

(様式第 1 4 号)

## 学 位 論 文 要 約

氏名: 美藤 友博

題目: Mechanisms of Metabolic Disorders and Memory/Learning  
Dysfunction Induced by Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency and Production of  
the Vitamin-Enriched Food for Preventing the Deficiency  
(ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症による代謝異常症と記憶・学習障害の発症メカニズムの  
解明および欠乏症予防のためのビタミンB<sub>12</sub>強化食品の開発)

本研究は、ビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) 欠乏症、特に神経障害の発症メカニズムを解明するために、ヒトのモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて B<sub>12</sub> 欠乏症モデルの調製を行った。線虫を B<sub>12</sub> 欠乏条件下で 5 世代 (15 日間) 生育させた時、体内 B<sub>12</sub> 含量が低下すると共に B<sub>12</sub> 依存性酵素メチルマロニル-CoA ムターゼ活性ならびにメチオニンシンターゼ活性が著しく減少し、B<sub>12</sub> 欠乏症の指標であるメチルマロン酸とホモシテイン (Hcy) が顕著に蓄積したことから、線虫が B<sub>12</sub> 欠乏状態であることが明らかになった。B<sub>12</sub> 欠乏線虫は著しい産卵数の減少と世代交代時間の増加を示し、B<sub>12</sub> 欠乏哺乳動物で報告されている不妊症や成長遅延と一致する結果を示した。また、新規な B<sub>12</sub> 酵素阻害剤 (B<sub>12</sub> ドデシルアミン誘導体) を開発し、線虫を極めて短期間 (3 日間) に B<sub>12</sub> 欠乏状態へ誘導させることにも成功した。以上の結果から、線虫が新規な B<sub>12</sub> 欠乏症モデルとして基礎医学の分野で哺乳動物の代替生物として活用できることを明かにした。

B<sub>12</sub> 欠乏性神経障害の発症メカニズムを解明するために、線虫の連合学習アッセイ法を用いて B<sub>12</sub> 欠乏線虫の記憶・学習能を評価した。その結果、B<sub>12</sub> 欠乏線虫は著しく記憶・学習能が低下していた。また、B<sub>12</sub> 欠乏線虫が著しい酸化ストレス障害を呈していたことから、酸化ストレス障害が記憶・学習能に及ぼす影響を検討するために、抗酸化物質を添加した条件下で B<sub>12</sub> 欠乏線虫を調製した。その結果、抗酸化物質の添加により B<sub>12</sub> 欠乏線虫の記憶・学習能の低下が約 50% に抑制された。さらに B<sub>12</sub> 欠乏線虫においてオルニチンの顕著な蓄積が新規に観察された。オルニチンは神経伝達関連物質ポリアミンの前駆体であることから、線虫体内のポリアミン量を測定したところ、B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではスペルミジンが著しく減少していた。B<sub>12</sub> 欠乏線虫では、生体内のメチル化反応の基質であり、ポリアミン合成に必須である S-アデノシルメチオニンが顕著に減少しており、これがスペルミジンの低下の原因であることを突き止めた。

以上の結果より、B<sub>12</sub> 欠乏性神経障害の発症要因は生体内のレドックス制御の破綻のみならず、生体内メチル化反応の低下が神経細胞膜のリン脂質組成を変化させることによる神経伝達異常、また Hcy およびポリアミン代謝異常が記憶保存に関与する受容体の

活性調節機構を攪乱することで学習機能を低下させるなど、複合的な要因が関与することを明らかにした。

本研究ではB<sub>12</sub>欠乏症の高い発症率を示す菜食主義者と高齢者に焦点をあて、B<sub>12</sub>欠乏症の発症を予防するためにB<sub>12</sub>強化野菜の開発を検討した。予備実験から、家畜の糞などを主原料とした有機肥料にはヒトで不活性なコリノイド化合物が含まれていたことから、B<sub>12</sub>産生能を有する紅色光合成細菌を主原料とする肥料でサラダ菜を栽培することでB<sub>12</sub>強化野菜の作成を検討した。その結果、使用した紅色光合成細菌の肥料においてもヒトで不活性なコリノイド化合物が含まれており、紅色光合成細菌を土壌ならびに葉面に施肥したサラダ菜からはB<sub>12</sub>を検出することはできなかった。そこで、効率的にB<sub>12</sub>強化野菜を調製するために植物工場で採用されている水耕栽培技術を用いて検討した。水耕栽培で生育したサラダ菜を収穫前24時間、種々な濃度のB<sub>12</sub>を添加した養液に曝露した時、養液中のB<sub>12</sub>濃度に応じてサラダ菜のB<sub>12</sub>含量は増加したが、養液中のB<sub>12</sub>濃度が5 μMの時サラダ菜のB<sub>12</sub>含量は飽和した。また、サラダ菜に含まれるB<sub>12</sub>の約86%が遊離型のB<sub>12</sub>として存在していることが明らかになった。これらの結果より、B<sub>12</sub>強化サラダ菜は菜食主義者や高齢者において吸収されやすい遊離型B<sub>12</sub>の供給源になることが示唆され、低濃度にB<sub>12</sub>が強化されたサラダ菜においては、1日に60 g程度を摂取することで、B<sub>12</sub>の推奨量(2.4 μg/日)を満たすと共に他のビタミンやミネラルならびに食物繊維質の補完にも機能すると考えられた。なお、一部図表等を割愛しています。