

<平成 30 年度助成>

## ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏により蓄積する異常な代謝産物が 生殖機能に及ぼす影響

美藤 友博

(鳥取大学 農学部)

### 1. 背景と目的

ライフスタイルの変化により高齢出産・不妊治療が増加している我が国では、少子化問題の解決の糸口となる『健全な子の発育』に関する研究の推進が必要不可欠である。

ビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) は深紅の水溶性ビタミンであり、我が国の食事摂取基準では推奨量 2.4 μg/日と極めて微量で有効である。B<sub>12</sub> 欠乏症は不妊症、成長遅延や神経障害などの発症が報告されるが、その詳細な発症メカニズムに不明点が多い。また、一般的に B<sub>12</sub> 欠乏症は動物性食品を摂取しない厳格な菜食主義者が呈しやすいことは知られているが、近年では胃の機能が低下した中高年（食事性 B<sub>12</sub> 吸収不良症）での罹患率の増加が報告されている<sup>1)</sup>。

B<sub>12</sub> は生体内において、分岐鎖アミノ酸や奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与するメチルマロニル CoA ムターゼならびにホモシステインと 5'-メチルテトラヒドロ葉酸からメチオニンの生成を触媒するメチオニンシンターゼの補酵素として機能している。B<sub>12</sub> 欠乏症を呈すると両酵素活性の低下に伴い、メチルマロン酸およびホモシステインが細胞内に蓄積し、その後尿中へと移行し排泄される。しかし、これら B<sub>12</sub> 欠乏で蓄積する異常な代謝産物（メチルマロン酸ならびにホモシステイン）の生体内への影響を詳細に解析した研究は極めて少ない。

これまでに B<sub>12</sub> 欠乏症の詳細な発症機構をモデル生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて解析してきた<sup>2)</sup>。線虫の特徴は、①自家受精を行うため基本的にモノクローンであり個体差が極めて小さい、②雌雄同体のため 1 個体で精子・卵・受精な

ど多くの生殖機能が評価できる、③生殖腺内への DNA プラスミド溶液のマイクロインジェクションが多用されている、④ヒトを含む哺乳動物同様に、生育に B<sub>12</sub> を要求するため B<sub>12</sub> 欠乏モデルとして利用ができる<sup>3)</sup> 点が挙げられる。

本研究では、中高齢者で急増する B<sub>12</sub> 欠乏症が不妊症の要因の 1 つであるかどうか検討するために、B<sub>12</sub> 欠乏で蓄積するメチルマロン酸ならびにホモシステインをマイクロインジェクション技術で線虫の生殖腺に注入し、線虫の生殖機能に及ぼす影響を解析した。

### 2. 方法

#### 2.1. 線虫の調製法

B<sub>12</sub> 供給（コントロール）、B<sub>12</sub> 欠乏線虫は B<sub>12</sub> 添加培地（B<sub>12</sub> 濃度：100 μg/L）ならびに B<sub>12</sub> 無添加培地を用いて継代的に調製した<sup>4)</sup>。回復線虫は B<sub>12</sub> 欠乏線虫を B<sub>12</sub> 添加培地で 3 世代継代的に生育させ調製した<sup>4)</sup>。また、B<sub>12</sub> 欠乏で蓄積する異常な代謝産物の影響を解析するために 3 日齢のコントロールの生殖腺にメチルマロン酸（25 μM、0.2 μL）またはホモシステイン（30 μM、0.2 μL）を注入した（図 1）。

#### 2.2. 生殖機能の解析

線虫の生殖機能として総産卵数、孵化数、産卵期間（線虫が産卵を始めてから産卵を終了するまでの期間）を評価した。生殖機能の解析にはビデオカメラを装着した顕微鏡（ECLIPSE Ts2-FL、株式会社ニコン）を用いた。

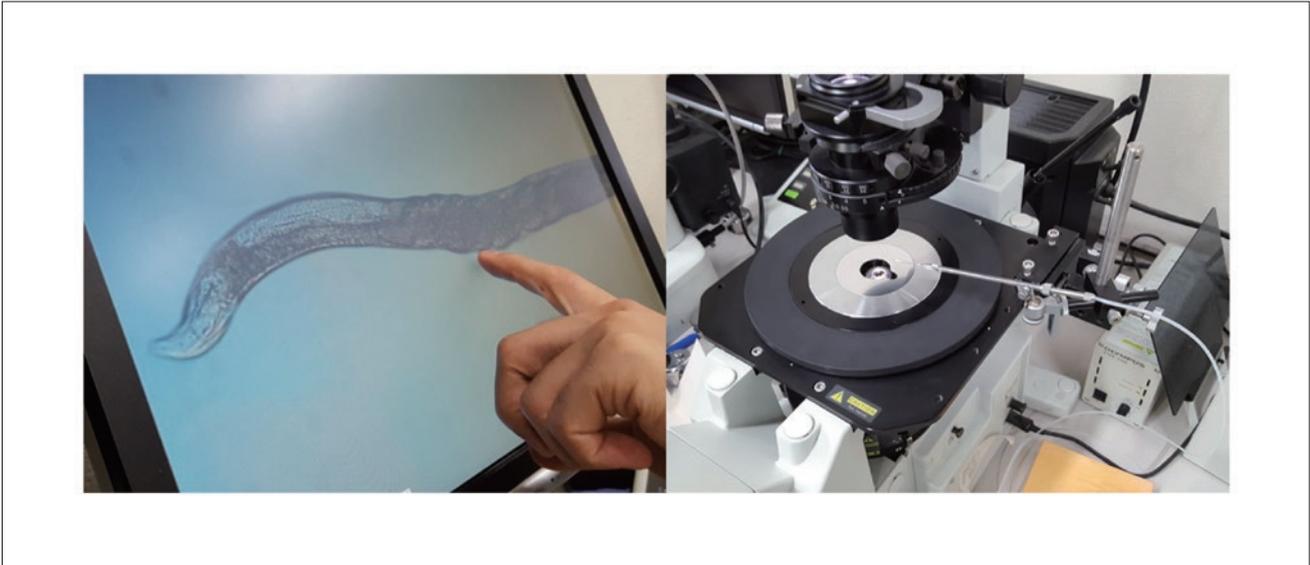


図1 線虫へのマイクロインジェクションの様子

### 2.3. B<sub>12</sub> 欠乏で発現変動を示す生殖関連遺伝子の探索

コントロールおよび B<sub>12</sub> 欠乏線虫から RNA を抽出し、mRNA 精製キットを用いて mRNA を精製した。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。コントロールと比較し、5 倍以上もしくは 1/5 倍以下の遺伝子発現量を示す遺伝子を B<sub>12</sub> 欠乏で発現変動を示す遺伝子と設定した。

### 3. 結果

#### 3.1. B<sub>12</sub> 欠乏ならびに異常な代謝産物の蓄積が線虫の生殖機能に及ぼす影響

コントロール線虫と B<sub>12</sub> 欠乏線虫を比較し、総産卵数ならびに孵化数に大きな変動を示さなかった(図2)。孵化率においても、両線虫ともに約90%と変化は見られなかった。また、メチルマロン酸ならびにホモシステインを注入した線虫においても、総産卵数、孵化数ならびに孵化率に有意な変動を示さなかった。これらの結果から、B<sub>12</sub> 欠乏ならびに B<sub>12</sub>

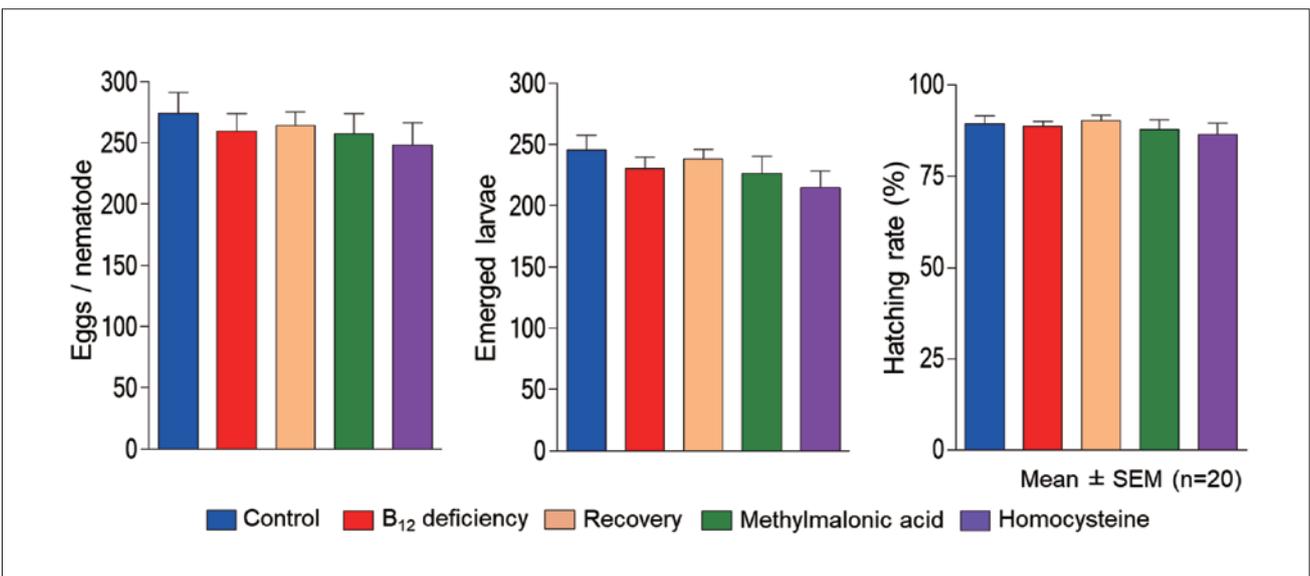


図2 B<sub>12</sub> 欠乏ならびに異常な代謝産物の蓄積が産卵数、孵化数、孵化率に及ぼす影響

欠乏で蓄積するメチルマロン酸ならびにホモシステインは線虫の総産卵数や孵化数に影響を及ぼさないことが考えられた。

一方、線虫の産卵期間に関しては、コントロール線虫と比較し、 $B_{12}$  欠乏線虫では産卵期間の延長が確認された (図 3)。コントロールは産卵開始時より 1 日 (24h) の間で総産卵数の内の約 65% を産卵し、産卵開始から 2 日間 (48h) でほぼ産卵を終えた。一方、 $B_{12}$  欠乏線虫は産卵開始時より 1 日の間で総産卵数の約 20% 程度しか産卵を行わず、産卵開始 2 日目まで産卵のピーク (総産卵数の内の約 50% を産卵) を迎え、その後も産卵開始 5 日目まで産卵を続けた。また、回復線虫はコントロール線虫と同様の産卵パターンを示したため、 $B_{12}$  欠乏線虫で確認された産卵期間の延長は  $B_{12}$  欠乏症による影響であることが推察される。非常に興味深いことに、ホモシステインを注入した線虫はコントロールと同様の産卵パターンを示したのに対して、メチルマロン酸を注入した線虫は  $B_{12}$  欠乏線虫と似た産卵パターンを示すことが明らかになった。これらの結果より、 $B_{12}$  欠乏

は線虫の産卵期間を延長させると共に、その要因の 1 つにメチルマロン酸の体内への蓄積が考えられた。

### 3.2. $B_{12}$ 欠乏で発現変動を示す生殖関連遺伝子について

トランスクリプトーム解析の結果、 $B_{12}$  欠乏で発現変動を示す 75 遺伝子を見出した (図 4)。その内 65 遺伝子は精子に関連する遺伝子であり、そのほとんどがアップレギュレートしていた。また、精子および卵関連遺伝子として、卵母細胞の細胞外マトリックス透明帯への接着に関与するゾナドヘシン遺伝子や産卵活動を制御するセロトニンの体内濃度維持に関連する遺伝子が顕著にダウンレギュレートすることが明らかになった。

## 4. 考察と今後の展開

本研究において、 $B_{12}$  欠乏で蓄積するメチルマロン酸は線虫の産卵期間を延長させることが示唆された。メチルマロン酸は TCA 回路の主要酵素であるコ

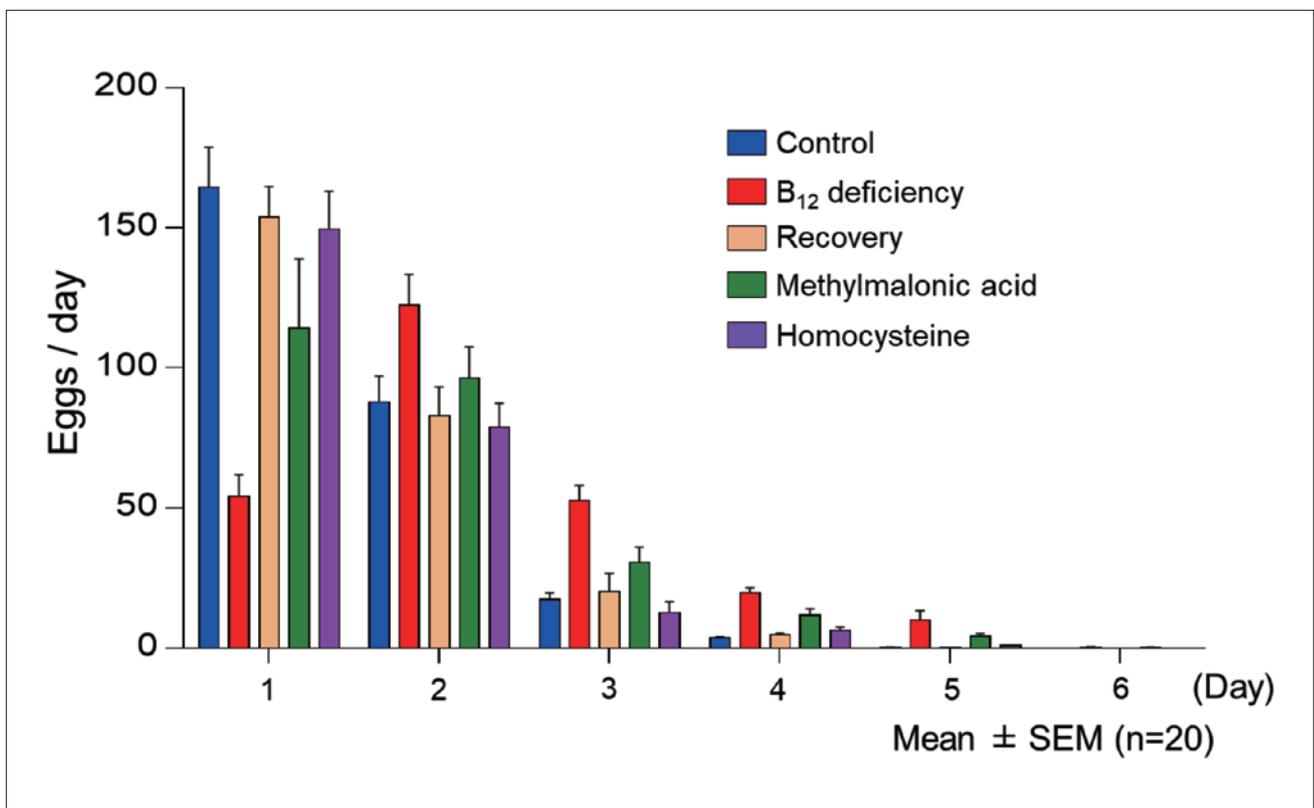


図 3  $B_{12}$  欠乏ならびに異常な代謝産物の蓄積が産卵期間に及ぼす影響

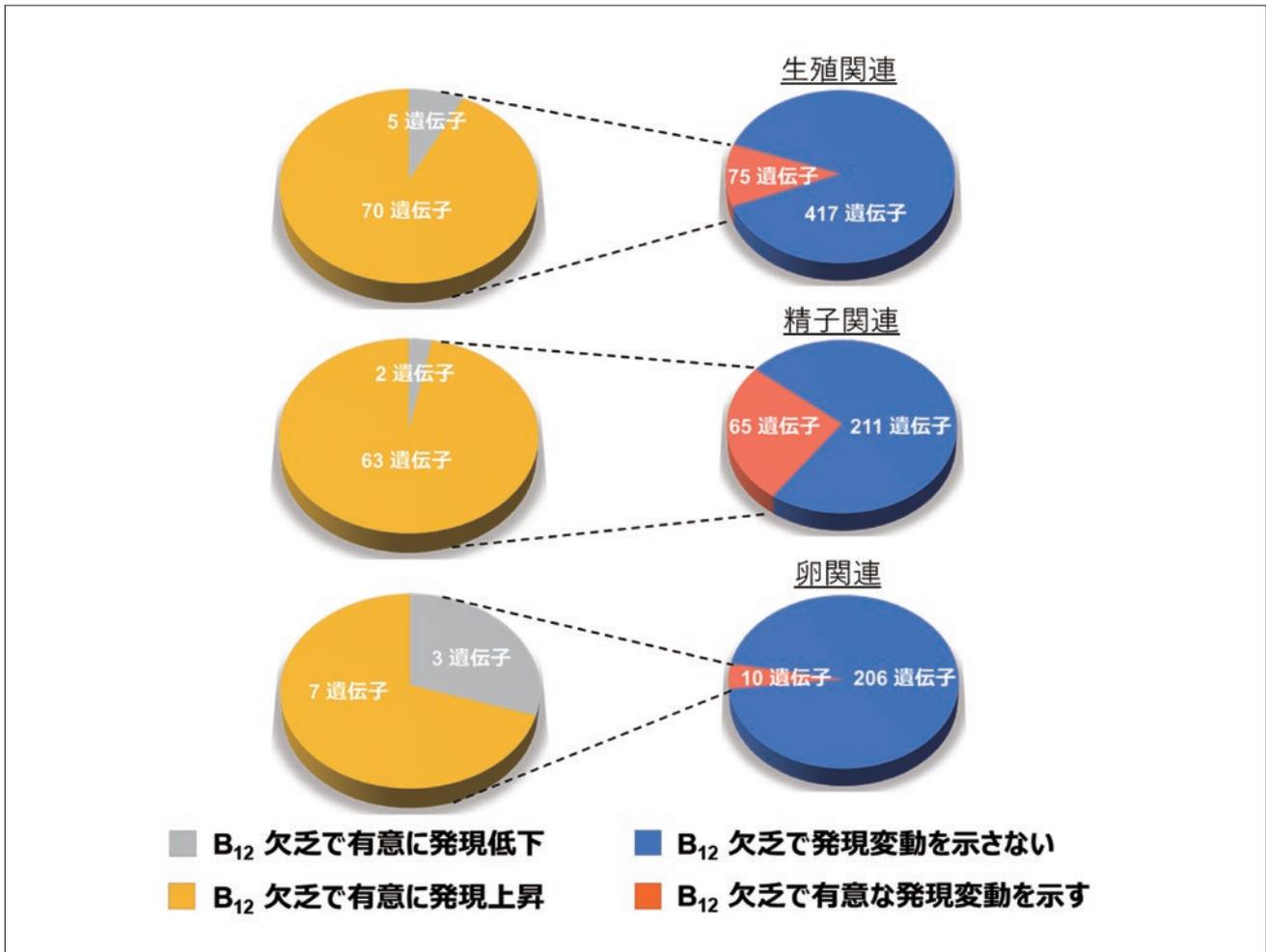


図4 B<sub>12</sub> 欠乏が生殖機能関連遺伝子の遺伝子発現に及ぼす影響

ハク酸デヒドロゲナーゼの酵素阻害剤として機能することが報告されている<sup>5)</sup>。B<sub>12</sub> 欠乏症で報告される成長遅延の要因はこの TCA 回路の障害が関与すると考えられているが、本研究で得られた産卵期間の延長にどのように影響しているのかは不明である。

線虫は幼虫期に 300 個弱の精子を作り、成虫期に卵を形成し、貯精嚢に貯めた精子を使って自家受精を行う。本研究では成虫期の精子形成を終えた線虫にメチルマロン酸とホモシステインを注入したため、精子形成への影響はないと考えられる。これは孵化数・孵化率のデータからも推察される。また、卵母細胞への精子接着に関与する遺伝子が B<sub>12</sub> 欠乏で著しい遺伝子発現の低下を示していたことにより、精子と卵の受精効率が低下していることが考えられる。

また本研究を遂行するにあたり、B<sub>12</sub> 欠乏では生

体内メチル基供与体である S-アデノシルメチオニンが減少することでポリアミン代謝が抑制されることを見出したと共に、そのポリアミン代謝異常が線虫の寿命に影響を及ぼすことを明らかにした<sup>6)</sup>。

セロトニンは線虫の陰門（産卵口）の開閉を担う陰門筋の動きを制御する伝達物質である。今後は B<sub>12</sub> 欠乏におけるセロトニン濃度の変動を確かめ、B<sub>12</sub> 欠乏で蓄積する異常な代謝産物がどのように関与するのか検討したいと考えている。また、本研究成果をきっかけに B<sub>12</sub> 欠乏で誘発される不妊症の発症メカニズムを分子レベルで解明し、治療法・予防法の開発に役立てたいと考えている。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より御礼申し上げますと共に、貴財団の益々の御発展を祈念申し上げます。

## 参考文献

- 1) Bito T. et al. (2013) *J Agric Food Chem*, 61, 3852-3858.
- 2) Bito T. et al. (2017) *Redox Biol*, 11, 21-29.
- 3) Bito T. and Watanabe F. (2016) *Exp Biol Med*, 241, 1663-1668.
- 4) Bito T. et al. (2013) *FEBS Open Bio*, 3, 112-117.
- 5) Toyoshima S. et al. (1995) *J Nutr*, 125, 2846-2850.
- 6) Bito T. et al. (2019) *Metabolites*, 9, 192.

## Effect of abnormal metabolites on reproductive function during vitamin B<sub>12</sub> deficiency

Tomohiro BITO

*Faculty of Agriculture, Tottori University*

Developed countries have the problem of an aging population and low birth rate. In Japan, late child-bearing and receiving infertility treatment is increasing with the change of our lifestyle. Therefore, it is very important for studies to be carried out on the birth and growth of healthy children.

Vitamin B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>), commonly known as the red-colored vitamin, has the largest molecular mass and the most complex structure of all vitamins. People with atrophic gastritis who develop low stomach acid output frequently present food protein-bound B<sub>12</sub> malabsorption, which prevails in middle-aged and elderly people. Thus, these individuals are at an increased risk of developing B<sub>12</sub> deficiency. B<sub>12</sub> deficiency induces various diseases, such as megaloblastic anemia, developmental disorders, growth retardation, and infertility. However, the mechanisms that are involved remain poorly understood.

In mammals, B<sub>12</sub> functions as a coenzyme for methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthase, respectively. In B<sub>12</sub> deficiency, methylmalonic acid and homocysteine both accumulate, with a decrease in their enzymatic activities. The results of our previous study indicated that *Caenorhabditis elegans* developed severe B<sub>12</sub> deficiency associated with infertility, growth retardation, and reduced lifespan when grown under B<sub>12</sub>-deficient conditions, suggesting that *C. elegans* may be a suitable model for clarifying the physiological functions of B<sub>12</sub>, and the mechanisms underlying the symptoms caused by B<sub>12</sub> deficiency.

When worms were grown under B<sub>12</sub>-deficient conditions, and injected with methylmalonic acid, respectively, the egg-laying period was extended. In addition, the expression of genes involved in fertilization between sperm and eggs was decreased in B<sub>12</sub>-deficient worms. These results indicated that the accumulation of methylmalonic acid due to B<sub>12</sub> deficiency may be the cause of the decrease in fertilization efficiency.