

生体より得られた血液・髄液サンプルを用いて CPR の遺伝子多型、ELISA を用いての血中濃度、脳血管障害との関連性を解析した。また髄液・血液中のコレステロール、中性脂肪濃度を HPLC 法を用いて測定を行い、認知症、脳血管障害との関連性について検討した。

3. 脈絡叢発現蛋白解析

書面にて承諾を得た剖検脈絡叢サンプルを用いて網羅的発現蛋白解析を共同研究にて行っている。

(倫理面への配慮)

本施設およびブレインバンクに関して、生命倫理面および個人情報管理面では考えうる最大限の努力を払っており、ヘルシンキ宣言の内容、遺伝学的検査に関するガイドライン(遺伝医学関連学会等10学会および研究会、平成15年8月)、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年4月1日施行)および疫学研究に関する倫理指針(3省、平成14年7月1日施行)に完全に準拠するものと考えている。

C. 研究結果

1. 遺伝子多型解析

A) CPR/TAFI の遺伝子多型を脳梗塞と正常加齢者で解析を行った。正常加齢者に比べ、脳梗塞患者ではユニークな傾向があることを突き止めた。

B) BDNF に関しては、これまでの報告でも統一した結果は出ていないが、AD, DLB ともに一定の傾向を見出すには至らなかった。

2. 発現遺伝子・蛋白解析;

A) 生体より得られた血液サンプルを用いて

CPR の遺伝子多型、ELISA を用いての血中濃度、脳血管障害との関連性を解析し、その濃度と遺伝子型のパターンが正常加齢者とは異なる事を突き止めた。

B) 髄液・血液中のコレステロール、中性脂肪濃度を HPLC 法を用いて測定を行い、認知症、脳血管障害との関連性について検討した。

3. リン酸化酵素発現解析

AD 脳における発現解析は終了したが、その病態に対する意義に関しては検討中である。

D. 考察および結論

今年度の結果としては、目新しい成果を得てはいない。しかしブレインバンクサンプルに対して遺伝的バックグラウンド情報の整備を開始した事により、今後遺伝的背景のしっかりしたサンプルに基づいて、外的ストレス因子に対する検索を進めていくことが可能になると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1) Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K.

Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies.

Acta Neuropathol (Berl). 2006

- Feb;111(2):109-14. Epub 2006 Jan 19.
- 2) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M.
Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease.
Psychiatry Clin Neurosci. 2006 Apr;60 Suppl 1:S34-9.
 - 3) Akatsu H, Yamagata H.D, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K,
Variations in the BDNF Gene in Autopsy-Confirmed Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies in Japan
Dement Geriatr Cogn Disord 2006;22:216-222
 - 4) Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H, Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., Paraskevas, G.P., Lutjohann, D., von Eckardstein, A., Hock, C., Nitsch, R.M., Papassotiropoulos, A.
Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease.
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Jul 5;141(5):534-6.
 - 5) Heese K, Akatsu H.
Alzheimer's disease--an interactive perspective.
Curr Alzheimer Res. 2006 Apr;3(2):109-21.
 - 6) Isojima D, Togo T, Kosaka K, Fujishiro H, Akatsu H, Katsuse O, Iritani S, Hirayasu Y
Vascular complications in dementia with Lewy bodies: a postmortem study
Neuropathology, in press.
 - 7) Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.
A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease.
Life Sci. 2006 Apr 18;78(21):2444-8. Epub 2005 Nov 21.
 - 8) Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada.
A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes.
Brain Res. 2006 Jul 17; [Epub ahead of print]
 - 9) Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M,

Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M.

Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jul 7;345(3):967-72. Epub 2006 May 11.

(2) 学会発表

- 1) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行、丸山将浩、田代学、舟木善仁、石川洋介、加藤元久、赤津裕康、山本孝之、成田勉、古川勝敏、岩田錬、伊藤正敏、谷内一彦、荒井哲行
アルツハイマー病の早期診断のため PET プローブの開発
東北大学先進行医工学研究機構第 2 回公開シンポジウム(2006.1.24)
- 2) 赤津裕康、松本光弘、宮本圭子、山本淑子、芦田欣也、高見正雄、小橋修
胃瘻造設患者へのタンパク質補給食品(メイプロテイン)の栄養介入による栄養改善効果
第 21 回日本静脈経腸栄養学会(2006.1.27)
- 3) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
アミロイド β 蛋白の画像化によるアルツハイマー病の早期診断
痴呆を語る会(2006.2.18)
- 4) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
PET による β アミロイドイメー

ジの可能性

第 35 回日本神経放射線学会(2006.2.23)

- 5) 赤津裕康、宮本圭子、谷水清美、山本淑子、小橋修、山本孝之
栄養療法にて肝性脳症をコントロールし得た末期肝癌例
第 6 回愛知 NST 研究会(2006.2.25)
- 6) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
 β アミロイドイメーシング
AD 研究会画像診断サブコミティ(2006.2.4)
- 7) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
アミロイドイメーシング用 PET プローブの開発とその臨床応用
第 79 回日本薬理学会年会(2006.3.10)
- 8) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、名倉潤、川尻真和、秦龍二、赤津裕康、紙野晃人、武田雅俊、三木哲郎
519 候補遺伝子アプローチによるアルツハイマー病関連遺伝子の探索
日本内科学会総会(2006.4.14-16)
- 9) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、赤津裕康、紙野晃人、川尻真和、武田雅俊、三木哲郎
PE-305 リンパ球特異的蛋白チロシンキナーゼはアルツハイマー病の新規リスク遺伝子である
日本神経学会(2006.5.11-13)
- 10) 三木哲郎、山縣英久、満田憲昭、鐘望涛、青木守、赤津裕康、紙

- 野晃人、武田雅俊、小原克彦、小阪憲司
PE-306 ニカストリン遺伝子スプライス変異と確実例アルツハイマー病の関連
日本神経学会(2006.5.11-13)
- 1 1) 赤津裕康、水上勝義、石井俊、山本孝之、小阪憲司、片桐拓也、内田和彦、朝田隆
アルツハイマー病患者における脈絡叢のプロテオーム解析
日本精神神経学会(2006.5.11-13)
- 1 2) 赤津裕康、三室麻耶、中澤秀嘉、松川則之、山本孝之、堀映、吉田眞理、小阪憲司、橋詰良夫
Amyloid angiopathy を伴った Orthochromatic(sudanophilic) leukodystrophy の一例
第 47 回日本神経病理学会(2006.5.24-26)
- 1 3) Hiroyasu Akatsu, Hidehisa Yamagata, Jun Kawamata, Kouzin Kamino, Masatoshi Takeda, Takayuki Yamamoto, Tetsuro Miki, Ikuo , Shun Shimohama, Kenji Kosaka
Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor(BDNF) Gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease(AD) or Dementia with Lewy bodies(DLB) in Japan
第一回国際ブレインバンク会議(2006.6.13-15)
- 1 4) Kazuki Satoh, Mitsumi Hata, Seiji Takahara, Tomoko Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi Yokota, Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka and Tatsuo Yamada
Novel genes transcriptionally induced in senile-plaque associated astrocytes
第 20 回国際生化学・分子生物学会議 / 第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議 / 第 79 回日本生化学会大会、第 29 回日本分子生物学会年会および第 59 回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)
- 1 5) Hiroyasu Akatsu, Masahiro Umezu, Takashi Ishii, Hideyuki Suzuki, Takayuki Yamamoto, Takuya Katagiri, Katsuyosi Mizukami, Takashi Asada, Kenji Kosaka, Kazuhiro Uchida
Proteome analysis of choroid plexus in Alzheimer's disease
第 20 回国際生化学・分子生物学会議 / 第 11 回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議 / 第 79 回日本生化学会大会、第 29 回日本分子生物学会年会および第 59 回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)
- 1 6) Saori Hata, Yoichi Araki, Hiroyasu Akatsu, Katsuya Urakami,

Masaki Nishimura, Tadashi Nakaya,
Toshiharu Suzuki

β -Alca, metabolic products of
Alcadein, as a novel diagnostic
marker in CSF of Alzheimer's disease
国際アルツハイマー学会
(2006.7.15-20)

17) Kazuki Satoh, Mitsumi
Hata, Seiji Takahara, Tomoko
Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi
Yokota, Hiroyasu Akatsu, Takayuki
Yamamoto, Kenji Kosaka and Tatsuo
Yamada

Novel genes transcriptionally
induced in senile-plaque associated
astrocytes

第 36 回米国ニューロサイエンス
(2006.10.14-18)

(2) 赤津裕康、三室麻耶、谷由章、山本孝
之、堀映、橋詰良夫
パーキンソニズムに認知症状を伴っ
た 1 剖検例
第 34 回臨床神経病理懇話会
(2006.11.18-19)

<分担研究報告書>

免疫系による老化制御

分担研究者 丸山光生（国立長寿医療センター研究所、老化機構研究部長）

研究要旨：加齢に伴う身体の機能低下や老年病の発症メカニズムについて細胞老化をモデルとして解明し、その予防や治療法の開発に貢献することを目指す。細胞老化は正常細胞にストレスが蓄積することによって細胞増殖が不可逆的に停止する現象として知られており、アポトーシスと並ぶ癌抑制機構として機能することが示唆されている。本年度の研究では新規細胞老化特異的発現亢進 TARSH 遺伝子に加え、細胞死関連遺伝子 DAP3 の細胞老化における生理的機能について解析した。その結果、1) 老化関連遺伝子として同定した TARSH 遺伝子が発癌抑制因子でもある可能性を示唆し、加齢に伴う生体機能低下と発癌抑制の双方に関与する機能分子であること。2) DAP3 の発現は分裂老化および酸化ストレスによる早期老化において減少すること、それらの減少が MEF 細胞においては分裂老化そのものを、また早期老化においてはミトコンドリアにおける活性酸素の産生を抑制する効果を有する老化関連分子であることが明らかになった。

A. 研究目的

MEF(マウス胎児由来繊維芽細胞)の細胞老化において遺伝子発現が亢進する機能未知分子 Tarsh (Target of Nesh),とアポトーシス関連遺伝子である DAP3 (Death Associated Protein 3) と細胞老化の関係に着目し、細胞老化における機能やそれらの機能を制御する機構を解明することを通して、急速な社会の高齢化が進む我が国にとって高齢者が健康で生き甲斐を持って生活できる社会を構築することを目的としている。

B. 研究方法

ストレス応答性細胞老化において、培養細胞株を用いたin vitroでのTarsh遺伝子発現を調節する機構について解析する。生体におけるTarsh遺伝子の個体老化における役割については加齢マウス個体における臓器別Tarsh遺伝子の発現動態や特異性等の詳細を検討する。具体的にはShRNAシステムを駆使したTarsh遺伝子発現抑制細胞における細胞増殖能、細胞周期チェックポイントを解析する。またDAP3に関してはストレス暴露による細胞老化における発現変化を解析し、Tarsh同様ShRNAシステムによる発現抑制系とレトロウイルスシステムによる過剰発現系を用いてDAP3遺伝子の発現変化によるMEF細胞における分裂老化あるいは酸化ストレス時の早期老化の対する影響について探究する。

(倫理面への配慮)

胚性幹細胞を含めマウス由来の細胞、試料あるいは動物個体を用いる際は長寿医療センターの定める倫理規定、動物実験ガイドラインを厳守した上で本年施行された「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に

関する基本指針」を順守して、計画、実行する。遺伝子改変動物を用いる実験においても「動物の保護及び管理に関する法律」や本年一部が改正された「動物の愛護及び管理に関する法律」ならびに CIOMS の「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則」等に遵守する

C. 研究結果

(3) 老化関連遺伝子Tarshの機能解析

a) 培養細胞を用いたin vitroにおけるTARSH分子の機能解析

shRNAシステムを用いたTARSH遺伝子発現を抑制制御した細胞における細胞増殖能、細胞周期チェックポイントを解析し、細胞老化における役割を解析した。その結果、RNAiでMEFsにおけるTARSHの発現を抑制すると細胞増殖が著しく阻害され、多核化細胞やセントロソームの数が異常な細胞の割合(多核化細胞で約5倍、セントロソーム数が3倍以上になっている細胞の割合で2倍以上)が増加することが明らかになった。

b) マウス個体における加齢変化におけるTARSH遺伝子の発現を各組織で検討したところ、肺のように老化初期にピークを示すものや膀胱のように加齢に伴って亢進する組織もあり、臓器による発現パターンの違いはあるものの

個体老化においても機能する可能性を掴んだ。

(4) アポトーシス関連蛋白DAP3の細胞老化における関与

Hela 細胞株においてアポトーシスに対して積

極的に関与することに加えてミトコンドリアにおける代謝にも関与が知られている DAP3 蛋白が H₂O₂ による酸化ストレス刺激後速やかに減少することを既に明らかにしたが、今回 MEF 細胞の継代培養にみられる分裂老化においても蛋白レベルで減少することを見いだした。さらに酸化ストレス刺激に絡む DAP3 蛋白の早期老化への関与を検討するために、DAP3 遺伝子特異的な ShRNA を用いて遺伝子を発現抑制させたところ、DAP3 の減少は酸化ストレスそのものに対しては抵抗性を示し、ミトコンドリア画分における活性酸素の産生を抑制させることが判明した。また、MEF 細胞における分裂老化において同様の DAP3 遺伝子の発現抑制を行なったところ、老化期そのものへの移行に変化が生じ、対照群に比べて増殖能が長期に持続することが判明した。

D. 考察

(1) 老化と癌抑制機構における Tarsh の機能解析

培養細胞株に用いた研究においては Tarsh 遺伝子の過剰発現細胞株を樹立し、ShRNA システムにおける抑制系と併せて、細胞周期調節因子の発現プロファイリングを進めるとともに相互作用する分子の同定を特異的抗体を作成して、今後は検討していきたい。また生体における生理的意義については条件付き遺伝子欠失マウスを作成し、腫瘍形成、免疫応答、個体老化を中心に解析の手を広げていきたい。

(2) 今後は、酸化ストレス刺激に対応する DAP3 の機能を制御する分子機構について、DAP3 の細胞死誘導のメカニズムとともに検

証し、細胞老化（あるいは単なる老化）と細胞死、あるいは癌化という細胞の運命の決定機構について検証を進めていく。

E. 結論

1) 老化関連遺伝子として同定した TARSH 遺伝子が発癌抑制因子でもある可能性が明らかになり、加齢に伴う生体機能低下と発癌抑制の双方に関与する機能分子であることが判明した。

2) DAP3 が酸化ストレス応答遺伝子、あるいは細胞における分裂老化において老化に対して、量のバランスで機能の変化しうる巧妙な制御因子であることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(3) 論文発表

1. Murata Y, Wakoh T, Uekawa N, Sugimoto M, Asai A, Miyazaki T, Maruyama M. Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett.* 580: 6093-6099, 2006.
2. Mitsuda N., Yamagata H.D., Zhong W., Aoto M., Akatsu H., Uekawa N., Kamino K., Taguchi K., Yamamoto T., Maruyama M., Kosaka K., Takeda M., Kondo I., Miki T.: A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease" *Life Science*, 78, 2444-2448, 2006
3. 杉本昌隆、丸山光生
細胞老化の分子機構と生体内における役割.

基礎老化研究, 30(3);5-10,2006

(2) 学会発表

1. Wakoh T, Murata Y, Uekawa N, Sugimoto M, Miyazaki T and Maruyama M
Characterization of apoptosis-related gene, DAP3 in cellular senescence The 29th Annual Meeting of The Japan Society for Biomedical Gerontology. Nagasaki. June 16, 2006
2. Takeshi Wakoh, Yoko Murata, Natsuko Uekawa, Masataka Sugimoto, Tadaaki Miyazaki, and Mitsuo Maruyama
Characterization of apoptosis-related gene, DAP3 in cellular senescence. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto. June 21, 2006.
3. Takeshi Wakoh, Natsuko Uekawa, Charles J. Sherr, Mitsuo Maruyama, Masataka Sugimoto
Role of HZF in adipocyte differentiation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto. June 22, 2006.
4. Natsuko Uekawa, Kunihiko Terauchi, Takeshi Wakoh, Masataka Sugimoto and Mitsuo Maruyama
Functional analysis of Abi3bp/TARSH, MEF Senescence related gene. The 6th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea. June 22, 2006
5. Mitsuo Maruyama, Takeshi Wakoh, yoko Murata, Natsuko Uekawa, Masataka Sugimoto and Tadaki Miyazaki
Characterization of death associated Protein-3 in cellular senescence. The 6th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, Chuncheon, Korea. June 22, 2006
6. Takeshi Wakoh, Masatoshi Takagi, Hiroyuki Kawagishi, Charles J. Sherr, Mitsuo Maruyama and Masataka Sugimoto
Role of Hzf in adipocyte differentiation. The 11th Adiposcience Symposium. Osaka
7. 若生武 浅井あづさ、上川奈都子、大田 聡、津田玲生、丸山光生：
免疫老化における機能低下と新規 GEF, Zizimin2 の関係 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 6 日、名古屋国際会議場
8. 上川奈都子、寺内邦彦、杉本昌隆、島田順一 丸山光生：
細胞老化関連遺伝子 TARSH/Abi3bp の機能解析 日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月 8 日、名古屋国際会議場
9. 上川奈都子、若生武、杉本昌隆、丸山光生
細胞老化関連遺伝子 TARSH/Abi3bp の機能解析 第 29 回日本基礎老化学会大会. 長崎 2006 年 6 月 15 日

(3) 新聞・雑誌等

丸山光生

南日本新聞 2006 年 5 月 29 日 朝刊

「長寿を拓く かがしま健康の深層」

「老化とは何か」

分担研究報告書

ストレス応答と生体反応

分担研究者 木内一壽（岐阜大学工学部生命工学科、教授）

研究要旨：グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）は黒質ドーパミンニューロンの生存維持因子として発見されて以来、多くの研究が進められている。最近では、脳の機械的な損傷や虚血などの低酸素傷害時に、GDNF がマクロファージやミクログリアなどの免疫系の細胞にて急速に誘導されることが報告されており、その誘導メカニズムに興味注がれている。中枢神経系において神経変性が生ずる際に、小胞体（ER）ストレスが引き起こされ、転写調節因子 NF- κ B の活性化に伴う数多くの炎症性あるいは抗炎症性因子が誘導されることが知られている。GDNF に関しては、ER ストレスとの関連は証明されておらず、また、損傷時での GDNF 遺伝子の発現誘導に NF- κ B が実際に関与していることを示す報告はない。本研究では、ER ストレス時に GDNF 遺伝子が誘導されることを初めて明らかにし、その発現誘導に係わる細胞内シグナル伝達経路について検討を加えた。また、炎症を引き起こす因子の一つであるリポポリサッカライド（LPS）を用いて、マクロファージ系の培養細胞株 RAW264.7 を刺激したところ、新規の GDNF mRNA が誘導されることを見いだしたので報告する。

A. 研究目的

1. ER ストレスにより GDNF 遺伝子が発現誘導されるかどうか検討を加え、誘導される場合には、そのメカニズムについて解析する。
2. LPS の刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムを解析する。

B. 研究方法

1. ER ストレスによる GDNF 遺伝子の発現誘導の解析

膠芽細胞腫 C6 細胞に小胞体 Ca²⁺ポンプの阻害剤 thapsigargin (TG) を作用させ、RT-PCR 法により、ER ストレス関連遺伝子の発現誘導を確認するとともに、GDNF 遺伝子の 3 種類のオルタナティブプロモーターのいずれが主要な役割を果たしているか分析する。

NF-κB 阻害剤および各種プロテインキナーゼ阻害剤を用い、TG 刺激にて C6 細胞で誘導された GDNF mRNA の発現量へ及ぼす影響について、RT-PCR 法により分析する。

Western blot 法を用い、TG 刺激による各種 MAP キナーゼ (ERK1/2, p38, JNK) の活性化パターンを分析するとともに、プロテインキナーゼ C (PKC) との係わりについて、各種 PKC 阻害剤を用いて解析する。

2. LPS 刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムの解析

LPS 刺激により RAW264.7 細胞で誘導される GDNF mRNA の種類を、各種プライマーペアを用いて、RT-PCR 法により分析する。

NF-κB 阻害剤などを用い、LPS 刺激にて RAW264.7 細胞で誘導された GDNF mRNA の発現量へ及ぼす影響について、RT-PCR 法により分析する。

LPS 刺激した RAW264.7 細胞より total RNA を

調製し、SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech)を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製し、新規 GDNF mRNA の構造を決定するために 5'-RACE を行う。

C. 研究結果

1. ER ストレスによる GDNF 遺伝子の発現誘導の解析

C6 細胞を 0.5 mM TG にて 1.5 時間処理し、GDNF 遺伝子の他、ER ストレスにより誘導されるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX2)、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) および GRP78 遺伝子に関し、RT-PCR を行ったところ、GDNF と COX2 遺伝子は 1 時間目に iNOS と GRP78 遺伝子は 2 時間目に発現量が増加することが分かった。NF-κB 経路の阻害剤である Bay11-7082 は TG 刺激による GDNF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。

GDNF 遺伝子の 3 つのオルタナティブプロモーターのいずれが、TG で誘導した ER ストレスにて活性化されるか、対応する mRNA を増幅させるためのプライマーペアを用いて、RT-PCR を行ったところ、プロモーター 3 が主として GDNF 遺伝子の発現に係わっていることを示唆する結果が得られた。一方、ルシフェラーゼレポーター分析系ではプロモーター3を含むイントロン2やその上流域には TG 処理により、特異的に活性化される領域はなかった。

GDNF mRNA は cPKC および nPKC の賦活剤である PMA により誘導されることが知られているので、各種 PKC 阻害剤、Gö6976 (cPKC 特異的阻害剤)、rottlerin (PKCδ 特異的阻害剤)、Ro-31-8220 (汎 PKC 阻害剤) を用いて TG 誘導性 GDNF mRNA 発現に及ぼす影響を調べたところ、rottlerin あるいは Ro-31-8220 処理により有意に抑

制されることが明らかとなった。従って、TG 処理による GDNF mRNA の発現誘導には Ca^{2+} 非依存性 PKC が関与しているものと考えられる。

次に、各種 MAP キナーゼ阻害剤、U0126 (MEK 阻害剤)、SB202190 (p38MAPK 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)を用いて、TG 誘導性 GDNF mRNA 発現に及ぼす影響を調べたところ、U0126 あるいは SP600125 処理により有意に抑制されることが明らかとなった。従って、TG 処理による GDNF mRNA の発現誘導には MEK-Erk1/2 および JNK リン酸化カスケードが関与しているものと考えられる。

最後に、PKC 経路と MAP キナーゼカスケードとの係わりについてウェスタンブロット法により解析したところ、TG 刺激により C6 細胞内では Erk1/2、p38MAPK、JNK のいずれも 5 分以内に一過性に活性化されることが分かった。一方、Erk1/2、JNK とも Ro-31-8220 のみによりそのリン酸化が抑制された。従って、3 種類の PKC ファミリーのうち、atypical PKC (aPKC) の MAP キナーゼカスケードへの関与が示唆された。

2. LPS 刺激で誘導される GDNF 遺伝子の発現メカニズムの解析

マクロファージ系の RAW264.7 細胞を 1 mg/ml LPS にて 4 時間処理し、誘導される GDNF mRNA の種類について、各種プライマーペアを用い RT-PCR 法により分析した。既知のエキソン 4 内のセンスプライマーを用いた場合には GDNF mRNA は増幅されるものの、エキソン 3 内のセンスプライマーを用いたときには全く増幅されないことが分かった。

次に、LPS 刺激した RAW264.7 細胞より total RNA を調製し、完全長 cDNA ライブラリーを調製後、5'-RACE を行ったところ、既知のエキソ

ン 4 の上流に隣接した 683 bp の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) の存在を確認することができた。この新規の GDNF (Ex4 GDNF) mRNA は多くの三量体 G タンパク質共役型受容体遺伝子と同様に単一エクソン遺伝子である可能性が示唆された。

上記 5'-UTR 内のセンスプライマーを用い、ミクログリア系の不死化細胞株 MG5 細胞や膠芽細胞腫 C6 細胞を 1 mg/ml LPS で 36 時間処理した後、RT-PCR 法にて分析したところ、いずれの細胞でも Ex4 GDNF mRNA 発現の上昇を確認することができた。また、ラット初代培養マクロファージ、ミクログリア、アストロサイトにおいても同様に Ex4 GDNF mRNA は誘導された。

一方、Bay11-7082 は RAW264.7 細胞において LPS 刺激による iNOS mRNA の発現誘導を抑えたものの、Ex4 GDNF mRNA の発現量には影響を及ぼさなかったことから、新規 GDNF mRNA の遺伝子発現は NF- κ B 非依存性であることが示唆された。

D. 考察

TG 誘導性 ER ストレスでは GDNF 遺伝子の発現には少なくとも二つのリン酸化経路が関わっている。一つは、 Ca^{2+} 非依存性 PKC のグループに含まれる PKCd が候補である。過去の研究では、ラット肝臓の上皮細胞において TG 刺激後 0.5 分で非受容体型チロシンキナーゼ Fyn が活性化されることが明らかにされている。一方、Fyn は C6 細胞において PKCd の 187 番目のチロシン残基をリン酸化することが報告されており、今回の実験系でもこのリン酸化カスケードが関わっている可能性が考えられる。もう一つの細胞内シグナル経路としては MEK-Erk1/2 経路と JNK 経路が候補として浮かび上がったが、PKC 経路との係わりでは Ro-31-8220

の効果より、aPKC の一つである PKC ζ が GDNF 遺伝子の発現誘導に関与する可能性が示唆された。PKC ζ は Raf-1 を活性化することが報告されているので、今回の実験系でも MEK-Erk1/2 の上流に位置しているものと考えられる。JNK に関しては相反する実験結果が報告されており、その活性かメカニズムについては今後の問題である。

LPS 刺激で誘導された新規の Ex4 GDNF mRNA は従来のエキソン4とその5'上流の非翻訳領域のみで構成される転写物である可能性が高い。この場合、従来のエキソン4内の最初の ATG コドンより 48 bp

上流にインフレームのストップコドンが存在しているため、Ex4 GDNF mRNA より翻訳されたタンパク質は従来のものとは異なる性質を有することが示唆される。

今回の二つの実験系で得られた結果より、イントロン3に GDNF 遺伝子の発現に係わる未知の応答配列が存在する可能性があるため、今後、解析を進めていきたい。

E. 結論

TG で誘導した ER ストレスにおいて、刺激後短時間に一過性に GDNF 遺伝子の発現誘導が起こることを初めて明らかにした。この結果は、中枢神経系の損傷モデルにて一過性に誘導される GDNF 遺伝子の発現に、ER ストレスが関与している可能性があることを示唆している。一方、LPS 刺激を含めて炎症性ストレスでは、GDNF 遺伝子の発現誘導は NF- κ B 非依存性であることが推定されるので、損傷初期における局所的な NF- κ B 阻害剤の使用は神経保護作用を有する GDNF の遺伝子発現には影響を及ぼさないものと考えられる。また、LPS 刺激で誘導された新規 GDNF mRNA は単一エキソン遺伝子様であり、従来の GDNF タンパク質の

性質とは異なった翻訳産物を生み出す可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Differential effect of nerve growth factor on dopaminergic neurotoxin-induced apoptosis, Y. Hirata, T. Meguro and K. Kiuchi, J. Neurochem., 99, 416-425 (2006)
2. Elevated neprilysin activity in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy, H. Hara, K. Oh-hashish, S. Yoneda, M. Shimazawa, M. Inatani, H. Tanihara and K. Kiuchi, Mol. Vis., 17, 977-982 (2006)
3. ER calcium discharge stimulates GDNF gene expression through MAPK-dependent and-independent pathways in rat C6 glioblastoma cells, K. Oh-hashish, M. Kaneyama, Y. Hirata, and K. Kiuchi, Neurosci. Lett., 405, 100-105 (2006)
4. GRP78-binding protein regulates cAMP-induced glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells, K. Oh-hashish, Y. Hirata, H. Koga and K. Kiuchi, FEBS Lett., 580, 3943-3947 (2006)
5. p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells, Y. Ito, K. Oh-Hashish, K. Kiuchi and Y. Hirata, Brain Res., 1099, 1-7 (2006)
6. Rehmannia glutinosa induces glial cell line-derived neurotrophic factor gene

expression in astroglial cells via cPKC and ERK1/2 pathways independently, H. Yu, K. Oh-Hashi, T. Tanaka, A. Sai, M. Inoue, Y. Hirata and K. Kiuchi, Pharmacol. Res., 54, 39-45 (2006)

(2) 学会発表

1. S. Shibata, T. Okano, M. Maeda, K. Furuta, M. Suzuki, K. Oh-hashishashi, K. Kiuchi and Y. Hirata, The study of anti-apoptotic effects of NEPP derivatives, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto, Japan)
2. T. Tanaka, H. Yu, K. Oh-hashishashi, A. Sai, M. Inoue, Y. Hirata and K. Kiuchi, *Rehmannia glutinosa* induces glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression in astroglial cells via cPKC and ERK1/2 pathways independently, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto, Japan)
3. K. Oh-hashishashi, Y. Hirata, H. Koga and K. Kiuchi, A novel function of rat GRP78-binding protein in regulating glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto, Japan)
4. 大橋憲太郎、平田洋子、磯部健一、木内一壽、低酸素ストレスのヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) 膜表在ネプリライシン活性におよぼす影響、日本基礎老化学会第 29 回大会、平成 18 年 6 月、長崎
5. S. Shibata, T. Okano, M. Maeda K. Furuta, M. Suzuki, K. Oh-hashishashi, K. Kiuchi and Y. Hirata, Anti-apoptotic effects of neurite outgrowth-promoting prostaglandin derivatives, Society for Neuroscience, 36th Annual Meeting, Oct, Atlanta.
6. 田中達英、大橋憲太郎、伊藤正敏、設楽裕信、平田洋子、木内一壽、新規 GDNF mRNA の同定とその機能解析、日本分子生物学会 2006 フォーラム、平成 18 年 12 月、名古屋

＜分担研究報告書＞

細菌産物による老化制御

分担研究者長谷川忠男（名古屋市立大学大学院医学研究科感染防御・制御学教授）

研究要旨：近年分離される A 群レンサ球菌は、その毒素発現プロファイルに変化をもたらしている。その変化は宿主の貪食細胞への取り込みの阻害をもたらしていることが明らかとなった。発現プロファイル変化の一つの毒素であり、かつ ADP リボシル化活性を有する Nga 蛋白質は一つのアミノ酸変異によって機能が非常に増強する可能性が示された。このことからヒトと細菌の間の相互に与えるストレスのネットワークは時代とともに変化している可能性がある。

A. 研究目的

ヒトは様々なストレス刺激の積み重ねにより、細胞、個体レベルで不可逆的な変化をきたし老化が進展すると考えられる。ストレス刺激として細菌などの微生物感染もそのひとつとして考えることができる。細菌感染における宿主の防御機構を考えた場合、免疫担当細胞より生ずるラジカルは細菌に対する強力な武器となるが、宿主そのものへの損傷を引き起こす可能性もある。また細菌は宿主からの防御手段、感染進展の武器として種々の毒素蛋白質を放出し、宿主防御機構からの回避、あるいは宿主へのダメージを来す。その細菌毒素の一つとして宿主細胞傷害性の ADP リボシル化酵素活性を持つ毒素蛋白質が存在する。この毒素は宿主の様々な蛋白質を ADP リボシル化し、その機能を阻害し、細胞レベル、ひいては個体レベルへのダメージを引き起こす。一方ヒトにおいてもポリ ADP リボシル化酵素ファミリーの存在が明らかにされ、ゲノムの安定性、転写レベルへの関与、生活

習慣病とのかかわりが注目されてきている。

以上のことを総合的に考えると細菌から放出される ADP リボシル化酵素は、宿主への様々な損傷、その不可逆的な変化、老化の促進へと関連している可能性がある。過去 2 年間の研究において A 群レンサ球菌における主たる ADP リボシル化酵素と考えられる Nga 蛋白質の発現調節機構を明らかにした。今年度は Nga 蛋白質の詳細な酵素学的検討とともに Nga を含め種々の毒素蛋白質プロファイルの異なる臨床分離株の宿主の貪食機能への関与を検討した。

B. 研究方法

1) 昨年度定義した分離時期、分泌蛋白質の二次元電気泳動プロファイルとパルスフィールドの結果に基づき A 群レンサ球菌 M1 臨床分離株を分類し、ゲノム株 SF370 などのグループ A、1529 株などのグループ B、GT01 株などのグループ C につき解析した。1529、GT01 株において、M タンパク、SIC 蛋白質、

この両者の発現制御因子である Mga 蛋白質、Nga 蛋白質の以上 4 者のノックアウト株を樹立した。ノックアウト株の作製は、まず遺伝子コード領域の大部分をスペクチノマイシン耐性カセットと置き換え、pFW12 ベクターに組み込んだ。次にこのベクターをエレクトロポレーション法で 1529 株と GT01 株に導入し、相同組み換えを起こさせ、ノックアウト株を作製した。このノックアウト株をマウス腹腔マクロファージと混和し、貪食細菌の数を顕微鏡下で観察した。

2) nga 遺伝子について SF370 株と GT01 株との間で異なる領域のアミノ酸に注目した。GT01 由来 ngaDNA に変異を導入した後、大腸菌でリコンビナント蛋白質を作成し、ADP を分解する酵素活性を指標として、アミノ酸変異の Nga 蛋白質における機能における役割を検討した。

C. 研究結果

1) SF370, 1529, GT01 株をそれぞれマウス腹腔マクロファージに 20, 30, 60, 120 分接触後、細胞を固定し顕微鏡観察したところ、SF370 では 20 分接触ですでに多くの菌が貪食される様子が観察され、その他の接触時間でも数多くの菌が貪食されている像が観察された。一方 GT01 では 20 分接触では貪食像はほとんど観察されず、120 分後においても少数の菌が貪食されているのみであった。1529 株においては SF370 株と GT01 株の中間の結果であった。ノックアウト株を用いた実験においては GT01 をバックグラウンドとする Mga 欠損株において貪食がやや促進され、Mga が発現

制御している因子が抗貪食に関係していることが示唆された。しかし Mga が制御する抗貪食に関係すると報告のある M 蛋白、SIC 単独では効果が顕著でなく複数の毒素の関与の重要性が示唆された。

2) SF370 株と GT01 株においては数箇所のアミノ酸変異が認められ、更に GT01 においては SF370 には認められない C 末端の 4 アミノ酸が存在する。SF370, GT01 それぞれのゲノム DNA を由来とする GST リコンビナント蛋白質を作成したところ、SF370 由来のものは ADP 分解活性が全く認められなかった。一方 GT01 由来のものは強い活性が認められた。GT01 由来 DNA に様々な変異を SF370 ゲノムとの違いをもとに導入し、作成したリコンビナント蛋白質を用いて実験したところ、330 番目のグリシンをアスパラギン酸に置換すると活性が全くなくなり、このアミノ酸が酵素活性に非常に重要であることが示された。

D. 考察

毒素蛋白質プロファイルの違いが宿主の貪食作用に大いに影響を与えることが示された。その因子として複数の毒素蛋白質を制御する発現制御因子の関与が示唆された。しかしながらこの制御因子の変異と無関係な毒素、または毒素発現制御因子、特に二成分制御系のより大きな関与の重要性も考えられる。染色体 DNA の変異に伴う毒素、あるいは毒素発現調節因子の変化が、宿主の防御機構に大いに影響を与えるということは、時代の変遷に伴い同じ細菌感染ストレスであっても毒素発現の違いによっては、宿主へ及ぼす感染スト

レス刺激が異なることを意味する。またその毒素発現は外界からの影響を受けるため宿主の因子が菌に影響を与え、それが再び宿主への感染ストレスにも影響するという図式が成り立つ。

E. 結論

細菌感染症における感染ストレスを考慮する上で、時代変遷に伴う細菌のゲノムの変化が毒素蛋白質の量的、質的变化を生み、それが宿主へのストレスを変化させると同時に、逆にそれらの細菌の変化が宿主の防御機構にも影響を与えるといった複雑なネットワークを構築していることが示唆された。したがって感染ストレスを軽減するためには、細菌の毒素の宿主への影響（細胞に障害を与える機構や、防御機構に及ぼす影響）を詳細に検討し、制御することが重要であり、その感染ストレスの軽減が老化を防止する手段になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

(4) 論文発表

1. Sawai J, Hasegawa T, Kamimura T, Okamoto A, Ohmori D, Nosaka N, Yamada K, Torii K, Ohta M.
Growth phase dependent effect of clindamycin on the production of exoproteins by *Streptococcus pyogenes*.
Antimicrob Agents Chemother. in press

2. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T, Goto H.

A novel, rapid and safe detection system for *Helicobacter pylori*: the combination of brushing technique and loop-mediated isothermal amplification method (LAMP).
J Clin Microbiol. in press

3. Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M.

Phylogenetic analysis of *Bacillus cereus* isolates from severe systemic infections using multilocus sequence typing scheme.
Microbiol Immunol. 2006; 50:743-749.

(2) 学会発表

- 1 長谷川忠男、神村卓也、岡本陽、山田景子、鳥居啓三、太田美智男

MI 型 A 群レンサ球菌の時代変遷に伴う発現制御因子の変化と分泌蛋白質発現への影響
第 79 回日本細菌学会総会 平成 18 年

- 2 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

MI 型 *S. pyogenes* における CsrS/CsrR 二成分制御系の機能解析
第 79 回日本細菌学会総会 平成 18 年

- 3 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

Streptococcus pyogenes の階層的プロテオーム解析による新奇翻訳領域の発見
第 79 回日本細菌学会総会 平成 18 年

<分担研究報告書>

マクロファージによる老化制御

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: indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は肝臓外のキヌレニン代謝経路の律速酵素であり、免疫応答や炎症において発現が誘導される。樹状細胞(DC)の中でリンパ系 DC やマウスの脾臓の CD8⁺ DC は IDO を発現し、トリプトファンの局所的な枯渇と代謝産物によるアポトーシスの誘導により T 細胞応答を抑制する。しかし、骨髄由来の骨髄系 DC (BMDC)が IDO 活性を示すか明らかでない。骨髄細胞から GM-CSF で分化させた BMDC は CD11c⁺CD11b⁺の骨髄系 DC であった。CpG オリゴデオキシヌクレオチド(CpG)は BMDC に 24 時間の培養で IDO と酸化窒素(NO)の産生を誘導した。BMDC の細胞抽出液を用いた酵素測定において、CpG で刺激した BMDC の IDO 活性は NO 合成酵素(NOS)のインヒビターの NMA により増強されたことから、IDO 活性は NO 産生により抑制されることが示された。BMDC の培養上清を trichloroacetic acid (TCA)で除タンパクして HPLC で測定したキヌレニンの濃度は CpG 刺激で低下していた。CpG で刺激した BMDC の培養上清を分離し、キヌレニンを加えて 2 時間培養した後キヌレニン濃度を測定した。メタノールで除タンパクするとキヌレニン濃度に変化はなかったが、TCA で除タンパクするとキヌレニン濃度が低下し、その低下は NMA により阻止された。これより、CpG 刺激を受けた BMDC は酸性でキヌレニンを崩壊させる物質を NO 産生と連動して放出することが示された。キヌレニンと NaNO₂ の反応が TCA や pH1 の塩酸で誘導され、HPLC の容出パターンにおいて CpG で刺激した BMDC の培養上清と同様な変化が現われた。酸性化ナイトライトにより 360 nm をピークとするキヌレニンの吸収スペクトルは消失し、340 nm をピークとする新しい吸収スペクトルが現れた。芳香族環のアミノ基に反応するエー ルリッヒ試薬はキヌレニンと酸性化ナイトライトの反応生成物と反応しなかった。マスマスペクトロメトリーによりキヌレニンは酸性化ナイトライトと反応して分子量が 12 増加することが示された。これらの結果より、キヌレニンが酸性化ナイトライトによってジアゾ化されることが示された。一方、メタノールを用いた除タンパク処理によるキヌレニン測定において、CpG 刺激を受けた BMDC はキヌレニンを放出せず、外から加えたキヌレニンをシステム L のトランスポーター により盛んに取込むことが示された。

研究目的：

樹状細胞(DC)には骨髄系 樹状細胞とリンパ系 樹状細胞が存在し、前者は免疫応答の誘導、後者はウイルスに対する免疫を誘導すると共に indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)を発現し、免疫抑制を誘導すると報告されている。マウスの脾臓に存在するリンパ系 DC や CD8⁺ DC は IDO を発現し、免疫抑制を誘導するが、骨髄系の CD8⁻ DC は IDO タンパクを発現しているにもかかわらず、IDO 活性がなく、免疫応答を誘導する。一方、骨髄細胞から GM-CSF で分化誘導させた 樹状細胞 (BMDC)は骨髄系 DC に相当するが、IDO 活性を示すか明らかでない。今回、骨髄細胞から GM-CSF で分化誘導した BMDC が IDO 活性を発現するか検討した。

B. 研究方法

1. 細胞培養

BMDCは骨髄細胞を GM-CSF で6日間培養して得た。これらの未熟な BMDC を 5 μM の CpG で 24 時間刺激して成熟・活性化させた。

2. BMDC の細胞表面抗原と IDO タンパクの発現

細胞表面抗原はフロー サイトメトリー で測定し、IDO タンパクの発現はウエスタン・ブロッティングで測定した。

3. IDO 活性の測定

IDO 活性は細胞抽出液を用いた酵素活性の測定と細胞の培養上清の HPLC によるキヌレニン濃度測定によって算定した。また、エールリッヒ試薬を用いた間接的な方法で測定し

た。

4. 酸化窒素(NO)産生の測定

Griess 試薬を用いてナイトライトを測定した。

5. キヌレニン付加生成物の質量分析

マススペクトロメトリーで質量を分析した。(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. CpG 刺激によって BMDC に誘導される IDO 活性と NO の産生

C57BL/6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF で 6 日間分化誘導させた BMDC の大部分は CD11c⁺D11b⁺の骨髄系 DC であった。BMDC を CpG で 24 時間刺激すると NO 合成酵素 (NOS) の イ ン ヒ ビ タ ー の NG-monomethyl-L-arginine acetate (NMA) の存在にかかわらず IDO タンパクの発現が誘導された。NO 産生も CpG 刺激により誘導されたが、NMA によって阻止された。

MDC の細胞抽出液を用いた酵素測定によって検出される IDO 活性は弱かったが、NMA を細胞培養系に加えることによって増加した。これらの結果は IDO 活性が CpG で刺激された BMDC に誘導されるが、その活性は NO 産生によって抑制されることを示している。

2. CpG 刺激による BMDC からの NO 産生と連動したキヌレニン崩壊物質の放出

BMDC によるキヌレニン産生を TCA で除タンパクした培養上清を用いて HPLC で測定

した。BMDC を CpG で刺激した培養上清のキヌレニンレベルはトリプトファンを加えても増加せず、減少した。BMDC の培養に加えられたキヌレニンの濃度は CpG 刺激によって著しく減少し、この減少は NMA によって阻止された。これらの結果は BMDC の NO 産生に関連した産物がキヌレニンを分解する可能性を示唆した。そこで CpG で 24 時間刺激した BMDC の培養上清を分離し、キヌレニンを加えて 2 時間培養した後、キヌレニン分解活性を測定した。除タンパクの影響を TCA とメタノールで比較検討した。TCA で処理された培養上清のキヌレニン濃度は CpG 刺激によって 50% 減少したが、この減少は NMA によって阻止された。CpG 刺激によるキヌレニンの減少はメタノールによる除タンパク処理では検出されなかった。これらの結果は TCA 処理によって誘導されるキヌレニン測定の誤りを防ぐために、メタノールによる除タンパク処理が有効であることを示した。

3. HPLC で検出される酸性化ナイトライトとキヌレニンの反応

BMDC から放出されるキヌレニン分解産物は NO 産生と関連したので、安定な NO の派生物のナイトライトを生成する NaNO_2 とキヌレニンを TCA 存在下で反応させた。HPLC で検出されるキヌレニンの 360 nm の吸収は 50 μM のキヌレニンと NaNO_2 の TCA 処理により完全に消失し、新しい吸収ピークが現れた。この HPLC の容出プロファイルの変化は CpG で刺激された BMDC の培養上清で示された変化と同様であった。これらの結果から、CpG で刺激された BMDC から放出され

るナイトライトがキヌレニンと TCA 処理により反応することが示された。

4. 吸収スペクトルで検出される酸性化ナイトライトとキヌレニンの反応

キヌレニンの吸収スペクトルは NaNO_2 と TCA 処理によって完全に消失し、新しい 340 nm をピークとする吸収スペクトルが現れた。この反応は pH1-4 で誘導され、2 時間まで徐々に進行した。キヌレニンの吸収スペクトルは pH1 で瞬時に消失し、pH2 で部分的に消失した。この変化は pH を中性にもどすと回復する可逆反応であった。しかし、酸性化ナイトライトとキヌレニンの反応は非可逆的であった。

5. キヌレニンとエー ルリ ッヒ 試薬の反応の酸性化ナイトライトによる抑制

キヌレニンの間接的な測定法として芳香族のアミノ基に反応するエー ルリ ッヒ 試薬を用いる方法がある。エー ルリ ッヒ 試薬は酸性化ナイトライトと反応させたキヌレニンを検出することができなかった。この結果から酸性化ナイトライトはキヌレニンの芳香族アミノ基に反応することが示唆された。

6. マスペクトロメトリーによって検出される酸性化ナイトライトによるキヌレニンのジアゾ化

酸性化ナイトライトとキヌレニンの反応生成物をマスペクトロメトリー で解析した。キヌレニンのプロトン付加生成物(m+H)が 209 m/z に現れた。このピークは NaNO_2 存在下で TCA や pH1 の酸処理によって消失し、220 m/z に新しいピークが出現した。220 m/z の付加生成物はキヌレニンと 12 m/z 異なる。