平成 17 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

Ⅲ．分担研究者の報告書

２．ハンチントン病モデルマウスを用いたトリプトファン－NAD 変換系の解析

分担研究者　福岡伸一　青山学院大学理工学部　教授

研究要旨
　食餌性 NAD の必要量を決定するためには、トリプトファンから変換されて合成される内的な NAD の変換効率を正確に知り、これを差し引いた上で策定する必要がある。本研究では、トリプトファンから NAD が変換される代謝経路（*de novo* 合成系）の鍵酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ（QPRT）遺伝子を人為的に欠損させたマウス（QPRT ノックアウトマウス）を作出することを試みている（現在鋭意進行中）。しかし、QPRT を欠損すると、神経毒性を有するキノリン酸が蓄積することが想定される。今年度は、*de novo* 合成系異常によって想定される基礎的情報を入手することを目的に、キノリン酸レベルの情報が病態としているハンチントン病に着目し、ハンチントン病モデルマウスを用い、トリプトファン－NAD 変換系への影響について、生化学的検討を行った。

A. 目的

正確な食餌性 NAD の必要量を明らかにするためには、トリプトファンから NAD に変換する経路（*de novo* 合成系）を完全に遮断した上で、食餌性 NAD のみの寄与を考えることが重要である。*de novo* 合成系の律速酵素として機能しているのが QPRT（キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ; EC2.4.2.19）である。QPRT は、*de novo* 合成系においてキノリン酸から NaMN（ニコチンアミドモノヌクレオチド）に変換する反応を触媒している。ヒト [1,2]において、QPRT の一次構造が明らかにされ、297 のアミノ酸からなり、肝臓、腎臓、そして脳に局在することが確認されている。本研究では、内的 NAD 変換を遮断する目的で QPRT 遺伝子を人為的に欠損させたマウス（QPRT ノックアウトマウス）を作出を試みている（現在鋭意進行中）。しかし、QPRT を欠損すると、神経毒性を有するキノリン酸が蓄積することが想定される。今年度は、*de novo* 合成系異常によって想定される基礎的情報を入手することを目的に、キノリン酸レベルの上昇するとされるハンチントン病に着目し、ハンチントン病モデルマウス（HD マウス）を用い、トリプトファンーNAD 変換系への影響について、肝臓・腎臓における代謝酵素活性を測定するとともに、尿中でトリプトファン代謝産物の測定を行った。

B. 研究方法

試料調製

8 週齢及び 11 週齢の HD マウスをジエチルエーテルにより吸引麻酔後、ネンブタールを腹腔投与し完全麻酔した。肝臓、腎臓は液体窒素中で迅速凍結後、-80℃で保存した。尿試料は 8 週齢及び 11 週齢のマウスから回収し、等容の 0.2N HCl を加え、-20℃保存した。

凍結保存した腎臓、肝臓に 5 倍容の 50 mM KPB（pH 7.0）を加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。高速冷却遠心機を用いて遠心分離（4℃, 50000 rpm,30 min）し、酵素活性測定用試料として上清を回収した。

尿試料は、0.1 N HCl で 1～12 倍希釈した後、遠心分離（2000 rpm, 5 min）により尿沈渣を沈殿させ、上清を回収した。0.45 μm のフィルター（日本ミリポア株式会社、東京）を用いて濾過し、HPLC 測定用試料とした。

3-HAO の酵素活性測定

3-HAO 活性は Decker ら [3]が報告した方法を用いて測定した。3-HAO 活性は 3-HAO の反応産物である ACMS 量の増加を 360 nm の吸光度で測定する事により決定した。25℃にインキュベートした反応溶液（3.3 mM 3-HA（in 10 mM Tris-acetate buffer）50 μL、200 mM Tris-acetate buffer 500 μL、Milli Q 940 μL）に酵素活性測定用試料 10 μL を加え、360 nm の吸光度測定により、3-HAO 活性として ACMS の生成を測定した。

ACMSD の酵素活性測定

ASMSD 活性は Ichiyam ら [4]が報告した方法を用いて測定した。ACMSD 活性は ACMSD の反応基質である ACMS 量の減少を 360 nm の吸光度で測定する事により決定した。25℃にインキュベートした反応溶液（3.3 mM 3-HA（in 10 mM Tris-acetate buffer）10 μL、200 mM Tris-acetate buffer 500 μL、Milli Q 850 μL）に 3-HAO 源（0.1 g ラ

ット肝臓アセトンパウダー （in 0.01 M Tris-acetate buffer, pH 8.0)）を加えて ACMS を生成させ、360 nm の吸光度測定により ACMS の生成を確認した。360 nm の吸光度の上昇（ACMS の生成）がプラトーに達した時点で酵素活性測定用試料 100 μL を加え、360 nm の吸光度の低下を測定した。コントロールとして酵素活性測定用試料 100 の代わりに 50 mM KPB(pH 7.0) 100 μL を加えたものを測定し、実験群とコントロールの差を ACMSD 活性とした。

QPRT の酵素活性測定

QPRT 活性は Shibata ら [5]が報告した方法に用いて測定した。QPRT 活性は QPRT の反応産物である NaMN 量を HPLC で測定する事により決定した。反応溶液（500 mM KPB(pH 7.0) 50 μL、10 mM Quinolinic acid 50 mL、10 mM phosphoribosylpyrophosphate 50 μL、100 mM $MgCl_2$ 10 μL、Milli Q 290 μL、酵素活性測定用試料 50 μL）を 37℃で 1 時間インキュベートして酵素反応を起こさせた後、沸騰水中で 5 分間インキュベートして反応を停止させた。氷中で 5 分以上放置した後、遠心分離（4℃,15000 rpm, 5 min）により上清を回収した。0.45 μm のフィルター（日本ミリポア株式会社、東京）を用いて濾過し、HPLC 測定用試料とした。試料容量:20 μL、移動相:10 mM KH_2PO_4（pH 7.0）、tetra-n-butylammonium bromide 1.47 g/L、10% アセトニトリル、流速 : 1.0 mL/min、圧 : 105 kgf/cm^2 程度、カラム : TOSHO 80Ts（φ4.6 ×250 mm）、カラム温度：40℃、検出器：HITACHI L-4000、データプロセッサー：HITACHI D-2500、検出方法：紫外分光光度計 UV 法（265 nm）の条件で測定を行った。

AnA の定量

AnA は Shibata ら [6]が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量:20 μL、移動相：50 mM KH_2PO_4（pH 3.0）、35% アセトニトリル、流速：1.0 mL/min、圧：140 kgf/cm^2 程度、カラム：TOSHO TSK-GEL ODS-80Ts（φ4.6×250mm）、カラム温度：40℃、検出器：SHIMADZU RF-10AXL、データプロセッサー：SHIMADZU CR-8A、検出方法：蛍光法（励起波長 340 nm、蛍光波長 410 nm）の条件で測定を行った。

KA の定量

KA は Shibata[7]が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量：2 μL、移動相：9.5 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）、5% アセトニトリル、流速：1.0 mL/min、圧 : 112 kgf/cm^2 程度、カラム：TOSHO TSK-GEL ODS-80Ts （φ 4.6 × 250mm）、カラム温度：40℃、検出器：HITACHI F-1050、データプロセッサー：HITACHI D-2500、検出方法：蛍光法（励起波長 344 nm、蛍光波長 398 nm）の条件で測定を行った。

XA、3-HA の定量

XA、3-HA は Shibata[8]らが報告した方法を用いて HPLC により同時定量した。試料容量:20μL、移動相:45.5mM KH_2PO_4（pH3.0）、2.73μg/mL EDTA-2Na、9.1% アセトニトリル、流速 : 1.0mL/min、圧 : 85kgf/cm^2 程度、カラム：STR ODS-Ⅱ（φ4.6×250mm）、カラム温度 : 40℃、検出器 : [キサンツレン酸] HITACHI L-2400 [3-ヒドロキシアンスラニル酸] SHISEIDO NANOSPACE SI-2、データ

プロセッサー : [キサンツレン酸] HITACHI D-2500　[3-ヒドロキシアンスラニル酸] HITACHI D-2500、検出方法 : [キサンツレン酸]紫外分光光度計 UV 法（340 nm）　[3-ヒドロキシアンスラニル酸]電気化学検出法（印加電圧＋500mV）の条件で測定を行った。

QA の定量

QA は Mawatari ら [9]が報告した方法を用いて HPLC により定量した。試料容量：20 μL、移動相 : 50 mM KH_2PO_4（pH 3.8）、1.2% H_2O_2、0.00045% 水酸化テトラメチルアンモニウム、流速：0.6 mL/min、圧：56 kgf/cm^2 程度、カラム : Unisil Q C81（φ4.6×250 mm）、カラム温度：40℃、検出器：SHIMADZU RF-10AXL、データプロセッサー：SHIMADZU CR-6A、検出方法 : 蛍光法（励起波長 326 nm、蛍光波長 380 nm）の条件で測定を行った。

C. 結果

HD マウスの表現型

正常型は正常に体重が増加したが、HD 型は 8 週齢で体重増加がプラトーに達し、その後減少した。10 週齢、11 週齢において、HD 型は有意に体重が低下していた。また、HD 型は、HD に特徴的な舞踏運動を示した。

トリプトファン代謝関連酵素群の酵素活性測定

HD マウスの肝臓および腎臓における Trp 代謝関連酵素（3-HAO、ACMSD、QPRT）の酵素活性を測定し、HD マウスにおける Trp 代謝異常の有無を調べた。HD マウスが、8 週齢まで正常に発育した後、顕著に体重が減少し、11 週齢で HD に特徴的な舞踏運動を示した事より、8 週齢を発症前、11 週齢を発症後とし、8 週齢、11 週齢における正常型、HD 型の肝臓、腎臓における 3-HAO、ACMSD、QPRT の酵素活性を測定した。

QA 生成に関わる 3-HAO の活性は肝臓の方が腎臓よりも 7〜8 倍程度高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスを比較すると、両臓器、両週齢とも HD マウスで活性が上昇しており、11 週齢の肝臓においては有意（$p<0.05$）に上昇していた。(図 1 (a).(b).)

QA 生成を抑制する ACMSD の活性は腎臓の方が肝臓よりも高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスを比較すると、両臓器、両週齢とも HD マウスで活性が低下しており、8 週齢、11 週齢の肝臓においては有意（$p<0.05$（8 週齢）、$p<0.01$（11 週齢））に低下していた。(図 2 (a).(b).)

QA を消去する QPRT の活性は肝臓の方が腎臓よりも 3〜4 倍程度高く、週齢による有意な差は観察されなかった。正常マウスと HD マウスの比較でも有意な差は観察されなかった。 (図 3 (a).(b).)

尿中トリプトファン代謝産物の定量

肝臓における ACMSD 活性の低下と 3-HAO 活性の上昇は、血中 QA 濃度の上昇を誘引すると考えられたので、血液成分を反映する尿中の Trp 代謝産物量を測定した。8 週齢、11 週齢における正常マウス、HD マウスの尿中 AnA、XA、KA、3-HA、QA を HPLC を用いて定量し、クレアチニン量で補正を行った。（表 1）

正常マウスと HD マウスを比較すると、

AnA は 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあり、8 週齢で有意（$p<0.005$）に低下していた。KA も 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあった。QA は 8 週齢、11 週齢ともに HD マウスで上昇傾向にあり、8 週齢で有意（$p<0.05$）に上昇していた。XA は測定の不具合により一部データが得られなかった。3-HA は傾向性が見られなかった。

D. 考察

本研究では、HD マウス末梢組織におけるトリプトファン代謝経路の異常を発見した。特に、肝臓では、3-HAO 活性が有意に上昇し、ACMSD 活性が有意に低下した。肝臓において、ACMS 生成酵素である 3-HAO 活性の上昇と ACMS を消去する ACMSD 活性の低下が ACMS 量の増加を引き起こし、また QA を消去する QPRT 活性が変動しないことで、結果として QA 量を増加させると考察できる。実際、HD マウスの尿中トリプトファン代謝産物測定では、尿中 QA 濃度が有意に上昇しており、先の考察と一致する。抗結核薬ピラジナミド摂取やフタル酸エステル摂取による腎臓、肝臓 ACMSD 活性の低下が、尿中 QA 濃度の上昇を誘導することが報告されており [10,11]、ACMSD 活性の低下が QA の生成の増加に深く関わることが推察できる。さらに、肝臓の機能として消化管から吸収された栄養に富む血液を肝門脈から受け取り、様々な栄養物の代謝や貯蔵を行うこと、尿は血液が腎臓の糸球体で濾過されたもので、血液成分の反映であるということより、末梢における ACMSD 活性の低下が血中 QA 濃度の上昇を誘導し、血液を反映する尿中の QA 濃度が上昇したと考察できる。腎臓切除による腎機能低下ラットが、肝臓 ACMSD 活性の低下や尿中、血清中の QA 濃度の上昇を示すだけでなく、脳脊髄液、大脳皮質、小脳、海馬線条体、視床においてもキノリン酸濃度の上昇を示すという報告 [12]より、末梢における代謝異常が中枢のキノリン酸濃度の上昇に影響する可能性がある。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

1. 発表論文

特になし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. Fukuoka S, Nyaruhucha M, Shibata K. Characterization and functional expression of the cDNA encoding human brain quinolinate phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* **1395**, 192-201. (1998)

2. Fukuoka S, Ishiguro K, Yanagihara K, Tanabe A, Egashira Y, Sanada H, Shibata K.

Identification and expression of a cDNA encoding human alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). A key enzyme for the tryptophan-niacine pathway and "quinolinate hypothesis". *J Biol Chem.* **277**,35162-7. (2002)

3. Decker RH, Kang H, Leach FR, Henderson LM. Purification and properties of 3-hydroxyanthranilic acid oxidase. *J Biol Chem.* **236**, 3076-82. (1961)
4. Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S. Studies on the matabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymatic formation of alpha-aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J Biol Chem.* **240**, 740-9. (1965)
5. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, **749,** 81-5.(2000)
6. Shibata K, and Onodera M. Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 143-148.(1991)
7. Shibata, K. Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*., **430**, 376-380.(1988)
8. Shibata K., Onodera M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci. Biotechol. Biochem*. **56,** 974. (1992)
9. Mawatari K, Oshida K, Iinuma F, Watanabe M. Determination of quinolinic acid by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Adv Exp Med Biol.* **398**, 697-701. (1996)
10. Fukuwatari T, Sugimoto E, Shibata K. Growth-promoting activity of pyrazinoic acid, a putative active compound of antituberculosis drug pyrazinamide, in niacin-deficient rats through the inhibition of ACMSD activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**, 1435-41. (2002)
11. Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R, Shibata K. Phthalate esters enhance quinolinate production by inhibiting alpha-amino-beta-carboxymuconate-epsilon-semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway. *Toxicol Sci*. **81**, 302-8. (2004)
12. Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. Am J Physiol Renal Physiol. 279:F565-72. (2000)

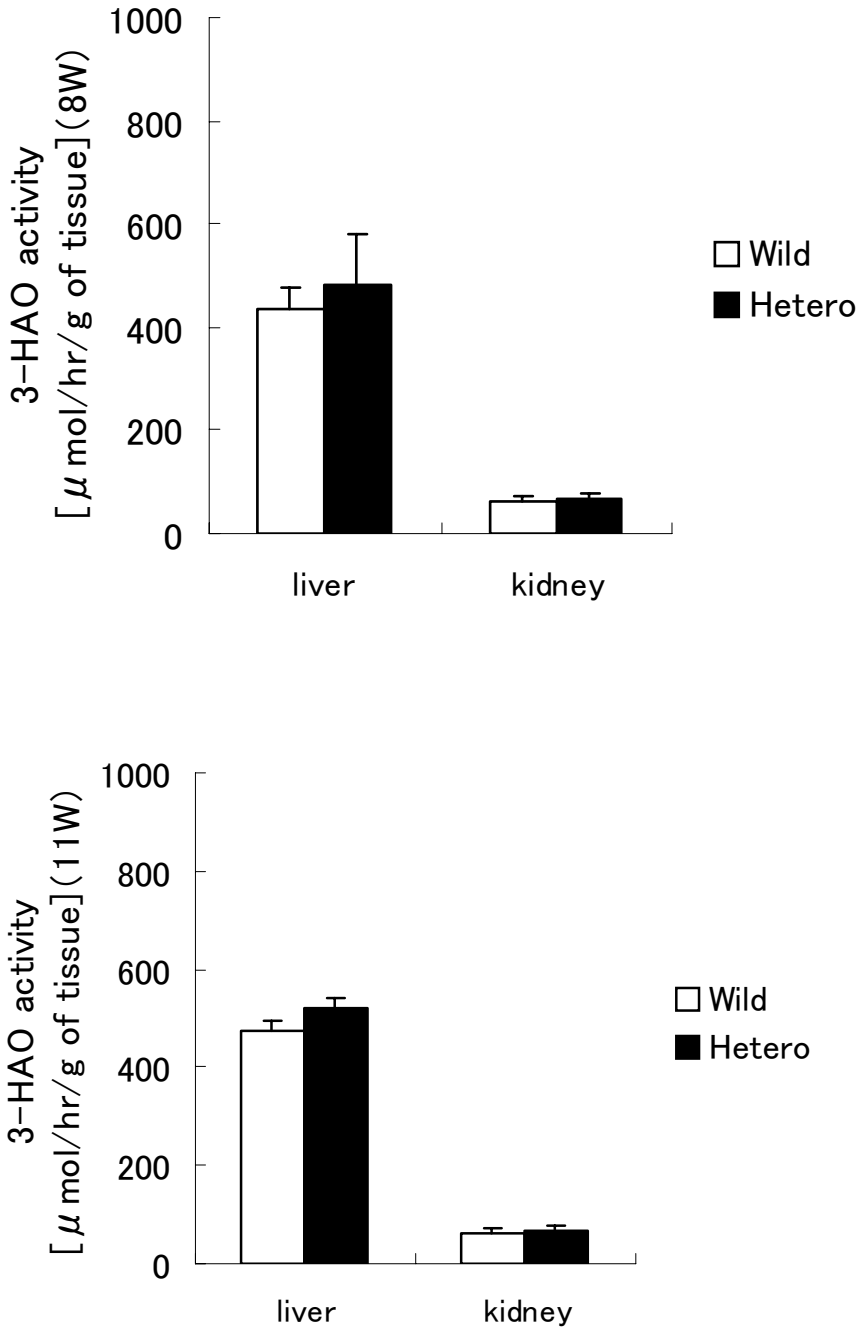

図 1.　HD マウス肝臓および腎臓においての 3-HAO 活性

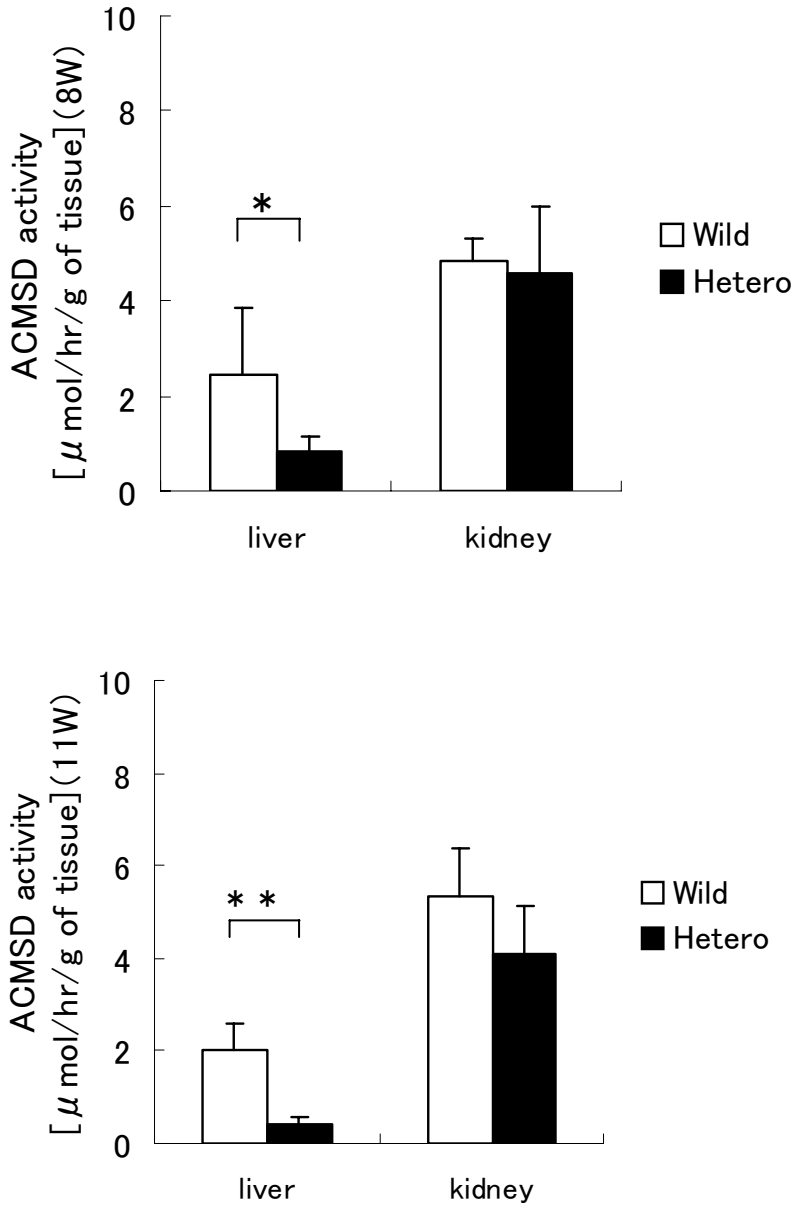

図２　HD マウス肝臓および腎臓においての ACMSD 活性
野生型 (Wild type)に比べ有意差有り（* p＜0.05　** p＜0.01）

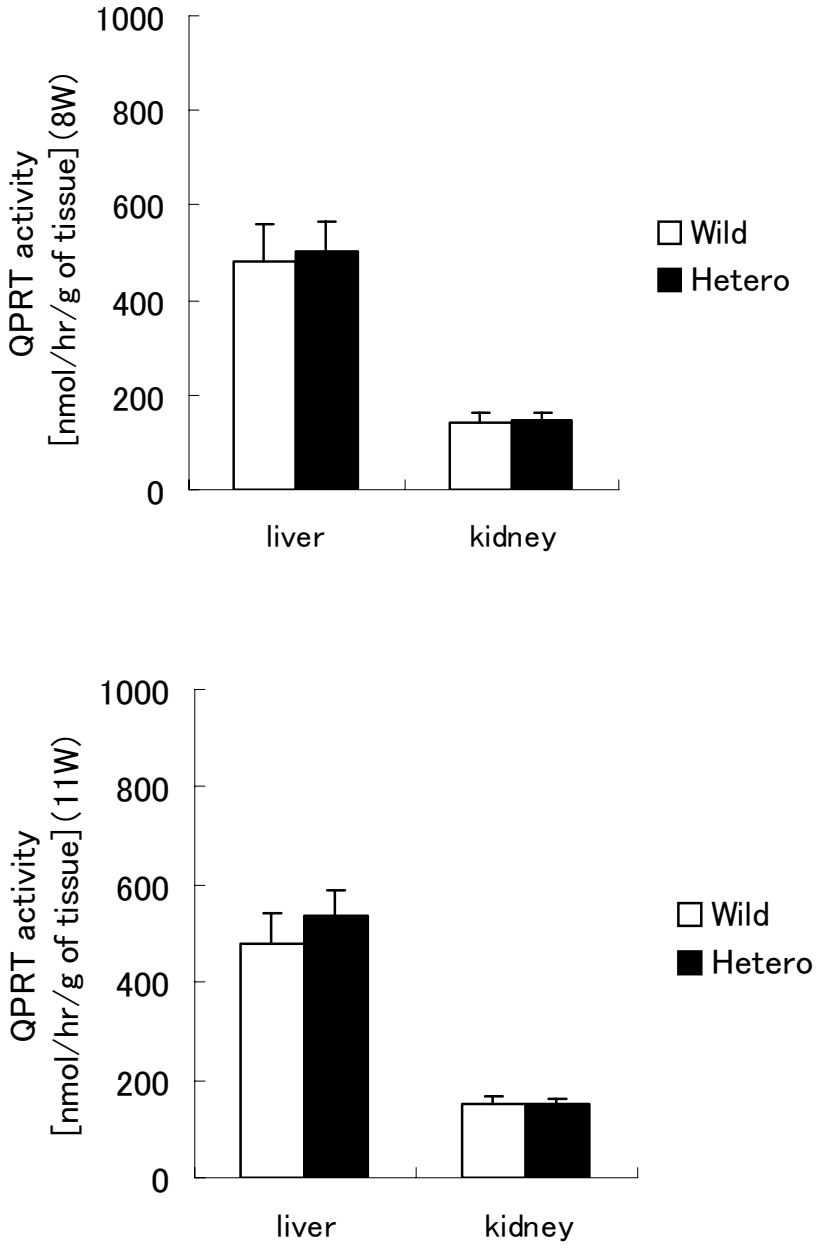

図３　HD マウス肝臓および腎臓においての QPRT 活性

表１　HD マウスにおける尿中トリプトファン代謝産物の比較

AnA；アンスラニル酸, XA；キサンツレン酸, KA；キヌレン酸,　3-HA；3-ヒドロキシアンスラニル酸, 値は平均値±標準偏差で表した。

野生型 (Wild type)に比べ有意差有り（* p＜0.05　** p＜0.01）

Urinary excretion/mg creatinine	8W			11W	
	Wild	Hetero		Wild	Hetero
AnA	20.3 ± 4.5	14.6 ± 4.2	**	17.3 ± 3.7	10.2 ± 0.0
XA	467.0 ± 58.2	454.7 ± 102.2		378.7 ± 18.9	N/A
KA	106.7 ± 23.6	96.9 ± 19.5		92.2 ± 15.1	80.1 ± 14.4
3-HA	668.3 ± 272.5	640.2 ± 247.1		536.4 ± 96.5	630.1 ± 217.1
QA	35.9 ± 9.6	49.7 ± 19.0	*	52.8 ± 7.5	56.6 ± 11.4

Values are shown as means±SD.