

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580144

研究課題名 (和文) 抗酸化ジペプチド、カルノシン・アンセリンの脳老化抑制機能の解析

研究課題名 (英文) Preventive function of antioxidant dipeptides, carnosine and anserine, against brain aging (senescence).

研究代表者

藤井 信 (FUJII MAKOTO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：70041655

研究成果の概要：抗酸化能を持つジペプチド、カルノシンは動物筋肉などに20 mMの高濃度含まれ、抗酸化能、疲労抑制、pH変動抑制、傷口のコラーゲン産生促進など多くの生理機能が知られている。高齢化社会の中で脳機能の劣化は生活QOLの低下が著しいことから、抗酸化能を示す食品成分で脳機能の老化、劣化を抑制することを検討しており、本プロジェクトではカルノシンの脳機能の老化抑制効果を検討した。

- 1、カルノシンをラットに8ヶ月間投与したところ、脳組織の過酸化脂質量、老人色素、リポフスチン含量は低下し、脳組織の細胞機能の生化学マーカーであるタウタンパクのリン酸化程度は減少した。以上より、カルノシンの長期摂取により、脳の活性酸素発生が抑制され脳細胞の正常性がより維持されている、即ち、脳の老化が抑制されていることが示唆された。
- 2、モデル神経細胞PC12を培養し、過酸化水素を添加すると活性酸素を細胞内に生じてアポトーシスを誘発するが、事前にカルノシン処理しておくこと、この活性酸素の産生が抑制され、アポトーシス誘導が抑制される。
- 3、PC12細胞を培養時にβアミロイドを添加すると、活性酸素を細胞内に生じてアポトーシスを誘発するが、事前にカルノシン処理しておくこと、この活性酸素の産生が抑制され、アポトーシス誘導が抑制される。
- 4、カルノシンを経口投与すると、血中への吸収・移行は投与後1時間をピークとし、その後は減少する。投与したカルノシンは、ほとんどがジペプチドのまま血中に出現した。
- 5、カルノシンを経口投与し、脳内のカルノシン含量への効果を検討したが、脳内のカルノシン含量の変動は検出できなかった。
- 6、ラット頭部にドリルで穴を開け、海馬にβアミロイドを注入したラットを用いて、電撃刺激に対する記憶能を検討した。カルノシン投与による改善効果を検討したが、今回の実験では、記憶の成立が確認できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：カルノシン、脳機能低下抑制、タウ・タンパク、リン酸化タウ・タンパク、過酸化脂質、アポトーシス、

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の中で、脳中枢の機能維持はヒトとしての生活ができるための必須のものであり、脳機能劣化患者のケアには多大の社会的経費を要する。また患者家族の苦痛は大変である。アルツハイマー症に代表される脳疾患を治療する薬品は未だなく、長年の生活習慣により予防することが重要である。脳細胞は脳で産生される活性酸素によって容易に死滅することは知られている。そこで高齢化に対応した食品機能の活用が求められている。

2. 研究の目的

1で述べたように、脳機能の老化・劣化を食品成分の抗酸化能を活用して予防し、脳機能の正常性を保つことを目的とする。

抗酸化能を示す食品成分は多いが、今回は筋肉中に多量に含まれるジペプチド、カルノシンをマウスに長期間投与し、脳細胞の正常性、脳機能の正常性、記憶の正常性など脳機能の劣化防止を検討する。

3. 研究の方法

I、実験方法：実験動物として、ラット(ウイスター、♂)を用いた。カルノシンは試薬レベルのものもとめ、さらに混入する副産物を

溶媒で抽出除去し、凍結乾燥を行った。これを精製飼料に添加し、自由摂食させた。飼育は24+2C, 12時間照明で行った。

2、実験飼料は8ヶ月間投与し、実験終了時に麻酔下で解体採血し、脳組織、肝臓組織などを得、直ちに凍結し、実験に使用した。

3、脳組織、肝臓と血清の過酸化脂質、リポスチン含量を定量した。

4、脳組織のタウタンパクは脳組織のホモジネイトのsupをウエスタンブロットに供し、抗体法によって、total タウタンパクとリン酸化タウタンパクの定量を行った。

5、脳組織の切片を調製し、抗体染色によってアポトーシス誘発率を測定した。

6、脳細胞のモデル細胞PC12細胞を培養し、培地にカルノシンを添加し、活性酸素誘導剤を加えて、PC12細胞内の活性酸素誘導とアポトーシス誘導、さらに事前のカルノシン添加によるアポトーシス抑制を検討した。

7、脳細胞のモデル細胞PC12細胞を培養し、アルツハイマー誘導タンパク、βアミロイドを添加し、細胞内の活性酸素誘導とアポトーシス誘導、さらに事前のカルノシン添加による活性酸素産生の抑制とアポトーシス抑制を検討した。

8、麻酔下でラットの脳海馬にβアミロイド

を投与し、その後の記憶の成立に対する効果を記憶の成立を電気刺激法で検討した。

9、カルノシンをラットに強制投与し、血中への移行を検討した。投与後、経時的に採血し、血中カルノシン濃度を検討した。

10、カルノシン投与に伴って、脳組織中のカルノシン濃度の増大を検討するため、脳組織中のカルノシン濃度を測定した。

4. 研究成果

1、カルノシンをラットに8ヶ月間経口投与したところ、脳組織の過酸化脂質量、老人色素、リポフスチン含量は低下した。これはカルノシンの抗酸化能によって脂質の過酸化が抑制され、またアルツハイマー誘因物であるβアミロイドタンパクの形成が抑制されたことを示している。

実験終了時の脳組織の細胞機能の生化学マーカーであるタウ・タンパクのリン酸化程度はカルノシン投与によって明らかに減少した。これらはカルノシンの長期摂取により、脳の活性酸素発生が抑制されて、脳細胞の正常性がより維持されている、即ち、脳の老化が抑制されていることが示唆された。

体重当たりの脳組織相対重量をみたが、今回の実験ではカルノシン投与による差は見られなかった。

2、モデル神経細胞PC12を培養し、これに過酸化水素を添加するとPC12細胞内に活性酸素が生じていることを認めた。この結果、PC12のアポトーシスが誘発される。しかし、事前にカルノシン処理しておくこと、この活性酸素の産生が抑制され、アポトーシス誘導が抑制されることを明らかにした。

3、PC12細胞を培養時にβアミロイド

を添加すると、活性酸素を細胞内に生じることを蛍光色素法で確認した。その結果、PC12細胞のアポトーシスが誘発されるが、事前にカルノシン処理しておくこと、この活性酸素の産生が抑制され、アポトーシス誘導が抑制される。即ち、βアミロイド蓄積により脳細胞で活性酸素が誘導され、その結果、脳細胞がアポトーシスを誘導されて死滅することが窺われた。

4、カルノシンを経口投与し、経時的に採血してカルノシンの血中への吸収・移行を測定した。血清分離後、除タンパクし、HPLC法で定量した。その結果、カルノシンの血中濃度は投与後30分から急激に上昇し、投与後1時間をピークとする血中濃度を示した。その後は急速に減少するので、そのままの形で極めて早く組織細胞に取り込まれると推定された。なお、投与したカルノシンは、ほとんどがジペプチドのまま血中に出現し、切断されて遊離のβアラニンとヒスチジンになる割合は少ないと見られた。

5、カルノシンを経口投与することによる脳組織内のカルノシン含量の変化を検討したが、今回の実験では脳内のカルノシン含量の変動は見られなかった。

6、ラット頭部に歯科用ドリルでラット頭骨に穴を開け、海馬にβカルノシンを注入した。その後、回復を待って、明暗箱を用いて、電気刺激法による記憶力測定法でラットの記憶への影響を検討した。カルノシン投与による記憶能の改善効果を検討したが、今回の実験では、記憶の成立が確認できなかった。

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 7 件) (全て査読あり)

1. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX*: Akt is a direct target for myricetin to inhibit cell transformation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009 (In press).(査読あり)
2. Sakao K, Fujii M, Hou DX*: Acetyl derivate of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis. *BoFactors*, 2009 (In press).(査読あり)
3. Sakao K, Fujii M, Hou DX*: Clarification of the role of quercetin hydroxyl groups on superoxide generation and cell apoptosis by chemical modification. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009 (In press).(査読あり)
4. Kumamoto T, Fujii M, Hou DX*: Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Lett.* 275; 17-26 (2009) (査読あり)
5. Chen J, Uto T, Tanigawa S, Kumamoto T, Fujii M, Hou DX*: Expression profiling of genes targeted by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in macrophages through DNA microarray. *Nutr. Cancer*. 60:43-50(2008) (査読あり)
6. Lin S, Fujii M, Hou DX*. Molecular mechanism of apoptosis induced by schizandrae-derived lignans in human leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol.*, 46(2):590-597 (2008). (査読あり)
7. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX*. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(3):797-804 (2008).(査読あり)

[学会発表] (計 20 件)

1. Kozue Sakao, Makoto Fujii, De-Xing Hou : Chemical modification and the structure-activity relationships of quercetin derivatives. 日本農芸化学会 2009 年大会、2009 年 3 月 26-28 日、福岡。
2. 隈元拓馬、藤井信、侯徳興 : PI3K/Akt を分子標的としたミリセチンの細胞形質転換抑制。日本農芸化学会 2009 年大会、2009 年 3 月 26-28 日、福岡。
3. 谷川 俊祐、藤井 信、侯徳興 : DNA マイクロアレイを用いたケルセチンの神経保護作用の解析。日本農芸化学会 2009 年大会、2009 年 3 月 26-28 日、福岡。
4. 斎藤ゆず、比嘉 淳、園田 直、原 暁穂、侯 徳興、山本 雅史、藤井 信 : 黒糖焼酎粕のメラニン形成抑制効果とその機構解析。第 13 回日本フードファクター学会大会、2008 年 11 月 17-18 日、東京。
5. 隈元 拓馬、藤井 信、侯 徳興 : ミリセチンは JAK1 を分子標的として細胞形質転換を抑制する。第 13 回日本フードファクター学会大会、2008 年 11 月 17-18 日、東京。
6. 谷川 俊祐、藤井信、侯 徳興 : ケルセチンによる転写因子のユビキチン化及び安定化の制御 : ポリフェノールの新たな機能性。第 13 回日本フードファクター学会大会、2008 年 11 月 17-18 日、東京。

7. 大黒 洋佑、藤井 信、侯 徳興 : COX-2 及び iNOS を標的としたワサビ成分の抗炎症作用。第 62 回日本栄養・食糧学会大会。2008 年 5 月 2 日-4 日、埼玉
8. 陳 継華、藤井 信、侯 徳興 : DNA マイクアレーを用いたアントシアニンの抗炎症作用の網羅的な解析。第 62 回日本栄養・食糧学会大会。2008 年 5 月 2 日-4 日、埼玉
9. 侯 徳興、谷川俊祐、藤井 信 : ポリフェノールのタンパク質ユビキチン化に及ぼす影響：ケルセチンを例として。第 62 回日本栄養・食糧学会大会。2008 年 5 月 2 日-4 日、埼玉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 信 (FUJII MAKOTO)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：70041655

(2) 研究分担者

侯 徳興 (HOU DE-XING)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：90305160

中野 隆之 (NAKANO TAKAYUKI)
鹿児島純心女子大学・看護栄養学部・教授
研究者番号：30155783

(3) 連携研究者