

(様式第 13号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 小関 喬平

題目: Characterization of folate and vitamin B₁₂ compounds in foods and the mechanisms of oxidative stress generation caused by the nutritional status of these vitamins
(食品中の葉酸とビタミンB₁₂化合物の特徴とこれらビタミンの栄養状態によって生じる酸化ストレス発生メカニズム)

硫黄含有アミノ酸であるホモシステインは、主にメチオニンの脱メチル化によって形成され、チオール化合物の代謝経路における重要な化合物である。ホモシステインの蓄積は活性酸素種の生成を促す。また、ホモシステインは心血管疾患やアルツハイマー病などの脳血管疾患の危険因子である。ホモシステインレベルの上昇は、葉酸とビタミン B₁₂ (B₁₂) を摂取することで低下させることができ、これらの疾患の発症リスクを軽減する。そのため食品中の葉酸化合物や B₁₂ の正確な定量及び葉酸と B₁₂ の栄養状態が生体に及ぼす影響を解明することは非常に重要な課題である。

まず初めに、日本食品標準成分表において採用されている微生物学的定量法(バイオアッセイ法)の分析精度について検討を行った。バイオアッセイ法に使用される *Lactobacillus rhamnosus* 野生型株及びクロラムフェニコール耐性株のプテロイルモノグルタミン酸およびプテロイルジグルタミン酸に対する生育度の違いを検討した。クロラムフェニコール耐性株の生育度は、様々な濃度においてプテロイルジグルタミン酸よりもプテロイルモノグルタミン酸で大きいことを明らかとした。そのため、バイオアッセイ用のサンプルを調製する際にプテロイルジグルタミン酸を最終生成物とするニワトリ臍臓由来の葉酸コンジュガーズを使用する場合、プテロイルジグルタミン酸を標準葉酸として使用すべきことを、実際に種々の食品を分析することで明らかとした。

B₁₂ は、一部の細菌と古細菌のみが生合成するため、動物性食品にのみ含有されるが、一部の藻類は外因性 B₁₂ を取り込む。ヒトサプリメントとして市販されている緑藻類のクロレラは製品ごとに含有される B₁₂ レベルは大きく異なる。また、クロレラは B₁₂ と代謝を共役する葉酸も多く含有される。そこで、クロレラ錠剤の B₁₂ と葉酸含量に相関性があるかについてクロレラ錠剤 13 種類を用いて検討した。その結果、クロレラ錠剤に含まれる B₁₂ 含有

量は製品間で大きく異なったが、葉酸レベルは製品間で差は少なかった。B₁₂を特に多量に含有する錠剤を除いた場合にはB₁₂と葉酸含量の間に弱い相関(R = 0.39)が示された。また、これらのクロレラ錠剤の総葉酸量の平均値は、約 1.3 mg/100 g 乾燥重量であり、主要な葉酸化合物は5-メチル-テトラヒドロ葉酸(約30%)とテトラヒドロ葉酸(約27%)であった。

ある種の食品には、ヒトにとって生理的に不活性な Pseudovitamin B₁₂ などが含まれていることが報告されている。そのため、様々な食品に含まれる B₁₂ 化合物の特徴を検討することは重要な課題である。小型のエビの食用内臓には B₁₂ コリン環のプロピオンアミド側鎖が修飾された B₁₂-*d*-モノカルボン酸及びジカルボン酸が含まれていることが報告されている。そこで6種類の B₁₂ モノおよびジカルボン酸を調製して、大型のエビやカニの内臓及び牛・豚・鶏の肝臓に含まれる B₁₂ 化合物を同定した。その結果、大型のエビやカニの内臓には B₁₂-*b*-、*-d*-、および *-e*-モノカルボン酸と B₁₂-*be*-ジカルボン酸が含まれていた。一方、牛、豚、鶏の肝臓には B₁₂ が主要(約 90 %)に含まれていたが、ヒトにとって生理的に不活性な B₁₂ 化合物を約 10%程度含むことを明らかとした。

サプリメント等に含まれる酸化型葉酸は、天然の食品に存在する還元型葉酸よりも生体利用率が高い。そのため、胎児の神経管閉鎖障害の発症リスクの軽減のために、穀物への酸化型葉酸の強化政策が 80 カ国以上で施行されている。しかし、高用量の酸化型葉酸の長期的な摂取の影響が懸念される。そこで、高容量の葉酸の補給が生体に及ぼす影響について *Caenorhabditis elegans*(線虫)を用いて解析した結果、高容量の酸化型葉酸の摂取はホモシステインの蓄積を誘導することで、酸化ストレスを引き起こし、葉酸欠乏と同様な代謝異常を発症させることを明らかとした。また B₁₂ 欠乏線虫では、線虫表皮の主成分であるコラーゲンの生合成が障害を受けた太短い表現型の線虫が発生することが報告されている。そこで、その変異体の発症機構を検討した結果、B₁₂ 欠乏により生成した活性酸素種が線虫体内のコラーゲン合成酵素の補酵素であるビタミン C のレベルを低下させることで、コラーゲンの生合成量を減少させた。また、コラーゲン間のジチロシン架橋の形成を促進させコラーゲンを変質させた。また活性酸素種によって形成されるジチロシン架橋はアルツハイマー病の発症に関与するアミロイド β オリゴマーの形成に関与している。そこで、ヒトアミロイド β を筋肉内で発現する変異体線虫を用いて、B₁₂ 欠乏がアルツハイマー病の発症に関与するか検討した結果、B₁₂ 欠乏がアミロイド β オリゴマーの形成を促進させることを明らかとした。