

氏 名 (本 国 籍)	劉 穎 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 5 7 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 4 年 3 月 1 3 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	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Roles of Folate and Betaine in the Metabolism of Homocysteine (ホモシステイン代謝における葉酸とベタインの役 割に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教 授 森 誠 副査 静岡大学 教 授 杉 山 公 男 副査 岐阜大学 教 授 早 川 享 志

論 文 の 内 容 の 要 旨

本学位論文は、ホモシステイン (Hcy) 代謝における葉酸とベタインの役割をラットを実験動物として用いて明らかにしようとしたものである。Hcy はメチオニン (Met) 代謝の中間体であるが、高 Hcy 血症は動脈硬化の独立した危険因子として認識されている。Hcy の代謝にはシスタチオニン合成と Met への再メチル化がある。再メチル化には葉酸関与とベタイン (Bet) 関与の二つがあるが、両者の独自の役割と相補性について必ずしも明確ではない。本研究は、Hcy 代謝における葉酸とベタインの役割を明らかにするために、葉酸欠乏による高 Hcy 血症に及ぼすベタインおよびコリンの効果を調べるとともに、コリン欠乏による高 Hcy 血症に及ぼす葉酸の効果を検討した。

第 1 章では、葉酸欠乏による高ホモシステイン血症に及ぼすベタインおよびコリンの効果を検討している。実験 1 では、葉酸欠 10%カゼイン食 (10C) と 20%カゼイン食 (20C) に Bet を比較的多量 (1%) に添加してその効果を検討した。6 週齢の Wistar 系雄ラットを実験動物として用いた。10%カゼイン食 (10C)、葉酸を除いた 10%カゼイン食 (10CFD)、10CFD + 1%Bet、20%カゼイン食 (20C)、葉酸を除いた 20%カゼイン食 (20CFD)、20CFD + 1%Bet の各食餌をラットに 4 週間自由摂取させた。飼育終了後、血漿と肝臓を採取し、血漿 Hcy 濃度、肝臓の Met 代謝中間体濃度、Hcy 代謝酵素活性などを測定した。血漿 Hcy 濃度は葉酸欠乏により上昇したが、10CFD 群では 20CFD 群に比べて有意に高い値を示した。10C と 20C での葉酸欠による血漿 Hcy 濃度の上昇は Bet の添加で有意に抑制されたが (Bet 添加で葉酸欠による血漿 Hcy の上昇は

10C の場合で 48.5%抑制され、20C の場合で 69.7%抑制された)、その効果は部分的あるいは限定的であった。葉酸欠乏により肝臓 5-メチルテトラヒドロ葉酸(5-MTHF)濃度とメチオニン合成酵素(MS)の低下が見られた。また肝臓 Bet 濃度の低下と Bet-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ(BHMT)の阻害剤として知られるジメチルグリシン(DMG)濃度の上昇も見られ、肝臓 DMG 濃度と血漿 Hcy 濃度の間に有意な正の相関が示された。これらの結果は、葉酸欠乏による肝臓 DMG 濃度の上昇は BHMT 反応を阻害し、Bet の効果を減少させることを示唆している。本実験で得られた結果は、葉酸欠乏は MS 経路だけではなく BHMT 経路での Hcy 代謝も阻害するという考え方を支持する重要な証拠である。

実験 2 では、葉酸欠 20C による高 Hcy 血症に及ぼすコリン欠(Bet 欠)の影響を検討した。20C、コリンを除いた 20%カゼイン食(20CCD)、20CFD、コリンを除いた 20CFD(20CFDCD)をラットに 4 週間自由摂取させた。20C からコリンを除いても血漿 Hcy の上昇は見られなかったが、葉酸欠 20C からコリンを除くと血漿 Hcy 濃度と肝臓 DMG 濃度は顕著に上昇した、実験 1 と同じように、肝臓 DMG 濃度と血漿 Hcy 濃度の間に有意な正の相関も見られた。また葉酸欠 20C からコリンを除くと、肝臓の S-アデノシルメチオニン(SAM)と Bet 濃度は有意に低下し、肝臓の S-アデノシルホモシステイン(SAH)と Hcy 濃度は顕著に上昇した。肝臓の MS 活性とシスタチオニン β -シンターゼ(CBS)活性も顕著的に低下した。これらの結果は、葉酸欠とコリン欠は相乗的に肝臓の Met 代謝中間体濃度、Hcy 代謝酵素活性などに影響を与え、血漿 Hcy 濃度を上昇させること、また肝臓 DMG 濃度の上昇もその相乗効果に関与していることを示唆している。本実験で得られた結果は、Met を比較的多く含む 20C からコリンを除いても高 Hcy 血症を引き起こさないが、葉酸欠乏の条件下ではコリン欠の影響が強く現れることを示している。

第 2 章では、コリン欠乏による高 Hcy 血症に及ぼす葉酸の効果を検討している。実験 1 では、コリン欠の 10C に葉酸(20 mg/kg diet)、2.5%セリン(Ser)あるいは両者を添加してその効果を検討した。6 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、10C、コリンを除いた 10C(10CCD)、10CCD に葉酸と Ser を単独あるいは一緒に添加した食餌をラットに 2 週間自由摂取させた。10CCD 投与で血漿 Hcy 濃度は顕著に上昇した。葉酸、Ser あるいは両者の添加はコリン欠乏による高 Hcy 血症を有意に抑制したが、その抑制効果は部分的あるいは限定的であった。(血漿 Hcy 濃度の増加分をそれぞれ 29.6%, 37.8%および 46.2%抑制)。また、葉酸と C1 ユニット源となる Ser との間に有意な相加効果は見られなかった。葉酸添加は Ser の有無にかかわらず肝臓の 5-MTHF 濃度、MS と CBS の活性、MS mRNA レベルを有意に上昇させたが、BHMT の活性は影響を受けなかった。Ser 単独添加は肝臓 Ser 濃度上昇させ、CBS 活性を上昇あるいは上昇させる傾向を示した。これらの結果は、葉酸のコリン欠乏による高 Hcy 血症に対する抑制効果は MS 経路による Hcy 代謝の亢進によること、また、Ser の高 Hcy 血症抑制効果はシスタチオニン合成による Hcy 代謝の亢進によることを示唆している。一方、Ser の有無にかかわらず葉酸投与の効果が部分的あるいは限定的であるのは、MS 経路の capacity が BHMT 経路の capacity よりも小さいことが原因の一つと考えられる。実験 2 では、10C の代わりに 25%大豆タンパク質食(25S)を用いて同様な実験を行い、実験 1 とほぼ同様な結果を得た。

以上のように本研究は、2つの Hcy 再メチル化経路において、1つの経路の機能低下によ

る高 Hcy 血症は他の経路での Hcy 代謝を促進する処置では完全には抑制できないことを明確にした。すなわち、Hcy の再メチル化反応には葉酸関与と Bet 関与の 2 つの経路が（従って、葉酸も Bet も）必要であることを実験的に明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

Hcy はメチオニン(Met)代謝の中間体であるが、高 Hcy 血症は動脈硬化の独立した危険因子として認識されている。Hcy の代謝にはシスタチオニン合成と Met への再メチル化がある。再メチル化には葉酸関与とベタイン(Bet)関与の二つがあるが、両者の独自の役割と相補性について必ずしも明確ではない。本研究は、Hcy 代謝における葉酸とベタインの役割を明らかにするために、葉酸欠乏による高 Hcy 血症に及ぼすベタインおよびコリンの効果を調べるとともに、コリン欠乏による高 Hcy 血症に及ぼす葉酸の効果を検討したものである。

第 1 章では、葉酸欠乏による高ホモシステイン血症に及ぼすベタインおよびコリンの効果を検討している。実験 1 では、葉酸欠 10%カゼイン食(10C)と 20%カゼイン食(20C)に Bet を比較的多量(1%)に添加してその効果を検討した。6 週齢の Wistar 系雄ラットを実験動物として用いた。10%カゼイン食(10C)、葉酸を除いた 10%カゼイン食(10CFD)、10CFD + 1%Bet、20%カゼイン食(20C)、葉酸を除いた 20%カゼイン食(20CFD)、20CFD + 1%Bet の各食餌をラットに 4 週間自由摂取させた。飼育終了後、血漿と肝臓を採取し、血漿 Hcy 濃度、肝臓の Met 代謝中間体濃度、Hcy 代謝酵素活性などを測定した。血漿 Hcy 濃度は葉酸欠乏により上昇したが、10CFD 群では 20CFD 群に比べて有意に高い値を示した。10C と 20C での葉酸欠による血漿 Hcy 濃度の上昇は Bet の添加で有意に抑制されたが、その効果は部分的あるいは限定的であった。葉酸欠乏により肝臓 5-メチルテトラヒドロ葉酸(5-MTHF)濃度とメチオニン合成酵素(MS)の低下が見られた。また肝臓 Bet 濃度の低下と Bet-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ(BHMT)の阻害剤として知られるジメチルグリシン(DMG)濃度の上昇も見られ、肝臓 DMG 濃度と血漿 Hcy 濃度の間に有意な正の相関が示された。これらの結果は、葉酸欠乏による肝臓 DMG 濃度の上昇は BHMT 反応を阻害し、Bet の効果を減少させることを示唆している。本実験で得られた結果は、葉酸欠乏は MS 経路だけではなく BHMT 経路での Hcy 代謝も阻害するという考え方を支持する重要な証拠である。実験 2 では、葉酸欠 20C による高 Hcy 血症に及ぼすコリン欠 (Bet 欠) の影響を検討した。20C、コリンを除いた 20%カゼイン食(20CCD)、20CFD、コリンを除いた 20CFD(20CFDCD)をラットに 4 週間自由摂取させた。20C からコリンを除いても血漿 Hcy の上昇は見られなかったが、葉酸欠 20C からコリンを除くと血漿 Hcy 濃度と肝臓 DMG 濃度は顕著に上昇した、実験 1 と同じように、肝臓 DMG 濃度と血漿 Hcy 濃度の間に有意な正の相関も見られた。また葉酸欠 20C からコリンを除くと、肝臓の S-アデノシルメチオニン(SAM)と Bet 濃度は有意に低下し、肝臓の S-アデノシルホモシステイン(SAH)と Hcy 濃度は顕著に上昇した。肝臓の MS 活性とシスタチオニン β -シンターゼ(CBS)活性も顕著的に低下した。これらの結果は、葉酸欠とコリン欠は相乗的に肝臓の Met 代謝中間体濃度、Hcy 代謝酵素活性などに影響を与え、血漿 Hcy 濃度を上昇させること、また肝臓 DMG 濃度の上昇もその相乗効果に関与していることを示唆している。本実験で得られた結果は、Met を比較的多く含む 20C からコリンを除いても高 Hcy 血症を引き起こさないが、葉酸欠乏の条件下ではコリン欠の影響が強く現れることを示している。

第 2 章では、コリン欠乏による高 Hcy 血症に及ぼす葉酸の効果を検討している。実験 1 では、コリン欠の 10C に葉酸(20 mg/kg diet)、2.5%セリン(Ser)あるいは両者を添加してその効果を検討した。6 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、10C、コリンを除いた 10C(10CCD)、10CCD に葉酸と Ser を単独あるいは一緒に添加した食餌をラットに

2週間自由摂取させた。10CCD投与で血漿Hcy濃度は顕著に上昇した。葉酸、Serあるいは両者の添加はコリン欠乏による高Hcy血症を有意に抑制したが、その抑制効果は部分的あるいは限定的であった。また、葉酸とC1ユニット源となるSerとの間に有意な相加効果は見られなかった。葉酸添加はSerの有無にかかわらず肝臓の5-MTHF濃度、MSとCBSの活性、MS mRNAレベルを有意に上昇させたが、BHMTの活性は影響を受けなかった。Ser単独添加は肝臓Ser濃度を上昇させ、CBS活性を上昇あるいは上昇させる傾向を示した。これらの結果は、葉酸のコリン欠乏による高Hcy血症に対する抑制効果はMS経路によるHcy代謝の亢進によること、また、Serの高Hcy血症抑制効果はシスタチオン合成によるHcy代謝の亢進によることを示唆している。一方、Serの有無にかかわらず葉酸投与の効果が部分的あるいは限定的であるのは、MS経路のcapacityがBHMT経路のcapacityよりも小さいことが原因の一つと考えられる。実験2では、10Cの代わりに25%大豆タンパク質食(25S)を用いて同様な実験を行い、実験1とほぼ同様な結果を得た。

以上のように本研究は、2つのHcy再メチル化経路において、1つの経路の機能低下による高Hcy血症は他の経路でのHcy代謝を促進する処置では完全には抑制できないことを明確にした。すなわち、Hcyの再メチル化反応には葉酸関与とBet関与の2つの経路が（従って、葉酸もBetも）必要であることを実験的に明らかにした。

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あるものと認めた。

<基礎となる学術論文>

1. Ying LIU, Yi-Qun LIU, Tatsuya MORITA, Makoto MORI, and Kimio SUGIYAMA: Effect of Dietary Supplementation with Folate on Choline Deficiency-Induced Hyperhomocysteinemia in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 58, in press (2012).
2. Ying LIU, Yi-Qun LIU, Tatsuya MORITA, and Kimio SUGIYAMA: Effects of Betaine Supplementation and Choline Deficiency on Folate Deficiency-Induced Hyperhomocysteinemia in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 58, in press (2012).