

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：37119

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00905

研究課題名（和文）ミトコンドリア異常と代償的葉酸代謝亢進の分子基盤と予防栄養の探索

研究課題名（英文）Research for preventive nutrition and molecular basis of mitochondrial dysfunction and of compensatory folate hypermetabolic

研究代表者

天本 理恵（Amamoto, Rie）

西南女学院大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：00352344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：葉酸代謝と動脈硬化、癌、認知症などの生活習慣病との関連性が注目されており、葉酸の摂取不足がこれらの疾患のリスク因子にもなることが報告されている。本研究では、ミトコンドリア機能低下による病態悪化に対して、ミトコンドリアの葉酸およびアミノ酸代謝機能の亢進が代償的防御機構として働くことを推察した。ミトコンドリア機能低下を老化や生活習慣病罹患の一因と考えると、葉酸の摂取がそれらの予防や重症化予防の一役を担うことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア内での葉酸代謝の亢進は、癌や胎児の細胞では見られるが、正常細胞ではあまり見られない。中でもミトコンドリアの葉酸代謝酵素であるMthfd2は、正常の細胞での発現はないと言われている。本研究で用いたミトコンドリア機能異常の心筋細胞では、この酵素の発現が見られ、葉酸、アミノ酸代謝を亢進させ、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝機能の低下を補っていることが考えられた。生活習慣病予防のためにも積極的な葉酸摂取を推奨するための基礎となる結果が得られたと考える。

研究成果の概要（英文）：The relationship between folate metabolism and lifestyle-related diseases such as arteriosclerosis, cancer, and dementia has attracted attention, and it has been reported that insufficient intake of folic acid is a risk factor for these diseases. In this study, we speculated that the enhancement of mitochondrial folic acid and amino acid metabolism functions as a compensatory defense mechanism against the deterioration of the pathological condition due to mitochondrial function decline. Given that mitochondrial dysfunction is one of the causes of aging and lifestyle-related diseases, it is expected that the intake of folic acid will play a role in their prevention and prevention of aggravation.

研究分野：栄養学

キーワード：ミトコンドリア機能異常 葉酸代謝 一炭素代謝 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

葉酸代謝、アミノ酸代謝は、生活習慣病の発症や、遺伝子のメチル化による細胞の分化・発生に深く関わっている。近年は、葉酸代謝を介する One-carbon(1C)代謝と動脈硬化、心血管疾患、癌、認知症などの生活習慣病、さらには DOHaD(developmental origins of health and disease)説との関連性が強く注目されており、葉酸の摂取不足が上記疾患のリスク因子にもなることが報告されていた。

(1) **具体的な症例**では、葉酸の摂取不足によって、上昇した血中ホモシステインが動脈硬化やアルツハイマーのリスク要因になり、さらに妊娠初期に葉酸が不足すると、細胞の正常分化が行われず、二分脊椎症などの神経管閉鎖障害の発症が高まることなどの報告もある。

(2) **ミトコンドリア機能低下による代償的防御機構**: 一方で生体は加齢やストレスにより細胞内小器官であるミトコンドリアの機能低下を引き起こし、種々の病態(ミトコンドリア病、糖尿病、心疾患)と関連することが明らかになっていた。しかしながら生体はこれらのミトコンドリア機能低下による病態に対して代償的な防御反応機構を有して病態の改善に繋げている。研究開始当初、我々は心筋特異的にミトコンドリア機能低下を引き起こしたマウス研究により、このマウスでは、セリン グリシン One carbon 経路の活性化、ミトコンドリア内の葉酸代謝経路の亢進による防御機構を有するかもしれないことを見出した。これらのことから、ミトコンドリア機能低下時の葉酸代謝、アミノ酸代謝機構の動態の解明が、病態の解明及び予防栄養学の推進に繋がることが示唆された。

しかしながら、血中ホモシステイン値上昇に関する遺伝子多型の報告以外で、葉酸摂取がホモシステイン値を下げるという分子生物学的メカニズムを報告した研究は殆どない。また、妊娠期においては、DOHaD 説における胎生期のエピゲノム変化に葉酸代謝が関わっていることも示唆されており(Graham C ら Br J Nutr.,2008)、低出生体重児で生まれた場合に**将来の心筋梗塞の発症率**を高めることの解明につなげるためにも、葉酸摂取が生活習慣病の発症(本研究では、**心疾患**)を抑制する分子生物学的メカニズムの検証が必要と思われる、葉酸代謝機構の分子生物学的解明が必要と考えた。

2. 研究の目的

背景に記載したように、葉酸代謝を介する One-carbon(1C)代謝と動脈硬化、癌、認知症などの生活習慣病との関連性が注目されており、葉酸の摂取不足が上記疾患のリスク因子にもなることが報告されている。申請者は、研究分担者が所持する心筋特異的 p32 ノックアウト(KO)マウスの研究を行っている。p32(gC1qR)は、そのほとんどがミトコンドリアに存在し好氣的 ATP 産生能に重要である。この p32 タンパク質の分子機能に関しては未だほとんどが不明であるが、心筋特異的に p32 を KO したマウスはミトコンドリア機能異常を有し、加齢とともに心筋の崩壊へと繋がることを考察している(Yagi, Amamoto: 投稿準備中)。葉酸代謝は細胞質だけでなくミトコンドリアでも行われている可能性を考え、申請者はこのミトコンドリア機能異常を持つマウスの**心臓**における**葉酸代謝**に着目して、**'ミトコンドリア機能低下が原因となる病態悪化(心機能低下)に対し、葉酸およびアミノ酸代謝の亢進が代償的な防御機構として働く。'**との仮説を提唱し検証した。本研究では、ミトコンドリア機能異常マウスを用い、葉酸代謝、アミノ酸、糖質代謝との関連性を分子生物学的に解明し、さらには葉酸、アミノ酸等の摂取による心疾患発症の予防効果を検討することで、予防分子栄養学への展開を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、心疾患と葉酸代謝との関連をミトコンドリアレベルで解明するために、(1) **モデルマウス**および(2) **培養細胞**を用いて以下の実験を行った。

(1) **ミトコンドリア機能異常 (p32KO) マウスの心臓組織における葉酸、糖質およびアミノ酸代謝機構の分子生物学的検討および p32 タンパク質の分子機能の解明**: 心筋特異的 p32 ノックアウト(KO) マウスの有用性を検討するために、研究分担者が所持する心筋特異的 p32 ノックアウトマウス(p32KO マウス)と正常のマウスにおいて葉酸代謝系(細胞質、ミトコンドリア)および One-carbon(1C)代謝(セリン グリシン合成)系の比較検討を行った。マウスは成獣マウス(雄、雌 6、9、12 ヶ月齢)と、成長期(2 ヶ月齢)のマウスを用いた。 p32cKO マウスの心筋細胞と正常マウスの心筋細胞において、葉酸代謝を介する One-carbon(1C)代謝に関係する酵素(Phgdh, Psat1, Shmt)の発現、ミトコンドリアの Mthfd2 発現を western blot および免疫染色、mRNA にて確認した。免疫染色では、各タンパク質の局在の確認のため、蛍光色素や HR-AP のポリマー (PolinkDS-RR キット)を使用して二重染色を行った。さらにミトコンドリア、細胞質双方の葉酸代謝系に関係する酵素群(Mthfd1L,2L)の発現様式をタンパク質、局在レベルで確認した。また、葉酸代謝に関連するアミノ酸代謝に係る因子(Mtr, Cbs 等)とDNAなどのメチル化反応に関わる Dnmt1 の発現も観察した。1C 代謝におけるアミノ酸分析には、メタボローム解析を行った。

(2) **ミトコンドリア機能異常 (p32KO) 培養細胞(MEF 細胞)における葉酸、糖質およびアミノ酸代謝機構の分子生物学的検討**: ミトコンドリア機能が低下している MEF 細胞を用いて酵素(Phgdh、 Mthfd2)の発現を局在およびタンパク質レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) **心筋特異的 p32 ノックアウト(p32cKO) マウスの心臓組織および培養細胞(MEF)における葉酸代謝系(ミトコンドリア)および One-carbon(セリン グリシン合成系)タンパク質の発現(局在)結果**

ミトコンドリアの葉酸代謝タンパク質(Mthfd2)と One-carbon 代謝タンパク質(Phgdh)の培養細胞(MEF)における発現: WT、p32cKO の MEF における Mthfd2 および Phgdh の発現を、蛍光免疫染色にて確認したところ、MEF においては、Mthfd2 および Phgdh の両タンパク質ともに、WT (図 1A) p32cKO (図 1B) 間で有意な発現差が見られなかった。Western blot の結果においても MEF では、Mthfd2 および Phgdh の両タンパク質ともに発現差が見られないという免疫染色と同様の結果となった。この結果から、本実験における培養細胞(MEF)を使用しての実験は難しいと判断し、次に記載する心臓組織における実験のみにて行うこととした。

ミトコンドリアの葉酸代謝タンパク質(Mthfd2)と One-carbon 代謝タンパク質(Phgdh)の心臓組織における発現: WT および p32cKO の心筋細胞(9 ヶ月齢雌雄マウス)における Mthfd2 発現を免疫染色にて確認したところ、WT (図 1C) の心臓組織には発現が見られず、p32cKO (図 1D)

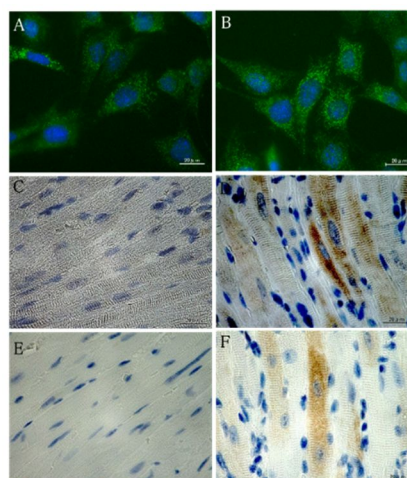


図1 MEF細胞および心臓組織におけるMthfd2とPhgdhの発現

にのみ発現が見られた。また Phgdh の発現も、WT (図 1E) には見られず、p32cK0 (図 1F) のみ確認された。これまでの研究報告では、Mthfd2 は胎生期や癌細胞でのみ発現が見られ、正常な細胞では発現していないと言われている。しかし、本研究

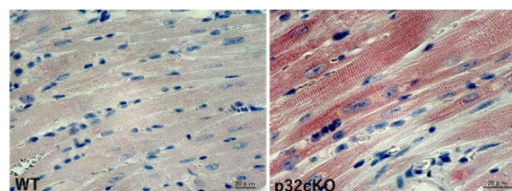


図3 Mthfd2(茶褐色)とShmt2(赤)の局在

の結果では、9 ヶ月齢マウスの p32cK0 の心筋組織に、Mthfd2 の発現が認められた。よって、葉酸および One-carbon (1C) 代謝系において WT と P32cK0 に発現差のある心筋組織を使用して、本研究の葉酸代謝および 1C 代謝の実験を進めることとした。さらに、Mthfd2 と Phgdh の発現がマウスの月齢差、性差にないかの確認を行った。2、6、9、12 ヶ月齢のマウスの心筋組織を使用し、Mthfd2 と Phgdh の発現を見た結果、2 ヶ月齢では、WT および p32cK0 のどちらも発現しておらず、月齢を追うごとに、p32cK0 の心筋組織のみが強く発現していた。この結果からは、加齢による Mthfd2、Phgdh の発現増加が考えられた。また、雌雄の差を検討したが、上記実験において雌雄差はどの月齢でも認められなかった。よって、本実験では9 ヶ月齢のマウスを使用した。

(2)p32cK0 心筋組織における葉酸代謝系(細胞質、ミトコンドリア)および One-carbon(セリン グリシン合成系)タンパク質の発現結果

Mthfd2 を含む他の葉酸代謝系および Phgdh を含む他の One-carbon (1C) 代謝のタンパク質の発現を検討した。細胞質の葉酸代謝に関係する酵素である Shmt1 および Mthfd1 は、p32cK0 および WT 両心筋組織において発現していたが、Mthfd1 は若干 p32cK0 の方が強く発現していた。一方、ミトコンドリアの Mthfd2 および Mthfd2L の発現は、免疫染色および western blot のいずれにおいても、p32cK0 のみで見られ、Mthfd1L と Shmt2 の発現は、免疫染色では WT に見られず、タンパク質レベル(western blot)でも p32cK0 での発現増加がみられた(図 2)。Psat1 の発現も WT より p32cK0 の心筋組織において強く認められた。また、各タンパク質の細胞内での局在を検討するために、HRP と AP を使用して二重染色を行った。ミトコンドリアタンパク質である Mthfd2 と Shmt2 は免疫染色では、p32cK0 に

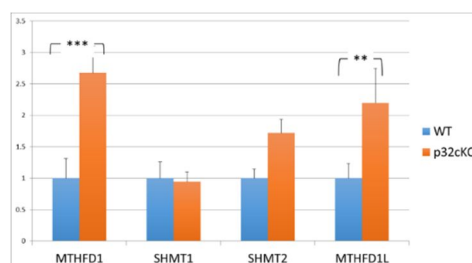


図2 葉酸代謝タンパク質の発現(western blot)

のみ発現が認められたが、Shmt2 は細胞全体に強く発現し、Mthfd2 は核の周りにだけ局在した(図 3)。P32cK0 マウスの心筋細胞の核周辺ミトコンドリアは、膨潤し、壊れていることが多く(T.Saito et al: Cardiovascular Research 2017)、その壊れたミトコンドリアに Mthfd2 が強く発現していることが考えられた。

(3)p32cK0 心筋組織における葉酸代謝系(細胞質、ミトコンドリア)および One-carbon(セリン グリシン合成系)タンパク質の遺伝子発現およびアミノ酸分析

P32cK0 の心筋組織における葉酸および One-Carbon (1C) 代謝タンパク質の遺伝子発現を検討した結果、*Psat1*、*phgdh*、*mthfd2* の mRNA の増加が見られ、中でも *Mthfd2* は強い発現であった。また、WT と P32cK0 心筋組織に含まれるアミノ酸を解析した結果、p32cK0 心筋組織には、serine および glycine の発現が多かった。これらの結果から p32cK0 の心筋組織内における 1C 代謝の亢進とそれに伴う、serine、glycine の蓄積が考えられた。

(4)葉酸代謝およびOne-Carbon (1C) 代謝に関わるアミノ酸代謝のタンパク質の検討

葉酸代謝に関連するアミノ酸代謝に係る因子 Mtr、Cbs と、DNA などのメチル化反応に関わる Dnmt1 の発現を免疫染色にて観察した。ホモシステインからシスタチオンを合成する Cbs の発現は、WT (図 4A) および p32cKO (図 4B) 両組織において強く見られたが、若干 p32cKO での発現が強かった。ホモシステインからメチオニン合成する Mtr の発現は、WT では弱く (図 4C)、p32cKO (図 4D) で若干強く観察された。メチオニンからホモシステインの代謝課程において、DNA のメチル化反応に関わる酵素である Dnmt1 は、WT (図 4E) および p32cKO とも強く発現していたが、核周辺の発現は p32cKO の心筋組織において高強度の発現であった (図 4F)。これらの結果より、葉酸代謝に付随するアミノ酸代謝の亢進、特にメチオニン代謝系を亢進させ、DNA などのメチル化反応を亢進させていることが考えられた。しかし免疫染色とタンパク質レベルの結果のみでは、詳細の検討は出来ておらず、さらなる実験が必要である。

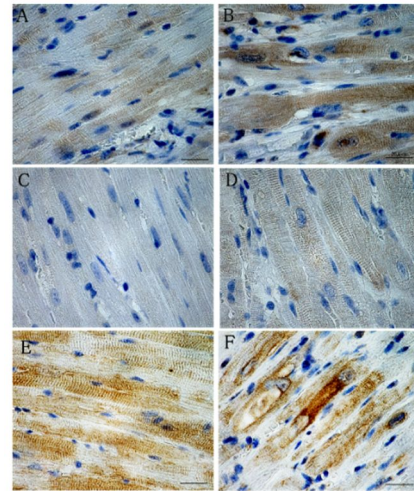


図4 心筋組織におけるCbs、Mtr、Dnmt1の発現

これまでの報告では、マウス心臓のミトコンドリアにおいては、One-carbon(1C)代謝が使われなかったと考えられてきた。また、ミトコンドリアの葉酸代謝酵素である Mthfd2 が働くのは、胎児の細胞と癌細胞のみと言われていたため、それ以外の細胞のミトコンドリアにおける葉酸代謝についても強くは機能していないと考えられてきた。しかし、本研究のミトコンドリア機能異常マウス (p32cKO マウス) の心臓組織における実験結果より、p32cKO の心筋細胞では、Mthfd2 の発現が確認され、さらには、Phgdh、Psat1、Shmt の発現亢進により、健常時 (WT) よりも One-carbon(1C)代謝の亢進が起こっていることが示唆された。また p32cKO 心筋細胞では、Shmt1 より Shmt2 の発現亢進が確認され、このことは、細胞質よりもミトコンドリアに回すセリンとグリシンの量を増やしていることも示唆された。また、Mthfd2 および Mthfd2L の発現が p32cKO 心筋細胞でのみ確認されたが、これらの発現は、2 ヶ月齢のマウスの心筋には見られず、月齢が上がるごとに確認されるようになった。さらには、健常時よりもミトコンドリア機能異常時の方が、葉酸代謝に関わるアミノ酸代謝の亢進も考えられたことから、つまりミトコンドリア機能異常を老化現象や病態悪化の1つと考えると、葉酸代謝の亢進によって、細胞質よりも機能異常を起こしたミトコンドリア内の葉酸代謝を亢進させることで、ミトコンドリア内におけるエネルギー代謝機能の低下を防御する機能が働いていることが示唆された。これらのことより本研究を開始した時に考えた『ミトコンドリア機能低下による病態悪化 (今回は心機能低下) に対して葉酸、アミノ酸代謝機能の亢進が代償的防御機構として働く。』という仮説の入口の段階までは検討できたと考える。よって老化や心機能低下時の葉酸の摂取が、代償的にミトコンドリアのエネルギー代謝機構を助けていることが推察されるが、提唱した『葉酸やアミノ酸摂取による内臓 (心臓等) 機能亢進、葉酸代謝機構の亢進サプリメント、ミトコンドリア機能亢進サプリメントの探索により予防分子栄養学を展開、確立する。』ことに関してはさらなる詳細説明が必要なため、今後の研究課題として検討していく。以上より本研究からは、ミトコンドリア機能低下を老化や生活習慣病罹患の一因と考えると、葉酸の摂取がそれらの予防や重症化予防の一役を担うことが期待される。

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 Saito Toshiro, Uchiumi Takeshi, Yagi Mikako, Amamoto Rie, Setoyama Daiki, Matsushima Yuichi, Kang Dongchon	4. 巻 113
2. 論文標題 Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvx095	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 Yagi Mikako, Uchiumi Takeshi, Sagata Noriaki, Setoyama Daiki, Amamoto Rie, Matsushima Yuichi, Kang Dongchon	4. 巻 7
2. 論文標題 Neural-specific deletion of mitochondrial p32/C1qbp leads to leukoencephalopathy due to undifferentiated oligodendrocyte and axon degeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-017-15414-5	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天本理恵、八木美佳子、内海健
2. 発表標題 ミトコンドリア機能異常と葉酸代謝亢進との関連性の検討
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	内海 健 (Uchiumi Takeshi) (80253798)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	八木 美佳子 (Yagi Mikako)		