

トリプトファン誘導体のIDO転写調節に及ぼす インドール環上の電荷密度の影響

川崎医科大学自然科学教室¹
立教大学極限生命情報研究センター²
立教大学理学部化学科³
順天堂大学医療看護学部化学教室⁴
川崎医科大学大学生化学教室⁵

岡本威明¹・山岸賢司²・麻生琴末³・山倉文幸⁴・常盤広明^{2,3}・刀祢重信⁵・日高和夫¹

(平成21年9月28日受理)

Effect of electron density on the indole ring of tryptophan derivatives on transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)

Takeaki OKAMOTO¹, Kenji YAMAGISHI², Kotomi ASO³, Fumiyuki YAMAKURA⁴,
Hiroaki TOKIWA^{2,3}, Shigenobu TONÉ⁵, Kazuo HIDAKA¹

¹*Department of Natural Sciences, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

²*Research Information Center for Extremophile, Rikkyo University, 3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku,
Tokyo, 171-8501, Japan*

³*Department of Chemistry, Faculty of Science, Rikkyo University, 3-34-1 Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku,
Tokyo, 171-8501, Japan*

⁴*Department of Chemistry, Juntendo University School of Health Care and Nursing,
1-1 Hiragakuendai, Inba, Chiba, 171-1606, Japan*

⁵*Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

(Received on September 28, 2009)

概 要

インドールアミン酸素添加酵素 (IDO) はトリプトファンキヌレニン代謝経路の律速酵素である。また, IDOの発現は生体内の免疫調節において重要な役割を果たしている。これまでに我々は, インターフェロン (IFN) 刺激に対して感受性が高く, 強力なIDOの発現誘導が認められるヒト類表皮細胞株 A431においてトリプトファンがIFN 誘導性IDO発現を転写レベルで促進することを報告してきた。本研究では, A431細胞を用いて9種のトリプトファン誘導体の構造とIFN 誘導性IDOmRNA発現との相関について検討した。L トリプトファンは, A431細胞におけるIFN 誘導性IDO発現を約2倍に増強し, 他の必須アミノ酸であるL メチオニンやL フェニルアラニンには増強効果は認められなかった。また, 6-ニトロ-L トリプトファン刺激では, トリプトファンよりも強い約3倍のIDO発現増強活性が認められたが, 5-ヒドロキシ-L トリプトファン刺激で

は, IDO発現増強活性は全く認められなかった。また, インドール環上の電荷密度とIDO発現増強活性との間には強い正の相関をもつことが明らかとなった。

キーワード: トリプトファン誘導体, インドールアミノ酸素添加酵素 (IDO), インドール環, 電荷密度

Abstract

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an initial and rate-limiting enzyme in the metabolism of tryptophan along the kynurenine pathway. This enzyme has been known to be involved in the immunoregulation. We previously reported that L-tryptophan stimulated IFN- γ -inducible IDO expression at the transcriptional level in human epidermoid carcinoma cell line A431. In the present study, we examined the correlation of nine kinds of structures of the tryptophan derivative along with IFN- γ -inducible IDO expression using A431 cells. L-Tryptophan increased IFN- γ -inducible IDO expression by 2-fold. In the presence of L-methionine and L-phenylalanine, other essential amino acids, however, no effect stimulating IDO expression was detected. 6-Nitro-L-tryptophan increased IFN- γ -inducible IDO expression by 3-fold, but in the presence of 5-hydroxy-L-tryptophan, no effect stimulating IDO expression was seen. Moreover, there was a strong positive correlation between the electron density on the indole ring and the effect on stimulating IDO expression.

Key words: tryptophan derivative, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), indole ring, electron density

1. はじめに

これまでに, IDOの発現は, 胎児 - 母体間免疫における免疫寛容の誘導や免疫抑制に関与し, 免疫調節機構において重要な因子であることが報告されている^{1),2)}。また, 免疫担当細胞である樹状細胞においてIDO発現はIFN γ 刺激によって誘導され, その発現を茶成分であるエピガロカテキンガレートやウコン中に存在するクルクミンが抑制することが明らかとなっている^{3),4)}。また, IFN γ に対して感受性が高く, 強力なIDOの発現誘導が認められる細胞株としてマウス直腸ガン細胞株CMT-93やヒト類表皮細胞株A431が報告されている^{5),6)}。近年, 我々は, Lトリプトファンやトリプトファン誘導体の一種でIDO酵素活性阻害剤として働く1メチルLトリプトファンならびにメチルチオヒダントインDLトリプトファン(MTHDL Trp)が, マウス直腸ガン細胞株CMT93におけるIFN γ 誘導性IDOの発現を転写レベルで制御することを報告してきた⁷⁾。また, ヒト

類表皮ガン細胞株A431に対してもLトリプトファンは, 転写レベルでIFN γ 誘導性IDOの発現を増強することを明らかにしてきた。よって, 本研究では, A431細胞を用いて9種のトリプトファン誘導体の構造とトリプトファン誘導体によるIFN γ 誘導性IDOmRNA発現調節機能との相関について検討したので報告する。

2. 材料

培養細胞として, ヒト類表皮ガン細胞株A431を用い, 培養培地はトリプトファン不含RPMI 1640培地(コージンバイオ, 埼玉)を用いた。トリプトファン誘導体として, 5ニトロDLトリプトファン, Lトリプトファン, 6メチルDLトリプトファン, インドール(和光純薬工業, 大阪), 1メチルLトリプトファン, 5ヒドロキシLトリプトファン, Lキヌレニン(SIGMA ALDRICH Co. 米国), 6ニトロインドール(東京化成工業, 東京), MTHDL Trp(Research Organics社, 米国)を用い

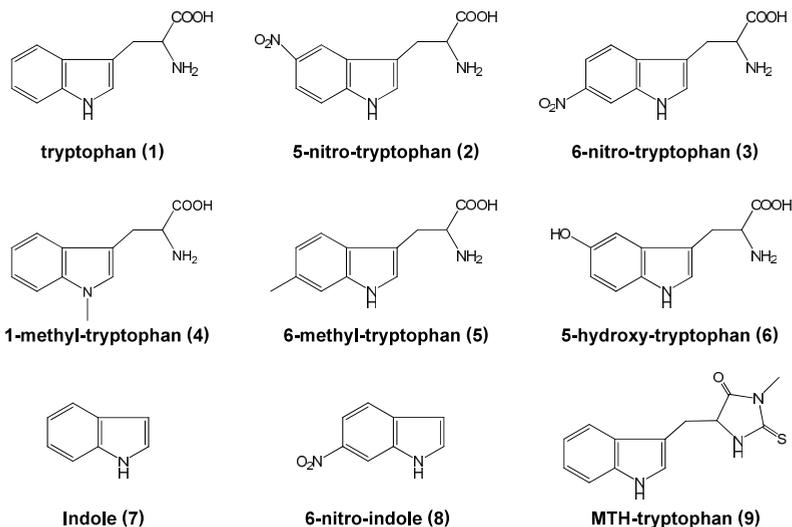


図1 各種トリプトファン誘導体の構造式

た。6-ニトロ-L-トリプトファンは順天堂大学にて合成した⁸⁾。必須アミノ酸として、L-メチオニンおよびL-フェニルアラニンを用いた(ナカライテスク, 京都)。また、トリプトファン誘導体の構造式を図1に示した。IFNは、遺伝子組み換え型インターフェロン製剤(イムノマックス[®])(シオノギ製薬)を用いた。

3. 実験方法

1) Real time reverse transcription-PCR

A431細胞にIFN (250IU/mL)ならびに各種トリプトファン誘導体をトリプトファン不含RPMI1640培地に添加し、24時間培養した。培養後、細胞よりtotal RNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen Germany)で抽出し、RNAからPrime Script RT reagent Kit(タカラバイオ株式会社)を用いて逆転写を行いcDNAを作成した。反応試薬としてSYBR Greenを使用し、Mx3000P (STRATAGENE)でPCRを行った。PCR条件は、95 5秒, 60 30秒とし、40サイクルとした。すべてのサンプルはduplicateとした。用いたprimer配列は、human IDO forward, 5'

TCGTGATGGAGACTGCAGTAAAGG, reverse, GTGGATTTGGTGAAACACTTGAAGG, human GAPDH forward, GCACCGTCAAGGCTGAGAAC, reverse, ATGGTGGTGAA GACGCCAGTを用いた。IDO遺伝子の定量は、GAPDHの量を標準化して計測した。

2) 静電ポテンシャルマップの作成

非経験的分子軌道法を用いたエネルギー勾配法に基づく理論計算によって、各種トリプトファン誘導体の最適化構造および電子状態を決定した。得られた電子状態に基づき全電子密度表面に対応する静電ポテンシャルを三次元的に表示した。計算レベルにはHF/3-21Gレベル, 計算プログラムにはGaussian03, 結果の可視化にはGauss Viewを利用した⁹⁾。

3) 統計解析

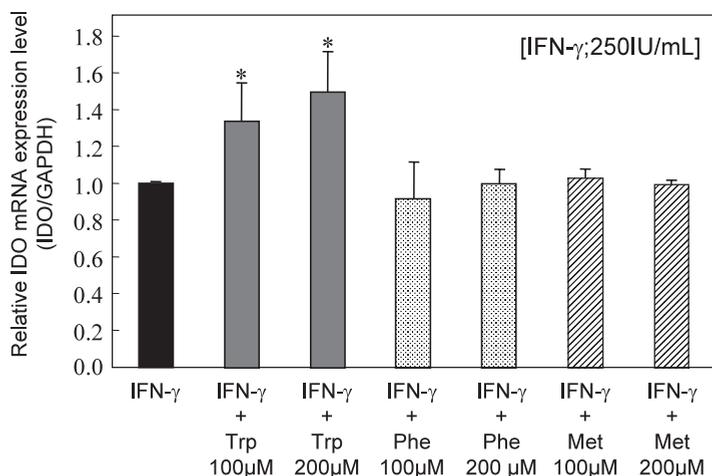
各群の値は、平均値 ± 標準偏差 (SD) で示し、各群間の有意差検定にはStudent's testを用い、 $p < 0.05$ (*) および $p < 0.01$ (**) を有意差ありとした。

4. 結果

A431細胞において、IFN 誘導性IDOm

RNA発現におよぼすL トリプトファン (Trp) の効果を検討したところ, Trpの培地への添加でIFN- γ 誘導性IDOの発現を約1.3~1.5倍に増強したが, 他の必須アミノ酸であるL フェニルアラニン (Phe), L メチオニン (Met) には, IFN- γ 誘導性IDOの発現増強効果 (以後, IDO発現増強活性と呼ぶ) は認められなかった (図2)。次に, トリプトファン代謝産物であり側鎖のインドール環が開裂したL キヌレニン (Kyn) ではIDO発現増強活性は認められなかったが, トリプトファン誘導体の一種である6-ニトロ-L-トリプトファン刺激下では濃度依存的にIDO発現増強活性の増大が認められ, 200 μ M刺激下では約3倍程度の強いIDO発現増強活性が確認された。これらの結果から, トリプトファンの側鎖であるインドール構造がIDO発現増強活性に関与するのではないかと推察された。また, インドール環におけるニトロ基の導入によりIDO発現増強活性が変化することが明らかとなった (図3)。そこで, 次に, 種々の官能基が導入された各種トリプトファン誘導体

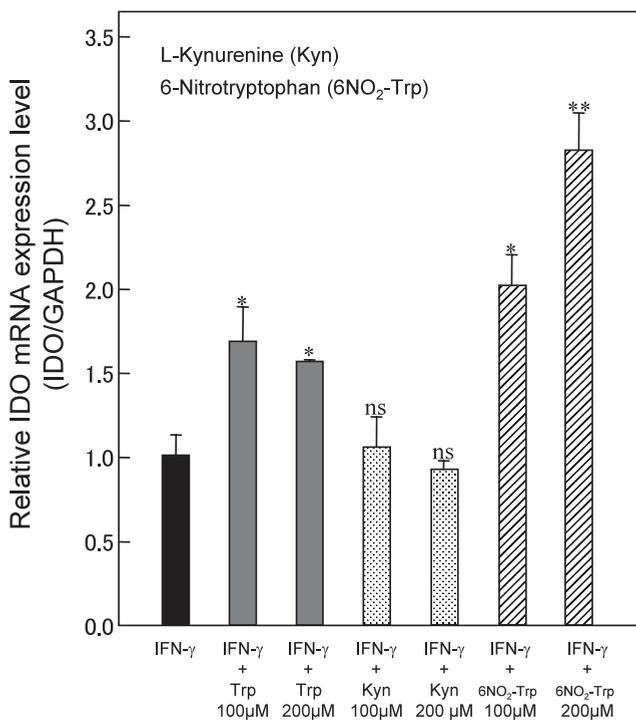
のIDO発現増強活性を検討した (表1)。各種トリプトファン誘導体の添加濃度によってそれぞれIDO発現増強活性が変化したが, その中でも200 μ M刺激下で全ての誘導体のIDO発現増強活性を比較したところ, トリプトファンによるIDO発現増強活性は, ニトロ基の導入によりさらに促進されるが, メチル基の導入によりその活性は減弱し, ヒドロキシ基の導入により完全に消失した。また, インドール環のみの刺激では, IDOの発現増強活性は, 1.4倍と微弱であり, さらにインドール環の6位にニトロ基を導入するとインドールによるIDO発現増強活性は消失した。したがって, ニトロ基導入による強いIDO発現増強効果はトリプトファンにおいては認められるが, 側鎖であるインドールのみでは認められなかった。したがって, ニトロ基導入によるIDO発現増強活性の制御には, アミノ酸構造の保持が必要であることが明らかとなった。一方, トリプトファンのインドール環以外のところにメチルチオヒダントイン骨格が導入された誘導体, MTH-DL-Trpでは, トリプト



Data are shown as the means \pm SD for three samples.

Data containing asterisk marks (*) are significantly different from the values in the IFN- γ group at $p < 0.05$.

図2 A431細胞におけるIFN- γ 誘導性IDOmRNA発現に及ぼすトリプトファン(Trp)フェニルアラニン(Phe),メチオニン(Met)の効果



Data are shown as the means \pm SD for three samples. Data containing asterisk marks (*,**) are significantly different from the values in the IFN- γ group, with values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

図3 A431におけるIFN- γ 誘導性IDOmRNA発現に及ぼすトリプトファン，トリプトファン代謝産物およびトリプトファン誘導体の効果

トリプトファン誘導体	conc.(μ M)	fold
6-nitro-tryptophan(3)	50	2.00
	100	2.20
	200	3.00
5-nitro-tryptophan(2)	100	2.10
	200	2.50
tryptophan(1)	100	2.00
	200	1.80
1-methyl-tryptophan(4)	100	1.40
	200	1.50
6-methyl-tryptophan(5)	100	1.30
	200	1.30
5-hydroxy-tryptophan(6)	100	0.65
	200	0.95

トリプトファン誘導体	conc.(μ M)	fold
Indole(7)	100	1.10
	200	1.40
	400	1.40
	600	1.40
6-nitro-indole(8)	50	1.25
	100	0.90
	200	1.10
MTH-tryptophan(9)	100	1.30
	200	1.30

表1 各種トリプトファン誘導体のIFN- γ 誘導性IDO発現調節機能

IFN- γ 単独刺激時におけるIDO発現増強活性を1.00とした。

ファンよりも弱い約1.3倍程度のIDOの発現増強活性が認められた。よって、インドール環以外の部位の修飾もIDO発現増強活性に影響を与えることが示唆された。

このように、インドール環への各種官能基の導入により、IDOの発現増強活性が変化することを見出した。そこで、各種トリプトファンのインドール環上の電荷状態の違いを明らかにするため、各種トリプトファン誘導体に対する静電ポテンシャルの三次元マップを作成した(図4)。その結果、5, 6位へのニトロ基の導入はインドール環上の電荷分布を増大させ、一方で1, 6位へのメチル基、ならびに5位へのヒドロキシ基の導入では、インドール環上の電荷分布を減少させることが明らかとなった。

次に、アミノ酸の構造を保持している6種のトリプトファン誘導体に着目し、インドール環上の電荷分布とIDO発現増強活性との関係につ

いて検討した。まず、各種トリプトファン誘導体のインドール環上の電荷を次のようにして算出した(表2)。トリプトファンに関しては、インドール環を構成する原子(N1, C2~9)に対して、それぞれの原子上電荷をMulliken populationとして算出し、それらの電荷の総和(sum)をインドール環上の電荷とした。各種官能基が導入されたトリプトファン誘導体に関しては、インドール環を構成する原子(N1, C2~9)の電荷と、インドール環に直結した原子(X)(ニトロ基であればNのみ, メチル基であればCのみ, ヒドロキシ基であればOのみ)の電荷の総和(sum)を、インドール環表面の電荷とした。その後、この各種トリプトファンのインドール環上の電荷(sum)とIDO発現増強活性との相関を解析したところ、相関係数 R^2 値=0.853(回帰式 $y = 1.31x + 3.75$)となり、強い正の相関を構築することに成功した。よっ

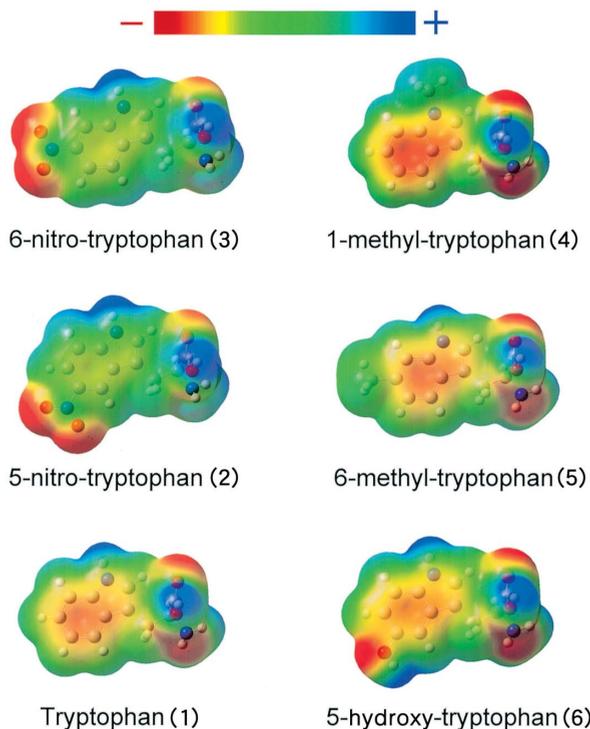


図4 各種トリプトファン誘導体の電荷分布

て、アミノ酸構造を保持したトリプトファン誘導体(1)~(6)のインドール環上の電荷はIDO発現増強活性と深く関連していることが明らかとなった(図5)。

5. 考察

本研究で用いたトリプトファン誘導体の中で最も強いIDO発現増強活性を有した6ニトロトリプトファンは、山倉らの研究により、

生体試料中に存在することが報告されており、生体内でIDOの発現を調節し、イムノモジュレーターとして働く可能性が考えられ本研究の生理的意義も大きい⁸⁾。特に、胎児-母体間免疫における免疫寛容機構に関しては胎盤上でのIDO発現が関与することから、産婦人科学(生殖医学)領域への臨床応用研究に繋がるのではないかと考えられる。また、各種トリプトファン

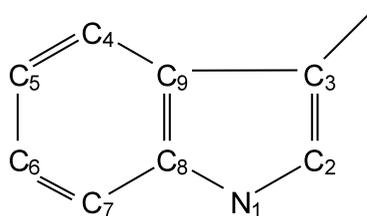


表2 インドール環を構成する各原子のMulliken電荷(HF/3-21G level)

Derivative	Relative IDO expression level	N1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	X	sum
tryptophan(1)	1.80	-1.004	0.144	-0.087	-0.228	-0.249	-0.236	-0.224	0.430	-0.129	-	-1.582
5-nitro-tryptophan(2)	2.50	-1.011	0.143	-0.065	-0.183	0.258	-0.193	-0.221	0.473	-0.150	0.176	-0.773
6-nitro-tryptophan(3)	3.00	-1.005	0.169	-0.094	-0.231	-0.203	0.266	-0.177	0.426	-0.103	0.179	-0.775
1-methyl-tryptophan(4)	1.50	-1.016	0.171	-0.097	-0.229	-0.249	-0.236	-0.228	0.461	-0.131	-0.322	-1.877
6-methyl-tryptophan(5)	1.30	-1.007	0.140	-0.085	-0.219	-0.239	-0.067	-0.221	0.442	-0.137	-0.584	-1.976
5-hydroxy-tryptophan(6)	0.95	-1.005	0.153	-0.092	-0.250	0.367	-0.280	-0.207	0.412	-0.115	-0.750	-1.768
Indole(7)	1.40	-0.986	0.119	-0.284	-0.222	-0.252	-0.234	-0.229	0.432	-0.140	-	-1.795
6-nitro-indole(8)	1.10	-0.987	0.140	-0.287	-0.226	-0.206	0.268	0.183	0.429	-0.114	0.181	-0.618
MTH-tryptophan(9)	1.30	-0.997	0.145	-0.095	-0.245	-0.245	-0.233	-0.222	0.433	-0.130	-	-1.589

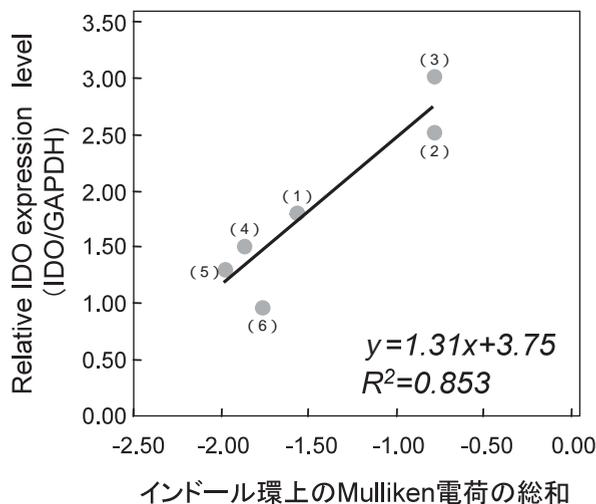


図5 インドール環上の電荷とIDO発現増強活性との相関

図中の番号は、化合物番号を示す。

ン誘導体のインドール環上の電荷とIDO発現増強活性とが強く相関性をもつことより, インドール環が活性発現には重要であると考えられ, それを認識する分子の存在が強く示唆される。これまでに, インドール系化合物であるインディルピン, インドール 3 カルビノール, インドロ [2 , 2 b]カルバゾールや, トリプトファンのphotoproductである 6 フォルミルインドロ [3 , 2 b]カルバゾール (FICZ) が, 細胞のサイトソル分画に存在する芳香族炭化水素レセプター (Ahレセプター; AhR) のリガンドとなることが報告されている^{10),11)}。AhRがトリプトファンのレセプターとなり得るかどうかは未だ解明されていないが, 各種置換基導入で生じるインドール環上の電荷密度の変化がAhRなどの認識分子との親和性・安定性に影響を与えていることが理論的に示唆された。

最後に, トリプトファンの誘導体と考えられている物質は大変多く, その化学構造もまた多種多様である。各種トリプトファン誘導体の生理活性の探索や機能解析を行う場合, 化学構造からその生理活性作用を予測することは困難である。本研究により構築したトリプトファン誘導体のインドール環上電荷密度とIDO発現増強活性との相関関係は, 実験的に測定されていないトリプトファン誘導体のIDO発現増強活性を, 理論化学計算から予想することを可能とした。例えば, アミノ基が導入された 6 アミノ トリプトファンでは, 同様の理論計算から算出すると, 原子上電荷の総和は, - 1.98となり, 構築した回帰式 $y = 1.31x + 3.75$ を用いると, そのIDO発現増強活性は理論的に1.16倍とトリプトファンと比べ弱いものになることが予想される。一方, 6 位にトリフルオロメチル基が導入されたトリプトファンでは, 理論的な原子上の電荷の総和は, - 0.29となり, 回帰式を用いて同様に予測するとIDO発現増強活性は, 3.37倍と非常に強いものになることが期待される。

今後, 生理活性物質の検索や機能解析において, 理論化学計算と実験化学を上手に組み合わせることにより, 効率の良い迅速な研究の遂行が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり終始御協力頂きました本学生化学教室の宮脇智恵氏, ならびにReal time PCRの機器の使用に関して御協力下さいました本学・生理学教室の皆様へ深く感謝致します。なお, 本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 20 4171) および文部科学省・科学研究費補助金 (課題番号19791177), および, 私立大学学術研究高度化推進事業 (立教大学: 極限環境生物の適応進化機構の解明とその応用) の援助により行われた。

文 献

- 1) Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL : Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281 : 1122-1124, 1998
- 2) Liu H, Liu L, Liu K, Bizargity P, Hancock WW, Visner GA : Reduced cytotoxic function of effector CD8⁺ T cells is responsible for indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent immune suppression. *J Immunol* 183 : 1022-1031, 2009
- 3) Jeong YI, Jung ID, Lee JS, Lee CM, Lee JD, Park YM : (-)-Epigallocatechin gallate suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells : evidences for the COX-2 and STAT1 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun* 354 : 1004-1009, 2007
- 4) Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, Lee CM, Chun SH, Yoon MS, Kim GT, Ryu SW, Kim JS, Shin YK, Lee WS, Shin HK, Lee JD, Park YM : Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein

- kinase Cdelta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J Biol Chem* 284 : 3700-3708, 2009
- 5) Habara-Ohkubo A, Takikawa O, Yoshida R : Cloning and expression of a cDNA encoding mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Gene* 105 : 221-227, 1991
- 6) Leung BS, Stout LE, Shaskan EG, Thompson RM : Differential induction of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) by interferon- in human gynecologic cancer cells. *Cancer Lett* 66 : 77-81, 1992
- 7) Okamoto T, Toné S, Kanouchi H, Miyawaki C, Ono S, Minatogawa Y : Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue. *Cytotechnology* 54 : 107-113, 2007
- 8) Ikeda K, Yukihiro Hiraoka B, Iwai H, Matsumoto T, Mineki R, Taka H, Takamori K, Ogawa H, Yamakura F : Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by Western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC12 cells. *Nitric Oxide* 16 : 18-28, 2007
- 9) Frisch MJ, *et al.* : Gaussian 03, Gaussian, Inc. : Wallingford, CT, 2004
- 10) Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Cenijn PH, Brouwer A, Denison MS : Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* 37 : 11508-11515, 1998
- 11) Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, Rannug A, Rannug U : The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P450 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 284 : 2690 - 2696, 2009