

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580156

研究課題名（和文）ビタミン C 不足が老化や神経系、エネルギー代謝、脂質代謝に及ぼす影響

研究課題名（英文）Influence of vitamin C deficiency exerts on aging, nervous system, energy metabolism and lipid metabolism

研究代表者

半田 節子（HANDA SETSUKO）

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所・助手

研究者番号：30360697

研究成果の概要：カルニチンはβ酸化によりエネルギー（ATP）を得るため脂肪酸を細胞質からミトコンドリア内に運ぶ重要な因子である。カルニチンはタンパク質中のリシンとメチオニンから生合成されるが、この時ビタミン C が必須といわれている。本研究では、生体内でのカルニチン合成にビタミン C が必須であるか明らかにするため、ビタミン C を体内で合成できない遺伝子破壊（SMP30/GNL-KO）マウスを用いて実験を行った。このマウスを用いた *in vivo* および *in vitro* 実験からビタミン C が生体内のカルニチン生合成系に必須でないことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：ビタミン C、老化、SMP30、カルニチン、ノックアウトマウス、アスコルビン酸

1. 研究開始当初の背景

私たちは、プロテオーム解析により、加齢に伴い肝臓や腎臓で減少するたんぱく質 SMP30（日本名：加齢指標たんぱく質 30）を発見し、老化における重要性を明らかにしてきた。加齢変化を示すたんぱく質の多くは、ホルモンによる制御を受けており、雌雄で異なる増減傾向を示す。しかし、SMP30 はホルモンによる制御を受けず、雌雄共に加齢に伴い減少するのが特徴である。また、SMP30 の減少はヒトでも同じように起こっている。

SMP30 は加齢に伴い減少するが、長い間、生体内での役割・機能は不明であった。私た

ちは、米国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）の遺伝子データベースを用いた検索から、SMP30 が藍藻（藍色細菌とも呼ばれる細菌の一種）にある酵素、グルコノラクトナーゼ（GNL）と非常に良く似ていることを発見した。GNL は哺乳類でのビタミン C（VC）合成に重要な酵素である。世界中の研究者が、この酵素の本態を明らかにしようと試みてきたが、誰も成功していなかった。私たちは、SMP30 が GNL そのものであることを証明した。即ち、SMP30 (GNL) の遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し、VC を全く含まない餌でこのマウスを飼育した。その結果、発育が

止まり、VCを必要とするコラーゲン繊維構築不全のために骨の形成が悪くなって骨折し易くなるなど、人の壊血病（ビタミンC欠乏症）症状そのものを呈し、全て死亡した。また、VC投与によりこの症状は改善した。

壊血病で死んだからといって、VC欠乏が老化を促進したとはいえない。なぜならば、老化は病気ではないからである。壊血病は病気である。私たちは、SMP30/GNL 遺伝子破壊マウスをVCの少ないエサ（マウスが1日に必要とするVC量のわずか2.5%）で飼育した。その結果、普通のマウスより寿命が1/4に短縮することが分かった。

2. 研究の目的

カルニチンは β 酸化によりエネルギー（ATP）を得るため脂肪酸を細胞質からミトコンドリア内に運ぶ重要な因子である。脂肪酸はミトコンドリア膜を通過する前に酵素カルニチンアシルトランスフェラーゼの作用により細胞質内のアシルCoAがアシルカルニチンへと転換されてから、ミトコンドリアマトリックス内へと膜を通過する。カルニチンはアミノ酸のリシンとメチオニンから合成されるが、この時VCが必須であると報告されている。VCはカルニチン合成系の重要な酵素、トリメチルリシン水酸化酵素（TMLD）や γ -ブチロバチン水酸化酵素（ γ -BBD）の補酵素として働く。細胞内でカルニチンが不足すると脂肪酸がミトコンドリア内に運ばれなくなり、ATPが合成できない。また、脂肪酸が代謝されずに細胞内に蓄積してしまう。最近、脂肪の代謝を良くし痩せるため、カルニチンをサプリメントとして摂取する人が多くいる。しかし、私たちヒトは肝臓や腎臓で十分なカルニチンを合成できるためサプリメントとしての効果は少し懐疑的である。また、カルニチンの生合成にはVCが必須であるという報告からVCが不足した人では、細胞内でのカルニチンが減少している可能性も考えられる。カルニチンには脳機能を改善し、記憶力を高め、脳の老化を予防する効果も報告されている。従って、細胞内でのカルニチンの減少はATPの産生を減少させ、脳機能を衰退させて記憶力の低下を招くかも知れない。

そこで、本研究ではVC&カルニチン欠乏による脳機能への影響を明らかにするため、私たちがこれまでに開発したVCを合成できないSMP30/GNL 遺伝子破壊（SMP30/GNL-KO）マウスを用いて実験を行った。

3. 研究の方法

ヒトやサル、モルモットはVC合成の最後に位置する酵素、グルノ- γ -ラクトン酸化酵素（GLO）に遺伝子変異があるため、体内でVCを合成できない。しかし、マウスはGLOに

遺伝子変異がないため、体内でVCを合成できる。SMP30/GNLはGLOの1つ手前に位置する酵素である。従って、私たちが開発したSMP30/GNL 遺伝子破壊マウスはVCを合成できない。

SMP30/GNL 遺伝子破壊（SMP30/GNL-KO）マウス及び野生型（WT）マウスを4週齢で離乳後、VCとカルニチンを全く含まない餌（クレア特殊精製飼料）で飼育した。また、両マウスを飲料水からVC（マウスが1日に必要とするVC量：7mg）を与える群（VC(+)）と与えない群（VC(-)）の4群に分け、75日間飼育した。即ち、マウス群（各5匹）は①VC(+)SMP30/GNL-KO、②VC(-)SMP30/GNL-KO、③VC(+)WT、④VC(-)WTの4群である。この4群について各臓器、血液中の総VC（還元型アスコルビン酸+酸化型デヒドロアスコルビン酸）及び総カルニチン（遊離カルニチン+アシルカルニチン）、還元型グルタチオン量（GSH）を測定した。更に、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスから肝臓、腎臓ホモジネートを作製し、*in vitro*アッセイ系でカルニチン生合成へのVCの関与を検討した。

総VC濃度は検体を全て還元型VCに変えるため0.1% DTT処理後、HPLC-電気化学検出法を用いて定量した。また、総カルニチン濃度はカイノス社製総カルニチン定量キットを用いて測定した。更に、GSHはHPLC-吸光度法を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 体重変化

生体内でのカルニチン合成にVCが必須であるか明らかにするため、SMP30/GNL-KO及びWTマウスを4週齢で離乳後、VCとカルニチンを全く含まない餌で飼育した。また、両マウスを飲料水からVCを与える群（VC(+)）と与えない群（VC(-)）の4群に分け、75日間飼育した。VC(-)SMP30/GNL-KOマウスは離乳後40日目までVC(+)SMP30/GNL-KOマウスと同程度に体重が増加した。しかし、40日目以降VC(-)SMP30/GNL-KOマウスは次第に体重が減少しはじめ70日目ではVC(+)SMP30/GNL-KOマウスより32%も体重が少なかった。VC(+)SMP30/GNL-KOマウスの平均水摂取量は 3.6 ± 0.3 ml/日/マウス、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスは 3.2 ± 0.5 ml/日/マウスであり、両者で違いは見られなかった。実験期間中、VC(+)SMP30/GNL-KOマウスは体重増加量、平均水摂取量共にVC(+)WT、VC(-)WTと違いは見られなかった。

(2) VC欠乏後の組織中総VC、総カルニチン濃度

離乳後75日目、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスの大脳、小脳、肝臓、腎臓、ひらめ筋、長趾伸筋、心臓、血漿中における総VC濃度は

VC(+)SMP30/GNL-KOマウスに比べて2%以下であった。また、VC(+)SMP30/GNL-KOマウスの大脳、小脳、ひらめ筋、長趾伸筋、心臓の総VC濃度はVC(+)WT、VC(-)WTマウスとほぼ同程度であった。しかし、肝臓、腎臓、血清中の総VC濃度はWTマウスの約半分であった。

一方、離乳後75日目、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスの大脳、小脳、肝臓、腎臓、ひらめ筋、長趾伸筋、血清中における総カルニチン濃度は予想に反して4群の間で違いは全く見られなかった。また、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスの心臓におけるカルニチン濃度は、VC(+)SMP30/GNL-KOマウスに比べて59.1%であった。同様の違いはVC(-)WTとVC(+)WTマウスでも見られた。

(3) VC欠乏による尿中へのカルニチン排泄

Reboucheはモルモットで以前に報告されているVC欠乏による臓器、血液中カルニチン濃度の減少は腎臓からのカルニチン再吸収能力の低下によるためと報告した。そこでSMP30/GNL-KOマウスでも同様にVC欠乏による腎臓からのカルニチン再吸収能力の低下が起きているか調べた。その結果、離乳後30日目、80日目でのVC(-)SMP30/GNL-KO、VC(+)SMP30/GNL-KOマウスにおける24時間の尿中カルニチン排泄量に違いは見られなかった。また、VC(-)WT、VC(+)WTマウスとも尿中カルニチン排泄量に有意な違いは見られなかった。

(4) In vitroカルニチン生合成実験

VCがin vitroでカルニチン生合成を促進するか調べるため、離乳後75日間VCを欠乏させたVC(-)SMP30/GNL KOマウス肝臓と腎臓のホモジネイトを調製し、1 mM VCの有無によるin vitroアッセイ系でのカルニチン合成量を比較した。肝ホモジネイト中にはカルニチン生合成に必要な内在性酵素を全て含む。また、VCも検出限界以下であることを予め確認した。肝ホモジネイトを37°Cでインキュベートすることによりカルニチン量は60分まで経時的に増加し、それ以降、次第に減少した。また、肝ホモジネイト中1 mM VCの有無はカルニチン合成量に影響を与えなかった。一方、腎ホモジネイトを用いた時の37°Cインキュベートによるカルニチン合成量は全く変化がなかった。更に、このin vitroアッセイ系が確かにカルニチン合成を見ていることを確認するため、肝ホモジネイトを予め95°Cで5分間、加熱処理し、内在性酵素を失活させた。その後37°Cで120分までインキュベートしたが、カルニチン量の増加は見られなかった。従って、このin vitroアッセイ系は確かにカルニチン合成を見ていることが確認できた。

(5) VC欠乏後の組織中GSH濃度

離乳後75日目、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスの肝臓におけるGSH濃度はVC(+)SMP30/GNL-KO、VC(+)WT、VC(-)WTマウスに比べてそれぞれ44.5%、32.8%、30.8%増加していた。しかし、4群の間で有意差はなかった。一方、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスのひらめ筋、血漿におけるGSH濃度はVC(+)SMP30/GNL-KOマウスに比べてそれぞれ16.4%、45.5%減少していた。また、VC(-)SMP30/GNL-KOマウスの心臓におけるGSH濃度は他の3群と比較して変化はなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Kondo, Y., Sasaki, T., Sato, Y., Amano, A., Iwama, M., Handa, S., Shimada, N., Fukuda, M., Akita, M., Lee, J., Jeong, KS., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 291-296 (2008) 査読有
- ② Sato, Y., Kajiyama, S., Amano, A., Kondo, Y., Sasaki, T., Handa, S., Takahashi, R., Fukui, M., Hasegawa, G., Nakamura, N., Fujinawa, H., Mori, T., Ohta, M., Obayashi, H., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 346-50 (2008) 査読有
- ③ Furusawa, H., Sato, Y., Tanaka, Y., Inai, Y., Amano, A., Iwama, M., Kondo, Y., Handa, S., Murata, A., Nishikimi, M., Goto, S., Maruyama, N., Takahashi, R. and Ishigami, A. : Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: Verification in vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31 1673-1679 (2008) 査読有
- ④ Park, JK., Jeong, DH., Park, HY., Son, KH., Shin, DH., Do, SH., Yang, HJ., Yuan, DW., Hong, IH., Goo, MJ., Lee, HR., Ki, MR., Ishigami, A., and Jeong, KS. : Hepatoprotective effect of Arazyme on CCl₄-induced acute hepatic injury in SMP30 knock-out mice. *Toxicology* 256 132-142 (2008) 査読有
- ⑤ Ishigami, A. and Maruyama, N. : (REVIEW

- ARTICLE) Significance of SMP30 in Gerontology. *Geriatrics & Gerontology International* 7 316-325 (2007) 査読有
- ⑥ 古澤元、佐藤安訓、田中康一、井内陽子、天野晶子、岩間水輝、近藤嘉高、半田節子、村田晃、錦見盛光、後藤佐多良、丸山直記、高橋良哉、石神昭人：カルニチン生合成系へのビタミンCの関与. *ビタミン* 83 287-289 (2009) 査読有
- ⑦ 石神昭人：ビタミンC不足は慢性閉塞性肺疾患の発症リスクを高める. *ビタミン* 82 39-42 (2008) 査読有
- ⑧ 石神昭人：ビタミンCの不足が老化に及ぼす影響. *ビタミン* 81 303-308 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① 半田節子、島田信子、天野晶子、福田貢、近藤嘉高、丸山直記、石神昭人：マウス肝臓におけるSMP30/GNLの組織学的加齢変化. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会，神戸，2008.12.9-12
- ② 天野晶子、近藤嘉高、岩間水輝、佐藤安訓、半田節子、相垣敏郎、石神昭人：ビタミンC生合成経路で働く酵素グルコノラクトナーゼ (SMP30/GNL)の加齢変化. 第62回日本栄養・食糧学会，埼玉，2008.5.2-4
- ③ 天野晶子、島田信子、岩間水輝、福田貢、半田節子、丸山直記、相垣敏郎、石神昭人：ビタミンC欠乏によるSVCT1およびSVCT2発現調節の検討. 第60回日本ビタミン学会，仙台，2008.6.13-14
- ④ 古澤元、佐藤安訓、高橋良哉、石神昭人：生体内におけるカルニチン合成へのビタミンCの関与. 第128回日本薬学会，横浜，2008.3.26-28
- ⑤ 半田節子、久保幸穂、福田貢、丸山直記、石神昭人：デジタル老化説—マウス肝臓におけるSMP30の加齢変化—. 第30回日本基礎老化学会，札幌，2007.6.20-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半田 節子

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団

東京都老人総合研究所・助手

30360697

(2) 研究分担者

石神 昭人

東邦大学・薬学部・准教授

50270658

(3) 連携研究者