

平成 16 年度厚生労働科学研究費(循環器疾患等総合研究事業)
日本人の食事摂取基準(栄養所要量)の策定に関する研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

II. 主任研究者の報告書

7. ヒト, ラット, マウスにおけるトリプトファン-ニコチンアミド代謝の比較

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

トリプトファン-ニコチンアミド代謝経路の中間代謝産物にはユニークな生理活性を示す化合物が多く存在するため, ヒトのモデル動物が必要となる. 我々はヒト, ラット, マウスのニコチンアミド異化代謝経路を比較した結果, ヒトとラットでは基本的に同じ異化代謝経路が作動しており, ラットはヒトのモデル動物として使用できることを明らかにした. そこで, 今回は, トリプトファン-ニコチンアミドの全代謝産物, 特にトリプトファン-キノリン酸代謝産物について比較を行った. ヒトでは, アンスラニル酸, キヌレン酸, キサンツレン酸, 3-ヒドロキシアンスラニル酸及びキノリン酸の各排泄量が, 全トリプトファン代謝産物に対する割合は, いずれも 5%以下であった. ラットでは, キヌレン酸が 20%弱, キサンツレン酸が 10%強, キノリン酸が 30%弱排泄されており, ヒトとはかなり異なった排泄パターンであった. アンスラニル酸と 3-ヒドロキシアンスラニル酸の排泄量はごくわずかであった. マウスの排泄パターンは比較的ヒトに類似していたが, キサンツレン酸が 20%弱であったことが, 異なる点であった. これらの結果から, ヒトではトリプトファンが開裂すれば, 途中の中間代謝産物が蓄積することなく, 一気にニコチンアミド異化代謝産物まで流れやすいことが明らかとなった. ラットでは, 神経毒のキノリン酸が蓄積しやすいが, アンタゴニストのキヌレン酸も同程度蓄積していた. マウスではヒトと同じく, キノリン酸の蓄積は全く認められず, 速やかにニコチンアミド異化代謝経路に流入することが明らかとなった. 従って, トリプトファン-キノリン酸代謝に関する研究モデルとしては, マウスが適していることが明らかとなった.

A. 目的

ニコチンアミドが生体内で必須アミノ酸の L-トリプトファンから生合成されることは良く知られている¹⁾。トリプトファン-ニコチンアミド転換経路上(Fig. 1.)にはユニークな生理活性を示す化合物が多く存在する。例えばキサンツレン酸は糖尿病を誘発し²⁾、またその一方マラリアの生殖母細胞活性因子であり³⁾アゴニストである⁴⁾。キノリン酸は脳内にある興奮性アミノ酸レセプターである N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA)レセプターのアゴニストであり⁵⁾、また一方、キヌレン酸とアンスラニル酸は、アンタゴニストであり^{6,7)}、ニューロプロテクタントである。また、3-ヒドロキシアンスラニル酸は神経系細胞を相乗効果的に攻撃する⁸⁾。よって、トリプトファン-ニコチンアミド転換経路調節のメカニズムを解明することは我々にとって有用である。トリプトファン-ニコチンアミド転換経路を研究するにあたって、ヒトに類似した適切なモデル動物を必要としているが、実験動物のこれらの代謝パターンは報告されていない。(マウスの主要なニコチンアミド代謝産物はニコチンアミド N-オキシドであるが、これはヒトやラットからは検出されない⁹⁾.)

我々はヒト、ラット、マウスのニコチンアミド異化代謝経路を比較し、ヒトとラットでは基本的に同じ異化代謝経路が作動していることを報告した。本研究では、Trp-ニコチンアミド転換経路を研究するにあたって最適な実験動物を選ぶために、トリプトファン-ニコチンアミドの全代謝産物、特にトリプトファン-QA 代謝産物について比較を行った。

B. 研究方法

(1) 試薬

飼料に使用したカゼイン、L-メチオニン、ショ糖は和光純薬工業(株)より購入した。ミネラル混合 (AIN93 配合)、ビタミン混合 (AIN93 配合)、セルロースパウダーはオリエンタル酵母工業(株)より購入した。

尿中代謝産物の定量用標準品として使用していたアンスラニル酸(AnA)、キヌレン酸(KA)、キサンツレン酸(XA)、3-ヒドロキシアンスラニル酸(3-HA)、N1-メチルニコチン

アミド (MNA) は東京化成工業(株)より、キノリン酸(QA)、ニコチンアミドは和光純薬工業(株)より購入した。N1-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、N1-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)は合成した^{10,11)}。

本実験は滋賀県立大学実験動物委員会で承認を受け、独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理委員会において承認を受けて行った。

(1) 被験者

健康な女子学生 10 人を被験者とした。被験者の年齢は 20.9 ± 0.6 才、身長は 162.6 ± 1.3 cm、体重は 54.67 ± 1.57 kg であった。7 日間精製食 (Table 1.) を摂取させ、実験最終日に 24 時間尿を採集した。

集めた 24 時間尿は、分析するまで塩酸酸性下、 -20°C で保存した。

(2) 実験動物

6 週齢の Wistar 系雄ラットと ICR 系雄マウス 5 匹を日本クレア(株)より購入し、代謝ケージに入れた。飼料は 20%カゼイン食¹²⁾を与え、21 日間飼育した。実験最終日に 24 時間尿を採集した。

集めた 24 時間尿は、分析するまで塩酸酸性下、 -20°C で保存した。

(3) トリプトファン-ニコチンアミド代謝産物の測定方法

尿を $0.45\mu\text{m}$ のマイクロチューブでろ過し、これに含まれる AnA¹⁵⁾、KA¹²⁾、XA¹⁴⁾、3-HA¹⁴⁾および QA¹⁶⁾を各々文献に示した HPLC 法で直接測定した。

尿中の MNA の定量は、強アルカリ下でアセトフェノンと縮合させることにより、蛍光物質に変換し、これを HPLC にて測定した¹³⁾。

尿中のニコチンアミド、2-Py および 4-Py の定量には、尿に炭酸カリウムを飽和量加えた後、ジエチルエーテルで抽出し、乾固させた抽出液を水に溶解したものを HPLC にて測定した¹¹⁾。

C. 結果

Table 2 に、ヒト、ラット、マウスにトリプトファン-ニコチンアミド代謝物質の尿中排泄量を示した。Fig. 2.はそれぞれ尿中排泄量のパーセントをトリプトファン代謝物質総量に対する値で示した。

トリプトファン-ニコチンアミド転換経路の研究上この経路は二つに分けられ、一つがトリプトファン-QA代謝経路で、もう一つがQA-ニコチンアミド代謝経路である。

トリプトファン-QA代謝経路において、ヒトでは、AnA,KA,XA,3-HA,QAの各排泄量が、全トリプトファン代謝産物に対する割合は、いずれも5%以下であった。ラットでは、KAが20%弱、XAが10%強、QAが30%弱排泄されており、AnAと3-HAの排泄量はごくわずかであった。これらの結果は、トリプトファン-QA代謝パターンがヒトとラットで極めて異なることを示している。マウスでは、トリプトファン-QA代謝経路での主要な尿中代謝産物はXAで、それはトリプトファン代謝物質総量の20%弱を占め、AnA,KA,3-HA,QAの尿中排泄量は非常に低値を示した。代謝パターンはラットとヒトよりマウスとヒトで類似していることが解った。したがって、トリプトファン-QA代謝経路に関する研究において、ラットよりマウスがより適切な実験動物であることが明らかとなった。

D. 考察

全体のトリプトファン代謝経路において、ヒトではトリプトファンが開裂すれば、途中の中間代謝産物が蓄積することなく、一気にニコチンアミド異化代謝産物であるMNA,2-Py,4-Pyにまで代謝される。ラットではトリプトファン-QA代謝経路の副産物であるKA,XAの両方が同程度蓄積しており、これは、キヌレニン→KAと3-ヒドロキシキヌレニン→XAの反応が、キヌレニン→AnAと3-ヒドロキシキヌレニン→3-HAの反応より活発であることを示している。QAの蓄積は、QA→NaMNの反応がラットの律速段階であり、しかし、一旦NaMNが生成するとそれは、スムーズに最終代謝産物2-Py,4-Pyに代謝されることを示している。マウスではもっとも豊富な代謝産物はニコチンアミドN-オキシドで40%を占めた。しかし、ニコチンアミドN-オキシドはラットとヒトには検出されなかった。

QAはNMDA受容体のアゴニストであり⁵⁾、ニューロンを破壊するのに対し、KAはNMDA受容体のアンタゴニストである⁶⁾。ヒトとラットは、QAとKAの割合がほとん

ど同じであったのに対し、マウスでは、QA生成量よりKA生成量が高かった。したがって、マウスのトリプトファン-QA代謝制御機構の解明は、神経損傷を防ぐための機能性食品開発のために有用であると言えるだろう。

E. 健康危機情報

特記する情報はない

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 出許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. Horwitt K, Harvey CC, Rothwell WS, Cutler JL, Haffron D: Tryptophan-niacin relationships in man. Studies with diets deficient in riboflavin and niacin together with observation on the excretion of nitrogen and niacin metabolites. *J Nutr* 60: 1-43, 1965.
2. Meyramov G, Korchin V, Kocheryzkina N: Diabetogenic activity of xanthurenic acid determined by its chelating properties? *Transplant Proc* 30: 2682-2684, 1998.
3. Lopez-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha lipoic acid differentially reduces oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J Pineal Res* 34: 269-277, 2003.
4. Muhia DK, Swales CA, Deng W, Kelly JM, Baker DA: The gametocyte-activating factor xanthurenic acid stimulates an increase in membrane-associated guanylyl cyclase activity in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 42: 553-560, 2001.
5. Ganong AH, Cotman CW: Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat

- hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 236: 293-299, 1986.
6. Stone TW, Behan WM, Jones PA, Darlington LG, Smith RA: The role of kynurenines in the production of neuronal death, and the neuroprotective effect of purines. *J Alzheimers Dis* 3: 355-366, 2001.
 7. Dale WE, Dang Y, Amiridze N, Brown OR: Evidence that kynurenine pathway metabolites mediate hyperbaric oxygen-induced convulsions. *Toxicol Lett* 30: 37-43, 2000.
 8. Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Foster AC: Quinolinic acid: an endogenous metabolites that produces axon-paring lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318, 1983.
 9. Shibata K, Takechi H, Matsuo H: Niacin catabolism in rodents. *J Nutr Sci Vitaminol* 36: 87-98, 1990.
 10. Pullman ME, Colowick SP: Preparation of 2- and 6-pyridones of N¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* 206: 121-127, 1954.
 11. Shibata K, Kawada T, Iwai K: Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 424: 23-28, 1988.
 12. Shibata K: Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 430: 376-380, 1988.
 13. Shibata K: Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins* 61: 599-604, 1987.
 14. Shibata K, Onodera M: Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci Biotech Biochem* 56: 974, 1992.
 15. Shibata K, Onodera M: Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem* 55: 143-148, 1991.
 16. Mawatari K, Oshida K, Inuma F, Watanabe M: Determination of quinolinic acid in human urine by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Anal Chim Acta* 302: 179-183, 1995.

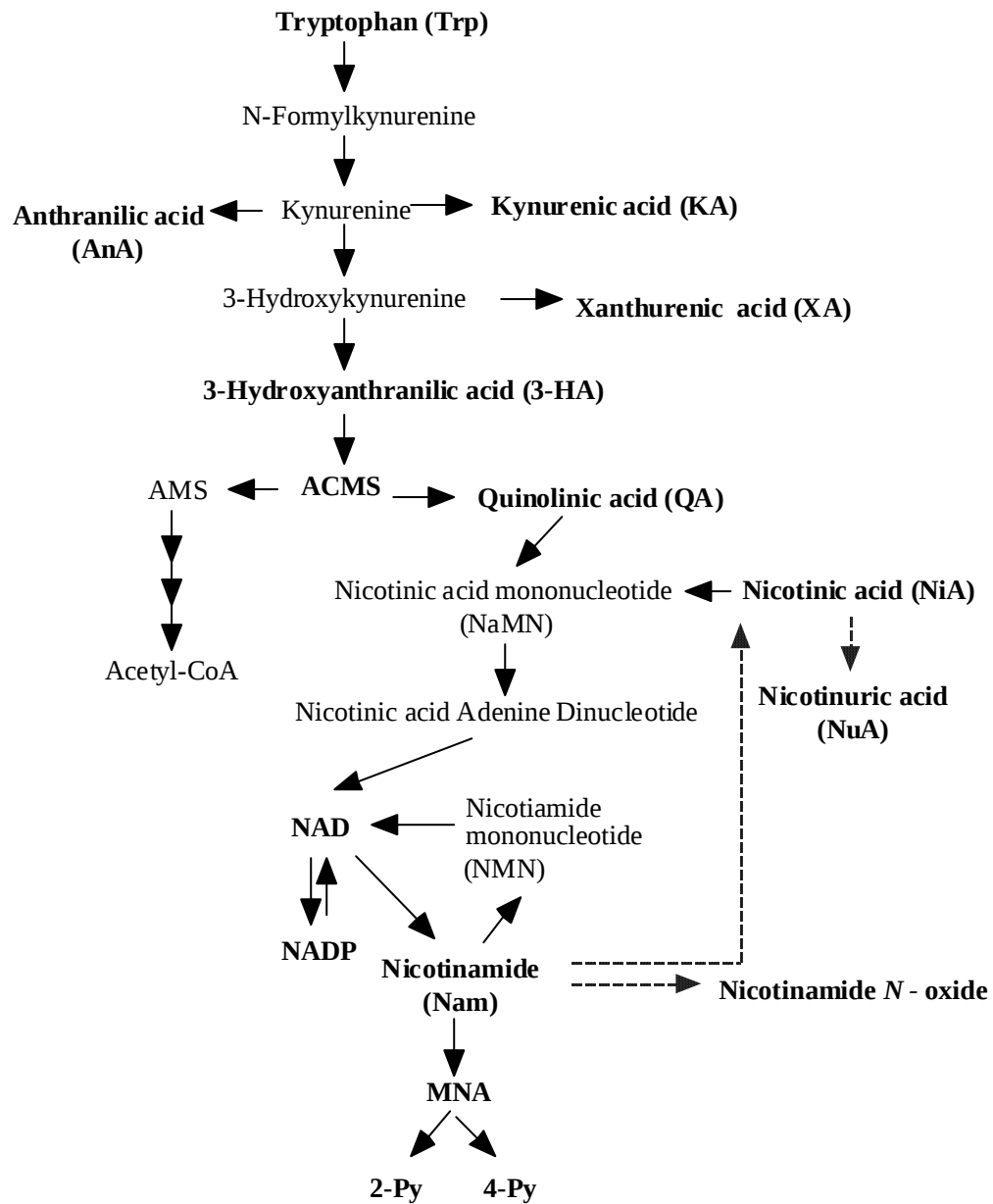


Fig. 1. Metabolic pathway from Trp.

Dotted line: mammals cannot conventionally convert Nam into NiA.

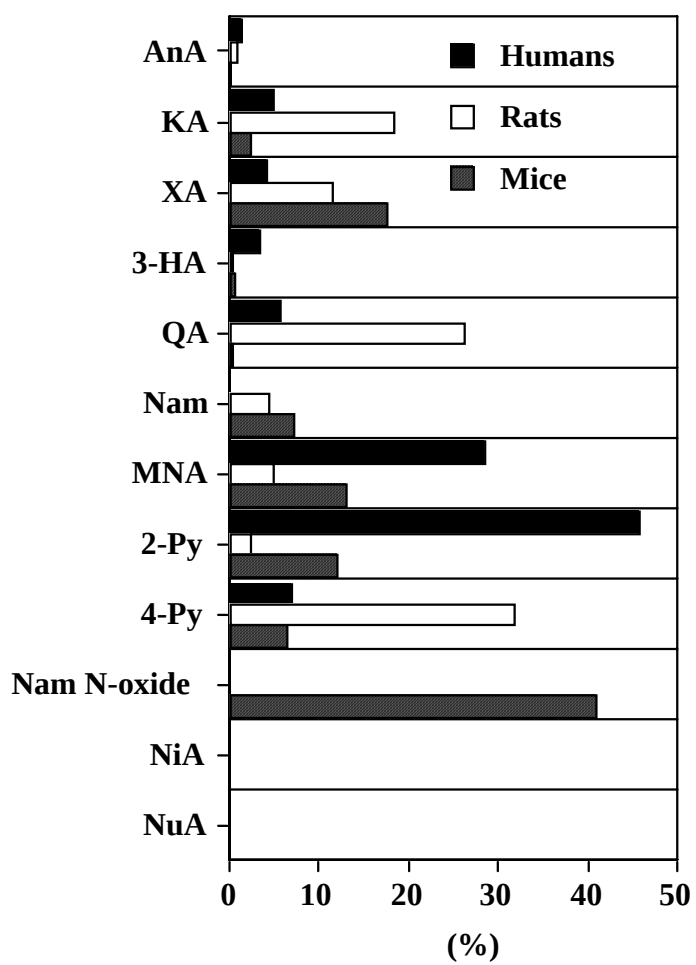


Fig. 2. Comparison of the Metabolism of Trp to Nam among Humans, Rats, and Mice.
The each value was expressed as percent over the total metabolites in each animal.

Table 1. The Composition of the Diets for Humans (around 20 years old women).

	(g/day)	Remarks
Vitamin-free milk casein	39.5	The casein contains 87.5% protein, so the net protein amount is 34.6 g.
Gluten	25.0	The wheat gluten contains 81.6% protein, so the net protein amount is 20.4 g.
Cornstarch	274	
Sucrose	50	
Fats		S:M:P = 3:4:3.
Soybean oil	10.1	
Rapeseed oil	13.8	n-6:n-3 = 4:1.
Coconut oil	6.2	
Lard	8.9	
Dietary fiber		Soluble dietary fiber was used "Fibersol" obtained from Matsutani Chemical Industry Co., Ltd. (Osaka, Japan), and insoluble dietary fiber was used ramie powder obtained from Tosco Co., Ltd. (Tokyo, Japan).
Soluble	3.6	
Insoluble	14.4	
Mineral mixtures	18.0	the composition is shown in the below.
Total amount	463.5	

For breakfast and supper, the above powder mixture of 139 g was added 91 ml of water, mixed well, and which was baked for 9 min at 250°C. The weight of the baked meal was 175 g. The meal and 0.3 g of the vitamin mixtures (the composition is shown in the below) were supplied to the subjects. For lunch, the above mixture of 185.5 g was added 122 ml of water, mixed well, and which was baked for 10 min at 250°C. The weight of the baked meal was 233 g. The meal and 0.4 g of the vitamin mixtures (the composition is shown in the below) were supplied to the subjects.

The composition of the mineral mixtures: 1,100 mg of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 860 mg of CaCO_3 , 2,200 mg of KH_2PO_4 , 3,500 mg of KHCO_3 , 2,100 mg of $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 13 mg of $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 19 mg of ZnCl_2 , 6.3 mg of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg of KI, and 8,142 mg of NaCl.

The composition of the vitamin mixtures: 3.6 mg (1,800 IU) of retinal acetate reagent (5,000,000 IU/g), 2.5 µg of cholecalciferol, 4.47 mg of dl- α -tocopherol (5 mg was supplied from oils), 13 µg of phylloquinone, 0.9 mg of thiamin-HCl, 1.0 mg of riboflavin, 1.5 mg of pyridoxine-HCl, 2.4 µg of cyanocobalamine, 5.5 mg of calcium pantothenate, 200 µg of pteroylmonoglutamic acid, 30 µg of D(+)-biotin, 100 mg of ascorbic acid, and to make up 1 g with sucrose.

Table 2. Comparison of the Metabolism of Trp to Nam among Humans, Rats, and Mice.

	Humans* ¹	Rats* ²	Mice* ³
AnA	1,375 ± 187	53.1 ± 10.1	3.0 ± 0.3
KA	4,994 ± 215	1,256 ± 186	59.1 ± 2.7
XA	4,252 ± 217	791 ± 39.3	434 ± 42.4
3-HA	3,339 ± 394	15.3 ± 0.9	10.1 ± 1.2
QA	11,208 ± 827	1,789 ± 259	5.8 ± 2.1
Nam	N.D.	289 ± 18.7	176 ± 18.2
MNA	29,147 ± 2,707	330 ± 80.3	316 ± 52.5
2-Py	46,741 ± 3,241	166 ± 31.9	297 ± 50.6
4-Py	7,070 ± 462	2,183 ± 461	159 ± 29.4
Nam N-oxide	N.D.	N.D.	1,004 ± 74.2
NiA	N.D.	N.D.	N.D.
NuA	N.D.	N.D.	N.D.

*¹Values are means ± SEM for 10 women and expressed as nmol/daily urine.

*²Values are means ± SEM for 5 rats and expressed as nmol/daily urine.

*³Values are means ± SEM for 5 mice and expressed as nmol/daily urine.