

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

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 克巳 滋賀県立大学 教授

### Ⅲ. 分担研究者の報告書

#### 12. トリプトファン過剰摂取の影響に関する研究

分担研究者 福岡 伸一 青山学院大学 教授

#### 研究要旨

当初の目的である QPTR ノックアウトマウスの作出についてはなお検討を要するが、神経細胞の情報伝達に関わる複数のタンパク質に対する構造生物学的解析に関しては一定の成果を得ることができた。今後は、マウスモデルの確立を期して、キノリン酸による神経細胞損傷のメカニズムを検討するとともに、タンパク質レベルでの解析も続行する。

## A. 目的

必須アミノ酸，特にトリプトファンの過剰摂取が脳神経細胞に及ぼす影響を解析するため，トリプトファンの代謝産物で神経毒性を持つキノリン酸の代謝系に着目した。キノリン酸代謝の律速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）を人為的に欠損させた遺伝子ノックアウトマウスの作出を目指した。一方，神経細胞の情報伝達に関わる複数のタンパク質について，構造生物学的解析を試みた。

## B. 研究の成果および課題

QPRT ノックアウトマウスの作出については，遺伝子構造の解析，ノックアウトベクターによる組み換え，組み換え型マウス ES 細胞の選別に成功した。この ES 細胞を用いてキメラマウスの作出に成功した。しかし，複数のキメラマウスを繰り返し産出したにもかかわらず，組み換え遺伝子が生殖細胞系列に移行したマウスを得ることができなかった。現在，再度，キメラマウス産出を試みると共に，生殖細胞系列への移行を妨げる特別な原因の有無を究明中である。また，キノリン酸による神経細胞死のメカニズム解明のモデルとして，ハンチントン病マウスを用いて検討を進めることにした。

一方，細胞内外の情報伝達に関連する 2 種類のタンパク質の機能解析および構造解析を行った。分担者らは，伝達性スポンジ状脳症発症に関与するプリオンタンパク質が，その正常な状態においては，神経情報伝達機構における補助的役割を担っている

と考えており，他の情報伝達分子との相互作用の解明を目指した。そのためのツールとして，プリオンタンパク質の C 末端側に青色蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を大腸菌において生産する系を確立した（国際学会発表）。また，機能発現時に結合する可能性がある候補タンパク質に対しても，C 末端側に緑色蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を大腸菌で生産する系を確立した。これらの融合タンパク質を用いて，その相互作用を FRET による定量的測定系を構築した。この系を用いて，プリオンタンパク質に融合されている青色蛍光タンパク質と候補タンパク質に融合されている緑色蛍光タンパク質が 31 Å の距離で近接することが明らかになった。このことは，プリオンタンパク質が候補タンパク質と結合していることを強く示唆している。

また，細胞間情報伝達物質を細胞内から細胞外へ開口分泌する際に重要なタンパク質の一つである ZAP36 の立体構造について，X 線結晶構造解析法を用いて明らかにした。ZAP36 は  $\alpha$  ヘリックスのみから成るタンパク質で，他の生体内低分子化合物を結合しうる構造を有していることが判明した（国際学会発表，下記）。分子内には 4 つの金属イオン結合部位が存在しており，カルシウムイオンの結合が推定されていたが，その電子密度，金属イオンとアミノ酸残基間の配位結合距離，原子吸光測定により，その結合イオンがナトリウムイオンであると決定した。また，そのナトリウムイオンとアミノ酸残基の配位結合数から，ナトリウムイオンを介した ZAP36 の膜への

結合様式が推定できた。

### 3. その他

なし

#### C. 健康危険情報

特記する情報なし

#### D. 研究発表

##### 1. 発表論文

なし

##### 2. 学会発表

Kohei Butsushita, Yasuhiro Arii and Shin-Ichi Fukuoka: Expression, Purification and crystallization of ZAP36, zymogen granule membrane associated protein with the molecular weight of 36 kDa, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto), International Union of Biochemistry and Molecular Biology, June 18-June 23, 2006.

Hidenori Yamaguchi, Yasuhiro Arii and Shin-Ichi Fukuoka: Expression of soluble prion protein-fusion proteins in Escherichia coli cells., 20<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto), International Union of Biochemistry and Molecular Biology, June 18-June 23, 2006.

#### E. 知的財産権の出願・登録情報（予定を含む）

##### 1. 特許予定

なし

##### 2. 実用新案登録

なし