

ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットのトリプトファン ニコチンアミド代謝 摂取ビタミン量との関係

誌名	日本栄養・食糧学会誌 : Nippon eiy ō shokury ō gakkaiishi = Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science
ISSN	02873516
著者名	今井,絵理 佐野,光枝 福渡,努 柴田,克己
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	64巻5号
巻号補足	
掲載ページ	p. 313-321
発行年月	2011年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの トリプトファン-ニコチンアミド代謝

—摂取ビタミン量との関係—

今井 絵理¹, 佐野 光枝¹, 福 渡 努¹, 柴田 克己^{*1}

(2011年3月4日受付; 2011年6月28日受理)

要旨: トリプトファン (Trp) の異化代謝にはビタミン B₁, B₂, B₆ が関わっている。そこで, 低用量, 中用量, 十分量のビタミン混合を含む飼料を投与した時に Trp 異化代謝がどのように変動するのかを, 健常ラットと糖尿病ラットを用いて比較した。健常ラットにおいても, 糖尿病ラットにおいても, 飼料中のビタミン混合含量の差異は Trp 異化代謝には全く影響をおよぼさなかった。糖尿病ラットにおける Trp-ニコチンアミド (Nam) 転換率は健常ラットの 1/3 程度にまで低下していた。N¹-メチルニコチンアミドが体内に蓄積しやすい代謝状態にあった。この現象は体内の遊離状態の Nam 濃度の上昇を引き起こす可能性がある。遊離型の Nam は, poly(ADP-ribose) 合成酵素やヒストンデアセチラーゼなど種々の酵素の阻害剤である。したがって, 糖尿病時には Nam 代謝変動による影響が表れる可能性があり, さらなる研究が必要である。

キーワード: ストレプトゾトシン, 糖尿病, トリプトファン, ニコチンアミド, ビタミン

糖尿病は, 一般的に糖質の利用が極度に制限されるため, 肝臓における脂質の利用が著しく増大し, かつ糖新生が盛んとなる。すなわち, タンパク質の分解が進み, アミノ酸の異化代謝が亢進する。そのため, 脂質代謝に関わるビタミン B₂, ナイアシン, パントテン酸の要求量が増大し, かつアミノ酸の異化代謝に関わるビタミン B₆ の要求量が特に高まることが予想される。本研究では, 糖尿病におけるビタミン量の違いがトリプトファン-ニコチンアミド代謝におよぼす影響について, また, トリプトファン異化代謝について明らかにすることを目的とし, 以下の二つのことについて調べた。一つ目は, ビタミン摂取量の差異がトリプトファン異化代謝にどのような影響をおよぼすのかである。

二つ目は糖尿病ラットと健常ラットのニコチンアミドそのものの異化代謝の違いについてである。I型糖尿病のモデル動物であるストレプトゾトシンおよびアロキサン誘導糖尿病ラットでは, 健常ラットと比べ, トリプトファンの異化代謝がかなり亢進しているものと考えられている。Mehler *et al.*¹⁾, Ikeda *et al.*²⁾, Sanada *et al.*³⁾ は糖尿病ラットでは肝臓の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が健常ラットと比べて顕著に高くなることを報告している。この酵素活性の増大はトリプトファン-ニコチンアミド転換経路の鍵中間体とな

るキノリン酸の生成量の低下を引き起こし, ニコチンアミド経路への流入が低下し, グルタル酸経路への流入量が多くなり, 最終産物であるアセチル-CoA の生成量の増大を招くことになる。McDaniel *et al.*⁴⁾ は, アロキサン糖尿病 SD 系ラットではトリプトファンを負荷すると健常ラットと比べてニコチンアミドの異化代謝産物である N¹-メチルニコチンアミド (MNA) の尿中への排泄量が低くなっていたが, この現象はニコチンアミドのメチル化反応の低下によるものではなく, トリプトファンからニコチンアミドへの転換経路が低くなったためであろうと報告している。したがって, MacDaniel *et al.*⁴⁾ は, 糖尿病はニコチンアミドの異化代謝には影響をおよぼすことはないものと結論した。後に, Shibata *et al.* はアロキサン誘発⁵⁾ およびストレプトゾトシン誘発⁶⁾ 糖尿病 SD 系ラットでは, トリプトファンを負荷しない通常食摂取時でも, トリプトファンから生合成されるニコチンアミドの量が低下していることを MNA, N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (2-Py) および N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド (4-Py) を測定することで, 直接証明している。さらに, Shibata *et al.* は, アロキサン誘発糖尿病 SD 系ラット⁵⁾ とストレプトゾトシン誘発糖尿病 SD 系ラット⁶⁾ では, ニコチンアミドの異化代謝産物である 4-Py/2-Py 排泄量比ならびに (2-Py+4-Py)/MNA

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科 (522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500)

排泄量比が健常ラットと比較して、差異が認められなかったことを証明し、MacDaniel *et al.*⁴⁾ が推測したように糖尿病はニコチンアミドの異化代謝には影響をおよぼすことはないという結論に支持を与えた。

ところが、ラットの系統をSD系ラットからWistar系ラットに変えて同様な実験を行ったところ、Wistar系ラットでは糖尿病になると、上記のニコチンアミド異化代謝産物の排泄量比が顕著に低下することをShibata *et al.*⁷⁾ は見いだした。この原因は、SD系ラットでは糖尿病状態でもMNA酸化酵素活性が低下しなかったが⁶⁾、Wistar系ラットでは低下したことであった⁷⁾。トリプトファンの異化代謝は種差や系統差あるいは性差による差異が著しいことが知られている²⁾⁸⁻¹³⁾。したがって、SD系ラットとWistar系ラット間で見られたニコチンアミドの異化代謝経路の差異はラットの系統に起因する特有のものである可能性が高いが、補酵素として関わっているビタミンの要求量の差異に起因する可能性も否定できない。

ビタミンB₂はキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ¹⁴⁾と2-Py生成MNA酸化酵素、4-Py生成MNA酸化酵素の補酵素として¹⁵⁾、ビタミンB₆はキヌレニナーゼ¹⁶⁾、キヌレニンアミノトランスフェラーゼ¹⁷⁾の補酵素として必要である。間接的ではあるが、PRPPの前駆体のリボース-5-リン酸の生成に関与するトランケートラーゼ反応にビタミンB₁が必要である¹⁸⁾。このように、トリプトファンの異化代謝は複数のビタミンが関与する。そこで、ニコチンアミドの異化代謝経路がストレプトゾトシンで影響を受けるWistar系ラットを用いて、低用量、中用量、十分量のビタミン混合を含む飼料を投与した時にトリプトファン-ニコチンアミド代謝がどのような変動を示すかを調べた。また、糖尿病ラットと健常ラット間のトリプトファン異化代謝についても比較した。

実験方法

1. 動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は22℃前後、明暗サイクルは、午前6

時～午後6時を明、午後6時～午前6時を暗とした。

5週齢のWistar系雄ラットを日本クレア(株)より購入した。購入後、新しい環境に順応させるために、直ちに、ラット用代謝ケージ(日本クレア社製、CT-10)に個別に入れ、表1に示した1%AIN-93ビタミン混合¹⁹⁾を含む20%カゼイン食と水を自由に与え、1週間予備飼育した。そして、6週齢となった時点で、ラットの平均体重がほぼ均等になるように15匹ずつ二群に分けた。一群のラットを糖尿病にするために、0.1 mol/Lのクエン酸でpHを4.4に調整した0.5%食塩水1.0 mLにストレプトゾトシンをラットの体重1 kg当たり70 mgとなるように溶解した液を腹腔内に注射した。ストレプトゾトシン投与3日後、飽食時での血糖値が200 mg/dL以上のものを使用し²⁰⁾²¹⁾、ストレプトゾトシンを注射した群を糖尿病ラット群とした。他の群にはストレプトゾトシンを含まない同じ液を腹腔内に注射した。この群を健常ラット群とした。注射をした時間は午前9時から9時30分とした。さらに、糖尿病ラット群と健常ラット群の二つの群は、摂取させた飼料によって三つの群に細分化した。0.3%ビタミン混合食飼料を摂取させた低用量ビタミン混合食群、0.5%ビタミン混合食飼料を摂取させた中用量ビタミン混合食群、1.0%ビタミン混合食飼料を摂取させた十分量ビタミン混合食群の三群である。ストレプトゾトシンを投与したラットの飼料摂取量は、健常ラットよりも徐々に増え始め、糖尿病状態が落ちてきた10日後あたりから、約2倍になり飼料摂取量も安定化してくることを予備実験で確認した。既報もこの現象が見られることを報告している⁶⁾。糖尿病ラット群のビタミン摂取量を健常ラットの比較すべき群と揃えるために、実験開始10日間は、予備実験時の糖尿病ラットの飼料摂取量を基にしてビタミン混合量を毎日変えた飼料を投与した。糖尿病ラット群は、実験開始11日からは、表1に示したように、健常ラットに与えた各飼料の1/2量のビタミン混合を含む飼料を与えることで、比較すべき健常ラット群のビタミン摂取量と揃えた。

飼育期間は70日間とした。この間、飼料と水は自由

表1 飼料組成

	健常ラット			糖尿病ラット		
	0.3% VX 飼料群	0.5% VX 飼料群	1.0% VX 飼料群	調整 0.3% VX 飼料群 ¹⁾	調整 0.5% VX 飼料群 ¹⁾	調整 1.0% VX 飼料群 ¹⁾
ビタミンフリーミルクカゼイン	20	20	20	20	20	20
L-メチオニン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
α-コーンスターチ	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8
ショ糖	24.2	24	23.5	24.35	24.25	24
コーン油	5	5	5	5	5	5
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合 (ニコチン酸欠 AIN-93-MX)	0.3	0.5	1	0.15	0.25	0.5

各値は%で示した。¹⁾ 健常群ラットと糖尿病群ラットのビタミン混合摂取量のみを各ビタミン混合飼料群間でそろえるために、糖尿病ラットの飼料中のビタミン含量を1/2にした。その理由は、糖尿病ラットは健常ラットの約2倍の飼料摂取量であるためである。

摂取とし、毎日新しいものに交換した。ラットの世話
は午前8時～10時の間に行い、体重と飼料摂取量を測
定した。実験開始日を Day 1 として、飼育最終日の Day
70 の1日尿 (Day 70 の午前9時～Day 71 午前9時: 24
時間) を集めた。非絶食時の尿を塩酸酸性下で集め、採
尿後、分析に供するまで-20℃で保存した。

2. 化学薬品

ビタミンフリーミルクカゼイン、ショ糖、L-メチオニ
ン、ニコチンアミド、アンスラニル酸は和光純薬工業(株)
(大阪)より購入した。コーンオイルは味の素(株)(東京)
より購入した。 α -コーンスターチ、ミネラル混合 (AIN-
93-G-MX)¹⁹⁾、ビタミン混合 (AIN-93-VX)¹⁹⁾ はオリエン
タル酵母(株)より購入した。キヌレン酸、キサントレン
酸、MNA は東京化成工業(株)(東京)より購入した。
2-Py および 4-Py は、各々 Pullman & Colowick²²⁾ および
Shibata *et al.*²³⁾ の方法により合成した。他の化学薬品は
市販品の中で最高純度のものを使用した。

3. 尿中のトリプトファン異化代謝産物の測定

アンスラニル酸²⁴⁾、キヌレン酸²⁵⁾、キサントレン酸²⁶⁾、
MNA²⁷⁾、Nam²³⁾、2-Py²³⁾、および 4-Py²³⁾ は各々文献に
示した方法で測定した。

4. 統計学的解析

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。データ
の比較には、二元配置分散分析 (2-way ANOVA) を行い、
差があると推定されたとき、Tukey 法にて多重比較検定
を行い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。計算には日本語
Windows 版 Statistical Package for Social Science (SPSS,
Chicago, IL) Ver.14 を用いた。

結 果

1. 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違い が尿量、血液および尿中生化学検査値におよぼす 影響

ストレプトゾトシンを投与した糖尿ラットの尿量は、
健常ラットに比べておよそ 19～35 倍であった。また、
血中グルコースおよび尿中グルコース排泄量、尿中尿素
窒素排泄量についても健常ラットに比べ糖尿ラットにお
いて有意に高値を示したが、ビタミン混合の摂取量の違
いによる影響は受けなかった (表 2)。

2. 飼料中のビタミン混合量の差異が通常ラットのト リプトファンの異化代謝におよぼす影響

トリプトファンの異化代謝産物で、尿中に排泄される
主要な化合物の測定を行った。表 3 に示したように、健
常な Wistar 系雄ラットを低用量 (0.3% VX)、中用量 (0.5%
VX)、十分量 (1.0% VX) のニコチン酸フリーのビタミン
混合を含む飼料を自由に摂取させた時のアンスラニル
酸、キヌレン酸、キサントレン酸排泄量は、ビタミン混
合の摂取量の違いによる影響を全く受けなかった。

本実験ではニコチン酸フリー飼料を投与したので、生
成したニコチンアミドとその異化代謝産物はすべて飼料

表 2 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いが体重、飼料摂取量、尿量、生化学検査値におよぼす影響

	実験開始時 の体重 (g)	実験終了時 の体重 (g)	体重増加量 (g/70日)	飼料摂取量 (g/70日)	尿量 (mL)	血漿グルコース (mmol/L)	尿中グルコース (mmol/日)	尿中尿素窒素 (mmol/日)
健常ラット×0.3% VX	154±3	455±10	301±9	1415±24	9±1	5.7±0.3	0.0073±0.0005	12.9±0.9
健常ラット×0.5% VX	154±1	445±12	292±13	1428±26	15±3	5.3±0.3	0.0063±0.0017	13.1±0.9
健常ラット×1.0% VX	154±1	468±12	313±12	1471±22	12±1	6.4±0.2	0.0090±0.0007	13.6±0.5
糖尿ラット×調整 0.3% VX	157±3	198±19*	41±22*	2792±114*	312±16*	61.8±3.8*	193±19*	34.3±4.0*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	155±2	219±25*	60±21*	2824±147*	281±45*	66.4±7.3*	173±36*	32.5±5.8*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	154±3	205±16*	51±16*	2815±81*	346±19*	60.0±4.9*	193±9*	32.7±2.2*
2-way ANOVA p-values								
ストレプトゾトシン	0.493	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ビタミン含量	0.810	0.833	0.795	0.897	0.349	0.777	0.796	0.966
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.810	0.494	0.592	0.953	0.288	0.627	0.796	0.920

各値は平均値±標準誤差 (n=5) で示した。*健常ラットに対して有意差 ($p < 0.05$) が認められたことを示す。

表3 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いが尿中へのトリプトファンの異化代謝におよぼす影響

	飼料摂取量 ¹ (g/日)	Trp 摂取量 ¹ (μ mol/日)	AnA 排泄量 (nmol/日)	AnA 排泄率 ² (%)	KA 排泄量 (nmol/日)	KA 排泄率 ² (%)	XA 排泄量 (nmol/日)	XA 排泄率 ² (%)
健常ラット×0.3% VX	20.4±0.4	232±5	98±4	0.045±0.002	976±66	0.432±0.036	984±76	0.424±0.043
健常ラット×0.5% VX	20.9±0.5	237±5	91±9	0.038±0.003	1017±151	0.426±0.053	886±113	0.373±0.042
健常ラット×1.0% VX	21.0±0.6	239±6	103±9	0.043±0.004	1107±108	0.465±0.045	1003±76	0.420±0.029
糖尿ラット×調整 0.3% VX	42.3±1.4*	462±32*	121±21	0.025±0.004*	1195±288	0.259±0.062*	893±186	0.193±0.040*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	44.3±2.1*	502±24*	122±22	0.024±0.006	1207±244	0.237±0.041*	948±425	0.189±0.074*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	41.3±1.4*	475±13*	124±35	0.027±0.008	1244±124	0.258±0.029*	848±167	0.179±0.031*
2-way ANOVA <i>p</i> -values								
ストレプトゾトシン	<0.001	<0.001	0.1332	<0.001	0.230	<0.001	0.725	<0.001
ビタミン含量	0.455	0.452	0.939	0.648	0.878	0.807	0.995	0.829
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.464	0.575	0.965	0.826	0.974	0.933	0.871	0.802

各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。*健常ラットに対して有意差 ($p<0.05$) が認められたことを示す。¹採尿日の値を示す。²Trp 摂取量に対する排泄量の割合を示す。略称: Trp, トリプトファン; AnA, アンスラニル酸; KA, キヌレン酸; XA, キサンツレン酸。

表4 飼料中のニコチン酸欠-ビタミン混合含量の違いがニコチンアミドの異化代謝産物におよぼす影響

	合計量 ¹ (nmol/日)	Trp-Nam 転換率 ² (%)	Nam (nmol/日)	MNA (nmol/日)	2-Py (nmol/日)	4-Py (nmol/日)	4-Py/2-Py	(2-Py + 4-P)/ MNA
健常ラット×0.3% VX	3169±269	1.37±0.13	69±4	155±21	136±21	2809±235	21.7±2.6	19.6±2.2
健常ラット×0.5% VX	3072±467	1.13±0.14	73±14	158±37	140±23	2701±400	20.0±2.2	19.6±2.4
健常ラット×1.0% VX	3287±172	1.38±0.06	79±8	150±6	150±17	2908±159	20.2±2.4	20.4±0.9
糖尿ラット×調整 0.3% VX	2088±250	0.43±0.04*	N.D. ³	1086±82*	114±20	907±242*	9.6±1.7*	0.9±0.3*
糖尿ラット×調整 0.5% VX	1981±362	0.52±0.16*	N.D.	961±94*	115±20	906±279*	7.6±2.4*	1.0±0.3*
糖尿ラット×調整 1.0% VX	2028±539	0.43±0.10*	N.D.	1018±315*	111±17	900±306*	8.1±2.1*	1.4±0.5*
2-way ANOVA <i>p</i> -values								
ストレプトゾトシン	<0.001	<0.001	—	<0.001	0.089	<0.001	<0.001	<0.001
ビタミン含量	0.932	0.735	—	0.908	0.962	0.938	0.687	0.877
ストレプトゾトシン× ビタミン含量	0.963	0.254	—	0.900	0.901	0.930	0.997	0.989

各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。*健常ラットに対して有意差 ($p<0.05$) が認められたことを示す。¹合計量は Nam, MNA, 2-Py, 4-Py の合計を示す。²Trp-Nam 転換率(%)=合計量 (nmol/日)/トリプトファン摂取量 (nmol/日)×100。(例; 健常 0.3% VX ラットで, トリプトファン摂取量が 230 μ mol/日の時では, 3169/230000×100 = 1.378 $\div$ 1.38%となる。³検出限界以下であることを示す。

中に含まれるカゼインのトリプトファンから生合成されたものである。ニコチンアミドとその異化代謝産物の尿中への合計排泄量と採尿時のトリプトファン摂取量からトリプトファン-ニコチンアミド転換率がもとめられる。その結果を表3に示した。この転換率も飼料中のビタミン含量の差異によって影響を受けることはなかった。

ニコチンアミドおよびその異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの各排泄量を表4に示した。また異化代謝産物排泄量比, 4Py/2-Py および (2-Py+4Py) /MNA を表3に示した。これらの値は, 摂取ビタミン量の差異によって影響を受けることはなかった。

3. 飼料中のビタミン混合量の差異が糖尿病ラットのトリプトファンの異化代謝におよぼす影響

ストレプトゾトシンを注射することで作成したI型糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝が, 摂取するビタミン量の違いによってどのように変動するのかを調べた。上記の健常ラットと同様に, 低用量, 中用量, 十分量のビタミン混合を含んだ飼料を自由に摂取させた。投与した飼料のビタミン混合量は, 後述の健常ラットと糖尿病ラット間での比較を行うに当たり, ラット1匹当たりの摂取するビタミンの絶対量を比較すべき二つの群間で等しくするために調整を行った。

トリプトファンの異化代謝産物であるアンスラニル酸, キヌレン酸, キサンツレン酸は表3に示したように, 糖尿病 Wistar 系雄ラットを低用量, 中用量, 十分量のニコチン酸フリーのビタミン混合を含む飼料を自由に摂取させた時において, 各々の排泄量は, ビタミン混合の摂取量の差異による影響を全く受けなかった。

糖尿病ラットのトリプトファン-ニコチンアミド転換率を求めた。その結果を表4に示した。転換率は摂取するビタミン量の差異による影響を受けなかった。

糖尿病ラットのニコチンアミドおよびその異化代謝産物であるMNA, 2-Py, 4-Pyの各排泄量を表4に示した。また異化代謝産物排泄量比, 4Py/2-Py および (2-Py+4Py)/MNA を表4に示した。これらの値は, 摂取ビタミン量の差異によって影響を受けることはなかった。

4. 健常ラットと糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝の比較

上述のように, 健常ラットおよび糖尿病ラットに低用量, 中用量, あるいは十分量のビタミン混合を含む飼料を与えて, トリプトファンの異化代謝産物排泄量への影響, トリプトファン-ニコチンアミド転換率への影響, およびニコチンアミド異化代謝産物への影響を調べたが, 調べた範囲内でのビタミン混合量の差異は, これらの指標に全く影響をおよぼすことはなかった(表3, 4)。

実験期間中の飼料摂取量は約2倍であったにもかかわらず, 体重増加量は, 糖尿病ラットの方が健常ラットよりも顕著に低い値であった。アンスラニル酸, キヌレン酸, キサンツレン酸の1日尿中に排泄された絶対量は, 糖尿病ラットと健常ラット間で差異は認められなかった

が, 糖尿病ラットのトリプトファン摂取量が2倍であったために, トリプトファン摂取量に対する排泄量比率は糖尿病ラットが健常ラットの約0.4~0.5倍の値となった。糖尿病ラットのトリプトファン-ニコチンアミド転換率は健常ラットの約1/3にまで低下していた。これは, ニコチンアミドとその異化代謝産物量がトリプトファン摂取量に比して, 低い値であったことを意味している。しかしながら, 糖尿病ラットの1日尿中に排泄されたニコチンアミドおよびその異化代謝産物の絶対量が, 健常ラットに比して一様に低いわけではなく, 2-Py 排泄量はほぼ等しく, MNAは高い値, 4-Pyは顕著に低い値を示した。糖尿病ラットのニコチンアミド排泄量は検出限界以下であったが, これは, 糖尿病ラットの尿量が300 mL/日と健常ラットの20倍も多く, ニコチンアミドが希釈されすぎて, 検出限界以下になったものと推察された。

考 察

トリプトファン代謝には, B群ビタミンが必要である。ビタミンB₆の栄養状態を判断する一つの指標として, トリプトファン負荷後の尿中へのキサンツレン酸排泄量を調べる方法^{28,29)}が知られている。また, 糖尿病患者の尿中には多量の3-ヒドロキシキヌレニンとキサンツレン酸が検出されること³⁰⁾や糖尿病ラットにトリプトファンを負荷するとキサンツレン酸の排泄量が顕著に高くなることも古くから明らかにされており³¹⁾, 糖尿病状態ではビタミンB₆の栄養状態が悪化していることが推察される。これは, キヌレニンの代謝経路と関係している。キヌレニンはビタミンB₂の補酵素型であるFADを補酵素とするキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ¹⁴⁾によって3-ヒドロキシキヌレニンになるのか, ピリドキサルリン酸を補酵素とするキヌレニナーゼ¹⁶⁾によってアンスラニル酸となるのか, あるいはピリドキサルリン酸を補酵素とするキヌレニンアミノトランスフェラーゼ¹⁷⁾によってキヌレン酸になるのか, 三つの可能性がある。キヌレニナーゼのキヌレニンと3-ヒドロキシキヌレニンに対する反応性は, K_m値などのデータから¹⁶⁾, 3-ヒドロキシキヌレニン→3-ヒドロキシアンスラニル酸の方が高いと考えられている。したがって, キヌレニナーゼは本来3-ヒドロキシキヌレニナーゼと呼ばれるべきである。3-ヒドロキシキヌレニンはキヌレニナーゼによって3-ヒドロキシアンスラニル酸になるか, キヌレニンアミノトランスフェラーゼによってキサンツレン酸になるのか, 二つの可能性がある。キヌレニナーゼは細胞質画分¹⁶⁾に, キヌレニンアミノトランスフェラーゼはミトコンドリアの外膜中に存在する酵素である³²⁾。ビタミンB₆欠乏になると, 細胞質に存在するキヌレニナーゼはミトコンドリア外膜に存在するキヌレニンアミノトランスフェラーゼよりも早くピリドキサルリン酸を失い, 活性が低下するものと考えられる。その結果, キヌレニ

ンはキヌレニン 3-モノオキシゲナーゼによって選択的に水酸化され、3-ヒドロキシキヌレニンが生成される。3-ヒドロキシキヌレニンは、ビタミン B₆ 不足では、キヌレニナーゼの触媒反応により 3-ヒドロキシアンスラニル酸になることができないので、トリプトファン-ニコチンアミド代謝経路から考えれば、側路に位置するキヌレニンアミノトランスフェラーゼによってキサンツレン酸へと代謝される。つまり、深刻なビタミン B₆ 欠乏状態では、キヌレニンを代謝できる酵素が二つともビタミン B₆ 酵素であるために、キヌレニンが蓄積するものと考えられる。しかし、穏やかなビタミン B₆ 欠乏の場合は、ミトコンドリアの外膜に存在するキヌレニンアミノトランスフェラーゼよりも、細胞質画分に存在するキヌレニナーゼの方が、より早くピリドキサルリン酸を失うため、キヌレニンがキサンツレン酸の生成へと偏向するものと考えられている。しかし、どれほどのビタミン B₆ 欠乏でこのような代謝変動が起きるのかについては未だ十分な解明はなされていなかった。今回の実験結果では、幼若ラットの最大成長を保証する最低量の 0.3% ビタミン混合食を投与しても、アンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の尿中排泄量が十分量のビタミン混合食を投与した時と比較して変動は認められなかった。したがって、トリプトファン-キサンツレン酸経路が主な代謝経路となるようなビタミン B₆ 栄養状態は、かなり深刻なビタミン B₆ 欠乏状態であると思われる。Schaeffer *et al.* は³³⁾、トリプトファン負荷によるキサンツレン酸の測定はビタミン B₆ 欠乏の鋭敏な判断方法としては適さないことを報告している。また、ビタミン B₆ はトリプトファンから生成する神経伝達ホルモンであるセロトニンの合成にも関わっていることから³⁴⁾、糖尿病による神経障害を、ビタミン B₆ の積極的な投与が緩和させることも報告されている³⁵⁾。今回の実験では、セロトニン関連物質の測定は行わなかったが、今後検討してみたい課題である。

ビタミン B₂ が欠乏すると、FAD 酵素であるキヌレニン 3-モノオキシゲナーゼ活性が低下し、キヌレニンの代謝はアンスラニル酸へと偏向することが予想される。今回の実験はすべてのビタミンを低用量にした群を設けたが、低用量ビタミン混合飼料を投与してもアンスラニル酸が増大することはなかった。したがって、0.3% ビタミン混合食に含まれるビタミン B₂ 量で、キヌレニン 3-モノオキシゲナーゼは十分に酵素活性を発揮できるものと推察された。

ビタミン B₁ は直接トリプトファンの異化代謝には関与していないが、キノリン酸からニコチン酸モノヌクレオチドが生成するときに必要な 5-ホスホリボシル-1-ピリロン酸 (PRPP)³⁶⁾ の生成系の一員であるトランスケトララーゼの補酵素として関与している。トリプトファン-ニコチンアミド転換率は飼料中のビタミン混合量の差異によって変動しなかったため、PRPP 生合成反応系にも

異常がないものと推察された。ビタミン B₁ の量もビタミン混合量が 0.3% で必要量をまかなうことができたものと考えられる。

今回の実験結果から、低用量ビタミン混合食として使用した 0.3% ビタミン混合食でも十分に幼若ラットの成長を支えることができ、さらにトリプトファンの異化代謝経路も正常に動かすことができることが明らかとなった。

糖尿病ラットは健常ラットの飼料摂取量の 2 倍の摂食があるにもかかわらず、アンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の排泄量が健常ラットに比して高い値を示すことはなく、ほぼ健常ラットと等しい値を示した。したがって、トリプトファンからの生成比率では糖尿病ラットは健常ラットの 1/2 程度であったことになる。このことは、糖尿病ラットではトリプトファンをアセチル-CoA に転換する経路の活性が強くなり、側路への流入量を著しく低下させる代謝変動が起きていることを意味する。これは、3-ヒドロキシアンスラニル酸ジオキシゲナーゼ活性の増大⁶⁾⁷⁾ と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の増大¹⁻³⁾⁶⁾⁷⁾ という *in vitro* 実験の結果から説明が可能である。すなわち、糖尿病によってキサンツレン酸が増えるという現象は、トリプトファンの大量負荷により、トリプトファンの異化代謝の本経路が飽和した結果時にのみ見られる現象で、通常の飼料中から得られるトリプトファン摂取量では、トリプトファンはほとんど本経路で処理されてしまい、側路に流入する量は減少し、糖尿病時ではむしろ側路に位置するアンスラニル酸、キヌレン酸、キサンツレン酸の各生成量比は低下していることが明らかとなった。

ビタミン B₂ 欠乏ラットではトリプトファンからのニコチンアミドの生合成量が低下することが報告されている³⁷⁾。これは、キヌレニン 3-モノオキシゲナーゼが FAD を補酵素とするからである¹⁴⁾。さらに、ニコチンアミドの異化代謝酵素である 2-Py 生成 MNA 酸化酵素と 4-Py 生成 MNA 酸化酵素は FAD 酵素であると推測されている³⁸⁾。したがって、ビタミン B₂ 欠乏ラットではこれらの酵素活性が検出限界以下にまで低下することで、MNA → 2-Py および MNA → 4-Py の反応が抑制され、MNA 排泄量が著しく高くなると考えられている。そして、(2-Py+4-Py)/MNA 排泄量比が著しく低下するものと思われる。今回の実験では低用量のビタミン混合食でもこれら二つの比率は変動しなかった。したがって、この結果も 0.3% ビタミン混合食に含まれるビタミン B₂ 含量で必要量をまかなっていることが推測された。

以上のことをまとめてみると、トリプトファン代謝には B 群ビタミンが補酵素として関わっていることから、飼料中のビタミン混合量を十分量、中用量、低用量とし、三つの飼料を健常ラットと糖尿病ラットに投与し、どのような代謝変動が起きるのか調べてみたが、ビタミン摂取量の差異による違いは全く見られなかった。このこと

は、糖尿病ラットにおいては、脂肪酸とアミノ酸の異化代謝が亢進され、これらの代謝に関わる B 群ビタミンの必要量に影響を与えると考え、通常食に混入される 1.0% ビタミン混合¹⁹⁾を基本として、1/2 量の 0.5% ビタミン混合食、1/3 量の 0.3% ビタミン混合食を投与したが、トリプトファンの異化代謝には変動がなかった。おそらく、他のアミノ酸や脂肪酸の異化代謝においても、0.3% ビタミン混合食で必要量をまかなうことができるものと思われた。さらに、低用量のビタミン混合食で調べてみる必要がある。

健常ラットと糖尿病ラットのトリプトファン異化代謝を比較してみると、多くの差異が観察された。従来から指摘されていたように¹⁻⁷⁾、トリプトファンからのニコチンアミドへの生合成量は約 1/3 にまで低下していた。今回の実験においてはじめて明らかとなった最も顕著な特徴は MNA から 2-Py および 4-Py の生成量が著しく低下していたことであった。このことは、体内への MNA の蓄積を意味する。MNA の蓄積はニコチンアミドメチルトランスフェラーゼ活性を阻害することで³⁹⁾、ニコチンアミドの蓄積を招き、蓄積したニコチンアミドがポリ ADP-リボース合成酵素⁴⁰⁾やヒストン脱アセチル化酵素活性⁴¹⁾を阻害することで、細胞機能に悪影響をおよぼす可能性がある。このような推論が正しいとすると、糖尿病でトリプトファン-ニコチンアミド転換率が下がるのは、遊離型のニコチンアミドの蓄積を抑制する防御機構の一つとも考えることができ、したがって、糖尿病患者にニコチンアミドを投与することは好ましくないものと思われる。

本研究は、平成 19 年度～21 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を改定するためのエビデンスの構築に関する研究—微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明—」(主任研究者、柴田克己)の成果の一部である。関係各位に謝意を表する。

文 献

- 1) Mehler AH, McDaniel EG, Hundley JM (1958) Changes in the enzymatic composition of liver. I. Increase of picolinic carboxylase in diabetes. *J Biol Chem* **232**: 323-30.
- 2) 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 Biol Chem* **240**: 1395-401.
- 3) Sanada H, Miyazaki M, Takahashi T (1980) Regulation of tryptophan-niacin metabolism in diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **26**: 449-59.
- 4) McDaniel EG, Hundley JM, Sebrell WH (1956) Tryptophan-niacin metabolism in alloxan diabetic rats. *J Nutr* **59**: 407-23.
- 5) Shibata K, Morita M, Matsuo H (1989) Urinary excretion of nicotinamide and its metabolites in alloxan-diabetic rats fed on a niacin-free diet. *Agric Biol Chem* **53**: 3353-4.
- 6) Shibata K (1988) Tryptophan-NAD metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Agric Biol Chem* **52**: 1993-8.
- 7) Shibata K, Ishikawa A, Kondo T (1997) Effects of dietary pyrazinamide on the metabolism of tryptophan to niacin in streptozotocin-diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**: 1679-83.
- 8) Leklem JE, Woodford J, Brown RR (1969) Comparative tryptophan metabolism in cats and rats: differences in adaptation of tryptophan oxygenase and in vivo metabolism of tryptophan, kynurenine and hydroxy kynurenine. *Comp Biochem Physiol* **31**: 95-109.
- 9) Leklem JE (1971) Quantitative aspects of tryptophan metabolism in humans and other species: a review. *Am J Clin Nutr* **24**: 659-72.
- 10) Rose DP, Braidman IP (1971) Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Am J Clin Nutr* **24**: 673-83.
- 11) Kitamura J, Fukuwatari T, Ohta M, Higashida M, Sasaki R, Shibata K (2004) Comparison of the metabolism of tryptophan to niacin among humans, rats, and mice. *Journal of Creative Approach for Health* **3**: 125-30.
- 12) Shibata K, Onodera M, Taniguchi M, Taniguchi N (1992) Metabolic fate of nicotinamide in LEC rats. *Biochem Int* **26**: 389-95.
- 13) Takahashi K, Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K (2009) Comparison of the nicotinamide catabolism among rat strains. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 274-9.
- 14) Breton J, Avanzi N, Magagnin S, Covini N, Magistrelli G, Cozzi L, Isacchi A (2000) Functional characterization and mechanism of action of recombinant human kynurenine 3-hydroxylase. *Eur J Biochem* **267**: 1092-9.
- 15) Ohkubo M, Sakiyama S, Fujimura S (1983) Purification and characterization of *N*¹-methylnicotinamide oxidase I and II separated from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **221**: 534-42.
- 16) Takeuchi F, Otsuka H, Shibata Y (1980) Purification and properties of kynureninase from rat liver. *J Biochem* **88**: 987-94.
- 17) Han Q, Robinson H, Li J (2008) Crystal structure of human kynurenine aminotransferase II. *J Biol Chem* **283**: 3567-73.
- 18) Talwar D, Davidson H, Cooney J, JO'Reilly DS (2000) Vitamin B₁ status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activity assay. *Clin Chem* **46**: 704-10.
- 19) Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* **127**: 838S-41S.
- 20) Kashiba M, Oka J, Ichikawa R, Kasahara E, Inayama T,

- Kageyama A, Kageyama H, Osaka T, Umegaki K, Matsumoto A, Ishikawa T, Nishikimi M, Inoue M, Inoue S (2002) Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* **33**: 1221-30.
- 21) Nakamura S, Li H, Adijiang A, Pischetsrieder M, Niwa T (2007) Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 2165-74.
- 22) Pullman ME, Colowick SP (1954) Preparation of 2- and 6-pyridones of *N*¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* **206**: 121-7.
- 23) Shibata K, Kawada T, Iwai K (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **424**: 23-8.
- 24) Shibata K, Onodera M (1991) Measurement of 3-hydroxyanthranilic acid and anthranilic acid in urine by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem* **55**: 143-8.
- 25) Shibata K (1988) Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, as endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **430**: 376-80.
- 26) Shibata K, Onodera M (1992) Simultaneous high-performance liquid chromatographic measurement of xanthurenic acid and 3-hydroxyanthranilic acid in urine. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 974.
- 27) 柴田克己 (1987) 高速液体クロマトグラフィーによる尿中 *N*¹-メチルニコチンアミドの超微量定量法. *ビタミン* **61**, 599-604.
- 28) Brown RR (1981) The tryptophan load test as an index of vitamin B-6 nutrition. In *Methods in Vitamin B-6 Nutrition: Analysis and Assessment*. (Keklem JE, Reynolds RD eds), p 321-40. Plenum Press, New York.
- 29) Sauberlich HE, Canham JE, Baker EM, Raica N, Herman YF (1972) Biochemical assessment of the nutritional status of vitamin B-6 in the human. *Am J Clin Nutr* **25**: 629-42.
- 30) Kotake Y, Tani S (1953) Studies on xanthurenic acid III. Xanthurenic acid in the urine of diabetic patient. *J Biochem* **40**: 295-9.
- 31) Rosen DA, Maengwyn-Davies GD, Beckee B, Stone HH, Freidenwald JS (1955) Xanthurenic acid studies in diabetics with and without retinopathy. *Proc Soc Exp Biol Med* **88**: 321-3.
- 32) Okamoto H, Hayaishi O (1970) Intramitochondrial localization of kynurenine aminotransferase. *J Biol Chem* **245**: 3603-5.
- 33) Schaeffer MC, Sampson DA, Skala JH, O'Connor DK, Gretz D (1991) Insensitivity of the tryptophan-load test to marginal vitamin B-6 intake in rats. *J Nutr* **121**: 1627-34.
- 34) Rahman MK, Nagatsu T, Sakurai T, Hori S, Abe M, Matsuda M (1982) Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Jpn J Pharmacol* **32**: 803-11.
- 35) Abraham PM, Kuruvilla KP, Mathew J, Malat A, Joy S, Paulose CS (2010) Alterations in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress; neuroprotective role of pyridoxine and Aegle marmelos. *J Biomed Sci* **17**: 78.
- 36) Nishizuka Y, Hayaishi O (1963) Enzymic synthesis of niacin nucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian liver. *J Biol Chem* **238**: 483-5.
- 37) Henderson LM, Weinstock LM, Ramasarma GB (1951) Effect of deficiency of b vitamins on the metabolism of tryptophan by the rat. *J Biol Chem* **234**: 19-29.
- 38) 柴田克己 (1990) リボフラビン欠乏ラットのニコチンアミド異化代謝. *ビタミン* **64**, 589-95.
- 39) 田口 寛, 武藤秀弥, 稲森国勝, 奥村克純, 島林幸英 (1998) ニコチンアミドメチルトランスフェラーゼの分布とブタ肝臓酵素の基本的性質. *ビタミン* **62**, 559-64.
- 40) Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K (1992) Specific inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase and mono (ADP-ribosyl) transferase. *J Biol Chem* **267**: 1569-75.
- 41) Avalos JL, Bever KM, Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD⁺ cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* **17**: 855-68.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **64**: 313–321 (2011)

Original Paper

**Tryptophan-nicotinamide Metabolism in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes:
Association of Dietary Vitamin Content**

Eri Imai,¹ Mitsue Sano,¹ Tsutomu Fukuwatari,¹ and Katsumi Shibata^{*,1}

(Received March 4, 2011; Accepted June 28, 2011)

Summary: The B-group of vitamins, including vitamins B₁, B₂, and B₆, are involved in the catabolic metabolism of tryptophan. We investigated the effects of dietary vitamin content (low, moderate and sufficient) on the catabolism of tryptophan in both diabetic and healthy rats. We found that tryptophan catabolism was not affected by differences in dietary vitamin content in both diabetic and healthy rats. However, the tryptophan-nicotinamide conversion ratio was one-third lower in diabetic rats than in healthy rats. In addition, nicotinamide catabolism differed between diabetic and healthy rats. *N*¹-methylnicotinamide, a nicotinamide catabolite, accumulated in diabetic rats, but not in normal rats, possibly contributing to the increase in free nicotinamide. It seems likely that this increase in the level of nicotinamide inhibited the activities of poly (ADP-ribose) synthetase and histone deacetylase. These results suggest that administration of nicotinamide might offer some effects, and warrants further investigation.

Key words: streptozotocin, diabetes, tryptophan, nicotinamide, vitamin

* Corresponding author (E-mail: kshibata@shc.usp.ac.jp)

¹ Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522–8533, Japan