

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼの生体における
新たな役割の解明

研究代表者 柴 祥子 (ゲノム医学研究センター)

本研究では、ビタミンKの補因子として作用するビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (γ -glutamyl carboxylase ; GGCX) の生体における新たな役割の解明のため、GGCXの臓器特異的動物モデルを作製した。肝臓における機能解析により、本酵素の作用不足は出血傾向を高め、さらに寿命に影響することを明らかにした(成果論文1)。本研究内容はGGCXを介するビタミンKの臓器特異的作用の詳細を明らかにするものとして、新聞やインターネットで広く報道され、社会的関心を集めた。

ビタミンKは、1929年に発見された脂溶性ビタミンであり、血液凝固因子や骨代謝に深く関与することが知られている。本邦では、正常な血液凝固作用を維持するために、厚生労働省が2010年度版食事摂取基準の中でビタミンKの目安量を定めている。ビタミンKは、脂質を含まない食餌でヒヨコを飼育していた際に出血しやすい現象から、Henrick Damにより、1929年に発見された。彼は1943年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。ビタミンKは、2-メチル-1,4-ナフトキノンを経典骨格とし、側鎖の構造の違いから、自然界には、緑黄色野菜・海藻類・緑茶・植物油などに多く含まれるビタミンK₁(フィロキノン)と、微生物や腸内細菌によって合成されるビタミンK₂(メナキノン類)の2つのビタミンKが存在する。ビタミンK₃(メナジオン)は合成化合物として知られている。ビタミンKの主要な機能の一つとして、ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ (γ -glutamyl carboxylase ; GGCX) の補因子として働くことが1970年代から知られてきた¹⁻³⁾。GGCXは、標的タンパク質中のグルタミン酸残基を γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)残基へと変換することにより、Gla化 (γ -カルボキシル化) 翻訳後修飾をもたらす、生理的な活性をもつGlaタンパク質として成熟させる重要な役割を担っている。ビタミンK依存性Gla化タンパク質としては、これまでに、

肝臓に存在する第II, VII, IX, X血液凝固因子やプロテインC, プロテインS, プロテインZ⁴⁾、骨組織に存在する骨基質タンパク質のオステオカルシン(osteocalcin ; OC, 別名 bone Gla protein ; BGP)⁵⁾やマトリックスGla化タンパク質(matrix Gla protein ; MGP)⁶⁾などがこれまでに知られており、GGCX自身もGla化を受ける⁷⁾。一方で、GGCXおよび、Gla化タンパク質は、肝臓、脾臓、肺、膵臓、生殖腺、胎盤、胸腺、甲状腺、軟骨、子宮などにおいても広く発現が認められていることから、多様な組織において作用していると想定されるが、血液凝固系と骨組織以外におけるビタミンKの作用については解明されておらず、新たなビタミンK依存性Gla化タンパク質の存在も推測される。

研究代表者が所属するグループ(以下、本グループ)では、今までにGGCXを介する基質タンパク質のGla化修飾以外のビタミンKの作用の一つとして、核内受容体であるステロイドX受容体(SXR)のリガンドとして機能することを報告し^{8,9)}骨芽細胞系におけるSXR依存性の遺伝子発現調節^{8,9)}およびコラーゲン蓄積作用⁹⁾を明らかにしてきた。また、ビタミンKはプロテインキナーゼA(PKA)のリン酸化を介しても骨芽細胞系における遺伝子発現調節に関与し、GGCXおよびSXR以外の作用点をもつことを明らかにしてきた¹⁰⁾。

生体におけるビタミンKの詳細な機能を解明するためには、ビタミンK作用点であるGGCXとその標的となるGla化タンパク質、ビタミンK受容体となるSXRなどの発現を改変した動物での機能解析が必要と考えられる。本グループでは、マウスSXRオルソローグのPXR欠損マウスを用いて、骨密度測定による骨形態観察を行い、PXR欠損マウスでは骨量減少を認めたことから、SXRが骨代謝の調節因子として重要である可能性を示した¹¹⁾。

生体におけるGGCXの機能解析については、全ての組織でGGCXを欠損させたノックアウトマウス

の表現型が過去に報告されている¹²⁾。このマウスでは、胎生期の9.5日から18日と生後間もない期間に出血が原因で致死となるため、GGCXの各組織における機能は未解明な点が多い。また、GGCXによりGla化を受け活性化される血液凝固因子のうち、第II因子の欠損マウスと第X因子の欠損マウスはともに、二次的ではあるが胎生致死であることが報告されている^{13,14)}。第II因子の欠損マウスは、卵黄嚢が青白く、血管内も空であり、胎生期の9.5～12.5日から心臓が拡張し始める。第X因子の欠損マウスは卵黄嚢や血管は正常だが、胎生期の11.5～12.5日から出血が原因で死亡する。これらの欠損マウスの表現型を考慮すると、*Ggcx*全身性欠損マウスの胎児は妊娠中期の発達に異常をきたしているかと推察できる。

このような背景の下、本研究では組織特異的にGGCXを欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作製し、GGCXの機能解析を行うことを目的とした。cKOマウスの作製には、各組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターの下流にCre組換え酵素を挿入したCre発現トランスジェニックマウスと、*Ggcx*遺伝子前後にCreにより切断されるloxP配列を挿入した遺伝子型をホモに有する*Ggcx*^{lox/lox}マウスとを交配して作製した。本研究により、組織特異的にプロモーターに制御されるCreトランスジェニックマウスを用いることにより、組織特異的に*Ggcx*をノックアウトし、機能解析することが可能になった。

肝細胞特異的に発現するアルブミン(Albmin; *Alb*)のプロモーター支配下にCre組換え酵素を挿入したトランスジェニックマウス(*Alb-Cre*)を*Ggcx*^{lox/lox}と交配することにより、肝臓特異的にGGCXの酵素機能を低下させることに成功した。興味深いことに、肝臓特異的*Ggcx* cKOマウスでは、コントロールマウスと比較して、血漿中の血液凝固因子第II因子と第IX因子の活性は低下し、止血時間に著しい延長が認められた。しかしながら、一次止血機構で中心的役割を担う血小板の数を調べると、*Ggcx* cKOマウスではコントロールマウスと遜色がなかった。このことから、cKOマウスでの血液凝固時間の延長は、二次止血機構の著しい障害によることが示唆された。生存期間は、雌雄ともcKOマウスにおいて短命であることが認められ、特にcKO雄性マウスは雌性マウスよりも短命であることが明らかになった。死亡したマウスのほとんどで皮下組織に膨大な出血が観察されたことから、出血が直接的な死因であると推測された。

また、本研究で作製した肝臓特異的*Ggcx*欠損マウスは、血液凝固第II, IV因子活性が低下したにもかかわらず、胎生致死の全身性*Ggcx*欠損マウスよりは著しく長く生存できることが明らかになった。*Alb-Cre*のアルブミンプロモーターは胎生期の16.5日

頃から活性化するため¹⁵⁾、*Ggcx* cKOマウスでは、この時期まで*Ggcx*が存在すると考えられ、両者の表現型の相違をもたらすものと考えられる。

近年では、ビタミンK、特にK₂が骨粗鬆症治療薬で使われている^{16,17)}。ビタミンKの活性型が肝臓以外の組織においても認められることから¹⁸⁾、ビタミンKを補因子とするGGCXの様々な臓器特異的な機能については、さらに各種臓器に対する*Ggcx* cKOマウスを作製することによって解明できるものと期待される。本研究をさらに進展し、ビタミンK作用に基づく創薬開発へつなげていきたい。

参考文献

- 1) Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K₂ in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev* 2005;10:24-35.
- 2) Nelsestuen GL, Zytkevich TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem* 1974;249:6347-50.
- 3) Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2730-3.
- 4) Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L. Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z. *J Biol Chem* 2008;283:19922-6.
- 5) Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:1447-51.
- 6) Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- 7) Berkner KL, Pudota BN. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:466-71.
- 8) Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grün F, Errandi J, Romero K, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-27.
- 9) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen

- accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2006;281:16927-34.
- 10) Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:239-47.
- 11) Azuma K, Casey SC, Ito M, Urano T, Horie K, Ouchi Y, Kirchner S, Blumberg B, Inoue S. Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 2010;207:257-63.
- 12) Zhu A, Sun H, Raymond RM Jr, Furie BC, Furie B, Bronstein M, Kaufman RJ, Westrick R, Ginsburg D. Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 2007;109:5270-5.
- 13) Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7597-602.
- 14) Dewerchin M1, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, Rosen ED. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* 2000;83:185-90.
- 15) Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ, Sucov HM. Hepatocytesspecific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 2000;20:4436-44.
- 16) Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:515-21.
- 17) Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer MJ, Gilbody S, Torgerson DJ. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006;166:1256-61.
- 18) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, Okuda N, Shimomura Y, Sahara Y, Okano T. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* 2010;468:117-21.

研究成果リスト

原著論文

- 1) Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S. Liver-specific γ -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One* 2014;9(2):e88643.
- 2) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 2013;4:2147.

総説

- 1) 柴祥子, 井上聡. ビタミンKと骨代謝. *Vitamins (Japan)* 2014;88(1):18-24.

学会発表

- 1) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 津久井通, 近藤志穂, 小路武彦, 井上聡. ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼをセルトリ細胞特異的に欠失したマウスは雄性不妊を呈する, 第32回日本アンドロロジー学会学術大会ならびに総会, 2013年7月26-27日, 大阪府大阪市:学会賞受賞(基礎部門)
- 2) 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡. COX7RPはミトコンドリアの呼吸活性を制御しその発現により動物個体レベルでの運動持続能を向上させる, 第86回日本生化学会大会, 2013年9月11-13日, 神奈川県横浜市:鈴木紘一メモリアル賞受賞

特許出願

該当なし