ビタミンB-12欠乏により変動するタンパク質の同定及びメチオニン添加によるその改善効果

上川篤志^{*1}, 勝島啓佑^{*1}, 河田哲典^{*2}, 小林謙一^{*1}, 山本祐司^{*1}, 田所忠弘^{*1}

(^{*1}東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科, ^{*2}岡山大学教育学部)

Proteomic analysis during vitamin B-12-deficiency and improvement effect by methionine supplement

Atsushi Uekawa^{*1}, Keisuke Katsushima^{*1}, Tetsunori Kawata^{*2}, Ken-Ichi Kobayashi^{*1}, Yuji Yamamoto^{*1}, Tadahiro Tadokoro^{*1}

^{*1} Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

^{*2} Faculty of Education, Okayama University, Tsushimanaka, Okayama-city, Okayama 700-8530

^{*1}〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

^{*2}〒700-8530 岡山県岡山市津島中

Vitamin B-12 (B-12) is a water-soluble vitamin and is one of the necessary nutrients for the body. However, in elder people, shortage of B-12 has been reported to be associated with impairments in health¹⁵). Therefore to evaluate whether we could improve these impairments by daily dietary supplementation of methionine, we raised a B-12 deficient animal model and then analyzed differences in the pattern of protein expression. Two proteins, GRP58 and ALDH2, were identified as molecules whose expression level changed during B-12 deficiency. Moreover, this change in expression of both molecules was showed opposite pattern in the liver and testis. However, this change in expression was recovered during supplementation with methionine, which suggests that methionine may partially attenuate the effects of B-12 deficiency.

緒 言

ビタミンB-12 (B-12) は、ビタミンの中で最大の分子量を持ち、複雑な構造で構成されている水溶性ビタミンである。また、動物性食品に含まれ、食事摂取基準によると成人男女とも一日当たり、2.4 μ gの摂取が推奨されており¹⁾、極微量で有効な働きを示す。しかしながら、B-12が欠乏した場合、悪性貧血、巨赤芽球性貧血、メチルマロン酸尿症、神経障害など、様々な症状を呈する²⁾。

食物中のB-12は、胃酸環境下にて胃液中の内因子、または、唾液や胃液中のR-binderと結合し、回腸上皮細胞のB-12-内因子複合体受容体を介して吸収される。血中に入ったB-12はB-12結合タンパク質であるトランスコバラミンII (TC-II)と結合し輸送され、肝臓へ運搬され、補酵素型B-12に転換された後、受容体を介し

て細胞内へ取り込まれ、その作用を発揮する³⁾。

B-12にはアデノシルコバラミン、メチルコバラミンの二つの活性型がある。アデノシルコバラミンはメチルマロニル CoA ムターゼ (MCM, EC 5.4.99.2) の補酵素である。B-12欠乏により、MCM 活性が低下すると、生体内にメチルマロン酸 (MMA) が蓄積し、その結果、尿中に MMA が排出される^{4) 5)}。このことから尿中MMA量の増加はB-12欠乏状態の指標として広く用いられている⁶⁾。

メチルコバラミンは、5-メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからテトラヒドロ葉酸とメチオニンを生成するメチオニンシンターゼ (MS, EC 2.1.1.13) の補酵素として機能する。B-12欠乏状態では、MSの活性低下に起因し、S-アデノシルメチオニン (SAM) 濃度の低下、S-アデノシルホモシステイン (SAH) 濃度

表 1 飼料組成

Component	B-12-deficient diet	Methionine-enriched B-12-deficient diet
	g/kg diet	
Soybean protein isolate	180	180
Glucose anhydrous	673.5	668.5
Lard (containing fat-soluble vitamins)	100	100
Mineral mixture	35	35
Water-soluble vitamin mixture without B-12	10	10
Choline chloride	1.5	1.5
D, L-methionine	—	5

Mineral mixture and vitamin mixture were based on the AIN-76 formation.

の上昇, SAM/SAH 比の低下を引き起こす⁷⁾。SAH の蓄積が, SAM 依存性メチルトランスフェラーゼを阻害することから, SAM/SAH 比の低下はメチル基転移反応を制御していると考えられている⁸⁾。

これまでの研究から, 高齢者など胃酸分泌が低下している人や, 胃切除など消化管切除者においては, 食品からのB-12の吸収率が低下することから^{9) 10)}, 潜在的B-12欠乏者が多く存在すると予想される。

そこで, 本研究ではB-12欠乏時において生体内, とくに細胞/分子レベルで起こる変化について, 近年その手法が確立されつつあるプロテオーム解析法により, B-12欠乏モデルラットを用いて解析することを試みた。その結果, B-12が補酵素作用による代謝変動のみならず, SAM/SAH 比の低下を介し, 肝臓ならびに精巣組織内のタンパク質発現にも影響することを見出したので報告する。また, メチルコバラミンがMSの補酵素であることから, メチオニン合成に着目し, B-12欠乏で観察された変動が食事由来のメチオニンによって改善されるか否かについても検討した。

方 法

1. 実験動物及び飼育方法

Wistar 系10週齢の雌雄ラットを用い, 妊娠・授乳期を通してB-12欠乏飼料を給与した雌親ラットから出生した雄ラットを実験に使用した。離乳した雄ラットを, 以下の4群: コントロール群 (C群), B-12欠乏群 (D群), コントロール+メチオニン添加群 (CM群), B-12欠乏+メチオニン添加群 (DM群) へと分けた。B-12欠乏飼料は, 大豆タンパク質をタンパク質源としたAIN-76を基本組成とし, B-12のみを除いた。メチオニン添加B-12欠乏飼料はB-12欠乏飼料に, D, L-メチオニンを0.5%添加した。飼料組成は表1に示した。離乳直後よりこれらの飼料の給与を開始し, 100日間飼育した。飼育は, 室温22℃±3℃, 明暗サイクル12時間 (7:00~19:00) の飼育室で行った。飼料及び飲料水は自由に摂取させ, 飼料摂取量と体重を毎日測定した。なお, C群, CM群のラットにはシアノコバラミンとしてB-12を一日当り1μg (20 ng/μL) 経口投与した。飼育開始後100日目のラットから24時間尿を採取し, 使用時まで-30℃で保存した。飼育終了後のラットをネンブター麻酔下にて心臓採血した。肝臓・精巣を摘出し, 直ちに

に液体窒素にて凍結後, 使用時まで-80℃にて保存した。

なお動物実験は, 総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」及び岡山大学動物実験管理委員会の「岡山大学動物実験指針」に従って行った。

2. 尿中 MMA 排泄量及び肝臓中B-12量の測定

尿中 MMA 量を Giorgio¹¹⁾の方法に従い測定した。また, 内部標準として尿中クレアチニン濃度をクレアチニンテストワコー (和光純薬工業 (株) 製) にて測定した。尿中 MMA 量は, 尿中クレアチニン量で除し, 算出した。一方で, 肝臓よりB-12を KCN 煮沸抽出法¹²⁾によって抽出し, *Lactobacillus delbruekii lactis* ATCC 7830 (AOAC 1990) を用いたマイクロバイオアッセイ法¹³⁾¹⁴⁾で肝臓中B-12量を定量した。

3. タンパク質の抽出

凍結した精巣, 肝臓を0.1 g 量り, 4 倍容 (400 μL) のタンパク質抽出緩衝液 (7 M尿素, 2 Mチオ尿素, 4 % 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸 (CHAPS), 0.5%ポリオキシエチレン*p*-*t*-オクチルフェニルエーテル (Triton X-100), 0.5%アンフォライン pH3.5-10, 100 mM (±) -ジチオトレイトール (DTT), 1 mM フェニルメタンスルホンイルフルオリド (PMSF), 3 μg/mL ロイペプチン, 5 μg/mL アプロチニンを加え, ポリトロンホモジナイザーにて破碎し, 水中に1時間静置した。膜タンパク質のような不溶性タンパク質の可溶化のため界面活性剤としてCHAPSとTriton X-100を組み合わせて用いた。その後, 10,000×g, 20分間, 4℃で遠心分離し, 上清を総タンパク質試料とした。この試料中のタンパク質濃度をプロテインアッセイラピッドキットワコー (和光純薬工業 (株) 製) を用いて測定した。

4. 二次元電気泳動

一次元目の等電点分離用ゲル (9.2M尿素, 4%アクリルアミド, 2%CHAPS, 1.6%アンフォライン pH6-8, 0.4%アンフォライン pH3.5-10) は, 4 mL に対し, 10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) を8 μL, *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を8 μL加え, ガラスキャピラリー内に作成した。等電点電気泳動の陰極液は100 mM NaOH, 陽極液は10 mM H₃PO₄を用いた。200V 10分, 300V 15分, 400V 15分, 定電圧でプレ電気泳動し, ゲル内にpH勾配を作成した。タンパク質試料に, 一次元用サンプル緩衝液 (9.5 M尿

素, 2% CHAPS, 5% 2-メルカプトエタノール, 1.6% アンフォライン pH6-8, 0.4% アンフォライン pH 3.5-10) を等量加え, 室温で20分間静置した。プレ電気泳動後, 陰極・陽極液をそれぞれ交換し, タンパク質量として100 μ g を試料とした。上置緩衝液 (9 M尿素, 0.8%アンフォライン pH6-8, 0.2% アンフォライン pH 3.5-10, 0.001% プロモフェノールブルー) 20 μ L をサンプルに重層し, 400 V 12時間, 800 V 1時間, 定電圧で電気泳動した。その後, SDS平衡化緩衝液 (0.025 M トリス-HCl pH6.8, 2.3% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 0.001% BPB) 5 mL 中で20分間穏やかに振とうし, 平衡化処理した。その後, 約5 mm の濃縮ゲルをもつ10% SDSポリアクリルアミドゲルにて, 定電流, 20 mAで電気泳動した。二次元目電気泳動終了後, タンパク質をFlamingoTM Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad社製) により染色し, その蛍光標識をモレキュラーイメージャーFX (Bio-Rad社製) にて検出した。

群間でタンパク質発現に差異の認められたスポットは, ジーンワールド (株) プロテオーム事業部に依頼し, LC-MS/MS 分析を行い, 得られたペプチド質量の組み合わせを Mascot 解析後, NCBI nr 検索した。

5. リアルタイム定量 PCR

精巢, 肝臓の total RNA は, ISOGEN (Nippon gene 社製) を用いて抽出した。リアルタイム PCR は2-Stepで行い, Invitrogen 社の SuperScriptTM III Platinum[®] Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR[®] Green のプロトコールに従った。total RNA 25 ng相当量の cDNA を鋳型とし, ネガティブコントロールとして鋳型の代わりに H₂Oを加えた。また, 内部標準遺伝子をラット GAPDH 遺伝子とし, 相対定量を行った。全ての PCR 産物は, アガロース電気泳動にてシングルバンドであることを確認した。以下に使用したプライマーを示す。GAPDH: Forward; 5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'; Reverse, 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'; GRP58: Forward; 5'-GTCAAGGGTTTTCTTACCCTAC-3'; Reverse; 5'-TATAGGAGGGTTTGTAGCTTCTCG-3'; ALDH2: Forward; 5'-GTGTATGATGAATTCGTGGAACG-3'; Reverse; 5'-TAGCCCAGGATCTTCTTAACTGAG-3'

6. 統計処理

本研究で得られた実験データは平均値±標準偏差で示した。各群間の平均値の有意差は, Excel統計 (Version 5.0; Esumi) を用いた二元配置分散分析を行い, さらに Scheffe の多重比較検定により解析した。有意差は $p < 0.05$ で統計学的に有意差ありと判断した。

結 果

1. ラットの成長, 尿中 MMA 量及び肝臓中 B-12 量

B-12欠乏ラットは生体内B-12の減少とともに, 成長

が遅延し, 尿中 MMA 排泄量が増加することはよく知られ, これらは B-12欠乏状態の指標⁶⁾として用いられる。ラット成長曲線を図1に示した。ラットの成長はC群に比べ, D群で著しい成長遅延が観察された ($p < 0.01$)。また, メチオニンを添加した DM 群は, 成長遅延が抑制された。尿中 MMA 排泄量, 肝臓中 B-12量を図2に示した。尿中 MMA 排泄量は, コントロールラット (C群, CM 群) では検出されなかったが, B-12欠乏ラット (D群, DM 群) において顕著に増加していた。また, 肝臓中 B-12量は B-12欠乏ラット (D群, DM 群) で枯渇していた ($p < 0.001$)。以上のことから D群, DM 群のラットは明確な B-12欠乏状態であることを確認した。

図1 成長曲線

平均値±標準偏差 (n=10)

*コントロール群と比べて有意差あり ($p < 0.01$)

図2 尿中メチルマロン酸排泄量と肝臓中 B-12 量

平均値±標準偏差 (n=10)

N.D.: 検出限界以下

異符号間は有意差あり ($p < 0.001$)

図3 精巣、肝臓における二次元電気泳動

2. タンパク質発現状態の解析

精巣での二次元電気泳動法による解析をした結果、D群でタンパク質の発現が消失するスポット、あるいはD群でのみ発現していたスポットを確認した(図3)。なおCM群はC群と同じ結果であった。これら2つのスポットについてLC-MS/MSにてタンパク質の同定を行ったところ、B-12欠乏で発現が消失していたスポットは、Glucose regulated protein, 58kDa (GRP58)であり、B-12欠乏でのみ発現していたスポットは、Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (ALDH2)であることが認められた。また、メチオニンの添加(DM群)でこれらの発現は正常に戻る事が明らかとなった。一方、肝臓ではD群におけるこれら二つのスポットの発現パターンが逆であった。また、肝臓においてもメチオニンの添加(DM群)で正常に戻る事が確認された。

3. GRP58, ALDH2のmRNAレベルの解析

B-12欠乏におけるタンパク質発現の変動が、転写レベルでの変動であるかを確認するため、mRNAの定量的な解析をリアルタイム定量PCR法にて行った。その結果、精巣において、GRP58の転写レベルはC群に比べ、D群で有意な減少が認められたが($p < 0.05$)、DM群では、有意な変化は認められなかった。ALDH2の転写レベルはD群で有意に増加しており($p < 0.05$)、DM群において有意な変化はみられなかった(図4)。これらの結果は、二次元電気泳動での結果と相関するものであった。一方、肝臓における、GRP58の転写レベルは、C群と比較しD群において有意に増加し($p < 0.05$)、DM群では有意な変化はなかった。ALDH2は、D群転写レベルの有意な低下がみられ($p < 0.05$)、DM群では、有意な変化はみられなかった(図5)。

考 察

B-12は、動物性食品、魚介類などの食品に多く含ま

図4 精巣 GRP58及びALDH2mRNAの定量
 平均値±標準偏差 (n=6)
 異符号間是有意差あり ($p < 0.05$)

れ、生物体内での半減期が比較的長いことから、欠乏することは稀であると考えられてきた。しかし、高齢者の血清中に含まれるB-12濃度を調べた結果では、明らかに低下しており¹⁵⁾、そのため潜在的B-12欠乏者が高齢者に多く存在すると予想されている。その原因として加齢とともに胃からのB-12結合タンパク質(内因子)の分泌が低下し、B-12の吸収障害が起こっているため、B-12の投与だけではB-12欠乏は回復しない可能性が考

図5 肝臓 GRP58及び ALDH2mRNA の定量
 平均値±標準偏差 (n=6)
 異符号間は有意差あり ($p < 0.05$)

えられる。

一方、アルツハイマー型認知症患者の脳内B-12量を測定すると、有意にB-12量が低下しており¹⁶⁾、B-12とアルツハイマー型認知症との関連が明らかになりつつある。この様に、B-12欠乏に起因する生理障害は、巨赤芽球性貧血にとどまらず、現代の社会問題の1つである、認知症などの脳神経変性疾患などとも関連する可能性が示唆されている¹⁷⁾。

しかし、B-12欠乏で起こる生理的障害及びその改善については、酵素活性レベルの変動は明確にされているものの、タンパク質発現レベルでの解析については不明な点が多く、B-12の機能解明には、B-12欠乏動物モデルを用いたより詳細な分子レベルでの解析が不可欠である。B-12の場合、重篤な欠乏状態の動物モデルの作成は困難であったが、河田ら¹⁸⁾は、B-12欠乏のアニマルモデルを確立し、B-12欠乏によって肝臓におけるMS活性、SAM合成酵素等の酵素活性が顕著に低下すること^{19) 20)}を報告している。

そこで本研究は、B-12欠乏に伴うタンパク質発現への影響についてプロテオーム解析手法を用いた網羅的変動解析を試みた。その結果、B-12欠乏により、変動する因子としてGRP58とALDH2を見出した。B-12欠乏時のGRP58、ALDH2の発現パターンは精巢と肝臓で全く逆であったことから、B-12の遺伝子発現に及ぼす影響が臓器特異的であることが示唆された。B-12欠乏に

伴うこれらの変動がメチオニン添加によりコントロール群と同程度にまで回復した。このことからB-12欠乏によるMS活性低下に伴う生理障害が、メチオニンの摂取により緩和される可能性を示したと考える。つまり、食餌性のメチオニンが、SAMへと変換され、メチル化反応に利用されることが示唆された。しかし、メチオニンの大量摂取には、成長障害などの可能性が報告されており²¹⁾、一般的に有効な手段ではないと考えられる。そこで、動物性タンパク質、特に鶏卵などメチオニンを多く含む食品を摂取することにより、高齢者のB-12不足状態に起因する生理障害などの改善が予想される。

最後に、本報告は食生活が生体レベルに及ぼす現象を科学的に説明する手段としてプロテオーム解析法が有効であることを改めて示すものである。

要 約

ビタミンB-12 (B-12) は、水溶性ビタミンの1つであり、生体内で必須である。しかし、高齢者の中には潜在的なB-12不足状態に起因する生理障害を呈する場合が報告されている。そこで、B-12不足による生理障害を食生活で改善できるかどうかを検討する目的で、モデル実験動物を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、B-12欠乏によって変動する新規因子 (GRP58 Wah, ALDH2) を同定した。また、両分子の変動パターンが、肝臓と精巢で異なり、臓器特異的であることが示唆された。さらに、B-12欠乏による両分子の変動が、メチオニン添加で回復したことから、食餌性メチオニンによる、B-12欠乏状態の改善が示唆された。

謝 辞

B-12欠乏飼料の調製に用いたダイズタンパク質は、不二製油株式会社研究開発本部フードサイエンス研究所よりご提供頂きました。

文 献

- 1) 厚生労働省：日本人の食事摂取基準 [2005年版]，第一出版，東京，p.97 (2005)
- 2) Grasbeck R, Salonen E : vitamin B12, Prog. Fd. Nutr. Sci. 2, 193-231 (1976)
- 3) Allen RH : The plasma transport of vitamin B12, Brit. J. Haematol, 33, 161 (1976)
- 4) Frenkel EP, White JD : Characterization of an animal model of vitamin B12 deprivation, Lab. Invest., 29, 614-619 (1973)
- 5) Brass EP, Tahiliani AG, Allen RH, Stabler SP : Coenzyme A metabolism in vitamin B-12-deficient rats, J. Nutr., 120, 290-297 (1990)
- 6) Brink JJ, Beck RA, Miller JS, Thenen SW : Relationship of urinary methylmalonic acid to vitamin B-12 concentrations and hematologic changes in rats fed vitamin B-12-deficient diets, J. Nutr. 110, 1338-1346 (1980)

- 7) Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Pagliusi RA, Blaia-d' Avila VL, Allen RH, Stabler SP : Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia, *Metabolism*, 56, 339-347 (2007)
- 8) De Cabo SF, Santos J, Fernandez-Piqueras J : Molecular and cytological evidence of S-adenosyl-L-homocysteine as an innocuous undermethylation agent in vivo, *Cytogenet. Cell Genet.*, 71, 187-192 (1995)
- 9) Krasinski SD, Russell RM, Samloff IM, et al : Fundic atrophic gastritis in an elderly population. Effect on hemoglobin and several serum nutritional indicators, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 34, 800-806 (1986)
- 10) Scarlett JD, Read H, O' Dea K : Protein-bond cobalamin absorption declines in the elderly, *Am. J. Hematol.*, 39, 79-83 (1992)
- 11) Giorgio AJ, Plant GWE : A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia, *J. Lab. Clin. Med.*, 66, 667-676 (1965)
- 12) 林淳三, 前川昭男, 伊藤宗次, 鈴木隆男, 佐橋佳一 : シアンカリ煮沸抽出によるビタミンB12定量法に関する研究, *ビタミン*, 19, 462-465 (1960)
- 13) 田中信夫 : ビタミン学実験法Ⅱ・日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, p242-246 (1985)
- 14) 上久保正 : ビタミンB12の微生物学的定量法, *ビタミン*, 11, 328-338 (1956)
- 15) 田中信夫 : 長寿者の健康, ビタミンB-12の効用. —加齢と体内ビタミンB-12含有量の推移—, *Health Science*, 9, 76-81 (1993)
- 16) Renvall MJ, et al : Nutritional status of free-living Alzheimer's patients, *Am. J. Med. Sci.*, 298, 20-27 (1989)
- 17) 稲田雅美, 亀山正邦 : 神経系とビタミンB-12について. 脳と神経, 31, 963-972 (1979)
- 18) Kawata T, Takada T, Morimoto F, Fujimoto N, Tanaka N, Yamada K, Wada M, Tadokoro T, Maekawa A : Effects of vitamin B12-deficiency on testis tissue in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 305-316 (1992)
- 19) Doi T, Kawata T, Tadano N, Iijima T, Maekawa A : Effect of vitamin B-12-deficiency on S-adenosylmethionine metabolism in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 1-9 (1989)
- 20) Doi T, Kawata T, Tadano N, Iijima T, Maekawa A : Effect of vitamin B-12-deficiency on the activity of hepatic cystathionine β -synthase in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 35, 101-110 (1989)
- 21) Sugiyama K, Mizuno M, Muramatsu K : Effect of individual amino acids on plasma cholesterol level in rats fed a high cholesterol diet, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 623-633 (1986)