

# マウス胚 / 胚体外組織におけるインドールアミン酸素添加酵素(IDO)と肝型トリプトファン分解酵素(TDO)の共発現

田中 幸子

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) と Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) は必須アミノ酸のひとつであるトリプトファン (Trp) を酸素化する反応を触媒し, N-ホルミルキヌレニンを生産する Trp 分解酵素である。

1998年に David Munn らは IDO が正常妊娠時に胎盤で局所的に Trp を枯渇させ, その結果母体側の免疫拒絶を担う T 細胞が機能不全に陥るといった報告を行った。しかし IDO の役割は十分に解明されていないことから, マウス胚/胚体外組織を用いて IDO 発現 (Trp 分解酵素活性, IDO 蛋白, IDO mRNA) の時間的推移を解析した。

Trp 分解酵素活性は, 受精後5.5日目には非常に低いものの, 胚 / 胚体外組織で検出でき, その後急激に増加し24時間後の6.5日目にはピークに達し, 次いで次第に減少した。IDO 蛋白は妊娠初期には認めず, 妊娠8.5日目から12.5日目に発現を認めた。IDO mRNA の発現は8.5日目以前は非常に低いものであったが, 9.5日目にピークを示した。Trp 分解酵素活性の方が, IDO の蛋白質および mRNA の発現よりも早い時期に上昇するという結果が得られた。そこで妊娠初期に高発現している Trp 分解酵素が如何なるものかを解明するために, もう1つの Trp 分解酵素である TDO に着目し検索を行ったところ, TDO は mRNA また蛋白レベルの双方で, 妊娠初期から胚 / 胚体外組織で強力に発現していた。それに加えて, 妊娠初期の Trp 分解酵素活性は IDO の特異的な阻害剤である1-methyl-Trp で抑制されなかった。以上のことから, 妊娠初期に発現している Trp 分解酵素活性は IDO ではなく TDO であることが示唆された。

これまで TDO は成体の肝臓でのみ特異的に発現していると報告されているが, TDO の発現が肝臓以外の組織中に初めて確認された。妊娠初期の組織中で Trp を枯渇させるのに, IDO よりもむしろ TDO が強力に働いていることを示唆する結果を得た。

妊娠初期には TDO が Trp 濃度を強力に低下させ卵の着床を導くが, 中期に至って胎児への大量の Trp 供給が必要とされるようになると, Trp を枯渇させずに IDO が胎盤局所での免疫抑制を行う, という役割分担を TDO と IDO で行っているのではないかと考察した。

(平成13年11月19日受理)

## Tryptophan Degradation by Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) in Murine Concepti

Sachiko TANAKA

Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO) are the tryptophan (Trp) degradation enzymes that catalyze the oxygenation of an essential amino acid, Trp, into N-formylkynurenine.

In 1998, David Munn et al reported that IDO initiated Trp degradation in the placenta and that it might play an important role in the prevention of allogeneic fetus rejection by maternal T cells.

However, the role of IDO has not been fully elucidated. The expression patterns of Trp degradation activity, IDO protein and IDO mRNA were examined in embryonic and extra-embryonic mouse tissue.

Although Trp degradation activity was very low at 5.5 days post-coitus (dpc), it dramatically increased to the peak level at 6.5 dpc, and then gradually decreased to the zero level by 18.5 dpc.

IDO protein, however, was detected between 8.5 and 12.5 dpc. IDO mRNA was also very low before 8.5 dpc, reaching its highest peak at 9.5 dpc. These results suggest that IDO does not contribute to the early phase of Trp degradation in gestation. IDO mRNA and protein were not expressed during such early gestation. On the other hand, TDO mRNA and protein were strongly expressed during the early gestation period. The Trp degradation activity of the early gestation period was not inhibited by a specific IDO inhibitor, 1-methyl-Trp, but that at 12.5 dpc was strongly inhibited. These findings suggest that the Trp degradation activity of the early period is not caused by IDO, but by TDO. TDO has been reported to be localized exclusively in the adult liver. This is the first report in which extra-hepatic expression of TDO has been clearly demonstrated. These results suggest that TDO, rather than IDO, functions in Trp deprivation in early concepti to maintain nidation, and that shortly induced IDO functions in local Trp deprivation to prevent allogeneic fetus rejection, while allowing supplement of Trp to the fetus in middle phase conception. (Accepted on November 19, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 28(1): 1-9, 2002

**Key Words** ① Gene expression ② Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO)  
③ Tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO) ④ Concepti  
⑤ Placenta

## はじめに

「胎児は母親にとって非自己であるのになぜ拒絶されないのか？」この免疫寛容の謎に対して1953年に Medawar が3つの現象<sup>1)</sup> (i: 母親と胎児は解剖学的に分離されている. ii: 胎児の抗原性は未熟なものである. iii: 妊娠中の母親は免疫抑制の状態にある.) を説明した. その後は母親の免疫抑制の観点から研究が進められてきたが, 1987年に Wegmann が母体の T 細胞が活性化された結果産生されるサイトカインが, 妊娠維持に働くとする immunotrophism model<sup>2)</sup> を提唱した. 1990年代に入ると, 斎藤

らは妊娠子宮内膜中の母体リンパ球が活性化状態にあり, 多くのサイトカインを産生することを見出し, 妊娠現象は母体免疫系の活性化の上に成り立っていることを明らかにし<sup>3),4)</sup>, 現在に至っている.

そのような中で, 1998年に David Munn らは Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) が妊娠時に胎盤で働くことにより, Tryptophan (Trp) を枯渇させ母体 T 細胞を機能不全に陥らせることを報告した<sup>5)</sup>. 彼らは妊娠マウスに IDO に特異的な阻害剤である 1-methyl-tryptophan (1 MT) を投与すると, allogeneic な胎児のみが高率に流産することを報告した. また彼らは *in vitro* で, macrophage colony-stimulating factor によつ

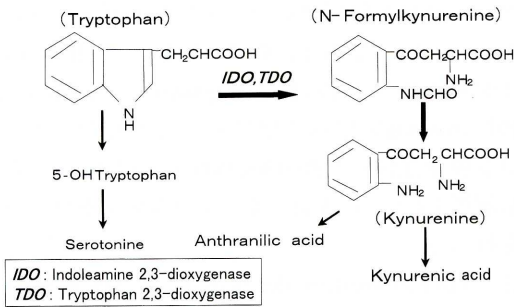


Fig. 1. Tryptophan metabolism

て刺激された単球に IDO が発現し, Trp を分解することによって T 細胞の増殖を抑制することも報告した<sup>6)</sup>.

妊娠と Trp 代謝との関係は古くから取りざたされており, Brown らによって妊婦尿中に Trp 代謝産物の排泄が増加すると報告されている<sup>7)</sup>. また, 臍帯動静脈血中の Trp やキヌレニン濃度が母体血清よりも高値であるとの報告もある<sup>8),9)</sup>.

IDO は Trp のピロール環を酸素化開裂し, ホルミルキヌレニン (Formyl-Kyn) を産生する反応を触媒する Trp 代謝の初発酵素で, 分子量 45 kDa のヘム蛋白である<sup>10),11)</sup> (Fig. 1). 既に我々のグループによってヒトでの遺伝子のクローニングも行われており<sup>12)~14)</sup> 哺乳類の胎盤, 肺, 小腸, 精巣上体などに発現が確認されている<sup>15),16)</sup>. また, 感染細胞や腫瘍細胞内でインターフェロン  $\gamma$  によって約 100 倍に誘導されることから, Trp を分解, 枯渇させることで感染細胞や腫瘍細胞の増殖抑制に関与していると考えられている<sup>17),18)</sup>. しかし, 妊娠維持機構に関しての IDO の生理的意義は明らかにはされていない.

Tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO) は IDO 同様, Trp 代謝の初発酵素で Trp のピロール環を酸素化開裂し Formyl-Kyn を産生する反応を触媒するヘム蛋白であるが (Fig. 1), 分子量は 120,000~167,000 で四量体を形成し, L-Trp を特異的に代謝する<sup>19)</sup>. この酵素の試験管内での活性化には IDO とは異なりメチレンブルーを必要としない. また TDO は成体の肝臓にのみ

存在し糖質コルチコイドにより誘導され<sup>20),21)</sup>, L-Trp 投与によりラット肝臓においてそのレベルが上昇するといわれている<sup>22)</sup>.

本研究では, Trp 代謝の急激な昂進と, 免疫寛容との関連を明らかにする目的で, マウス妊娠組織を用いて IDO と TDO の発現パターンの時間的推移を中心に検討した. その結果から IDO と TDO の妊娠時の Trp 代謝におよぼす合目的性について考察した.

## 実験方法

### 1) 組織の採取

8 週令の ICR マウス (チャールスリバー, 静岡) を交配させ, 妊娠日数は陰栓確認日の正午を 0.5 日 (0.5 dpc) とした. 頸椎脱臼を行った直後に開腹し, 妊娠子宮を切開し, 以下の組織を採取した. 5.5~9.5 dpc は胎盤のみの分離が不可能であったため, 胚と胚体外組織を丸ごと (以下 concepti) 採取し, 10.5~18.5 dpc は胎盤のみを採取し, これらを以下の実験に用いた.

### 2) HPLC による Trp 分解酵素活性測定

採取した組織を 5 倍量の 0.1% Triton X-100 添加 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH 6.5) で 4℃ 下でホモジネートを行った. これを 15,000 rpm, 10 分間遠心した上清を酵素溶液として使用した. 反応溶液 (50  $\mu$ l) は, 100 mM KPB (pH 6.5), 40 mM アスコルビン酸, 20  $\mu$ M メチレンブルー, 200  $\mu$ g/ml カタラーゼ, 800 mM L-Trp とし, この反応溶液に同量の酵素溶液を添加して酵素反応開始とした. 酵素反応は 37℃, 60 分間行い, 30% (w/v) トリクロロ酢酸 20  $\mu$ l を加えて反応を停止した. その後 100℃, 3 分間の加熱処理を加え Formyl-kyn を Kyn に変換し, 15,000 rpm, 5 分間遠心した. その上清の Kyn 量を HPLC (Waters 600 E) を用いて測定し, 組織重量当たりの酵素活性を求めた<sup>11)</sup>.

### 2) Western blot analysis

0.1% SDS 添加 10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルで, Trp 分解酵素活性測定で調整した



胚/胚体外組織上清 (1 レーンあたり 30  $\mu$ g の蛋白を使用) を, 電気泳動した. これをニトロセルロース膜へトランスファーした後, メンブランをブロッキング液 (0.5% スキムミルク) に浸して 1 時間室温で振盪させ, 抗マウス IDO ポリクローナル抗体 (マウス IDO 蛋白のアミノ酸 1-18, 156-175, 359-377 に相当する 3 つのペプチドで免疫されたウサギの混合血清, 北海道大学, 滝川修博士より供与された) を 0.1% PBS Tween (PBST) で 2000 倍希釈してメンブランを浸し, 16 時間, 4  $^{\circ}$ C で振盪させた. このメンブランを PBST で洗浄し, 1 次抗体反応と同様に horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Bucks., U.K.) で 2 次抗体反応を 2 時間室温で行い, PBST で洗浄後, ECL Western blotting detection reagent (Amersham) で発色反応を行った.

### 3) Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

totalRNA は RNA-isolation kit (Trizol reagent, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) を用いて上記組織から採取した. そのうち 5  $\mu$ g を使用し transcription kit (Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beades, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.) を用いて cDNA を作製した. プライマー (5' primer, 5'-AGGATCCTTG AAGACCACCA-3'; 3' primer, 5'-GAAGGAGC AGAGAGATAACC-3', Gen Bank, accession no. U 69109) を作成し PCR を行った. 反応は 95  $^{\circ}$ C 3 分の後, 95  $^{\circ}$ C 30 秒, 62.8  $^{\circ}$ C 30 秒, 72  $^{\circ}$ C 60 秒を 35 サイクル, 最後に 72  $^{\circ}$ C 5 分を行った. また, コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) を用いた.

### 4) Northern blot analysis

5  $\mu$ g の totalRNA を 60  $^{\circ}$ C で加熱処理し, ホルマリンゲル (1.2% アガロース) で電気泳動を行った. 泳動後に 18 S と 28 S rRNA のバンドを確認し, ナイロン膜 (Hybond N, Amersham), 濾紙, ペーパータオルの順にこれらをゲル上に置き, 約 20 時間かけてトランスファーした. その後オープンにてナイロン膜を 3 時間ベーキン

グし, 43  $^{\circ}$ C 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った. これに  $^{32}$ P ラベルした IDO の cDNA プロブ (EcoR I fragment)<sup>12)</sup> を添加し, 42  $^{\circ}$ C over night でハイブリダイズさせた. ナイロン膜を洗浄した後 BAS2000 (Fuji Film) で定量解析を行い, 引き続きオートラジオグラフィーを行った.

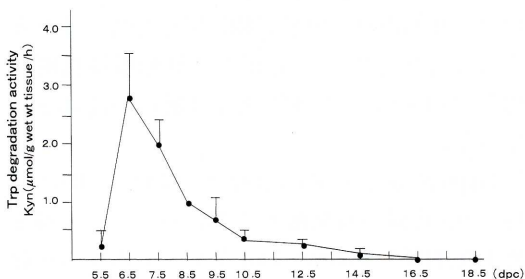
### 5) TDO の Western blot analysis, RT-PCR, Northern blot analysis

実験手順は全て IDO に準ずるが, Western blot では 1 次抗体には抗マウス TDO ポリクローナル抗体 (マウス TDO 蛋白のアミノ酸 391-406 に相当するペプチドで免疫されたウサギ血清, 当教室で作成) を使用した. RT-PCR はプライマー (5' primer, 5'-TGGGAAGCTAGATTC TGTTTCG-3'; 3' primer, 5'-TCGCTGCTGAAGT AAGAGCT-3', Gen Bank, accession no. U 24493) を作成し反応は 95  $^{\circ}$ C 3 分の後, 95  $^{\circ}$ C 30 秒, 58  $^{\circ}$ C 30 秒, 72  $^{\circ}$ C 60 秒を 35 サイクル, 最後に 72  $^{\circ}$ C 5 分を行った. PCR 産物のシーケンスを確認後, Northern blot のプロブとして使用した.

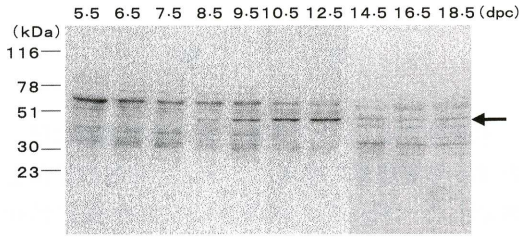
なお, 本研究における実験は, 川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No 99-080), 川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された.

## 結 果

### 1) Trp 分解酵素活性



**Fig. 2.** Trp degradation activity during murine gestation  
Trp degradation activities in concepti (5.5-9.5 dpc) or placenta (10.5-18.5 dpc) were determined. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. From triplicate experiments. Assay methods were described in the text.  
Trp; L-Tryptophan, dpc; days post-coitus



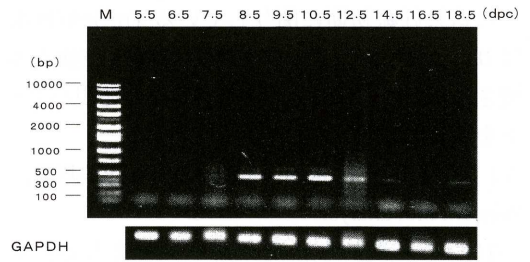
**Fig. 3.** Western blot analysis of IDO protein during the gestation period. Arrow indicates IDO bands of 45 kDa. Samples were subjected to SDS/PAGE (10% gels), transferred onto nitrocellulose membrane and stained by anti-IDO antibody. Size markers are shown on the left. Methods were described in the text. IDO; indoleamine 2,3-dioxygenase, dpc; days post-coitus.

妊娠期間 (5.5~18.5 dpc) を通しての Trp 分解酵素活性の変化を **Figure 2** に示す。Trp 分解酵素活性は 5.5 dpc では非常に低かったが、その 1 日後 (6.5 dpc) に活性は急激に上昇し、ピークに達し、その後次第に低下した。16.5 dpc 以降は胎盤での活性はほとんど検出出来なくなった。また、10.5~18.5 dpc の胎児でも活性は認められなかった (data not shown)。

## 2) Western blot analysis と RT-PCR

妊娠期間中の IDO 蛋白の発現様式を調べる目的で、抗 IDO 抗体を用いて Western blot を行った結果を **Figure 3** に示す。目的とする 45 kDa のバンドは 8.5~12.5 dpc に認められ、妊娠初期には認められなかったことから IDO 蛋白は妊娠初期には発現していないものと考えられた。totalRNA を concepti と胎盤から採取し、半定量的に RT-PCR による IDO 遺伝子の発現パターンの解析を行った結果を **Figure 4** に示す。IDO の mRNA は 7.5 dpc にかすかなバンド (約 500 bp) として描出されるものの、それよりも初期にはバンドは認められなかった。8.5~12.5 dpc には明瞭なバンドが観察された。

この蛋白と mRNA の発現様式から、7.5~12.5 dpc に IDO が発現していることが示唆された。Western blot で 5.5~10.5 dpc に認められている 60 kDa のバンドは IDO mRNA の発現時期とは異なることから、IDO 蛋白とは無関係であると思われた。しかも、Trp 分解酵素活性の最も高かった時期とも時間的なズレが生じていた。



**Fig. 4.** RT-PCR analysis of IDO mRNA during the gestation period. RT-PCR amplification was carried out to the mRNA samples from concepti or placenta at the gestation times indicated. The 500 bp product indicates the IDO mRNA fragment. M, molecular-size marker. Methods were described in the text.

RT-PCR; reverse transcriptase PCR, IDO; indoleamine 2,3-dioxygenase, dpc; day post-coitus, GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase.

## 3) Northern blot analysis

RT-PCR で観察された IDO 遺伝子の発現パターンを確認するために、Northern blot 解析を行った (**Fig. 5A**)。RT-PCR で確認されたように 7.5 dpc にかすかなシグナルが認められ、それが 8.5 dpc に発現が徐々に強くなり 10.5 dpc 以降は発現が弱くなった。定量解析を行った結果を **Figure 5B** に示す。IDO の発現は 8.5 dpc よりも早い時期には非常に低く、その後上昇し 9.5 dpc にピークとなった。

## 4) 1-methyl-DL-tryptophan (1 MT) による Trp 分解酵素活性の阻害効果

IDO の特異的な阻害剤である 1 MT (Aldrich) (3.75 mM) を反応液に加えたもの (1 MT+) と加えないもの (1 MT-) の両者間で阻害率を比較した結果を **Table 1** に示す。ポジティブコントロールとして、IDO はヒト Recombinant IDO (Rec. IDO)、TDO は 8 週令マウスの肝臓抽出液を用いた。またマウスのステージは concepti では 6.5 dpc, 9.5 dpc, 胎盤では 12.5 dpc を選択した。Rec. IDO は 1 MT によって 83% 阻害されたが、マウス肝臓 TDO の阻害率は 6% と、ほとんど阻害されなかった。concepti では 6.5 dpc, 9.5 dpc それぞれ 2%, 4% の阻害率で 1 MT による阻害は認められなかったが、12.5 dpc の胎盤では 45% であり、concepti と胎盤との阻害率に有意差 ( $P < 0.001$ ) を認めた。

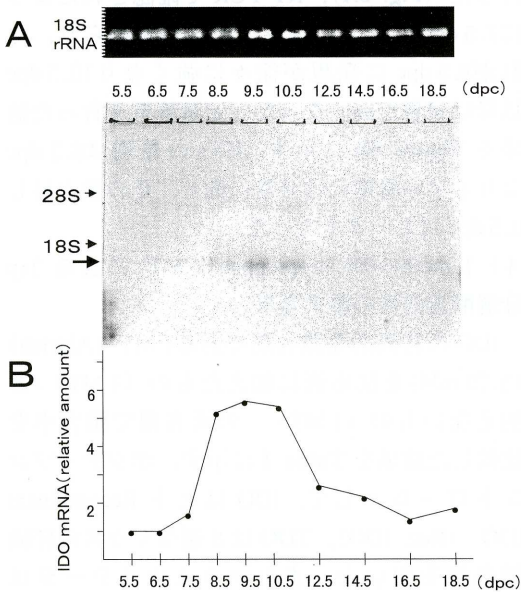


その結果妊娠初期に関与している Trp 分解酵素は IDO ではなく、TDO である可能性が強く示唆されたため、IDO と同様に TDO の発現パターンを解析した。

#### 5) TDO の Northern blot analysis, RT-PCR, Western blot analysis

TDO の時間的な発現パターンをまとめたものを **Figure 6** に示す。A は Northern blot analysis で、TDO の mRNA は 5.5 dpc から強力に発現していることが確認された。B の RT-PCR も同様の結果であったが、C の Western blot では TDO 蛋白はそれよりも 1 日遅い 6.5 dpc から発現していることが確認された。

これらの発現パターンは、妊娠初期での強い Trp 分解酵素活性とよく一致していた。



**Fig. 5.** Northern blot analysis of IDO expression during the gestation period

(A) Expression pattern of IDO and 18 S rRNA. IDO mRNA level was estimated by Northern blot analysis.

18 S rRNA stained with ethidium bromide is shown at the top of the panel. Large arrow indicates IDO transcript on Northern blot analysis. (B) Ratios of the radio activity of IDO transcripts to 18 S rRNAs. Methods were described in the text.

IDO ; indoleamine 2,3-dioxygenase, dpc ; days post-coitus, rRNA ; ribosomal RNA.

## 考 察

本研究では、マウス妊娠子宮の発育過程に伴った Trp 分解酵素の発現パターンの時間的推移を確認した (**Fig. 7**)。結果として IDO 蛋白は妊娠中期の 9.5~12.5 dpc に発現していたが、その発現は妊娠末期までは持続しなかった。IDO の発現はこれまでヒトの報告では、胎盤の syncytiotrophoblast (合胞体栄養膜細胞) で発現していることが報告されている<sup>23)</sup>ことから、胎盤の形成と関係していると言われてきた。もし、IDO が Trp を消費することで、胎児に対して攻撃的な働きをすると考えられる T 細胞の増殖を抑制しているとするれば、IDO の持続的な発現は免疫抑制を誘導するのに必須であると考えられる。一方で、この時期までにいったん免疫寛容が確立してしまえば、Trp の消費とは無関係に出生時まで妊娠の継続が可能となることも予測される。

しかし妊娠の成立を考えた場合、もっとも重要な時期は着床前後の妊娠初期と考えられ、この時期に IDO が発現していないという事実を考慮すると、妊娠が成立する段階では Trp 代謝と妊娠維持機構との間には、一見関わりが無い

**Table 1.** Effect of 1-methyl-tryptophan on Trp-degradation activity

	1MT(-)	1MT(+)	
	activity ( $\mu$ mol/g wt/h)	activity ( $\mu$ mol/g wt/h)	inhibition (%)
6.5dpc	2.23 $\pm$ 0.68	2.20 $\pm$ 0.67	2
9.5dpc	0.64 $\pm$ 0.27	0.64 $\pm$ 0.24	4
12.5dpc	0.50 $\pm$ 0.46	0.27 $\pm$ 0.24	43
Liver	0.69 $\pm$ 0.25	0.66 $\pm$ 0.24	6
Recombinant IDO	3.08	0.54	83

Trp-degradation activities in concepti 6.5, 9.5 and 12.5 dpc, in adult liver extract and of recombinant IDO in the presence (1 MT+, 3.75 mM) or absence (1 MT-) of 1 MT were determined as the amount of produced kyn. Inhibition was calculated as [(activity of 1 MT- minus activity of 1 MT+) / activity of 1 MT-]  $\times$  100%.

Means  $\pm$  S. D. of triplicate measurements are shown. Assay methods were described in the text.

1 MT ; 1-methyl-tryptophan, Trp ; L-Tryptophan, IDO ; indoleamine 2,3-dioxygenase

5.5 6.5 7.5 8.5 9.5 10.5 12.5 14.5 16.5 18.5 (dpc)

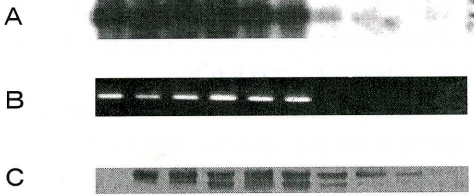


Fig. 6. TDO expression during the gestation period

- (A) Northern blot analysis of TDO  
(B) RT-PCR analysis of TDO  
(C) Western blot analysis of TDO

Methods were described in the text.

TDO; tryptophan 2, 3-dioxygenase, dpc; days post-coitus, RT-PCR; reverse transcriptase-PCR

ようにも思える。しかし、本研究では Trp 分解酵素活性が6.5 dpc という妊娠初期にもっとも高いという予期せぬ結果が得られ、さらにそれはもう一つの Trp 分解酵素である TDO であることが判明した。

本研究ではその TDO の mRNA の発現が、5.5 ~10.5 dpc の concepti で確認された。それに加え、その時期の Trp 分解酵素活性は、IDO の特異的な阻害剤である 1 MT では阻害されなかった。以上のことから、妊娠初期に認められた酵素活性の大半を占めているのは、IDO ではなく、むしろ TDO によるものであることが示唆された。IDO の蛋白や mRNA が初期には発現していないことも証拠となる。Munn らが言うように、Trp の枯渇が妊娠時の母親と胎児間の組織免疫を抑制するのに重要な役割を果たしているのであれば、妊娠初期は TDO によって、そして妊娠中期は IDO によってその免疫抑制がコントロールされていると考えるのが妥当と考える。そして妊娠中期以降の胎児への Trp 供給に支障を来さないため、IDO が弱く発現され、胎盤局所での免疫抑制に携わっているのであらうか。

これまでに、TDO は成体の肝臓でのみ発現しており、他の臓器のみならず、胎児の肝細胞でも発現は確認されていない<sup>24)</sup>。また、本研究での結果、TDO が高発現している6.5 dpc には少なくとも胎児の肝臓も完成されていないし、

5.5 6.5 7.5 8.5 9.5 10.5 12.5 14.5 16.5 18.5 (dpc)

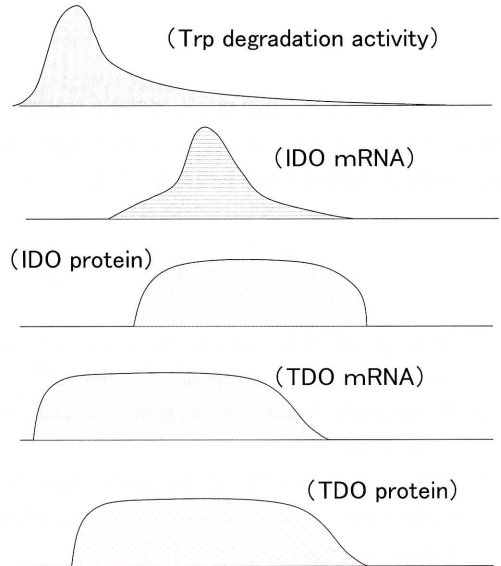


Fig. 7. Changes of Trp degradation enzymes in the concepti during murine gestation

Trp; L-Tryptophan, IDO; indoleamine 2, 3-dioxygenase, TDO; tryptophan 2, 3-dioxygenase, dpc; days post-coitus

10.5~18.5 dpc の胎児にも Trp 分解酵素活性は認められなかった。それゆえに、肝臓以外の臓器で TDO が発現していることが本研究で初めて明らかにされたことになる。

現時点で報告されている Trp 分解酵素は IDO と TDO の 2 者であるが、当然のことながら未知の Trp 分解酵素が存在している可能性も否定はできない。しかし、IDO に加えて妊娠期間中の局所的な Trp 代謝に、TDO の活性が関与していることは免疫寛容を含めた母児間の相互作用を理解する上で重要なことと思われる。

肝臓 TDO が糖質コルチコイドで誘導されることが知られて40年ほど経ている<sup>21)</sup>。しかし、その誘導メカニズムも生理的意義も解明されていない。胚組織の TDO および IDO がいかなる機作で誘導されるのか、またそのことによっていかなる生理反応がもたらされるのか、この 2 つの蛋白が異なる時期に発現していることによるような意味があるのか、またそれらの発現の空間的分布などの詳細を明らかにすることが今

後必要である。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導と御校閲を賜りました川崎医科大学学生化学教室 湊川洋介教授、刀禰重信助教、同産婦人科学教室河野一郎教授に深く

感謝致します。

なお本研究の一部は平成11年度文部省科学研究費 (No. 11877288), および日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助 (大学院重点特別経費・学生分, 1999年度) の補助によって行われた。

本論文の要旨は、第73回日本生化学学会 (2000年)、第14回国際発生生物学会 (2001年) で発表した。

## 文 献

- 1) Medawar PB : Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. Symp Soc Exp Biol 7 : 320-338, 1953
- 2) Wegmann TG : Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. Immunol Letter 17 : 29-34, 1998
- 3) Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, Ichijo M, Kurahayashi M, Sugamura K : Accumulation of CD 16- CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. Int Immunol 3 : 743-750, 1991
- 4) Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, Ichijo M : Cytokine production by CD16- CD56+ bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. Int Immunol 32 : 105-110, 1993
- 5) 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 : 1191-1193, 1998
- 6) Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL : Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med 189 : 1363-1372, 1999
- 7) Brown RR, Thornton MJ, Price JM : The effect of vitamin supplementation on the urinary excretion of tryptophan metabolites by pregnant women. J Clin Invest 40 : 617-627, 1961
- 8) Kamimura S, Eguchi K, Sekiba K : Tryptophan and its metabolite concentrations in human placenta and breast milk during perinatal period. Acta Med Okayama 45 : 101-106, 1991
- 9) Kazda H, Taylor N, Healy D, Walker D : Maternal, Umbilical, and amniotic fluid concentrations of tryptophan and kynurenine after labor or cesarean section. Pedia res 44 : 368-373, 1998
- 10) Shimizu T, Nomiya S, Hirata F, Hayashi O : Indoleamine 2, 3-dioxygenase. J Biol Chem 253 : 4700-4706, 1978
- 11) Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayashi O : Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2, 3-dioxygenase. J Biol Chem 261 : 3648-3653, 1986
- 12) Tone S, Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Kadoya A, Yoshida R, Kido R : Primary structure of human indoleamine 2, 3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. Nucleic Acids Res 18 : 367, 1990
- 13) Kadoya A, Tone S, Maeda H, Minatogawa Y, Kido R : Gene structure of human indoleamine 2, 3-dioxygenase. Biochem Biophys res commun 189 : 530-536, 1992
- 14) Tone S, Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Kadoya A, Minatogawa Y, Kido R : Molecular cloning and characterization of human indoleamine 2, 3-dioxygenase cDNA. Advances in Trp res : 413-416, 1992
- 15) Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe T, Fujiwara M, Hayashi O : Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. Arch Biochem Biophys 203 : 343-351, 1980
- 16) Yamazaki F, Kuroiwa T, Takikawa O, Kido R : Human indoleamine 2, 3-dioxygenase. Biochem J 230 : 635-638, 1985
- 17) Takikawa O, Kuroiwa T, Yamasaki F, Kido R : Mechanism of interferon- $\gamma$  action. J Biol Chem 263 : 2041-2048,



1988

- 18) Aune TM, Pogue SL : Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension : induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 84 : 863-875, 1989
- 19) Feigelson P, Brady FO : Heme-containing dioxygenases. *In* (Hayashi O Ed), *Molecular mechanism of oxygen activation*. New York Academic Press. 1974, pp 84-133
- 20) Feigelson P, Greengard O : Immunochemical evidence for increased titers of liver tryptophan pyrrolase during substrate and hormonal enzyme induction. *J Biol Chem* 237 : 3714-3717, 1962
- 21) Knox W, Piras M, Tokuyama K : Induction of Tryptophan pyrrolase in rat liver by physiological amounts of hydrocortisone and selected glucocorticoids. *Enzymol Biol Clin* 7 (1) : 1-10, 1966
- 22) Greengard O, Feigelson P : The activation and induction of rat liver tryptophan pyrrolase *in vivo* by its substrate. *J Biol Chem* 236 : 158-161, 1961
- 23) Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba K : Localization and developmental change of Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama* 45 : 135-139, 1991
- 24) Nakamura T, Nagao M, Ichihara A : *In vitro* induction of terminal differentiation of neonatal rat hepatocytes by direct contact with adult rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 169 : 1-14, 1978