

令和元年6月3日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15270

研究課題名(和文) ビタミンB12欠乏による酸化ストレス障害の発症機構の解明

研究課題名(英文) Study of Pathogenic Mechanism of Oxidative Stress by Vitamin B12 Deficiency using *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

美藤 友博 (Bito, Tomohiro)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号：20776421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は高齢者で多発するビタミンB12(B12)欠乏性神経障害の発症メカニズムを解明するために、B12欠乏症で誘発される著しい酸化ストレス障害の発症機構に着目した。モデル生物である線虫を用いて解析を行ったところ、B12欠乏症では抗酸化酵素の遺伝子発現ならびに酵素活性が著しく減少することが明らかになり、B12欠乏症では抗酸化系システムの破綻が著しい酸化ストレスを生じさせる原因であることが推察された。また、B12と寿命・老化の関連性を探索した結果、B12欠乏では特定の時計遺伝子が著しい発現変動を示すことが明らかになり、今後、B12と時計遺伝子の関連性を詳細に検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンB12(B12)欠乏症で誘発される酸化ストレス障害は抗酸化システムが破綻することで生じることが推察された。酸化ストレスと神経疾患の関連性が数多く報告されていることから、B12欠乏性神経障害の要因としてB12欠乏で誘導される酸化ストレスが一因であることが挙げられ、その発症機構を部分的に解いたことの学術的意義は大きい。またB12欠乏症の酸化ストレスは抗酸化物質(グルタチオンやビタミンC)を供給することで解消されるが、この結果はB12欠乏症において多量の抗酸化物質を摂取することは、真のB12欠乏症の症状を覆い隠すことに繋がる。医療現場等において非常に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of vitamin B12 (B12)-deficient neuropathy that occurs frequently in elderly people, this study focused on the mechanism of oxidative stress disorder induced by B12 deficiency. Analysis using the model organism *C. elegans* revealed that B12 deficiency results in significant decrease in gene expression and enzyme activity of some antioxidant enzymes. From these results, it was inferred that the failure of antioxidant system is the cause of leading severe oxidative stress in B12 deficiency. In addition, as the results of studying the relationship between B12 deficiency and lifespan or aging, it became clear that a specific clock gene shows remarkable expression fluctuation.

研究分野：食品科学、食品機能学

キーワード：ビタミンB12 酸化ストレス 線虫 *Caenorhabditis elegans*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水溶性ビタミンであるビタミン B₁₂ (B₁₂) は主に畜肉や魚貝類などの動物性食品に含まれており、我が国の食事摂取基準では推奨量 2.4 μg/日と極めて微量で有効である。生体内において、B₁₂ は B₁₂ 依存性酵素であるメチルマロニル CoA ムターゼならびにメチオニンシンターゼの補酵素として機能しており、分岐鎖アミノ酸や含硫アミノ酸代謝に関与する。近年、中高齢者において B₁₂ 欠乏症が多発しており、運動機能障害や重度の場合は神経障害により歩行が困難になり、老後の QOL を著しく低下させる。従って、超高齢社会の我が国において、B₁₂ 欠乏性神経障害や運動機能障害は極めて深刻な問題であり、B₁₂ 欠乏症の感度の良い診断法や予防法の検討が急務である。

これまでに、ヒトのモデル生物として広く用いられている線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において、ヒトを含む哺乳動物と同様に正常な生育に B₁₂ を要求することを明らかにした(引用文献)。また、B₁₂ 欠乏線虫は、顕著な平均寿命の低下や体内に酸化ストレスの指標である過酸化水素を蓄積させることなども明らかにしてきた(図 1)。

これらの研究結果を踏まえ、「B₁₂ 欠乏症」と「酸化ストレス」と「老化」の間で関連性を見出すことで、世界に先駆けて超高齢社会に突入した我が国の B₁₂ 欠乏性神経障害や運動機能障害の疾病予防・治療法の開発に貢献できるのではないかと考えられた。

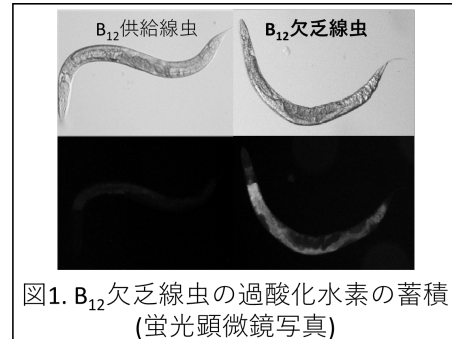


図1. B₁₂欠乏線虫の過酸化水素の蓄積 (蛍光顕微鏡写真)

2. 研究の目的

(1) B₁₂ 欠乏での酸化ストレス障害の発症機構について

これまでの研究において、B₁₂ 欠乏線虫では過酸化水素のほかに、活性窒素種やカルボニル化タンパク質含量の顕著な蓄積を示し、B₁₂ 欠乏では著しい酸化ストレス障害を誘発することが明らかになった。本研究では、B₁₂ 欠乏で誘発される著しい酸化ストレス障害の発症メカニズムを解明するために、B₁₂ 欠乏で特異的に発現が促進あるいは抑制される酸化ストレス産生・消去に関与する遺伝子を見出し、B₁₂ 欠乏が体内レドックス制御機構に及ぼす影響を分子レベルで検討することを目的とした。

(2) B₁₂ 欠乏が寿命調節機構に及ぼす影響

これまでに「高齢者」と「B₁₂ 欠乏症」については多くの研究者によって研究されているが、B₁₂ 欠乏症の詳細な発症要因については不明な点が多い。また、「B₁₂ 欠乏症」と「老化」の因果関係を示す知見がほとんど存在しない。B₁₂ 欠乏は著しい酸化ストレスを誘発することからも老化の促進因子や寿命短縮因子であることが推察され、生体内で B₁₂ が老化や寿命の制御機能を有している可能性が考えられた。老化研究のモデル生物である線虫を用いて、B₁₂ 欠乏が寿命・老化調節機構に及ぼす影響を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B₁₂ 欠乏が線虫体内レドックス制御機構に及ぼす影響

次世代シーケンサーを用いて、コントロール線虫 (B₁₂ 供与) と B₁₂ 欠乏線虫のレドックス制御に関連する遺伝子発現を比較し、B₁₂ 欠乏で応答する遺伝子を選抜した。特に、生体内レドックス制御機構において、重要な機能を果たす種々の酵素 (フリーラジカルの産生に関与する NADPH オキシダーゼ、細胞内で活性酸素の消去に関連するスーパーオキシドディスムターゼ、過酸化水素を分解するカタラーゼおよび抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ) に着目した。B₁₂ 欠乏で応答を示す酵素遺伝子を見出した場合、リアルタイム PCR 法にて、再現性の確認と遺伝子発現量の定量を試みた。生体内の抗酸化物質として、ビタミン C ならびにグルタチオン含量を HPLC 等で分析した。

(2) B₁₂ 欠乏が寿命・老化調節機構に及ぼす影響

本研究では線虫の寿命を成長期 (孵化から産卵まで)、産卵期 (産卵開始から産卵終了まで)、老齢期 (産卵終了から死まで) の 3 つに区分し、評価した。酸化ストレスを解消させた B₁₂ 欠乏線虫 (抗酸化物質: ビタミン C を添加した培地で生育させた) を調製し、B₁₂ 欠乏のみで応答する寿命や老化に関連する遺伝子の発現をリアルタイム PCR で分析した。

4. 研究成果

(1) B₁₂ 欠乏が線虫体内レドックス制御機構に及ぼす影響の解析

B₁₂ 欠乏が抗酸化酵素の遺伝子発現や酵素活性に及ぼす影響を検討した結果、B₁₂ 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較して、グルタチオン S-トランスフェラーゼの遺伝子発現が約 30% に著しく低下していた。しかし、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの遺伝子発現に顕著な変動は見られなかった。

一方、酵素活性においては、B₁₂ 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較して、スーパーオキ

シドディスムターゼ活性の約 50%およびカタラーゼ活性の約 30%の減少を示した。これらの結果から、 B_{12} 欠乏は抗酸化酵素の遺伝子発現レベルには大きな影響は及ぼさないが、抗酸化酵素活性には大きく影響することが推定される。特に、スーパーオキシドディスムターゼとカタラーゼは活性中心にマンガンや鉄を配位するため、体内の異常な酸化ストレスに求核攻撃を受けやすく、酵素活性低下を示しやすいことが考えられた。また、グルタチオンペルオキシダーゼ活性においては、 B_{12} 欠乏で約 1.8 倍の活性上昇を示したが、原因は不明であった。

体内抗酸化物質については、 B_{12} 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較し、還元型グルタチオン含量の約 30%の減少ならびにビタミン C 含量が約 50%の減少を示した。ビタミン C に関して、これまでに線虫のビタミン C 合成経路の解明が試みられているが、特定には至っていない(引用文献)。今後は、 B_{12} 欠乏がビタミン C 合成経路に及ぼす影響の解析も推進させる必要があると考えられる。以上の結果より、 B_{12} 欠乏では直接の原因は未解明だが、生体内の抗酸化物質を減少させることが、著しい酸化ストレス障害を誘発する原因の 1 つであることが明らかになった(図 2)。

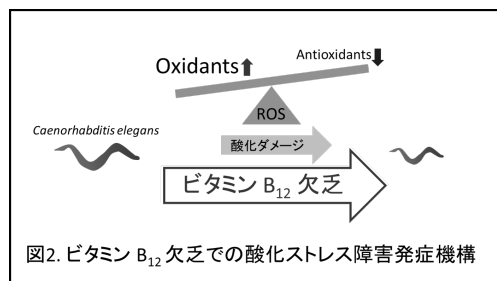


図2. ビタミン B_{12} 欠乏での酸化ストレス障害発症機構

(2) B_{12} 欠乏が寿命・老化調節機構に及ぼす影響

コントロール線虫と B_{12} 欠乏線虫の詳細な寿命を測定した結果、 B_{12} 欠乏では成長期と産卵期が顕著に延伸し、老齢期が著しく短縮し(図 3)、総合的に寿命を短縮させることが明らかになった。これらの現象は、抗酸化物質を用いて酸化ストレスを解消させた B_{12} 欠乏線虫でも寿命の内訳に大きな変化が見られなかったことから、 B_{12} 欠乏で特有で引き起こる現象であることが推定された(図 3)。特に、哺乳動物における B_{12} 欠乏症は、成長遅延を引き起こすことが報告されるため(引用文献)、本研究では哺乳動物に合致する表現型が得られた。

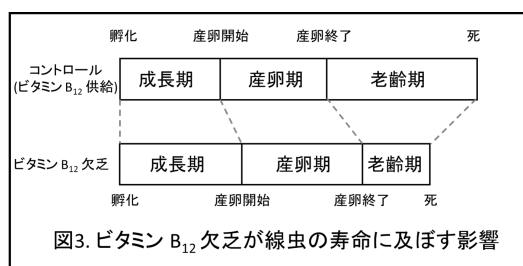


図3. ビタミン B_{12} 欠乏が線虫の寿命に及ぼす影響

続いて、 B_{12} 欠乏が寿命や老化への関連性が報告される遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した結果、*clk* 遺伝子(時計遺伝子)が B_{12} 欠乏で顕著に発現低下を示すことが明らかになった。また、抗酸化物質を用いて酸化ストレスを解消させた B_{12} 欠乏線虫では、*clk* 遺伝子の発現を回復させなかった。これらの結果から、 B_{12} 欠乏は生体リズムを破綻させることで寿命や老化に関連することが推定された。

また、本研究を推進させるにあたり、 B_{12} 欠乏が線虫の脂質代謝や産卵機能に様々な影響を及ぼすことを見出した。今後は、これら B_{12} 欠乏症で誘発される様々な症状の発症機構を詳細に検討する必要があると考えられる。

<引用文献>

- Bito T, et al (2013) FEBS Open Bio, 3, 112-117.
 Patananan AN, et al (2015) Archives of Biochemistry and Biophysics, 569, 32-44.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Tomohiro Bito, Taihei Misaki, Yukinori Yabuta, Takahiro Ishikawa, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe, Vitamin B_{12} deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*. Redox Biology, 査読有, vol. 11, 2017, DOI: 10.1016/j.redox.2016.10.013

[学会発表](計 15 件)

美藤友博, 後井俊哉, 岡本奈穂, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B_{12} 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の中性脂肪代謝に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.3

美藤友博, 後井俊哉, 真鍋若菜, 岡本奈穂, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B_{12} 欠乏が筋組織に及ぼす影響とその原因について, 日本農芸化学会中四国支部第 52 回講演会, 2018.9

岡本奈穂, 藤飛, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B_{12} 欠乏が線虫 (*C. elegans*) のコラーゲン代謝に及ぼす影響, 日本農芸化学会中四国支部第 52 回講演会, 2018.9

Naho Okamoto, Fei Teng, Tomohiro Bito, Yukinori Yabuta, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe, Effects of vitamin B_{12} deficiency on collagen protein in *Caenorhabditis*

elegans, 1st International Forum on Food Industry Science and Technology in Northeast Asia, 2018.9 (国際学会)

美藤友博, 真鍋若菜, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の筋組織に及ぼす影響, 日本ビタミン学会第 70 回大会, 2018.6
藪田行哲, 和田滉佑, 岡本奈穂, 美藤友博, 渡邊文雄, 線虫のビタミン C 生合成経路の解明, 日本ビタミン学会第 70 回大会, 2018.6

美藤友博, 岡本奈穂, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の S-アデノシルメチオニン関連代謝系に及ぼす影響, 第 59 回日本生化学会中国・四国支部大会, 2018.5

岡本奈穂, 藤飛, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏線虫のコラーゲン代謝異常の解析, 第 59 回日本生化学会中国・四国支部大会, 2018.5

岡本奈穂, 藤飛, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のコラーゲンタンパク質および運動機能に及ぼす影響, 第 72 回日本栄養・食糧学会大会, 2018.5

藪田行哲, 吉田佳代子, 美藤友博, 渡邊文雄, 線虫のカルボニル化合物レベルに及ぼすビタミン B₁₂ 欠乏の影響, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.3

美藤友博, 岡本奈穂, 森脇涼, 北村有子, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の生殖及び産卵機能に及ぼす影響, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018.3

岡本奈穂, 藤飛, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄, ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のコラーゲンタンパク質に及ぼす影響, 第 50 回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会, 2017.11

Suzumi Moriwaki, Tomohiro Bito, Yukinori Yabuta, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe, Effects of Vitamin B₁₂ Deficiency on Reproductive Function in *Caenorhabditis elegans*. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2017, 2017.11 (国際学会)

Naho Okamoto, Fei Teng, Tomohiro Bito, Yukinori Yabuta, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe, Effects of Vitamin B₁₂ Deficiency on Collagen Protein in *Caenorhabditis elegans*, International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2017, 2017.11 (国際学会)

Tomohiro Bito, Taihei Misaki, Yukinori Yabuta, Takahiro Ishikawa, Tsuyoshi Kawano, Fumio Watanabe, Cobalamin deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*, 21st International *C. elegans* Conference, 2017.6 (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。