

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860379

研究課題名(和文) 精神疾患の血液生化学的診断マーカーとしての血中キヌレニン酵素的測定法の開発

研究課題名(英文) Development of an enzymatic assay for the determination of kynurenine

## 研究代表者

藤垣 英嗣 (FUJIGAKI, HIDETSUGU)

広島国際大学・保健医療学部・講師

研究者番号：00612631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファンの代謝産物であるキヌレニン(KYN)の血中および脳脊髄液中濃度の上昇とうつ病の重症度には関連があることが明らかになっている。うつ病の血液生化学的診断マーカーとしての応用を目指してKYN酵素的測定法の開発を行った。バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて、KYNを代謝する酵素であるキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ(KMO)およびキヌレニンアミノトランスフェラーゼ2(KAT2)の組換え型酵素の精製に成功した。さらに、これらの酵素を用いた試料中KYNの酵素的測定法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Kynurenine (KYN) is a metabolite of L-tryptophan. An increased KYN concentration in the blood and cerebrospinal fluid is associated with the pathogenesis of depression. The purpose of this study is to develop an enzymatic assay for the determination of KYN as a diagnostic marker for depression. We have succeeded in purifying KYN-metabolizing enzymes; kynurenine 3-monooxygenase and kynurenine aminotransferase2, using baculovirus expression system. Furthermore, we have succeeded in developing an enzymatic assay for KYN using the recombinant enzymes.

研究分野：臨床化学

キーワード：トリプトファン代謝 キヌレニン うつ病

## 1. 研究開始当初の背景

必須アミノ酸であるトリプトファンは、生体内においてタンパク質合成に利用されるだけでなく、生化学的に代謝され種々の生理活性を持つ代謝産物が生成する。生体内のトリプトファンの主な代謝経路はキヌレニン経路である。キヌレニン経路により産生する代謝産物は神経毒性を持つなど、精神・神経疾患の病態と深く関与していることが示唆されている。特にキヌレニン経路の中間代謝産物であるキヌレニン (KYN) の血中および脳脊髄液中濃度は、うつ病患者で上昇し、自殺未遂を起こした患者ではさらに上昇することから、血中および脳脊髄液中 KYN 濃度とうつ病の重症度には関連があることが明らかになっている。うつ病などの精神疾患患者数は近年大幅に増加しており、医療機関を受診していない者を含めると患者数はさらに多いと考えられる。うつ病は適正な治療によって治癒する可能性があり、早期の発見が予後改善と再発防止に有効であるが、うつ病の診断は専門医による問診が必要であり、健康診断や専門外の診療科において患者を発見するのは困難である。そこで、健康診断時や専門医でなくても診断できる客観的な診断マーカーの早期開発が望まれている。上記のように、血中および脳脊髄液中 KYN 濃度はうつ病で上昇し、さらに、重症度とも関係があることから、生体試料中 KYN の測定は精神疾患の生化学的診断マーカーとして利用できる可能性が高い。しかし、現在用いられている主な KYN 測定法は高速液体クロマトグラフィーを用いた方法であり、除タンパクなど検体の前処理が必要、多数検体の同時測定ができないなど、臨床で用いるには不備な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、KYN を代謝する酵素であるキヌレニン 3-モノオキシゲナーゼ (KMO) およびキヌレニンアミノトランスフェラーゼ 2 (KAT2) の組換え型酵素を精製し、酵素法による KYN 迅速測定法を開発することを目的とし、精神疾患、特にうつ病の血液生化学的診断マーカーとしての利用を目指して検討を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) バキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いた KMO および KAT2 の組換え型酵素の発現と精製

真核生物特有の翻訳後修飾能力を持つバキュロウイルス・昆虫細胞発現系を用いて組換え型酵素 (rKMO および rKAT2) を発現・精製した。ヒト脳 total RNA から RT-PCR 法により得たヒト KMO または KAT2 遺伝子を含むバキュロウイルスベクターを構築し、昆虫細胞 (Sf9) に感染させ、rKMO または rKAT2 を細胞内に発現させた。rKMO と rKAT2 は His タグ融合タンパクとして発現させ、アフィニティカラムを用いて精製した。精製した rKMO および rKAT2 の純度を SDS-PAGE により確認した。また、それぞれの酵素の至適温度や至適 pH、Km 値や最大反応速度 ( $V_{max}$ ) の測定を行い、酵素反応の最適条件を検討した。

- (2) rKMO または rKAT2 を用いた KYN 酵素的測定法の開発

rKMO による KYN 測定は、補酵素 NADPH の 340 nm における吸光度の減少量測定により行った。rKAT2 による KYN 測定は、酵素反応後の反応液に亜鉛を加え、生成物であるキヌレニン酸と亜鉛の複合体が発する蛍光を蛍光マイクロプレートリーダーで測定することにより行った。

## 4. 研究成果

- (1) rKMO および rKAT2 の生化学的的特性解析

精製した rKMO を SDS-PAGE 電気泳動により確認したところ、推定分子量である約 58 kDa のバンドが確認された (図 1)。高分子量側に数本のバンドも確認され、翻訳後修飾の存在が推測された。

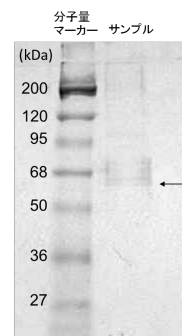


図 1. rKMO の SDS-PAGE 電気泳動像

至適 pH と至適温度の検討から、至適 pH は 7~8、至適温度は 30~40 であることが確認された。酵素活性の特性をミカエリス・メンテンのプロットにより解析したところ、最大反応速度 ( $V_{max}$ ):  $329.3 \pm 43.6$  nM/min、ミカエリス定数 ( $K_m$ ):  $56.3 \pm 24.0$   $\mu$ M、比活性:  $23.5 \pm 0.4$  nmol/min/mg であった (図 2)。

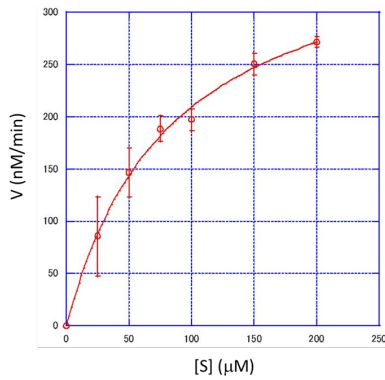


図 2 . rKMO のミカエリス・メンテンのプロットによる解析

精製した rKAT2 を SDS-PAGE 電気泳動により確認したところ、推定分子量である約 48 kDa 付近に単一のバンドが確認された(図 3)。

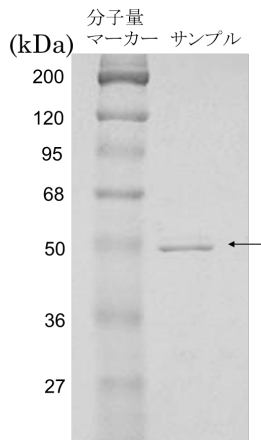


図 3 . rKAT2 の SDS-PAGE 電気泳動像

至適 pH と至適温度の検討から、至適 pH は 8 付近、至適温度は 30 ~ 60 であることが確認された。酵素活性の特性をミカエリス・メンテンのプロットにより解析したところ、最大反応速度 ( $V_{max}$ ):  $64.3 \pm 21.6 \mu\text{M}/\text{min}$ 、ミカエリス定数 ( $K_m$ ):  $2.9 \pm 1.1 \text{ mM}$  であった(図 4)。

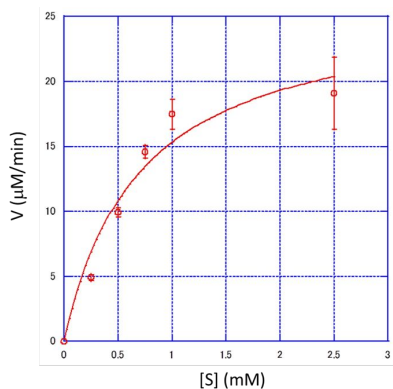


図 4 . rKAT2 のミカエリス・メンテンのプロットによる解析

以上の結果より、rKMO と rKAT2 とともに、バキュロウイルス・昆虫細胞発現系により活性を保持した十分な量の酵素の精製に成功した。これらの酵素を用いて KYN 測定の検討を行った。

## (2) rKMO または rKAT2 を用いた KYN 酵素的測定法の開発

rKMO を用いて各種濃度の試料中 KYN 濃度を NADPH の減少量の測定により求めることを試みた。試料中 KYN に rKMO が作用する際、補酵素 NADPH が消費されるため、その消費速度を 340 nm における吸光度の変化量として求めた。図 5 に示すように、試料中 KYN 濃度に依存的に吸光度変化量が上昇し、酵素法による KYN 測定は可能であることが示唆された。

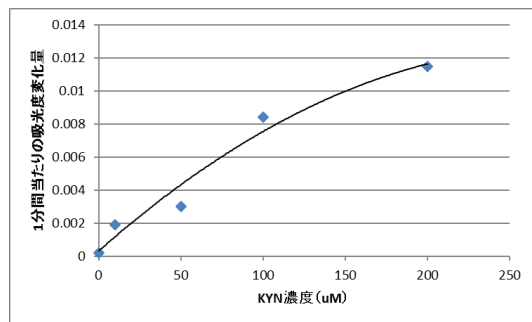


図 5 . rKMO による酵素的 KYN 測定

しかし、健常人血中 KYN 濃度は約  $1 \mu\text{M}$  であり、このままでは検出限界以下であることから、酵素サイクリング反応を利用して更なる高感度化が必要であると考えられた。

rKAT2 を用いた酵素的 KYN 測定法についても同様に、各種濃度の試料中 KYN 測定を試みた。7.8  $\mu\text{M}$  ~ 125  $\mu\text{M}$  まで良好な希釈直線性が得られた(図 6)。

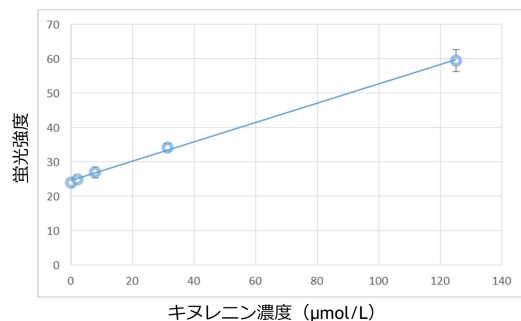


図 6 . rKAT2 による酵素的 KYN 測定

以上の結果より、rKMO と rKAT2 を用いた試料中 KYN 測定に成功した。今後、更なる高感度測定を可能とし、うつ病の生化学的診断マーカーとしての有用性を検討する。また、上記 1) の結果より、KMO においては翻訳後修飾の存在が確認された。KMO の抑制剤はアルツハイマー病などの神経変性疾患の治療薬として近年注目されている。本研究により発

現・精製に成功した rKMO の生化学的特性の解析をさらに行い、rKMO の新規阻害剤の開発へと繋がる研究も今後行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- 1) L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences.  
Fujigaki H, Yamamoto Y, Saito K  
Neuropharmacology. 2016 Jan 6.  
pii: S0028-3908(16)30011-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.011.

[学会発表](計4件)

- 1) 松尾円香、藤垣英嗣、石田有里、三東由樹、藤川紗英、川本雅也、笹根真介、山本康子、斉藤邦明  
キヌレニン酸素添加酵素の生化学的特性の解析とN結合型糖鎖の検出  
第38回日本分子生物学会年回・第88回日本生化学会合同大会  
神戸ポートアイランド  
2015年12月1~4日
- 2) Hidetsugu Fujigaki, Akiko Sakamoto-Morise, Suwako Fujigaki, Kanako Hirabayashi-Takahashi, Masato Hoshi, Yasuko Yamamoto, Sanford P. Markey, and Kuniaki Saito  
A rapid and highly sensitive method to evaluate the quinolinic acid using recombinant enzymes with HPLC-fluorescence detection.  
The 14th International Society for Tryptophan Research Conference.  
Van Andel Research Institute in Grand Rapids, Michigan (USA)  
September 16-18, 2015.
- 3) 三東由樹、藤垣英嗣、松尾円香、藤川紗英、速水啓介、板羽秀之、山本康子、斉藤邦明  
バキュロウイルスノ昆虫細胞発現系を用いた組換えキヌレニン酸素添加酵素の精製と生化学的解析  
第10回日本臨床検査学教育学会学術大会  
信州大学医学部  
2015年8月19~21日
- 4) 藤川紗英、藤垣英嗣、松尾円香、三東由樹、速水啓介、板羽秀之、山本康子、斉藤邦明  
組換えキヌレニンアミノ基転移酵素2の

発現・精製と生化学的解析  
第10回日本臨床検査学教育学会学術大会  
信州大学医学部  
2015年8月19~21日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤垣 英嗣 (FUJIGAKI, HIDETSUGU)  
広島国際大学・保健医療学部・講師  
研究者番号: 00612631