

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20580132

研究課題名(和文) 高齢者に多発するビタミンB12欠乏性神経障害発症の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neuropathy caused by vitamin B12-deficiency in elderly people

研究代表者

渡辺 文雄(WATANABE FUMIO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30210941

研究成果の概要(和文)：高齢者に多発するビタミンB12欠乏性神経障害の分子メカニズムをヒトのモデル生物として広く用いられている線虫(*Caenorhabditis elegans*)により解明した。ビタミンB12欠乏線虫では脂質やアミノ酸代謝異常に加え、各種酸化ストレスが著しく蓄積していた。これら代謝異常や酸化ストレスの蓄積は複合的に神経細胞に作用し、神経伝達の非効率化、神経伝達受容体の攪乱ならびに神経細胞死を誘発することが推定された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of neuropathy caused by vitamin B12-deficiency in elderly people, the vitamin-deficient nematode (*Caenorhabditis elegans*) was prepared and used as a model animal. The vitamin B12-deficient nematode showed significant metabolic disorders of lipids and amino acids, and accumulation of oxidative stress; such disorders result in inefficiency of neurotransmission, functional disturbance of neuron receptors, and death of neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養生化学, ビタミン学

1. 研究開始当初の背景

ビタミンB12(B12)は、深紅の水溶性ビタミンであり、我が国の食事摂取基準では推奨量2.4 μ g/日と極めて微量で有効である。B12の生合性能は微生物のみが有し、自然界の食物連鎖により、動物組織へと蓄積される。我が国では畜肉や魚介類ならびに食用藻類がB12の良い供給源となっている。

近年、中高年者で加齢に伴う胃の機能低下や萎縮性胃炎による胃酸分泌の低下により、食品からB12を十分に摂取していてもB12の

消化・吸収ができ難い体質となり、徐々にB12欠乏症(食品タンパク質結合性B12吸収不良)を発症し、重度の神経障害により歩行困難となることが明らかとなった。B12欠乏性神経障害は高齢者のQOLを顕著に低下させ死に至らしめるためB12欠乏症の感度の良い診断法の開発や予防法の検討が急務である。実際に我が国の高齢者の栄養調査の結果、B12欠乏症の罹患率が非常に高く、急速に超高齢化社会へと向かう我が国において、このB12欠乏性神経障害は深刻な問題である。さらに、

B12 欠乏症を予防する目的で食品に含まれる B12 化合物の栄養評価を検討した結果、日本人が摂取する食品にはヒトにとって生理的に不活性な疑似 B12 が多量に含まれていることも判明し、今後、我が国において B12 欠乏性神経障害が深刻な社会問題となることが推測された。

B12 は生体内でアミノ酸や奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与するメチルマロニル CoA ムターゼとホモシステインと 5-メチルテトラヒドロ葉酸からメチオニン合成するメチオニン合成酵素の補酵素として機能しているが、B12 欠乏症との関連については不明点が多く残されている。

2. 研究の目的

この難問題を解決するために個体発生機構・全ゲノム情報・ヒトの疾患遺伝子と相同性の高い遺伝子群の存在など生命機能の情報が非常に充実しており、ヒトのモデル生物として広く用いられている線虫 (*Caenorhabditis elegans*) に着目した。実際に *C. elegans* はヒトに存在する B12 関連遺伝子のほとんどを有しており、また *C. elegans* はすべてのニューロンが同定されている唯一の生物であり、神経回路と行動メカニズムや行動パターンの情報も豊富である。これらの理由から *C. elegans* は B12 欠乏性神経障害発症の分子メカニズム解明のための実験生物として最適と考えられる。B12 欠乏 *C. elegans* を作成し、本生物での代謝異常などを現象を分子レベルで解明し、ヒトの B12 欠乏性神経障害の予防法や診断・治療法へ結びつけるのが本件研究の目的である。

3. 研究の方法

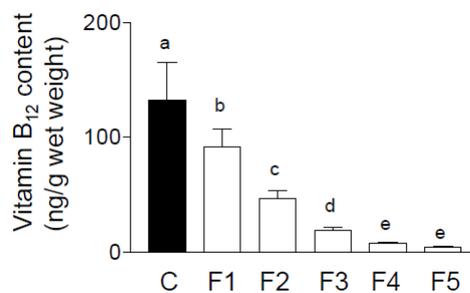
線虫 *C. elegans* の B12 に関する基礎データがほとんど存在しないため B12 関連遺伝子および酵素などの基礎データの収集を行うことが、目的達成の近道と考えられる。先ず、(1) 線虫を用いた B12 欠乏動物の調製法を確立することを検討した。線虫 *C. elegans* の食餌が大腸菌であるため、B12 不含大腸菌を調製し、*C. elegans* の飼育条件を種々検討した。B12 欠乏状態はメチルマロン酸およびホモシステインを指標として HPLC 法で測定した。また、種々のバイオマーカーと体内 B12 量との相関について検討した。(2) B12 は生体内で奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与することから、B12 欠乏が線虫の脂質代謝に及ぼす影響について検討した。(3) B12 は生体内でメチオニンの生合成やバリン・イソロイシンなど分岐鎖アミノ酸の異化代謝に関与することから、B12 欠乏が線虫のアミノ酸代謝に及ぼす影響について検討した。またオルニ

チンから合成され神経機能を調節するポリアミンの代謝についても検討した。(4) B12 欠乏により細胞内で蓄積したホモシステインによる酸化ストレス障害を解析した。

(5) 食餌性 B12 欠乏動物の作成には長時間を要するため新規な B12 酵素阻害剤を開発し、線虫ならびに培養細胞を用いて早期に B12 欠乏症モデル動物(細胞)を調製することを検討した。

4. 研究成果

線虫を用いた B12 欠乏症モデル動物の調製法を確立する目的で、食餌性 B12 欠乏が線虫に及ぼす影響を検討した。B12 制限食餌の調製は大腸菌 OP50 株を M9 培地で振とう培養したものを B12 制限食餌として用いた。コントロールの生育条件として線虫(野生種 N2)を B12 (100 μ g/l)を添加した培地を用いて B12 制限食餌で生育させた。B12 欠乏線虫はコントロール線虫を B12 無添加の培地に同一条件下で 5 世代継代的に生育させて調製した。生育の指標として産卵数と世代交代時間を測定した。また B12 欠乏の指標として体内メチルマロン酸量、ホモシステイン量、メチルマロニル CoA ムターゼ活性、メチオニンシンターゼ



活性を HPLC 法で測定した。

図 1 ビタミン B12 欠乏条件下で生育させた線虫の体内ビタミン B12 量

B12 欠乏条件下の線虫の産卵数はコントロール線虫より著しく減少し、世代交代時間は増加した。また、線虫体内の B12 量は 1 世代目から顕著に低下し(図 1)、5 世代目の線虫において B12 欠乏の指標である体内メチルマロン酸量(図 2 A)は約 3 倍に上昇し、ホモシステイン量(図 2 D)も顕著に上昇した。B12 依存酵素メチルマロニル CoA ムターゼ(図 2 BC)は約 10 倍に活性が上昇し、メチオニンシンターゼ(図 2 EF)は B12 欠乏条件下 1 世代目から有意に活性が減少した。

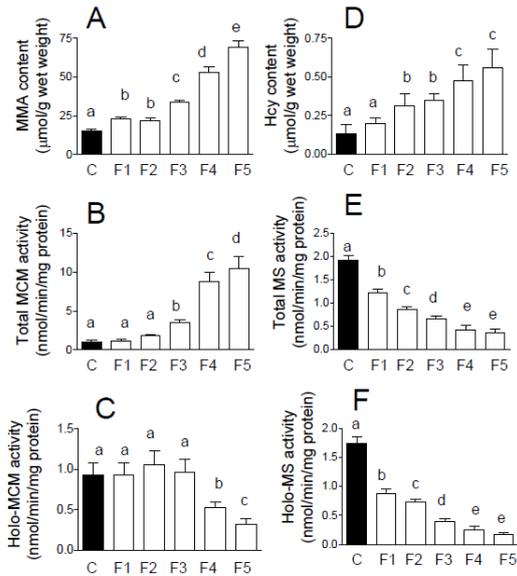


図2 ビタミン B12 欠乏条件下で飼育した線虫体内の各種バイオマーカーの変動

また、これら B12 欠乏条件下で線虫に生じた現象は B12 添加によりほぼ回復した。また、B12 欠乏条件下で太短い形態を有する線虫が約 16% 程度の頻度で観察され、本変異体(図 3)は著しい運動機能障害を有していた。

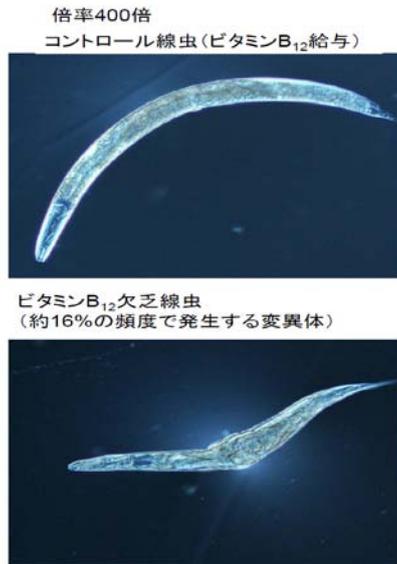


図3 ビタミン B12 欠乏条件下で発生する線虫の変異体

食餌性 B12 欠乏が線虫の脂質およびアミノ酸代謝に及ぼす影響を検討した。B12 欠乏線虫は総脂質ならびにリン脂質や中性脂肪量がコントロール線虫に比べ顕著に増加して

いたが、奇数鎖脂肪酸の蓄積は認められなかった。一方、B12 欠乏線虫でリン脂質のホスファチジルエタノールアミン/ホスファチジルコリン比が6倍以上に上昇し、生体内メチル化反応の指標である *S*-アデノシルメチオニン/*S*-アデノシルホモシステイン比は顕著に減少していた。

B₁₂は生体内でメチオニンの生合成やバリン・イソロイシンなど分岐鎖アミノ酸の異化代謝に関与することから、B₁₂欠乏が線虫のアミノ酸代謝に及ぼす影響について検討した。B12 欠乏線虫では、メチオニン合成酵素活性の低下から生体内メチオニンが減少し、ホモシステイン・シスタチオンが顕著に増加していた。またメチルマロニルCoAムターゼ活性の低下からスレオニン・バリン・ロイシン・イソロイシンが有意な増加を示した。さらに神経機能に関与するポリアミンの前駆体であるオルニチンが顕著な増加を示したことから、体内ポリアミン量の変動を検討した。その結果、B12 欠乏線虫ではプトレスシンは有意差が見られなかったが、スペルミジンが著しく減少していた。またポリアミン合成の律速酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ活性はB12 欠乏線虫で顕著な上昇を示したが、ポリアミンの合成には*S*-アデノシルメチオニンが必須であるためメチル化反応の低下がB12 欠乏線虫のポリアミン代謝に大きな影響を及ぼしていると推察され、上述の運動機能障害との関連性が示唆された。

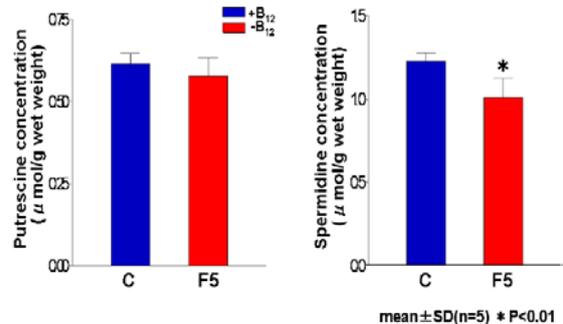


図4 ビタミン B12 欠乏線虫のプトレスシンとスペルミジン量

また、B12 欠乏により細胞内で蓄積したホモシステインは自己酸化の過程で活性酸素種の発生に関与する。そこでB12 欠乏線虫の酸化ストレス障害の解析を行った。その結果、B12 欠乏線虫体内において顕著に活性酸素種ならびに活性窒素種が生成し、過酸化脂質や酸化タンパク質の蓄積ならびに酸化型グルタチオンの増加（還元型グルタチオンの減少）などが観察され、著しい酸化ストレス障

害を呈していることが明らかとなった。



図5 ビタミン B12 欠乏線虫体内の過酸化水素の蛍光染色

以上の結果から B12 欠乏に起因するアミノ酸代謝異常は複合的に神経細胞に作用し、神経伝達の非効率化、イオンチャネル型受容体 (NMDA 受容体) の攪乱ならびに神経細胞死を誘発することが推定された。また、B12 欠乏は予想を超える酸化ストレス障害を誘発することが本研究で明らかとなり、酸化ストレスが神経細胞死を誘発することが推定された。

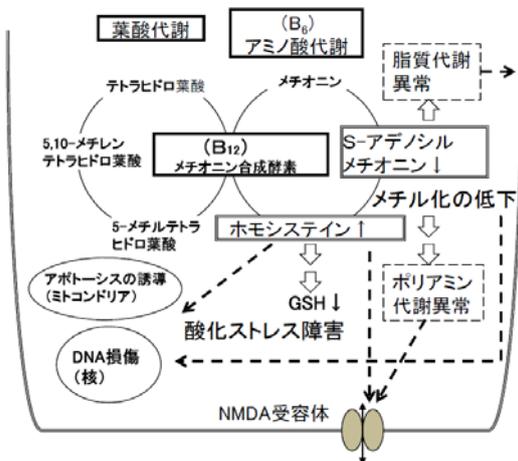


図6 ビタミン B12 欠乏によるアミノ酸代謝障害と神経障害の関連性

B12 欠乏症モデル動物を短期間で作成することを目的として B12 酵素に特異的な阻害剤を調製した。調製した B12 アルキルアミン誘導体は疎水性を示し、複数の B12 定量用微生物において B12 の生物活性を示さなかった。サル腎臓由来細胞 Cos-7 細胞の培地中に OH-B12 アルキルアミン誘導体を添加した時、B12 依存酵素の活性を顕著に阻害した。OH-B12 アルキルアミン誘導体の阻害作用は既存の B12 酵

素阻害剤である OH-B12[c-lactam]よりも強力であった。また、線虫 *C. elegans* への投与実験でも同様な傾向が示された。食事性 B12 欠乏線虫の調製時には、B12 欠乏食餌で 5 世代継代 (15 日間) 飼育しなければ欠乏線虫を調製することができなかったが、B12 アルキルアミン誘導体を用いれば 1 世代目 (3 日) で欠乏状態を示したことから、短期間に B12 欠乏動物を調製することができる可能性が示唆された。今後、ラットなどの哺乳動物による試験を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

査読なし

1. 渡辺文雄(2011) ビタミン B12. Functional Food, 4, 280-286.

2. 渡辺文雄(2009) ビタミン B12 と高齢者. ビタミン, 87, 369-373.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 渡辺文雄 (代表) ビタミン B12 が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のアミノ酸代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会 (2010 年 5 月 21-23 日) アスティとくしま

2. 渡辺文雄 (代表) ビタミン B12 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の脂質代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会 (2009 年 11 月 17 日) 鳥取大学農学部

3. 渡辺文雄 (代表) 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いたビタミン B12 欠乏症モデル動物の調製法の確立. 日本ビタミン学会 (2008 年 6 月 14 日) 仙台国際センター

4. 渡辺文雄 (代表) 脂溶性ビタミン B12 誘導体の調製と生体に及ぼす影響. 日本ビタミン学会 (2008 年 6 月 14 日) 仙台国際センター

〔図書〕(計 1 件)

Watanabe, F. and Yabuta, Y. (2011) Fortified Foods with Vitamins. Wiley-VCH Verlag, 165-171.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 文雄 (WATANABE FUMIO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30210941