

氏 名 (本国籍)	山 本 紘 平 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第599号
学位授与年月日	平成25年3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	ビタミン B ₆ 欠乏により惹起される高ホモシステイン血症の葉酸強化による改善に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 中 川 智 行 副査 岐阜大学 教 授 早 川 享 志 副査 静岡大学 教 授 杉 山 公 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

ビタミン B₆ (B₆) は水溶性ビタミンの一つであり、主にアミノ酸代謝に関わっている。例えば、B₆ 欠乏時には尿中キサンツレン酸の排泄増加が生じ、これは B₆ 欠乏に起因するトリプトファン代謝異常の結果であり B₆ 欠乏の生化学的指標として広く用いられている。一方、B₆ はメチオニン代謝にも関わっており、欠乏時には血漿中にホモシステイン (HCY) が蓄積する高 HCY 血症となる。HCY は必須アミノ酸であるメチオニンが ATP により活性化を受けた S-アデノシルメチオニン (SAM) が種々のメチル基転移反応に利用されて生ずる S-アデノシルホモシステイン (SAH) の代謝物である。HCY は動脈硬化症や心疾患等の独立した危険因子であるばかりでなく、認知症との関連も認められつつあり、HCY レベルを低値に維持することは健康上重要である。HCY の代謝は、二つの経路によるがそれぞれ役割が異なっている。第一の経路は、HCY の再メチル化によりメチオニンを再生する再メチル化経路である。この経路には二つのサブ経路があり、ビタミン B₁₂ (B₁₂) と葉酸が関与するメチオニンシンターゼ (MS) と、ベタインが関与するベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (BHMT) がある。B₁₂ や葉酸不足による高 HCY 血症は、MS 活性低下が関与する。一方、第二の経路は硫黄転移経路と言われ、HCY をシステインへと代謝する。この経路には、シスタチオニン β-シンターゼ (CBS) とシスタチオニン γ-リアーゼの二つの酵素が関わっており、何れの酵素にもピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) が補酵素として関わっている。この経路ではシスタチオニンを經由してシステインに変換が進む。従って、B₆ 欠乏も HCY 代謝を低下させ、高 HCY 血症の要因となる。従って、HCY 代謝には、B₁₂、葉酸、B₆ といった複数のビタミンが関与している。臨床的にはマルチビタミンの投与が行われ、特に葉酸の効果が比較的高いことが知られている。本研究においては、B₆ 欠乏によって惹起される高ホモシステイン血症を改善する要因の一つとして葉

酸強化の効果について検討を加えたものである。

第一に、本研究を進めるに当たって、安定した高ホモシステイン血症を実験的に惹起できる条件について検討を行なった。これまで行ってきた実験において単に B₆ 欠乏のみでは血漿 HCY は高値にはならず、高タンパク質において高くなるものの、著しい高値は得られなかった。そこで、B₆ 欠乏とメチオニン添加レベルの段階的な変化の影響を検討した。ラットに飼料 1 kg 当たり L-メチオニンを 3, 6 または 9 g 含むコントロール飼料または B₆ 欠乏飼料を与えて 5 週間飼育した。その結果、B₆ 欠乏群の血漿 HCY 濃度は飼料中メチオニンレベルの増加に応じて増加し、安定して高 HCY 血症を誘導できる飼料条件として、B₆ 欠乏飼料に L-メチオニン 9 g/kg 飼料を添加する飼料条件を見出した。以降の実験にはこの飼料条件を適用した。

第二に、B₆ 欠乏によって惹起される高 HCY 血症に対する葉酸添加の効果について検討を加えた。飼料 1 kg 当たり L-メチオニンを 9 g 含む条件下で、コントロール飼料、B₆ 欠乏飼料、葉酸強化 (10 mg プテロイルモノグルタミン酸/kg 飼料) B₆ 欠乏飼料をそれぞれ Wistar 系雄ラットに与えて 5 週間飼育した。B₆ 欠乏によって高 HCY 血症が惹起される一方で、葉酸強化群では血漿 HCY 濃度の改善を示した。以上の結果から、葉酸強化はメチオニン負荷飼料条件下 B₆ 欠乏により惹起される高 HCY 血症を改善できることを初めて明らかにした。

第三に、メチオニン負荷飼料条件下 B₆ 欠乏により惹起される高 HCY 血症の葉酸強化による改善機序を明らかにすることを目的として再メチル化経路と硫黄転移経路に及ぼす葉酸強化の影響について検討を行なった。飼料 1 kg 当たり L-メチオニンを 9 g 含むコントロール飼料、B₆ 欠乏飼料、2 添加レベルの葉酸強化 (2.5 倍および 10 倍) B₆ 欠乏飼料をそれぞれ Wistar 系雄ラットに与えて 5 週間飼育した。最終日は一晩の絶食ののち解剖 3 時間前に尾静脈から血液を採取した。続けて胃ゾンデにより L-メチオニン投与 (100 mg L-メチオニン/kg 体重) を行い、その 3 時間後に解剖し、腹部大動脈から採血した。その結果、空腹時とメチオニン負荷時両方において B₆ 欠乏により高 HCY 血症が確認されたが、葉酸強化により軽減され、葉酸強化の程度に応じた血漿 HCY 濃度の低下を認めた。血漿と肝臓の PLP レベルは B₆ 欠乏飼料群において有意に低下し、硫黄転移経路の肝臓 CBS 活性の低下も見られた。しかし、これらに対して葉酸強化の影響は見られなかった。また肝臓 MS 活性についても葉酸強化の影響を受けなかった。しかし、B₆ 欠乏飼料群では MS の基質である 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) の肝臓含量が有意な低下を示していることを見出した。また、その一方で、葉酸強化をした群においては 5-MTHF の肝臓含量は有意な増加に転じていることを明らかにした。肝臓における 5-MTHF 含量は、Km よりも低く、葉酸強化による 5-MTHF 含量の回復は *in vivo* における MS 活性増加を意味する。以上の結果より、B₆ 欠乏においては、硫黄転移経路の代謝活性が低下し、再メチル化経路において MS 活性自体は変わらないものの、その基質となる肝臓 5-MTHF 含量が著しく低下し、再メチル化経路の代謝活性も低下することを明らかにした。また、B₆ 欠乏により惹起された高 HCY 血症の葉酸強化による軽減は、B₆ 欠乏によって低下した肝臓 5-MTHF 葉酸含量を葉酸強化によって回復できた結果、*in vivo* における MS 活性を高め、HCY 代謝を促進したことによると結論づけた。

本研究では、L-メチオニンを添加することで B₆ 欠乏による重度の高 HCY 血症モデルの作成に成功した。また、その条件下で葉酸強化により高 HCY 血症を改善できる

ことを明らかにした。葉酸と B₆ はともに HCY 代謝において重要な役割を有するビタミンであるが、その生理的作用は独立しており、B₆ 欠乏に対して葉酸を強化しても効果は期待できないと思われたが、本研究では、B₆ 欠乏による代謝悪化が葉酸強化により改善されるという新たな知見を得た。これは、HCY 代謝系のように複数のビタミンが関与し、複雑な代謝系を持つ場合には、他のビタミンが統合的に作用して生体機能調節に重要な役割を演じていることを意味しており、生体におけるビタミン機能の観点から新たな知見を提起する結果である。

審 査 結 果 の 要 旨

ホモシステイン (Hcy) はメチオニンの代謝中間物であり、血漿 Hcy 濃度の上昇はアテローム性動脈硬化症や心疾患等の独立した危険因子であると認識されている。通常 Hcy は、二つの経路により代謝され、その代謝には複数のビタミンが関わっている。硫黄転移経路においてはシスタチオン β-シンターゼ (CBS) とシスタチオン γ-リアーゼにより Hcy はシスタチオンを経てシステインへと代謝される。これらの酵素はビタミン B₆ (B₆) を補酵素としている。一方、再メチル化経路において Hcy はメチオニンシンターゼ (MS) によりメチオニンに再合成される。この経路には葉酸とビタミン B₁₂ (B₁₂) が関わっている。Hcy の蓄積はこうした二つの経路の代謝能の低下により惹起される。本研究は、B₆ 欠乏により実験的に高 Hcy 血漿を惹起させる条件を設定し、その条件下において葉酸を強化した場合の効果と、その機構について検討を加えたものである。

(1) 高 Hcy 血漿は通常単に B₆ 欠乏のみでは生じないことから、流入するメチオニン代謝量に関わっていると考えられた。そこで、B₆ 欠乏とメチオニン添加レベルの 2 要因が血漿 Hcy 濃度に及ぼす影響について検討した。ラットに飼料 1 kg 当たり L-メチオニンを 3, 6 または 9 g 含むコントロール飼料または B₆ 欠乏飼料を与えて 5 週間飼育した。その結果、B₆ 欠乏群の血漿 Hcy 濃度は飼料中メチオニンレベルの増加に応じて増加した。このことから、B₆ 欠乏群に L-メチオニン 9 g/kg 飼料を添加することで重度の高 Hcy 血症を惹起できることを見出した。この条件は以降の実験に適用した。

(2) B₆ 欠乏により惹起される高 Hcy 血症に対する葉酸強化の効果を検討した。ラットに対して、飼料 1 kg 当たり L-メチオニンを 9 g 含むコントロール飼料、B₆ 欠乏飼料、葉酸強化 (10 mg プテロイルモノグルタミン酸/kg 飼料) した B₆ 欠乏飼料を与える 3 群のラットを 5 週間飼育した。高 Hcy 血症が B₆ 欠乏によって惹起された一方で、葉酸強化は血漿 Hcy 濃度を改善した。これらの結果から、葉酸の強化は B₆ 欠乏とメチオニン摂取により惹起された高 Hcy 血症を改善することを明らかにした。

(3) B₆ 欠乏により惹起される高 Hcy 血症の葉酸強化による改善機序は明らかではない。そこ 2 段階の葉酸強化レベル (通常の 2.5 倍および 10 倍) の B₆ 欠乏飼料を実験軍に加えて 5 週間飼育した。飼育後、最初に一晩の絶食ののち尾静脈から血液を) の葉酸強化によって高 Hcy 血症が改善する様相を MS 活性, CBS 活性を含めて詳細

に検討を行なった。その結果、空腹時とメチオニン負荷時両方の血漿で B₆ 欠乏による高 Hcy 血症が確認されたが、葉酸強化により軽減され、葉酸強化の程度に応じた血漿 Hcy 濃度の低下が確認された。また、B₆ 欠乏飼料では MS の基質である 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) の肝臓含量は B₆ 欠乏飼料では有意に低下する事を初めて見出した。即ち、葉酸強化では 5-MTHF 濃度が有意に回復し、MS 活性の律速基質濃度の改善を介した効果であることを初めて明らかにした。

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. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, Hayakawa T. Folic acid fortification ameliorates hyperhomocysteinemia caused by a vitamin B₆-deficient diet supplemented with L-methionine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76: 1861-1865 (2012).
2. Yamamoto K, Isa Y, Nakagawa T, Hayakawa T. Involvement of 5-methyltetrahydrofolate in the amelioration of hyperhomocysteinemia caused by a vitamin B₆-deficiency and L-methionine supplementation. *Biosci Biotechnol Biochem*, in press.

【既発表論文】

1. Matsufuji Y, Yamamoto K, Yamauchi K, Mitsunaga T, Hayakawa T, Nakagawa T. Novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press.