

## 学位論文審査の結果の要旨

### Summary of Doctoral Dissertation Examination

氏 名/Name	小関 喬平
審査委員 Examining Committee	Chief Examiner 渡邊 文雄 (署名) 主 査 <small>signature</small>
	Assistant Examiner 石川 孝博 (署名) 副 査 <small>signature</small>
	Assistant Examiner 小崎 紳一 (署名) 副 査 <small>signature</small>
	Assistant Examiner 藪田 行哲 (署名) 副 査 <small>signature</small>
	Assistant Examiner 美藤 友博 (署名) 副 査 <small>signature</small>
題 目 Title	<p>Characterization of folate and vitamin B<sub>12</sub> compounds in foods and the mechanisms of oxidative stress generation caused by the nutritional status of these vitamins</p> <p>(食品中の葉酸とビタミンB<sub>12</sub>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)</p>
<p>含硫アミノ酸であるホモシステインは、メチオニン代謝経路の重要な代謝中間体である。生体内で高濃度にホモシステインが蓄積すると活性酸素種の生成が促進され、脳血管疾患などの発症に関連すると考えられている。葉酸やビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) の摂取不足は体内のホモシステインレベルを上昇させ、これら疾患の発症リスクを高める。そのため食品中の葉酸や B<sub>12</sub> の正確な定量法の確立と葉酸と B<sub>12</sub> 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と考えられる。</p> <p>食品に含まれる葉酸の分析は、微生物学的定量法が我が国の公定法として採用されている。葉酸分析の定量菌として <i>Lactobacillus rhamnosus</i> の野生株とクロラムフェニコール耐性株が広く用いられているが、野生株と抗生物質耐性株で食品中に含まれる葉酸の分子種により生育度に相違があることを初めて証明した。また、食品中の葉酸はポリグルタミン酸型葉酸であり、分析の前処理として葉酸コンジュガーズを作用させ、モノグルタミン酸型葉酸に変換しなければいけない。従来分析に用いられている葉酸コンジュガーズは粗酵素標品であるため比活性が低く、反応に長時間を要する。そこで、ヒト小腸由来の葉酸コンジュガーズを遺伝子組替え酵素として大量に調製することで、分析時間を大幅に短縮することに成功した。また、牛乳由来の葉酸結合タンパク質を用いて食品抽出液から葉酸化合物を簡便に精製する方法も考案し、食品に含まれる多種類の還元型葉酸の定量法の開発に成功した (第2章)。</p> <p>B<sub>12</sub> は一部の細菌と古細菌のみが生合成能を有し、食物連鎖と生物濃縮を経て動物性食品に主に含有される。先行研究では、一部の食品にヒトにとって生理的に不活性な擬似 B<sub>12</sub> 化合物 (シユード B<sub>12</sub> や B<sub>12</sub> カルボン酸など) が含有されていることが報告されている。我が国において主要な B<sub>12</sub> の供給源である魚介類や牛・豚・鶏の肝臓に多種類の擬似 B<sub>12</sub> 化合物が含まれているかどうかを質量分析を用いて精密に分析した (第3章)。エビやカニの内蔵には B<sub>12</sub>-b、-d、および -e-モノカルボン酸と B<sub>12</sub>-be-ジカルボン酸が多量に含まれていることを明らかにした。一方、肝臓では B<sub>12</sub> が主要な割合を占めていたが、多種類の擬似 B<sub>12</sub> が約 10%程度含まれていることを初めて明らかにした。第2章と第3章で検討した分析法は、食品中に含まれる両ビタミンの正確な栄養価を決定するのに有効な方法であると評価した。</p>	

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 カ国以上で実施されている。サプリメントや強化食品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化学的に安定であり、生体利用率が高いことが知られている。しかし、ライフステージを通して高用量の酸化型葉酸の長期的な世代を超えた摂取が健康に及ぼす影響に関する知見はない。そこで、高容量葉酸の世代を超えた長期的な摂取が生体に及ぼす影響を *Caenorhabditis elegans* (線虫) を用いて解析した (第 4 章)。その結果、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発し、葉酸欠乏と同様な酸化ストレス障害と代謝異常障害を引き起こすことを世界で初めて明らかにした。また、 $B_{12}$  欠乏が生体に及ぼす影響について  $B_{12}$  欠乏線虫を用いて検討した結果、 $B_{12}$  欠乏により生成した活性酸素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 レベルを低下させることでコラーゲンの生合成量を著しく減少させると共に、活性酸素はコラーゲンを変質させた。このコラーゲンの変質に関与するジチロシン架橋の形成促進は、アルツハイマー病の発症に関与するアミロイド  $\beta$  のオリゴマー形成にも関与している。そこで、ヒトアミロイド  $\beta$  を筋肉内で発現する変異体線虫を用いて検討した結果、 $B_{12}$  欠乏がアミロイド  $\beta$  のオリゴマー形成を促進させるという新しい知見を見出した (第 4 章)。

以上の新規な研究成果から、本論文は優れた学位論文として高く評価できると判定した。