

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580158

研究課題名(和文)脳炎症時におけるトリプトファン代謝鍵酵素による神経毒制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the regulatory mechanisms of neurodegeneration by tryptophan key enzymes

研究代表者

江頭 祐嘉合 (Egashira, Yukari)

千葉大学・園芸学研究所・教授

研究者番号：80213528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファン代謝産物である神経毒キノリン酸は神経変性患者の脳で上昇することが報告されている。このキノリン酸の産生に影響を与える酵素にインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ(IDO)と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)がある。

本研究ではミクログリア細胞あるいはマウスにリポ多糖LPSで炎症を誘発した時IDOの発現を制御する食品成分(穀類由来のポリフェノール)とそのメカニズムの一部(IKB $\alpha$ の分解抑制)を明らかにした。また葉野菜に含まれるフィトールでACMSDの発現が変化し、PPAR $\alpha$ などの転写因子がその調節に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：Quinolinic acid (QA), a tryptophan metabolite, was observed to increase in brains of patients with neurodegenerative diseases. Indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO) and amino carboxymuconate semialdehyde decarboxylase (ACMSD) affect QA production. In this study, we investigated the effect of some food components on IDO or ACMSD expression in microglial cells or LPS treated mice involved in neurodegenerative disease pathogenesis. Polyphenols in cereals suppressed IDO expression in microglial cells and in brain of LPS treated mice. Our results suggest that inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway may be partly involved in the regulatory mechanism of IDO expression by polyphenols in cereals. We also found that phytol decreased ACMSD activity, its protein and mRNA expression. It is possible that this mechanism resulted from the activation of PPAR $\alpha$ . Some food components may be considered helpful for avoiding central nervous system inflammation.

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

トリプトファンの中間代謝産物であるキノリン酸は、中枢神経系においては、多量に存在すると神経細胞上の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神経変性を伴う疾患を引き起こす原因の一つではないかと考えられている。神経変性疾患としてパーキンソン病、アルツハイマー病などが知られている。超高齢化社会に向けて神経変性疾患を予防することは重要と思われる。

## 2. 研究の目的

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)およびIndoleamine 2,3-deoxygenase (IDO)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支配する鍵酵素である(図1)。ACMSDは食品成分・エネルギー・ホルモンなどのシグナルや肝炎、腎炎、糖尿病などの疾病により活性が変動し、それに伴い体内のキノリン酸の生成量に影響を及ぼす。IDOは通常活性が非常に低く、検出できないが、炎症刺激により活性が誘導され、それに伴いキノリン酸の生成量が増加する。しかし、キノリン酸に影響を与えるこれらの酵素の調節機構は不明である。そこで本研究では、これらの調節機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳炎症時におけるフェルラ酸の影響

脳内で免疫防御を担っているミクログリア細胞(マウス由来)をダルベッコMEM培養液(10%FBS含)で培養し、その培養液に高濃度のLPS(リポ多糖)を添加し炎症を誘発した。炎症の誘導は、培養液に分泌されたNO、炎症性サイトカインTNFの量を測定し確認した。LPSの添加と同時に食品成分フェルラ酸(FA)も濃度を変えて添加し(L:低濃度、M:中濃度、H:高濃度)、5~30分間処理後、細胞を回収して、IDOの発現およびNF- $\kappa$ B経路およびMAPK経路のタンパク質ERK、JNK、p-38のリン酸化をウエスタン・ブロット法にて測定し、炎症シグナル因子に及ぼす影響を検討した。

LPSで脳に炎症を誘発したマウスにFAを2週間投与し、脳におけるIDOの発現を定量PCRで測定した。

### (2) ACMSDの活性に影響を与える食品成分の探索とメカニズムに関する研究

LPSにより誘導される炎症では、ACMSDの発現は誘導されない。しかし、肝炎、腎炎によりACMSD活性が低下し、キノリン酸の産生が増加することが報告されている。また

ACMSDの阻害剤であるピラジニアミドをラットに投与するとキノリン酸が増加することも報告されている。

そこで、本実験では葉野菜に含まれているフィトールをラットに投与し、ACMSDの活性に及ぼす影響とその調節機構について検討した。

ファイトケミカルであるフィトールは、葉野菜に多く含まれ、抗酸化作用があることが報告されている。また、脂質代謝のマスターレギュレーターPPARのアゴニストとして作用することも知られている。100gのホウレンソウに62mgのフィトールが含まれている(Baxter JH, 1968)。

4週齢のSD系雄ラットを予備飼育後、0.5~2%のフィトールを含む高タンパク質無脂肪食をラットに与え、7日間自由摂取させた。

実験終了後、各臓器のACMSDの活性、タンパク質発現、遺伝子発現を測定した。また、PPAR $\alpha$ の活性化の指標となるACOMRNAも測定した。

### (3) 高コレステロール血症時のACMSDの発現と調節機構

ACMSDの調節機構を明らかにするため、高コレステロール血症時のACMSDの変動と調節機構について検討した。

SD系雄ラットにコレステロールを含む食餌を10日間投与し、高コレステロール血症を誘発させた(血中総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール値で確認)。ACMSD活性と、核内転写因子SREBPの発現を測定した。

初代培養細胞にコレステロール+25-ヒドロキシコレステロールを添加し、ACMSDとSREBP-2のタンパク質発現を測定した。

コレステロールの合成を抑制するスタチン系薬剤を添加し、ACMSDとSREBP-2のタンパク質発現を測定した。

### (4) ACMSDの転写因子結合部位の探索

TFSEARCHを用いてラットの5'上流領域における転写因子結合部位の予測を行った。

数種類のプラスミドを作成し、レポーターアッセイを行い、プロモーター活性を測定した。レポーターベクター中のHNF4 $\alpha$ 結合領域の塩基配列に対し、inverse PCR法により変異導入を行った。細胞にレポーターベクターと内部標準をトランスフェクトした。6時間後に培地交換を行い、48時間後にルシフェラーゼ活性の測定を行った。

## 4. 研究成果

(1) LPSの添加によりミクログリア細胞中のIDOの発現は有意に上昇した。一方、培養液にFAを添加するとLPS添加FA無添加のものに比し、MとHの添加でIDOの発現が有意に低下した(図2)。

次に、FAのIDO抑制のメカニズムに

NFκB 経路、MAPK 経路の関与を検討した結果、FA は IκBα の分解を抑制した。しかし、ERK, JNK, p-38 のリン酸化には影響しなかった。

LPS を投与することによりマウスの脳の IDO が LPS 無投与群の 2 倍以上に上昇した。FA を摂取した群は脳の IDO の上昇が対照群より有意に低下した。

以上の結果から、FA は in vitro の実験でも in vivo の実験でも IDO の発現を低下させることを明らかにした。

脳内マクロファージであるミクログリア細胞において FA は MAPK 経路には作用せず、NFκB 経路を阻害することにより、IDO の発現上昇を抑制する可能性が示唆された。

(2) フィトールを投与した群はこの投与量が多くなるにしたがい肝臓の ACMSD 活性、タンパク質発現、mRNA 発現をより強く阻害した(図 3、4)。この結果からキノリン酸の増加が予想される。ACOMRNA も上昇したことから、ACMSD の調節に PPARα の活性化が一部関与している可能性が示唆された。

(3) 高コレステロール血症を誘発させたラットの ACMSD 活性、タンパク質発現、mRNA 発現は低下した。核内転写因子 SREBP の発現は減少した。

初代培養細胞にコレステロール+25-ヒドロキシコレステロールを添加すると ACMSD と SREBP-2 のタンパク質発現は減少する傾向がみられた。

コレステロールの合成を抑制するスタチン系薬剤を添加すると、ACMSD と SREBP-2 の発現は有意に上昇した。

ACMSD はコレステロール代謝と関連しており、ACMSD の遺伝子発現は SREBP 2 が関与している可能性が示唆された。

(4) ACMSD の転写因子結合部位の探索を行った。TFSEARCH により HNF4α、SREBP などの脂質代謝関連因子の結合部位を見出した。HNF4α、SREBP の結合領域を含むレポーターベクターを細胞に導入した時、空ベクターの導入時と比べて活性が有意に上昇した。転写因子 HNF4α の結合部位に変異を導入すると、ルシフェラーゼ活性が低下した。以上の結果から HNF4α は ACMSD 遺伝子のプロモーター領域と相互作用することで ACMSD の転写を活性化する可能性が示唆された。

今後ゲルシフトアッセイ等を行い、詳細を明らかにしていく予定である。

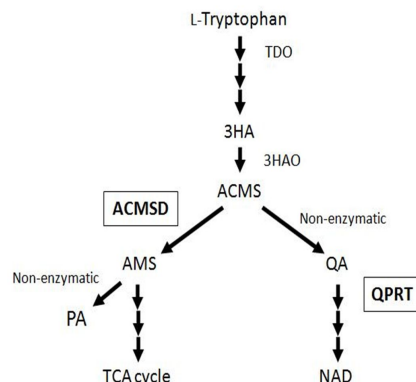


図 1 . トリプトファン・ナイアシン代謝図  
炎症がおこると TDO (正常時では主に肝臓に発現する)ではなく、主に免疫担当細胞において IDO が誘導される。  
QA : キノリン酸  
TDO : トリプトファン 2,3,ジ オキシゲナーゼ

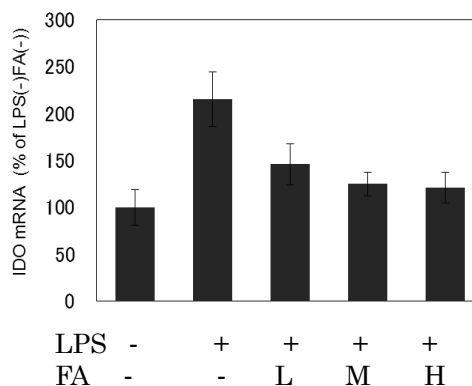


図 2 . FA が LPS 処理ミクログリア細胞の IDOmRNA の発現に及ぼす影響  
LPS(+)+FA(M) と LPS(+)+FA(H) の IDOmRNA の発現は LPS(+)+FA(-)より有意に減少した。

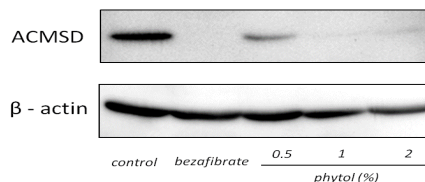


図 3 . フィトールが ACMSD のタンパク質発現に及ぼす影響  
(Biosci. Biotech. Biochem. 2013 に掲載済み)  
ポジティブ・コントロールとしてベザフィレート (PPARα のアゴニスト) を用いた。

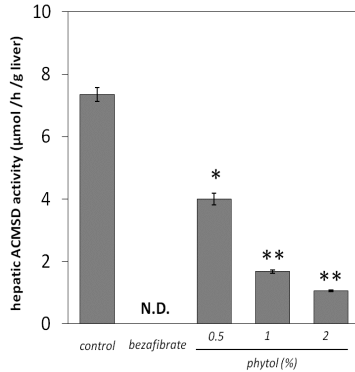


図 4 . ACMSD 活性に及ぼすフィトールの影響  
(*Biosci. Biotech. Biochem.* 2013 に掲載済み)

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) Hiroko Matsuda, Mayumi Sato, Mako Yakushiji, Manami Koshiguchi, Shizuka Hirai, and Yukari Egashira, Regulation of rat hepatic  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme in the tryptophan-NAD pathway, by dietary cholesterol and sterol regulatory element-binding protein-2. *Eur.J. Nutr.* 2014,53,469 - 477 (査読有り)

2) Hiroko Matsuda, Ryota Gomi, Shizuka Hirai, and Yukari Egashira Effect of dietary phytol on the expression of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme of tryptophan-niacin metabolism in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2013,77(7), 1416-1419 (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1) Manami Koshiguchi, Hitoshi Komazaki, Masako Otsuka, Shizuka Hirai, Yukari Egashira, Modulatory effect of ferulic acid on LPS-induced indoleamine 2, 3-deoxygenase (IDO) expression in microglia  
国際栄養学会議 (2013.9.19) グラナダ (スペイン)

2) 松田寛子、薬師寺真子、中込友梨、越口愛美、平井静、江頭祐嘉合、多価不飽和脂肪酸リノール酸によるトリプトファン代謝鍵酵素 ACMSD の活性抑制機構に関する研究、日本栄養・食糧学会大会 (2013.5.25) 名古屋大学 (愛知県)

3) Yukari Egashira, Naho Sasaki, Kuniaki Saito, Minoru Iijima A mechanism for the production of quinolinic acid by dietary components or medicine  
国際トリプトファン学会 (2012.11.7-9) シドニー (オーストラリア)

4) Mayumi Sato, Hiroko Matsuda, Mako Yakushiji, Shizuka Hirai, Yukari Egashira, The study on relationship between ACMSD activity and cholesterol metabolism in rats  
国際トリプトファン学会 (2012.11.7-9) シドニー (オーストラリア)

5) Hiroko Matsuda, Ryo-ta Gomi, Shizuka Hirai, Yukari Egashira, Effect of dietary phytol on the expression of  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase, a key enzyme of tryptophan-niacin metabolism in rats,  
国際トリプトファン学会 (2012.11.7-9) シドニー (オーストラリア)

6) 佐藤麻弓、五味亮太、松田寛子、薬師寺真子、平井静、江頭祐嘉合、高コレステロール負荷がラットにおけるトリプトファン代謝系の主要酵素活性と遺伝子発現に及ぼす影響  
日本トリプトファン研究会 (2011.12.4) 東邦大学 (千葉県)

7) 松田寛子、平井静、江頭祐嘉合、食品成分フィトールがトリプトファン・ナイアシン代謝鍵酵素の遺伝子発現に及ぼす影響  
日本栄養・食糧学会大会 (2011.5.15) お茶ノ水女子大学 (東京都)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 祐嘉合 (Egashira, Yukari)

千葉大学・大学院園芸学研究所・教授

研究者番号 : 80213528