

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614010

研究課題名(和文) アミノ酸摂取によるトリプトファン代謝産物キヌレン酸産生制御を介した高次脳機能調節

研究課題名(英文) Regulation of higher brain function via control of tryptophan metabolite kynurenic acid by amino acid intake

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品栄養学的観点から、トリプトファン代謝産物キヌレン酸産生の制御による高次脳機能低下の予防・軽減を目指した。細胞・組織レベルの研究により、キヌレン酸産生抑制作用をもつアミノ酸10種を見出し、その作用機構を明らかにした。動物実験により、アミノ酸関連化合物の摂取がキヌレン酸産生を抑制し、ドーパミン機能を改善することを明らかにした。行動実験により、キヌレン酸産生増加によって社会行動が低下することを見出し、食餌のアミノ酸組成を変えることによってこの行動異常を抑制できることを明らかにした。以上の結果より、アミノ酸摂取によってトリプトファン代謝を制御し、高次脳機能を調節できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to prevent and improve higher brain dysfunction by regulation of tryptophan metabolite kynurenic acid production from food scientific and nutritional aspects. In vitro study showed that 10 out of 19 amino acids suppressed kynurenic acid production via inhibition against kynurenic acid precursor kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis reaction. In vivo study showed that administration of amino acid related compound suppressed high tryptophan diet-induced kynurenic acid production and lowering dopamine turnover. Behavioral study showed that high tryptophan diet revealed social interaction deficits, and different amino acids composition diet rescued the dysfunction. These results suggest that dietary amino acid can prevent and improve higher brain dysfunction by regulation of tryptophan metabolism in the brain.

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化合物である。というのは、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ためである。動物実験により、脳内キヌレン酸濃度の増加がドーパミンやグルタミン酸といった神経伝達物質の放出を抑制し、認知機能の低下を招くことが示された。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、高リジン食の摂取によってリジン代謝産物 2-アミノアジピン酸がキヌレン酸合成反応を抑制し、高分岐鎖アミノ酸食の摂取によってキヌレン酸前駆体キヌレニンの脳への取込みを抑制することを見出し、これらのアミノ酸がキヌレン酸産生増大とドーパミン代謝回転低下を抑制することを明らかにした。

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中性アミノ酸輸送体によって行われる。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。キヌレニンからキヌレン酸への合成反応はキヌレニンアミノトランスフェラーゼ (KAT) によって触媒される。KAT は広い基質特異性を持ち、多くのアミノ酸は KAT の基質となる。以上より、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、アミノ酸摂取がキヌレン酸産生におよぼす影響とその機構を明らかにするとともに、アミノ酸摂取がキヌレン酸を介したドーパミン分泌および高次脳機能におよぼす影響について明らかにすることを目

的とした。具体的には、下記の3項目に取組んだ。

- ・ラット大脳皮質組織切片を用いた *in vitro* 実験により、キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸をスクリーニングする。
- ・アミノ酸もしくはアミノ酸関連化合物をラットに摂取させ、キヌレン酸産生増加およびドーパミン機能低下を抑制する化合物を見出す。
- ・高次脳機能の評価系を構築し、キヌレン酸産生増加が高次脳機能におよぼす影響を明らかにするとともに、キヌレン酸産生抑制を介して高次脳機能に影響をおよぼすアミノ酸を明らかにする。

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 1 mmol/L もしくは 3 $\mu\text{mol/L}$ ~ 10 mmol/L の各アミノ酸を含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。トリプトファンを除く 19 種類のアミノ酸について検討した。同様に 30 $\mu\text{mol/L}$ ~ 10 mmol/L の D-シクロセリンについても検討した。

(2) アミノ酸関連化合物食によるキヌレン酸産生制御

実験動物として Wistar 系雄ラットを用いた。7 週齢のラットに 20% カゼイン食を 7 日間与えて予備飼育したのち、0 ~ 100 mg/kg 体重の D-シクロセリン・1.5% トリプトファン添加食を与えて 7 日間飼育した。飼育終了後にラットを屠殺し、脳と肝臓を摘出し、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。

(3) 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、ドーパミン、ドーパミン代謝産物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) とホモバニリン酸 (HVA) は HPLC-電気化学検出法により測定した。DOPAC と HVA の合計に対するドーパミンの比をドーパミン代謝産物/ドーパミン比とした。

(4) 行動実験

行動実験には 10 週齢の C57BL/6J 系雄マウスを用いた。対照食、トリプトファン添加

食，トリプトファン・ロイシン添加食を与えたマウスをオープンフィールド試験，高架式十字迷路試験，社会性行動実験，強制水泳実験，バーンズ迷路試験，恐怖条件付け実験に供した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* におけるアミノ酸がキヌレン酸産生におよぼす影響

大脳皮質切片を用いた *in vitro* 実験により，トリプトファンを除く 19 種類のアミノ酸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。1 mmol/L のアミノ酸を含む緩衝液中で組織切片を培養し，キヌレン酸産生量および組織中キヌレニン濃度を測定した。19 種類のアミノ酸のうち，ロイシン，イソロイシン，フェニルアラニン，メチオニン，チロシン，アラニン，アスパラギン酸，グルタミン酸，グルタミンの 10 種類がキヌレン酸産生を抑制した（図 1）。この 10 種類のうち，ロイシン，イソロイシン，フェニルアラニン，メチオニン，チロシンの 5 種類がキヌレニン取込みを抑制し，他の 5 種類は組織中キヌレニン濃度に影響をおよぼさなかった（図 2）。キヌレニン取込みを抑制したアミノ酸はいずれも中性アミノ酸輸送体の基質となることから，これらのアミノ酸は中性アミノ酸輸送体を介したキヌレニンの取込みを競合阻害することが示唆された。また，キヌレニン取込みに影響をおよぼさない 5 種類のアミノ酸については，キヌレニンからキヌレン酸への合成反応を競合阻害したことが示唆された。

キヌレン酸産生抑制作用が認められた 10 種類のアミノ酸について，3 μ mol/L ~ 10 mmol/L における作用を検討したところ，いずれのアミノ酸も濃度依存的にキヌレン酸産生を抑制した。また，1 mmol/L でキヌレニン取込みを抑制した 5 種類のアミノ酸は濃度依存的にキヌレニン取込みを抑制した。これらのデータを用いて，キヌレン酸産生抑制およびキヌレニン取込み抑制に対する各アミノ酸の IC₅₀ 値を算出した（表 1）いずれのアミノ酸について，IC₅₀ 値は生理的濃度に近かったことから，キヌレン酸産生量はアミノ酸の生理的濃度の変動の影響を受けることが示唆された。

(2) アミノ酸関連化合物食によるキヌレン酸産生制御

アミノ酸代謝産物であり，抗けいれん薬として用いられている D-シクロセリンがキヌレニンアミノトランスフェラーゼ活性を阻害するという報告があることから，D-シクロセリンがキヌレン酸産生におよぼす影響について検討した。

まず，大脳皮質切片を用いた *in vitro* 実験により，D-シクロセリン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。キヌレン酸産生は D-シクロセリ

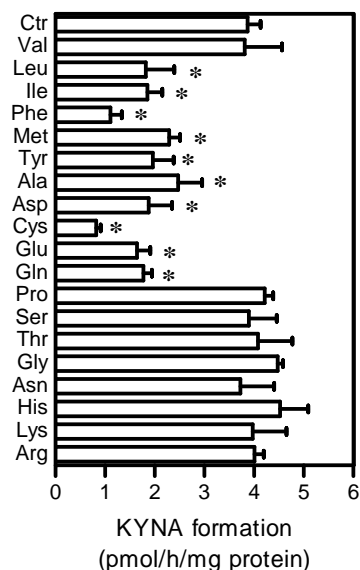


図 1 大脳皮質切片におけるアミノ酸がキヌレン酸産生におよぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 (n=3~7) として示した。一元配置分散分析および Dunnett の多重比較検定により，*は $p < 0.05$ で対照 (Ctr) に対して有意差があることを示す。

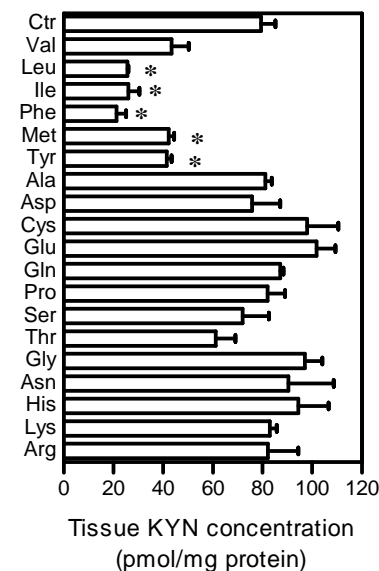


図 2 大脳皮質切片におけるアミノ酸がキヌレニン取込みにおよぼす影響。値は平均 ± 標準誤差 (n=3~7) として示した。一元配置分散分析および Dunnett の多重比較検定により，*は $p < 0.05$ で対照 (Ctr) に対して有意差があることを示す。

ン濃度依存的に抑制され，その IC₅₀ 値は約 6 mmol/L であった。キヌレニン取込みも D-シクロセリン濃度依存的に抑制されたが，3 mmol/L 以上の濃度ではそれ以上の抑制は認められなかった。以上より，D-シクロセリンはキヌレニン取込みおよびキヌレン酸合成反応のいずれも抑制することにより，キヌレン酸産生を抑制することが示唆された。

D-シクロセリンを含む食餌をラットに与

え，高トリプトファン食によるキヌレン酸産生亢進を抑制できるか検討した．高トリプトファン食の摂取によって対照群の 2.0 倍に上昇した脳内キヌレン酸濃度は，D-シクロセリンの同時摂取によって対照群の 1.3 倍に抑制された．また，D-シクロセリン摂取によってドーパミン代謝回転の増加が認められた．以上の結果は，D-シクロセリンがキヌレン酸産生を抑制することによってドーパミン機能が亢進することを示唆するものである．すなわち，アミノ酸もしくはアミノ酸関連化合物の摂取によってキヌレン酸産生を抑制できれば，高次脳機能を調節できる可能性を示している．

(3) キヌレン酸が高次脳機能におよぼす影響

脳内キヌレン酸濃度の増減が高次脳機能のおよぼす影響を評価するために，本研究では，まず行動実験による高次脳機能評価系の構築に取組んだ．オープンフィールド試験，高架式十字迷路試験，社会性行動実験，強制水泳実験，バーンズ迷路試験，恐怖条件付け実験といった評価系を構築することができた．この評価系を用いて，マウスにおける高トリプトファン食摂取が高次脳機能におよぼす栄養について検討したところ，社会行動の低下が認められた．高トリプトファン食摂取時にロイシンを同時摂取させると，社会行動低下の改善が認められた．この結果は，アミノ酸摂取によってトリプトファン代謝を制御し，高次脳機能を調節できる可能性を示している．

表 1 キヌレン酸産生およびキヌレニン取込みに対するアミノ酸の IC₅₀ 値

アミノ酸	キヌレン酸産生に対する IC ₅₀ 値 (μmol/L)	キヌレニン取込みに対する IC ₅₀ 値 (μmol/L)
Leu	36.9	30.4
Ile	60.1	83.6
Phe	22.5	10.4
Met	184	98.6
Tyr	970	159
Cys	110	
Glu	94.9	
Ala	146	
Asp	502	
Gln	647	

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, Okamoto M, Kanatani Y, Sano M, Shibata K, and Fukuwatari T. Amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain *in vitro*. *SpringerPlus* 2015;4:48

doi:10.1186/s40064-015-0826-9

〔学会発表〕(計 5 件)

Sekine A, Okamoto M, Kanatani Y, Sano M, Shibata K, and Fukuwatari T. Ten amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain *in vitro*. 12th Asian Congress of Nutrition. May 14–16, 2015. Yokohama.

Kuroki Y, Yamamoto C, Sekine A, Mori N, and Fukuwatari T. Administration of D-cycloserine suppresses kynurenic acid production in rat brain. 12th Asian Congress of Nutrition. May 14–16, 2015. Yokohama.

関根愛莉, 佐野光枝, 柴田克己, 福渡努. ロイシンとリシンの同時摂取がラット脳内キヌレン酸代謝調節を介したドーパミン代謝を調節する. 日本アミノ酸学会第 6 回学術大会. 平成 26 年 11 月 8–9 日. 東京都.

福渡努, 関根愛莉, 岡本美沙希, 佐野光枝, 柴田克己. 脳におけるトリプトファン代謝産物キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸の *in vitro* スクリーニング. 日本アミノ酸学会第 7 回学術大会. 平成 25 年 11 月 2–3 日. 熊本市.

関根愛莉, 岡本美沙希, 佐野光枝, 福渡努, 柴田克己. ラット脳におけるトリプトファン代謝産物キヌレン酸産生を制御するアミノ酸の検索. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会. 平成 25 年 5 月 24–26 日. 愛知県名古屋市.

〔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：
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：