

学内グラント 報告書

平成27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)

ビタミンKは、1929年にHenrick Damらが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を見出したことで発見された脂溶性ビタミンである。今日では、ビタミンKは、血液凝固や骨折予防¹⁾に深く関わる事が判明しており、本邦では、厚生労働省が2015年度版食事摂取基準の中で目安量を定めている。ビタミンKの構造的特徴は、2-メチル-1,4-ナフトキノンを経典骨格としており、側鎖構造の違いにより、自然界では、ビタミンK₁ (フィロキノン) とビタミンK₂ (メナキノン類) の2つのビタミンKが存在し、合成化合物として、ビタミンK₃ (メナジオン) が知られている。ビタミンK₁は、緑黄色野菜・海藻類・緑茶・植物油などに多く含まれ、ビタミンK₂は微生物や腸内細菌によって合成され、発酵食品の納豆に多く含まれる。

1970年代から、ビタミンKの主要な作用メカニズムの一つとして、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知られてきた²⁻⁴⁾。GGCXは、ビタミンK依存性に標的タンパク質中のグルタミン酸 (Glu) 残基を γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基へと変換する酵素であり、タンパク質のGla化 (γ -カルボキシ化) 翻訳後修飾をもたらすことで、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。

GGCXの基質として知られる代表的なビタミン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Z⁵⁾、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)⁶⁾やマトリックスGla化タンパク (Matrix Gla protein ; MGP)⁷⁾などが知られている。オステオカルシンは骨芽細胞から産生され、ビタミンK依存性GGCXにより、Gla化オステオカルシン (Carboxylated osteocalcin ; cOC, Gla-OC) へと修飾されることによってカルシウムが結合するようになり、骨基質中に蓄積され、骨形成に重要な役割を果たしている。一方、低カルボキシ化オステオカルシン (Undercarboxylated osteocalcin ; ucOC, Glu-OC) は骨のビタミンK不足を反映すると考えられており、その血中濃度は骨粗鬆症患者で高く、大腿骨頸部骨折のリスク

と相関していることから、骨粗鬆症におけるビタミンK₂治療薬の効果モニターとしてucOCが用いられている。最近、KarsentyらのグループはucOCが、インスリン感受性の亢進に関与することを報告しており⁸⁾、骨代謝のみならず糖代謝との関連が注目されている。

一方で、GGCXおよびGla化タンパク質は、肝臓、軟骨、生殖腺、膵臓、脾臓、肺、胸腺、胎盤、甲状腺、子宮などにおいても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。しかしながら、血液凝固系と骨組織以外におけるビタミンKの作用については未だ解明されておらず、新たなビタミンK依存性Gla化タンパク質の存在と上記の組織における新たな機能が想定される。GGCXの生体における機能を解明する目的で、全身性にGGCXを欠損するマウスが作製されたが、このGGCXノックアウトマウスは出血を起こして出生前後に致死となることが報告されており⁹⁾、生体の各組織における特異的な作用については解析がなされていない。

そこで我々は、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 (Conditional knockout ; cKO) を作製し、GGCXの生体における機能解析モデルマウスを作製した。組織特異的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 (Transgenic ; Tg) マウスと、*Ggcnx* 遺伝子の前後にCreによって切断されるloxP配列を挿入した遺伝子型をホモに有する *Ggcnx*^{fllox/fllox} マウスとを交配して作製した。当研究室では、肝細胞特異的に発現するアルブミン (Albumin ; *Alb*) のプロモーター支配下にCre組換え酵素を挿入したTgマウス (*Alb-Cre*) を *Ggcnx*^{fllox/fllox} マウス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たマウス (肝臓cKO) を作製し、この肝臓cKOマウスに認められた止血時間と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を見出した。さらに、生存期間は、雌雄とも肝臓cKOマウスにおいて短命であり、特に肝臓cKO雄性マウスは雌性マウスよりも短命であることが判明した。死亡したマウスでは、皮下組織に著名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、生命維持に

において肝臓中のGGCXが必須であることが認められた¹⁰⁾。

続いて、我々はGGCXによる骨代謝と糖代謝の関連性を解明する目的で、*Ggcx*^{flox/flox}マウスと骨芽細胞に発現するコラーゲンtype 1 (*Col1*)のプロモーター支配下に*Cre*組換え酵素を挿入した*Col1-Tg*マウスとを交配させ、骨芽細胞でGGCXを欠損するコンディショナルノックアウトマウス(骨芽細胞cKO)を作出した。このことにより、骨組織における特異的なGGCXの機能に焦点を絞ることができ、近年注目される骨代謝と糖代謝との関連性の解析を可能とした。

我々は、独自に作製した骨芽細胞cKOマウスの大腿骨において、GGCX抗体を用いた免疫組織化学的解析にて*Ggcx*のタンパク質の発現が消失していることを認めた。また、GGCXの基質でGla化タンパク質であるオステオカルシンは、骨芽細胞の*Ggcx*が欠損していることから、Gla化修飾が起これないと予測できる。そこで、血清ucOCとcOC濃度を調べると、コントロールマウスに比べて*Ggcx* cKOマウスでは、ucOC濃度が上昇し、cOC濃度が低値を示したことから、骨芽細胞特異的に*Ggcx*を欠損していることを認めた。

この骨芽細胞cKOマウスを用いて、糖代謝解析を行った。経口糖負荷試験を実施して血糖値を測定し、各時点において採取した血液から血漿インスリン濃度を測定した。その結果、骨芽細胞cKOマウスにおいて、少ないインスリン量で血糖値を低く維持できることを見出した。加えて興味深いことに、骨芽細胞cKOマウスは体重の推移では差は認められなかったが、白色脂肪組織重量が低下することを発見した。マイクロアレイを用いた白色脂肪組織の遺伝子発現解析から、脂質分解関連遺伝子およびインスリンシグナル経路関連遺伝子が骨芽細胞cKOマウスにおいて増加したことが認められた。これらの結果から、骨芽細胞においてGGCXがオステオカルシンのカルボキシル化調節を担っているばかりでなく、糖代謝においても重要な役割を果たしていることを見出した¹¹⁾。

次に、骨芽細胞cKOマウスの骨代謝解析を行った。Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法にて骨密度を測定した結果、この骨芽細胞cKOマウスは、コントロールマウスに比べて大腿骨の骨密度が増加していた。そこで、骨形態計測を行ったところ、類骨の形成が増大していることが観察された。さらに、皮質骨を調べると、骨芽細胞cKOマウスにおいて皮質骨の幅の増加を認めた。骨芽細胞においてGGCXを欠失させた時の骨芽細胞への影響を調べるために、生後1～2日の仔マウス頭蓋より初代骨芽細胞を採取して培養し、骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼの産生を調べたところ、コントロールマウスに比べ、骨芽細胞cKOマウスで上昇していることを認めた。骨芽細胞における*Ggcx*の機能を詳細に調べるため、透過型電子顕微鏡を用いた微細構造解析を行うと、興味深いことに、コントロールマウスでは典型的な石灰芽球が形成されていたのに対し、骨芽細胞cKO

マウスにおいては石灰芽球を構成するリン酸カルシウム結晶の密度が低下し、典型的な石灰芽球への成長が妨げられていることが観察された。加えて、骨芽細胞cKOマウスでは、石灰芽球の形成が不完全のまま、コラーゲン線維へ直接沈着しており、骨形成の異常を認めた。骨強度への影響を調べるため、大腿骨の3点曲げ試験を行ったところ、コントロールマウスと比較して骨芽細胞cKOマウスで骨強度が増していることが示された。これらのことから、骨芽細胞cKOマウスで見られた異常な石灰化は骨強度の増加に寄与していることが示唆された。

以上の解析により、骨芽細胞特異的に*Ggcx*を欠損させると異常な骨形成が認められ、一方で糖代謝では、インスリン感受性が良好になることが示され、Karsentyらの報告したメカニズムと矛盾しないことが示された^{8, 12-14)}。骨芽細胞におけるGGCXは、生体内で正常な骨代謝と代謝調節に重要であり、骨代謝と糖代謝の相互作用における新しいメカニズムの解明のためにも、GGCXとその補因子となるビタミンKを介する新規分子とそのシグナル経路を明らかにすることが課題であると考えられた。近年のオステオカルシンに関する上記の新知見などから、オステオカルシンは骨由来の内分泌ホルモンとして、骨代謝、エネルギー代謝、生殖機能などを制御する多臓器連関に関与する可能性が示唆される¹⁵⁾。

本研究により、ビタミンK依存性GGCXは、糖代謝と骨代謝を制御する重要な役割を担っていることが示された。糖代謝は、糖尿病をはじめとする生活習慣病と密接に関わっている。糖尿病は予防医学の観点から特に留意すべき疾患であり、遺伝的な要因を除けばエネルギーの摂取過多、身体活動量の低下など食習慣や生活習慣の乱れが危険因子であり、また発症は加齢に伴って増加していく。一方で、加齢に伴って骨粗鬆症を罹患する割合も増加しており、骨粗鬆症患者は生活習慣病罹患率も高いことから、骨代謝と糖代謝の連関が想定される。本研究をさらに進展させ、GGCXとビタミンK作用に基づいた生活習慣病や骨粗鬆症などの予防法や治療、創薬開発が可能になると期待された。

参考論文

- 1) Bouckaert JH, Said AH. Fracture healing by vitamin K. *Nature* 1960; 185: 849.
- 2) Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev* 2005; 10: 24-35.
- 3) Nelstuen 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.
- 4) 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.
- 5) Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L.

- Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of proteinZ. *J Biol Chem* 2008; 283: 19922-6.
- 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 2010; 142: 296-308.
 - 9) 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.
 - 10) 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: e88643.
 - 11) Shiba S, Ikeda K, Azuma K, Hasegawa T, Amizuka N, Horie-Inoue K, Inoue S. γ -Glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453: 350-5.
 - 12) Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-69.
 - 13) Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5266-70.
 - 14) Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Brüning JC, Clemens TL. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 2010; 142: 309-19.
 - 15) Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, Srinivas P, Chamouni A, Lugani F, Lejeune H, Kumar TR, Ploton I, Karsenty G. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest* 2013; 123: 2421-33.

研究成果リスト

原著論文

- 1) Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S. Osteoblastspecific γ -glutamyl carboxylase-deficient mice display enhanced bone formation with aberrant mineralization. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 1245-54.