされなかった。しかし、研究者の研究室ではビタミン K の重水素ラベル体を用いて組織に蓄積する MK-4 が経口摂取された PK や MK-7 の変換体であることを証明していた (Okano T, et al. J Biol Chem, 2008, 283, 11270-9)。また、MK-4 への変換にはビタミン K 類縁体の側鎖切断と、切断後にゲラニルゲラニル側鎖がナフトキノ骨格へ導入されなければならないが、これについて Nakagawa らはゲラニルゲラニル側鎖導入の鍵酵素が UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 (UBIAD1) であることを世界で初めて明らかにした (Nakagawa K, et al. Nature, 2010, 468, 117-21)。一方、側鎖切断についても小腸が側鎖切断の重要な組織であることを科学的に実証することができた (Hirota Y, Tsugawa N, et al. J Biol Chem 2013, 288, 33071-80)。

このように、摂取されたビタミン K が体内で MK-4 に変換される経路を科学的に証明することができたが、組織中の MK-4 の存在意義については未だ不明な点が多く残されていた。摂取したビタミン K は、全てが側鎖切断体に代謝されるわけではなく、intact の PK や MK-7 も血液循環を介して標的組織に到達する。ただし、血液循環中のビタミン K は半減期が短く、また、MK-4 は VKDP を Gla 化するという云々ゆる "Canonical" な作用だけでなく、核内受容体 Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) の脂溶性リガンドとして標的遺伝子の転写を制御する PK や MK-7 にはない作用を持つ。その一例として、骨芽細胞ではコラーゲンの蓄積を助ける tsukushi (TSK) や、コラー

ゲン分子と会合する Matrilin-2 などの細胞外マトリクスタンパク質を誘導する。これらのことは、標的組織で変換・蓄積される MK-4 の生理的な意義が非常に高いことを示唆する。しかし、この点に関する確たる証拠は現在のところ得られていなかった。循環血中に存在するビタミン K と、組織中で体内変換されるビタミン K の役割を明確に分離するためには、UBIAD1 遺伝子欠損による MK-4 欠失マウスの作出が必須となる。このような背景から、血管にターゲットを絞り、血管特異的 UBIAD1 遺伝子欠損マウスを作出し、その表現型を解析することでビタミン K の新たな作用機序が解明できると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミン K の標的組織である「血管」に焦点を当て、血管特異的 Ubiad1 遺伝子欠損により血管で MK-4 を喪失したマウスの表現型を解析し、標的組織での MK-4 生合成の生理的意義を明らかにすることである。

VKDP の一種である MGP の遺伝子欠損マウスは、生後数週間で重篤な血管石灰化を発症して死亡する。これは、MGP が強力な血管石灰化抑制因子であることを示すと同時に、血管におけるビタミン K の重要性を強く示唆する。MGP は、Gla 化されることによって骨芽細胞分化誘導因子である骨形成タンパク質 BMP-2 の作用を阻害する。また、培養血管平滑筋細胞をビタミン K 拮抗薬であるワルファリンで処理すると骨芽細胞様細胞へ分化誘導されることや、ワルファリン服用患者では動脈石灰化指標が有意に高いことが明らかにされている。また、MGP 遺伝子欠損マウスでは動静脈奇形 (AVM) などの血管形成異常が惹起され、血管壁被薄化による出血やガス交換不全による呼吸困難とチアノーゼが観察される。MGP の機能発現にはビタミン K が必須であり、胎児期から成長期、成熟後の血管におけるビタミン K と MGP の作用とその機序を明らかにすることは極めて重要と考えられる。MGP は主に血管平滑筋細胞に発現することや、血管内皮細胞にも弱いながら発現が認められる。このような理由から、血管におけるビタミン K の役割は重要であり、本研究では血管における MK-4 および UBIAD1 の存在意義を明らかにするために、血管平滑筋細胞特異的な UBIAD1 遺伝子欠損マウスを作出し表現型解析を行うことを計画した。

3. 研究の方法

血管特異的コンディショナル Ubiad1 遺伝子欠損マウス (Ubiad1-V-KO) の作出: Ubiad1 flox/flox マウスに、血管平滑筋に特異的に発現する Transgelin (SM22) の

プロモーターを用いて Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Transgelin(SM22)-Cre) の交配により Ubiad1-V-K0 を作出する。Transgelin(SM22)-Cre として、成熟マウスの血管平滑筋で Cre リコンビナーゼを発現する B6.129S6-Tagln^{tm2(cre)Yec/J} を交配させて、目的の Ubiad1-V-K0 作出を試みた。SM22 は、主に血管平滑筋に発現するが、心筋にも発現が認められる。

表現型解析: 血管特異的 Ubiad1 遺伝子欠損による出生への影響、血管形成および石灰化観察、出血傾向やビタミン K 代謝を検討した。また、テールカフ法による測定装置 (Softron 社製 BP-98A-L, 現有設備) を用いて血圧測定を行った。同時に心拍数および心臓断面画像、駆出率等の解析を行った。

4. 研究成果

コンディショナル Ubiad1 遺伝子欠損マウスを作出する目的で、Ubiad1 遺伝子第 1 エクソンを loxP 配列で挟んだ flox/flox マウスを作出し、これに Transgelin(SM22) プロモーターで血管平滑筋に恒常的に Cre リコンビナーゼを発現する成熟マウスの血管平滑筋で Cre リコンビナーゼを発現する B6.129S6-Tagln^{tm2(cre)Yec/J} を交配させた結果、Ubiad1-V-K0 はメンデルの法則に従って出生した。離乳前および離乳後は、しばらく正常に生育することを確認した。また、出血傾向について観察したところ、特に異常は見られなかった。しかし、生後 5 週目頃から成長に異常が見られはじめ、約 6 週~8 週齢にはすべての Ubiad1-V-K0 が死亡することを確認した。死亡した Ubiad1-V-K0 の解剖所見から、胸腔内に胸水が貯留することが死亡の主な原因であると推察された。

組織学的観察を行った結果、大動脈の弾性繊維の並びに乱れが観察され、血管平滑筋における Ubiad1 の欠失は弾性線維形成に異常を生じさせる可能性が示唆された。また、心臓の組織学的観察から、心室心筋形成不全と思われる心臓壁の菲薄化が観察された。また、数値化されていないものの、心筋の弾力性に変化が見られた。

さらに血圧を測定した結果、野生型マウスに比べて Ubiad1-V-K0 の血圧が上昇していることを確認し、心拍数も低下していることがわかった。評価個体数を十分に確保することができなかったため、血管石灰化あるいは心筋石灰化の有無については明確に確認ができなかったが、血管中膜の石灰化によるメンケベルグ型動脈硬化症は動脈の弾性を低下させ、さらに末端の毛細血管形成に異常が生じた場合、その影響は血圧変化として現れる可能性が高い。Ubiad1-V-K0 の血圧が上昇した理由を明らかにすることはできなかったが、これら血

管の石灰化や形成異常の影響による可能性もあり、継続して今後詳細な検討を行う。以上の結果より、血管平滑筋におけるビタミン K 体内変換酵素 Ubiad1 の欠損が血管形成や硬化、心機能に影響する可能性が強く示唆された。

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 3 件)

1. Vitamin K₂ biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice, Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, Uchino Y, Suhara Y, Hasegawa T, Amizuka N, Okamoto T, Tsugawa N, Kamao M, Funahashi N, Okano T, PLoS One, 2014, 9(8):e104078, 査読有, <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.014078>

2. Functional characterization of the vitamin K₂ biosynthetic enzyme UBIAD1, Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Okuda N, Suhara Y, Uchino Y, Kimoto T, Funahashi N, Kamao M, Tsugawa N, Okano T, PLoS One, 2015, 10(4):e0125737, 査読有, <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125737>

3. Cardiovascular Diseases and Fat Soluble Vitamins: Vitamin D and Vitamin K, Tsugawa N, J Nutr Sci Vitaminol, 2015, vol. 61, S170-2. <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.61.S170>

[学会発表](計 2 件)

1. Role of vitamins in prevention and treatment of disease and their recent findings; New functions of fat soluble vitamins., Tsugawa N, Asian congress of nutrition; 2015 年 5 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜)

2. 異所性石灰化に伴う軟組織における骨芽細胞様形質の獲得と Matrix Gla Protein (MGP) 発現の関係, 苫田紘佳, 津川尚子, 中村 拳, 山本真由美, 安田真央, 中川公恵, 岡野登志夫, 日本ビタミン学会第 67 回大会, 2015 年 6 月 6 日, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

津川尚子 (TSUGAWA , Naoko)
大阪樟蔭女子大学 ・ 健康栄養学部
・ 教授

研究者番号 : 30207352

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし