

氏 名 (本国籍)	伊 佐 保 香 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 426 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Methionine Metabolism and <i>S</i> -Adenosylhomocysteine Hydrolase Activity in Vitamin B <sub>6</sub> -deficient Rats (ビタミン B <sub>6</sub> 欠乏ラットにおけるメチオニン代謝と <i>S</i> -adenosylhomocysteine hydrolase 活性に関する 研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 早 川 享 志 副査 岐阜大学 教授 山 内 亮 副査 静岡大学 教授 杉 山 公 男 副査 信州大学 助教授 橋 本 博 之

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

ビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) は主にアミノ酸代謝酵素の補酵素として作用することが知られており、メチオニン代謝においては cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) と  $\gamma$ -cystathionase の補酵素として作用する。B<sub>6</sub> 欠乏においては CBS と  $\gamma$ -cystathionase の活性低下によりメチオニン代謝異常を惹き起こすことが報告されており、組織での *S*-adenosylhomocysteine (SAH) の蓄積はそのひとつである。SAH の代謝に関与する SAH hydrolase は可逆酵素であり、通常ホモシステイン (Hcy) とアデノシン (Ado) から SAH を合成する反応が優位であるが、生体内では Hcy と Ado に加水分解される反応が優位である。これまでに SAH hydrolase の SAH 合成活性の上昇が B<sub>6</sub> 欠乏ラットの肝臓で観察されているが、SAH の蓄積との関連については明らかにされていない。そこで本研究の目的は、B<sub>6</sub> 欠乏ラットでの SAH の蓄積メカニズムを SAH hydrolase の活性変化を中心に明らかにすることとした。

Chapter 1: ラット (Wistar/ST, 雄, 4 週齢) は 70% カゼイン食 (B<sub>6</sub> フリー) にて 5 週間飼育を行い、B<sub>6</sub> 欠乏ラットを作成した (B<sub>6</sub>-def. 群)。また Control 群, Pair-fed Control 群 (P.F. 群) は B<sub>6</sub> を含む 70% カゼイン食で飼育した。ラットは体重増加の抑制, 尿中キサンツレン酸排泄量の増加, 血漿 PLP 濃度の低下より B<sub>6</sub> 欠乏状態であることを確認した。また摘出した肝臓の SAH hydrolase 活性を SAH 合成活性と分解活性の両方向にて測定を行ったところ, B<sub>6</sub>-def. 群の SAH 合成活性は他の群よりも有意に高値を示した。一方, SAH 分解活性及び SAH hydrolase mRNA の発現量は各群間に有意な差は見られなかった。これらより B<sub>6</sub> 欠乏ラットで見られた

SAH 合成活性の上昇は、SAH 合成活性の特異的な上昇によると考えられた。

Chapter 2: B<sub>6</sub> 欠乏ラットにおいて特異的に SAH 合成活性の上昇を惹き起こす要因を探するため、Chapter 1 において見られた血漿 Hcy 濃度の上昇に注目した。血漿 Hcy 濃度が上昇した状態で血漿 SAH の蓄積が報告されているが、SAH 合成活性の上昇によるかは明らかではない。そこで過剰な Hcy が SAH 合成活性の変化に影響を与えるか *in vivo* と *in vitro* において調べた。*in vitro* の実験において、様々な濃度の Hcy を抽出した酵素液に添加してプレインキュベートした後、SAH 合成活性を測定したが有意な変化は見られなかった。またラットに Hcy を静脈投与して血漿 Hcy 濃度を上昇させた *in vitro* の実験において、SAH 合成活性は上昇した Hcy レベルの影響は受けなかったが、肝臓の SAH の蓄積が確認できた。以上のことより血漿 Hcy 濃度が高い状態において、Hcy が SAH 合成活性を変えることなく SAH の蓄積を惹き起こすことが明らかとなった。

Chapter 3: SAH hydrolase は同一のサブユニットからなる 4 量体であり、各サブユニットは NAD<sup>+</sup> と固く結合している。この NAD<sup>+</sup> の酸化還元状態の変化により SAH hydrolase 活性が調節されていることが報告されている。またリン酸の存在により SAH 合成活性が上昇する報告もある。これらより NAD<sup>+</sup> の酸化還元状態の変化とリン酸の存在が B<sub>6</sub> 欠乏ラットで見られる SAH 合成活性を特異的に上昇させる要因であるか調べた。Control 群、P.F. 群 および B<sub>6</sub>-def. 群 (実験条件は第 1 章と同様である) のラットの肝臓を摘出し、その酵素抽出液から SAH hydrolase のアポ酵素を作成し、NAD<sup>+</sup> の酸化還元状態が SAH 合成活性に与える影響を調べた。アポ酵素は NAD<sup>+</sup> と再構成した後、SAH 合成活性の測定を行った。さらに酵素抽出液は、リン酸緩衝液と Tris-Hepes 緩衝液環境下で SAH 合成活性を比較した。アポ酵素の SAH 合成活性は 3 群間に有意な差は見られなかったが、NAD<sup>+</sup> と再構成した後の SAH 合成活性は、B<sub>6</sub>-def. 群が最も高値であった。またリン酸緩衝液と Tris-Hepes 緩衝液環境下における SAH 合成活性はリン酸緩衝液の方が有意に高値であり、Tris-Hepes 緩衝液条件下に対するリン酸緩衝液条件下での SAH 合成活性の比は B<sub>6</sub>-def. 群が最も高かった。これらの結果より結合する NAD<sup>+</sup> の酸化還元状態の変化、NAD<sup>+</sup> 結合能の変化、リン酸の存在などが B<sub>6</sub> 欠乏ラットにおいて SAH hydrolase の SAH 合成活性を特異的に上昇させていることが予測された。

本研究では、B<sub>6</sub> 欠乏ラットで観察される SAH の蓄積は SAH hydrolase 自身の増加によるものではなく、SAH hydrolase の SAH 合成活性の特異的な上昇により惹き起こされることが明らかになった。さらに B<sub>6</sub> 欠乏ラットで見られた血漿 Hcy の上昇は、今回の実験条件下においては SAH 合成活性を増加させる一因ではないと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ビタミン B<sub>6</sub> (B<sub>6</sub>) は主にアミノ酸代謝酵素の補酵素として作用することが知られており、メチオニン代謝においては cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) と  $\gamma$ -cystathionase の補酵素として作用する。B<sub>6</sub> 欠乏においては CBS と  $\gamma$ -cystathionase の活性低下によりメチオニン代謝異常を惹き起こすことが報告されており、組織での S-adenosylhomocysteine (SAH) の蓄積はそのひとつである。本研究では、B<sub>6</sub> 欠乏ラットでの SAH の蓄積メカニズムを SAH hydrolase の活性変化を中心に研究を行ったものである。

(1) ラットは 70% カゼイン食にて 5 週間飼育後、B<sub>6</sub> 欠乏試料を与えた群では B<sub>6</sub> 欠乏状態であることを確認した。肝臓の SAH hydrolase の SAH 合成活性は B<sub>6</sub> 欠乏群で他の群よりも有意に高値であったが、SAH 分解活性は各群間で有意な差は見られなかった。ま

た SAH hydrolase の mRNA の発現にも各群間に差が見られなかったことより、B<sub>6</sub> 欠乏ラットで見られる SAH の蓄積は SAH 合成活性の特異的な上昇によることを初めて指摘した。

(2) SAH 合成活性の特異的な上昇を惹き起こす要因を調べるため、肝臓 SAH hydrolase 抽出液に対するホモシステインの影響をみた *in vitro* の実験とラットにホモシステインを静脈投与して酵素活性の変化を調べる *in vivo* の実験を行った。両実験から、ホモシステイン自体が SAH hydrolase に対して SAH 合成活性を特異的に上昇させる因子ではないことを示した。

(3) SAH hydrolase の活性調節因子である NAD<sup>+</sup>とこれまでに SAH 合成活性を上昇させる因子として報告されているリン酸に注目し、B<sub>6</sub> 欠乏で見られる SAH 合成活性の特異的な上昇へのこれらの関与を調べた。アポ SAH hydrolase と NAD<sup>+</sup>再構築時、B<sub>6</sub> 欠乏群の活性が有意に高値であった。しかしアポ酵素活性は各群間で有意差がなかったことより NAD<sup>+</sup>との結合性の違いが考えられた。また NAD<sup>+</sup>と再構築後の SAH hydrolase 活性は元の活性より低かったことより NAD<sup>+</sup>の酸化還元状態の関与が考えられた。次にリン酸の存在が SAH 合成活性上昇に関与しているか調べるため、リン酸の有無による活性の比較を行った。B<sub>6</sub> 欠乏群の SAH hydrolase 活性はリン酸存在下において活性の上昇が他の群よりも大きかったことより、B<sub>6</sub> 欠乏ラットではリン酸が SAH 合成活性の上昇に関与している可能性が示唆された。

以上により、B<sub>6</sub> 欠乏ラットで観察される SAH の蓄積は SAH hydrolase 自身の増加によるものではなく、SAH 合成活性の特異的な上昇により惹き起こされることを初めて明らかにした。更に、B<sub>6</sub> 欠乏ラットで観察される血漿ホモシステインの上昇は、今回の実験条件下においては SAH 合成活性を増加させる因子ではないことも明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 【学位論文の基礎となる学術論文】

1. Isa Y, Tsuge H, Hayakawa T. Effect of Vitamin B<sub>6</sub> Deficiency on *S*-Adenosylhomocysteine Hydrolase Activity as a Target Point for Methionine Metabolic Regulation. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52(5): 2006 (in press).
2. Isa Y, Mishima T, Tsuge H, Hayakawa T. Increase in *S*-Adenosylhomocysteine Content and its Effect on the *S*-Adenosylhomocysteine Hydrolase Activity under Transient High Plasma Homocysteine Levels in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52(6): 2006 (in press).

#### 【既発表論文】

1. 伊佐保香, 柿内明子, 早川享志, 佐々木昌子, 新澤佳代, 鈴木久美子, 戸谷誠之, 柘植治人 日本人の母乳中ビタミン含量 *Vitamins(Japan)*, 78(9): 437-440 (2004).