

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248046

研究課題名(和文)新規アミノ酸栄養学の構築とその応用に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the functional amino acid nutrition and its application

研究代表者

古瀬 充宏 (Furuse, Mitsuhiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30209176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,600,000円、(間接経費) 11,580,000円

研究成果の概要(和文)：L-トリプトファンの代謝産物であるキヌレン酸にストレス軽減効果が認められ、その効果は $\alpha 7$ nACh受容体とNMDA受容体を介することが明らかになった。L-アスパラギン酸はNMDA受容体を、D-アスパラギン酸はNMDA受容体と他の受容体を介してストレス軽減に機能することが判明した。不安様行動に対し、L-セリンの単回ならびに長期投与が異なる反応を示すことを認めた。多動性を示す動物の脳では、L-チロシンがD-チロシンに変換されやすく、L-セリンが減少していることが判明し、アミノ酸栄養による改善の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kynurenic acid (KYNA), L-tryptophan metabolite, induced a strong sedative effect under stress via the simultaneous inhibition of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine ($\alpha 7$ nACh) receptor and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subgroup containing the subunits NR2A and NR2B. L-Aspartate (L-Asp) and D-aspartate (D-Asp) also attenuates stress responses. L-Asp could induce sedative and hypnotic effects for stress behaviors through the NMDA receptor, but D-Asp might be via simultaneous involvement of other receptors besides the NMDA receptor.

Both acute and chronic L-serine treatments differently influenced an index of an antidepressant-like state. Acute L-serine increased L-serine and chronic L-serine treatment increased D-serine in the brain. The conversion of L-tyrosine to D-tyrosine in the brain of hyperactive animals may be higher, which may cause low dopamine concentration. Furthermore, L-serine, which is known as sedative factors, was lower in hyperactive animals.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：ストレス トリプトファン アスパラギン酸 セリン チロシン 不安様行動 受容体 睡眠

1. 研究開始当初の背景

畜産物が有する重要な特徴は、優良なタンパク質を含むことにある。したがって、動物生産における栄養の観点は、タンパク質の蓄積、言い換えれば体タンパク質合成の改善にあった。その際、タンパク質の材料となるアミノ酸で焦点が当てられたものは次の3つの条件を有する。1) 栄養学的に必須アミノ酸であること、2) L型アミノ酸であること、そして3) α -アミノ酸であることである。これらのアミノ酸に関する知見は多く貯えられてきた。その結果、飼養標準が設定され、アミノ酸要求量が提示されている。

研究代表者は、1) の必須アミノ酸代謝産物、例えば、L-リシンの脳内特異的代謝産物である L-ピペコリン酸 (J Neurosci Res, 73:270-275, 2003) や L-アルギニンの代謝産物である L-オルニチン (Amino Acids, 35:107-113, 2008) がストレス環境下において鎮静・催眠効果を発揮することを見出していた。これらはタンパク質に取り込まれることはない。2) では必須アミノ酸の対比語である非必須アミノ酸の L-セリン (Behav Brain Res, 170:71-77, 2006) や L-アラニン (Amino Acids, 36:131-135, 2009) に鎮静・催眠効果を認めていた。これらの事実はタンパク質合成の素材としてだけでなく、遊離の状態においてアミノ酸は機能を発揮することを物語る。2) の L 型アミノ酸の鏡像異性体である D-ピペコリン酸 (Neurosci Lett, 310:97-100, 2001)、D-システイン (Anim Sci J, 80:428-432, 2009) や D-プロリン (Amino Acids, 38:57-64, 2010) にも強力な鎮静・催眠効果を認めた。ラセマーゼによる L 型から D 型アミノ酸への変換により、タンパク質には取り込まれなくはなるが、生理的に機能することが示唆された。3) の α -アミノ酸に関しては、 α -アミノ酸でなくとも機能的であることを、核酸のウラシルから合成される β -アラニンに鎮静・催眠作用を

確認している (Brain Res Bull, 63:75-82, 2004)。

また、動物生産に留まらず伴侶動物やヒトにおいては、異常行動や精神疾患が多く認められるようになってきた。ADHD (注意欠陥・多動性障害: Attention Deficit Hyperactivity Disorder) は、著しく不相応な注意散漫、衝動性や多動性がみられる発達障害の一つである。ジャンガリアンハムスターとロボロフスキーハムスターは、同じヒメキヌゲネズミ属に分類されるハムスターであるが、ロボロフスキーハムスターはジャンガリアンハムスターと比べ、自発運動量が高いことが示唆されている。ロボロフスキーハムスターを ADHD のモデル動物と捉え、行動量の違いが脳内モノアミン含量の違いで説明できるかが検証された。その結果、ジャンガリアンハムスターと比べ、ロボロフスキーハムスターの脳内ドーパミン濃度が低いことが判明した (Exp Anim, 57:447-452, 2008)。次いで、ドーパミンの前駆体である L-DOPA (Behav Pharmacol, 20:260-264, 2009) やさらにその前駆体であるチロシン (Neurosci Lett, 488:45-48, 2011) を与えることで行動量を低下させることが確認されている。しかし、何故ドーパミンの濃度が低いのかは不明なままであった。また、モノアミン代謝に変調が起こることで発症するうつ様症状に対して、抗うつ薬を投与すると脳内のアミノ酸代謝も同時に影響を受けることが判明 (Eur J Pharmacol, 602:73-77, 2009; Nutr Neurosci, 15:26-33, 2012) し、モノアミン仮説一辺倒では説明がつかない可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これらの事実を総合すると、L- α -必須アミノ酸の栄養に特化していた従来の研究から抜け出し、L型アミノ酸の代謝産物、D型アミノ酸および β -アミノ酸のようなタンパク

質に組み込まれない遊離のアミノ酸の機能や遊離の非必須アミノ酸の機能を見出す、あるいは見直す必要があった。特に、ストレス軽減に関わる鎮静効果や催眠効果は、異化作用を低め、タンパク質合成にプラスに働き、催眠作用は成長ホルモンの分泌を通して同化作用を亢進する。催眠作用は概日リズムの調節因子に影響を及ぼす可能性を示唆し、これまでの飼養標準に時間栄養学の観点を組み入れることが可能となる。また、ストレス軽減が叫ばれる現在において、飼養管理技術の一環として栄養面からの改善を可能にすると考えた。また、コンパニオンアニマルやヒトの精神疾患におけるアミノ酸代謝の異変を把握することがアミノ酸の新規機能を解明する道筋になると考えた。

3. 研究の方法

(1) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体に関連する作動薬や拮抗薬と L-トリプトファン代謝産物であるキヌレン酸 (KYNA) を同時に投与し、KYNA の効果の消長を調べた。卵用種雄ヒナを 24 時間明期、室温 30 °C および自由摂食・飲水条件下で群飼した。試薬 (10 µl) を脳室内に投与後、単離ストレス条件下における自発運動量、甲高い鳴き声および姿勢を 10 分間記録し、実験後解析を行った。投与群は生理的食塩水、KYNA 単独ならびにそれにそれぞれ (+)-MK 801、D-セリン、NMDA ならびにキノリン酸 (QUIN) を加えた計 6 群を設けて実験を行った。

(2) NMDA 受容体の拮抗薬と L-アスパラギン酸 (L-Asp) あるいは D-アスパラギン酸 (D-Asp) を同時に投与し、両アミノ酸の効果の消長を調べた。卵用種雄ヒナを 24 時間明期、室温 30 °C および自由摂食・飲水条件下で群飼した。試薬 (10 µl) を脳室内に投与後、単離ストレス条件下における自発運動量、甲高い鳴き声および姿勢を 10 分間記録し、実験後

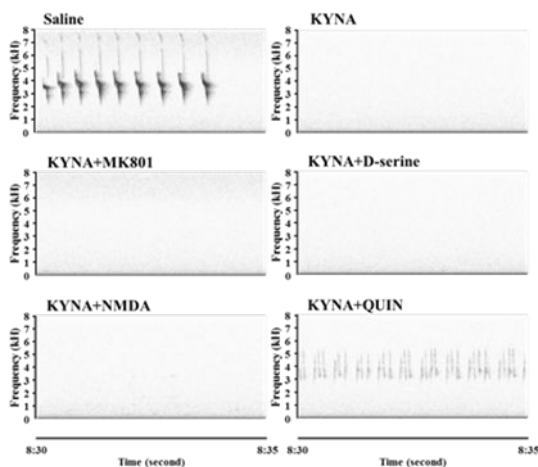
解析を行った。実験 1 では、生理的食塩水、L-Asp 単独、(+)-MK 801 単独および L-Asp + (+)-MK 801 の計 4 群を設けて実験を行った。実験 2 では、実験 1 の L-Asp を D-Asp に置き換えて実験を行った。

(3) L-セリンの単回投与ならびに長期給与が、オープンフィールド試験における不安様行動に及ぼす影響を評価した。単回投与試験では、Wistar ラット (7 週齢、雄) を 8 日間馴化させ、9 日目にオープンフィールド試験を行った。また、L-セリン溶液 (6 mmol/10 ml/kg) あるいは蒸留水 (10 ml/kg) の投与はオープンフィールド試験開始の 30 分前に行った。長期給与試験では、Wistar ラット (3 週齢、雄) を 7 日間馴化させ、2% L-セリン溶液あるいは蒸留水を自由飲水条件下で 21 日間給与し、22 日目にオープンフィールド試験を行った。オープンフィールド試験では、自発運動量の指標として総移動距離、不安様行動の指標として中央移動距離の割合ならびに探索行動の指標として立ち上がり回数を測定した。

(4) 3 週齢のジャンガリアンハムスターとロポフスキーハムスターを群飼し、室温 23±1 °C、明期 12h 暗期 12h (8:00 点灯、20:00 消灯) で 8 日間馴化した。その翌日の明期開始 6 時間後と暗期開始 6 時間後にそれぞれ 7 匹ずつから脳、肝臓および血漿をサンプリングした。その後、L 型アミノ酸と D 型アミノ酸の分析を UPLC で行った。

4. 研究成果

(1) 自発運動量および鳴き声の解析から、NMDA のイオンチャンネル型受容体拮抗薬 (+)-MK 801、KYNA が拮抗する部位とされる NMDA 受容体 glycine 部位の作動薬である D-Serine ならびに NMDA 受容体全体の作動薬である NMDA では、KYNA の効果を解除



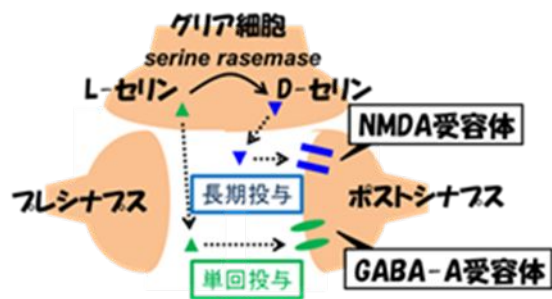
Saline投与では甲高く鳴いているが、KYNAの投与で鳴かなくなっている。KYNAの効果をQUINが一部解除している。

できなかった。自発運動量において、QUINはKYNAの作用を一部解除した。KYNA単独もしくはQUINを除く他の処理で、甲高く鳴くことは完全に抑えられたが、QUINでは異なる周波数ながら鳴き声が観察できた。加えて、姿勢の解析における活発に動いている時間、頭を垂らして目を閉じている時間においてもKYNAの効果をQUINのみが解除した。QUINはNMDA受容体のサブユニットであるNR1AとNR2Bの作動薬であることから、単離ストレス下のニワトリヒナの脳内において、KYNAは別実験で明らかとなった α 7nACh受容体とNMDA受容体(NR1A, NR2B)を介して効果を発現する可能性が示唆された。

(2) 実験1において、L-Aspによって誘導された鎮静・催眠作用は、(+)-MK 801の同時投与により解消された。実験2ではD-Aspの効果が(+)-MK 801の存在により催眠に変化するという事実を得た。これらの事実より、L-AspはNMDA受容体を、D-AspはNMDA受容体と他の受容体を介してストレス軽減に機能することが判明した。

(3) L-セリンの単回投与は、オープンフィールド試験において総移動距離と立ち上がり回数に影響を与えないものの、中央移動距離の

割合を有意に減少させた。一方、L-セリンの長期給与は、単回投与と同様に総移動距離と立ち上がり回数には影響を与えないものの、中央移動距離の割合を有意に増加させ、抗不安様行動を誘導した。行動試験の結果より、L-セリンの単回投与ならびに長期給与では、不安様行動に異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。また、L-セリンの単回投与と長期給与後に脳内のL-セリンならびにその代謝産物を測定したところ、単回投与後にL-セリンの増加が、長期給与後にはL-セリン自体ではなくその代謝産物であるD-セリンの増加が確認された。本研究より、L-セリンの単回投与と長期給与による不安様行動への異なる影響は、L-セリンの代謝に変化が起こることに起因する可能性が示唆された。

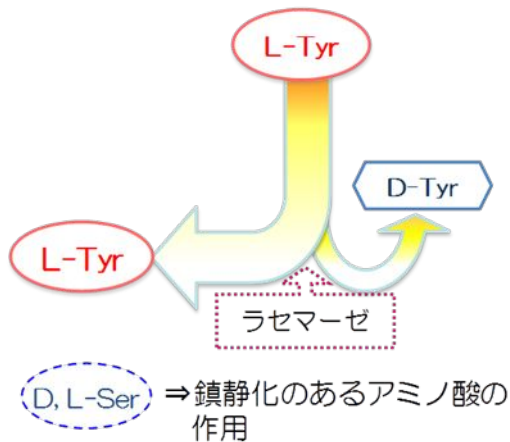


単回投与では、L-セリンが、長期投与ではD-セリンが抗不安行動に関連している。

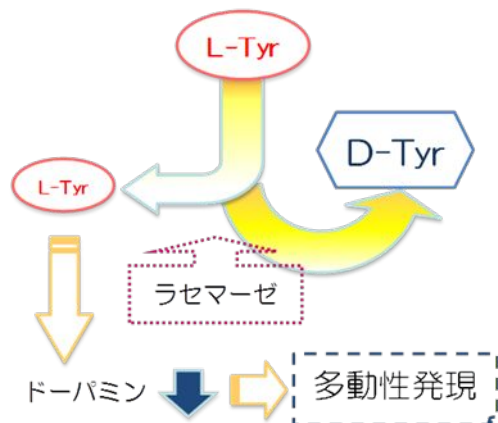
(4) 検出されたほぼ全てのアミノ酸は、行動期である暗期にジャンガリアンハムスターおよびロボロフスキーハムスターとも有意に増加した。脳内におけるL-チロシン含量は行動量が多いロボロフスキーハムスターよりもジャンガリアンハムスターの方が高い傾向にあった。ところが、D-チロシン含量については逆にジャンガリアンハムスターよりもロボロフスキーハムスターで高かった。一方、肝臓についてはL-チロシンおよびD-チロシンともにロボロフスキーハムスターの方が有意に高かった。血漿については有意な差はみられなかった。

これらのことから、ロボロフスキーハムス

ジャンガリアンハムスター



ロボロフスキーハムスター



多動性を示すロボロフスキーハムスターは、ドーパミンの基質となるL-チロシンと鎮静作用を示すセリンの脳内含量が低い。

ターでは L-チロシンを D-チロシンへと変換するラセマーゼの活性が高く、それによりドーパミンの基質である L-チロシンの含量が低くなると考えられた。このことが、最終的にドーパミンの減少を導き、ロボロフスキーハムスターの多動性が発現するものと考察された。また、鎮静作用を有する L-セリンがロボロフスキーハムスターで低いことも明らかとなった。ロボロフスキーハムスターを多動性動物モデルとして用いることで、ADHD やペットにおける異常行動などの改善に貢献することが可能であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Ikeda, H., Kawase, T., Nagasawa, M., Chowdhury, V. S., Yasuo, S. and Furuse, M. (2014). The metabolism of amino acids differs between the brains of the Djungarian hamster (*P. sungorus*) and the Roborovskii hamster (*P. roborovskii*). SpringerPlus, in press. 査読有

Erwan, E., Chowdhury, V.S., Nagasawa, M., Goda, R., Otsuka, T., Yasuo, S. and Furuse, M. (2014). Oral administration of D-aspartate, but not L-aspartate, depresses rectal temperature and alters plasma metabolites in chicks. Life Sciences, in press. 査読有

Erwan, E., Chowdhury, V.S., Nagasawa, M., Goda, R., Otsuka, T., Yasuo, S. and Furuse, M. (2014). Central injection of L- and D-aspartate attenuates isolation induced stress behavior in chicks possibly through different mechanisms. European Journal of Pharmacology, 736(C):-138-142. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.04.042. 査読有

Erwan, E., Chowdhury, V. S., Ito, K. and Furuse, M. (2013). Lauroyl-L-aspartate decreased food intake and body temperature in neonatal chicks. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 113(C):7-11. doi: 10.1016/j.pbb.2013.10.010. 査読有

Yoshida, J., Shigemura, A., Ogino, Y., Denbow, D.M. and Furuse, M. (2013). Two receptors are involved in the central functions of kynurenic acid under an acute stress in neonatal chicks. Neuroscience, 248(1):194-200. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.005. 査読有

Nagasawa, M., Ogino, Y., Kurata, K., Otsuka, T., Yoshida, J., Tomonaga, S. and Furuse, M. (2012). Hypothesis with abnormal amino acid metabolism in depression and stress vulnerability in Wistar Kyoto rats. Amino Acids, 43(5):2101-2111. doi: 10.1007/s00726-012-1294-y. 査読有

Erwan, E., Tomonaga, S., Yoshida, J., Nagasawa, M., Ogino, Y., Denbow, D.M. and Furuse, M. (2012). Central administration of L- and D-aspartate attenuates stress behaviors by social isolation and CRF in neonatal chicks. Amino Acids, 43(5):1969-1976. doi: 10.1007/s00726-012-1272-4. 査読有

Yoshida, J., Tomonaga, S., Ogino, Y., Nagasawa, M., Kurata, K. and Furuse, M. (2012). Intracerebroventricular injection of kynurenic acid attenuates corticotrophin-releasing hormone-augmented stress responses in neonatal chicks. Neuroscience, 220(1):142-148. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.041. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

池田裕美, 川瀬貴博, 長澤麻央, スルチ
ョードリ ビシュワジット, 安尾しのぶ,
古瀬充宏. ジャンガリアンハムスター
とロボロフスキーハムスターにおける
L-および D-アミノ酸含量の比較に関する
研究. 日本畜産学会第 117 回大会.
2013.09.09. 新潟大学.
長澤麻央, 川瀬貴博, 池田裕美, 岩本綾
香, 安尾しのぶ, 古瀬充宏. Wistar Kyoto
ラットの脳における L-セリン代謝酵素
の遺伝子発現解析. 日本アミノ酸学会.
2013.11.02. 熊本大学.
エディ エルワン, スルチョードリ ビ
シュワジット, 長澤麻央, 五田亮世, 大
塚剛司, 安尾しのぶ, 古瀬充宏. L-およ
びD-アスパラギン酸の中樞投与は異なる
機構を介して単離ストレス下のヒナ
のストレス行動を緩和する. 日本家禽学
会春季大会. 2014.03.29. 筑波大学.
長澤麻央・大塚剛司・都合勇希・山長聖
和・吉田惇紀・山崎いづみ・魚津伸夫・
寺本祐之・安尾しのぶ・古瀬充宏. L-セ
リンの単回および長期給与はWistar Ky
oto ラットならびにWistar ラットにお
いて抗うつ様効果を誘導する. 日本アミ
ノ酸学会. 2012.09.28. 千葉大学.
吉田惇紀・友永省三・荻野ユミ・重村麻
子・長澤麻央・古瀬充宏. トリプトファン
代謝産物の脳室投与が単離ストレス
下のニワトリヒナの行動に及ぼす影響.
日本畜産学会第115回大会. 2012.03.28.
名古屋大学.
吉田惇紀・友永省三・荻野ユミ・長澤麻
央・倉田幸治・古瀬充宏. 脳内キヌレン
酸が単離ストレス下のニワトリヒナの
行動に及ぼす影響. 日本アミノ酸学会.
2011.11.04. 名古屋大学.

〔図書〕(計 4 件)

Chowdhury, V.S. and Furuse, M. (2013).
Metabolism and physiology of glutamate in
chickens.
In: Glutamic Acid: Chemistry, Food Sources
and Health Benefits (Edited by Balcazar,
D.M.J. and Perez, E.A.R.), pp. 43-62.
NOVA Science Publishers Inc., Hauppauge
NY, USA.
Tomonaga, S., Erwan, E., Denbow, D.M.
and Furuse, M. (2012). Functions of brain
L-aspartate and its derivatives on stress
responses. In: Tyrosine and Aspartic Acid:
Properties, Sources and Health Benefits
(Edited by Jones, J.E. and Morano, D.M.),
pp. 163-175. NOVA Science Publishers Inc.,
Hauppauge NY, USA.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/lrmb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古瀬充宏 (FURUSE, Mitsuhiro)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 30209176

(2)研究分担者

友永省三 (TOMONAGA, Shozo)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 00552324
平成 23 年度のみ

安尾しのぶ (YASUO, Shinobu)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 30574719
平成 24 年度-平成 25 年度

(3)連携研究者

安尾しのぶ (YASUO, Shinobu)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 30574719
平成 23 年度のみ