

## 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成30年4月25日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 徳島大学大学院 医歯薬学研究部  
職 名 助教  
研究代表者 大西 康太

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:17019)

1. 共同研究課題名	キヌレニン及びキヌレン酸によるオートファジー制御機構の解析			
2. 共同研究目的	出芽酵母と哺乳動物において、オートファジー活性の調節に重要なキヌレニン代謝物を探索・同定し、その作用機序について説明する。			
3. 共同研究期間	平成29年4月1日 ~ 平成30年3月31日			
4. 共同研究組織				
氏名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 大西 康太	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 食品機能学分野	助教	哺乳動物細胞における キヌレニン経路を介した オートファジー制御機構の解析	
(分担研究者) 大橋 一登	群馬大学 生体調節研究所	助教	出芽酵母における オートファジー活性を制御する キヌレニン代謝物の探索	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	テニュアトラック	氏名	大橋 一登

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

キヌレニン、トリプトファン代謝物の一種であり、哺乳動物の神経細胞に対して毒性を示すことが知られている。一方、キヌレニンから一段階の脱アミノ化反応により生成されるキヌレン酸は、神経保護的に働くと考えられている。これらトリプトファン代謝物の神経細胞内における量的変動は、神経変性疾患の病態に関与することが示唆されているが、キヌレニン及びキヌレン酸の細胞内における役割はいまだ不明である。そこで、細胞内異常タンパク質に対する主要な分解機構であり、近年、神経変性疾患の発症機構との関わりが報告されているオートファジーに着目し、キヌレニン及びキヌレン酸がその活性を制御する可能性について検証する。

最近、生体調節研究所の大橋助教は、出芽酵母におけるキヌレニン脱アミノ化酵素群を多重欠損することにより、キヌレン酸生合成が顕著に抑制された欠損株を樹立した。興味深いことに、本欠損により、高濃度トリプトファン含有培地における生育が抑制された。この表現型は、キヌレニンの蓄積、及び、キヌレン酸の欠乏によるものと予想される。そこで申請者らは、出芽酵母、及び、哺乳動物が、細胞内に蓄積したキヌレニンによる異常に対し、キヌレン酸生合成を介した共通の分子機序を以て対抗している可能性を想定した。本共同研究では、これらトリプトファン代謝物が、神経変性疾患との関わり深いオートファジー活性に及ぼす影響を検証する。

まず、種々のトリプトファン代謝酵素の遺伝子欠損株(大橋助教が既に樹立している)における、高濃度トリプトファン存在下でのオートファジー活性を比較することで、キヌレニン及びキヌレン酸の本分解機構に対する作用性を検証する。オートファジー活性の評価には、マーカー分子であるAtg8を指標として用い、オートファゴソームの蛍光顕微鏡観察、及び、オートファジーフラックスの解析を行う(申請者が保有する技術)。

出芽酵母においてオートファジー活性への関与が示唆された遺伝子に関しては、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2a 細胞(申請者が保有している)においてもそのホモログの遺伝子発現をノックダウンし、関連するトリプトファン代謝物の蓄積や、オートファジー活性に対する影響を評価する。

既報や大橋助教による予備的な検討から、オートファジー活性に対してキヌレニンは抑制的に、キヌレン酸は促進的に作用する可能性を想定しているが、mTORC1(出芽酵母では TORC1)シグナルへの影響を中心にそれぞれの分子機序について検証し、トリプトファン代謝物によるオートファジー活性の調節機序を明らかにする。

## 7. 共同研究の成果

出芽酵母にオートファジー活性のマーカー分子となる GFP-Atg8 の遺伝子を導入し、GFP-Atg8 の細胞内での分解をウエスタンブロットで検出することで、オートファジー活性変化の評価を試みた。オートファジー活性をトリプトファンの有無で比較したが、オートファジーの活性に顕著な変化は見られなかった。また、上記のキヌレニン脱アミノ化酵素群の遺伝子多重欠損株でも野生株と比較してオートファジー活性の明確な変化は観察できなかった。このことから、キヌレニンやキヌレン酸などのトリプトファン代謝物によってオートファジーは活性化されない、もしくはその影響は軽微である、と考えられた。そこで、トリプトファンからのキヌレニン生合成反応の一部を担う酵素 IDO1 が強発現する、マクロファージではトリプトファン代謝物が増加すると考えられ、その代謝物がオートファジー活性に及ぼす影響が観察しやすくなると予想した。J774.1 マウスマクロファージ様細胞株に対し、トリプトファン(L 体、D 体)、キヌレニン(L 体)、キヌレン酸を、それぞれ終濃度 10 mM で投与し、オートファジー活性に対する影響を評価した。予想したオートファジーの活性変化は認められなかったものの、無処理の細胞と同程度のオートファジー活性は確認できた。

一方で、オートファジー関連遺伝子を欠損した数種の出芽酵母株に対し、高濃度トリプトファン投与の影響を評価したところ、興味深いことに、数種のコア Atg 遺伝子欠損株が、顕著な感受性を示した。上述したように、トリプトファン、および、その代謝物(キヌレニンやキヌレン酸など)がオートファジーの活性を制御する可能性は低いと考えられる。しかしながら、高濃度トリプトファン耐性への恒常的オートファジーの寄与が示唆された。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

該当なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当なし