

称号及び氏名	博士(農学) 中尾 元幸
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「Mammalian Methylmalonyl-CoA Mutase under Cobalamin-deficient Conditions コバラミン欠乏下におけるメチルマロニル-CoA ムターゼに関する研究」
論文審査委員	主査 中野 長久 副査 宮武 和孝 副査 乾 博

## 論文要旨

コバラミン(ビタミンB<sub>12</sub>)はビタミンの中で最大の分子量を持ち、非常に複雑な構造から構成されている水溶性ビタミンである。また、所要量は男女共に成人で一日当たり 2.4 µg と、非常に微量で有効である。しかしながら、欠乏した場合、成長遅延、神経障害、進行性の悪性貧血など、様々な症状を呈することが知られている。

食物中のコバラミンは唾液由来のハプトコリンと結合して消化管を輸送される。続いて十二指腸において内因子 (Intrinsic factor, IF)に移行する。IF-コバラミン複合体は腸管を下降し、回腸末端部において、IF-コバラミン複合体受容体であるキュビリンに結合し、体内に吸収される。その後、コバラミンはトランスコバラミン II (TCII)と結合した形で分泌され、輸送される。TCII-コバラミン複合体は TCII-コバラミン複合体受容体を持つ標的細胞に取り込まれる。

細胞内でコバラミンは数段階の変換を受け、二つの酵素の補酵素として機能する。一つはメチルコバラミンを補酵素とし、5-メチルテトラヒドロ葉酸とホモシステインからメチオニンを生合成するメチオニンシンターゼ(MS)であり、生体内での様々なメチル化反応や DNA の de novo 合成系に関与する。もう一つは、バリン、イソロイシンなどの分岐鎖アミノ酸や奇数鎖脂肪酸、コレステロールなどの代謝の最終段階において、メチルマロニル-CoA を TCA サイクルの中間体であるスクシニル-CoA に変換する反応を触媒するメチルマロニル-CoA ムターゼ(以下 MCM)である、本酵素には、アデノシルコバラミンが補酵素として機能する。MCM 活性が低下すると基質であるメチルマロニル-CoA が蓄積し、それが加水分解されることによって細胞内にメチルマロン酸が生成し、メチルマロン酸尿症を引き起こす。なお、尿中メチルマロン酸排泄量はコバラミン欠乏症の指標として用いられている。メチルマロン酸尿症の症状は重篤なケトアシドーシスであり、特に先天性のメチルマロン酸尿症患者にとっては生命に係わる問題であるが、MCM の活性及び発現調節メカニズムに

についての知見はごくわずかである。本論文では、MCMに着目し、コバラミン欠乏の影響について詳細に検討した。

最初に、ラット肝臓における MCM 酵素活性及びタンパク質発現レベルに及ぼすコバラミン欠乏の影響について検討を行うために、ラットを離乳時よりコバラミン欠乏飼料を与えて飼育した。コントロール群には 25 µg/kg diet のシアノコバラミンを含む飼料を与え、20 週齢まで飼育したものをコバラミン欠乏ラットとした。

ラット肝臓における MCM 活性を測定したところ、コントロール群においても MCM のホロ活性はトータル活性(ホロ酵素+アポ酵素)の約 3%であり、MCM はそのほとんどがアポ酵素として存在していた。欠乏ラットでは予想されるとおりホロ活性はほとんど検出されなかったが、MCM タンパク質発現レベルは異常に上昇しており、トータル活性はコントロール群の約 4 倍に上昇していた。しかしながら MCM mRNA レベルには変化は見られず、MCM タンパク質発現レベルの上昇は転写の活性化によるものではないことが示唆された。

次に、培養細胞 (COS-7 細胞) 系での MCM に関する検討を行った。培地中にコバラミンを大過剰量添加してもホロ酵素はトータル酵素の 10%程度であり、ラット肝臓と同様に MCM の大半はアポ酵素であった。培地中にコバラミンを添加せずに培養すると細胞はコバラミン欠乏状態になり、ホロ活性はほとんど検出されなくなった。一方、トータル活性は約 2 倍に上昇しており、コバラミン欠乏による MCM タンパク質発現レベルの上昇が培養細胞レベルでも確認された。これらの結果から、アポ酵素がホロ酵素に比べ細胞内で安定なため欠乏細胞では MCM タンパク質の安定性 (半減期) に及ぼす培地中のコバラミン濃度の影響を調べたが、コバラミン供給細胞と欠乏の間で MCM タンパク質の安定性に差は見られなかった。

MCM 活性が低下するとメチルマロン酸が多量に生成するが、メチルマロン酸は TCA サイクルのコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であり、肝臓におけるメチルマロン酸の蓄積は呼吸活性の低下を引き起こす。また、MCM 活性の低下に起因した CoA 代謝の異常も報告されている。したがって、MCM 活性の低下したコバラミン欠乏ラットでは肝臓に何らかの障害が起きている可能性が考えられる、実際、肝臓傷害のマーカーである血漿 ALT (alanine aminotransferase)活性を測定したところ、コバラミン欠乏ラットでは正常群に比べ有意な活性上昇が観察された。さらに、細胞増殖の指標である PCNA (proliferating cell nuclear antigen)の発現レベルも異常に上昇していた。これらの異常が MCM 活性の低下に起因した現象であるかどうかについて調べる目的で、臨床的にメチルマロン酸尿症の改善に用いられる L-カルニチンを欠乏ラットに投与した。その結果、尿中へのメチルマロン酸排泄量の減少に伴って、血漿 ALT 活性の低下が観察された。しかしながら、PCNA 発現レベルはカルニチン投与では何ら影響を受けず、飼料中にメチオニンを補充することで正常化したので、メチオニンシンターゼ活性の低下がコバラミン欠乏による肝細胞の異常な増殖活性化の原因と考えられる。

MCM 活性の低下はメチルマロン酸尿症を引き起こすことが知られている。先天的な遺伝子異常によるメチルマロン酸尿症はその原因により分類されており、コバラミン応答性のメチルマロン酸尿症として 8 種類の存在が知られている。このうち、*cb1A* 型と呼ばれるメチルマロン酸尿症はミトコンドリア内におけるコバラミン補酵素合成系に障害があり、MCM の補酵素であるアデノシルコバラミンが合成されず、MCM の活性が低下すると考え

られている。近年、この *cblA* 型メチルマロン酸尿症の原因遺伝子として MMAA が同定されたが、その生理機能については未だ何の知見も得られていない。そこで、MMAA の生理機能を解明することを目的として本研究を行った。

*cblA* 型メチルマロン酸尿症患者由来の繊維芽細胞において、ホロ MCM 活性は検出されなかった。また、この細胞では MMAA 遺伝子に変異が起こっていた。そこで、この細胞に変異のない MMAA 遺伝子を導入したところ、MCM のホロ活性は回復した。この MMAA 遺伝子はタンパク質としての存在が確認されていないので、組み換え体 MMAA を用いてポリクローナル抗体を作成し、細胞内局在を調べたところ、ミトコンドリアの外膜に局在していた。したがって、MMAA タンパク質はミトコンドリア外膜においてコバラミンの輸送、あるいは補酵素型への変換に関与するタンパク質であると考えられる。

## 審査結果の要旨

コバラミン(ビタミンB<sub>12</sub>)は複雑な構造を持つ水溶性ビタミンで、非常に微量で有効で、欠乏した場合、成長遅延、神経障害、進行性の悪性貧血など、様々な症状を呈することが知られている。細胞内でコバラミンは数段階の変換を受け、二つの酵素の補酵素として機能する。一つはメチルコバラミンを補酵素とし、メチオニンを生成するメチオニンシンターゼ(MS)で、メチル化反応やDNAのde novo合成系に関与する。もう一つは、メチルマロニル-CoAをTCAサイクルの中間体であるスクシニル-CoAに変換する反応を触媒するメチルマロニル-CoAムターゼ(以下MCM)である、本酵素には、アデノシルコバラミンが補酵素として機能する。MCM活性が低下すると基質であるメチルマロニル-CoAが蓄積し、それが加水分解されることによって細胞内にメチルマロン酸が生成、メチルマロン酸尿症を引き起こす。なお、尿中メチルマロン酸排泄量はコバラミン欠乏症の指標として用いられている。特に先天性のメチルマロン酸尿症患者にとっては生命に係わる。MCMの活性及び発現調節メカニズムについての知見はごくわずかである。本論文では、MCMに着目し、コバラミン欠乏の影響について詳細に検討した成果であり、以下に概説する。

ラット肝臓における MCM 酵素活性及びタンパク質発現レベルに及ぼすコバラミンの影響を検討するため、ラットに離乳時からコバラミン欠乏飼料を与えて 20 週齢まで飼育してコバラミン欠乏ラットとした。肝臓における MCM 活性を測定したところ、コントロール群においても MCM のホロ活性はトータル活性(ホロ酵素+アポ酵素)の約 3%で、そのほとんどがアポ酵素として存在していた。欠乏ラットではホロ活性はほとんど検出されなかったが、MCM タンパク質発現レベルは異常に高く、トータル活性はコントロール群の約 4 倍であった。しかし MCMmRNA レベルには変化は見られず、MCM タンパク質発現レベルの上昇は転写の活性化によるものではないことが示唆された。また、培養細胞(COS-7 細胞)系での MCM に関する検討をした。コバラミン欠乏での MCM タンパク質発現レベルの上昇が培養細胞レベルでも確認された。この結果から、アポ酵素がホロ酵素の細胞内での安定性を検討したところ、コバラミン供給細胞と欠乏の間で MCM タンパク質の安定性に差はなかった。

MCM 活性が低下するとメチルマロン酸が多量に生成する。メチルマロン酸は TCA サ

イクルを阻害し、肝臓でのメチルマロン酸の蓄積は呼吸活性を低下させる。また、MCM 活性の低下に起因した CoA 代謝の異常も報告されている。また、肝臓傷害のマーカである血漿 ALT (alanine aminotransferase) 活性がコバラミン欠乏ラットでは有意な活性上昇が観察され、さらに、細胞増殖の指標である PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の発現レベルも異常に上昇した。これらの異常が MCM 活性の低下に起因した現象であるかどうかを調べる目的で、臨床的に尿症の改善に用いられる L-カルニチンを欠乏ラットに投与した。その結果、尿中へのメチルマロン酸排泄量の減少に伴い、血漿 ALT 活性が低下した。しかし、PCNA 発現レベルは影響を受けず、飼料にメチオニンを補充すると正常化したので、メチオニン合成の低下がコバラミン欠乏による肝細胞の増殖活性化の原因と考えられる。

MCM 活性の低下はメチルマロン酸尿症を引き起こす。先天的な遺伝子異常によるメチルマロン酸尿症はその原因により分類され、コバラミン応答性のメチルマロン酸尿症として 8 種類の存在が知られている。このうち、*cb1A* 型と呼ばれるメチルマロン酸尿症はミトコンドリア内におけるコバラミン補酵素合成系に障害があり、MCM の補酵素であるアデノシルコバラミンが合成されず、MCM の活性が低下すると考えられている。この *cb1A* 型メチルマロン酸尿症の原因遺伝子として MMAA が同定されたが、その生理機能は未だ何の知見もない。そこで、MMAA の生理機能を検討した。*cb1A* 型メチルマロン酸尿症患者由来の繊維芽細胞で、ホロ MCM 活性は検出されなかった。また、この細胞では MMAA 遺伝子に変異が起こっていた。そこで、この細胞に変異のない MMAA 遺伝子を導入したところ、MCM のホロ活性が回復した。この MMAA 遺伝子はタンパク質としての存在が確認されていないので、組み換え体 MMAA を用いてポリクローナル抗体を作成し、細胞内局在を調べたところ、ミトコンドリアの外膜に局在していたことから、このタンパク質はミトコンドリア外膜でコバラミンの輸送、あるいは補酵素型への変換に関与するタンパク質であると考えられる。

以上の成果は、栄養生理学、医学、生化学、分子生物学分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。