

機関番号： 1 4 6 0 2

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008 ～ 2010

課題番号： 20500708

研究課題名 (和文) 生活習慣病予防を目指したホモシステイン代謝調節機構の解明

研究課題名 (英文) Regulatorial mechanism of homocysteine metabolism targeted to prevent of life-style related diseases

研究代表者 中田 理恵子 (NAKATA RIEKO)
奈良女子大学・生活環境学部・講師

研究者番号： 9 0 1 9 8 1 1 9

研究成果の概要 (和文)：

葉酸欠乏ラットでは、ホモシステイン代謝に関与する 5, 10 メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR), シスタチオン合成酵素 (CBS), メチオニン合成酵素 (MS) の各遺伝子発現が有意に減少した。葉酸欠乏群では、血漿および肝臓のホモシステイン濃度が有意に上昇していたことから、葉酸欠乏によるホモシステイン濃度の上昇は MTHFR, CBS, MS 各遺伝子の発現によって調節されていると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We found that the increase of homocysteine during folate deficiency is regulated by gene expression of homocysteine metabolic enzymes , 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase , cystathionine - β -synthase and methionine synthase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2, 300, 000	690, 000	2, 990, 000
2009 年度	800, 000	240, 000	1, 040, 000
2010 年度	500, 000	150, 000	650, 000
年度			
年度			
総計	3, 600, 000	1, 080, 000	4, 680, 000

研究分野：栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ホモシステイン, 葉酸, ビタミン, 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

含硫アミノ酸の一種であるホモシステインは、高血圧や高コレステロールなどとは独立した動脈硬化症のリスクファクターとして近年注目されている。ホモシステインの代謝は、葉酸とビタミン B12 が関与する経路、ビタミン B6 が関与する経路、そしてコリンの代謝物であるベタインが関与する経路の 3 つが存

在する。

ホモシステインの代謝に関する研究では、主に葉酸やビタミン B12, ビタミン B6 の摂取との関連について注目するものが多い。研究代表者もこれまでに、葉酸欠乏ラットを用いた研究で、葉酸欠乏過程の初期から血漿中のホモシステイン濃度が上昇すること、ホモシステインが上昇した組織においては、酸化ストレ

スが亢進していることなどを明らかにしてきた。しかしながら、これらのビタミンとは別に、コリンが関与する経路についてはあまり注目されていない。研究代表者は、葉酸欠乏あるいはメチオニン負荷によるホモシステイン濃度上昇モデルを用いて、コリンの代謝物であるベタインの連続摂取が上昇を抑制することを明らかにしており、ホモシステインの代謝の調節については、葉酸、ビタミン B12、ビタミン B6 およびコリンに関連するすべての代謝を、総合的に解明する必要があると考えた。

2. 研究の目的

ホモシステインは、メチオニンの脱メチル化によって生成する代謝中間体で、その代謝には葉酸、ビタミン B6、B12、コリンが関与している。血漿ホモシステインの上昇は、新生児では神経管閉鎖障害、成人や高齢者では心血管および脳血管疾患の危険因子として知られており、ヒトの障害を通して様々な疾患の発症に関与している。各種疾患の一次予防と健康増進の観点から、ホモシステイン代謝の調節機構を解明することは、非常に重要な課題である。本研究では、ホモシステインがどのような機構により、代謝が調節されているかについて、遺伝子発現レベルまで含めて解明することを目的とした。

さらに研究を進めて、葉酸の欠乏がホモシステイン代謝以外の代謝にどのように影響を与えるのかについて検討することを試みた。これまでに、核酸代謝やアミノ酸代謝への関与は判明しているが、本研究ではそのほかの代謝にも葉酸も関与するのかどうかを明らかにするため、遺伝子発現の網羅的解析を行い、葉酸と各種代謝との関連性を解明することによって、葉酸の新しい機能を提唱することを目的とした。

そして、生活習慣病予防や健康維持・増進を目指した食生活の設計の基礎とすることを考え、研究を進めた。

3. 研究の方法

- (1) Wistar 系雄性ラットを 2 群に分け、葉酸欠乏食（葉酸フリー）および対照食（葉酸 8mg/kg 食餌）を各々自由摂取させた。一定期間飼育後、血液と肝臓を採取し、血漿と肝臓の葉酸量およびホモシステイン濃度を測定した。さらに、肝臓のホモシステイン代謝に関連する遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。

- (2) Wistar 系雄性ラットを 2 群に分け、葉酸欠乏食（葉酸フリー）および対照食（葉酸 8mg/kg 食餌）を各々自由摂取させた。8 週後に肝臓を採取し、RNA を抽出した。さらにビオチンラベル cRNA を合成し、DNA マイクアレイ法により、肝臓における遺伝子発現の網羅的解析を行った。変動のあった遺伝子については、定量 RT-PCR 法により、発現量を解析した。

- (3) SD 系雄性ラットを 4 群に分け、葉酸欠乏食とその対照食（葉酸 8mg/kg 食餌）、20%ラードを添加した高脂肪食、高脂肪食を葉酸欠乏にした食餌のいずれかを摂取させた。8 週間後に、血液、肝臓、各脂肪組織を採取した。肝臓の葉酸量とホモシステイン量、血漿と肝臓の脂質量を測定した。酸化ストレスの評価として、肝臓の TBARS 量とビタミン C 量を測定した。さらに、脂質代謝に関連する遺伝子の発現変動を検討した。

4. 研究成果

- (1) 葉酸欠乏群では、血漿および肝臓の葉酸量が欠乏 4 週目から有意に減少した。血漿および肝臓のホモシステイン濃度は、欠乏 4 週目から有意に上昇していた。そこで、ホモシステイン代謝に関わる酵素の遺伝子発現の変化を調べた。ホモシステインの再メチル化反応に必要な 5-メチルテトラヒドロ葉酸を合成する酵素である 5, 10 メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素は、欠乏 6 週、8 週目で対照群の 40%と有意に減少していた。5-メチルテトラヒドロ葉酸を補酵素としてホモシステインの再メチル化反応を触媒するメチオニン合成酵素の遺伝子発現は、欠乏 6 週目で 75%、8 週目で 50%と対照群に対して有意に減少した。イオウ転移経路においてホモシステインを分解する酵素であるシスタチオニン合成酵素の遺伝子発現は、欠乏 6, 8 週目で各々対照群の 50%、40%と有意に減少していた。ベタインを基質にしてホモシステインをメチオニンへと変換させる反応を触媒する酵素であるベタイン-ホモシステインメチル転移酵素の発現量は、欠乏 6 週目で対照群の 1.6

倍と有意に増加していた。
S-アデノシルメチオニンから S-アデノシルホモシステインへの返還を触媒する酵素のメチオニンアデノシル基転移酵素、メチオニンから S-アデノシルメチオニンへの変換を触媒する S-アデノシルメチオニンメチル基転移酵素、S-アデノシルホモシステインからホモシステインへの反応を触媒する S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素の各発現量は、いずれも欠乏群と対照群の間で差がなかった。
以上の結果から、葉酸欠乏によって引き起こされるホモシステイン濃度の上昇は、ホモシステインからメチオニンへの再メチル化反応の抑制と、ホモシステインからシスタチオンへの分解の抑制によっておこると考えられ、その調節は 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素、メチオニン合成酵素、シスタチオン合成酵素各遺伝子の発現を抑制することによって行われていることが定量的に明らかとなった。

- (2) 葉酸欠乏によるホモシステインの代謝が、酵素の遺伝子レベルで調節を受けていることが明らかとなったので、ホモシステイン代謝に関連する遺伝子以外の発現が、葉酸欠乏下でどのように変化しているのかを明らかにするため、葉酸欠乏ラットの肝臓における遺伝子発現変動を網羅的に解析した。葉酸の欠乏によって発現が有意に増加した遺伝子は 179 個、発現が有意に減少した遺伝子は 87 個であった。変動があった遺伝子を機能によって分類すると、酵素タンパク質の遺伝子が最も多く変動しており、増加した遺伝子は 5 個、減少した遺伝子は 34 個であった。さらに、酵素を作用によって分類すると、脂質代謝系 19 個、エネルギー代謝系 7 個、糖代謝系 7 個、アミノ酸代謝系 9 個、アミノ酸のリン酸化反応 8 個、核酸代謝系 6 個などであり、脂質代謝が最も多く変動していた。
そこで、DNA マイクロアレイで有意な変化があった遺伝子に加え、脂質代謝で重要な働きをしている酵素の遺伝子発現変動を検討した。ミトコンドリアの外膜に存在し脂肪酸アシル-CoA からアシルカルニチンへの転換反応を触媒するカルニチンパルミトイル基転移酵素 I、ペルオキシソームでの β 酸化に関与するアセチル

CoA アシル基転移酵素、脂肪酸合成に関わるリンゴ酸合成酵素と脂肪酸合成酵素、不飽和脂肪酸合成に関わるステアシル CoA 不飽和化酵素が、葉酸欠乏群で対照群に対して有意に減少していた。また、コレステロール合成に関わる HMG-CoA 還元酵素は有意に増加していた。
以上の結果から、葉酸欠乏は脂肪酸代謝の調節に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

- (3) 葉酸欠乏が脂質代謝に影響を与える可能性が示唆されたので、高脂肪食摂取時に葉酸が欠乏した場合、脂質代謝がどのように変化するのかを検討した。
肝臓の葉酸量は、葉酸欠乏 (F) 群では対照 (C) 群の 50% と有意に減少した。HF 群は C 群とほぼ同程度であったが、HF-F 群は C 群、F 群に対して有意に減少しており、高脂肪食を同時に摂取した場合のほうが、葉酸量を大きく減少させる可能性が考えられた。
体重 100 g あたりの肝臓重量は、葉酸の欠乏により有意に増加し、その程度は高脂肪負荷時のほうが大きかった。肝臓トリグリセリド量は、F 群で C 群の 2 倍、HF-F 群では F 群の約 10 倍、HF 群の 1.5 倍と増加し、葉酸欠乏による肝重量の増大と、肝臓へのトリグリセリドの蓄積が見られた。肝臓のホモシステイン量は、F 群で C 群の約 4 倍、HF-F 群ではさらに増加して C 群の約 16 倍、F 群の約 5 倍と有意に増加した。また、葉酸を欠乏させていない HF 群においてもホモシステインが有意に上昇し、高脂肪摂取の影響が見られた。
過酸化物質である TBARS は、HF-F 群で大きく増加した。一方、抗酸化系で作用するビタミン C は、HF-F 群で有意に減少していた。HF-F 群では、肝臓のホモシステイン量の大きな増加によって、酸化ストレスが亢進したためではないかと考えられた。
以上のように、高脂肪食摂取時に葉酸を欠乏させると、肝臓へのトリグリセリドの蓄積により脂肪肝が誘導されること、ホモシステインの上昇に伴う酸化ストレスの亢進がおこることが明らかとなった。
さらに、肝臓における脂質代謝に関連する遺伝子発現の変動を調べた。脂肪酸の燃焼に関わるカルニチンパルミトイル転移酵素、脂肪酸の取

込みに関与する脂肪酸輸送タンパク質および脂肪酸結合タンパク質、脂肪酸の合成に関わるリンゴ酸酵素、アセチル CoA 脱炭酸酵素、脂肪酸合成酵素は、いずれも HF-F 群で有意に減少していた。

以上の結果から、高脂肪摂取時に葉酸が欠乏すると、肝臓での脂肪酸の燃焼や輸送が障害され、肝臓への脂肪蓄積を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 中田理恵子, 淡路比呂代, 渡邊志保, 井上裕康「葉酸欠乏が脂質代謝関連酵素の遺伝子発現に及ぼす影響」脂質生化学研究, 査読無 50, 300-303 (2008)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 朝日麻衣, 高芝沙千子, 井上裕康, 中田理恵子「大腸菌を用いた組換え γ -グルタミルヒドロラーゼの発現系構築と精製」日本ビタミン学会第 62 回大会, 2010 年 6 月 12 日, いわて県民情報交流センター (岩手県)
- ② 中田理恵子, 井上裕康「大腸菌を宿主とした γ -グルタミルヒドロラーゼの発現と精製」第 64 回日本家政学会大会, 2010 年 5 月 29 日, 広島大学 (広島県)
- ③ 朝日麻衣, 渡邊志保, 井上裕康, 中田理恵子「大腸菌による組換え γ -グルタミルヒドロラーゼの発現と精製」第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010 年 5 月 22 日, アスティとくしま (徳島県)
- ④ 淡路比呂代, 朝日麻衣, 井上裕康, 中田理恵子「葉酸欠乏が肝臓及び脂肪組織における脂質代謝関連酵素の発現に及ぼす影響」日本ビタミン学会第 61 回大会, 2009 年 5 月 30 日, 京都学園大学 (京都府)
- ⑤ Hiroyo Awaji, Mai Asahi, Hiroyasu Inoue, Rieko Nakata; Change in gene expression of lipid metabolic enzyme in liver and adipose tissue of the folate-deficient rats. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid mediators, 2009 年 5 月 27 日, 学術総合センター (東京)

- ⑥ 淡路比呂代, 朝日麻衣, 井上裕康, 中田理恵子「葉酸欠乏による肝臓及び脂肪組織での脂質代謝関連酵素の発現変動」第 63 回日本栄養・食糧学会大会, 2009 年 5 月 21 日, 長崎ブリックホール (長崎県)

- ⑦ 淡路比呂代, 朝日麻衣, 渡邊志保, 井上裕康, 中田理恵子「葉酸欠乏における遺伝子発現の変動—肝臓と脂肪組織における脂質代謝関連酵素の変化—」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会, 2008 年 12 月 12 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

- ⑧ 中田理恵子, 淡路比呂代, 石田麻夏, 井上裕康「葉酸欠乏における遺伝子発現の変動」日本ビタミン学会第 60 回大会, 2008 年 6 月 14 日, 仙台国際センター (宮城県)

- ⑨ 中田理恵子, 淡路比呂代, 渡邊志保, 井上裕康「葉酸欠乏が脂質代謝関連酵素の遺伝子発現に及ぼす影響」第 50 回日本脂質生化学会, 2008 年 6 月 6 日, 徳島県郷土文化会館 (徳島県)

- ⑩ 淡路比呂代, 石田麻夏, 渡邊志保, 井上裕康, 中田理恵子「葉酸欠乏における遺伝子発現の変化」第 62 回日本栄養・食糧学会, 2008 年 5 月 3 日, 女子栄養大学 (埼玉県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 理恵子 (NAKATA RIEKO)

奈良女子大学・生活環境学部・講師

研究者番号: 90198119

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし