

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780140

研究課題名(和文) QPRTノックアウトマウスを用いた真正ナイアシン欠乏症とその発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of true niacin deficiency and its pathogenic mechanisms using QPRT knockout mice

研究代表者

佐野 光枝 (Sano, Mitsue)

滋賀県立大学・人間文化学部・助教

研究者番号：20524911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ナイアシン欠乏によって小腸の内輪層が影響を受け、ペラグラの特征的症状である消化器疾患が現れることが示唆された。またナイアシンによって影響を受ける代謝経路は栄養素欠乏の影響を同時に受けていることから明らかにすることはできなかったが、今後食餌摂取量が減少しない時点での解析を更に進める必要があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Niacin deficiency was caused in QPRT knockout mice via a niacin-deficient diet, and the resulting biological abnormalities in that condition were analyzed. The present study suggested that the inner circular layer of the small intestine is affected by niacin deficiency, and that gastrointestinal diseases appear with characteristic symptoms of pellagra. In addition, although the effects of niacin on metabolic pathways could not be clarified because of the influence of simultaneously occurring nutritional deficiency, the necessity of continuing future analysis without reducing the amount of food intake was apparent.

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：栄養生化学 水溶性ビタミン ナイアシン 分子栄養学 栄養化学

1. 研究開始当初の背景

ナイアシンを補酵素として必要とする酵素は500種類にも及び、全酵素の20%以上を占める。ナイアシンの欠乏症である「ペラグラ」は皮膚炎、下痢、神経障害といった症状が引き起こされる全身性の病気である。このペラグラは20世紀前半にアメリカ南部地域などに多くみられたが、現在でも難民キャンプなど動物性食品の供給が少ない場所でその発生が報告されている。

ヒトはもちろんマウスでも、ナイアシンは食餌由来のものに加えてTrpからも合成される。したがって「ペラグラ」はナイアシン摂取不足に加えてTrp摂取量が極端に少ない状態になって初めて発症する。過去の実験動物をもちいたナイアシン欠乏の研究では、飼料中のナイアシンを欠乏させることに加えてTrpを制限しているが、常にTrp欠乏による交絡因子を排除出来ず、更にTrpからのナイアシンの合成量をゼロにすることが出来ないために、これまでペラグラの発症に及ぼすナイアシンのみの機能を明らかにすることは不可能であった。

キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPRT)はTrp-NAD経路の分岐点に位置するキノリン酸(QA)を代謝する酵素である。本研究では真のナイアシンの機能を明らかにしたいと考えており、そのためには十分なTrpを摂取した上でTrpからのナイアシンの供給量をゼロに出来る実験動物が必要である。そこで本研究ではQPRTに注目し、この酵素をノックアウトしたマウスを作成した。このノックアウトマウスではQPRTの酵素活性を失っていること、そしてナイアシン欠乏餌を与えることで体重減少が起こることは既に確認している。(ノックアウトマウスは通常飼料で飼育している限り、出生・発育・外見・生殖機能すべてにおいて野生型マウスと全く同様である。)

2. 研究の目的

本研究グループによって作成されたQPRTノックアウトマウスはTrp-NAD経路を失っており、これまで明らかにすることが出来なかったナイアシンのみの機能を、Trpの不足を考慮することなく解析することの出来る新しい実験動物である。ナイアシンは欠乏症である「ペラグラ」の原因物質であるという観点から一時注目されたが、ナイアシンを投与すれば治ること、Trpからも一部合成されるためにナイアシンの投与量のみをコントロールすることが出来ず解析が困難であったことから、ナイアシンの純粋な機能やペラ

グラの発症機構は明らかになっていない。

本研究によりこれまで明らかにされることがなかった真正ナイアシン欠乏症の症状や、そこから推定されるナイアシンの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

QPRTノックアウトマウスにナイアシン欠乏飼料を与えてナイアシン欠乏症を起こし、その状態での生体に起きた異常について解析する。ここではナイアシンを含んだ通常飼料で飼育した場合と比較してナイアシン欠乏飼料を与えたノックアウトマウスにのみナイアシンの最終代謝産物(N¹-メチルニコチンアミド, N¹-メチル-4-ピリジン-3-カルボキシアミド(4-Py), N¹-メチル-2-ピリジン-5-カルボキシアミド(2-Py), ニコチンアミド-N-オキシド)の尿中排泄量やナイアシンから合成されるNADやNADPの血中及び肝臓中含量が枯渇していることを定量的に確認すると共に、ペラ

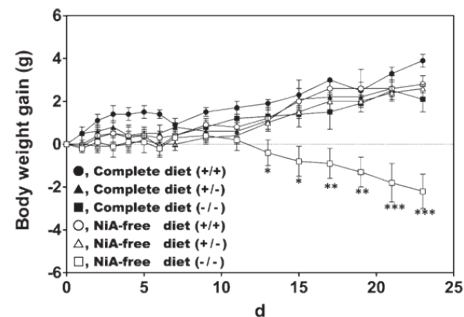


FIGURE 2 Daily change in body weight of 8-wk-old $qprr^{+/+}$, $qprr^{+/-}$, and $qprr^{-/-}$ mice fed a complete diet containing 2.3 g L-Trp/kg with or without 30 mg NIA for 23 d. Means at one time without a common letter differ, $P < 0.05$. Values are means \pm SEM, $n = 5-7$. NIA, nicotinic acid.

グラの特徴的的症状である皮膚炎や消化器疾患の有無を中心に、全身を組織科学的手法(ヘマトキシリン-エオシン染色など)によって観察する。また同時に肝臓をサンプルとして網羅的メタボローム解析を行い、ナイアシン欠乏によって影響を受ける物質の探索を行う。メタボローム解析によって注目すべき物質が得られたなら、その物質の血中だけでなく臓器中含量と尿中排泄量を定量的に測定することで確認し、その物質が血中で増加もしくは減少する機構とナイアシンの生体機能について明らかにする。

4. 研究成果

QPRTノックアウトマウスにナイアシン欠乏飼料を与えることでナイアシン欠乏症を起こし、その状態での生体に起きた異常について解析した。

ノックアウトマウスに通常飼料を与えた場合()はWT(+ / +)群(,)と同様の体重増加量を示すが、ナイアシン欠乏

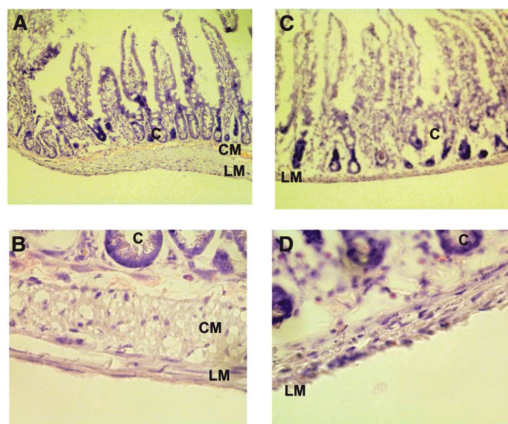


FIGURE 3 Histological observation of the small intestine in *qprt*^{-/-} mice fed a complete diet (A,B) and *qprt*^{-/-} mice fed an NiA-free diet (C, D) (H&E staining). A and C, Magnification = 100-fold. B and D, Magnification = 400-fold. C, Crypt; CM, inner circular layer of smooth muscle cell; H&E, hematoxylin and eosin; LM, outer longitudinal layer of smooth muscle cell; NiA, nicotinic acid.

飼料を与えた場合 () は 10 日以降に体重減少を示し、ナイアシン欠乏となることが示された。また血中 NAD と NADP 含量を定量分析すると、ナイアシン欠乏によって枯渇することも明らかになった。

組織科学的解析においてはナイアシン欠乏群と非欠乏群のノックアウトマウスの肝臓、腎臓、腸など複数の臓器をパラフォルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色によって観察した。その結果、小腸の内輪層が極端に薄くなっていることが観察された (Figure3-D)。このことから、ナイアシン欠乏症であるペラグラの特徴的症状である消化器疾患の原因は小腸の内輪層がナイアシン欠乏によって損傷を受けることによって起こることが示唆された。観察した他の臓器には異常は観察されなかった。

ノックアウトマウスにナイアシン欠乏飼料を与える前、与えた後体重が減少する前 (ナイアシン弱欠乏群)、体重が減少した後 (ナイアシン強欠乏群) の 3 つのタイムポイントで各 n=1 であったが肝臓をサンプルにメタボローム解析を実施した。その結果、GABA 合成経路に異常が観察されたので、その後 HPLC 法によって追試したが、異常は認められなかった。メタボローム解析結果では、ナイアシン欠乏の影響よりもナイアシン欠乏によって飼料摂取量が減少することによる飢餓の影響が強く出ており、この点を考慮して、よりマイルドな時点でのメタボローム解析を実施する必要があることが明らかとなった。

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)

Terakata M, Fukuwatari T, Sano M, Nakao N, Sasaki R, Fukuoka S, Shibata K. Establishment of true niacin deficiency in quinolinic acid phosphoribosyltransferase knockout mice. *J Nutr.*, 査読有, 2012, pp.2148-2153, DOI: 10.3945/jn.112.167569.

[学会発表](計 2 件)

寺方美希, 佐野光枝, 福渡努, 福岡伸一, 柴田克己, QPRT 遺伝子欠損マウスを用いたナイアシン欠乏モデル動物のメタボローム解析, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 (平成 24 年 5 月・宮城県仙台市)

Katsumi Shibata, Miki Terakata, Tsutomu Fukuwatari, Mitsue Sano, and Shin-ichi Fukuoka., The establishment of a true niacin-deficient model animal QPRT-KO mouse., 13th Conference of the International Society for Tryptophan Research (November, 2012, Sydney, Australia)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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

佐野 光枝 (Sano Mitsue)

滋賀県立大学・人間文化学部・助教

研究者番号: 20524911

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：