

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450150

研究課題名(和文) 脳内環境を保護するトリプトファン代謝鍵酵素の食品成分による制御機構

研究課題名(英文) A study on mechanism of tryptophan metabolic key enzymes protecting the brain environment by food ingredients

研究代表者

江頭 祐嘉合 (Egashira, Yukari)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：80213528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファン代謝鍵酵素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)の低下、インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ(IDO)の上昇は神経毒キノリン酸の産生を増加させる。そこでこれらの酵素の食品成分による調節機構を検討した。エネルギー制限食はACMSD活性を上昇させること、ラットACMSDは転写因子HNF4alphaにより調節されることを示した。

LPSで炎症誘導したミクログリア細胞にフェルラ酸を添加し培養すると、IDOが有意に減少した。フェルラ酸のIDO抑制のメカニズムに、I $\kappa$ Bの分解抑制によるNF $\kappa$ B経路の阻害およびP38MAPKのリン酸化抑制が関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：Enhanced indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) or decreased amino carboxymuconate semialdehyde decarboxylase (ACMSD) expression leads to increased levels of toxic metabolite quinolinic acid. In this study, we investigated the regulatory mechanism of tryptophan metabolic key enzymes by food ingredients. We found energy restricted diet increased ACMSD activity, and rat ACMSD was regulated by the transcription factor HNF4 alpha and other transcription factors. Moreover, we examined the effect of ferulic acid (FA) in microglial cells on IDO expression levels and its mechanism. FA suppressed LPS-induced IDO mRNA expression and also suppressed nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and phosphorylation of p38 MAPK in microglial cells. Our results indicate that FA decreases LPS-induced IDO expression, which may be mediated by suppression of the NF- $\kappa$ B and p38 MAPK pathways.

研究分野：食品科学

キーワード：トリプトファン NAD ナイアシン キノリン酸 ファイトケミカル 炎症 ミクログリア ACMSD

## 1. 研究開始当初の背景

トリプトファン代謝産物キノリン酸は中枢神経系に多量に存在すると NMDA 型グルタミン酸受容体を介して神経細胞を変性させることが報告されている。キノリン酸の産生に影響を及ぼす鍵酵素としてインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO), 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), キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) が挙げられる。IDO の上昇, ACMSD, QPRT の低下はキノリン酸の産生を上昇させることが報告されている。しかし、これらの食品成分による変動や調節機構は明らかではない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、脳内環境を保護するトリプトファン代謝鍵酵素の食品成分による調節機構の一部を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験 1) 長寿遺伝子といわれているサ - チュインを活性化させることが報告されている摂取エネルギー制限 (食餌のカロリー制限), および同様の作用が報告されている赤葡萄果皮に含まれているポリフェノールの一種レスベラトロールを投与した時のラットのトリプトファン代謝の変動を検討した。

実験 1 - 1 では標準食自由摂取群 (Standard; S), 標準食 40% 制限群 (Standard Restriction; SR), 高タンパク無脂肪食自由摂取群 (Control; C), 高タンパク無脂肪食 40% 制限群 (Control Restriction; CR) に分け、ラットを飼育した。実験 1 - 2 ではレスベラトロール無投与群, レスベラトロール投与群に分け飼育した。

実験 2) 血中キノリン酸濃度と ACMSD 活性は負の相関関係がある。ラット ACMSD の

調節機構を分子レベルで解明するため、ラットの ACMSD のプロモーター部位のレポータープラスミドの作製を検討した。転写因子結合予測部位に変異を導入あるいは変異を導入しないプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを用いて、レポーターアッセイを行った。さらにゲルシフトアッセイも行った。

実験 3) マウスの研究で脳内のアミロイドを減少させることが報告されているポリフェノールに注目し、炎症誘導時のマウス由来ミクログリア細胞のトリプトファン代謝鍵酵素へのポリフェノールの影響と作用機序について検討した。

### 実験 3 - 1)

マウス由来のミクログリア細胞 MG6 に、リポ多糖 (LPS) と穀類由来のポリフェノールフェルラ酸 (FA) を共添加し 24 時間培養した。培養後、細胞を回収し、トリプトファン代謝鍵酵素の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定した。また、培養液中に放出された NO は Griess Reaction 法で、TNF, IL-6 は ELISA 法で測定した。作用機序を調べるため、細胞を回収し、NF $\kappa$ B シグナル伝達経路への影響について Western blot 法を用いて検討した。

### 実験 3 - 2)

マウス由来のミクログリア細胞 MG6 に、リポ多糖 (LPS) とタマネギ由来のポリフェノールケルセチン (QA) を共添加し 24 時間培養した。培養後、細胞を回収し、トリプトファン代謝鍵酵素の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定した。また、培養液中に放出された NO は Griess Reaction 法で、TNF, IL-6 は ELISA 法で測定した。

#### 4. 研究成果

実験1：ACMSD 活性値および遺伝子発現は、エネルギーを制限 (SR 群, CR 群) することにより, S 群および C 群より有意に上昇した。この時, HNF4 および PGC1 の遺伝子発現も同様の動きを示した。

レスベラトロールの投与は ACMSD 活性に影響を与えなかった。

実験2：ラット ACMSD のプロモーター部位 (5' 上流領域) に存在する HNF4 alpha 結合予測部位が、転写活性を上昇させることを示した。さらに、ゲルシフトアッセイを行ったところ, HNF4 alpha が結合することが示唆された。

植物油脂に含まれる リノレン酸や魚油に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) が転写活性に及ぼす影響を検討したところ、リノレン酸と DHA は ACMSD の転写活性を低下させた。

実験3：ミクログリア細胞 MG6 に LPS を添加し培養すると炎症が誘導され、トリプトファン代謝鍵酵素のひとつ IDO の発現が有意に上昇した。一方、ACMSD の発現には変化が見られなかった。また、培養液中に放出された NO, TNF, IL-6 量も有意に増加した。LPS とともに FA を添加した群は、LPS 添加 FA 無添加群に比し、IDO の発現上昇を有意に低下させた。また LPS 添加により誘導される I $\kappa$ B $\alpha$  の分解は、FA の添加により抑制された。さらに核内の NF- $\kappa$ B の移行も FA の添加により抑制された (図1)。P38MAPK のリン酸化も FA により抑制されたが、JNK, ERK のリン酸化には影響しなかった。

以上の結果から、FA の炎症時における IDO 発現抑制のメカニズムの一部に、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解抑制による NF $\kappa$ B 経路の阻害および P38MAPK のリン酸化抑制が関与することが示唆された。

ミクログリア細胞 MG6 に LPS を添加し培養すると炎症が誘導され、トリプトファン代

謝鍵酵素のひとつ IDO の発現が有意に上昇した。また、培養液中に放出された NO, TNF, IL-6 量も有意に増加した。LPS とともに QA を添加した群は、LPS 添加 QA 無添加群に比し、IDO の発現上昇を有意に低下させた。また、QA は、NO, TNF, IL-6 量も有意に低下させた。

以上の結果から、QA はミクログリア細胞において LPS 誘導炎症を抑制し、IDO の発現も抑制することを示した。

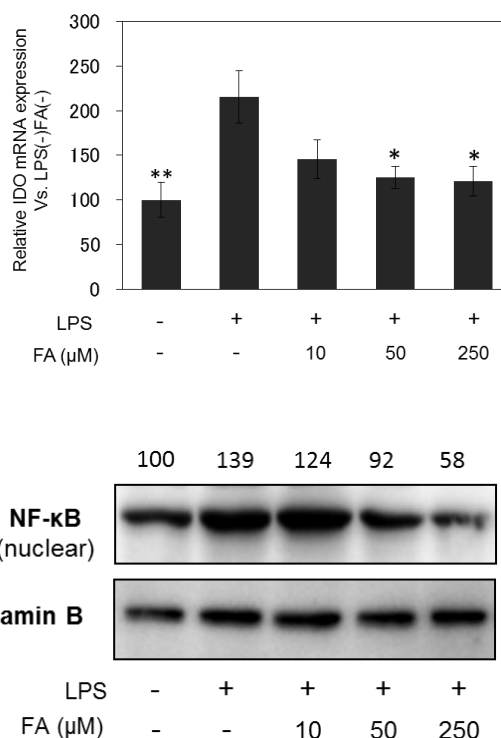


図1. LPS で炎症を誘発したミクログリア細胞の IDO の発現および細胞核内の NF- $\kappa$ B の発現に及ぼすフェルラ酸の影響

Values indicate mean  $\pm$  SE. \* $p$  < 0.05, \* $p$  < 0.01 vs culture treated with LPS alone (Tukey test).

( *Biosci Biotechnol Biochem.* ( 2017 ) 81(5):966-971.より引用 )

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

M Koshiguchi, H Komazaki, S Hirai, Y Egashira (2017) Ferulic acid suppresses expression of tryptophan metabolic key enzyme indoleamine 2, 3-dioxygenase via NFκB and p38 MAPK in lipopolysaccharide-stimulated microglial cells, *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(5):966-971.

江頭祐嘉合 (2017) 野菜およびフィトケミカルの健康機能性, 食品と科学, 59(4):63 - 67.

### 〔学会発表〕(計7件)

江頭祐嘉合, 越口愛美, 高内健志, 平井静 (2016) LPS 誘発炎症ミクログリア細胞のトリプトファン代謝鍵酵素に及ぼすケルセチンの影響と作用機序, 日本トリプトファン研究会 (東京農業大学, 東京都, 世田谷区) 12月10~11日

越口愛美, 平井静, 江頭祐嘉合 (2016) ACMSD 発現調節機構における HNF4 および PGC1 の役割, 日本栄養・食糧学会大会 (武庫川女子大学, 兵庫県, 西宮市) 5月14~15日

江頭祐嘉合, 高内健志, 越口愛美, 平井静 (2016) ケルセチンは NF B 経路を介して LPS 誘発炎症ミクログリア細胞におけるトリプトファン代謝鍵酵素を抑制する, 日本アミノ酸学会 (東京大学, 東京都, 文京区) 9月13日

Y Egashira (2015) Regulation of ACMSD, a key enzyme in the tryptophan-NAD pathway, by diet and hormones, The 14<sup>th</sup> International Society for Tryptophan Research (ISTRY) Conference (Michigan, USA)

9月16日

杉本光季, 越口愛美, 平井静, 江頭祐嘉合 (2015) エネルギー制限によるトリプトファン代謝鍵酵素 ACMSD 発現調節機構の解明, 日本アミノ酸学会 (滋賀県立大学, 滋賀県, 彦根市) 10月23日

江頭祐嘉合, 倉部隼, 越口愛美, 駒崎仁, 平井静 (2014) 脳炎症時のトリプトファン代謝鍵酵素に及ぼすファイトケミカルの影響, 日本トリプトファン研究会 (旭川医科大学, 北海道, 旭川市) 10月18日

越口愛美, 駒崎仁, 平井静, 江頭祐嘉合 (2014) 炎症誘導ミクログリア細胞におけるトリプトファン代謝鍵酵素 IDO の発現抑制作用, 日本栄養・食糧学会大会 (北海道大学, 北海道, 札幌市) 6月1日

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

越口 愛美 (KOSHIGUCHI, Manami)  
平井 静 (HIRAI, Shizuka)