

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11649

研究課題名（和文）補酵素型ビタミンB12の脳内動態と睡眠・覚醒における機能解明

研究課題名（英文）Function of Vitamin B12 in Brain

研究代表者

竹中 重雄（Takenaka, Shigeo）

大阪公立大学・大学院生活科学研究科 ・教授

研究者番号：10280067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脳におけるビタミンB12の機能解明を試み、脳内B12の日内変動が存在すること、それはアデノシルB12（Ado-B12）の変動であることを明らかにした。また、培養細胞においてAdo-B12合成酵素RNAiを実施した結果、all-transレチノイン酸による神経様細胞への分化が有意に抑制されることを見出した。加えて、メタボリックプロファイリングから分化前後の代謝、特に有機酸とアミノ酸代謝への影響が大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンB12が脳内における日内変動を示したことはB12が生理学的に重要な機能を有することが示唆される。また、補酵素型B12の減少が神経細胞の分化において重要な役割を果たしていることも明らかになった。これらの結果は脳機能、すなわち精神の健康の維持増進においてB12が担う重要な働きが存在することを示唆するものであり、栄養学的観点から重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Vitamin B12 content in brain has a circadian rhythm and Adenosyl cobalamin had a major role in the change. In a neuroblastoma cell line RNAi of Ado-B12 synthesizing enzyme resulted in low differentiation rate compared to the control under all-trans retinoic acid. The metabolisms of organic acid and amino acid were strongly influenced by the RNAi.

研究分野：栄養化学

キーワード：ビタミンB12 補酵素型 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B12 (Cobalamin; 以下、B12) は水溶性ビタミンの一種である。中心にコバルト原子を持つコリン環に下方から 5,6-ベンズイミダゾールが配位し、上方配位子の違いにより生理活性の異なる B12 (シアノコバラミン; CN-B12、アデノシルコバラミン; Ado-B12、メチルコバラミン; Me-B12 など) が構成される。B12 は放線菌など一部の微生物のみで生合成が可能であり、動物や植物はともに生合成できない。しかし、生体内において種々の酵素反応における生化学的作用に関与しており、生体にとって必要不可欠なものである。哺乳類の生体内で B12 を補酵素とする酵素は、メチルマロニル CoA ムターゼ (以下、MUT) と 5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (以下、MTR) の 2 種類のみである。MUT は Ado-B12 依存性にメチルマロニル CoA からスクシニル CoA へと炭素骨格の組み替えを伴う異性化反応を触媒し、MTR は Me-B12 依存性にメチル基転移反応を起こし、ホモシステインをメチオニンに変換する。

ヒト臨床の現場において悪性貧血、神経障害、睡眠障害に対して CN-B12 または Me-B12 が処方されている。CN-B12 は細胞内で上方配位子をアデノシル基またはメチル基のどちらかに変換され、生理作用を発揮する。神経障害や睡眠障害には、特に Me-B12 が有効であると考えられている。また、Me-B12 は葉酸とともに DNA 合成に関与するため、欠乏すると赤血球分化に異常をきたし、症状が進行すると巨赤芽球性貧血を呈する。B12 欠乏に伴う二つの B12 依存性酵素に由来する病態解析から B12 の作用機構は明らかにされているが、神経障害や睡眠障害に対して B12 がどのような作用機序で働き、その効果を示すのかということは明らかにされていない。体内に存在する B12 の大部分は肝臓に蓄えられるが、血液を介して血液脳関門を通り、中枢神経系に運ばれる。これまでに B12 欠乏動物では顕著な神経障害がみられること、アルツハイマー病やアルコール性認知症の患者の脳脊髄液中の B12 濃度は極度に低下していることが知られている。また、B12 を添加することで皮質ニューロン培養細胞に対するグルタミン酸作動性の細胞毒性による神経障害を防ぐことが出来ること、低酸素状態や低血糖状態、グルタミン酸塩の添加によって引き起こされる海馬のシナプス前電位の減少を軽減できることも知られている。これらの報告から、中枢神経系の神経修復に B12 が機能する生理機構の存在が示唆される。しかし、これらのような中枢神経系に対する B12 の効果に対する報告はあるが、脳生理学的な機能はほとんどわかっていない。特に睡眠障害では生体の概日性の回復を目的に Me-B12 が投与され、その投与によるサーカディアンリズムへの影響が報告されており、また、脳内 B12 量の概日性変化が存在し、Me-B12 がサーカディアンリズムの信号であるメラトニン合成に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、B12 のサーカディアンリズムへの関与機構は明らかでない。一方で、Ado-B12 のサーカディアンリズムに関する報告はない。

2. 研究の目的

B12 の神経における機能を明らかにすることを目的に、脳内 B12 の定量から脳の B12 概日性変化を明らかにし、また、脳における補酵素型 B12 の概日性変化を明らかにすることを目的にした。特に B12 の定量法として液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LCMS) を用いた方法の適用性についての検討を実施した。また、培養神経細胞を用いた系において、B12 の機能を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) B12 定量法

B12 依存性大腸菌を用いたバイオ・オートグラム

B12 の定量は、食品では B12 要求性微生物を用いたバイオ・オートグラムが主体であり、ヒトの臨床検査では B12 結合タンパク質であるブタ胃内因子を用いた自動分析装置が用いられている。生体における B12 の定量には極微量の B12 を測定するための高い感度が求められる。そこで、いくつかある B12 定量法の中から操作の簡便なバイオ・オートグラムによる定量法を採用した。バイオ・オートグラムは微生物を用いて生理活性物質を定量する方法で、本研究では B12 を定量するために、B12 要求性大腸菌 *Escherichia coli* 215 を用いた。本章では *E. coli* 215 を用いたバイオ・オートグラムを用いた。

LCMS による B12 定量

LCMS を用いた B12 定量を検証した。カラムは C18 系を用い、アセトニトリルまたはメタノールに要る溶出を実施、それぞれの B12 類縁体に対する検討を実施した。

(2) B12 類縁体の調製

各組織 0.1 g 程度を秤量し、それに 80 %エタノール 0.2 mL を加え、暗所にてホモジェナイザで破碎後、15,000 rpm、4 で 1 時間心分離を行い、上清を得た。調製したサンプルを、バイオ・オートグラムを用いて定量した。

(3) SH-SY5Y における Ado-B12 の役割

神経芽腫細胞 SH-SY5Y の Ado-B12 合成酵素の RNAi 細胞を作出した。RNAi はドキシサイクリン (DOX) 誘導ベクターの導入によって行った。DOX 存在下に *all-trans* レチノイン酸 (ATRA) による分化誘導を行い、Ado-B12 の分化への影響を検討した。

(4) メタボリックプロファイリング

前項の細胞から代謝物を抽出し、誘導体化後、GCMS/MS によるメタボリックプロファイリングを実施した。データベースは Smart Metabolite Database (島津製作所) を、解析には MetaboAnalyst を用いた。

4. 研究成果

(1) B12 定量法

B12 要求性大腸菌株を用いた定量法では 2~200 pg の範囲で良好な検量線が得られ、また、ラット由来の B12 の検出と定量が可能であった。しかしながら、補酵素型 B12 を含む類縁体の分離が明確ではなく、それぞれの分別定量性が低い難点があったが、Me-B12 と Ado-B12 の定量は可能であった。一方で、LCMS では補酵素型 B12 を含む類縁体の分離制度は高いが、それぞれの B12 類縁体の検出下限が 1 ng 近辺にあったため、栄養強化食品中の B12 の定量は可能な程度にとどまり、ラット脳を含む生体由来の B12 の検出が困難であった。そこで、以降の検討は、LCMS による検出法は実施せず、バイオ・オートグラムを実施した。

(2) 生体内 B12 の日内変動

大脳、小脳において B12 量の日内変動がみられた。大脳では消灯中の 0 時から照明が点灯される 8 時まで有意に B12 量が低下した。8 時に最低値を示した後、定常的なレベルへと上昇した。小脳では消灯中の 4 時に一過性の上昇が確認できた。その他の脳幹・肝臓・腎臓・血清において B12 量の日内変動は見られず、一日を通して一定の値を示した。このことから脳内の B12 レベルに変動が生じることが示された。(図 1 左)

(3) 補酵素型 B12 の日内変動

Ado-B12 は定量に十分な染色像を得ることが出来たが、Me-B12 は定量が困難であった。そこで、Ado-B12 の染色スポット面積を ImageJ で測定し、脳内 Ado-B12 の日内変動を検証した。前章示した総 B12 量と比較したところ、Ado-B12 量の日内変動パターンは、総 B12 量の日内変動に合致した。また、上方配位子が失われた OH-B12 が検出されなかったことから、実験手技に問題はなかった。よって、前項の結果と併せて、Ado-B12 の変動が起きていることが示唆された。(図 1 右)

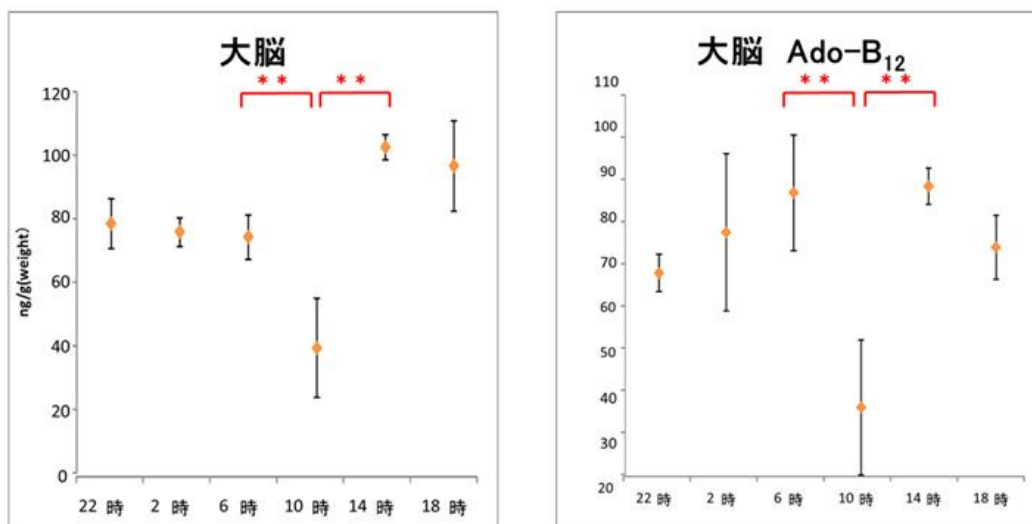


図 1 大脳内 B12 と Ado-B12 の日内変動

(4) Ado-B12 合成酵素 RNAi の細胞分化への影響

Ado-B12 合成酵素遺伝子 (Cb1B) RNAi 細胞の ATRA による分化への影響を検討した結果、神経様細胞への分化率は RNAi 細胞において有意に減少した。また、分化マーカーであるニューロフィラメントである NF160 と神経細胞特異的核タンパク質 (NeuN) の発現も同様に低下していた。よって、細胞内 Ado-B12 の減少は SH-SY5Y 細胞の Ado-B12 の分化を抑制する。

(5) Ado-B12 合成酵素 RNAi のメタボリックプロファイリング

Ado-B12 合成酵素遺伝子 Cb1B RNAi 細胞のメタボリックプロファイリングを実施した結果、Control 細胞では分化前後で代謝が大きく変動したが、RNAi 細胞では、その代謝変化が認められなかった。特に RNAi 細胞において TCA 回路の抑制とアミノ酸代謝の変動が大きく、それらが分化に大きく影響することが示唆された。

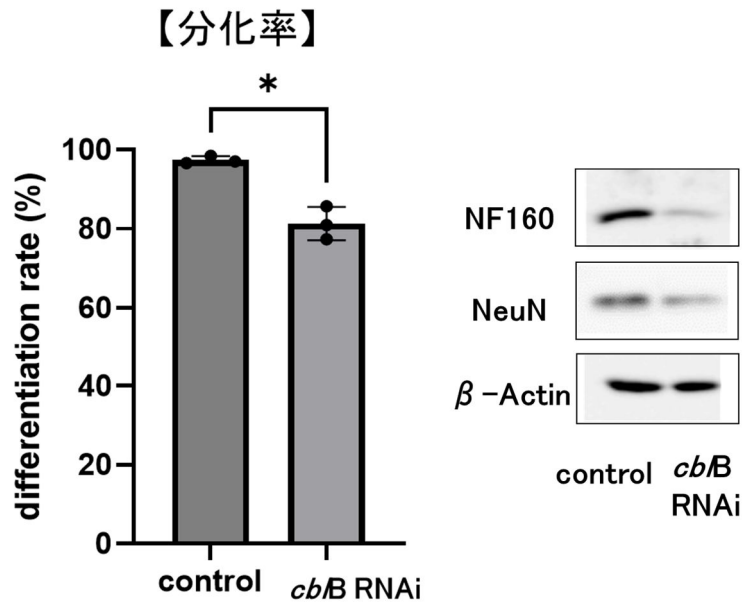


図2 SH-SY5Y における Ado-B12 合成酵素 RNAi 細胞の ATRA による分化への影響

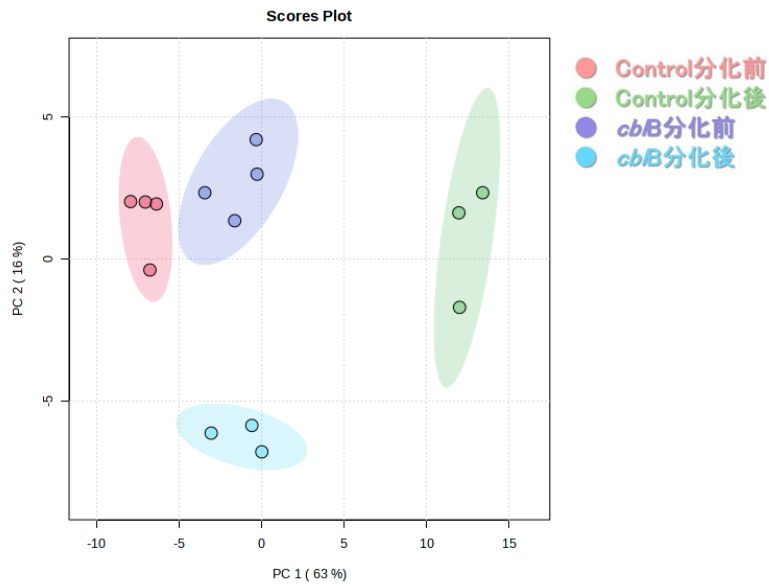


図3 SH-SY5Y における Ado-B12 合成酵素 RNAi 細胞の GC-MS/MS メタボリックプロファイリング PCA スコアプロット

以上の結果から、B12 は脳内において日内変動があり、そのことが生理学的な機能に関与することが示唆された。また、神経細胞の分化と維持に B12 は重要な役割を果たすことが示唆された。今後は脳内 B12 の生理学的な機能解析と神経細胞において代謝への影響を明らかにすることが求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高松愛梨, 岡本彩希, 松村成暢, 岩城俊雄, 叶内宏明, 竹中重雄
2. 発表標題 先天性ビタミンB12代謝異常症原因遺伝子群RNAiによるヒト神経芽細胞腫の分化抑制
3. 学会等名 日本ビタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takenaka, S., Natsuhara, M., Fujita, K., Okamoto, S., Matsumura, S., Iwaki, T., Kanouchi, H., Tanaka, M., Izawa, T., Kuwamura, M.
2. 発表標題 Serum Metabolic Profiling of Rat Fed Folate and Vitamin B12 Depleted Diet
3. 学会等名 International Conference of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ラット脳内ビタミンB12の日内変動
2. 発表標題 岡田直人, 岡本彩希, 叶内宏明, 渡辺文雄, 乾博, 竹中重雄
3. 学会等名 日本ビタミン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝端早紀, 高松愛梨, 中野寧音, 松村成暢, 叶内宏明, 竹中重雄
2. 発表標題 先天性ビタミンB12代謝異常症原因遺伝子cb1B RNAiによるヒト神経芽腫細胞の代謝変動
3. 学会等名 日本栄養食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2023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
---------	---------