

素蛋白質発現に対する抗生物質投与時期の影響

第78回日本細菌学会総会 東京 平成17年4月

4. 神村卓也、長谷川忠男、岡本陽、山田景子、鳥居啓三、太田美智男

S. pyogenes M1 臨床分離株の分泌タンパク質プロファイルと二成分制御系発現制御因子 CsrS のアミノ酸変異の関連

第42回日本細菌学会中部支部総会 金沢 平成17年11月

5. 岡本陽、長谷川忠男、神村卓也、山田景子、鳥居啓三、太田美智男
LC/LC-MS/MS を用いた *Streptococcus pyogenes* の細胞分画による階層的プロテオーム解析

第42回日本細菌学会中部支部総会 金沢 平成17年11月

<分担研究報告書>

トリプトファン代謝による T 細胞応答の制御機構

分担研究者 長瀬文彦 (名古屋大学医学部保健学科、教授)

研究要旨：トリプトファン代謝産物の 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)、kynurenine、3-hydroxykynurenine などは T 細胞にアポトーシスを誘導して免疫応答を抑制することが知られている。3-HAA は酸化により O_2^- と cinnabarinilic acid (CA) を生成し、この反応は superoxide dismutase (SOD)、 $MnCl_2$ 、カタラーゼなどで促進される。しかし、actinomycin D と骨格が同じである CA がアポトーシスを誘導することは報告されていない。本研究では 3-HAA による胸腺細胞のアポトーシスの誘導は SOD または $MnCl_2$ により増加し、カタラーゼによりさらに増強された。3-HAA による細胞内の活性酸素 ROS の産生は SOD または $MnCl_2$ により増強されたが、カタラーゼによって抑制された。3-HAA からの CA の生成は SOD または $MnCl_2$ により増加し、カタラーゼによってさらに増強された。それゆえ、3-HAA によるアポトーシスの誘導は ROS の産生ではなく CA の生成と関連している。合成した CA は 3-HAA より 10 倍強いアポトーシス誘導活性を示した。3-HAA と CA はカスパーゼ依存的にアポトーシスを誘導した。アポトーシス誘導と ROS の産生は 3HAA 単独では関連したが CA では関連しなかった。N-acetyl-L-cysteine (NAC) は CA の生成の阻止と CA の崩壊の促進により 3-HAA と CA によるアポトーシスの誘導を阻止した。これらの成績から 3-HAA は酸化によって生成する ROS と CA によって胸腺細胞にアポトーシスを誘導するが、CA は ROS 非依存性に強くアポトーシスを誘導することが示された。

研究目的： 肝臓外のトリプトファン代謝は indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) を律速酵素とするキヌレニン代謝経路によって調節されている。IDO は免疫応答や炎症により産生される IFN- γ によって発現が増強される。トリプトファン代謝は免疫応答を第一にトリプトファンの枯渇による T 細胞増殖の阻止、第二に 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) をはじめとするトリプトファン代謝産物による T 細胞のアポト

シスの誘導により制御している。IDO は微生物感染に対する防御、妊娠や移植における拒絶反応の抑制、腫瘍免疫の抑制、アレルギーや自己免疫性疾患の発症の制御など免疫応答と深く関係している。最近、 $CD4C^+D25^+$ 制御性 T 細胞が恒常的に発現する CTLA-4 によって抗原提示細胞である樹状細胞(DC)やマクロファージ($M\phi$)の CD80/CD86 を刺激すると、IDO を発現する制御性の DC や $M\phi$ が誘導され、ナイーブ T 細胞の応答を抑

制することが示された。一方、quinolinic acid などのトリプトファン代謝産物はアルツハイマー疾患の発症や AIDS における脳の障害に関わっている。IDO 発現は加齢とともに増加し、加齢に伴う免疫不全とも関係する。このように IDO の発現の調節は免疫応答の制御において重要である。

トリプトファン代謝産物の 3HAA は酸化により 3-hydroxyanthranilyl radical となり、 O_2^- と cinnabarinic acid (CA) の産生を誘導する。3HAA のアポトーシス誘導活性と CA の細菌増殖阻止活性の報告はあるが CA のアポトーシス誘導活性の報告はない。それゆえ、3HAA による胸腺細胞のアポトーシス誘導と 3HAA の酸化の関係を検討し、CA が強いアポトーシス活性を示す成績を得た。

B. 研究方法

1. 細胞培養

BALB/c マウス胸腺細胞に 3-HAA、SOD、 $MnCl_2$ 、カタラーゼ、CA 等を添加し、18 時間培養した。

2. アポトーシスと ROS 産生の測定

アポトーシスはフローサイトメトリーと電気泳動により測定した。細胞内の ROS 産生はフローサイトメトリーにより測定した。

3. CA の測定と合成

6 時間培養した培養上清中の CA を $450 \mu m$ にピークを示す吸収スペクトルで測定した。CA の合成は Prinz と Savage の方法により 3-HAA から作

製し、HPLC と吸収スペクトルにより 98%以上の純度を確認した。

(倫理面への配慮)

実験中にはマウスに苦痛を与えぬよう十分に配慮した。

C. 研究結果

1. 3-HAA によるアポトーシスの誘導と ROS の産生の非相関性

3-HAA による胸腺細胞のアポトーシスの誘導は $300 \sim 500 \mu M$ でピークを示し、 $100 \mu M$ と $1mM$ ではアポトーシスを誘導しなかった。 $100 \mu M$ の 3-HAA に SOD または $MnCl_2$ を添加するとアポトーシスが誘導され、カタラーゼを併用するとさらに増強された。しかしカタラーゼのみではアポトーシスの誘導を増強しなかった。3HAA による細胞内の ROS の産生は $300 \mu M$ 以上の 3HAA の濃度に依存して増加した。ROS を産生しない $100 \mu M$ の 3-HAA に SOD または $MnCl_2$ を添加すると ROS の産生が誘導されたが、カタラーゼはそれを抑制した。それゆえ、3-HAA によるアポトーシスは ROS の産生のみでは説明できない。

2. 3-HAA によるアポトーシスの誘導と CA の産生の相関性

3HAA による CA の産生は $MnCl_2$ または SOD により増強され、カタラーゼによりさらに増強された。しかしカタラーゼのみでは CA の産生を増強しなかった。SOD や $MnCl_2$ による CA の産生は一定時間に停止したが、カタラーゼ存在下では経時的に

増強した。それゆえアポトーシスの誘導は ROS の産生ではなく CA の産生と相関している。合成した CA によるアポトーシスの誘導は 30~50 μ M でピークを示し、3HAA より 10 倍高いアポトーシス誘導活性を示した。

3. CA による ROS 非依存性アポトーシスの誘導

3HAA または CA によって誘導されるアポトーシスはカスパーゼ依存性であった。しかし、強くアポトーシスを誘導する 30-50 μ M の CA は細胞内の ROS の産生を有意に増強しなかった。CA は培養中に徐々に崩壊し、カタラーゼによって崩壊は部分的に抑制された。しかし、CA によるアポトーシスの誘導は SOD、MnCl₂、カタラーゼによっては影響されなかった。NAC は 3-HAA からの CA の生成と ROS の産生を抑制するとともに合成した CA を急速に崩壊させることにより 3-HAA と CA によるアポトーシスの誘導を完全に阻止した。

D. 考察

SOD または MnCl₂ とカタラーゼにより増強される 3-HAA のアポトーシス誘導活性が培養中に産生される CA と相関することおよび合成した CA の成績から、CA は強いアポトーシス誘導活性を有することが示された。

2 個の 3-HAA は 6 個の e⁻と H⁺を失って CA を生成する。3-HAA は還元剤であるが O₂ に電子を供与すると O₂⁻が生成し、H₂O₂ の生成へと反応が進む。O₂⁻や H₂O₂ は CA を崩壊させ

るので、SOD やカタラーゼはこれら除去して CA の生成を促進すると報告されてきた。しかし、本研究では SOD や MnCl₂ が 3-HAA と反応して細胞内 ROS の産生を増強し、カタラーゼはそれを抑制した。最近、Liochev と Fridovich は Cu,Zn-SOD が 3-HAA を基質として酸化することを報告している。それゆえ、以下の酸化還元サイクル反応が CA 産生の機序に適していると思われる。酸化型 SOD や Mn³⁺は 3-HAA に反応して 3-HAA ラジカルを生成させ、自らは還元型 SOD または Mn²⁺となり、3-HAA ラジカルは O₂ を還元して O₂⁻と CA を生成させる。酸化型 SOD や Mn²⁺が O₂⁻を H₂O₂ に還元し、自らは酸化される反応はカタラーゼによって促進される。それゆえ、単独では CA の産生を誘導できないカタラーゼは SOD や MnCl₂ が単独で誘導する CA の産生を酸化還元サイクルによってさらに増強させる。

CA は ROS 非依存性にどうしてアポトーシスを誘導するのだろうか。NAC は CA を崩壊して CA によるアポトーシスの誘導を阻止した。このことから、CA は細胞の SH-基と反応して、タンパク-SH の修飾やグルタチオンの酸化によりアポトーシスを誘導すると推測される。CA は核酸合成阻害剤の actinomycin D と骨格が同一であり、アポトーシス誘導活性のメカニズムは興味深い。

3-HAA から CA を産生する酵素として微生物の産生する laccase とそ

の哺乳類のカウンターパートとしてセルロプラスミンが報告されており、チロシナーゼも同様な活性を示す。トリプトファン代謝産物の 3-HAA、kynurenine、3-hydroxykynurenine は T 細胞増殖を互いに付加的に抑制することが報告されている。本研究は炎症の局所で産生される 3-HAA が、酸化によってアポトーシス誘導活性の高い CA に変化して、T 細胞応答を抑制する可能性を示唆している。

E. 結論

3-HAA は酸化によって生成する ROS と CA によって胸腺細胞にアポトーシスを誘導するが、CA は ROS 非依存性に強くアポトーシスを誘導する。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

なし。

(2) 学会発表

1. 平松莉瑛、原稔晶、齋藤寛、川部勤、長瀬文彦； トリプトファン代謝産物 3-hydroxyanthranilic acid が誘導する胸腺細胞のアポトーシスの SOD、MnCl₂ およびカタラーゼによる増強 第 28 回日本トリプトファン研究会 2005 年 12 月（愛知）
2. 原稔晶、田中景子、秋元秀俊、滝川修、平松莉瑛、齋藤寛、川部勤、長瀬文彦； CpG、vitamin D₃、

dexamethasone の併用によりマウス骨髄由来樹状細胞に誘導される indoleamine 2,3-dioxygenase の発現と nitric oxide による酵素活性の制御 第 28 回日本トリプトファン研究会、2005 年 12 月（愛知）

3. 平松莉瑛、原稔晶、川部勤、長瀬文彦； トリプトファン代謝産物 3-hydroxyanthranilic acid によって胸腺細胞に誘導されるアポトーシスの SOD とカタラーゼによる増強 第 34 回日本免疫学会、2005 年 12 月（横浜）