

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00829

研究課題名(和文) アミノ酸代謝制御を介して高次脳機能を調節する食環境の構築

研究課題名(英文) Establishment of dietary environment for regulation of higher brain function via control of amino acids metabolism

研究代表者

福渡 努 (Fukuwatari, Tsutomu)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：50295630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸代謝制御によってトリプトファン代謝産物キヌレン酸を介した高次脳機能の調節を目指した。大型中性アミノ酸トランスポーター(LAT)の阻害は脳内キヌレン酸産生を抑制し、LATの基質となるアミノ酸の摂取によって脳内キヌレン酸産生の増加を抑制できることを明らかにした。疾病モデル動物におけるトリプトファン代謝動態の解析に取組み、急性肝炎によって脳内トリプトファン産生が亢進した。軽度の非アルコール性脂肪肝モデル動物では、末梢のトリプトファン代謝は変動したが、脳キヌレン酸濃度には影響は認められなかった。これは、肝障害の種類によって末梢および脳のトリプトファン代謝が異なることを示す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to regulate the higher brain function via tryptophan metabolite kynurenic acid by control of amino acids metabolism. We showed that inhibition of large neutral amino acid transporter (LAT) suppressed brain kynurenic acid production, and intake of LAT substrate amino acids also suppressed the high tryptophan diet-induced kynurenic acid production in rat brain. We investigated the tryptophan metabolism in animal model, and acute liver failure model rat showed enhancement of brain kynurenic acid production. Although mild non-alcoholic steatohepatitis affected peripheral tryptophan metabolism, these change failed to affect brain kynurenic acid. These results showed that influence on tryptophan metabolism in the brain and peripheral depend on respective liver failure.

研究分野：食品栄養学

キーワード：アミノ酸 脳神経科学 代謝

1. 研究開始当初の背景

キヌレン酸はトリプトファン異化代謝経路であるキヌレニン経路の代謝産物の一つであり、近年、脳神経科学者の注目を集めている。キヌレン酸は生理的濃度で $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7nAChR$) のアンタゴニストとして作用し、 $\alpha 7nAChR$ は神経伝達物質の放出を介して高次脳機能を調節する分子である。実験動物において、脳内キヌレン酸濃度の増加はドーパミンやグルタミン酸などの神経伝達物質の放出を抑制し、認知機能の低下、うつ様症状を招く。また、脳内キヌレン酸濃度の低下は神経伝達物質の放出を亢進し、認知機能および統合失調様症状を改善する。ヒトにおいては、アルツハイマー病および統合失調症患者の脳におけるキヌレン酸濃度が高いことが報告されている。このように、キヌレン酸と脳神経系疾患との関与が示唆されることから、キヌレン酸代謝異常が脳神経系疾患を誘発するというキヌレン酸仮説が提唱されている。したがって、キヌレン酸代謝を正常に保つことによって、脳環境を適切に維持できる可能性が考えられる。

我々は、これまでに食品栄養学的見地からアミノ酸摂取による脳内キヌレン酸産生調節の可能性について検討してきた。その結果、高トリプトファン食の摂取がキヌレン酸濃度の増加およびドーパミン放出の低下を招くことを明らかにした。さらには、10 種のアミノ酸が *in vitro* でキヌレン酸産生抑制作用をもち、*in vivo* では高リジン食と高分岐鎖アミノ酸食がキヌレン酸産生抑制およびドーパミン代謝亢進作用をもつことを見出した。以上の知見は、食餌によるキヌレン酸産生亢進は高次脳機能に影響をおよぼすこと、高次脳機能は食餌によって調節できることを示している。

キヌレン酸の産生を抑制する作用点として、血中からアストロサイトへのキヌレニンの取込み、キヌレニンからキヌレン酸への合成反応が挙げられる。アストロサイトによるキヌレニンの取込みは大型中性アミノ酸輸送体によって行われる。大型中性アミノ酸輸送体はキヌレニンのほか、分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸など多くのアミノ酸を基質とする。*in vitro* でキヌレン酸産生抑制作用をもつ 10 種のアミノ酸のうち、キヌレニン取込み抑制作用をもつ 5 種のアミノ酸は大型中性アミノ酸輸送体の基質でもある。したがって、これらのアミノ酸の摂取によって脳内キヌレン酸産生を制御することができれば、高次脳機能を調節できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、キヌレン酸産生機構がアミノ酸代謝と関連することに着目し、アミノ酸代謝制御によってキヌレン酸を介した高次脳機能を調節することを目的とした。このため

に、1) キヌレン酸産生を調節する作用部位と制御機構の解明、2) キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸の検索に取組んだ。さらに、キヌレン酸産生異常を招く因子を明らかにすることを目的として、疾病モデル動物におけるキヌレン酸代謝動態の解析に取組んだ。末梢トリプトファン代謝の主要な役割を担う臓器は肝臓であることから、急性肝炎および非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデル動物について検討した。

3. 研究の方法

(1) 組織切片を用いた *in vitro* 実験

本研究における動物実験を行うにあたり、滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた。飼育室の温度は 22°C 前後、湿度は 50% 前後に維持し、明暗サイクルは、午前 6 時～午後 6 時を明、午後 6 時～午前 6 時を暗とした。

Wistar 系 8 週齢雄ラットから大脳皮質を摘出し、ティッシュチョッパーで 1 mm 角の組織切片を作製した。2 $\mu\text{mol/L}$ キヌレニンおよび 3 $\mu\text{mol/L}$ ~ 3 mmol/L の LAT 阻害剤 2-アミノ 2-ノルボルナンカルボン酸 (BCH) むリンゲル緩衝液中でこの組織切片を 2 時間培養した。培養後、リンゲル緩衝液を回収し、キヌレン酸の定量に用いた。また、組織切片を回収し、キヌレニンの定量に用いた。

(2) BCH 投与がキヌレン酸産生におよぼす影響

BALB/c 系 8 週齢雄マウスに BCH (200 mg/kg BW) の静脈注射とキヌレニン (50 mg/kg BW) の強制経口投与を同時に行った。1 時間後にマウスを屠殺し、脳、肝臓、腓腹筋を摘出し、採血した。摘出した脳から大脳皮質、海馬、線条体を摘出し、分析に供した。

(3) LAT 基質のアミノ酸摂取がキヌレン酸産生におよぼす影響

Wistar 系 8 週齢雄ラットに 3% バリン、3% ロイシン、3% イソロイシン、1% メチオニン、3% フェニルアラニン、5% チロシンのいずれかを添加した 1.5% トリプトファン添加食あるいは対照食を与えて 7 日間飼育した。飼育終了後にラットを屠殺し、脳を摘出し、採血した。摘出した脳から大脳皮質、海馬、線条体を摘出し、分析に供した。

(4) 肝疾患モデル動物における脳キヌレン酸産生

Wistar 系 8 週齢雄ラットに 200 mg/kg BW のチオアセトアミド (TAA) を 3 日間連続して腹腔内投与した。最後の投与の 24 時間後にラットを屠殺し、脳および肝臓を摘出し、採血した。摘出した脳から大脳皮質、海馬、線条体を摘出し、分析に供した。

Wistar 系 3 週齢雄ラットに 20% カゼイン食あるいは 70% フルクトース食を与え、10 週間飼育した。飼育終了後、ラットを屠殺し、

脳, 肝臓, 腓腹筋を摘出し, 採血した. 摘出した脳から大脳皮質, 海馬, 線条体を摘出し, 分析に供した.

(5) 分析

キヌレン酸は HPLC-蛍光検出法により, キヌレニン は HPLC-UV 検出法により測定した.

4. 研究成果

(1) LAT の阻害がキヌレン酸産生におよぼす影響

大脳皮質切片をもちいた *in vitro* 実験により, LAT 阻害剤 BCH がキヌレニン取込みおよびキヌレン酸産生におよぼす影響について検討した. $3 \mu\text{mol/L} \sim 3 \text{mmol/L}$ の BCH を含む緩衝液中で組織切片を培養し, 緩衝液中のキヌレン酸量および組織中のキヌレニン濃度を測定した. キヌレン酸産生量は BCH 濃度依存的に減少し, IC_{50} は $90.7 \mu\text{mol/L}$ であった (図 1a). キヌレニン取込み量も BCH 濃度依存的に減少した (図 1b). この IC_{50} は $97.4 \mu\text{mol/L}$ であり, キヌレン酸産生に対する IC_{50} と一致する結果となった. 以上の結果は, LAT 阻害によって脳へのキヌレニン取込みが阻害され, それに伴ってキヌレン酸産生も阻害されたことを示している.

マウスを用いて *in vivo* における LAT 阻害がキヌレン酸産生におよぼす影響について検討した. マウスに BCH とキヌレニンを同時に投与し, キヌレニンおよびキヌレン酸の代謝動態について調べた. キヌレニン投与による脳内キヌレニンおよびキヌレン酸濃度の上昇は, BCH 投与によって抑制された (図 2). BCH 投与の有無にかかわらず, キヌレニン投与によって血中キヌレニン濃度が上昇したことから, LAT 阻害によって脳へのキヌレニン取込みが抑制され, その結果, 脳内キヌレン酸産生が抑制されたことが示唆された.

(2) LAT 基質のアミノ酸摂取がキヌレン酸産生におよぼす影響

LAT 阻害が脳キヌレン酸産生を抑制する結果を得たことから, LAT 基質となるアミノ酸の摂取が脳キヌレン酸産生におよぼす影響について検討した. 1.5%トリプトファン添加食を与えたラットにおいて, 対照食を摂取したラットと比べ, 脳内のキヌレニンおよびキヌレン酸の濃度, 血清キヌレニン濃度はいずれも約 2 倍を示した. トリプトファン添加食を摂取したラットと比べ, バリンを除くいずれのアミノ酸添加食によっても脳内のキヌレニンおよびキヌレン酸濃度は低値を示し, 高トリプトファン食摂取による脳内キヌレン酸およびキヌレニン濃度の上昇が抑制された. バリン添加食による脳内キヌレン酸濃度の抑制は認められなかった. いずれのアミノ酸を添加しても血清キヌレニン濃度は対照食を摂取したラットの約 2 倍を示し, ア

ミノ酸添加による影響は認められなかった. 以上の結果から, バリンを除く LAT の基質となるアミノ酸の摂取によって, LAT を介したキヌレニン取込みが拮抗阻害され, 脳内キヌレン酸産生が抑制されることが示唆された.

(3) 肝障害がキヌレン酸産生におよぼす影響

末梢トリプトファン代謝の主要な臓器である肝臓が障害を受けたときの脳キヌレン酸産生について検討した. 急性肝炎モデル動物として, TAA を投与したラットを用いた. TAA 投与により, 血中および脳キヌレニン濃度, 脳キヌレン酸濃度が上昇した. 肝臓におけるトリプトファン異化代謝経路の初発酵素であるトリプトファン 2,3-ジオキシゲナーゼ活性は低下した. 以上の結果より, 急性肝炎によって肝臓におけるトリプトファン異化代謝が抑制され, 非肝臓組織におけるトリプトファンからのキヌレニン産生が亢進し, そのキヌレニンが血中に放出された結果, 血中キヌレニン濃度が上昇し, それに伴って脳によるキヌレニン取込みが亢進したことが示唆された.

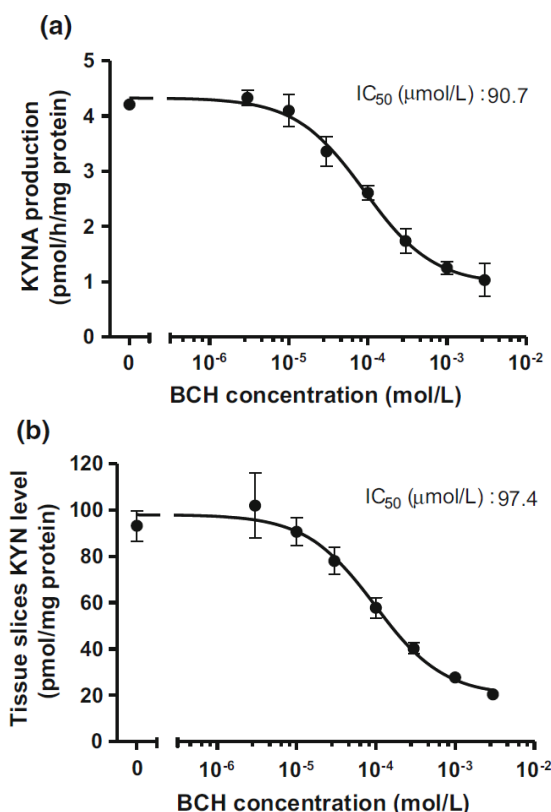


図 1 大脳皮質切片における BCH がキヌレン酸産生 (a) およびキヌレニン取込み (b) におよぼす影響. 値は平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) として示した.

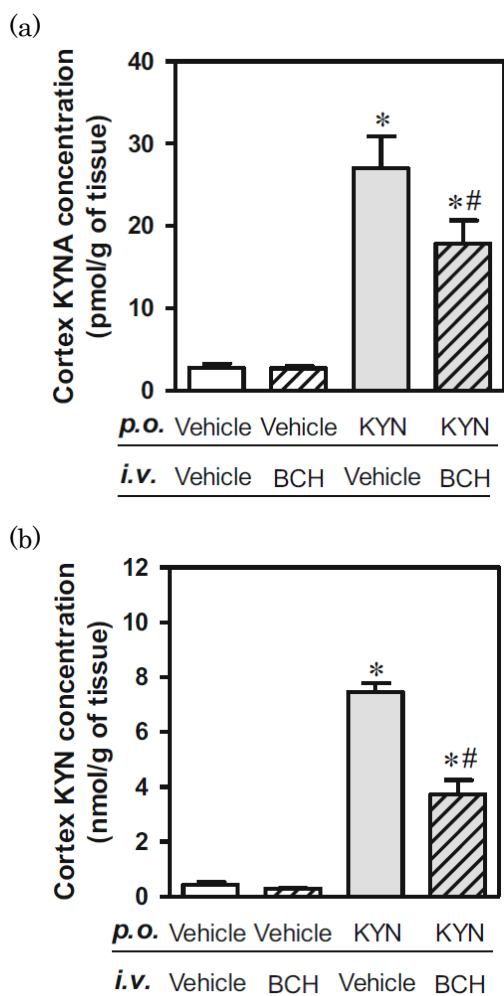


図2 マウスにおける BCH 投与が大脳皮質キヌレン酸濃度 (a) および大脳皮質キヌレニン濃度 (b) におよぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 (n = 5 ~ 10) として示した。*は Vehicle/Vehicle 群と $p < 0.05$ で有意差があることを示す。#は KYN/Vehicle 群と $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

急性肝炎によるキヌレン酸産生への影響が認められたことから、慢性肝炎について検討した。本研究では、慢性肝炎モデルとしてラットに70%フルクトース食を10週間与え、軽度のNASHを発症させた。NASHにより、トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ、キヌレニン3-モノオキシゲナーゼなど肝臓におけるトリプトファン代謝経路の酵素活性の変動が認められ、肝臓におけるトリプトファン異化代謝が抑制された。これに伴い血中キヌレニンの低下が認められたが、脳内のキヌレニンおよびキヌレン酸濃度には影響は認められなかった。以上の結果は、脳内キヌレン酸産生は末梢のトリプトファン異化代謝の抑制による影響を受けないことを示している。肝障害の種類によって、末梢のトリプトファン代謝が受ける影響が異なり、それに伴い脳内キヌレン酸産生への影響も異なる可能性が示された。

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 1 件)

Sekine A, Kuroki Y, Urata T, Mori N, and Fukuwatari T. Inhibition of Large Neutral Amino Acid Transporters Suppresses Kynurenic Acid Production Via Inhibition of Kynurenine Uptake in Rodent Brain. *Neurochem Res*. 2016;41: 2256-66. doi: 10.1007/s11064-016-1940-y.

〔学会発表〕(計 9 件)

Fukuwatari T. Modulation of kynurenine pathway by amino acids. (Invited speech) 14th Conference of the International Society for Tryptophan Research. September, 2015, Grand Rapids, USA.
Mori N, Yamamoto C, Sekine A, and Fukuwatari T. D-Cycloserine inhibits kynurenic acid production in rat brain *in vitro* and *in vivo*. 14th Conference of the International Society for Tryptophan Research. September, 2015, Grand Rapids, USA.

関根愛莉, 岡本美沙希, 金谷侑香, 佐野光枝, 柴田克己, 福渡努. アミノ酸が *in vitro* においてラット脳内キヌレン酸産生を抑制する. 日本アミノ酸学会第9回学術大会. 平成27年10月. 滋賀県彦根市.
福渡努, 柴田克己. アミノ酸によるトリプトファン代謝産物キヌレン酸産生制御(シンポジウム講演)第70回日本栄養・食糧学会大会. 平成28年5月. 兵庫県神戸市・西宮市.

関根愛莉, 黒木裕介, 浦田朋実, 森紀之, 福渡努. 大型中性アミノ酸トランスポーターの阻害が神経伝達調節因子キヌレン酸産生を抑制する. 第70回日本栄養・食糧学会大会. 平成28年5月. 兵庫県神戸市・西宮市.

関根愛莉, 黒木裕介, 浦田朋実, 森紀之, 福渡努. 大型中性アミノ酸トランスポーター阻害剤による脳内キヌレン酸産生の抑制. 日本アミノ酸学会10周年記念大会. 平成28年9月. 東京都.

Sekine A, Kuroki Y, Urata T, Mori N, and Fukuwatari T. Inhibition of large neutral amino acid transporters suppresses kynurenic acid production via inhibition of kynurenine uptake in rodent brain. Society for Neuroscience 46th Annual Meeting. November, 2016, San Diego, USA.

楠本晶子, 関根愛梨, 丸山明子, 佐野光枝, 森紀之, 柴田克己, 福渡努. 大型中性アミノ酸摂取による神経伝達調節因子キヌレン酸の脳内濃度上昇抑制効果. 第71回日本栄養・食糧学会大会. 平成29年5月.

沖縄県宜野湾市 .
井上真実 , 大原千洗 , 福渡努 . 軽度の非アルコール性脂肪肝炎が肝および脳のトリプトファン代謝におよぼす影響 . 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 . 平成 30 年 5 月 . 岡山県岡山市・総社市 .

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福渡 努 (FUKUWATARI, Tsutomu)
滋賀県立大学・人間文化学部・教授
研究者番号 : 50295630

(2) 研究分担者

大貫 宏一郎 (OHNUKI, Koichiro)
近畿大学・産業理工学部・准教授
研究者番号 : 50378668

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :