

(様式第 1 3 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 美藤 友博

題目: Mechanisms of Metabolic Disorders and Memory/Learning
Dysfunction Induced by Vitamin B₁₂ Deficiency and Production of
the Vitamin-Enriched Food for Preventing the Deficiency
(ビタミンB₁₂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B₁₂強化食品の開発)

本研究は、ビタミン B₁₂ (B₁₂) 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 B₁₂ 欠乏症モデルの調製を行った。線虫を B₁₂ 欠乏条件下で 5 世代 (15 日間) 生育させた時、体内 B₁₂ 含量が低下すると共に B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ 欠乏状態であることが明らかになった。B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ 酵素阻害剤 (B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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。

B₁₂ 欠乏線虫は著しく Hcy を体内に蓄積していたが、Hcy はジスルフィド結合を形成する過程で H₂O₂ やスーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素種を発生させることが知られている。そこで、酸化ストレス関連のバイオマーカーを検討したところ、B₁₂ 欠乏線虫では活性酸素種や活性窒素種の生成に関与する NADPH 酸化酵素と一酸化窒素合成酵素の活性が著しく上昇し、H₂O₂ や一酸化窒素化合物の顕著な蓄積が示された。一方、還元型グルタチオンなどの抗酸化物質やスーパーオキシドディスムターゼなどの抗酸化酵素の活性が著しく減少していた。また、B₁₂ 欠乏線虫では酸化ストレス障害の指標である過酸化脂質やカルボニル化タンパク質が顕著に増加していた。以上の結果から、B₁₂ 欠乏による Hcy の蓄積が生体内のレドックス制御の破綻を誘発させ、極めて著しい酸化ストレス障害を引き起こすことをはじめて明かにした。

B₁₂ 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 B₁₂ 欠乏線虫の記憶・学習能を評価した。その結果、B₁₂ 欠乏線虫は著しく記憶・学習能が低下していた。また、B₁₂ 欠乏線虫を B₁₂ 添加条件下で生育させた時、低下した記憶・学習能が完全に回復したことから、記憶・学習能の低下が B₁₂ の欠乏に起因する

ことが明らかとなった。また、B₁₂ 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（ビタミン E と還元型グルタチオン）を添加した条件下で B₁₂ 欠乏線虫を調製した。その結果、抗酸化物質の添加により B₁₂ 欠乏線虫の記憶・学習能の低下が約 50%に抑制された。以上の結果から、B₁₂ 欠乏線虫の記憶・学習能の低下は、酸化ストレスとそれ以外の要因で引き起こされることをはじめて明らかにした。本研究結果は、ヒトにおいて抗酸化物質の積極的な摂取が B₁₂ 欠乏性神経障害の症状を顕著に軽減させる可能性を示唆している。

B₁₂ 欠乏性神経障害の酸化ストレス以外の発症要因を特定するために、B₁₂ 依存性酵素が関与するアミノ酸代謝に着目した。B₁₂ 欠乏ラット等で報告されている分岐鎖アミノ酸やメチオニンの代謝異常以外に、B₁₂ 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、B₁₂ 欠乏線虫ではスペルミジンが著しく減少していた。B₁₂ 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。

これらの結果より、B₁₂ 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 B₁₂ 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、B₁₂ 欠乏症の発症を予防するために B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ を検出することはできなかった。そこで、効率的に B₁₂ 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 B₁₂ を添加した養液に曝露した時、養液中の B₁₂ 濃度に応じてサラダ菜の B₁₂ 含量は増加したが、養液中の B₁₂ 濃度が 5 μM の時サラダ菜の B₁₂ 含量は飽和した。また、サラダ菜に含まれる B₁₂ の約 86% が遊離型の B₁₂ 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、B₁₂ 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 B₁₂ の供給源になることが示唆され、低濃度に B₁₂ 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、B₁₂ 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。