

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660248

研究課題名(和文) アミノ酸代謝酵素(LAO)が脳内アミノ酸濃度と記憶・学習に与える影響

研究課題名(英文) Effect of L-amino acid oxidase on metabolite of amino acid and learning function in brain

研究代表者

永岡 謙太郎(Nagaoka, Kentaro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60376564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生命の源であるアミノ酸は、体の中で様々な生理活性物質として働いています。本研究ではアミノ酸を代謝する酵素であるLAOが脳の記憶を司る部位である海馬で発現することを確認しました。また、LAOを持たないマウスと正常のマウスを比較したところ、LAOを持たないマウスは記憶と学習脳が弱い結果が得られました。今後、LAOが制御するアミノ酸を詳しく調べることで、脳機能を高める因子が見つかるかもしれません。

研究成果の概要(英文)：Amino acid which is the source of life, has been working as a variety of biologically active substances in the body. In this study, we confirmed that the expression of LAO, one of amino acid metabolite enzyme, in the hippocampus where is responsible for learning and memory. In addition, when comparing mice do not have LAO (LAO KO) and normal mice, LAO KO mice showed weak learning and memory activity. In the future, by examining in detail the amino acids that LAO to control, we may find the factors that increase the brain function.

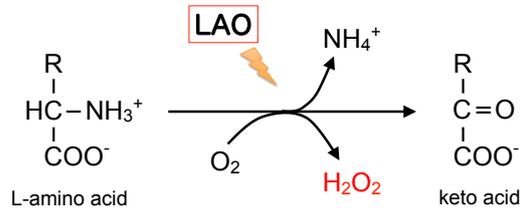
研究分野：生理学

キーワード：アミノ酸 記憶と学習 ミルク

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は生命の源となる栄養素であり、タンパク質合成素材として必須アミノ酸と非必須アミノ酸が存在する。一方、タンパク質合成に利用されないアミノ酸も数多く知られ、生体内で生理活性物質として多彩な作用を示す事が知られている。特に脳内神経伝達物質にはグルタミン酸やグリシンなどのアミノ酸、GABA、セロトニンやドーパミンといったアミノ酸代謝産物があり、記憶や学習をはじめとする脳の高次機能に重要な役割を担っている。しかし、アミノ酸合成や代謝経路は非常に複雑であり、脳機能における詳細な機構は不明である。

これまでに申請者は、マウス乳腺におけるL-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) について研究を行ってきた。LAO は特定の L-アミノ酸を分解し過酸化水素を発生させることで (下図) 乳腺の抗菌維持に重要であることを、ノックアウトマウスを作製し証明してきた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでミルク中の抗菌物質として知られていたアミノ酸代謝酵素 L 型アミノ酸オキシダーゼ (LAO) の新しい機能、海馬における記憶と学習効果を明らかにすることである。また、LAO が制御する脳内アミノ酸濃度と記憶・学習効果の相関関係を証明すると共に、ミルク中に含まれる LAO がアミノ酸バランスを整え、泌乳期の脳発育に関与する可能性についての検討も行う。

3. 研究の方法

LAO ノックアウトマウスの行動解析評価

海馬依存性の記憶・学習テストの一つである受動的回避試験の結果から、LAO ノックアウトマウスは長期記憶能の低下が示唆されている。異なる実験系であり空間学習と長期記憶を評価できるモリス式水迷路もしくはバーンズ迷路を行い、野生型および LAO ノックアウトマウスにおける記憶と学習能について更なる検討を行う。また、記憶学習に影響を与えるマウスの活動量や情動性についての検討も行うため、オープンフィールド試験 (活動量、情動性)、高架式十字型迷路 (不安様行動)、社会的行動測定試験 (新奇場面、社会行動) を行い総合的に評価する。

マウス脳内 LAO 発現解析

LAO が脳内各部位において局所的に発現しているかを確認する。野生型および LAO ノックアウトマウスの脳より、嗅球、大脳皮質、

海馬、視床、小脳を分離し、RNA を回収、リアルタイム PCR にて LAO mRNA 発現を測定する。他の臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、小腸、胸腺、骨格筋) や雌雄における発現量の比較も同時に行う。泌乳中乳腺を LAO 発現ポジティブコントロールとして用いる。

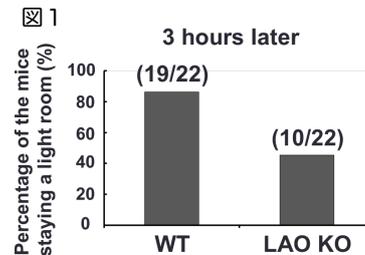
マウスミルクおよび海馬メタボローム解析

記憶学習能力と脳内 (海馬) 代謝産物濃度の関係を明らかにするため、野生型および LAO ノックアウトマウスの脳より海馬および大脳皮質 (コントロール) を分離し、重量を測定した後、前処理を行い、メタボローム解析に供する。

4. 研究成果

LAO ノックアウトマウスの行動解析評価

海馬依存性の記憶と学習テストの一つである受動的回避試験、およびモリス式水迷路において、LAO ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、学習成立および長期記憶成績が有意に悪い結果が得られた (図 1)。



一方、活動量や情動性を評価するオープンフィールド試験、不安行動を評価する高架式十字迷路において、両マウスの成績に優位な差は認められなかった。

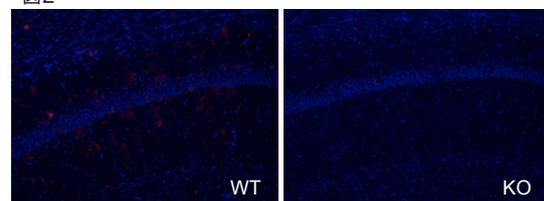
養母交換による行動解析評価

LAO ノックアウトマウスに認められる記憶と学習能の変化が、母マウスのミルク中 LAO が仔マウスの脳発育に影響を与えた結果かどうかを検討するため、養母交換をおこなった結果、受動的回避試験については母マウスのミルクに関係なく、仔マウスの LAO 遺伝子型によって成績が変化することが明らかとなった。興味深いことに、モリス式十字迷路については、母マウスのミルクの違いにより成績結果に影響が認められた。

マウス脳内 LAO 発現解析

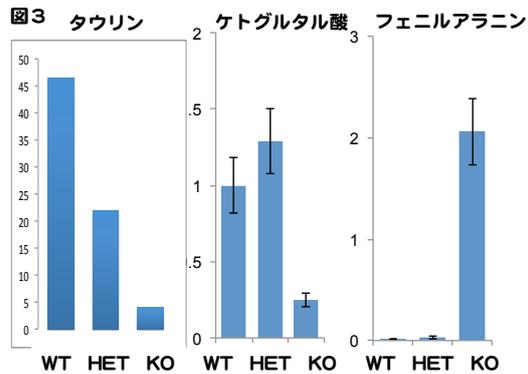
海馬において LAO mRNA の発現がリアルタイム PCR により確認され、LAO タンパクの存在も免疫蛍光法にて明らかにした (図 2)。

図 2



マウスミルクおよび海馬メタボローム解析

野生型マウスおよびLAOノックアウトマウスのミルクおよび海馬抽出物を用い、アミノ酸や有機酸など400成分についてメタボローム解析を行った結果、主成分分析により明らかに差が認められ、特にフェニルアラニン、タウリン、ケトグルタル酸などの含有量がミルクと海馬中両方において異なることが明らかとなった(図3)。



結果のまとめ

受動的回避試験においては仔マウスのLAO発現遺伝型が、モリス式水迷路においては母マウスのLAO遺伝型によるミルクの違いが関与するといった新しい発見が得られた。すなわち、同じ記憶と学習試験でも、そのモチベーションの違いによりLAOが関与する脳機能も関与の仕方も異なることが示唆された。事実、LAOはミルクの成分を大きく変化させており、また、ミルク中のみならず微量ではあるが海馬の局所において発現が認められることが今年度の研究結果により明らかとなり、生体内におけるLAOの役割は多岐にわたる可能性が考えられる。以上の結果から、LAOノックアウトに認められる記憶と学習の変化は、海馬に発現するLAOが局所的にアミノ酸代謝を行い脳機能に関与することと、ミルク中に含まれるLAOが代謝するアミノ酸が子の脳発達に影響を及ぼす2通りの可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計3件)

① Fujii K, Zhang H, Usuda K, Watanabe G, Nagaoka K. Lactogenic Hormone Stimulation and Epigenetic Control of L-Amino Acid Oxidase Expression in Lactating Mammary Glands. *J Cell Physiol*. 230:2755-2762. 2015 査読あり

② Orikasa C, Nagaoka K, Katsumata H, Sato M, Kondo Y, Minami S, Sakuma Y. Social isolation prompts maternal behavior in sexually naïve male ddN mice. *Physiol*

Behav. 151:9-15. 2015 査読あり

③ Nagaoka K, Zhang H, Arakuni M, Taya K, Watanabe G. Low expression of the antibacterial factor L-amino acid oxidase in bovine mammary gland. *Animal Science Journal*. 85, 976-980, 2014 査読あり

[学会発表] (計3件)

① 重野佑布子, 臼田賢人, 伴野太平, 辨野義己, 渡辺元, 永岡謙太郎 母乳中アミノ酸代謝酵素(LAO)がマウス乳子の腸内細菌叢形成に与える影響 日本アミノ酸学会 2015年10月24日 滋賀県立大学(滋賀県・彦根市)

② 鈴木駿, 永岡謙太郎, 渡辺元 ウシL型アミノ酸オキシダーゼの組換えタンパクの作製とミルク中体細胞を用いた発現解析 日本畜産学会 2015年3月29日 宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)

③ 藤井一希, 張浩林, 永岡謙太郎, 渡辺元 泌乳期マウスにおけるL-amino acid oxidase(LAO)発現機構の解明 日本繁殖生物学会 2014年8月23日 帯広畜産大学(北海道・帯広市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~nvetphys/>
<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/36/0003600/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永岡 謙太郎 (NAGAOKA, Kentaro)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：60376564

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：