

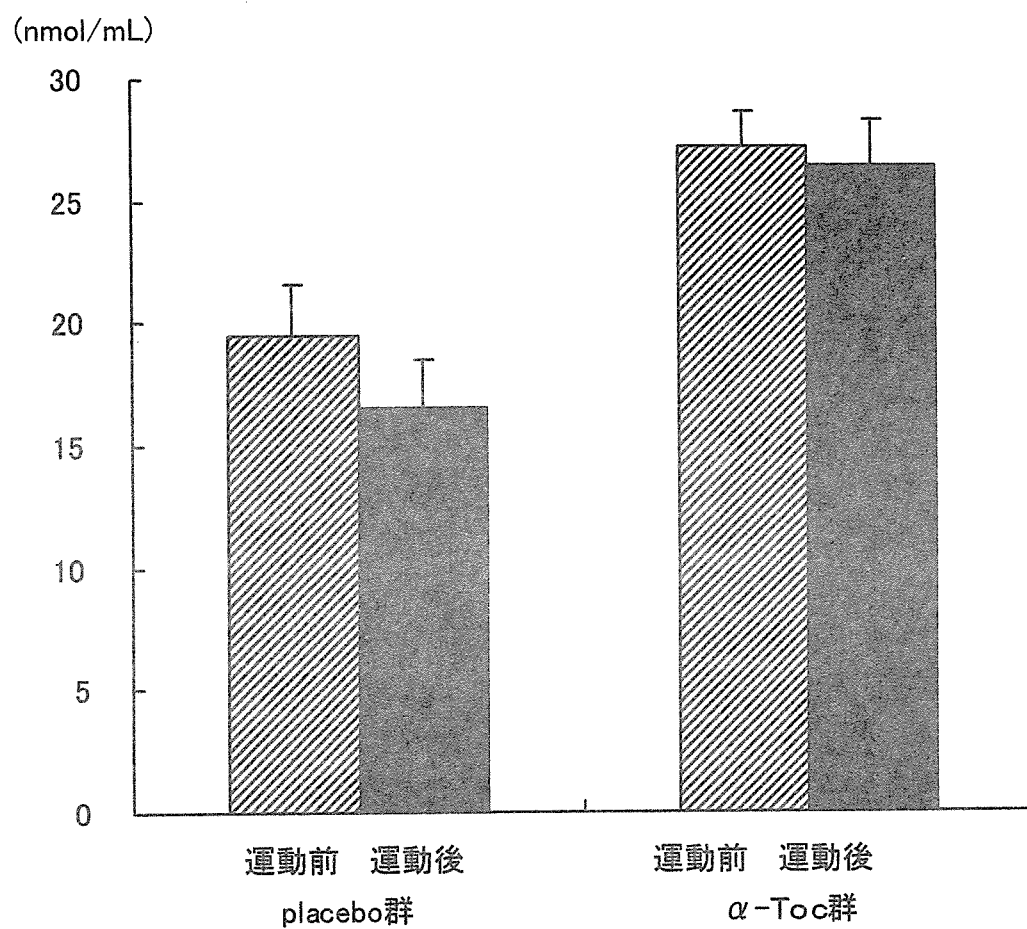


図3 高 α -Toc 群における運動トレーニングに伴う血中 α -Toc 濃度の変化

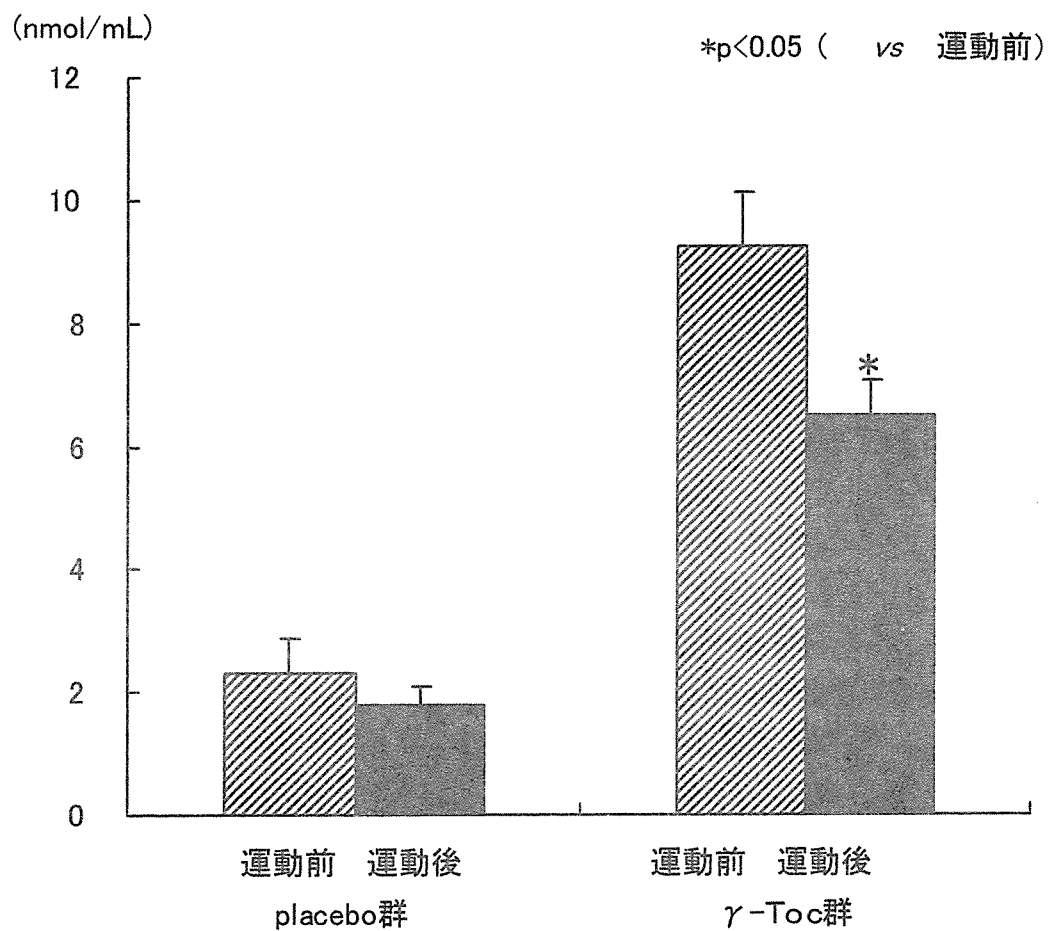


図4 高γ-Toc群における運動トレーニングに伴う血中γ-Toc濃度の変化

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 α 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 Arie 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.

Hidehori Yamaguchi, Yasuhiro Arie and Shin-
Ichi Fukuoka: Expression of soluble prion
protein-fusion proteins in Escherichia coli cells.,
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.

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

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 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

13. 母乳分泌における脂溶性ビタミンの細胞内輸送機構の解析

分担研究者 玉井 浩 大阪医科大学 教授

研究要旨

乳腺細胞において、ビタミン E 輸送蛋白質(α -tocopherol transfer protein: α -TTP)の存在を確認した。 α -TTP 遺伝子発現は、脂質代謝に関係する核内受容体 LXR (Liver X Receptor)リガンドにより調節される。母乳中のビタミン E 濃度は、これらの遺伝子群により調節される可能性が示唆された。

1 本年度の研究成果

1) 目的および背景

母乳は子供の急速な成長と発達にとって重要であり、十分なエネルギーと必須栄養素を供給する。感染予防物質・細胞・ホルモン・酵素・成長因子・結合タンパク質など多くの物質を含んでいる。脂溶性ビタミン群も同様に母乳中に含まれ、授乳を通じて乳児に供給される。近年、母乳分泌のメカニズムは詳細に解明されつつある。ビタミンEは、肝細胞内における α -トコフェロール輸送タンパク質 (α -TTP: α -tocopherol transfer protein) が同定され、細胞内輸送機構が明らかにされている。しかし乳腺細胞においてはまだ検討されていない。

ビタミンEは抗酸化作用をもつ脂溶性ビタミンである。生体内で活性を有するビタミンEは、主に α -トコフェロールである。 α -トコフェロールはホメオスタシスの維持に重要な役割を有する。母乳中のビタミンE濃度は母体の摂取量にもよるが、ほぼ充足されている。また初乳中のビタミンE濃度は、成熟乳および母体血液中と比較し、高値であることが知られている。すなわち乳腺細胞においては、ビタミンEを積極的に細胞外に輸送する機構の存在が考えられる。そこで今回我々は、乳腺細胞においても α -TTP遺伝子が存在することを確認し、その発現調節機構を解明することを試みる。

2) 方法

ヒト培養細胞である Ishikawa cell (子宮内膜腺癌)、FLC-5 (肝癌)、MCF-10 (乳腺線維嚢胞) を用いて、添加実験を行った。添加

リガンドとして、成長因子・ホルモン・ビタミン・脂溶性リガンドを用いた。添加 24 時間後の培養細胞から RNA を抽出し、real-time RT PCR 法を用いて、 α -TTP 遺伝子発現を検討した。

3) 結果

各培養細胞において、22(R) hydroxyl-cholesterol (22R HC) 添加後、 α -TTP 遺伝子発現が有意に上昇した($p<0.05$)。この発現の上昇は濃度依存的であった。またヒト初代肝臓培養細胞でも、22R HC により α -TTP 遺伝子発現が上昇した($p<0.05$)。22R HC は、コレステロール代謝に関与している核内受容体 LXR(liver X receptor)のリガンドである。

2 研究成果の意義及び今後の発展

LXRはコレステロール代謝を制御する転写因子であり、肝臓においてコレステロール異化作用を有する CPY 7a 遺伝子発現を亢進し、また末梢細胞や小腸においてコレステロールのトランスポーターである ABCA 1 遺伝子発現を誘導する。以上の結果から、 α -TTP 遺伝子発現は LXR を介したコレステロール代謝機構の中で調節されている可能性が示唆された。今後 α -TTP 遺伝子のプロモーター領域を取得し、転写活性実験を行い、転写レベルにおける発現調節を解析する予定である。また哺乳ラットの乳腺組織において α -TTP 遺伝子発現を確認する。

ビタミンEは乳児にとって重要な抗酸化物質である。今後、乳腺細胞におけるビタ

ミン E の輸送機構が解明されることにより、母乳を介した酸化ストレスに対する防御機構が明らかになると思われる。

3 発表論文集

1) Okamoto N, Murata T, Tamai H, Tanaka H, Nagai H.

Effects of alpha tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma.

Int Arch Allergy Immunol. 2006;141(2):172-80.

2) Takitani K, Zhu CL, Inoue A, Tamai H. Molecular cloning of the rat beta-carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid.

Eur J Nutr. 2006 Sep;45(6):320-6.

3) Yoshikawa S, Morinobu T, Hamamura K, Hirahara F, Iwamoto T, Tamai H.

The effect of gamma-tocopherol administration on alpha-tocopherol levels and metabolism in humans.

Eur J Clin Nutr. 2005 Aug;59(8):900-5.

4) Hiroi M, Ogihara T, Hirano K, Hasegawa M, Morinobu T, Tamai H, Niki E.

Regulation of apoptosis by glutathione redox state in PC12 cells exposed simultaneously to iron and ascorbic acid.

Free Radic Biol Med. 2005 Apr 15;38(8):1057-72.

5) Inoue A, Muranaka S, Fujita H, Kanno T, Tamai H, Utsumi K.

Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway.

Free Radic Biol Med. 2004 Oct

15;37(8):1290-9

6) Takitani K, Inoue A, Koh M, Kawakami C, Kuno T, Kawamura N, Miyake M, Tamai H.

Pharmacokinetics of low-dose all-trans retinoic acid in Japanese children with cancer.

J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2004

Jun;50(3):219-21.

7) Nakakura H, Ashida A, Hirano K, Tamai H.

Oxidative stress in a rat model of nephrosis can be quantified by electron spin resonance.

Pediatr Nephrol. 2004 Mar;19(3):266-70.

IV. 研究協力者の報告書

IV. 研究協力者の報告書

1. 母乳中の総たんぱく質，IgA 含量の変動

研究協力者 成田 宏史 京都女子大学 教授

研究協力者 廣瀬 潤子 滋賀県立大学 助手

研究協力者 長尾 早枝子 長尾助産院 院長

研究要旨

母乳は単に栄養成分としてのたんぱく質供給源ではなく、生理活性たんぱく質の供給源としても重要である。我々はこれまでにヒト母乳中に食物アレルギーが分泌型 IgA との免疫複合体として存在していることを明らかにしてきた。本研究では、母乳に含まれるこれらの免疫成分と乳児のアレルギーとの関係を明らかにすることを目的とした。健康児又は卵アレルギー児の母親から各々採取した母乳（健康児母乳又は卵アレルギー児母乳）について、卵白抗原であるオボアルブミンとミルク抗原であるカゼインに対する免疫複合体、特異的 IgA の定量を行った。その結果、健康児母乳では採取時期を変えても個人のパターンは安定しており、特異的 IgA、免疫複合体ともにオボアルブミンよりカゼインが多く分泌されていることがわかった。一方、卵アレルギー児母乳では採取時期により変動が激しく、特異的 IgA はオボアルブミンよりカゼインが多いにも拘わらず、免疫複合体はオボアルブミンの方が多く分泌されていることがわかった。このような免疫成分の分泌量の不安定さや偏りが、アレルギー発症の原因と関連しているのかもしれない。

A. 目的

「日本人の食事摂取基準 2005 年版」¹⁾における乳児に対するたんぱく質目安量は、山本、米山らの報告²⁻⁴⁾に基づき、母乳中のたんぱく質濃度を 0～5 ヶ月の乳児に対しては 12.6 g/L, 6～11 ヶ月の乳児に対しては 10.4 g/L として策定されている。

しかしながら、母乳は単に栄養成分としてのたんぱく質供給源ではなく、生理活性たんぱく質の供給源としても重要である。そこで本研究では、母乳中の総たんぱく質と生理活性たんぱく質として IgA を対象とし、総 IgA, 食品たんぱく質特異的 IgA, さらには食品たんぱく質と特異的 IgA との免疫複合体 (IC) に関して、種々の採取条件による濃度変動について解析し、食物アレルギーとの関連について考察した。

B. 実験方法

1. 母乳収集

滋賀県立大学倫理審査委員会の審査を完了した上で、本研究の主旨について説明し、参加同意の得られた母親から母乳を提供していただいた。

2. 母乳の処理

図 1 における異なる処理方法とは、

A) 全乳保存：搾乳→凍結①→融解① (NaN₃ 添加 (NaN₃ final 0.1%), 分注) →凍結②→融解②→遠心 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取→定量

B) 中間層保存：搾乳→凍結①→融解① (NaN₃ 添加 (NaN₃ final 0.1%), 分注) →遠心 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取→凍結②→融解②→沈殿があるまま VORTEX をよくかけてそのまま定量

C) 中間層保存 (ソニック)：搾乳→凍結①→融解① (NaN₃ 添加 (NaN₃ final 0.1%), 分注) →遠心

(10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取→凍結②→融解②→ソニック (KINEMATICA AG, POLY TRON 26 で 30 秒, 30 で 30 秒) →定量

D) 中間層保存 (再遠心)：搾乳→凍結①→融解① (NaN₃ 添加 (NaN₃ final 0.1%), 分注) →遠心 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取→凍結②→融解②→遠心 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取→定量である。

その他の実験においては、搾乳→凍結→融解→NaN₃ 添加 (NaN₃ final 0.1%) →遠心 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) →中間層を採取後、定量に供した。

3. たんぱく質定量

牛血清アルブミンを標準たんぱく質として、Bio-Rad 社の DC Protein Assay キットを用いて定量した。

4. 総 IgA 定量

総 IgA はヒト分泌型 IgA を標準物質として、以下のような条件でサンドイッチ ELISA を行った。

①固相化抗体 (Buffer : PBS) : Goat anti Human IgA (α) (5 μg/ml, 50 μl/well, 37℃, 1h)

②Wash : PBS × 3

③Blocking : 1 % BSA/PBS (200 μl/well, 4℃ O/N)

④Wash : PBS × 3

⑤抗原 : (Buffer : 0.1% BSA-T/TBS)

・検量線 : Human Secretory IgA (0～10³ ng/ml)

(50 μl/well, 4℃ O/N)

・ヒト母乳 Sample : (50 μl/well, 4℃ O/N)

⑥Wash TBS × 1, T-TBS × 5, TBS × 1

⑦酵素標識二次抗体 (Buffer 0.1% BSA-T/TBS) :

ALP-Goat anti Human IgA (1 μg/ml, 50 μl/well, 37℃, 1h)

⑧Wash TBS × 1, T-TBS × 5, TBS × 1

⑨基質: p -ニトロフェニルリン酸 2Na /ジエタノールアミン Buffer 1mg/ml (100 μ l/well)

⑩吸光度測定 (主波長: 405 nm, 副波長: 655 nm R/T 3,5,8,10 min)

5. 食品たんぱく質特異的 IgA, IC の定量

食品たんぱく質特異的 IgA の定量は総 IgA 定量の①において Goat anti Human IgA(α) のかわりにオボアルブミンあるいはカゼイン (5 μ g/ml, 50 μ l/well, 37°C, 1h) を用いた. IC の定量には総 IgA 定量の①において, オボアルブミン, カゼインに対する特定原材料モリナガ ELISA キット (森永生科学研究所) の固相プレートを用いた. これらのプレートにはそれぞれオボアルブミン, カゼインに対する抗体が固相化されている.

C. 結果

1. 母乳の処理

母乳は処理方法の違いによって, 肉眼でも脂質との分離や沈殿形成に差が生じる事がある. しかしながら, たんぱく質, 総 IgA とともに条件による顕著な濃度の違いは見られなかった.

2. 泌乳期間による総たんぱく質, 総 IgA の変動

アレルギー疾患をもたない乳児の母親を無作為に抽出し (スポット母乳), 母乳中の総たんぱく質量と総 SIgA 量を定量し, 乳児の月齢 (泌乳期間) 順に並べた (図 1). 総たんぱく質量は平均 9.5 mg/ml と食事摂取基準の値より少し低めであり, 泌乳期間が長くなると減少気味であった. また総 IgA 量は平均 376 μ g/ml で個人差が激しく, 月齢による変動はみられなかった.

3. 総たんぱく質, 総 IgA の日内変動

アレルギー疾患をもたない乳児の母親 9 人に依

頼し, 授乳ごとに直前の母乳を採取していただき, 総たんぱく質, 総 IgA の日内変動を見た (図 3). だいたいにおいて両者とも安定していたが, A, E さんで大きな変動が見られた. しかも A さんではたんぱく質は減少していたが IgA は一定で, E さんではたんぱく質, IgA 共に増加していた. 水分摂取, 活動との関連など理由は不明である. また, 個体差やこれらの変動を含むため, スポット母乳の結果がばらつくものと考えられる.

4. 個々の母親における泌乳期間, 乳児の食物アレルギーの有無と総 IgA

スポット母乳では結果がばらつく事がわかったので, 個々の母親について泌乳期間による総 IgA の変動を解析した (図 4). その結果, 乳児にアレルギーのない母親から採取された母乳 (健康児母乳), 卵アレルギー児をもつ母親から採取された母乳 (卵アレルギー児母乳), にかかわらず, 泌乳期間が長くなると総 IgA 濃度が低下していくことが明らかとなった.

5. 健康児母乳中の特異的 IgA と IC

我々はこれまでにヒト母乳中に食物アレルギーが特異的分泌型 IgA との IC として存在していることを明らかにしてきた⁵⁾. そこでさらに, 代表的な食物アレルギーである卵白オボアルブミンと牛乳カゼインについて, 特異的 IgA と IC の変動を個々の母親レベルで, 日内変動, 2 ヶ月の泌乳期間をあけて解析した. 健康時母乳では, 朝と晩で大きな変動はなく, また 2 ヶ月間隔をあけて採取した場合でも大きな違いは見られず, 安定した濃度で母乳中に特異的 IgA やその IC が分泌されていた (図 5).

6. 食物アレルギー児母乳中の特異的 IgA と IC

一方、図 6 に卵アレルギー児母乳を用いて得られた結果を示した。J さんや K さんでは特異的 IgA も IC も、朝に採取した場合と夜に採取した場合には夜の方が少なく、さらに 2 ヶ月間隔が空いた場合にも変動がみられた。また、L さんのように日内では大きな変動はみられなくても、月齢を経ると IC の濃度が大きく減少するような場合があった。これらのことから、さきほどの健康児母乳と比べて、卵アレルギー児母乳は母乳中への免疫成分の分泌に不安定さがある事が判明した。また、健康児母乳と比べると、特異的 IgA は健康児母乳と同様にカゼインが優位だったが、IC については健康児母乳の場合はカゼインが優位だったのに対し、アレルギー児の場合ではオボアルブミンのほうが多く存在していた。卵アレルギー児をもつ母親では、特異的 IgA の分泌と抗原の取り込みについて、卵たんぱく質に特徴的な応答が見られているかもしれない。

D. 考察

母乳成分の値は特に特異的成分では個体差が総たんぱく IgA や IC は月齢変動よりも個人差が大きくみられました。

健康児母乳中では特異的 IgA や IC はオボアルブミンよりカゼインのほうが多く存在していたが、卵アレルギー児母乳中の IC については特徴的にオボアルブミン IC が多く存在していた。母親の腸管免疫系に対する抗原性と抗原の腸管からの取り込みやすさが、たんぱく質の種類によって異なることと乳児のアレルギーの有無に関係があるのかも知れない。

個人内で見ると、卵アレルギー児母乳の特異的 IgA、IC では日内変動や月齢変動がみられる場合があり母乳中への分泌の不安定さがあった。

このような不安定さが見られる場合、母親の食物摂取のタイミングによっては、母乳中 IgA の抗原結合部位の飽和度が高まり、遊離の抗原が母乳中へ出る可能性が多くなり、アレルギー発症、増悪の原因となるかも知れない。

今後は、母親の腸管免疫系への抗原性の違い、それに続く母乳への特異的 IgA の分泌量の違い、IgA 分泌の不安定さなど粘膜免疫反応の安定性の違い、さらに特異的 IgA の抗原結合部位の飽和度合いなどを解析し、乳児の食物アレルギー発症との関連を見て行くことが必要である。

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
なし

2. 学会発表

廣瀬潤子, 木津久美子, 長尾早枝子, 木村彰宏, 本庄勉, 成田宏史: 外分泌液中の食品タンパク質・IgA 免疫複合体の評価. 日本栄養食糧学会大会. 平成 18 年 5 月 20 日. 静岡県立大学.

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. 日本人の食事摂取基準 (2005 年版) (日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書)

平成 16 年 10 月 厚生労働省

2. 山本良郎, 米久保明得, 飯田耕司, 他. 日本人の母乳組成に関する研究 (第 1 報). 小児保健研究 1981;40:468-75.
3. 米山京子, 後藤いずみ, 永田久紀. 母乳成分の授乳月数に伴う変動. 日本公衛誌 1995; 42:472-81.
4. 明治乳業株式会社. ソフトカード明治コナミルク「ほほえみ」解説書. 2001:41-2.
5. J. Hirose, S.Ito, N. Hirata, S. Kido, N. Kitabatake, and H. Narita, "Occurrence of a major food allergen, ovomucoid, in human breast milk as an immune complex", Biosci. Biotechnol. Biochem., 65,1438-1440, 2001

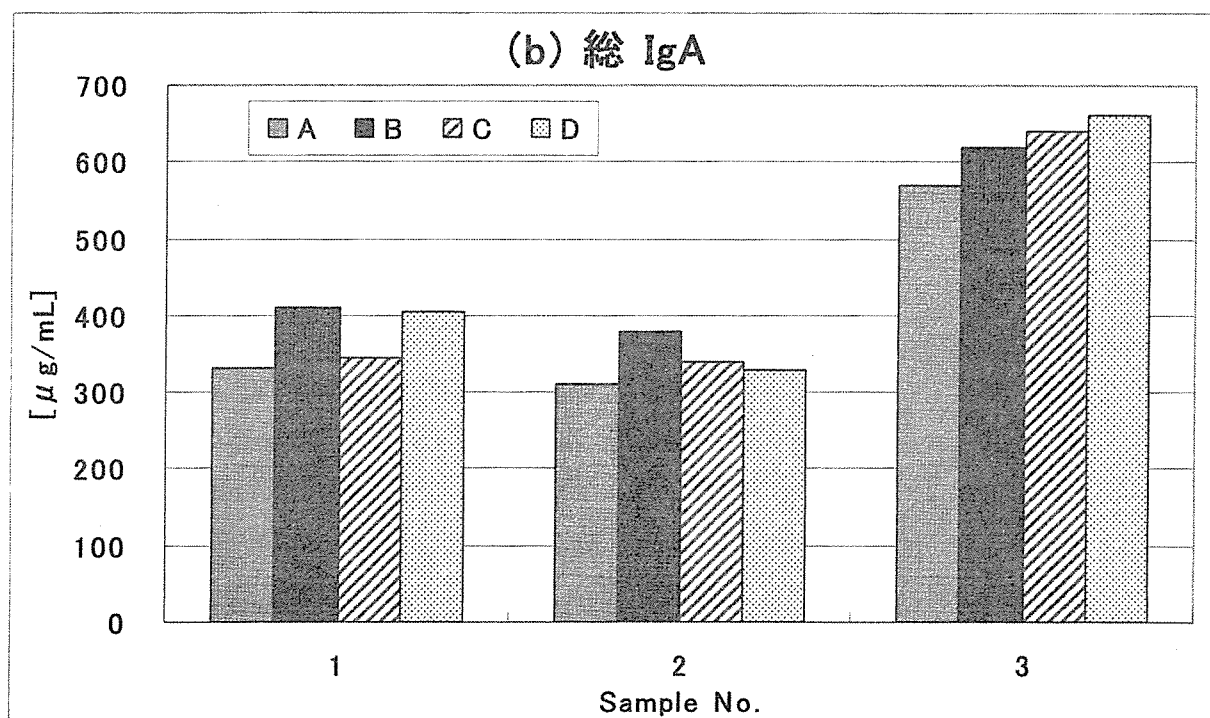
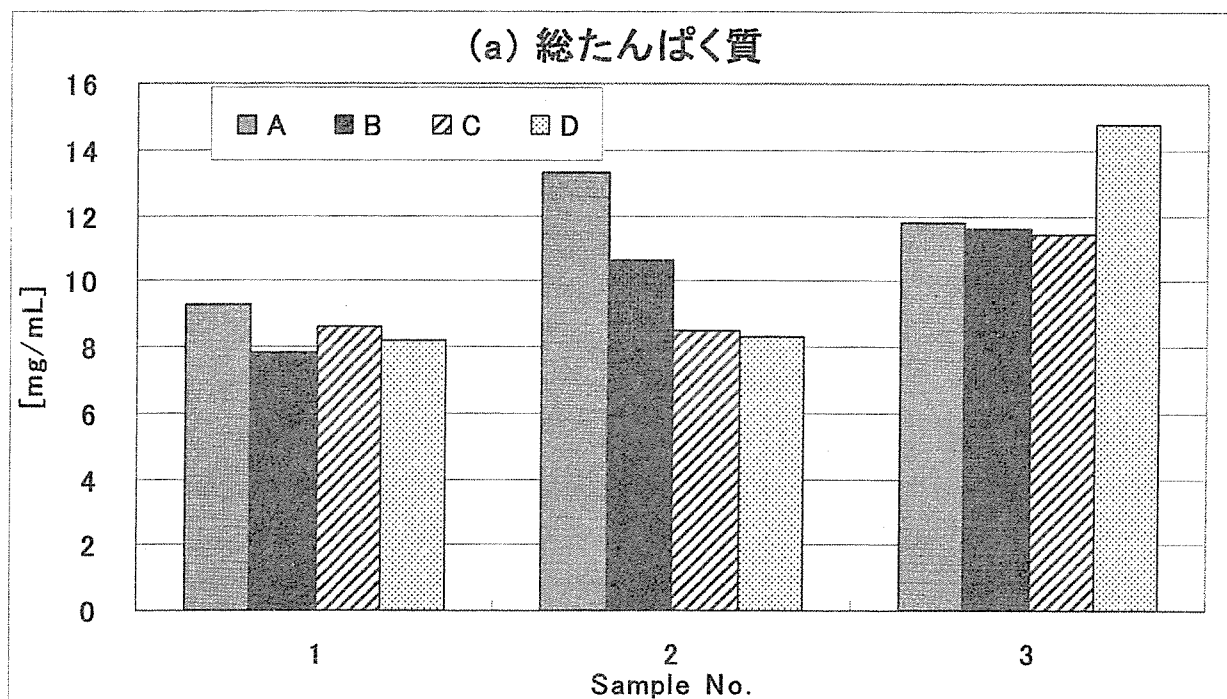


図 1. 調製法の違いによる変動 (a) 総たんぱく質 (b) 総 IgA

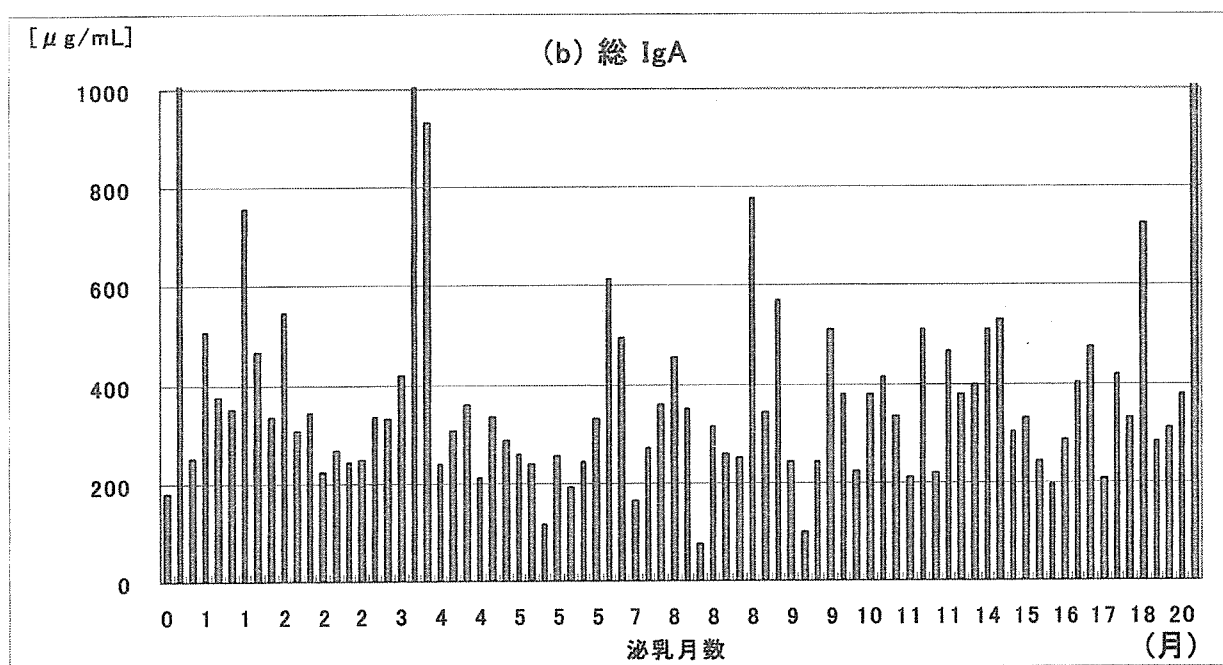
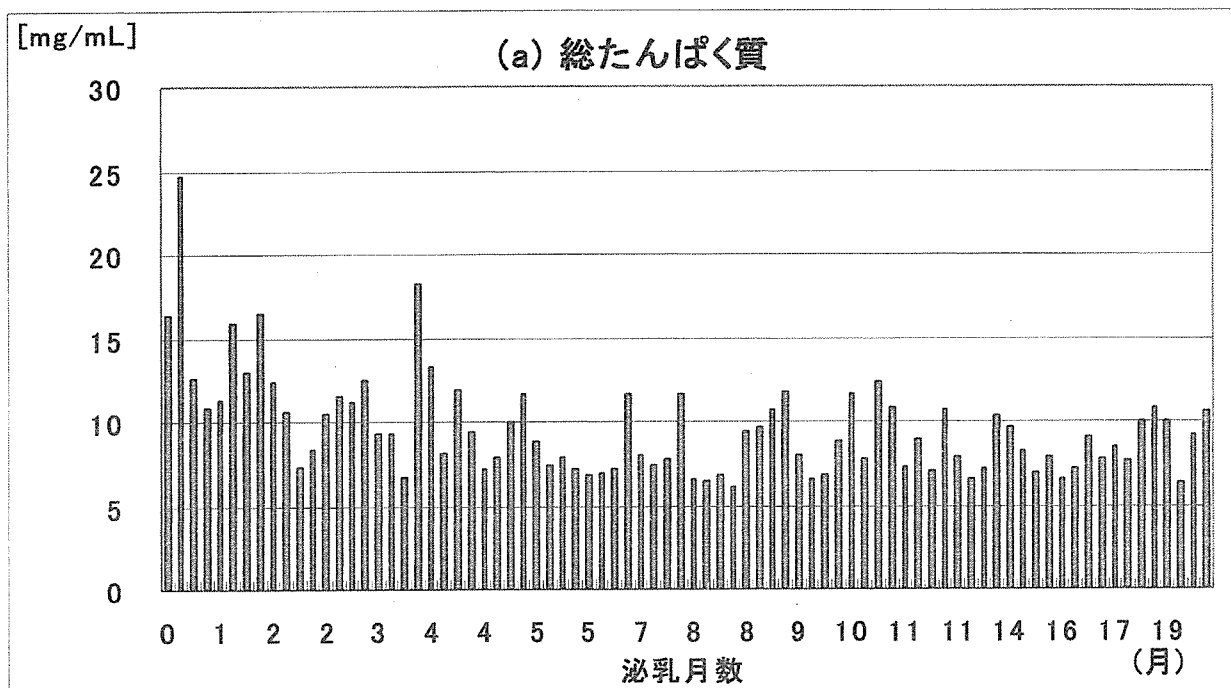


図 2. 泌乳月数による違い (スポット母乳) (a) 総たんぱく質 (b) 総 IgA

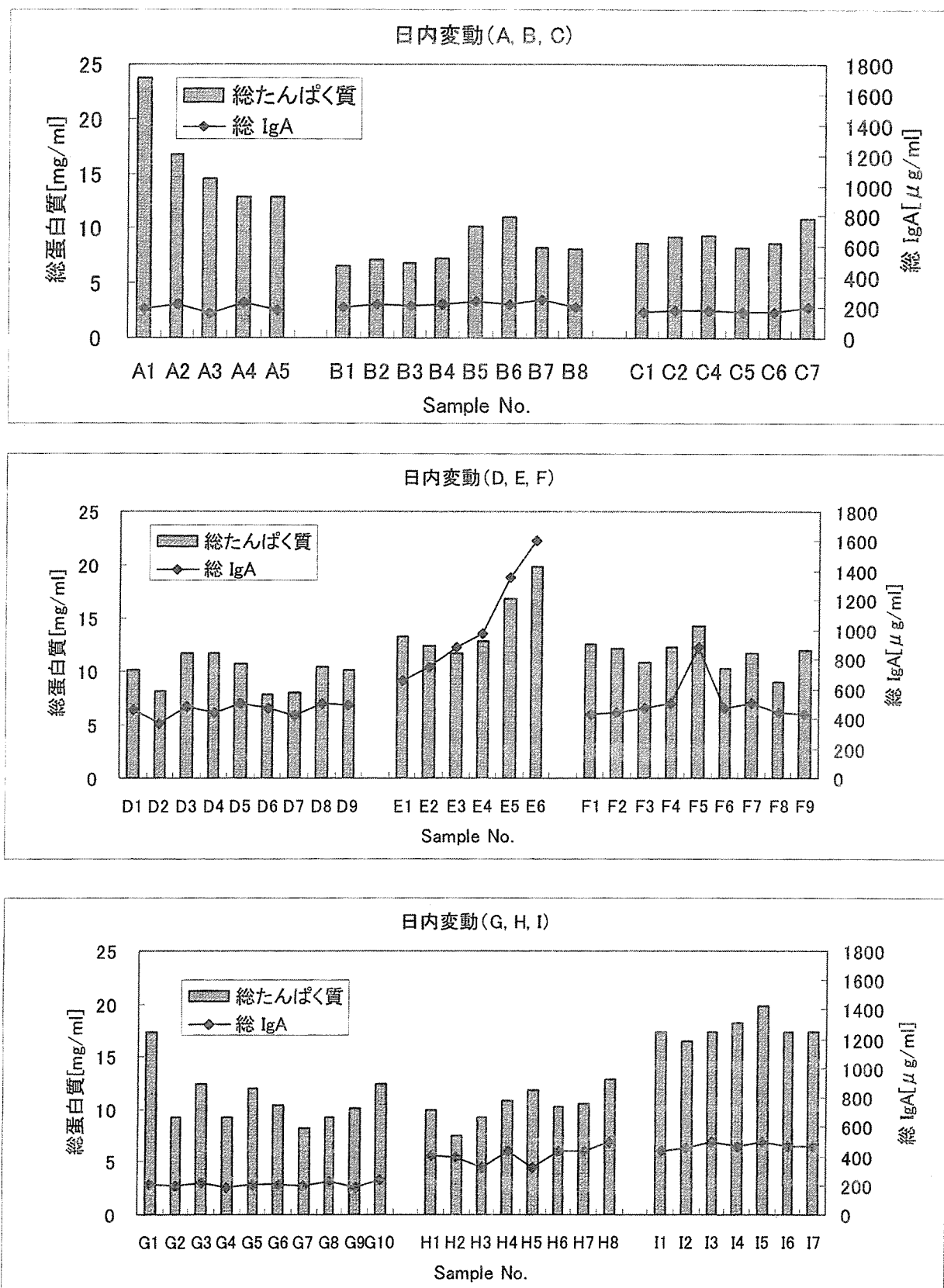


図 3. 日内変動

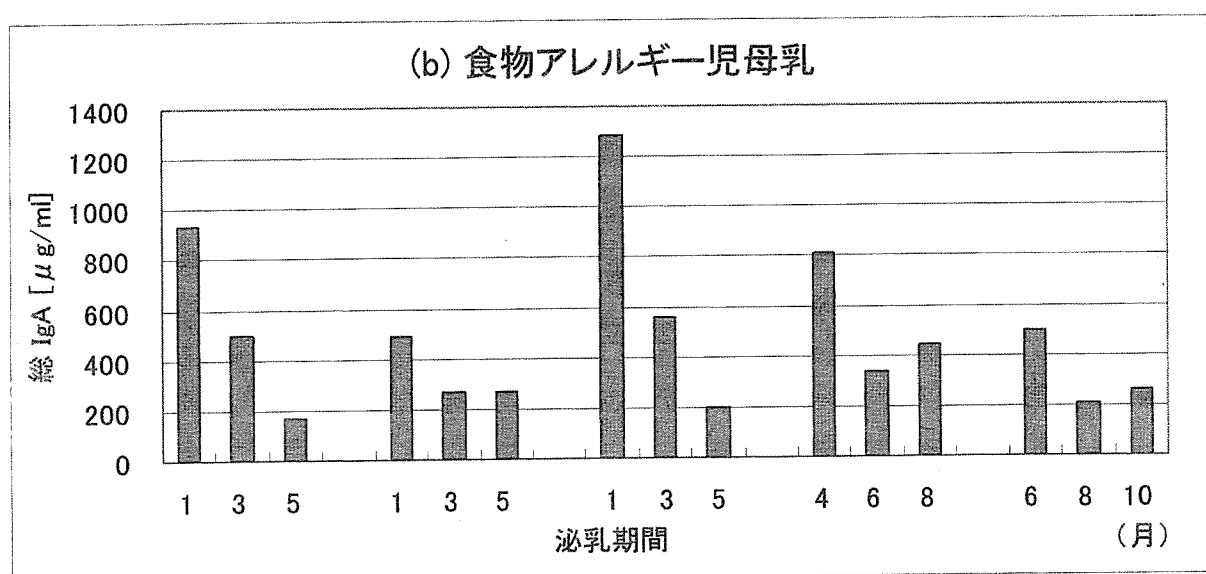
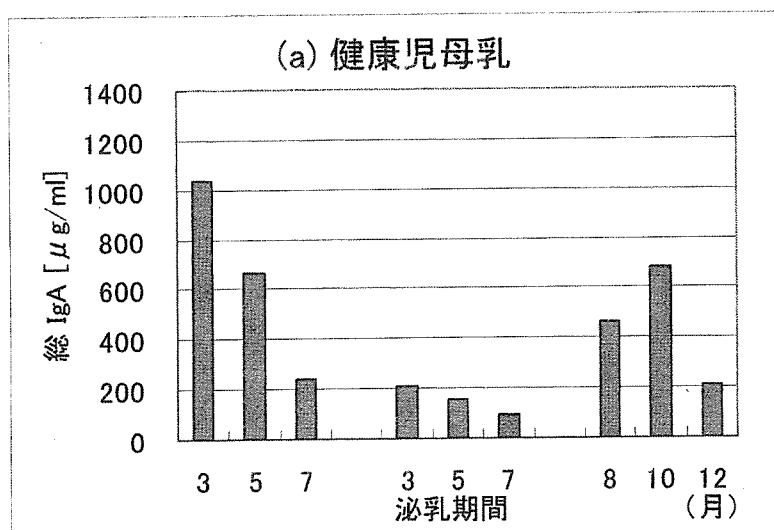


図4. 個々の母親における泌乳期間、乳児の食物アレルギーの有無と総IgA量

(a) 健康児母乳 (b) 食物アレルギー児母乳

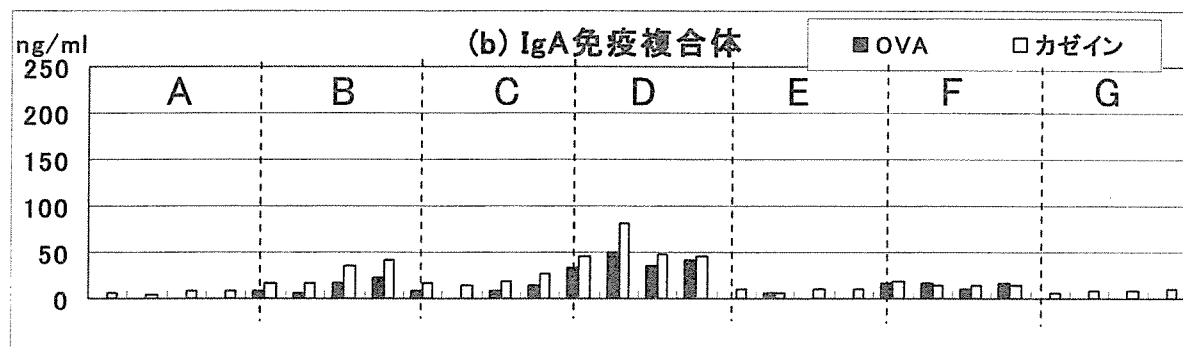
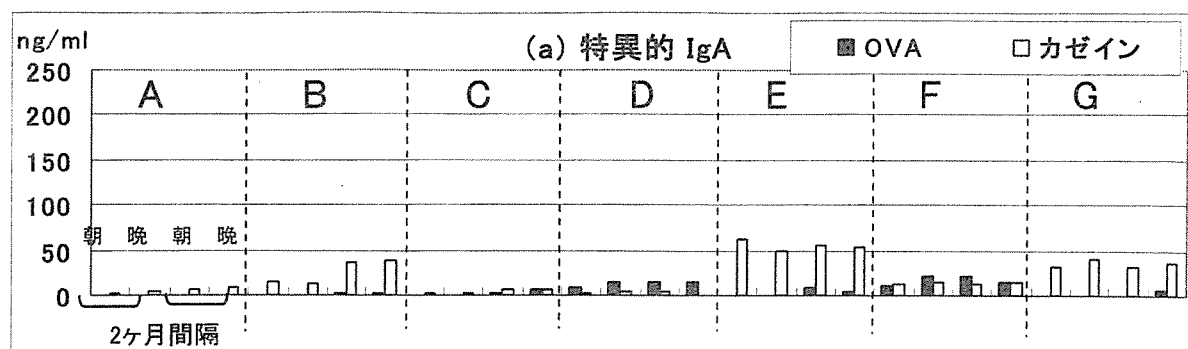


図5. 健康児母乳中の特異的 IgA 及び IgA 免疫複合体

(a) 特異的 IgA (b) IgA 免疫複合体

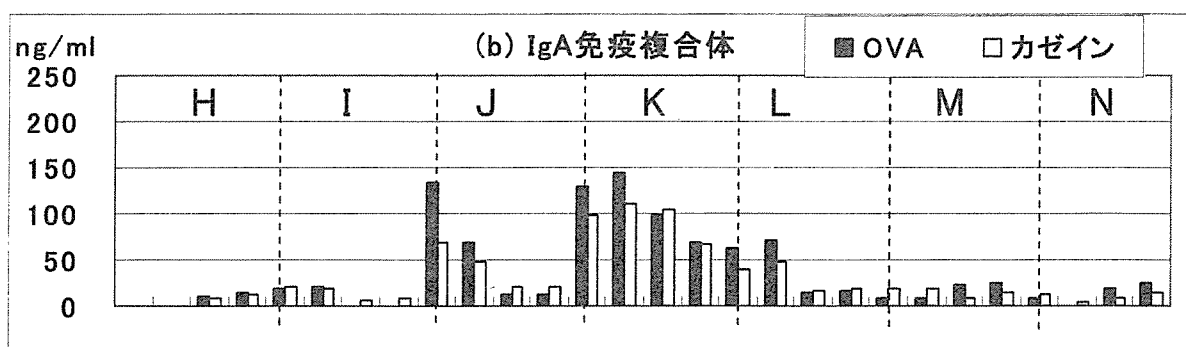
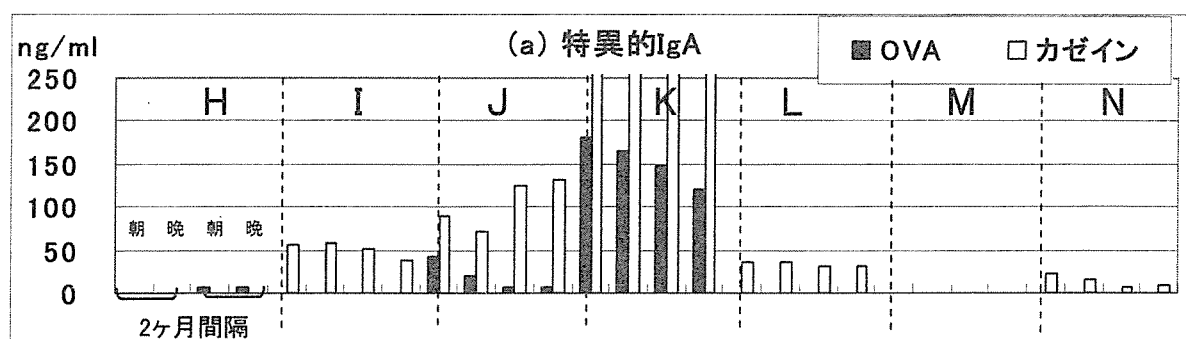


図6. 食物アレルギー児母乳中の特異的 IgA 及び IgA 免疫複合体

(a) 特異的 IgA (b) IgA 免疫複合体

V. 講演会の報告書