

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580122

研究課題名 (和文) トリプトファン代謝鍵酵素の脳内免疫における役割と神経毒生成機構の解明

研究課題名 (英文) The role of tryptophan-niacin key enzymes in brain' s immune system

研究代表者

江頭 祐嘉合 (YUKARI EGASHIRA)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：80213528

研究成果の概要 (和文)：

神経毒キノリン酸の産生増加因子 EPA やデヒドロイソアンドロステロンによる ACMSD mRNA の低下は核内転写因子 PPAR $\alpha$  を介さないことを示した。糖尿病時の肝細胞内外におけるキノリン酸濃度を調べた結果、細胞内で生成したキノリン酸を細胞外へ積極的に排出する機構の存在が示唆された。脳神経マクローファージ細胞ミクログリアの培養液に LPS と食品成分を添加した時、ある種のポリフェノールは IDO の発現を有意に低下させることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

The L-tryptophan (Trp) metabolites such as L-kynurenine (Kyn), L-kinurenic acid, quinolinic acid (QA) and picolinic acid (PA) have been shown physiologically important in central nervous and immune system. Dietary dehydroisoandrosterone (DHEA) affects quinolinic acid (QA) production. The present study suggesting that the mechanism of decrease in ACMSD mRNA level by DHEA was different from that by WY-14,643, and that there would be any pathway other than PPAR $\alpha$  mediated one for DHEA to regulate ACMSD expression.

In the STZ-induced diabetes group, the amount of [5- $^3$ H]L-Trp converted to tritiated water, L-Kyn or QA were found to be more than 3 times of that in the control group, respectively. It is suggested that STZ-diabetes mellitus causes augmentations of both L-Kyn and QA generations but not those of PA and Nam in liver, indicating the possibility that the immune and neuronal systems of insulin dependent diabetes mellitus would be influenced by the increased amounts of L-Kyn and QA but not by those of PA and Nam.

Inflammation-induced activation of the tryptophan catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) causes increase of QA production. We investigated which dietary components affect IDO expression in microglial cells. This study suggests that some dietary polyphenols affected LPS-induced IDO expression in microglial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：トリプトファン、ナイアシン、キノリン酸、神経毒、ミクログリア、脳

1. 研究開始当初の背景

トリプトファンは哺乳類の生体内で水溶性ビタミンのナイアシンに転換されることが知られている。キノリン酸はトリプトファン・ナイアシン転換経路の中間代謝産物であるが、中枢神経系においては、神経細胞中のNMDAレセプターを介して神経細胞を変性させる。このキノリン酸量の増大がてんかん、パーキンソン病などの神経変性を伴う疾患の一因と考えられている。高齢化社会に向け、キノリン酸生成のしくみや神経変性のしくみについて明らかにすることは重要である。

2. 研究の目的

トリプトファン・ナイアシン転換経路においてアミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素 (ACMSD と略す) はトリプトファンからナイアシンおよびキノリン酸の生成量を決定する鍵酵素である。ACMSD は栄養シグナル、ホルモンシグナル、糖尿病などの疾病により活性が変動し、キノリン酸の生成量に影響するが、その調節機構については不明である。本研究ではその点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

実験1. 糖尿病の状態では脳、肝臓、腎臓のACMSD活性が上昇する。そこでACMSD活性

を高めたストレプトゾトシン誘発インスリン非依存性糖尿病ラットの初代培養肝細胞を用いてACMSDの遺伝子発現と炎症に関わりのあるキノリン酸(QA)や他のトリプトファン代謝産物(L-キヌレニン(L-Kyn)、ピコリン酸(PA)、ニコチンアミド(Nam))の細胞内濃度と細胞外(細胞培養液)濃度を測定した。

細胞はコラゲナーゼ灌流法によって分離した。遺伝子発現はrealtime-RT-PCRにより測定した。細胞外液、および細胞内液中に含まれるトリチウムラベルされたトリプトファン由来の代謝産物量の測定は同位体希釈法を用いて分離精製を行った。細胞外液、または細胞内抽出液と、目的とする物質の非標識物質を大量に混合した溶液をイオン交換カラム、活性炭カラム、セルロース薄層クロマトグラフィーによって分離し、液体シンチレーションシステムで放射活性を、また、吸光法によって濃度を測定し、比活性を求めた。これより、一時間のインキュベーションにおいて生成したトリチウムラベルトリプトファン由来の代謝産物量を求めた。

実験2. ペルオキシソーム増殖活性がある性ホルモンデヒドロイソandroステロンはキノリン酸の産生を増加させる。その機序を調べるため、デヒドロイソandroステロンと核内転写因子PPAR $\alpha$ の阻害剤MK886をラ

ットの初代培養肝細胞に添加し、デヒドロイソアンドロステロンによる ACMSD 遺伝子発現抑制作用と PPAR $\alpha$  の関係を調べた。細胞はコラゲナーゼ灌流法によって分離した。遺伝子発現は *realtime*-RT-PCR により測定した。

実験 3. ミクログリア細胞株 MG6 に LPS で炎症を誘発させ ACMSD を含む主要トリプトファン代謝酵素の遺伝子発現を調べた。遺伝子発現は *realtime*-RT-PCR により測定した。

実験 4. ラット ACMSD の 5' 上流プロモーター領域を TFSEARCH で解析した。

#### 4. 研究成果

実験 1. ストレプトゾトシン誘発インスリン非依存性糖尿病ラット肝細胞の ACMSD mRNA の発現が約 13 倍上昇した(図 1)。生成したキノリン酸は細胞外へ大量に排出された(図 2)。この結果から細胞内におけるキノリン酸を細胞外へ排出させる機構の存在が示唆された。

L-キヌレニン は血液脳関門を通過することができる。糖尿病の肝細胞は正常な肝細胞に比べ細胞外に放出された L-キヌレニンの量は約 3 倍以上であった(図 2)。細胞内抽出液中に存在する量は両群とも検出限界以下であった。糖尿病時の中枢神経系の合併症にこれらトリプトファン代謝産物が関与している可能性が考えられる。細胞内におけるピコリン酸やニコチンアミドは少量検出されたが、キノリン酸や L-キヌレニンと比較して著しく低い値であった(図 2)。

### Effect of STZ-induced diabetes on the mRNA expression of the enzymes in hepatocytes

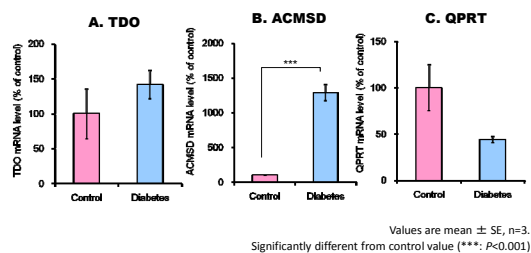


図 1. ストレプトゾトシン誘発インスリン非依存性糖尿病ラット肝細胞におけるトリプトファン代謝主要酵素の mRNA 発現

TDO: トリプトファン 2, 3 ジオキシゲナーゼ

ACMSD: アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ

QPRT: キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ

### The amount of tryptophan metabolites generated from [5-<sup>3</sup>H]L-Trp in hepatocytes

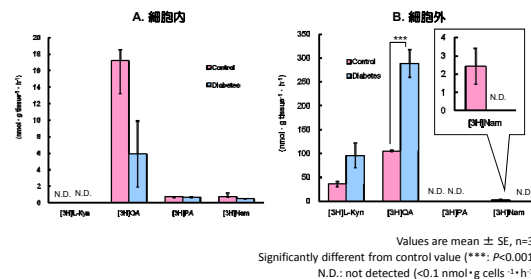


図 2. ストレプトゾトシン誘発インスリン非依存性糖尿病ラット肝細胞におけるトリプトファン代謝産物の細胞内外の量

QA: キノリン酸

L-Kyn: L-キヌレニン

PA: ピコリン酸

Nam: ニコチンアミド

実験 2. デヒドロイソアンドロステロンの添加により ACMSD mRNA の発現は減少した。しかし、PPAR $\alpha$  の阻害剤を同時に添加しても

ACMSDmRNA の発現の回復はみられず、デヒドロイソアンドロステロンによる ACMSD 遺伝子発現抑制作用は PPAR  $\alpha$  非依存的なメカニズムであることが示唆された。

実験 3. 細胞培養液に LPS を添加することによりトリプトファン代謝酵素 IDO (Indoleamine 2, 3-dioxygenase) の発現が有意に誘導されたが、ACMSD の発現は見られなかった。細胞培養液にポリフェノールを添加したところ、ある種のポリフェノールは IDO の発現を有意に抑制した。

実験 4. ラット ACMSD の 5' 上流プロモーター領域をソフトウェア TFSEARCH で解析した。その結果、グルココルチコイド、HNF4  $\alpha$  などいくつかの核内転写因子の結合配列が見出された。今後、レポーターアッセイなどを行い、詳細に調べていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1) 佐々木菜穂、真田宏夫、江頭祐嘉合、初代培養肝細胞における糖尿病時のトリプトファン異化代謝産物の変動、アミノ酸研究 4(2), 179-183 (2010)

2) N Sasaki, Y Egashira, H Sanada, Production of L-tryptophan-derived catabolites in hepatocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Nutr.* 48(3) 145-153 (2009)

3) 飯島穂、佐々木菜穂、真田宏夫、江頭祐嘉合、抗高脂血症剤とトリプトファン代謝アミノ酸研究 2(2), 147-150 (2008)

[学会発表] (計 6 件)

1) 松田寛子、五味亮太、平井静、江頭祐嘉合 食品成分によるトリプトファン・ナイアシン代謝酵素の発現調節機構に関する研究、

日本農芸化学会関東支部 2010 年度支部大会 (2010)

2) 松田寛子、五味亮太、平井静、江頭祐嘉合、食品成分フィトールによるトリプトファン・ナイアシン代謝酵素の遺伝子発現調節機構、日本トリプトファン研究会第 32 回学術集会 (2010)

3) 佐々木菜穂、真田宏夫、江頭祐嘉合 In vivo と in vitro における糖尿病時のトリプトファン代謝産物の変動、日本トリプトファン研究会第 32 回学術集会 (2010)

4) Y Egashira, M Okamura, H Sanada, Effect of dehydroisoandrosterone on tryptophan metabolism and quinolinic acid production in rats. 国際栄養学会議 (2009)

5) Y Egashira, H Sanada, K Saito, M Okamura, Dietary interaction and hormones affect serum quinolinic acid production in rats, accompanied with alteration of ACMSD activity and its mRNA expression. 国際トリプトファン学会 (2009)

6) 岡村美那子、齋藤邦明、真田宏夫、江頭祐嘉合、デヒドロイソアンドロステロンによるラットの血中キノリン酸量への影響、第 62 回日本栄養食糧学会大会 (2008)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 祐嘉合 (YUKARI EGASHIRA)  
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授  
研究者番号：80213528