

ミネラルとビタミンの過不足による染色体動態への影響の検討

山田 貴富 (管理栄養学科・准教授)

1. 序論

1.1 栄養素としてのビタミンとミネラル

五大栄養素と称される糖質、タンパク質、脂質、ビタミン、ミネラルは熱量素（主としてエネルギー源となるもの）、構成素（主として筋肉や内臓、骨格など体の構成成分となるもの）、調節素（主として生体内の化学反応を調節するもの）のいずれか、またはそれらの複数として機能し、ヒトの健康や生命維持を支える。五つのうちビタミン、ミネラルは体内での存在量が僅かであるために微量栄養素とされるが、前者は調節素として、後者は調節素及び構成素として、ともに生命機能に必須の役割を果たす。

1.1.1 ビタミン

ビタミンは、「生物の生存・生育に必要であるが体内で合成されないか、合成されても必要量に満たない有機化合物」と定義されるため、外因性物質の摂取が必須である。各種ビタミンの合成の可否は生物種によって異なるため、それらの種類も同様である（例えば、ビタミンCはヒトにとってはビタミンであるが、これを合成できるイヌなどにとってはビタミンではない）。しかし、複数のビタミンは種を超えて共通であり、これはビタミンの機能が普遍的に重要であることを意味する。

ビタミンは多くの場合、酵素（生体内での化学反応を触媒するタンパク質）の活性を調節する補酵素として機能する。特に、ヒトにおける水溶性ビタミン（ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、葉酸、パントテン酸、ナイアシン、ビオチン、ビタミンC）のほとんどは生体内でのエネルギー物質として機能するアデノシン3リン酸（以下、ATP）の産生に関与する多くの酵素の補酵素である。すなわち、これらのビタミンはエネルギー産生という生命の根幹に関わる現象に寄与しており、それらの欠乏は様々な疾患、障害の原因となる。本研究でも取り上げるナイアシンとパントテン酸の欠乏は、それぞれペラグラと成長障害などを惹起する。

1.1.2 ミネラル

ミネラルは人体の構成元素のうち炭素、水素、酸素、窒素を除く元素をいい、体内での存在量に応じて多量ミネラルと微量ミネラルに分類される。前者には骨や歯などの成分となるカルシウムやリン、マグネシウムが含まれるのに対し、後者には鉄、ヨウ素、モリブデンなどが含まれ、これらは酵素の構成成分になることが多い。いずれも生物には必須の成分であり、その過不足が様々な疾患の原因となることはビタミンと共通である。

1.2 細胞と染色体

全ての生物は細胞から構成されるが、細胞の基本的な営みは酵母のような単細胞微生物

からヒトやイネのような多細胞動植物に至るまで共通であることが多い。細胞の分裂はその一例であるが、これには体細胞分裂と減数分裂があり、次に説明する（図1）。

体細胞分裂では一つの親細胞から（基本的には）全く同じ二つの娘細胞が形成され、細胞数が増える際におこる。この際、細胞は「細胞周期」と呼ばれる機構に従って秩序正しく体細胞

分裂を繰り返し、増殖する。細胞周期は染色体 DNA を合成（複製）する S 期、親細胞が2つの娘細胞に分裂する M 期、S 期での DNA 合成の準備をする G₁期、M 期の準備をする G₂期の4つの段階からなる。G₁期→S 期→G₂期→M 期→G₁期、、、、と4つの段階を規則正しく繰り返すことにより、細胞が分裂して細胞数が増加する。なお、この過程の異常は細胞の不適切な細胞増殖、さらには細胞死や細胞癌化の原因となる。

一方、減数分裂は受精や接合に関わり配偶子（精子、卵子、孢子など）を産生するための細胞分裂である。配偶子は受精や接合に備えて染色体数を半減させる必要があるため、減数分裂では1回の DNA 合成の後に2回の分裂が連続して起こる。すなわち、G₁期→S 期→G₂期→M 期（第1分裂）→M 期（第2分裂）という経過を経て配偶子形成にいたる。

体細胞分裂、減数分裂の両者において、S 期での DNA 合成、M 期での染色体の分配、各段階・現象に必要な遺伝子発現（転写）など、遺伝情報の担体である染色体は動的に変化する。加えて、減数分裂の G₂期には両親由来の染色体の再編成（減数分裂期組換えと呼ばれる）や空間的接近（対合と呼ばれる）といった現象も起こる。これらは全て種を超えてみられる普遍的な現象である。

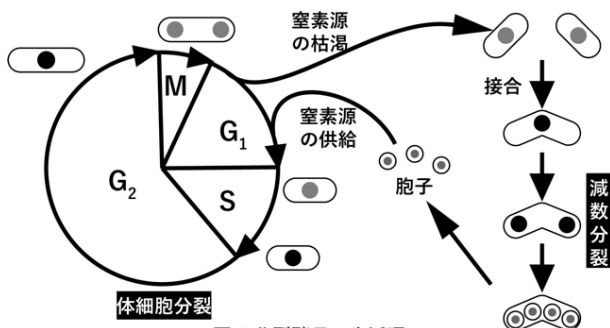


図1 分裂酵母の生活環

1.3 ミネラル、ビタミンが染色体現象に及ぼす影響

1.1で述べたように、ビタミン、ミネラルはともにヒトの成長や健康に必須の役割を果たしている。加えて、両栄養素は単細胞真核微生物を含む多くの生物において調節素として生育に必須である。これは、ビタミンとミネラルが細胞レベルでは生物種を問わず普遍的な機能を果たしていることを示唆する。特に1.2で述べた染色体現象に注目すると、以下のような例が明らかになっている。

ナイアシンは遺伝子の転写発現や染色体構造の制御に関わる酵素の活性を調節する。また、パントテン酸が代謝されて産生される補酵素 A は染色体現象制御の重要官能基であるアセチル基の供給体としても機能する。しかし、ビタミンやミネラルが染色体現象に与える寄与には不明の点が多く、研究が十分に進んでいるとはいえない。

1.4 分裂酵母

分裂酵母は単細胞真核微生物の研究モデル生物である。多彩な研究解析系が整備されている上に、その全ゲノム配列（染色体の全塩基配列の情報）が解明されていることから、様々な分野の基礎研究に頻用されている。1.2で述べた細胞周期の研究にも分裂酵母は大

きく貢献し、それを担った英国の Sir Paul Nurse は2001年度ノーベル生理学医学賞を受賞した。また、ヒト等の高等真核生物に類似した染色体構造を持つことから、染色体関連現象の研究にも有用である。

分裂酵母も生育にビタミンとミネラルを必要とし、培地（細胞を培養するために必要な栄養素を溶解したもの）はこれらを含む。ビタミンはビオチン、ナイアシン（Li et al. 2007）、パントテン酸、イノシトール（Voicu et al. 2002）の4種類である。前3者はヒトのビタミンでもあり、イノシトールも（体内で合成できることからビタミンに分類されないものの）ヒトでのビタミン様物質とされる。分裂酵母に必要なミネラルはホウ素、マンガン、亜鉛、鉄、モリブデン、ヨウ素、銅で、これらは全てヒトにおいても重要な栄養素である。

分裂酵母は栄養素が豊富な条件下では1倍体としても2倍体としても体細胞分裂により増殖する（図1、これはヒトなどと異っており、ヒトの場合、個体を形成し、増殖する細胞のほとんどが父親由来の染色体と母親由来の染色体の2セットを持つ2倍体であり、1倍体は精子や卵子などのごく一部である）。しかし、培地中の窒素源が枯渇すると接合型（ヒトなどの場合の性別に相当する）の異なる1倍体同士で接合し、2倍体を形成した後に減数分裂を行い、1倍体の胞子を形成する。胞子は外界の栄養条件が改善すると通常の1倍体細胞に戻り体細胞分裂を行なって増殖する。

1.5 本研究の狙い

本研究は1.1から1.3で説明した内容を踏まえ、微量栄養素が種を超えて共通に持つ基盤的な細胞機能に注目する。これらの機能を明らかにすることは、ヒトの健康を目標とする栄養学、医学にのみならず基礎生命科学においても極めて重要な課題である。しかしながら、現在でのビタミン・ミネラルの研究は前者にかけられるウェイトが大きく、後者についての理解は十分ではない。

このような状況において、申請者はビタミン・ミネラルの細胞機能における基本的な機能を明らかにしたいと考えた。特に、有用なモデル生物である分裂酵母（1.4参照）に分子遺伝学・生化学の手法を用いて染色体関連現象の研究を専門としてきた経緯をもとに、分裂酵母においてビタミン・ミネラルが染色体の動態に及ぼす影響を調べる。これにより両栄養素の未知の機能を明らかにすること、および栄養学と染色体生物学の接点を創出することを目指す。

2. 材料と方法

2.1 分裂酵母株と細胞培養

本研究で用いた分裂酵母株とそれらの遺伝子型（ ）内は次の通りである：HM 1 (h^{90})、HM 3 (h^{+})、TYK 1 ($h^{+}/h^{-} ade 6-210/ade 6-216$)。

分裂酵母細胞の培養にはPM培地（0.3% Potassium hydrogen phthalate, 0.18% Na_2HPO_4 , 0.5% NH_4Cl , 2% Glucose, 2% salts solution, 0.01% minerals solution）をベースとして、4種のビタミン（40.8 μ M ビオチン、81.2mM ナイアシン、4.2mM パントテン酸、55.5mM イノシトール）を必要に応じて添加したものを用いた。胞子形成、 G_1 期細胞の濃縮には標準的な窒素源除去による方法を用いた（Yamada et al. 2013）。また、DNA合成の進行はフ

ローサイトメトリーを用いた標準的な方法により観察した。

2.2 接合と孢子形成率の測定

接合と孢子形成の誘導には SPA 寒天培地 (0.1% KH_2PO_4 , 2% Glucose, 3% 寒天) をベースとして、4種のビタミン (40.8 μM ビオチン、81.2mM ナイアシン、4.2mM パントテン酸、55.5mM イノシトール) を必要に応じて添加したものを用いた。両過程は通常の光学顕微鏡による明視野法により観察し、接合率と孢子形成率を算出した (Kunitomo et al. 1995)。

3 結果と考察

本年度は、ビタミンとミネラルが関わる染色体現象を明らかにするため、体細胞分裂により増殖する細胞、減数分裂を行う細胞についての基本的な解析を行なった。先にビタミンの影響を調べたところ、興味深い結果が得られているので、現段階ではビタミンについての研究を先行させている。現在までに得られている結果とその考察は以下の通りである。

3.1 G_1 期細胞の細胞周期再開へのビタミンの寄与

細胞周期制御におけるビタミンの影響を探るため、HM3株を用いて DNA 合成の前後の現象を調べた。解析を容易にするため、体細胞分裂を繰り返して増殖している分裂酵母細胞の培養液中 (通常、分裂酵母では G_2 期の時間が長いため、 G_2 期の細胞が全体の7割程度を占める) から窒素源を除去することで増殖を G_1 期で停止させ、 G_1 期の細胞を濃縮した (この過程にはビタミンの寄与は認められなかった; data not shown)。その後、窒素源を含む新鮮な培地に細胞を移し (培地交換)、増殖を再開させた。交換後の培地として、4種類のビタミン全てを含むもの、4種類のいずれか一つを除去したものの5種類を用い、それぞれのビタミンの寄与を検討した。その結果、全てのビタミンを含む培地、ナイアシンを欠く培地、ビオチンを欠く培地に移された細胞に比べると、パントテン酸を欠く培地とイノシトールを欠く培地に移された細胞では、DNA 合成に遅延が認められた。しかしいずれの場合とも、培地交換5時間後までには DNA 合成が終了し、ほとんどの細胞が G_2 期に移行していた (data not shown)。興味深いことに、培地交換5時間後の時点で、パントテン酸を欠く培地とイノシトールを欠く培地に移された細胞は、他の3種の培地に移された細胞よりも細胞長が短かった (図2)。以上の結果は、イノシトールとパントテン酸は細胞周期再開後の DNA 合成には必須でないものの、細胞の成長に必要である可能性が示唆された。

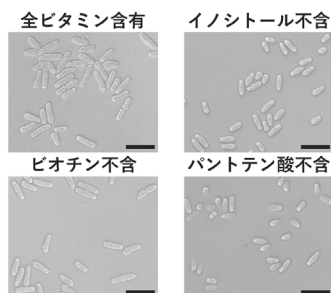


図2 ビタミンの細胞成長への寄与
窒素源除去により G_1 期で停止させた細胞を、4 種全てのビタミンを含む培地、
ビオチンを含まない培地、イノシトールを含まない培地、パントテン酸を含まない培地
(いずれも窒素源を含む) に移し、5 時間後に顕微鏡下で写真を撮影した。
Scale Bar は全て 20 μm

3.2 接合と孢子形成へのビタミンの寄与

各種ビタミンが減数分裂時の DNA 関連現象に及ぼす影響を検討する手がかりとするため、接合と孢子形成への寄与を調べた。このため HM 1 株を、4 種類のビタミン全てを含む SPA 寒天培地、4 種類のいずれか一つを除去した寒天培地の計 5 種類に播種した。30℃で2日間、保温した後、光学顕微鏡下で観察して接合率を計測した。その結果、ナイアシンがない場合でも全ビタミン存在下と同様の接合率が計測された。また、ビオチン非存在下では、ビタミン存在下、ナイアシン非存在下の場合より有意に低下したものの、やはり高効率での接合が見られた。しかしながら、パントテン酸またはイノシトールの非存在下ではまったく接合が見られず(図3)、パントテン酸やイノシトールは接合に必須の働きを持つ可能性が考えられた。イノシトールについてのこの結果は、既報と一致しており、イノシトールの接合における重要性が確認されたといえる (Voicu et al. 2002)。一方で、パントテン酸が同様の特徴を持つことについては申請者の知る限り新規の知見である。

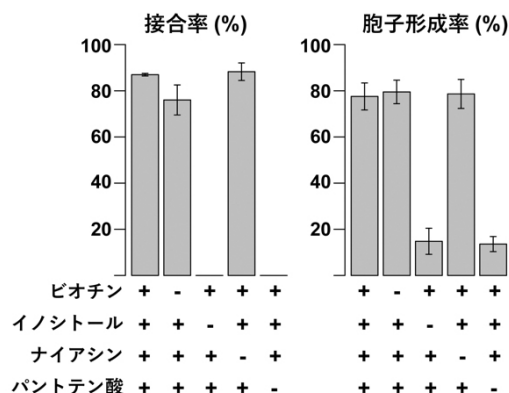


図3 ビタミンの接合と孢子形成における寄与
各種ビタミンの存在 (+) と非存在下 (-) で1倍体細胞間での接合率と2倍体細胞における孢子形成率を測定した。結果は3回の独立な実験の平均値とそれらの間の標準偏差として示している。

続いて、孢子形成への各種ビタミンの関与を調べた。このため、全ビタミン存在下での接合により得た2倍体細胞 (TYK 1) を安定に培養し、これを4種類のビタミン全てを含む SPA 寒天培地、4種類のいずれか一つを除去した SPA 寒天培地の計5種類に播種した。30℃で2日間、保温した後、光学顕微鏡下で観察して孢子形成率を計測した。その結果、すべてのビタミンを含む培地、ナイアシンを欠く培地、ビオチンを欠く培地の3つの場合は80%程度の孢子形成率が認められた。対照的にパントテン酸またはイノシトールを欠く培地での孢子形成率は15%程度にとどまった(図3)。これらの結果は、パントテン酸とイノシトールは接合の過程に加え、接合後の孢子形成 (減数分裂) の過程にも重要であることを示している。既報では、イノシトールは接合後の減数分裂の過程には不要とされていた (Voicu et al. 2002)。しかし、今回の結果は、この既報での知見に再考を迫るものであるとともに、パントテン酸についての新規知見を提供するものである。

4 今後の展望と計画

今後は、これまでに得た結果をリファインするとともにこれらを発展させ、論文にまとめて早急に投稿することを目指す。その際、以下のトピックに注目する。

4.1 細胞周期関係の解析

現段階ではパントテン酸とイノシトールの(1)G₁期での細胞周期を停止した細胞の、細胞周期再開後の成長、(2)接合、(3)孢子形成の3つにおける重要性を示唆する結果が得られている。今後はまず、二つのビタミンがどのように上記の3つの現象に関与しているか

を明らかにする。分裂酵母にはさまざまな変異体が取得されているので、パントテン酸非存在下、イノシトール非存在下と同様の異常を示す変異体について解析する。

4.2 染色体関連現象の解析

並行して、本申請の本題である染色体現象についての研究に着手する。減数分裂期には多数の染色体関連現象が起こるが、これらは全て正常な孢子形成に必要である。従って、パントテン酸とイノシトールが染色体現象の制御を介して正常な孢子形成に寄与する可能性が考えられ、これを検討する。

4.3 パントテン酸とナイアシンの未知機能の解析

本研究では、ともにエネルギー産生に重要な役割を果たすパントテン酸とナイアシンは対照的な結果を示した。すなわち、本研究で調べた複数の事象について前者の欠如は異常を示したが、後者の欠如は示さなかった。これは以下の可能性を示唆するものといえる。

- ・当該現象は、エネルギー産生とは異なる面において、パントテン酸を必要とするがナイアシンは必要としない可能性
 - ・パントテン酸とナイアシンは、細胞内での必要量や半減期で異なる特徴を持つ可能性
- これらの検討は、二つの水溶性ビタミンが持つ新規機能の解明に発展しうるため、来年度の本研究の計画に含める。

5 引用文献

- Kunitomo H., Sugimoto A., Wilkinson C. R. M., and Yamamoto M. : *Schizosaccharomyces pombe* *pac 2⁺* controls the onset of sexual development via a pathway independent of the cAMP cascade **Current Genetics** vol. 28 pp.32-38, 1995
- Li Y.-F., Bao W.-G. : Why do some yeast species require niacin for growth? Different modes of NAD synthesis **FEMS Yeast Res.** vol.7 pp. 657-64 2007
- Voicu P. M., Poitelea M., Schweingruber M. E., and Rusu M. : Inositol is specifically involved in the sexual program of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Arch. Microbiol.** vol.177 pp.251-8, 2002
- Yamada S., Ohta K., and Yamada T. : Acetylated Histone H 3 K 9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H 3 K 4 methylase Set 1 in fission yeast. **Nucleic Acids Research** vol. 41 pp.3504-3517, 2013

謝辞

結果について議論をしてくださっている山本歩教授(静岡大学)、実験に協力してくださっている村上浩士教授(中央大学)、小菅清二教育技術員(中央大学)に感謝申し上げます。