

氏名(本籍)	おお 大	さき 崎	ゆう 雄	すけ 介
学位の種類	博士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 6 2 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	遺伝子発現の網羅的解析手法を用いたビタミンKの新規機能に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	駒 井 三千夫	
	(副 査)	教 授	池 田 郁 男	
		助教授	北 澤 春 樹	
		助教授	白 川 仁	

# 論文内容要旨

## 緒言

ビタミン K(K)は、高等生物において K 依存性タンパク質のグルタミン酸残基を  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(Gla) 残基に変換する  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)に必須の補因子である(Fig. 1)。哺乳類において Gla 残基を含むタンパク質(Gla タンパク質)には、プロトロンビンなどの血液凝固因子や骨基質タンパク質であるオステオカルシンなどが含まれることから、K は血液凝固や骨代謝において重要な役割を果たしている。しかし K の生体内分布をみると血液凝固因子産生の際である肝臓や骨以外にも精巣、脳、膵臓、顎下腺などにも高濃度で存在しているが、これらの組織における K の役割は明らかとなっていない。

K は 2-メチル-1,4-ナフトキノンを骨格とし、3 位の側鎖の違いによっていくつかの同族体に分類される。フィチル基を側鎖とする K1 は植物によって生産され、イソプレニル基を側鎖とする K2 は主に微生物によって合成される。側鎖を持たない化学合成品である K3 も含め、K 類は高等動物の組織内において K2 の一種であるメナキノ-4(MK-4)へと特異的に変換されることが明らかとなっている(Fig. 2)。MK-4 はヒト白血病由来の細胞へのアポトーシス誘導、破骨細胞への分化抑制やアポトーシス誘導、骨芽細胞のアポトーシス抑制など他の K 類には見られない MK-4 特異的な作用を有していることが報告されている。前述の精巣、脳、膵臓、顎下腺では MK-4 変換活性が非常に高いが、これらの組織における変換の意義は未だ明らかとなっていない。以上のことから K、特に MK-4 には未知の作用が存在していることが強く示唆されている。近年、モデル生物のゲノムプロジェクトの成果として DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析が可能となった。本研究では K 充足度の異なるモデル動物を作出し、これらの動物における遺伝子発現を網羅的に解析することによって、K の新規作用を検索することを目的とした。

## 第 1 章 K 充足度の異なるモデル動物の作出

### 第 1 節 K 欠乏動物の作出

組織中の K 量に依存して発現量を変化させる遺伝子種をスクリーニングするに先立ち、K 充足度が異なる組織サンプルを得るために、K 欠乏及び K 添加モデル動物を作出した。

K は腸内細菌叢によって合成され、宿主はこれを吸収・利用することから、実験には腸内細菌の存在しない Wistar 系無菌(GF)及び腸内細菌を有する Wistar 系通常(CV)ラット(雄、11~12 週齢)を用いた。K 欠乏群、コントロール群、K 添加群とに分け、それぞれに市販 K 欠乏飼料(TD97053, Harlan Teklad 社)、K 欠乏飼料 1kg あたりに K1 を 0.75mg、75mg 添加した飼料を与えて 9 日間(GF 群)または 21 日間(CV 群)飼育した。欠乏状態の指標として、血液凝固時間であるプロトロンビン時間(PT)及び活

性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した (Fig. 3)。GF および CV 欠乏群では PT、APTT がともに延長しており、特に GF 欠乏群ではほぼ全ての個体で PT、APTT とともに 60 秒を越えていたことから重篤な血液凝固不全の状態であったと推察された。また蛍光 HPLC 法により肝臓、心臓、腎臓、精巣、脳、顎下腺中 K 濃度を測定した (Table 1)。肝臓中 K 濃度は GF 欠乏群で最低値を示し、以下低い順に GF コントロール群、CV 欠乏群、CV コントロール群、GF 添加群、CV 添加群となっていた。他の組織中 K 濃度も GF、CV とともにほぼ欠乏群、コントロール群、添加群の順に組織中総 K 濃度が上昇しており、また GF に比べて CV ラットの方が K 濃度は高値を示した。また、肝臓および心臓においては変換されて生成した MK-4 よりも飼料由来の K1 の方が高い濃度で存在しており、腎臓では K1 と MK-4 が同程度、精巣、脳、顎下腺では K1 よりも MK-4 の方が高い濃度で存在していた。以上の結果より、GF 欠乏群および CV 欠乏群では K 欠乏状態にあり、特に GF 欠乏群は重篤な K 欠乏状態にあると考えられた。

## 第 2 節 MK-4 欠乏動物の作出

MK-4 は他の K 類にはない特異的な作用を有する可能性が示唆されているが、K 類は MK-4 へと変換されることから、組織中の MK-4 濃度を低下させるためには全ての K 類の供給を無くす必要がある。しかし、このアプローチでは血液凝固不全などの K 欠乏症を併発することから MK-4 特異的な作用の解析には有用ではなかった。ところが、近年加工油脂の製造工程で行なわれる水添反応において K1 から生じる 2',3'-ジヒドロフィロキノン (dK1) は K 類同様 GGCX の補因子として作用するが MK-4 へと変換されないことが報告された (Fig. 4)。そこで、本実験では dK1 を無菌ラットに与えることにより、血液凝固不全を引き起こすことなく組織内 MK-4 を欠乏させたモデル動物の作出を試みた。

実験には Wistar 系無菌 (GF) ラット (雄、5 週齢) を用いた。K1 群、dK1 群とに分け、それぞれに 2mg/kg 飼料の K1 および dK1 を添加した飼料を与え、26 日間飼育した後解剖に供した。飼育期間中の体重および解剖時の肝臓重量、大腿骨重量には変化は認められなかった。Gla 化活性の評価を行なうために PT および APTT を測定したところ、コントロール群と比較して dK1 群において PT、APTT とともに若干ではあるものの有意に延長していた (Fig. 5)。血漿、肝臓、精巣、脳の K 濃度を蛍光 HPLC 法により測定したところ (Table 2)、肝臓における総 K 濃度はコントロール群と比較して dK1 で約半分になっており、dK1 群で見られた血液凝固時間の延長は肝臓中の総 K 濃度を反映したものであると考えられた。精巣および脳における MK-4 濃度はコントロール群と比較して dK1 群ではそれぞれ 3 分の 1、7 分の 1 となっており、有意な低値を示した。以上の結果から、dK1 食の給餌により重篤な血液凝固不全を引き起こすことなく組織内 MK-4 濃度を低下させたモデル動物の作出に成功した。

## 第2章 遺伝子発現の網羅的解析によるK標的遺伝子の検索

Kの新規作用に繋がる知見を得るために、第1章で作出したモデルラットの組織内において、K充足度に依存して発現量を変化させる遺伝子種を検索するために、DNAマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現量変化を網羅的に解析した。

K欠乏群、コントロール群、K添加群の肝臓、精巣、心臓、脳、腎臓よりトータルRNAを抽出し、各群毎にプールし、市販DNAマイクロアレイ(Rat GeneFilters, Research Genetics社)を用いて遺伝子発現量を網羅的に解析した。スクATTERプロット法によって肝臓における発現量を解析したところ、添加群と比較して欠乏群で発現量が上昇していた遺伝子種には、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、フィブリノーゲン、メタロチオネインなど一連の急性期タンパク質に属する遺伝子が含まれていた(Table 3)。また、階層的クラスタ分析により解析を行ったところ、添加群では発現量が低く欠乏群で発現量が上昇しているクラスターにおいて、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質およびフィブリノーゲンといった急性期タンパク質が含まれていた(Fig. 6)。これらのうち、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖、メタロチオネイン-2の発現量をノーザンハイブリダイゼーション法により測定したところ、GF、CVともにK欠乏群において、いずれも顕著な発現上昇が認められた(Fig. 7)。以上のことから肝臓ではK欠乏時に急性期タンパク質の発現が上昇することが示された。急性期タンパク質は炎症時に発現が上昇するが、この発現がK欠乏時に上昇していたことから、Kが炎症を抑制する可能性が考えられた。

また、スクATTERプロット法によって精巣における発現量を解析したところ、欠乏群と比較して添加群で発現量が上昇していた遺伝子種にはcAMP生成、コレステロール合成およびイソプレノイド代謝に関連するいくつかの遺伝子が含まれていた(Table 4)。精巣ではcAMPによりステロイドホルモン合成が促進されることから、コレステロール、ステロイドホルモン合成経路が活性化している可能性が示唆された。

## 第3章 Kが炎症に及ぼす影響の解析

### 第1節 リポポリサッカライド投与による炎症誘導ラットを用いた検討

K欠乏ラット肝臓における遺伝子発現の網羅的解析からKが炎症を抑制する可能性が示唆された。そこで、リポポリサッカライド(LPS)投与による炎症誘導モデルラットを用い、Kが炎症に及ぼす影響について検討を行った。

Wistar/stdラット(8週齢、雄)にコントロール飼料またはK添加飼料を与えて10日間飼育した。LPSまたは生理食塩水を0.5 mg/kg体重を腹腔内投与し、18時間後に腹大動脈より採血して血漿を得た。血漿中ALTおよびAST活性を測定したところ、LPS非投与群においては有意な差は認められなかったが、LPS投与群においてはコントロール群と比較してK添加群で有意な低値を示した(Fig. 8)。また、定量RT-PCR法によって肝臓におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)発現量を測定したところ、LPS投

与群においてコントロール群と比較して K 添加群では MIF 発現量は低下していた (Fig. 9)。K1 または MK-4 を単回投与 ( $10^5$  mol/kg 体重) したラットでは K による炎症抑制効果は認められなかった。以上の結果より、K は抗炎症作用を有しているが、その効果は長期的な K の摂取によって発揮されると考えられた。

## 第2節 培養細胞を用いた検討

K の抗炎症作用を詳細に解析するために、ヒトマクロファージ様細胞を LPS で刺激した際に誘導されるインターロイキン-6 (IL-6) 発現量を指標として検討した。

培地中に 0、0.1、1、10  $\mu$ M の MK-4 を添加したところ、濃度依存的に IL-6 発現が抑制された (Fig. 10)。10  $\mu$ M の K 同族体を添加したところ、K1、dK1、MK-3、MK-4 のいずれも有意に IL-6 発現量を低下させた。有意ではなかったが MK-7 も IL-6 発現量を低下させた。K 類の側鎖構造と類似したゲラニオール (GOH)、ファルネソール (FOH)、ゲラニルゲラニオール (GGOH)、フィトール (FOH)、ゲラニルゲラニルアセトン (GGAc) を添加したところ、GGOH を除いて IL-6 発現量に変化は認められなかった。K がプロテインキナーゼ A (PKA) を活性化させるという報告があることから、1 mM のジブチリル cAMP を添加したところ、有意な IL-6 発現低下が認められた。以上のことから K による抗炎症作用は側鎖構造よりも骨格構造による寄与が大きく、PKA の活性化を介している可能性が示唆された。

## まとめ

本研究は K の新規作用の検索を目的として行われた。K 充足度の異なるモデル動物を作出し、組織内の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、欠乏群では肝臓における急性期タンパク質の遺伝子発現量が上昇していることが明らかとなった。また、精巢ではステロイド産生やイソプレノイド代謝に関わる遺伝子種の発現が欠乏群と比較して添加群で上昇していた。ラットにおいて LPS に誘導される炎症が K 添加食の給餌によって抑制されたことから K が抗炎症作用を有していることが明らかとなった。さらにヒトマクロファージ様細胞を用いた検討の結果、K の骨格部分による PKA の活性化を介して抗炎症作用が発揮される可能性が示唆された。

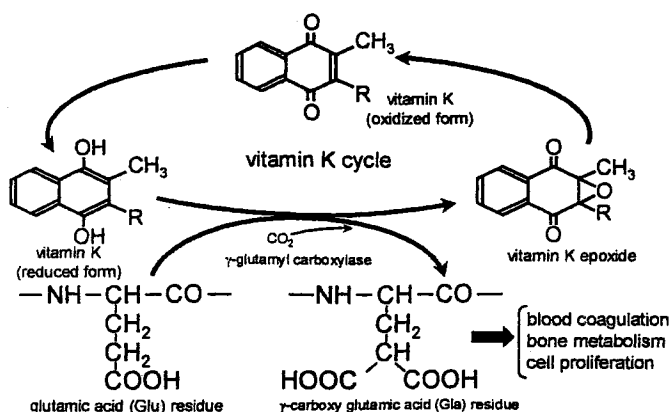


Fig. 1 The vitamin K cycle and  $\gamma$ -glutamyl carboxylation.

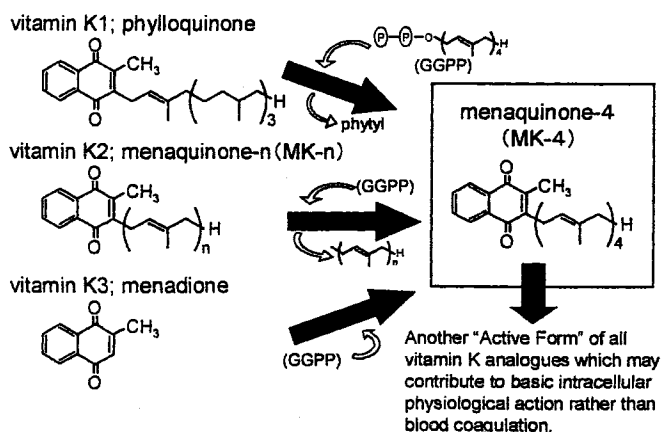


Fig. 2 The structures of vitamin K analogues and conversion to menaquinone-4.

Table 1. Vitamin K concentrations in each organ.<sup>1</sup>

		liver	heart	kidney	testis	brain	submandibular gland
K1	def	2.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	10 ± 4.9 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>a</sup>
	GF	4.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>
	cont	2494 ± 558 <sup>b</sup>	933 ± 73 <sup>b</sup>	147 ± 17 <sup>b</sup>	37 ± 5.3 <sup>b</sup>	34 ± 3.3 <sup>b</sup>	109 ± 1.1 <sup>b</sup>
	sup	10 ± 5.2 <sup>a</sup>	3.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	25 ± 6.3 <sup>a</sup>	12 ± 3.0 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.7 ± 4.0 <sup>a</sup>
	CV	22 ± 4.5 <sup>a</sup>	29 ± 3.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
	sup	2862 ± 611 <sup>b</sup>	4769 ± 5.2 <sup>b</sup>	463 ± 25 <sup>b</sup>	112 ± 11 <sup>b</sup>	137 ± 12 <sup>b</sup>	680 ± 69 <sup>b</sup>
MK-4	def	N.D. <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	99 ± 16 <sup>a</sup>	11 ± 0.6 <sup>a</sup>	77 ± 3.2 <sup>a</sup>
	GF	N.D. <sup>a</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	137 ± 4.3 <sup>a</sup>	29 ± 1.2 <sup>a</sup>	145 ± 4.2 <sup>a</sup>
	cont	28 ± 4.4 <sup>b</sup>	270 ± 19 <sup>b</sup>	186 ± 9.1 <sup>b</sup>	669 ± 58 <sup>b</sup>	607 ± 34 <sup>b</sup>	660 ± 24 <sup>b</sup>
	sup	N.D. <sup>a</sup>	10 ± 1.9	4.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	212 ± 13 <sup>a</sup>	48 ± 7.2 <sup>a</sup>	228 ± 29 <sup>a</sup>
	CV	N.D. <sup>a</sup>	9.7 ± 1.5	12 ± 0.6 <sup>a</sup>	147 ± 4.8 <sup>a</sup>	38 ± 2.1 <sup>a</sup>	402 ± 23 <sup>a</sup>
	sup	136 ± 59 <sup>b</sup>	2065 ± 1264	317 ± 17 <sup>b</sup>	1336 ± 54 <sup>b</sup>	909 ± 27 <sup>b</sup>	1281 ± 78 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Values are mean ± SEM pmol/g tissue of 3-7 rats. Values with different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$ . K1, vitamin K1; MK-4, menaquinone-4; GF, germfree group; CV, conventional group, def, vitamin K deficient group; cont, control group; sup, vitamin K1 supplement group; N.D., not detectable.

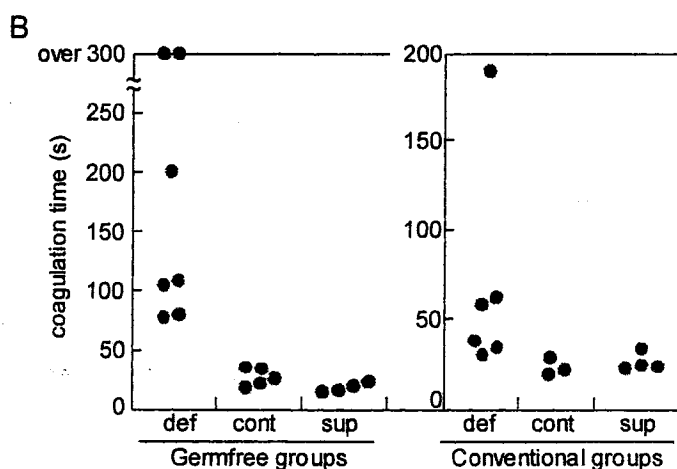
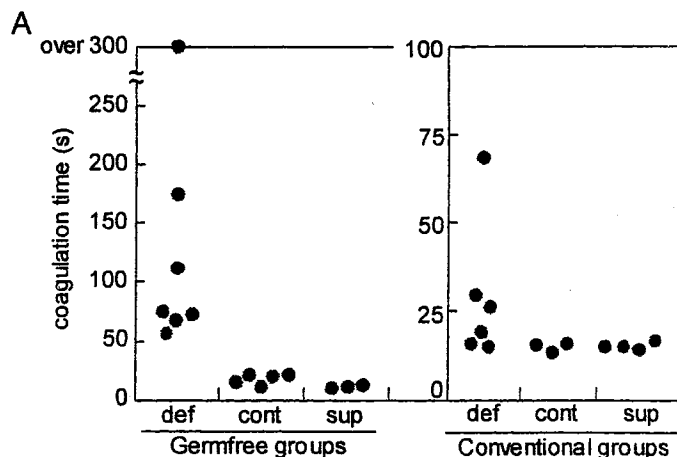


Fig. 3 Effect of vitamin K-deficient diet on blood coagulation time, as measured by prothrombin time (A) and activated partial thromboplastin time (B). def, deficient group; cont, control group; sup, supplement group.

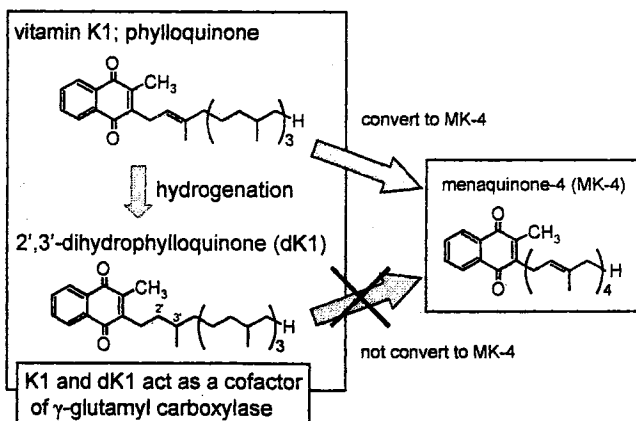


Fig. 4 The structure of 2',3'-dihydrophylloquinone (dK1). dK1 acts as a cofactor of  $\gamma$ -glutamyl carboxylase and does not convert to menaquinone-4.

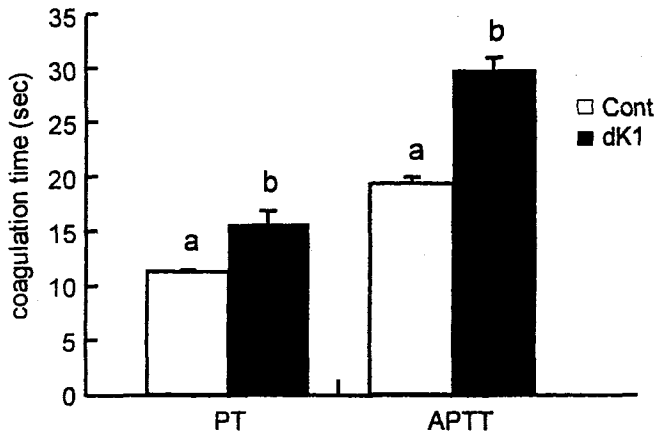


Fig. 5 Effect of 2',3'-dihydrophyloquinone (dK1) diet on blood coagulation time, as measured by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT). Cont, control diet group; dK1, dK1 diet group

Table 2. Vitamin K concentrations.<sup>1</sup>

		pmol / mL or pmol / g tissue			
		K1	dK1	MK-4	total
plasma	cont	5.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.2 ± 2.0
	dK1	0.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	N.D. <sup>b</sup>	3.4 ± 1.1
liver	cont	73 ± 10 <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	N.D.	73 ± 10 <sup>a</sup>
	dK1	4.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	33 ± 5.1 <sup>b</sup>	N.D.	37 ± 5.2 <sup>b</sup>
testis	cont	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	89 ± 3.4 <sup>a</sup>	91 ± 3.5 <sup>a</sup>
	dK1	N.D. <sup>b</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	25 ± 2.0 <sup>b</sup>	28 ± 2.1 <sup>b</sup>
brain	cont	2.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	N.D. <sup>a</sup>	37 ± 2.0 <sup>a</sup>	39 ± 1.3 <sup>a</sup>
	dK1	N.D. <sup>b</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	7.2 ± 0.5 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Values are mean ± SEM pmol/mL or pmol/g tissue of 5 rats. Values with different superscripts are significantly different between K1 and dK1 at *p* < 0.05. K1, vitamin K1; dK1, 2',3'-dihydrophyloquinone; MK-4, menaquinone-4; cont, control; N.D., not detectable.

Table 3 Genes downregulated in liver of deficient groups.<sup>1</sup>

acc No.	NAME	ratio (def/sup)	
		GF	CV
AA899887	EST	4.66	3.85
AA819506	actin-related protein complex 1b	3.37	1.36
AA900307	EST	2.57	1.84
A1071037	preimplantation protein 2	2.36	1.28
AA899108	EST	2.34	2.36
AA924281	<u>metallothionein-2</u>	<u>2.28</u>	<u>1.06</u>
AA900218	<u>metallothionein-1</u>	<u>2.03</u>	<u>1.10</u>
A1029162	<u>α<sub>1</sub>-acid glycoprotein</u>	<u>2.02</u>	<u>1.50</u>
AA819267	<u>fibrinogen γ polypeptide</u>	<u>1.93</u>	<u>1.27</u>
AA817840	opioid receptor s 1	1.84	1.41
AA924856	EST	1.84	1.35
AA859825	α <sub>2</sub> -macroglobulin	1.78	1.15
AA964414	proteasome subunit a type 3	1.74	1.53
A1071033	<u>fibrinogen B β polypeptide</u>	<u>1.72</u>	<u>1.34</u>
AA955539	solute carrier family 22 member 5	1.71	1.20
AA819042	hemopexin	1.51	1.41

<sup>1</sup>Values are expressed as a expression ratio of deficient group / supplement group. Underlined genes belong to acute phase proteins. def, deficient; sup, supplement; GF, germfree; CV, conventional; EST, expressed sequence tag.

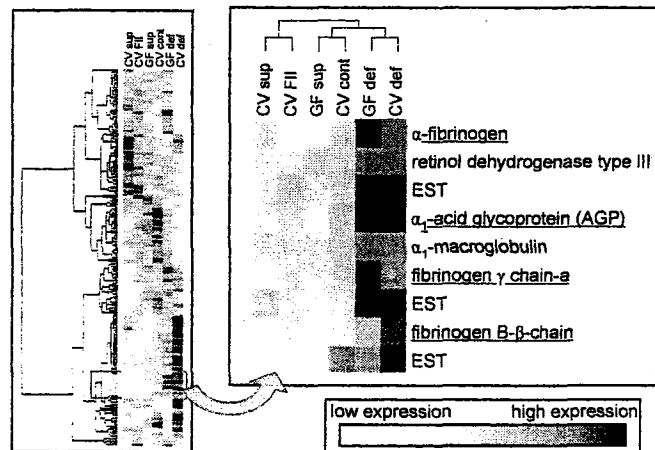


Fig. 6 Cluster analysis of gene expressions in liver. Underlined genes belong to acute phase proteins. GF, germfree group; CV, conventional group; def, deficient group; cont, control group; sup, supplement group; FII, commercial pellet diet group; EST, expressed sequence tag.

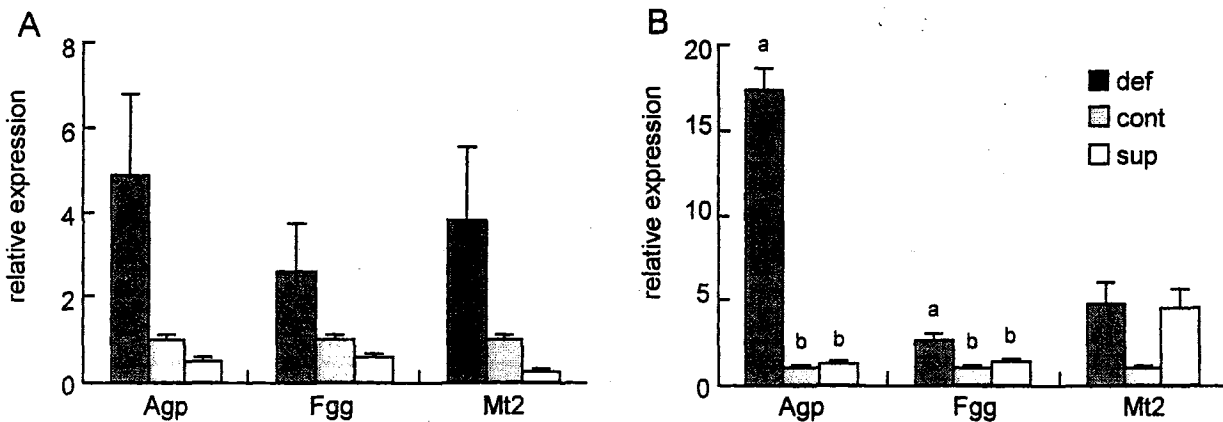


Fig. 7 Effect of vitamin K-deficient diet on gene expression of acute phase proteins in liver. Amounts of mRNA of α<sub>1</sub>-acid glycoprotein (Agp), fibrinogen γ chain (Fgg) and metallothionein-2 (Mt2) were measured with Northern hybridization normalized with 18S ribosomal RNA, and expressed as a fold of control diet values (A, germfree groups; B, conventional groups). Data are expressed as means ± SEM, n=4-7. Values with different letters are significantly different at *p*<0.05. def, deficient group; cont, control group; sup, supplement group.

Table 4 Genes upregulated in germfree testis groups.<sup>1</sup>

acc. No.	NAME	K1 sup / def
AA955508	adenylate cyclase 3	20.8
AI029771	adenylate cyclase 5	3.36
AA956889	adenylate cyclase 4	2.63
AA956815	adenylate kinase 2	2.16
AA859704	adenylate kinase 3	2.43
AI059291	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, $\alpha$	3.78
AI043867	protein kinase, AMP-activated, $\gamma$ 1 non-catalytic subunit	1.62
AI058569	mevalonate (diphospho) decarboxylase	3.08
AA997956	lanosterol synthase	1.76
AA964948	3- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase	1.94
AA818329	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	1.94
AI070588	farnesyltransferase, CAAX box, $\alpha$	1.77
AI071807	rab geranylgeranyl transferase component, subunit $\alpha$	17.6
AI029123	rab geranylgeranyl transferase component, subunit $\beta$	2.53
AI072276	ras-related associated with diabetes	9.17
AA957963	GDP dissociation inhibitor 2	5.17

<sup>1</sup> Values are expressed as a expression ratio of supplement group / deficient group. def, deficient; sup, supplement.

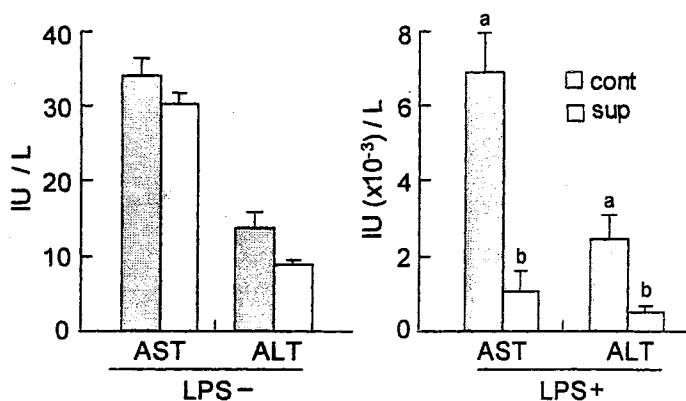


Fig. 8 Effect of vitamin K supplemented diet on plasma aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities induced by lipopolysaccharide (LPS) administration. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n=3-5. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.01$ . Cont, control group; sup, supplement group.

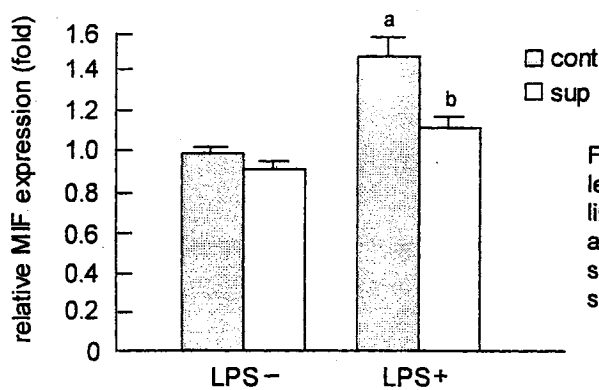


Fig. 9 Effect of vitamin K supplemented diet on hepatic mRNA level of microphage migration inhibitory factor (MIF) induced by lipopolysaccharide (LPS) administration. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n=3-5. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.01$ . Cont, control group; sup, supplement group.

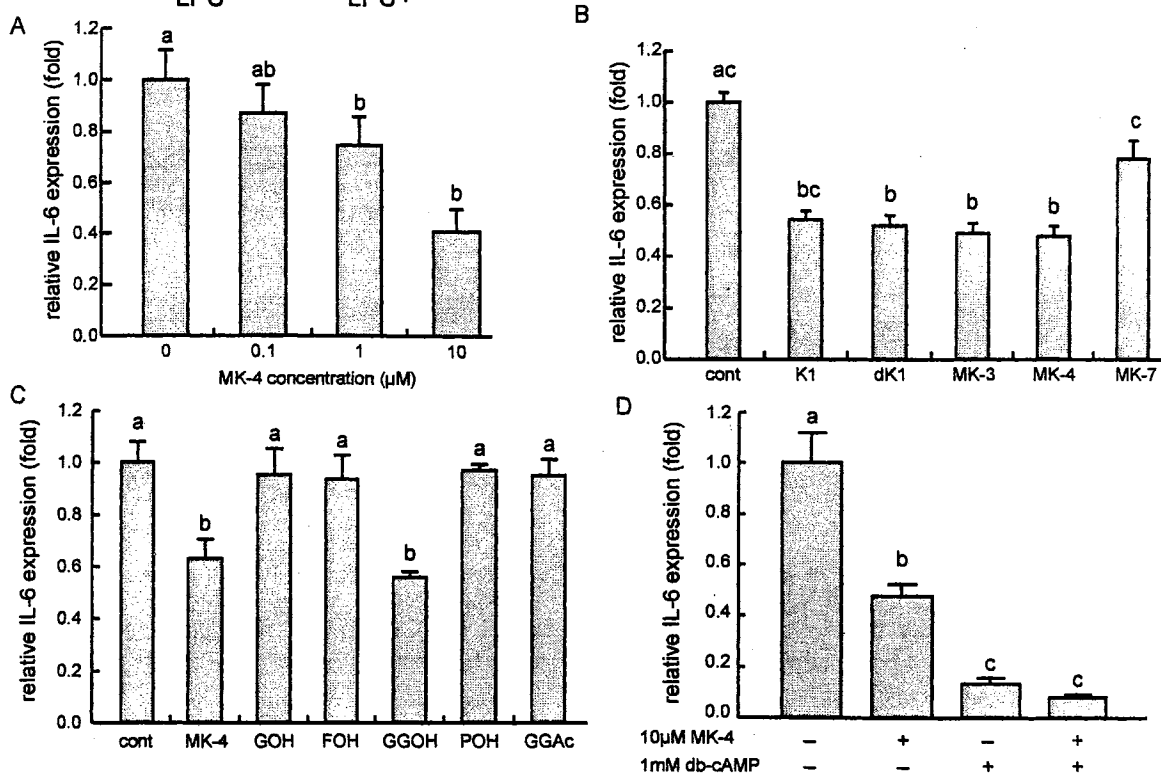


Fig. 10 Effect of K on interleukin-6 (IL-6) mRNA level induced by LPS in human macrophagic THP-1 cells. A, effect of concentration of MK-4 on IL-6 expression; B, effect of K analogues on IL-6 expression; C, effect of side chain of K analogues on IL-6 expression; D, effect of cAMP on IL-6 expression. Values are means  $\pm$  SEM of 4-10 experiments normalized to the mean of control group. Values with different letters are significantly difference at  $p < 0.05$ . cont, control; K1, vitamin K1; dK1, 2',3'-dihydrophyloquinone; MK-3, menaquinone-3; MK-4, menaquinone-4; MK-7, menaquinone-7; GOH, geraniol; FOH, farnesol; GGOH, geranylgeraniol; POH, phytol; GGAC, geranylgeranyl acetone; db-cAMP, dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate.



## 論文審査結果要旨

ビタミンK (K) は、K 依存性タンパク質の翻訳後修飾 ( $\gamma$ -カルボキシル化, Gla 化) に必須の補因子であり、血液凝固や骨代謝などに関与している。K は3位の側差によって分類され、フィチル基を側鎖とする K1、鎖長の異なるイソプレニル基を側鎖とする K2 (メナキノン-n) などがある。高等動物では摂取した K 類の一部は組織内で K2 の一種であるメナキノン-4 (MK-4) へと変換されることが明らかとなっており、MK-4 は他の K 類にはない未知の作用を有している可能性が示唆されている。本研究では、K の新規機能を明らかとすることを目的とした。

無菌ラットに K 欠乏飼料を給餌して K 欠乏動物を作出した。また、無菌ラットに 2', 3'-ジヒドロフィロキノン (dK1) 添加食を給餌して、重篤な血液凝固不全を伴わずに組織内 MK-4 のみを欠乏させたモデル動物を初めて作出した。組織内 K 充足度に応答して発現量に変化が生じた遺伝子種を検索したところ、肝臓において K 欠乏時に  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、フィブリノーゲン、メタロチオネインなど、炎症時に発現が上昇する急性期タンパク質の発現上昇が認められ、K が炎症を抑制する可能性が考えられた。また、精巣ではコレステロールおよびテストステロン合成に関わる酵素の遺伝子発現が K 欠乏時に低下することが認められた。血漿中テストステロン濃度を測定したところ、給餌飼料中 K 濃度に応答して上昇していたことから、K は精巣においてテストステロン合成に関与していることが示唆された。

K が炎症に及ぼす影響を解明するため、リポポリサッカライド (LPS) 投与による炎症誘導モデルラットを用いて検討を行った。飼料中への K の添加により LPS で誘導される血漿中トランスアミナーゼである ALT および AST 活性の上昇が抑制されたことから、K が抗炎症作用を有していることが示された。また、ヒトマクロファージ様細胞を用いた検討では、K が LPS 刺激により誘導されるインターロイキン-6 (IL-6) 発現を抑制したことから、K による抗炎症作用は IL-6 発現の抑制を介している可能性が示された。この効果は K 同族体には認められたが側鎖類縁体には認められなかったことから、抗炎症作用には K のナフトキノン骨格が重要である可能性が示された。

本論文では K 充足度の異なるモデル動物を対象とし、遺伝子発現の網羅的解析手法を用いることにより K の新規機能の解明を試みた結果、抗炎症作用やテストステロン合成への関与という K に関する新しい知見が明らかにされた。

よって審査員一同は、当論文提出者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判定した。