

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05929

研究課題名（和文）ビタミンB12欠乏が引き起こすレドックス制御破綻の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The molecular mechanism of disorder of redox regulation system by vitamin B12 deficiency

研究代表者

藪田 行哲（YABUTA, Yukinori）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：種々の遺伝子破壊線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いてビタミンB12（B12）欠乏による酸化ストレスの誘導メカニズムについて解析した。その結果、メチルマロニルCoA代謝の機能不全が酸化ストレスの誘導に関わっている事が明らかになった。ミトコンドリアは主要な活性酸素種の生成源であるためここに着目し、ATPレベルとミトコンドリアゲノムの定量を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品中のビタミンB12(B12)を吸収するためにはタンパク質の消化が必要であるが、高齢者では胃酸分泌の低下により消化力が低下していることからB12欠乏症が多発する。我々の研究により線虫においてB12の不足は酸化ストレスを引き起こし、それはミトコンドリアの機能低下に関わっている事が示唆された。近年ミトコンドリアの機能低下は多くの疾病に関わっている事が報告されていることから、B12欠乏に伴うミトコンドリアの機能低下のメカニズムを明らかにすることで、超高齢化社会に突入した我が国では高齢者のQOLの向上や健康寿命の延長に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of oxidative stress induced by vitamin B12 deficiency was analyzed using various knockout *Caenorhabditis elegans*. The results revealed that dysfunction of methylmalonyl CoA metabolism is involved in the induction of oxidative stress. Since mitochondria are the major source of reactive oxygen species, we quantified ATP levels and mitochondrial genome levels.

研究分野：栄養科学

キーワード：ビタミンB12 酸化ストレス 活性酸素種 線虫

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B₁₂ (B₁₂) はメチオニン合成酵素 (MS) とメチルマロニル-CoA ムターゼ (MCM) の補酵素として機能し、その不足はメチルマロン酸 (MMA) 尿症やホモシステイン (Hcy) 血症の他、手足のしびれや痛みなどの神経障害や認知機能障害などを引き起こす。またアルツハイマー病発症のリスクとなる。食品中の B₁₂ はタンパク質と結合しており、B₁₂ を吸収するためにはタンパク質を消化する必要がある。しかし高齢者では胃酸分泌の低下により消化能が低下しているため、それに起因する B₁₂ 吸収不全による B₁₂ 欠乏症が多発しており、超高齢化社会に突入した我が国において B₁₂ 不足の予防や欠乏症の早期発見のための診断方法の検討が急務である。

これまでに我々はヒトのモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて B₁₂ の機能解析を行ってきた。その結果、線虫も我々哺乳類と同様に生育に B₁₂ を要求すること、B₁₂ 不足線虫ではアスコルビン酸 (ビタミン C) およびグルタチオンレベルの低下、SOD およびカタラーゼ活性の低下、NADPH オキシダーゼ活性の上昇などによりレドックス制御の破綻し、著しい酸化ストレスが誘導されている事を明らかにした (Bito et al., 2017)。

これまでに B₁₂ 不足による酸化的ストレスは B₁₂ 不足に伴い蓄積する Hcy が O₂ を還元することで活性酸素種 (ROS) の一つである O₂ を生成する、蓄積した Hcy が ROS 生成に関わる NADPH オキシダーゼを活性化する、あるいは B₁₂ 不足下では抗酸化酵素の発現レベルを低下させる、主要な抗酸化物質である GSH の合成を低下させるなどにより誘導されることが報告されており、これらは主に不十分なメチオニン代謝に起因すると考えられる。その一方、同じく B₁₂ に依存する MCM の活性低下に伴う酸化的ストレスの誘導についてはほとんど報告されておらず、MCM 活性の低下は ROS 生成に起因するかは不明であった。

2. 研究の目的

B₁₂ の不足による MS および MCM のどちらの活性低下が酸化的ストレスの誘導に関わっているかを明らかにする目的で B₁₂ 代謝に関わるタンパク質をコードする遺伝子が破壊された *C. elegans* を用いて、ROS レベルおよび寿命について測定した。

3. 研究の方法

遺伝子欠損線虫は *Caenorhabditis Genetics Center* (Stanford University) もしくはナショナルバイオリソースプロジェクト線虫 (東京女子医科大学) より分与していただいた。線虫は大腸菌 OP50 株もしくは HT115 株を塗布した nematode growth medium (NGM) 上で 20 で培養した。全ての遺伝子破壊線虫は 5 回 N2 株とバッククロスしたものをを用いた。C は HPLC を、メチルマロン酸およびホモシステインは LC-MS を用いて測定した。ROS レベルは ROS プロブであるジクロロフルオロセインジアセテート (H₂DCFDA) により染色し蛍光顕微鏡を用いて観察した。ATP は化学発光法により定量した。ミトコンドリアゲノムの定量は qPCR により行った。

4. 研究成果

(1) B₁₂ 不足による酸化ストレス誘導の分子機構の解明

線虫を培養する為に一般的に大腸菌 OP50 株を用いるが、OP50 株は B₁₂ 含量が少なくそれを給餌した線虫は B₁₂ 不足になるとの報告がある。そのため、遺伝子破壊株を用いて解析する際に OP50 株を用いると遺伝子破壊以外にも B₁₂ 不足の影響が見られると考えられた。大腸菌 HT115 株は一般的に線虫の RNAi に用いられ OP50 株よりも B₁₂ 含有量は高い。そこでまずこれら 2 種類の大腸菌を給餌した線虫の B₁₂、MMA、Hcy レベルの測定を行った。その結果、OP50 株を与えた線虫と比較して HT115 株を与えた線虫の B₁₂ レベルは高く、MMA および Hcy レベルは低かった。このことは OP50 株では B₁₂ 欠乏に陥っている事が明らかとなった。そこで以降の実験では HT115 株を用いることとし、次に図 1 に示す遺伝子破壊線虫を入手し、MMA および Hcy レベルを測定した。

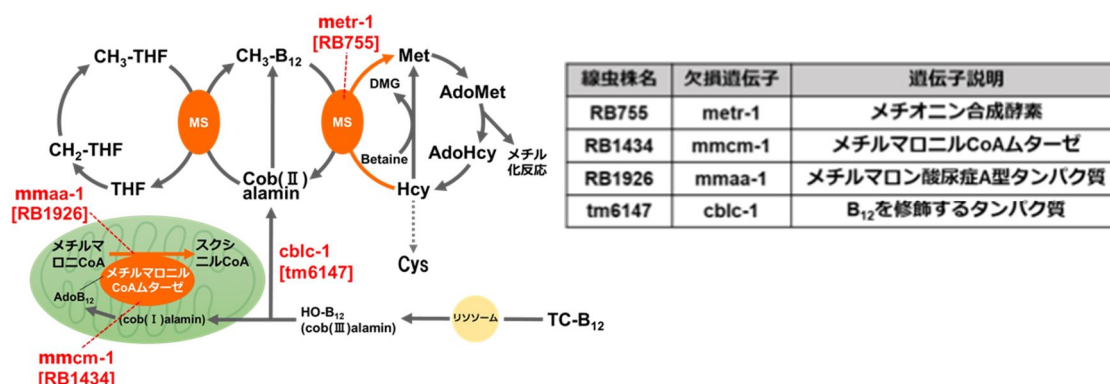


図 1 B₁₂ 代謝と入手した遺伝子破壊線虫

赤文字は入手した遺伝子破壊線虫を示す。Ado: アデノシル, Cys: システイン, DMG: ジメチルグリシン, Hcy: ホモシステイン, Met: メチオニン, MS: メチオニン合成酵素, TC: トランスコバラミン, THF: テトラヒドロ葉酸

その結果、*mmcm-1* および *mmaa-1* 遺伝子破壊株で MMA の顕著な蓄積が認められた。また Hcy レベルは N2 株と大きな違いは認められ無かった。*cb1c-1* 遺伝子破壊株は MMA および Hcy の蓄積が認められた。一方で *metr-1* 遺伝子破壊線虫では MMA のみならず Hcy の蓄積も認められ無かった。また遺伝子破壊線虫が得られなかった遺伝子については RNAi による遺伝子発現線虫の MMA および Hcy レベルの測定も行ったが、ばらつきが大きかったため本実験では遺伝子破壊株のみを用いることとした。

次に N2 線虫に HT115 株を与えた時の ROS レベルを OP50 株を与えた時と比較し、HT115 株を与えた時では ROS は蓄積していない事を確認した (図 2)。

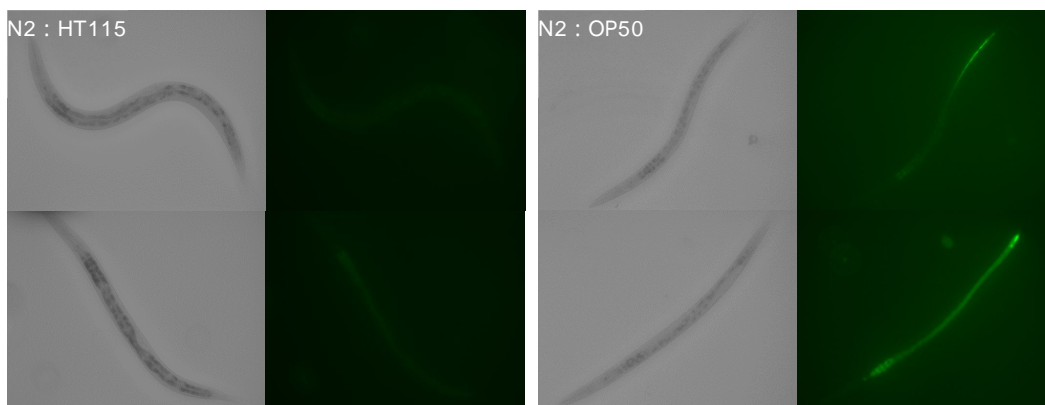


図 2 HT115 株もしくは OP50 株を与えた時の ROS の蓄積

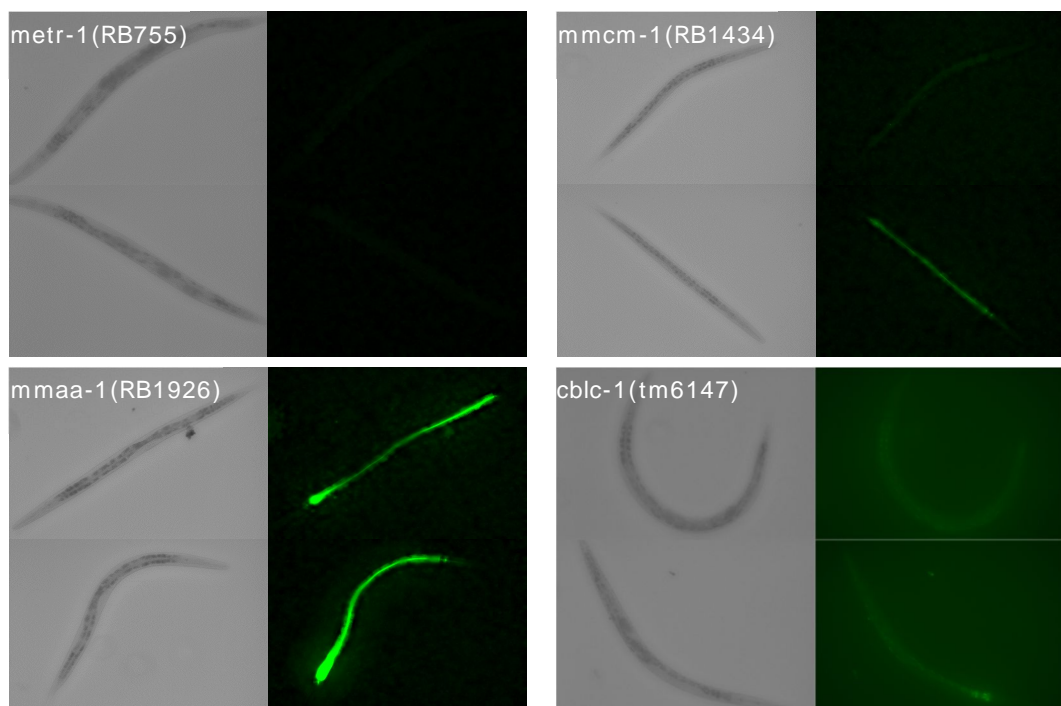


図 3 遺伝子破壊線虫の ROS の蓄積

そこで HT115 株を与えた遺伝子破壊株の ROS の蓄積を同様に調べた結果、*metr-1* 遺伝子破壊線虫以外 ROS の蓄積が認められた (図 3)。以上のことから MCM を含むメチルマロニル CoA 代謝経路の機能低下が酸化ストレス誘導に関わっている事が明らかになった。一方で以前から報告されていたメチオニン代謝の活性低下に起因する Hcy 蓄積に伴う酸化ストレスの誘導については *cb1c-1* 遺伝子破壊線虫において Hcy の蓄積と共に ROS 蓄積が認められたが (図 3)、MMA も蓄積していたためこちらの経路の関与の有無については本研究では明らかにすることはできなかった。

次に寿命について測定した結果、N2 株の生存期間中央値は 14.18 日であり、*mmaa-1*、*mmcm-1*、*cb1c-1* 遺伝子破壊株ではそれぞれ、10.77、10.26、10.27 日に有意に短縮していた。この原因は恐らく誘導された酸化ストレスの影響がメチルマロニル CoA 代謝が滞った事に起因すると思わ

れる。一方、metr-1 遺伝子破壊線虫の生存期間中央値もまた 12.9 日と短縮していたが、有意な短縮ではなかった。このことは線虫ではメチオニン代謝が滞っても問題無いことを示唆するが、不明な点も多いため詳細な解析が必要である。

ミトコンドリアは主要な ROS の生成源であること、MCM はミトコンドリアに局在することから、B₁₂ の不足はミトコンドリアの機能低下を介して酸化的ストレスを誘導しているのではないかと考え、OP50 株を用い NGM もしくは B₁₂ を添加した NGM で培養した N2 株の ATP レベルとミトコンドリアゲノムレベルについて検討した。ATP レベルおよびミトコンドリアゲノムレベル共に B₁₂ 無添加と比較して B₁₂ 添加により増加した (図 4)。

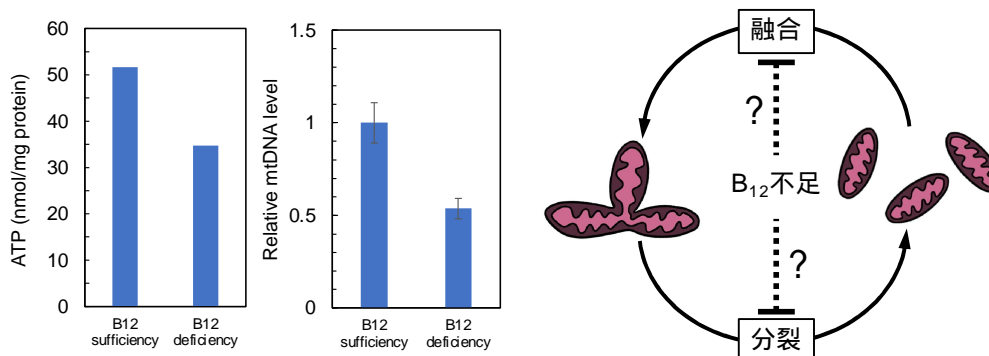


図 4 ATP とミトコンドリアゲノムレベル

ミトコンドリアは分裂・融合を繰り返して健全性を保っており、これがどちらかに偏るとミトコンドリアの機能低下が起こる。ミトコンドリアゲノムレベルの変化はミトコンドリアの分裂・融合が健全に保たれていない事を暗示しており、ミトコンドリアの機能低下が起こっていることを示唆する。以上のことから B₁₂ 不足によるメチルマロニル CoA 代謝が滞った事によりミトコンドリアの機能低下が起こり、その結果 ROS の生成が増大した事が示唆された。また糖尿病や慢性疲労症候群など様々な疾病にミトコンドリアの機能低下が関わっていることから、B₁₂ 不足はこれらの疾病発症に関わっている事も考えられる。今後とも B₁₂ 不足に起因するミトコンドリアの機能低下の分子メカニズム解明を行っていく。

(2) B₁₂ 不足が及ぼすアミロイド の毒性への影響

B₁₂ の不足による高 Hcy 血症はアルツハイマー病の発症リスクとなることが報告されており、Hcy レベルの上昇による酸化的ストレスが関与することが考えられていた。アルツハイマー病発症は脳内でのアミロイド (A β) の蓄積が関わっていることが広く支持されている。しかし、アルツハイマー病の発症と高 Hcy 血漿の因果関係において不明な点も多く、高 Hcy はアルツハイマー病発症の単なるマーカーの可能性もある。我々は B₁₂ の不足による酸化的ストレスがその発症に関わっていると考え、B₁₂ 不足が及ぼす A β の毒性について調べるため、A β を筋肉で発現する GMC101 株を用いて調べた。GMC101 株は生育温度を 25℃ に上昇すると A β の発現が誘導され麻痺する。そこで、OP50 株を餌とし、B₁₂ 添加あるいは B₁₂ 無添加 NGM で培養した GMC101 株の麻痺にかかる時間を比較した。

B₁₂ 無添加では B₁₂ 添加と比較して麻痺にかかる時間は短かった(図 5)。また B₁₂ 無添加 NGM に VC 誘導体であるアスコルビン酸 2-グルコシド添加したところ ROS レベルの低下に加え、麻痺にかかる時間は延長された。しかし、A β レベルおよびそのアグリーゲーションに B₁₂ の有無およびアスコルビン酸 2-グルコシドの影響は認められなかった。以上の結果より B₁₂ の不足に起因する酸化ストレスが A β の毒性を増幅している事が示唆された。

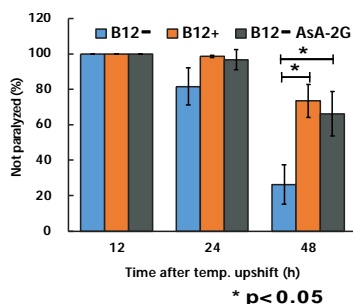


図 5 GMC101 株の麻痺に及ぼす B₁₂ の影響

アルツハイマー病の発症には A β の凝集ではなく、A β の蓄積が発症に関わっていると考えられている。また A β の蓄積はミトコンドリアの機能低下を引き起こす事も報告されており、先の研究から B₁₂ 不足はミトコンドリアの機能低下を引き起こす事が示唆されていることから、これ

らが相乗的あるいは相加的にアルツハイマー病の発症に関わっていることが示唆され、今後これらの関係について興味を持たれる。

(3) 線虫のアスコルビン酸生成経路の同定

B₁₂ 不足は線虫のアスコルビン酸レベルを著しく低下させる。また B₁₂ 不足は dumpy と呼ばれる太くて短くなる形態異常をもたらす。dumpy の多くはコラーゲン遺伝子の変異による事が報告されていることから B₁₂ 不足による dumpy の出現はアスコルビン酸レベルの低下に起因する事が示唆された。またアスコルビン酸は主要な抗酸化物質であることから B₁₂ 不足による酸化ストレス誘導に関わっていることから線虫のアスコルビン酸生成経路の同定を行った。

はじめに 1 位の炭素を ¹³C でラベルした D-グルコース[D-Glc(1-¹³C)]を含む培地で培養した OP50 株を餌として線虫を培養し、GC-MS により ¹³C がアスコルビン酸のどの部分に取りこまれたかを調べた。その結果、6 位の炭素を含むフラグメントに取りこまれた事が明らかになり、哺乳動物の経路と同様であることが示唆された。次に動物および植物のアスコルビン酸前駆体を線虫に与えたところ、動物の VC 前駆体である L-グルノ-1,4-ラクトン添加によりアスコルビン酸レベルの増加が認められた。以上の事から線虫のアスコルビン酸生成経路は哺乳動物の生合成経路と類似している事が示唆された。

次にラットのアスコルビン酸合成に関わる酵素をコードする遺伝子と相同な遺伝子を線虫ゲノムから探索したところ、グルコノラクターゼ (E03H4.3) および L-グルノ-1,4-ラクトンオキシダーゼ (F54D5.12) と相同な遺伝子を発見した。そこで E03H4.3 遺伝子の発現を RNAi によりノックダウンした線虫もしくは F54D5.12 遺伝子破壊線虫 (tm6671) を入手しアスコルビン酸レベルを測定したところ、どちらも約 20%程度アスコルビン酸レベルの低下が認められた(図 6)。

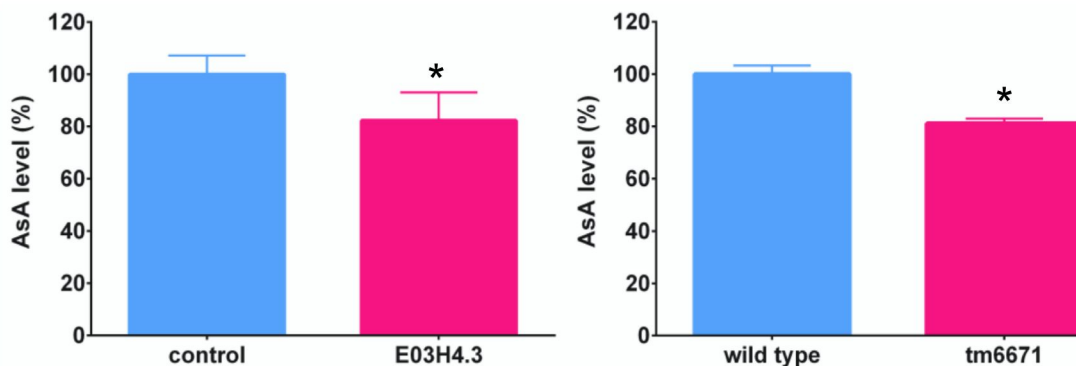


図 6 遺伝子発現抑制線虫(左)と遺伝子破壊線虫(右)のCレベル

アスコルビン酸レベルの低下が線虫の寿命および酸化ストレスへの影響を調べるため、アスコルビン酸レベルの低下が認められた tm6671 線虫の寿命およびマロンジアルデヒドレベルを測定した。その結果、tm6671 線虫の生存期間中央値は 11.00 日で、N2 株と比較して 2.78 日短縮していた。マロンジアルデヒドレベルも tm6671 線虫では N2 株と比較して 1.75 倍蓄積していた。以上の結果よりアスコルビン酸の減少により酸化的ストレスが誘導され、その結果寿命が短縮された事が示唆された。今後、アスコルビン酸生成経路に及ぼす B₁₂ 低下の影響について解析を行う。更に、これらの線虫を用いてアスコルビン酸の減少が及ぼす種々の疾病に及ぼす影響について疾病モデル線虫とを掛け合わせて解析を行い、疾病とアスコルビン酸の関係について解析を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yabuta Y, Nagata R, Aoki Y, Kariya A, Wada K, Yanagimoto A, Hara H, Bito T, Okamoto N, Yoshida S, Ishihara A, Watanabe F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Ascorbate Biosynthesis Involves Carbon Skeleton Rearrangement in the Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 metabolites	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo10080334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Andra, A, Tanigawa, S, Bito, T, Ishihara, A, Watanabe, F, Yabuta, Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 effects of vitamin B12 deficiency on amyloid- toxicity in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10060962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藪田行哲, 苅谷あゆみ, 青木優果, 和田滉佑, 柳本綾子, 原寛佳, 岡本奈穂, 美藤友博, 吉田晋一, 石原亨, 渡邊文雄
2. 発表標題 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> のビタミンC生合成経路の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会（第55回講演会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藪田行哲, 青木優果, 苅谷あゆみ, 和田滉佑, 柳本綾子, 原寛佳, 岡本奈穂, 美藤友博, 吉田晋一, 石原亨, 渡邊文雄
2. 発表標題 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> のビタミンC生合成経路の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Andra Arif、藪田行哲、美藤友博、渡邊文雄
2. 発表標題 線虫 (Caenorhabditis elegans) を用いたアミロイド の凝集に及ぼすビタミンB12の影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Andra Arif、谷川尚子、美藤友博、渡邊文雄、藪田行哲
2. 発表標題 ビタミンB12添加はアミロイド を発現した線虫 (Caenorhabditis elegans) の麻痺を緩和する
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田隆太、青木優果、苅谷あゆみ、和田滉佑、柳本綾子、原寛佳、岡本奈穂、美藤 友博、吉田晋一、石原亨、渡邊文雄、藪田行哲
2. 発表標題 線虫のビタミンC生合成経路の同定とビタミンC新機能の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川尚子、陳サイジュツ、美藤友博、渡邊文雄、藪田行哲
2. 発表標題 酸化ストレスに及ぼすB12代謝関連遺伝子欠損の影響
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田隆太、青木優果、苅谷あゆみ、岡本奈穂、美藤友博、吉田晋一、石原亨、渡邊文雄、藪田行哲
2. 発表標題 線虫(Caenorhabditis elegans)のビタミンC生合成経路の同定とビタミンC低下線虫の特性
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳サイジュツ、谷川尚子、美藤友博、渡邊文雄、藪田行哲
2. 発表標題 ビタミンB12欠乏が引き起こす酸化ストレス誘導の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------