

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22610011

研究課題名（和文）食生活と環境化学物質は子ども達の情動を左右するか？—穏やかな学校生活のために—

研究課題名（英文）Are affective disorder for school-age children influenced by dietary habit and environmental chemical compounds ?

研究代表者

酒井 久美子（KUMIKO SAKAI）

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：60225753

研究成果の概要（和文）：

近年の子ども達の学習障害や情緒障害の原因は何か？私たちは環境中の化学物質である安息香酸亜鉛が脳ミトコンドリアのモノアミンオキシダーゼ A (MAOA) を阻害することを報告している。本研究では亜鉛や安息香酸亜鉛、安息香酸ナトリウムが MAOA に及ぼす影響を *in vitro* で検証した結果、亜鉛で阻害が見られた。さらに、これらを含む食餌で飼育・繁殖させた子マウスの脳組織の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、カルシウムシグナルや神経伝達系に明らかな変動が見られた。

研究成果の概要（英文）：

Recently, children with learning disabilities and affective disorder are increasing. We previously reported that zinc benzoate, a contaminating environmental compound, inhibited A-type monoamine oxidase (MAOA). In this report, we investigated how zinc and zinc benzoate influenced activity of MAOA. Microarray analysis of brain tissues isolated from mice fed zinc, zinc benzoate or sodium benzoate diets revealed that the regulation of genes involved calcium signal transduction and neuroactive ligand-receptor interaction were changed.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2012 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：子ども学（子ども環境学）

キーワード：情動障害・モノアミンオキシダーゼ・安息香酸亜鉛

1. 研究開始当初の背景

近年の子ども達の学習障害や情緒障害の原因は何か？私たちは偶然に環境中の化学物質が脳において MAOA の活性を阻害し、正常な神経伝達系を乱す可能性があることを

発見し、この化学物質が安息香酸亜鉛であることをつきとめた。さらに私たちは脂質栄養学の研究から脳神経系を構築する重要なパーツである高度不飽和脂肪酸(n-3 系 PUFA) の不足が、神経伝達系に異常をもたらすこと

も見いだした。これらから、現代の子ども達をとりまく化学物質過剰な生活環境と偏った食生活が相乗的に働いて、脳神経系に何らかの影響を与えるのではないかと考えた。

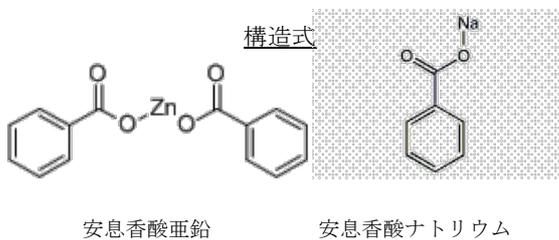
2. 研究の目的

子どもの脳神経系に影響を与える化学物質と食事脂質の両観点から、生化学的に検証し、穏やかな小中学校生活がおくれるよう、生活環境の提案を行う。

3. 研究の方法

(1) 試薬

塩化亜鉛 ($ZnCl_2$) 特級はシグマ・アルドリッチ社より、安息香酸亜鉛 (Zinc benzoate, $C_{14}H_{10}O_4Zn$) および安息香酸ナトリウム (Sodium benzoate, $C_7H_5NaO_2$) は、和光純薬より購入した。



(2) 脂肪酸

リノール酸 ($C_{18:2, n-6}$)、 α -リノレン酸 ($C_{18:3, n-3}$) は、Cayman Chemical 社(USA)より、アラキドン酸(AA, $C_{20:4, n-6}$)、ドコサヘキサエン酸(DHA, $C_{22:6, n-3}$)は NU-CHEK PREP, INC. (USA)より購入した。

(3) マウス

FVB/L; 5週齢を日本エスエルシー(株)より購入した。

gpt delta; 国立医薬品食品衛生研究所の能美健彦博士により開発された分子生物学的に DNA 損傷が検証できる遺伝子改変マウスで、本研究にあたり博士より繁殖許可を得ている。

マウスの飼育に関して、本学動物実験委員会、および遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得ている。

2種類のマウスはランダムに各4群に分け、①コントロール (通常の飲料水と飼料)、②0.01% $ZnCl_2$ を含む飲料水、③0.01%安息香酸亜鉛を含む飼料、④0.01%安息香酸ナトリウムを含む飼料で飼育した。まず♂♀のつがいで①から④のエサで5週齢より飼育を開始し、繁殖を行った。産まれた子どもも同じエサで飼育を継続した。子どもが5から8週齢で犠死させ、ただちに脳を摘出し、氷上で扁桃体・海馬・視床下部の3部位を分け取り、一部は続けてミトコンドリアを調製し、残り

は液体窒素中に保存した。

(4) ミトコンドリアの調製

サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株)社のミトコンドリア調製キットを用いて、新鮮な扁桃体・海馬・視床下部の3部位よりミトコンドリアを調製した。

(5) MAOA アッセイ

プロメガ株式会社の MAO-Glo Assay System を用いて MAOA の活性を測定した。本キットの基質は甲虫ルシフェリン類似体で、MAO 酵素によりルシフェリンに変換され、発光を生じるルシフェラーゼ反応に供される。

(6) ウェスタンブロッティング

サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株)社の T-PER 組織タンパク質抽出キットを用いて、扁桃体・海馬・視床下部の3部位よりタンパク質画分を調製した。タンパク質定量を行い、各部位で同量の $5 \mu g$ ずつをアプライし、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。膜に転写後、一次抗体 Anti-MAOA、二次抗体 Rabbit、バイオラッド社 New Clarity™ ウェスタン ECL 基質でウェスタンブロッティングを行った。

(7) mRNA の調製

(株)キアゲン社の QIARNeasy™ Mini Kit を用いて、自動抽出装置 QIAcube で mRNA を抽出した。

(8) モノアミンオキシダーゼ A

プロメガ社より、酵母で発現させたヒト組み換え MAOA 酵素を購入した。

(9) マイクロアレイ

各組織より抽出された mRNA を Agilent 社の Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4x44K) v2 により網羅的発現解析を行った。数値データを正規化した後、シグナル値を比較 ($Zscore \geq 2$ かつ $Ratio \geq 1.5$ 、および $Zscore \leq -2$ かつ $Ratio \leq 0.66$)、発現の増減変化を示した遺伝子群を抽出した。

(10) パスウェイ解析

マイクロアレイで発現変動の大きかった遺伝子群を、National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)によって提供されているパスウェイ解析ソフトで KEGG pathway を用いて解析した。Reference; Huang et al. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols (2009) vol. 4 (1) pp. 44-57.

4. 研究成果

(1) 脳各部位における MAOA の局在

コントロールのエサで飼育し、5～8週齢で摘出した脳の扁桃体・海馬・視床下部の3部位のウェスタンブロッティングを行った結果、MAOA が視床下部に多く局在していることが検証された (図1)。

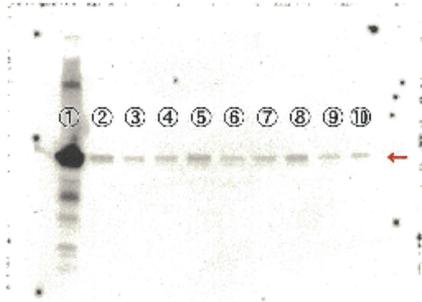


図1. マウス脳各部位における MAOA の局在
①MAOA、②G(gpt delta mouse)視床下部、③G 海馬、④G 扁桃体、⑤G 視床下部、⑥G 海馬、⑦G 扁桃体、⑧ F(FVB/L mouse) 視床下部、⑨F 海馬、⑩F 扁桃体

(2) 脳各部位ミトコンドリア画分中の MAOA の活性測定

新鮮な脳の各部位、扁桃体・海馬・視床下部からミトコンドリアを抽出し、重量あたりの発光値で MAOA の活性を測定したところ、視床下部での活性は扁桃体と海馬に比べて低かった。

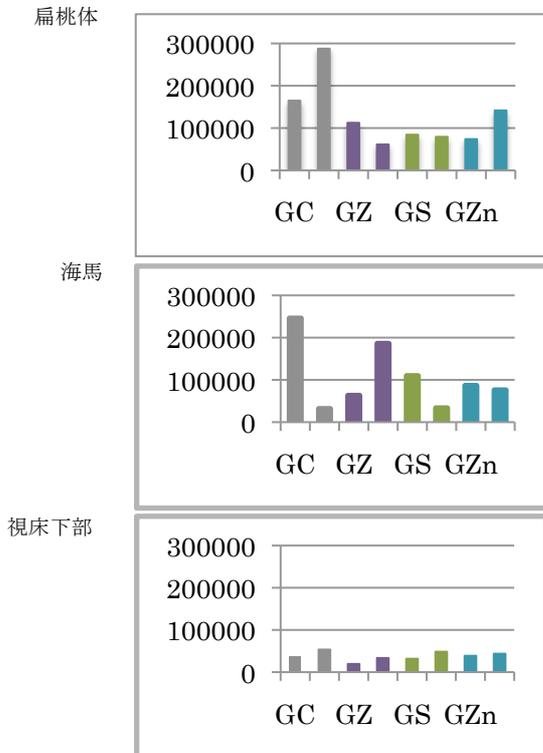


図2. 食餌群別のミトコンドリア MAOA アッセイ
C: コントロール, Z: 安息香酸亜鉛, S: 安息香酸 Na, Zn: ZnCl₂

(3) 視床下部のマイクロアレイ解析

今回のマイクロアレイ実験ではマウスの匹数がそれぞれ n=1 で行ったが、下記に示す通り、実験誤差は非常に小さく、明らかに有意差のある結果が得られた。

MAOA タンパク質としての局在量が多かった視床下部で、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変動を検証した。マウス 2 系統、コントロールを含め 4 群で解析を行った。コントロールとエサ 3 群を各々比較解析したデータで大きく発現変動した遺伝子群についてパスウェイ解析を行い、有意差 (p-value<0.05) が認められたパスウェイを以下に示す。

①マウス FVB/L 系統

- I. コントロール v ZnCl₂ 群 (p-value)
 - ECM-receptor interaction (5.7E-4)
 - Focal adhesion (3.3E-3)
 - Cell adhesion molecules (CAMs) (2.6E-2)
 - Sphingolipid metabolism (2.9E-2)
 - Adherens junction (3.7E-2)
 - Pathways in cancer (4.6E-2)
 - MAPK signaling pathway (4.7E-2)

- II. コントロール v 安息香酸亜鉛 (p-value)
 - Endocytosis (7.0E-4)
 - Antigen processing and presentation (1.8E-2)
 - Autoimmune thyroid disease (2.4E-2)
 - Graft-versus-host disease (4.4E-2)
 - Allograft rejection (4.4E-2)
 - TGF-beta signaling pathway (4.9E-2)

- III. コントロール v 安息香酸ナトリウム群 (p-value)
 - Calcium signaling pathway (6.5E-8)
 - Neuroactive ligand-receptor interaction (6.0E-5)
 - Long-term depression (6.4E-3)
 - Long-term potentiation (1.8E-2)
 - Axon guidance (3.1E-2)
 - Vascular smooth muscle contraction (4.3E-2)

②マウス gpt delta 系統

- I. コントロール v ZnCl₂ 群 (p-value)
 - Neuroactive ligand-receptor interaction (2.0E-5)
 - Calcium signaling pathway (7.4E-5)
 - Chemokine signaling pathway (8.7E-3)
 - Wnt signaling pathway (1.2E-2)
 - Thyroid cancer (1.6E-2)
 - Melanogenesis (2.0E-2)
 - Pathways in cancer (2.5E-2)
 - Basal cell carcinoma (3.8E-2)

II. コントロール v 安息香酸亜鉛 (p-value)
Antigen processing and presentation
(7.4E-3)
Valine, leucine and isoleucine degradation
(1.4E-2)

Proteasome (1.5E-2)
Ribosome (2.1E-2)
Synthesis and degradation of ketone
bodies (3.7E-2)
Spliceosome (4.0E-2)

III. コントロール v 安息香酸ナトリウム群
(p-value)

Calcium signaling pathway (2.1E-6)
Neuroactive ligand-receptor interaction
(1.4E-4)
ECM-receptor interaction (5.9E-3)
Focal adhesion (1.5E-2)

マイクロアレイ解析の結果、塩化亜鉛、安息香酸ナトリウムを含んだ食餌で飼育したマウスの視床下部において、特にカルシウムシグナル経路、および向神経活性リガンド-受容体相互作用においていくつかの遺伝子の発現変動が明らかになった。

(4) MAOA 活性に影響を及ぼす物質の検証
in vitro MAOA アッセイ系にて、MAOA の活性に影響を与える可能性がある塩化亜鉛、安息香酸亜鉛、脂肪酸のリノール酸、 α -リノレン酸、AA、DHA、MAOA の特異的阻害剤であるクロルジリンをそれぞれ単独で加えて、活性測定を行った。結果の阻害曲線を図3に示す。縦軸は活性(%), 横軸はモル濃度(M)。

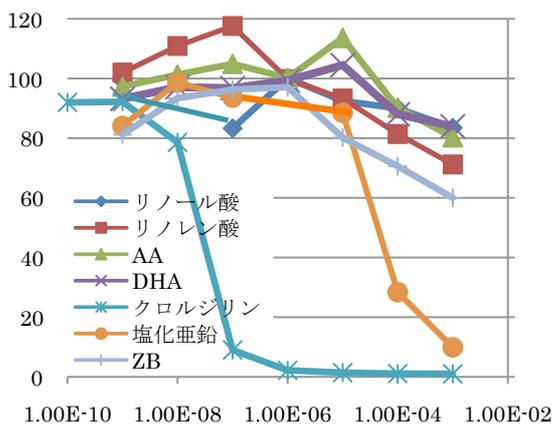


図3. MAOA アッセイ

この結果、阻害剤のクロルジリンは 10^{-8} ~ 10^{-7} M で特異的に MAOA を阻害した。塩化亜鉛は 10^{-5} M で MAOA を阻害した。安息香酸亜鉛(ZB)では若干の阻害が見られた。脂肪酸類は、in vitro で 10^{-9} ~ 10^{-5} M の低濃度で、一旦活性を上昇させる傾向を見せたが、 10^{-5} M 以上ではいずれの脂肪酸もやや活性を

減少させた。

(5) 脂肪酸と安息香酸亜鉛、塩化亜鉛の MAOA 活性へ与える相乗効果の検討

①脂肪酸存在下、クロルジリンが MAOA 活性に与える影響

脂肪酸のリノール酸、 α -リノレン酸、AA、DHA の各々 1μ M の存在下で MAOA 活性をクロルジリンが阻害する効果に影響があるか、検討した。縦軸は活性(%), 横軸はモル濃度(M)。

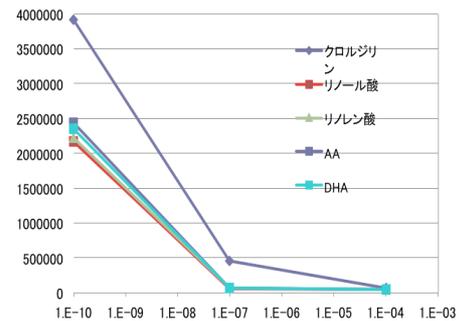


図4. 脂肪酸存在下クロルジリンの MAOA 阻害効果

②脂肪酸存在下、塩化亜鉛が MAOA 活性に与える影響

脂肪酸のリノール酸、 α -リノレン酸、AA、DHA の各々 1μ M の存在下で MAOA 活性を塩化亜鉛が阻害する効果に影響があるか、検討した。縦軸は活性(%), 横軸はモル濃度(M)。

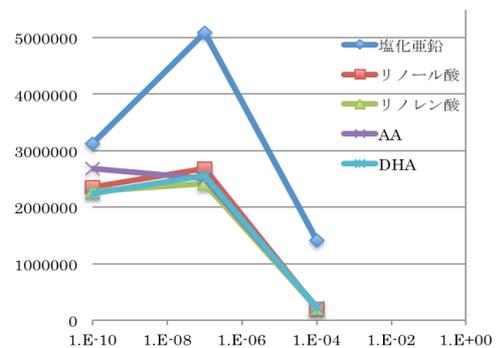


図5. 脂肪酸存在下塩化亜鉛の MAOA 阻害効果

結果は①②ともにクロルジリンおよび塩化亜鉛単独の時よりも各種脂肪酸存在下の方が活性が下がった。今後は、脳組織のミトコンドリア画分で MAOA を含む膜のリポソームを調製し、MAOA を取り囲む脂肪酸の環境を変えることで、いかに MAOA の活性に変化が及ぶかを検証する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

発表者；酒井 久美子(代表)、古屋 マミ、
千葉 政一、酒井 謙二

発表標題；亜鉛の慢性投与がマウス脳に与える影響

発表学会名；第 86 回日本生化学会大会

発表年月日；2013 年 9 月 11～13 日

発表場所；パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 久美子 (SAKAI KUMIKO)

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：60225753

(2) 研究分担者

酒井 謙二 (SAKAI KENJI)

九州大学・農学部・教授

研究者番号：50205704