

氏名(本籍)	藤 垣 英 嗣 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第 643 号		
学位授与日付	平成 18 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Nitration and Inactivation of IDO by Peroxynitrite		
審査委員	(主査) 教授	清 島 満	
	(副査) 教授	小 澤 修	教授 武 田 純

## 論文内容の要旨

### 【背景および目的】

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) はトリプトファンを代謝する酵素で、この酵素は種々炎症性サイトカインによって誘導され、Tリンパ球や樹状細胞などの細胞機能の調節と深く関与している。さらに、マクロファージや樹状細胞における炎症性サイトカインによるIDOの誘導と一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の誘導は共に抗微生物作用、抗細胞増殖作用を有し、両酵素が相互に密接に関係していることが示唆されている。本研究では、iNOSによって生産され、蛋白にニトロ化という翻訳後修飾を起こすことで知られているペルオキシナイトライトとIDOの関係を、ヒトマクロファージ中のサイトカインにより誘導されたIDOとリコンビナントIDO (rIDO) を用いて詳細に検討した。

### 【研究材料と方法】

細胞内におけるペルオキシナイトライトによるIDO活性の抑制とニトロ化の解析については、ヒト末梢血中単球細胞とヒトモノサイト系のセルラインであるTHP-1細胞を用いた。細胞を各種サイトカインで刺激後、ペルオキシナイトライトの発生剤であるSIN-1で処理したときの細胞内のIDOについて活性とウエスタンブロットによる蛋白量、あるいは生成物として培養上清中のL-kynurenine (L-Kyn) 濃度を測定した。また、細胞内のIDOのニトロ化の検出は、細胞から免疫沈降法でIDOを精製し、抗ニトロチロシン抗体を用いたウエスタンブロットで検討した。rIDOはヒトIDO cDNAを蛋白発現ベクターに組み込み大腸菌内で発現させアフィニティークラムにより精製した。ペルオキシナイトライトによるrIDOの活性抑制とニトロ化の影響は、rIDOをペルオキシナイトライトで処理し、IDO活性の測定と抗ニトロチロシン抗体を用いたウエスタンブロットを行い検討した。IDO中のニトロ化されたチロシンの同定は、ペルオキシナイトライトで処理したrIDOを、質量分析計を用いて解析し検討した。

### 【結果】

ヒト末梢血中マクロファージとTHP-1細胞をサイトカインで刺激すると、IDOの蛋白量と酵素活性は有意に増加するが、SIN-1を添加することによりIDOの蛋白量は変化しないにもかかわらずIDO活性は顕著に減少した。また、SIN-1で処理した細胞から免疫沈降法により精製したIDOにはニトロチロシンの存在が確認された。rIDOを用いた実験により、IDOをペルオキシナイトライトで処理することによりIDO活性が抑制され、ニトロ化が確認された。これらの結果から、IDOはペルオキシナイトライトによりニトロ化され、酵素活性が阻害されることが明らかになった。さらに、ペルオキシナイトライトで処理したrIDOを質量分析計で解析した結果、IDO中の15番目、345番目、353番目のチロシン残基がニトロ化されていることが明らかになった。これらのどのチロシン残基がペルオキシナイトライトによるIDOのニトロ化と酵素活性の抑制に最も重要な役割をしているのかを調べるため、それぞれのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したmutant rIDOを作成し、ペルオキシ

ナイトライトによるニトロ化とIDO活性について検討した。その結果、15番目のチロシン残基がペルオキシナイトライトにより最もニトロ化されやすく、IDO活性の抑制においても影響を受けやすいことが証明された。

#### 【考察】

本研究では、IDOがペルオキシナイトライトによりニトロ化され活性が抑制されることを詳細に明らかにした。IDOとiNOSはともに免疫系の関与する疾患で重要な役割をしていると考えられているが、iNOSによって生産される一酸化窒素はIDOを抑制することが知られている。一方でIDOがトリプトファンを代謝してできる代謝産物もiNOSを抑制することが知られている。両者は共に抗微生物作用や抗細胞増殖作用を持つにも関わらず、相互に密接に関係しており、これらの酵素活性は厳密にコントロールされていると考えられる。本研究では、さらに、iNOSによって生産されるペルオキシナイトライトがIDOをニトロ化しIDO活性を抑制するという新たな機構を解明した。このことにより、IDOとiNOSがさらに複雑なネガティブフィードバック機構を有し、抗微生物作用や抗細胞増殖作用におけるIDOとiNOSによる複雑な調節機構が存在していることが推察された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 藤垣英嗣、はトリプトファン代謝酵素であるIDOがペルオキシナイトライトによりニトロ化されて、活性が抑制されることを証明した。またIDOとiNOSはお互いに複雑なネガティブフィードバック機構を有し、抗微生物作用や抗細胞増殖作用に影響していることが示唆された。これらの知見は病態情報解析医学ならびに分子生物学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Nitration and Inactivation of IDO by Peroxynitrite  
The Journal of Immunology 176: 372-379 (2006).