

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

8. 魚類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-ニコチンアミド変換率の推定

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

### 研究要旨

コイとフナのトリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 転換率を 3-HAO/ACMSD 活性比から推定した結果、効率良く利用できるラットと比較して、数十分の一程度であった。肝臓においてのみナイアシン活性を示すキノリン酸という中間代謝産物をユニバーサルにナイアシン活性を有する化合物に転換する酵素である QPRT 活性もコイとフナには検出されなかった。以上のことから、魚においては、NiA-NH<sub>2</sub> はトリプトファンからきわめて合成されにくいことが、はじめて明らかとなった。

## A. 目的

ヒトにおいて、B-群ビタミンの一つである NiA-NH<sub>2</sub> が必須アミノ酸の一つであるトリプトファンから生合成されることはよく知られている。トリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 転換率は、摂取トリプトファン量と尿中に排泄される NiA-NH<sub>2</sub> 異化代謝産物量との比較から求めるのが、通常の方法である。しかしながら、尿の採取が困難である動物においては、他の方法の考案が必要である。田口らは<sup>1)</sup>、家畜類の飼料を考案する上で、トリプトファンからどの程度 NiA-NH<sub>2</sub> が生合成されているかが重要であるという認識から、トリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 転換経路で鍵中間代謝物質であるキノリン酸の生成量を支配する二つの酵素、すなわち、キノリン酸生成酵素である 3-ヒドロキシアンスラニル酸 3,4-ジオキシゲナーゼ(3-HAO)とキノリン酸の生成量を抑制する酵素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)の活性比率から、トリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 転換率を推定する方法を報告した。今回は、その方法を使用して、琵琶湖の固有種であり、近年生息数が激減しているニゴロブナの本転換率を推定したので報告する。合わせて、コイについても調べた。

## B. 研究方法

生後1年6ヶ月、体長15~20cm、体重30~40gのニゴロブナ(*Car. auratus grandoculis* Temminck et Schlegel)とコイ(*Cyprinus carpio* Linnaeus)を滋賀県水産試験場から入手した。Table 1に飼育用飼料の組成を示した。哺乳動物ではトリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 代謝経路は肝臓のみに局在している。そこ

で、魚においても肝臓を用いた。ニゴロブナの肝臓の量は非常に少ないため、5匹から得られた肝臓を一まとめにして処理した。コイからは肝臓を得、5匹から得られたものを一まとめにして処理した。各々得た臓器は5倍量の50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)を加え、ガラス-テフロンホモゲナイザーで均一化した。ホモジネートは10,500×gで20分間遠心分離した後の上清を3-hydroxyanthranilate

3,4-dioxygenase(3-HAO, EC 1.13.11.6)活性, aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD, EC 4.1.1.45)活性, 及び Quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT, EC 2.4.2.19)測定のための酵素源とした。また、肝臓と筋肉中の総 NiA-NH<sub>2</sub> 含量を測定した。

対照データを得るために、トリプトファンから NiA-NH<sub>2</sub> を効率よく合成できる動物として、ラットを使用した。ラットは雄 Wistar 系で、ナイアシン欠-20%カゼイン食(ラットは20%カゼインを含む飼料を与えれば、すでにビタミン体となっているナイアシンを全く含まない飼料を与えなくても、正常に生育する<sup>2)</sup>)で飼育した7週齢の肝臓を用いた。酵素源の調製方法は、魚の場合と同じである。

3-HAO 活性は Decker ら<sup>3)</sup>の方法により、ACMSD 活性は Ichiyama ら<sup>4)</sup>の方法により、QPRT は Shibata らの<sup>5)</sup>方法により測定を行った。

総 NiA-NH<sub>2</sub> 含量の測定は Shibata ら<sup>6)</sup>の方法に従って行った。

## C. 結果と考察

Table 2にコイとニゴロブナの3-HAO活

性, ACMSD 活性, および 3-HAO/ACMSD の活性比を示した. トリプトファンから効率よく NiA-NH<sub>2</sub> を生合成できるラットの値と比較して, コイもフナも 3-HAO 活性は顕著な差異は認められなかった. しかしながら, ACMSD 活性は, ラットと比較して, 数十倍も高く, その結果, この二つの活性比はラットと比較して, 数十分の一という値であった. 以前に報告<sup>1)</sup>したように, 鳥類においても, 3-HAO 活性の種による差異は 2-3 倍程度であったが, ACMSD 活性 ( $\mu\text{mol/h/g}$ ) 肝臓には顕著な差異が認められ, ニワトリでは 5.5, ハトは 9.0, スズメは 32.7, カラスは 52.2 であった. 哺乳動物でも, トリプトファンを NiA-NH<sub>2</sub> の前駆体として利用できないネコ<sup>7)</sup>では, ACMSD 活性が  $50\mu\text{mol/h/g}$  肝臓と高くこの活性比は 4.75 と報告されている<sup>8)</sup>.

さらに, トリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 転換経路の鍵物質であるキノリン酸をユニバーサルにナイアシン活性を有する物質に転換する酵素である QPRT 活性を測定したが, コイにおいても, フナにおいても, 検出限界以下であった(Table 3).

結論として, コイとフナは NiA-NH<sub>2</sub> の前駆体としてトリプトファンを利用できないと推測された.

さらに, トリプトファンから NiA-NH<sub>2</sub> が合成できないと推定されるコイ・フナと合成できるラットの筋肉中と肝臓中の総 NiA-NH<sub>2</sub> 含量を調べた結果(Table 3), 魚の含量が低かった. このことと, トリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 生合成経路の強弱との関係についてはさらなる検討を有するが, 興味あることである.

NiA-NH<sub>2</sub> の補酵素である NAD・NADP は

代謝に関わっている全酵素の約 20%が必要としている. トリプトファンからの生合成経路は, この補酵素が必要な時に, 必要な量だけ速やかに供給するために存在していると考えている. 従って, 本経路が作動していない魚の飼育においては, NiA-NH<sub>2</sub> の供給を適切に行うことが, 養殖において一つの重要なポイントになるものと思われる.

#### D. 健康危機情報

特記する情報なし

#### E 研究発表

1. 発表論文  
なし
2. 学会発表  
なし

#### F. 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

#### G. 引用文献

1. 田口寛, 早野元日子, 柴田克己(1991) 鳥類における 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ/アミノカルボキシルムコン酸セミアルデヒド脱炭酸酵素活性比からのトリプトファン-NiA-NH<sub>2</sub> 変換率の推定. ビタミン, **65**, 459-460
2. Shibata K, Mushiage T, Kondo T, Hayakawa T, Tsuge H (1995) Effects of

- vitamin B6 deficiency on the conversion ratio of tryptophan to niacin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 2060-2063
3. Decker RH, Kang HH, Leach FR, Henderson LM (1961) Purification and properties of 3-hydroxyanthranilic acid oxidase. *J Biol Chem* **236**, 3076-3082
4. Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S (1965) Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. II. Enzymic formation of  $\alpha$ -aminomuconic acid from 3-hydroxyanthranilic acid. *J Biol Chem* **240**, 740-749
5. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E (2000) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr* **749**, 281-285
6. Shibata K, Kawada T, Iwai K (1987) High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide in rat tissue samples and blood after extraction with diethyl ether. *J Chromatogr* **422**, 257-262.
7. Da Silva AC, Fried R, De Angelis RC (1952) The domestic cat as a laboratory animal for experimental nutrition studies. *J Nutr* **46**, 399-409
8. Ikeda M, Tsuji H, Nakamura S, Ichiyama A, Nishizuka Y, Hayaishi O (1965) Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J Bio Chem* **240**, 1395-1401

Table 1. Composition of the Diet for Fishes.

Materials	%
Fish powders	50
Wheat flour	21
Vegetable oil cake	14
Rice bran	9
Food yeast	6

The food contains 43.0% crude protein, 3.0% crude fat, 3.0% crude ash, 2.0% Ca, and 1.5% P.

Table 2. The Activities of 3-HAO, ACMSD, and the Ratio of 3-HAO/ACMSD in the Livers of Fishes.

	3-HAO ( $\mu\text{mol/h/g}$ )	ACMSD ( $\mu\text{mol/h/g}$ )	3-HAO/ACMSD
Carp	324	64	5.06
Crucian	430	69	6.23
Rat	481	0.74	650

The values are the mean of the separate three experiments.

Table 3. Comparison of the QPRT Activity and the Concentration of Total NiA-NH<sub>2</sub> in Liver and Muscle.

	QPRT ( $\mu\text{mol/h/g}$ )	Total NiA-NH <sub>2</sub>	
		Liver (nmol/g)	Muscle (nmol/g)
Carp	N.D.	1129	293
Crusian	N.D.	626	188
Rat	0.35	2093	647

The values are the mean of the separate three experiments.

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

### 9. 宇宙環境がラットの補酵素 NAD に及ぼす影響

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

#### 研究要旨

宇宙環境でのナイアシン栄養について検討する上で、その補酵素型である NAD 代謝に着目して実験を行った。その結果、宇宙飛行後、肝臓中の NADP 含量が Flight Control 群の約半分以下にまで減少することが明らかになった。NADP は酸化損傷を防ぐスカベンジャーであるグルタチオンペルオキシダーゼの反応に関与している。宇宙環境では極度のストレスによって生体内が酸化され、グルタチオンペルオキシダーゼによる酸化防御機構が活発になることが考えられる。よって、宇宙飛行による肝臓中 NADP 含量の減少は、生体内でこれら酸化防御機構が起こることで NADP の必要量が高まったためではないかと考えられる。今度、宇宙でのナイアシン栄養を検討する上で、生体内酸化による NADP の必要量の増加を考慮に入れる必要があると考えられる。

## A. 目的

宇宙航空研究開発機構・宇宙化学研究本部 (ISAS/JAXA) では、約20年にわたり、大学などの研究者による幅広い分野での宇宙研究を推進しており、この機構のサポートによってさまざまな研究が行われてきた。特に宇宙環境の特徴である微小重力環境と宇宙放射線に関する研究が多く報告されており、微小重力環境による影響としては、筋肉の委縮、宇宙酔い、骨量減少、生体移動や心循環器系などへの生体変化などが、そして宇宙放射線による影響としては、活性酸素の生成増加、DNAの損傷、タンパク質の変化、脂質の過酸化などが報告されている<sup>1-3)</sup>。このように、宇宙環境ではさまざまな生体现象が起こることが明らかになってきた。しかし、宇宙栄養に関する研究はまだまだ乏しいのが現状である。そこで本研究では、宇宙環境でのナイアシン栄養を検討するため、その補酵素であるNAD代謝に着目して研究をおこなった。

## B. 研究方法

### 1) 動物の飼育方法

SD系ラットを、Grand Control群・Flight Control群・Flight群の3群に分け、1993年4月8日から4月17日の9日間、NASA通常食にて飼育した。Flight群はSTS-56計画にて9日間の宇宙飛行を行った。着陸後、それぞれ0、24、72時間後に解剖を行い、その後-70℃にて凍結保存した肝臓を得た。なお、この試料は、STS-107計画での試料が、事故により回収できなくなったための代

替試料である。

### 2) 肝中の酵素活性の測定方法

Quinolate phosphoribosyltransferase (QPRTase, EC 2.4.2.19)はShibataら<sup>4)</sup>が開発したHPLCを用いるnon-RI法で測定した。

#### QPRTase 活性測定法 《反応組成》

0.5 M KPB (pH7.0)	50 $\mu$ l
10 mM QA	50 $\mu$ l
10 mM PRPP	50 $\mu$ l
100 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l
水	290 $\mu$ l
Enzyme source	50 $\mu$ l

---

Total	500 $\mu$ l
-------	-------------

上記の試薬 (Enzyme source 以外) をねじロマイクロチューブに順次入れておく

↓

Enzyme source を入れ、手で3回上下逆さにした後、37℃で1時間インキュベーション

↓

5分間、沸騰水中に放置

↓

5分以上、氷中に放置

↓

5分間遠心分離 (4℃, 10,000 rpm)

↓

上清を0.45  $\mu$ mのフィルターでろ過

↓

HPLCにて分析

<測定条件>

移動相: 0.5 M KPB (pH 7.0)	20 ml
tetra- <i>n</i> -butylammonium bromide	1.47 g
アセトニトリル	100 ml

超純水で1Lにする  
流速： 1.0 ml / min

カラム： TOSOH TSK-GEL  
ODS-80TS(φ4.6×250 mm)  
カラム温度： 40 °C  
検出器： SHIMADZU LC-9A  
検出方法： UV 法 (265 nm)

<計算方法>

QPRase activity (nmol / hr / g of liver)  
=(NaMN の面積 / 74000 × 500 / 20 ×  
50000 / 500

<試薬作成方法>

**10 mM QA** (冷蔵保存)

Quinolinic acid=167.13 (半井化学薬品株  
式会社, 室温保存)

$$167.13 \times 0.01 \times 0.01 = 0.016713$$

QA を 0.0167 g 秤量し, 水を 10 ml 加え,  
スターラーで攪拌した。

**10 mM PRPP** (冷蔵保存)

5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate=390.1

(和光純薬株式会社, 凍結保存)

$$390.1 \times 0.01 \times 0.01 = 0.03901$$

PRPP を 0.0390 g 秤量し, 水を 10 ml 加え  
た。

**100 mM MgCl<sub>2</sub>** (冷蔵保存)

Magnesium Chloride Hexahydrate=95.2

(和光純薬株式会社, 凍結保存)

$$95.21 \times 0.1 \times 0.01 = 0.0952$$

MgCl<sub>2</sub> を 0.0952 g 秤量し, 水を 10 ml 加え  
た。

α-Amino-β-carboxymuconate-ε  
-semialdehyde decarboxylase (ACMSDase,

EC 4.1.1.45)は Ichiyama らの<sup>9)</sup>方法に従って  
測定した。

#### ACMSDase 活性測定法

《反応組成》

3.3mM 3-Hydroxyanthranilic acid	10 μl
0.2M Tris-acetate buffer,pH8.0	500 μl
H <sub>2</sub> O	800 μl
<hr/>	
Total	1400μl

上記の試薬を石英セル (マイクロセル) に  
分注し, よく攪拌して 360 nm の吸光度の 0  
合わせをした。

↓

3-HAO 源を 100 μl 加え, 吸光度の上昇  
が止まり若干低下した時点で ACMSDase を  
100 μl 加えた。

(傾きが測定できれば終了)

※ 対象として, 50 mM KPB, pH7.0  
を 100 μl 加えたものを行った。

<計算方法>

ACMS の分子吸光係数 ε<sub>360 nm</sub>=45000  
(1 時間の 360 nm の吸光度の変化/45000)  
×(1.56 × 10<sup>-3</sup>) × (5.0/0.1) × 10<sup>6</sup>  
= \_\_\_\_\_ μmol/hr/g of liver

すなわち, 1 時間の 360nm の吸光度の変  
化 × 100 = \_\_\_\_\_ μmol/hr/g of liver

<試薬作成方法>

**0.2M Tris-asetate buffer(pH8.0)** (冷蔵保  
存)

Tris (トリスヒドロキシメチルアミノメタ  
ン) = 121.14

(nacalai tesque, 室温保存)

$$121.14 \times 0.2 \times 0.5 = 12.114 (g)$$



1. Tris を 12.114 g 取り, 水を 400 ml 程度加えた.

2. 1 M 酢酸にて pH8.0 に調節し, 水で 500 ml にメスアップした.

### 0.01M Tris-asetate buffer(pH8.0)

0.2M Tris-asetate buffer(pH8.0)を 10ml 取り, 水を 190ml 加えた.

3.3mM 3-Hydroxyanthranilic acid …使用直前に作成

3-ヒドロキシアンスラニル酸=153.14

(東京化成工業株式会社)

$153.14 \times 0.0033 \times 0.001 \times$

1000=5.05(mg)

1. 10ml 容三角フラスコに 3-ヒドロキシアンスラニル酸を 0.005g 秤量し,

0.01M Tris-asetate buffer(pH8.0)を 10ml 加え攪拌した.

2. 加温後, マグネチックスターラーで攪拌し, 溶けたら水中で保存した.

1M 酢酸 (室温保存)

Acetic acid=60.05 (和光純薬工業株式会社)

$60.05 \times 1 \times 1 = 60.05$

酢酸を 60.05g 取り, 水にて 1000ml にメスアップした.

### 3-HAO 源

1. ラット肝臓アセトンパウダー1g に

0.01M Tris-asetate buffer,pH8.0 を 10ml 加え 30 分間室温でスターラーにて攪拌した.

2. 遠心分離した. (15,000rpm, 10min)

3. 上清を 3-HAO 源とした.

3) 血中および肝中 NAD・NADP 定量方法  
6-9)

組織を約 0.25g 正確に秤量し, 20 倍量の抽出用緩衝液を加え, ウルトラディスペーサーで完全に均一化した. この均一化液 200 $\mu$ l を, 1000 $\mu$ l の 100mM ニコチンアミド-50mMKPB(pH6.0)を入れたネジ付きマイクロチューブに加え, 90°Cで 1.5 分間加熱処理した. 遠心上清を肝臓中 NAD・NADP 含量の測定に用いた.

NAD, NADP 測定方法

<試薬>

ニリン酸ナトリウム十水和物: 和光純薬工業

塩酸セミカルバジド (Semicarbazide Hydrochloride): 和光純薬工業 (株)

MTT

[ 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide ] : 東京化成工業 (株)

PMS (Phenazine Methosulfate): 和光純薬工業 (株)

ADH (Alcohol dehydrogenase from yeast): オリエンタル酵母 (株)

グリシルグリシン: 和光純薬工業 (株)

グリセロール: 和光純薬工業 (株)

ニコチンアミド: 和光純薬工業 (株)

エタノール: 和光純薬工業 (株)

リン酸二水素カリウム (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): nacalaitesque

リン酸水素二カリウム (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): nacalaitesque

$\beta$ -NAD<sup>+</sup> ( $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide,oxidized from  $\beta$ -Diposphoynucleotide,oxidized from coenzyme I,oxidized from): オリエンタル酵母 (株)

Glucose-6-phosphate (G-6-P) : SIGMA  
 $\beta$ -NADP<sup>+</sup> ( $\beta$ -Nicotinamide-adenine  
dinucleotide phosphate, oxidized from  
triphosphoryridine nucleotide, oxidized from  
coenzyme II, oxidized from) : オリエンタル酵  
母 (株)

Glucose-6-phosphate dehydrogenase  
(G-6-PDH) : SIGMA  
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl<sub>2</sub> ·  
6H<sub>2</sub>O) : 和光純薬工業 (株)

<試薬の調製>

#### 0.1 M ピロリン酸 Buffer (pH 8.8)

ピロリン酸ナトリウム十水和物を 4.46 g,  
塩酸セミカルバジドを 0.5 g 秤量し, 約 80 ml  
の超純水に溶解した. 1 M · NaOH を加えて  
pH を 8.8 に調整してから, 超純水を加え 100  
ml にした.

#### 2.5 mg/ml MTT

MTT を 0.125 g とり 50 ml の超純水を加え  
溶かした. 褐色瓶に入れ冷蔵で約 3 ヶ月保  
管可能.

#### 1 mg/ml PMS

PMS を 0.01 g とり 10 ml の超純水を加え溶  
かした. 光に弱いので褐色瓶に入れた. 用  
事調製.

#### 50% グリセロール

50ml のグリセロールに 50ml の水を加えて  
攪拌する. -25°C で保存.

#### 1500 IU/ml ADH 原液

15000 IU の ADH がはいっているビンに  
10ml の 50% グリセロール (-25°C に氷冷) を  
加え泡立てない様にまぜる. 一晩 -25°C で放  
置して溶解した.

使用直前に, 上記 ADH 原液を 50 mM KPB  
(pH 7.0) で 20 倍希釈した.

#### 75 IU/ml ADH

ADH 原液を 50 mM KPB (pH 7.0) で 20 倍  
希釈した.

#### NAD 測定用 Buffer (pH 7.4)

0.1 M ニコチンアミドと 0.5 M エタノール  
を含む 65 mM のグリシルグリシン- NaOH  
Buffer (pH 7.4)

8.59 g のグリシルグリシンと 12.21 g のニ  
コチンアミドをビーカーに入れ, 超純水を  
約 800 ml と 23.0 g のエタノールを加え溶解  
した. 1 M NaOH を用いて pH を 7.4 に合わ  
せてから, 超純水で 1000 ml にした.

#### 0.5 M KPB (pH 6.0)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 6.85 g とり 80 ml の超純水を加  
え完全に溶解した後超純水で 100 ml にした.  
(0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を 8.71 g とり 80 ml の超純水を加  
え完全に溶解した後超純水で 100 ml にした.  
(0.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> に 0.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 混ぜ合わせ,  
pH を 6.0 に調整した.

#### 抽出用 Buffer

0.1 M ニコチンアミドを含む 0.5 M KPB  
Buffer (pH 6.0)

0.5 M KPB (pH 6.0) 100 ml にニコチンアミ  
ドを 12.2 g 加え, 溶けたら超純水を加え  
1000 ml にした.

#### 10 $\mu$ g/ml NAD<sup>+</sup>

$\beta$ -NAD<sup>+</sup> を 0.005 g とり 5 ml の超純水を加  
えた. (1 mg/ml NAD<sup>+</sup> 原液)

NAD<sup>+</sup> 原液を超純水で 100 倍希釈して使用.

-25°Cで保存した。

### 10 mM G-6-P

G-6-P を 0.091 g をとり、超純水を 30 ml 加え溶解した。4°Cで保存した。

### 1µg/ml NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> を 0.01 g 秤量し 10 ml の超純水に溶かした。(1 mg/ml NAD<sup>+</sup>原液) NAD<sup>+</sup>原液を超純水で 1000 倍希釈して使用した。  
-25°Cで保存した。

### 500 IU/ml G-6-PDH 原液

500 IU /ml 50%グリセロールとなるように、G-6-PDH のビンに直接 50%グリセロール (-25°Cに冷却してあること)を加えて溶解した。

### 2 IU/ml G-6-PDH

G-6-PDH 原液を 50 mM KPB (pH 7.0)で 250 倍希釈した。

### 0.2 M MgCl<sub>2</sub>

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O を 19.04 g 取り超純水を加えて 100 ml にした。

### <測定機器>

測定に使用したマイクロプレートリーダー用吸光測定装置は Labsystem の Multiskan Ascent (製造元: Thermo Bioanalysis Company, FIN-00811 Helsinki, Finland.) を使用し、570nm のフィルターを使用した。本機器は、振とう機能、インキュベーション機能がついており、96 穴のスキャンを 7 秒で行うことができる。さらに、振とう、インキュベーション、測定の時間、データの保存はあらかじめプログラミングができるので、ピペット操作以外はすべて自動で行うことができる。マイクロプレートタイ

ターは住友ベークライト (株) の ELISA 用プレートを使用した。

### <測定方法>

=操作上の注意=

MTT, PMS は光に弱いので、なるべく暗い部屋で実験を行った。

=NAD の測定法=

### NAD<sup>+</sup>の絶対量測定法

	Reference	Sample
0.1 M ピロリン酸 Buffer (pH8.8) (ml)	0.5	0.5
超純水(ml)	1.0	0
10 µg/ml NAD <sup>+</sup> (ml)	0	1.0
エタノール (µl)	10	10

(1) 上記試薬をマイクロセルに順次入れ混和し、分光光度計で 340 nm の波長で 0 合わせをした。

(2) ADH(75 IU/ml)を 10µl ずつ入れ混和し、340 nm の波長で最高値を測定した。

(3) NADH の 340nm の分子吸光係数 6200 から、真の NAD<sup>+</sup>値を求めた。

正確な濃度を求めた NAD<sup>+</sup>を使用して NAD<sup>+</sup>測定のための検量線を作製した。

### 検量線作成

基準とする 10 µg/ml NAD<sup>+</sup>の濃度や ADH の活性条件が異なるため、サンプル測定時は検量線を書いた。

v 超純水 (µl)	1000	900	800	700	600	500
10 µg/ml NAD <sup>+</sup> (µl)	0	100	200	300	400	500

上記試薬のうち 10µl をサンプルのところに

置き換えて、同様に操作した。

**反応組成 (300 $\mu$ l)**

2.5mg /ml MTT	10 $\mu$ l
1mg /ml PMS	80 $\mu$ l
測定用 Buffer(pH 7.4)	150 $\mu$ l
サンプル	10 $\mu$ l

- (1) 上記試薬を Buffer まで 96well のプレートに順次 8 連式ピペットマンを使用して入れていった。10 秒間、960rpm で振とう後、5 分間 37°C でプレインキュベーションを行った後、570nm の吸光度を測定した。(測定①)
- (2) 測定後、上記試薬のサンプルを順次入れていった。10 秒間、960rpm で振とう後、直ちに 570nm の吸光度を測定した。(測定②)
- (3) 5 分間 37°C で再度プレインキュベーションを行った後、570nm の吸光度を測定した。(測定③)
- (4) ADH(75IU/ml)を 8 連ずつ 30 秒間隔で加え、加えるごとに 10 秒間、960rpm で振とうを行った。最後の 8 連の ADH を加え、振とう後、各々の列を正確に 37°C で 10 分間、インキュベーションした後、570nm の吸光度の測定を行った。

=NADP の測定法=

**NADP<sup>+</sup>絶対量測定法**

	Reference	Sample
測定用 Buffer (pH7.4) (ml)	0.5	0.5
10 mM G-6-P (ml)	0.2	0.2
0.2 M MgCl <sub>2</sub> (ml)	0.1	0.1
超純水 (ml)	0.5	0.46
1mg/ml NADP <sup>+</sup> (ml)	0	0.04

- (1) 上記試薬をマイクロセルに順次入れ混和し、分光光度計で 340 nm の波長で 0 合わせをした。
- (2) G-6-PDH (2 IU/ml)を 10 $\mu$ l ずつ入れ混和し、340 nm の波長で最高値を測定した。真の NADP<sup>+</sup>値を求め、検量線に用いた。

**検量線作成**

基準とする 1  $\mu$ g/ml NADP<sup>+</sup> の濃度や G-6-PDH の活性条件が異なるため、サンプル測定時は検量線を書いた。

超純水 ( $\mu$ l)	1000	900	800	700	600	500
1 $\mu$ g/ml NADP <sup>+</sup> ( $\mu$ l)	0	100	200	300	400	500

上記試薬のうち 50 $\mu$ l をサンプルのところに置き換えて、同様に操作した。

**反応組成 (300 $\mu$ l)**

2.5mg /ml MTT	10 $\mu$ l
1mg /ml PMS	80 $\mu$ l
測定用 Buffer(pH 7.4)	80 $\mu$ l
10 mM G-6-P	60 $\mu$ l

サンプル	20 $\mu$ l
G-6-PDH (2 IU/ml)	50 $\mu$ l

- (1) 上記試薬をG-6-Pまで96wellのプレートに順次8連式ピペットマンを使用して入れていった。10秒間、960rpmで振とう後、5分間37°Cでプレインキュベーションを行った後、570nmの吸光度を測定した。(測定①)
- (2) 測定後、上記試薬のサンプルを順次入れていった。10秒間、960rpmで振とう後、直ちに570nmの吸光度を測定した。(測定②) 5分間37°Cで再度プレインキュベーションを行った後、570nmの吸光度を測定した。(測定③)
- (3) G-6-PDH (2 IU/ml)を8連ずつ30秒間隔で加え、加えるごとに10秒間、960rpmで振とうを行った。最後の8連のG-6-PDHを加え、振とう後、各々の列を正確に37°Cで10分間、インキュベーションした後、570nmの吸光度の測定を行った。

### C. 結果

#### 1) 肝中の酵素活性

図1に示した。宇宙飛行直後、ACMSDase, QPRTase活性が共に減少した。24時間後にはFlight Control群に比べ活性が増加し、72時間後にはFlight Control群と同レベルになった。

この影響はACMSDaseでより顕著に現われた。

#### 2) 肝中NAD・NADP含量

図2に示した。宇宙飛行によって、肝中NAD含量に変化は見られなかったが、肝中NADP含量はFlight Control群の半以下にまで減少した。24時間後には、Flight Control群に対してNAD含量が約1.8倍、NADP含量が約1.5倍となり、大幅な増加傾向を示した。72時間後にはNAD含量が約1.4倍、NADP含量が約1.3倍となり、増加傾向を示した。

### D. 考察

生体が生命活動を営む上で、酸素はなくてはならない存在である。酸素のほぼ98%はエネルギー産生に有効利用されるが、残りの2%程度の酸素は活性酸素の発生につながり、この活性酸素の過剰生成が生体内に細胞損傷や組織障害などの酸化的損傷を引き起こす。この生体内の酸化的損傷を防ぐ酵素にグルタチオンペルオキシダーゼがあり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はグルタチオンペルオキシダーゼと還元型グルタチオンの作用でH<sub>2</sub>Oに変換され無毒化される。このとき還元型グルタチオンは酸化型グルタチオンとなり、NADPHは再びこの反応が行える様、酸化型グルタチオンを還元型に戻す役割を果たす。このようにNADPは細胞の酸化的損傷を防ぐ反応で重要な役割を果たしている。

実際、赤血球においてNADPHは、ペントースリン酸経路上のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの反応で産生されるため、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠乏症の患者では、NADPHの産生は抑制される。

このNADPH産生抑制によりグルタチオンペルオキシダーゼの働きが抑制され、 $H_2O_2$ の産生を阻害できず、その結果、酸化損傷が起こり赤血球膜の破壊、タンパク質やDNAの酸化などという致命的な症状を起こす。

このNADPHを産生するNADP<sup>+</sup>はニコチンアミドから生合成されており、そして理論上約2万回代謝されると異化され破壊することがわかっている。今回の実験では宇宙飛行によるNADPレベルの大幅な減少が見られた。これは、宇宙環境という過酷な環境で極度のストレスを受けたことで、体内での活性酸素の生成が増加し、その結果、生体内でNADPHを必要とするこのような代謝が亢進し、NADPの必要量が高まったことに起因すると考えられる。よって、宇宙環境でNADPが欠乏するとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠乏症発症時に近いメカニズムを経て、赤血球膜の破壊、タンパク質やDNAの酸化などという致命的な症状を起こす可能性があると考えられる。

本研究では、宇宙環境がNAD代謝に及ぼす影響を調べた。その結果、宇宙環境ではNADPの必要量が高まることが明らかになった。そしてこれは、宇宙環境での種々のストレスによって生体内酸化が進み、それを阻止しようとする機構が働いたためであると推測できる。したがって、これらNAD・NADPの前駆体であるナイアシンの、宇宙環境での必要量は、地上での必要量に比べ高まる可能性が示唆される。

#### E. 健康危機情報

特記する情報なし

#### F. 研究発表

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. 福永哲夫 (2001) 宇宙におけるヒトの骨格筋変化, バイオメカニズム学会誌, **25**:24-28.
2. 大平充宣 (1997) 航空宇宙医学における廃用症候群 (3) 宇宙で骨格筋の変化, 総合リハビリテーション, **25**:235-241.
3. Burger EH, Klein-Nulend J (1998) Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone*, **22**,127S.
4. Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E (2001) Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr*, **749**:281-285.
5. Ichiyama A, Nakamura S, Kawai H, Honjo

- T, Nishizuka Y, Hayaishi O, Senoh S  
(1965) Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissues. *J Biol Chem*, 240:740-749.
6. Shibata K, Murata K. (1986) Blood NAD as an Index of Niacin Nutrition, *Nutr Int*, 2:177-181.
  7. Shibata K, Tanaka K. (1986) Simple Measurement of Blood NADP and Blood Levels of NAD and NADP in Humans, *Agric Biol Chem*, 50:2941-2942.
  8. 柴田克己, 岩井和夫 (1990) NADP 定量方法の改良と女子学生の血液中の NADP 値の訂正, *ビタミン*, 64:193-196.
  9. 柴田克己, 福渡 努, 土居美紀, 尾方進, 下岡令美, 田口寛, (2001) マイクロプレートリーダーを利用した NAD および NADP の微量定量法, *ビタミン*, 75:455-462.

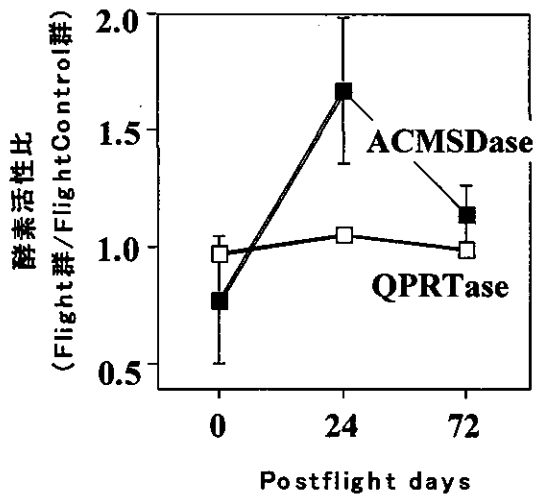
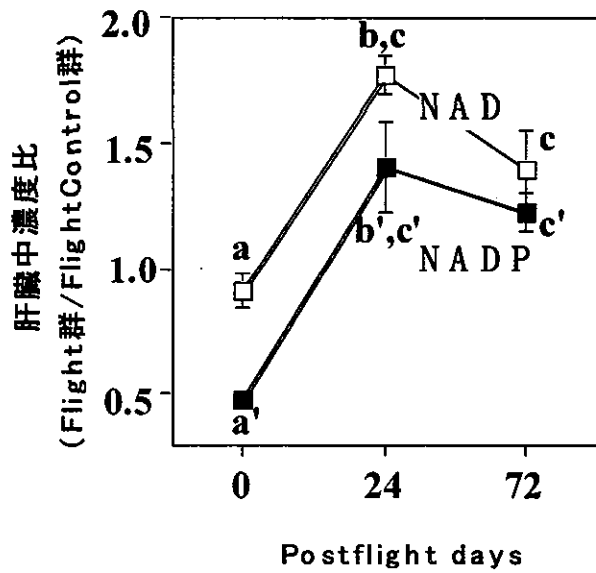


図1 宇宙飛行がトリプトファンニコチンアミド代謝調節酵素 ACMSDase, QPRTase に及ぼす影響



異なるアルファベットで有意差有り

図2 宇宙飛行が補酵素 NAD, NADP 含量に及ぼす影響



平成 16 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）  
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

II. 主任研究者の報告書

10. トリプトファン-ナイアシン代謝に関与する酵素活性から推定したラット乳仔のトリプトファン-ナイアシン転換率

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-ナイアシン転換率は、成人では重量比で 1/60 というデータがあるが、乳児のデータはなく、離乳直後のラットと成熟期のラットにおける実験値の外挿から、0～5 ヶ月の乳児では 0、6～11 ヶ月の乳児では 1/120 とされている。そこで、乳児から幼児のトリプトファン-ナイアシン転換率を推定するために、新生仔から離乳前のラットを使用して、トリプトファン-ナイアシン代謝に関与する酵素活性を測定し、成熟ラットの酵素活性と比較した。その結果、トリプトファン-ナイアシン転換経路の初発酵素であるトリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ（TDO）の活性が、出生直後の 0 日目および 6 日目では非常に弱かった。この結果は、乳児の初期においては、ほとんどトリプトファンからナイアシンは生合成されていないことを裏付けるものである。また、13 日目、20 日目の TDO 活性は日齢とともに増大したことから、このデータをヒトにあてはめれば、乳児の後期すなわち 6～11 ヶ月では本転換経路が作動しはじめており、成熟期の半分である 1/120 程度としてもさしつかえないと思われた。

## A. 目的

乳児(0~11カ月)の水溶性ビタミン必要量の算定精度が低いことが指摘されている。乳児の水溶性ビタミン必要量を求めるための根本的な考え方は、「乳児(0~5カ月)は、母乳を適量摂取している限り、健全に発育する。」<sup>1)</sup>というものである。また、6カ月から11カ月の乳児は離乳食を摂るようになるので、必要量を求めるのは複雑になるため、精度の高いデータを得ることが困難であり、我々が調べた限り報告は認められなかった。現在の必要量の求め方の考え方は、「0~5カ月児の必要量からの外挿値と成人の必要量からの外挿値を、平均化したものが適当であろう」<sup>1)</sup>である。具体的に述べれば、乳児(0~5カ月)の必要量に体表面積比、(6~11カ月の基準体重/0~5カ月の基準体重)<sup>0.75</sup>をかけた数値と成人(18~29歳)の必要量に、{(6~11カ月)の基準体重/成人(18~29歳)の体基準体重}<sup>0.75</sup>×(1+成長因子の0.3)をかけた数値の、二つの値の平均値である<sup>1)</sup>。これらの6~11カ月の乳児の必要量の外挿値は、若年成人から外挿した値よりも乳児から外挿した値の方がかなり低くなる。単位重量当たりの代謝回転は乳児の方が若年成人よりも高いと思われるのに、なぜであろうかという疑問に光をなげかけるために、このシリーズの研究を開始した。今回は、新生仔におけるトリプトファン-ナイアシン転換率に関する問題に絞って実験を行った。

## B. 実験方法

### 1. ラットの飼育方法

妊娠20日目のWistar系、雌ラットを日本クレア(株)より購入後、ただちに飼育ケージに入れ、固形飼料と水を自由に与えた。新生仔が出生した日を0日目とし、6日目、13日目、20日目の肝臓をそれぞれ摘出した。また、日本クレア(株)よりWistar系、雄ラットも購入し、同様に固形飼料と水を自由に与えて成熟(15週齢)させ、対照として用いた。動物室は温度20℃前後、湿度60%前後を維持し、明暗サイクルは6時~18時を明、18時~6時を暗とした。なお、本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を得たものである。

### 2. トリプトファン-ナイアシン代謝に関わる酵素活性の測定方法

断頭によりラットをと殺後、肝臓を摘出し

た。直ちに肝臓を細片し、5倍量の冷却した50mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を加え、テフロンホモゲナイザーで均一化した。このホモジネートを酵素源とし、トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ(TDO)<sup>2)</sup>、キヌレニナーゼ(Ky-ase)<sup>2)</sup>、3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ(3-HAO)<sup>2)</sup>、キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPRT)<sup>3)</sup>の活性測定を行った。

## C. 結果

ナイアシンは必須アミノ酸のトリプトファンから体内で合成されている。このトリプトファン-ナイアシン転換率は成人では、重量比で1/60というデータがあるが<sup>4)</sup>、乳児のデータはなく、離乳直後(21日齢)のラットにおける実験値と成熟ラットにおける実験値の外挿から、乳児ではこの転換経路は作動しておらず、転換率は0とされている<sup>5,6)</sup>。この推測の精度を高めるために、出産当日の0日目、6日目、13日目、20日目のラットの肝臓を取り出し、トリプトファン-ナイアシン転換経路の主要な酵素活性を測定した。その結果を表1にまとめた。TDOはトリプトファン-ナイアシン転換経路の初発酵素である。この酵素活性が、0日目および6日目では非常に弱かった。他の酵素活性は、出産直後の0日目でも、すでに十分な活性が検出された。

## D. 考察

ナイアシンは必須アミノ酸のトリプトファンから体内で合成される。その量は、成人では、重量比で1/60である<sup>4)</sup>。ところが、この比率は年齢によって変動し、「第六次改定 日本人の栄養所要量-食事摂取基準-」では、離乳直後のラットと成熟期のラットにおける本転換経路に関与する酵素活性の比較から、0~5カ月の乳児では0、6~11カ月の乳児では1/120としている<sup>6)</sup>。このデータの精度を高めるために、出産当日の0日目、6日目、13日目、20日目のラットの肝臓を取り出し、トリプトファン-ナイアシン転換経路の主要な酵素活性を測定した。その結果、本転換経路の初発酵素であるTDO活性が0日目、6日目ではわずかに検出されたにすぎなかった。この事実は、乳児の初期においては、ほとんどトリプトファンからナイアシンは生合成されていない

ことを裏付けるものである。13日、20日目と日齢とともに活性は増大し、20日目では成熟ラットの約1/2であった。したがって、このデータをヒトにあてはめれば、乳児の後期すなわち6~11カ月では、本転換経路が作動しはじめており、成熟期の半分である1/120程度としてもさしつかえないと思われた。

#### E. 結論

離乳期のトリプトファン-ナイアシン転換率の精度を高めるために、ラットを用いて実験を行った。出産後、経日的にトリプトファン-ナイアシン転換経路の主要な酵素活性を測定した。その結果、本転換経路の初発酵素であるトリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ活性が0日目、6日目ではわずかに検出されたにすぎなかった。13日目、20日目と日齢が進むとともに本酵素活性は増大し、成熟ラットの約1/2に達した。したがって、このデータをヒトにあてはめれば、乳児の後期すなわち6~11カ月では本転換経路は作動しはじめており、成熟期の半分であると算定してもさしつかえないと思われた。

#### F. 健康危険情報

特記する情報はない。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### I. 引用文献

1. 厚生労働省 (2005) 日本人の食事摂取基準 2005年版. 東京
2. Shibata K (1987) Tryptophan-niacin metabolism in alloxane diabetic rats and partial prevention of alloxane by nicotinamide. *Agric Biol Chem* **51**, 811-816
3. Shibata K (2000) Reversed-phase high-

performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyltransferase. *J Chromatogr* **749**, 281-285

4. Horwitt MK, Harper AE, Henderson LM (1981) Niacin-tryptophan relationships for evaluating niacin equivalent. *Am J Clin Nutr* **34**: 423-7
5. Shibata K (1990) Effects of ethanol feeding and growth on the tryptophan-niacin metabolism in rats. *Agric Biol Chem* **54**: 2953-9
6. 厚生省 (1999) 日本人の栄養所要量-食事摂取基準-. 東京

表 1. 出生後のトリプトファン-ナイアシン転換経路に関わる主要な酵素の活性変動 (ラット)

	0 日目	6 日目	13 日目	20 日目	成熟ラット
TDO	0.08±0.01	0.06±0.01	0.28±0.04	0.48±0.02	1.18±0.17
Ky-ase	0.50±0.01	0.41±0.02	0.50±0.06	1.02±0.03	1.39±0.18
3-HAO	528±38	684±25	638±30	570±20	627±54
QPRT	1.34±0.03	1.73±0.03	1.06±0.05	0.67±0.02	0.62±0.03

値は、3 匹のラットの平均値±標準偏差である。単位は $\mu\text{mol/hr/g liver}$  で示した。TDO = Tryptophan dioxygenase, Ky-ase = kynureninase, 3-HAO = 3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase, QPRT = Quinolate phosphoribosyltransferase.