

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15767

研究課題名（和文）高齢者で多発するビタミンB12欠乏性運動機能障害の発症機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the cause of locomotor dysfunction caused by vitamin B12 deficiency in elderly

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ビタミンB12欠乏で生じる運動機能障害の原因を明らかにするために、ビタミンB12欠乏が筋組織に及ぼす影響を解析した。ビタミンB12欠乏線虫では筋組織を構成するアクチンならびにミオシン繊維に老化様の変化を見出した。その要因はビタミンB12欠乏で誘発される酸化ストレスがユビキチン・プロテアソーム系を活性化させることにより、筋組織の分解が促進されたと推定された。また、線虫の運動機能の低下は、表層コラーゲンの量・質の低下が部分的に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、高齢者で多発するビタミンB12欠乏症と加齢性筋萎縮症（サルコペニア）の関連性が垣間見れることより、サルコペニアの新しい予防・診断・治療法の開発に向け、本成果の社会的意義は極めて大きい。特にこれまでに報告がないビタミンB12欠乏による筋肉の分解系促進は加齢・老化の視点を取り入れ、解析を進めるべき課題であると考えられる。また、ヒト疾病のモデル生物を用いて酸化ストレスがコラーゲン分子間の変異を誘発する仕組みを解明した点についての学術的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：To clarify the cause of locomotor dysfunction caused by vitamin B12 deficiency, the effect of vitamin B12 deficiency on muscle in *Caenorhabditis elegans* was analyzed. In vitamin B12 deficient nematodes, we found aging-like changes in actin and myosin fibers that consist of muscle fibers. It was presumed that the ubiquitin-proteasome system, which promoted the decomposition of muscle tissue, was activated by the oxidative stress induced vitamin B12 deficiency. In addition, it was clarified that the locomotor dysfunction of vitamin B12-deficient *C. elegans* is partially related to the decrease of the quantity and quality in the surface collagen of nematodes.

研究分野：食品機能学

キーワード：ビタミンB12 *Caenorhabditis elegans* 酸化ストレス サルコペニア ロコモティブシンドローム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会を迎えた我が国では、持続可能な社会を構築するためにも「高齢者の健康維持」に関する基礎および応用研究は必須である。高齢者が自立した健全な生活を送り、介護を不要とする身体的な機能を維持することは必要不可欠であり、特に骨格筋は運動機能を担う主要な組織である。近年、ロコモティブシンドロームやサルコペニアと称される加齢に伴う筋肉の減少や衰弱は高齢者の QOL を顕著に悪化させるため、我が国においても重要な問題となっている。これら加齢に伴う筋萎縮を予防するためには、筋肉の合成・分解のバランスを適切に制御するための分子機構の解明やそれに及ぼす様々な因子に関する研究は極めて重要であり、持続可能な社会を構築するためにも急を要する。

(2) また近年、中高齢者において加齢に伴った胃の機能低下によりビタミン B<sub>12</sub> の消化・吸収ができ難い体質となり (ビタミン B<sub>12</sub> 吸収不良)、徐々にビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症を発症し、重度の神経機能障害や運動機能障害により歩行困難となることが明らかになっている。高齢者においては、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏性神経障害・運動機能障害も著しい QOL の低下を引き起こすために深刻な問題となっており、その予防法・治療法の開発に係る研究を推進させることが急務である。これまでのビタミン B<sub>12</sub> 欠乏哺乳動物を用いた研究では、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏過程では筋肉中のビタミン B<sub>12</sub> から有意に減少していくことは明らかにされているが、ビタミン B<sub>12</sub> と筋肉の詳細な関連性を示す知見はない。

### 2. 研究の目的

(1) 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は、体長約 1 mm ほどの非寄生性線虫で、生殖系、神経系、筋肉系、消化系など高等生物と同様な体制を有しており、様々な生命現象を解き明かすヒトのモデル生物として様々な研究分野で用いられている。当研究室では、この線虫のビタミン B<sub>12</sub> の要求性を明らかにし、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルとして活用している。これまでに本線虫を用いた研究で、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏により蓄積したホモシステインは生体内レドックス制御機構を破綻させ、酸化ストレスを著しく増大させることを明らかにした。

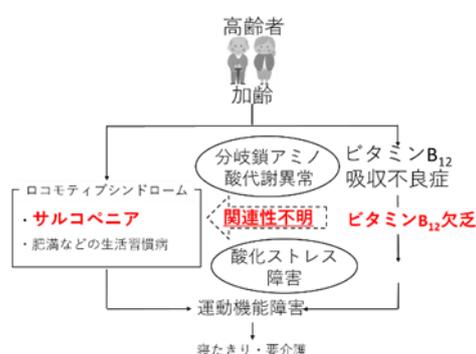


図1 本研究の目的

(2) 酸化ストレスは骨格筋のタンパク質の酸化を促進し、タンパク質分解酵素であるプロテアソームが活性化されることが報告される。本研究では、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫を用いて筋肉の合成系および分解系に及ぼす影響を解析し、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏が筋組織に及ぼす影響を明らかにすると共に高齢者で多発する加齢性筋萎縮症 (サルコペニア) との関連性を見出すことを目的にした(図 1)。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた線虫は M9 最小培地にビタミン B<sub>12</sub> を添加したビタミン B<sub>12</sub> 添加培地 (100 μg/L) または M9 最小培地 (ビタミン B<sub>12</sub> 無添加培地) で継代的に培養し、コントロール線虫ならびにビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫を調製した。線虫の運動機能を評価するために、水中でのむち打ち運動回数 (回/30 sec) を動画撮影し計測した。線虫のアクチンおよびミオシン関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で評価した。線虫のアクチンおよびミオシンタンパク質のタンパク質発現を確認するため、交差実績のある抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。線虫のアクチンおよびミオシン繊維の形態を確認するため、アクチン繊維のローダミン・ファロイジン染色ならびにミオシン抗体染色を行い、蛍光顕微鏡で観察・撮影を行った。ユビキチン抗体を修飾させたアフィニティービーズを用いて、ユビキチン化・ポリユビキチン化アクチンのタンパク質量を SDS-PAGE で評価した。

(2) 本研究を推進させる中で、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではコラーゲンの代謝異常が引き起こされており、そのコラーゲン代謝異常が線虫の運動機能に影響を及ぼしていることが推察された。線虫のコラーゲン量は線虫の加水分解溶液のヒドロキシプロリン量をアミノ酸分析機で測定することで評価した。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏がコラーゲンの質に及ぼす影響を解析するためにジチロシンならびに最終糖化産物 (AGEs) レベルを評価した。さらに、アルツハイマー病モデルを用いて、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏で誘発される酸化ストレスがアミロイド β の凝集にどのように関わってくるのか抗体染色法で評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 線虫において、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏で運動機能障害を呈するのか確認するために、水中でのむち打ち運動回数を評価した。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫では、コントロール線虫と比較し、約 20%の有意なむち打ち運動回数の減少を示した。また、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫にビタミン B<sub>12</sub> を供与した回復線虫ではコントロールレベルにまで有意なむち打ち運動回数の回復を示した。この結果は、線虫においてもビタミン B<sub>12</sub> 欠乏で運動機能障害を誘発させることが可能であることが推察された。

(2) リアルタイム PCR 法により、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏が筋組織の合成・分解に関与する遺伝子の遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、アクチンタンパク質を構成する遺伝子には大きな発現変動は見られなかったが、ミオシンタンパク質をコードする遺伝子の発現減少が確認された。また、アクチンならびにミオシンの多くの分解関連遺伝子の発現が顕著に上昇していた。これらの結果より、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ではアクチンならびにミオシンタンパク質の分解系がアップレギュレートされている可能性が示唆された(図 2)。

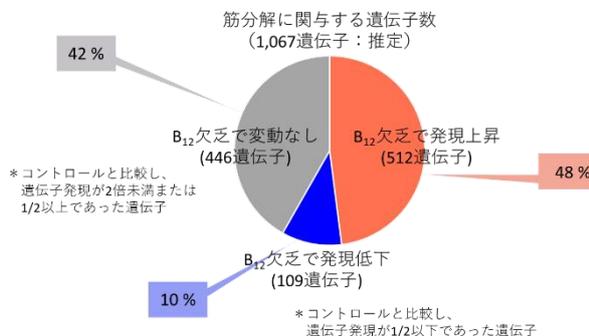


図2 筋肉の分解に関与する遺伝子の遺伝子発現

(3) 線虫の筋繊維の状態を確認するために、アクチンならびにミオシン繊維の蛍光観察を行った結果、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではコントロールと比較して、アクチン繊維に歪み・間隙が多い状態であることが明らかになった(図 3)。ミオシン繊維に関しては、アクチン繊維ほど顕著ではなかったが、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではミオシン繊維の歪みが多く観察された。これらの結果より、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏では筋繊維の形態学的異常を引き起こすことが明らかになった。また、本研究では3日齢の線虫を観察しているが、15日齢の老化線虫(コントロール条件下)でも同様の筋繊維の形態学的異常が見られた。さらに、老化が進むとミオシンタンパク質よりもアクチンタンパク質の方から分解され始めることが知られていることよりも、本研究において、アクチン繊維で損傷が強かった点を鑑みると、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏では早期に老化が促進されていることが推察された。

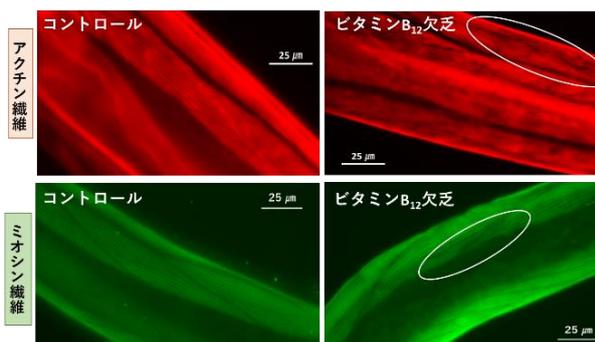


図3 アクチン・ミオシン繊維の蛍光観察

(4) ここまでの結果より、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫の筋繊維において、アクチン繊維が優先的に分解を受けていることが推定された。そこで筋繊維の分解系であるユビキチン-プロテアソーム系に着目した。ユビキチン抗体を修飾したアフィニティービーズを用いて、ユビキチン・ポリユビキチン化されたアクチンタンパク質を検出したところ、コントロールと比較しビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではユビキチン化アクチンタンパク質の増加傾向を示すものの、有意な増加は認められなかった(図 4)。今後はアクチン抗体アフィニティービーズを作成し、ユビキチン抗体で検出し評価する予定である。以上の結果より、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏による運動機能障害は老化促進により筋繊維の破綻(分解促進)が生じることが要因であることが推測された。ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏線虫の筋繊維の状態は、サルコペニアモデルの線虫(老化促進線虫)の筋繊維状態と非常によく似ていたことよりもビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症がサルコペニアの発症要因になりうることを推測された。

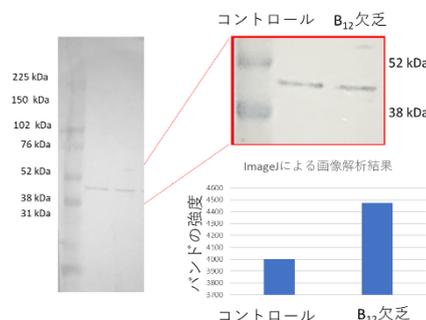
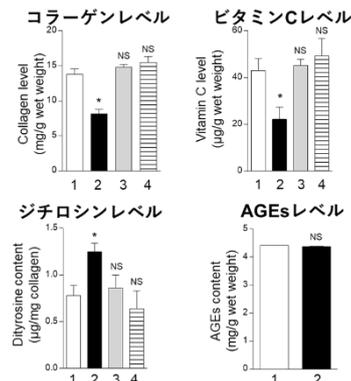


図4 ユビキチン化アクチンの検出

(5) 先行研究により、ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏では体内抗酸化物質(還元型ビタミン C ならびに還元型グルタチオン)の減少により、著しい酸化ストレス障害を誘発することを明らかにした。特にビタミン C はコラーゲン合成の補酵素として機能する点と、線虫はコラーゲン(表層)

を豊富に有す生物であり、コラーゲン遺伝子の欠損株で様々な運動機能の低下が報告されている点より、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏ではコラーゲン代謝異常を含め、コラーゲンの質の低下が推測された。アミノ酸分析ならびにビタミンC添加実験の結果、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏ではビタミンC(補酵素)の減少により、著しくコラーゲン量を低下させることが明らかになった。また、線虫コラーゲンの質の評価に用いられる AGEs ならびにジチロシン含量を分析した結果、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏はAGEs レベルには影響を及ぼさなかったが、ジチロシン含量はコントロール線虫の約2倍に増加した(Koseki *et al. International Journal of Molecular Sciences*, 22:12959, 2021)。一方、コラーゲン量ならびに質の低下はビタミンB<sub>12</sub>欠乏線虫の運動機能障害に及ぼす影響は小さかった。

(6) 線虫のコラーゲン分子間で生じるジチロシン架橋はヒトのコラーゲン中では生成されないことが明らかにされている。ヒトにおいて、ジチロシン架橋が形成されるのはアミロイドβの凝集時であるため、筋肉中でヒトのアミロイドβを発現させる遺伝子組換え線虫GMC101を用いて、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症がアルツハイマー病の発症要因になりうるのかを検討した。ビタミンB<sub>12</sub>欠乏GMC101株ではアミロイドβのタンパク質発現量は先行研究(Arif *et al. Antioxidants* 10:962, 2021)と同様に変化は示されなかったが、アミロイドβモノマー間のジチロシン架橋が顕著に増加していた。また、このアミロイドβ間のジチロシン架橋は抗酸化剤(ビタミンC)の添加で生成が抑制された。これらの結果より、ビタミンB<sub>12</sub>欠乏で誘発される酸化ストレスはアルツハイマー病の発症の促進因子になりうることを推察された(Koseki *et al. International Journal of Molecular Sciences*, 22:12959, 2021)。



1. コントロール線虫, 2. ビタミンB<sub>12</sub>欠乏線虫, 3. 回復線虫, 4. ビタミンB<sub>12</sub>欠乏線虫 + ビタミンC供与  
Mean ± SEM (n=3), \*p<0.05

図5 ビタミンB<sub>12</sub>欠乏がコラーゲン関連因子に及ぼす影響

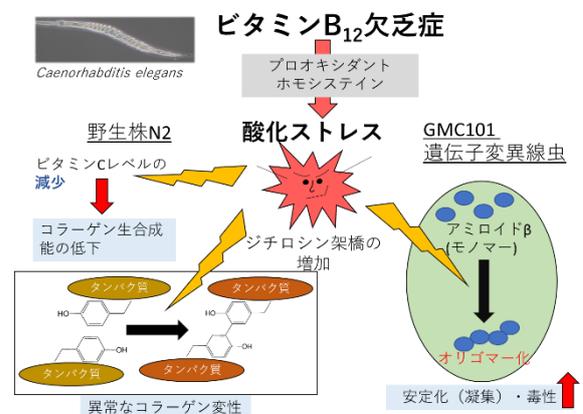


図6 ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症とアルツハイマー病発症の関連性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koseki Kyohei, Yamamoto Aoi, Tanimoto Keisuke, Okamoto Naho, Teng Fei, Bito Tomohiro, Yabuta Yukinori, Kawano Tsuyoshi, Watanabe Fumio	4. 巻 22
2. 論文標題 Dityrosine Crosslinking of Collagen and Amyloid- Peptides Is Formed by Vitamin B12 Deficiency-Generated Oxidative Stress in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312959	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 美藤友博, 真鍋若菜, 岡本奈穂, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄
2. 発表標題 ビタミンB12欠乏が線虫( <i>Caenorhabditis elegans</i> )の運動機能および筋組織に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Bito, Naho Okamoto, Yukinori Yabuta, Fumio Watanabe
2. 発表標題 Mechanisms of oxidative stress induced by vitamin B12 deficiency in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美藤友博, 岡本奈穂, 後井俊哉, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄
2. 発表標題 ビタミンB12欠乏が線虫( <i>C. elegans</i> )の脂質代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 第52回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------