

神経機能に關与する天然化学物質の研究

工学部生物化学工学科 教授 山田 康枝

1. はじめに

自然界には植物，発酵食品由来のポリフェノールをはじめとして様々な天然化学物質が存在し，その生理活性についての研究が進んでいる．その中でも抗酸化については特に研究されており，ポリフェノール類の抗酸化の性質や酸化による障害作用への保護作用は明らかになりつつある．しかし，神経機能に影響を与える物質の性質の検討は，まだ，僅かである．茶や酒，漢方薬など，古来リラックス効果を持つ物質の存在は知られているが，作用機序はいまだ不明な点が多く，構造なども同定されていないものも多い．わたしたちがどのように天然化学物質の神経機能への効果についての研究にアプローチをしているかを紹介したい．神経機能への効果は分子レベルから細胞，神経組織，行動への効果と様々な方法で検討可能である．私たちは分子レベルから行動までを一つの物質について検討できる系を構築することを考えている．アフリカツメガエル卵母細胞発現系において発現させた受容体への天然化学物質の直接効果，更にヒトやラット神経系細胞への効果，行動実験による効果について検討する予定であり，今回は現在の状況と今後の研究の方向性を示したい．

2. 中枢神経系に存在する受容体への直接効果の検討

2.1 NMDA 型グルタミン受容体

グルタミン酸受容体のイオンチャネル型である N-メチルD-アスパラギン酸 (NMDA) 型受容体は，高等動物の中枢神経系における興奮性シナプス伝達で中心的役割を担っており，記憶や学習に重要な役割を果たしている．NMDA 受容体は NR1 と NR2 サブユニットで構成されそれぞれにグリシンとグルタミン酸が結合するとチャネルが開口する(図 1)^{1,2)}．また，NR2 には 2A, 2B, 2C, 2D のサブタイプがあり，それぞれ発現の時期や場所が異なる．NMDA 受容体の過剰な反応は脳梗塞や脳卒中の際の神経細胞死の原因のひとつであり，アルツハイマー型の認知症においても NMDA 受容体による神経細胞死が関係していると考えられている³⁾．

NMDA 受容体の活性阻害薬であるメマンチンは，今年1月に抗認知症薬として日本国内での製造販売が承認された⁴⁾．また，NMDA 受容体の特異的阻害薬が統合失調症様の症状を示

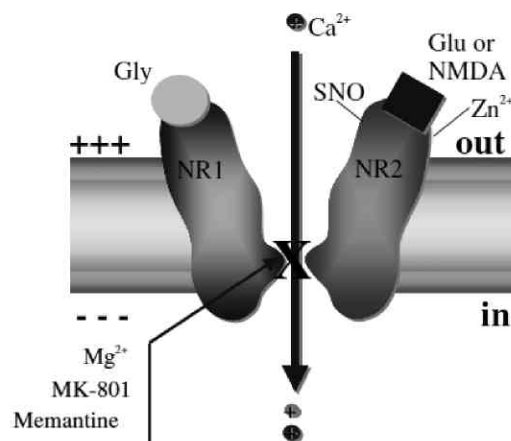


図1 NMDA型グルタミン酸受容体の構造
Gly, グリシン; Glu, グルタミン酸 Rより改変

めすことが知られている⁵⁾。このように、NMDA 受容体に作用する物質は認知症や統合失調症などの精神疾患の解明に役立ち、治療薬となる可能性がある。この受容体は神経機能において重要な働きをしているが故に、活性の強すぎる物質は副作用が強くなる。そのため活性が緩やかで、選択性の高い薬が望まれている。現在、私たちは、アフリカツメガエル卵母細胞にマウスのNMDA受容体を発現させ受容体へのジペプチドや日本酒成分の効果、焼酎の香気成分の効果を検討している。古来、人が飲用している酒類に含まれるエタノール以外の成分に受容体への効果が見られれば、副作用の少ない薬やサプリメントが開発可能である。既に、ジペプチド、日本酒成分や焼酎の香気成分にNMDA受容体に効果のある物質が存在していること見つけている⁶⁾。最終的に、効果のある物質を同定し、薬やサプリメントへ応用したいと考えている。

2.2 γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体

イオンチャンネル型 γ -aminobutyric acid 受容体 ($GABA_A$ 受容体) は脳など中枢神経系に存在する主要な抑制性の受容体で2つの α 、2つの β 、1つの γ サブユニットからなりこの受容体に GABA が結合すると Cl^- チャンネルが開いて膜電位を下げることで神経興奮

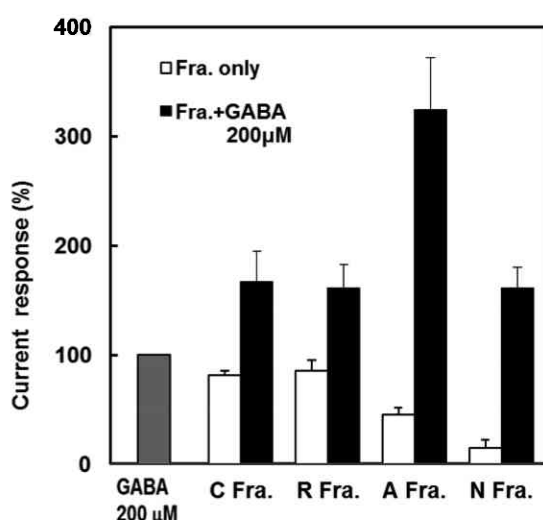


図2 純米酒分画成分の $GABA_A$ 受容体への効果
C Fra は塩基性アミノ酸を含み、R Fra は酸性アミノ酸を A Fra は有機酸を含み、N Fra は糖を主に含む。□は純米酒成分のみの活性を示し、■は GABA 存在下の活性である。

を抑制する⁷⁾。GABA 以外にも、ベンゾジアゼピン、バルビツール酸、神経ステロイド、麻酔薬、エタノールなど多くの薬物が $GABA_A$ 受容体に作用してその応答を強める。その程度に応じて、安らぎ、精神安定、睡眠、麻酔効果が生じることが知られ、気分に影響する物質の主要な作用対象である⁷⁾。適量の飲酒はリラックス効果をもたらすと言われている。このリラックス効果はエタノールによる $GABA_A$ 受容体の亢進によるものと考えられている^{8,9)}。日本酒にはリラックス効果があることが動物行動実験で示されている^{10,11)}。しかしながら、日本酒中にエタノール以外にも、リラックス効果に関わる酒類成分が存在するかどうかについての十分な検討は行われていない。

日本酒にはアミノ酸、有機酸をはじめ様々な成分が含まれており、その中には $GABA_A$ 受容体を亢進する GABA も含まれている。現在、日本酒に含まれる GABA の量を測定したうえで、GABA 以外の $GABA_A$ 受容体を活性化する日本酒成分についてアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討している。図2に示すように、すでに日本酒成分分画の有機酸を主に含む A Fra 中に $GABA_A$ 受容体を活性化する成分を発見し報告している¹²⁾。今後はこれらの成分について単離同定し、日本酒成分の有効利用を考えていきたい。

3. ヒト由来神経系細胞

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 **SK-N-SH** は交感神経系の神経細胞や副腎髄質細胞が分化する前に癌化したものであり、神経細胞への分化能をもつことが知られている。現在当研究室では、レチノイン酸添加による神経細胞への分化の最適条件を検討し、ヒト神経機能研究やヒト神経細胞へ作用する物質の研究への応用の可能性を検討している。ヒト神経細胞機能には未だ解明されていない部分が多く存在する。その原因はヒト神経細胞を使った研究を簡便に行うことができないということがあげられる。通常、神経細胞研究は、動物初代培養細胞や培養細胞を用いるが、得られた結果が、ヒトの神経系の実際の機能とは関連しないことがある。iPS細胞やES細胞を分化させ神経機能研究に用いることもできるが、高度な技術や多くの設備が必要である。SK-N-SH細胞はレチノイン酸添加により神経細胞への分化能を持つことが知られている。SK-N-SH細胞を用いて簡便にヒト神経細胞へ分化させる方法を確立した(図3)。神経細胞であれば、NMDA受容体が発現しており、すでに述べているように、この受容体に過剰のグルタミン酸を添加することにより細胞内へ過剰のカルシウムイオンが入り神経細胞死を誘導することが可能である。SK-N-SHから分化させた神経細胞を用いてグルタミン酸の添加により誘導される神経細胞死に保護効果のある物質の検索を行うことが出来、得られた物質を神経機能や精神疾患の研究に利用可能であると考えられる。また、統合失調症のような神経疾患や認知症の薬を考えるうえで重要な基礎データとなる^{3,4,5}。

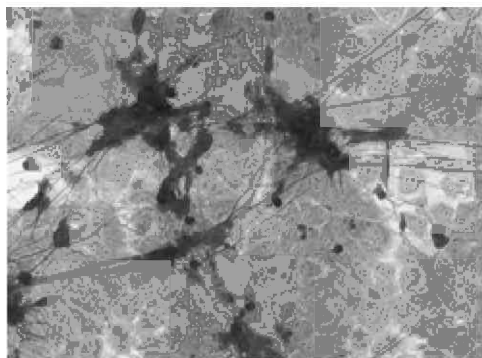


図3 ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 **SK-N-SH** から分化した神経細胞
SK-N-SHを40 μ Mレチノイン酸で2週間培養後のヘマトキシリン・エオジン染色

SK-N-SH細胞はレチノイン酸添加により神経細胞への分化能を持つことが知られている。SK-N-SH細胞を用いて簡便にヒト神経細胞へ分化させる方法を確立した(図3)。神経細胞であれば、NMDA受容体が発現しており、すでに述べているように、この受容体に過剰のグルタミン酸を添加することにより細胞内へ過剰のカルシウムイオンが入り神経細胞死を誘導することが可能である。SK-N-SHから分化させた神経細胞を用いてグルタミン酸の添加により誘導される神経細胞死に保護効果のある物質の検索を行うことが出来、得られた物質を神経機能や精神疾患の研究に利用可能であると考えられる。また、統合失調症のような神経疾患や認知症の薬を考えるうえで重要な基礎データとなる^{3,4,5}。

4. ラット初代培養神経細胞

ラット初代培養神経細胞では、妊娠ラットから胎仔を取り出しその脳の神経細胞を生体外培養している(図4)。正常な神経系受容体やタンパク質を発現しているため継代培養が可能な株化細胞より細胞本来の性質を観察できる点が優れており、初代神経細胞は他の株化細胞と比較して1/10以下の濃度でも細胞応答性が高く、薬理作用や細胞毒性の評価を正確に行うことができるため、薬物活性や細胞毒性評価に用いられている。ラットやマウス脳のスライス標本やラット初代培養神経細胞を使用して神経活動を測定し、神経活動に影響を与える物質を検索することが可能である。受容体活性に影響があることが証明された物質が実際の神経活動にも効果があるか検証できれば、医薬品やサプリメントへの応用の可能性が高まる。

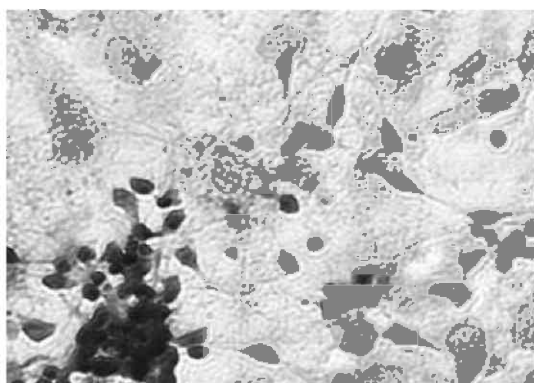


図4 ラット初代培養神経細胞(大脳皮質)
ラット胎児脳を40日間単離培養後神経特異的抗体(MAP2)で抗体染色した。

正常な神経系受容体やタンパク質を発現しているため継代培養が可能な株化細胞より細胞本来の性質を観察できる点が優れており、初代神経細胞は他の株化細胞と比較して1/10以下の濃度でも細胞応答性が高く、薬理作用や細胞毒性の評価を正確に行うことができるため、薬物活性や細胞毒性評価に用いられている。ラットやマウス脳のスライス標本やラット初代培養神経細胞を使用して神経活動を測定し、神経活動に影響を与える物質を検索することが可能である。受容体活性に影響があることが証明された物質が実際の神経活動にも効果があるか検証できれば、医薬品やサプリメントへの応用の可能性が高まる。

5. 行動実験

受容体への直接効果，神経活動への効果を検証後，実際にマウスに投与し，マウスの自発運動能への効果や不安作用を見ることができると高橋式十字迷路試験などで検証する．図5に示す装置を考案し，実際に香気成分についてマウスの自発運動能への効果を検討はじめている．

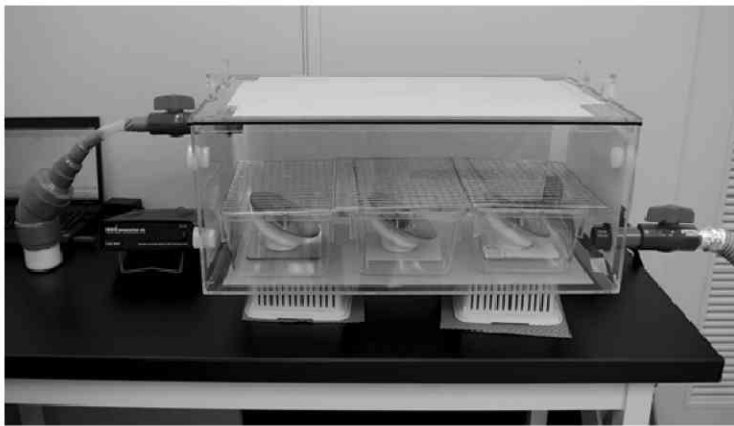


図5 香気成分行動実験測定装置

ルから組織，動物による行動実験での詳細なデータが必要である．私たちの研究のように，古来ヒトが食生活の中で飲用していたものの中から，神経機能の改善に役立つ物質を見つけることは，副作用の少ない物質を得るひとつの方法であると考えられる．

参考文献

- 1) Chen H.S. and Lipton S.A., "The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists." J Neurochem. Vol.97, No.6 (2006), pp.1611-26.
- 2) Prybylowski K. and Wenthold R. J., "N-Methyl-D-aspartate Receptors :Subunit assembly and trafficking to the synapse." J Biol Chem Vol. 279, (2004) pp. 9673-9676.
- 3) Texido L., Martin-Satue M., Alberdi E., Solsona C., and Matute C., "Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors." Cell Calcium(2011) in press
- 4) Riordan K. C., Hoffman Snyder C. R., Wellik K. E. Caselli R. J., Wingerchuk D. M., and Demaerschalk B. M. "Effectiveness of adding memantine to an Alzheimer dementia treatment regimen which already includes stable donepezil therapy: a critically appraised topic." Neurologist Vol. 17, No.2 (2011) p121-123.
- 5) Kantrowitz J. T. and Daniel C. J., "N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia?" Brain Research Bulletin Vol. 83 (2010) pp. 108-121.
- 6) 立溝博也，黒下主悠，山田康枝 "NMDA型グルタミン酸受容体に対するジペプチドの効果

6. 最後に

ヒトの神経機能は今だ，未知の部分が多く，そのため認知症を含む多くの精神神経疾患が根治できる治療法のない状態に置かれている．神経系の薬の難しさは，正常な神経活動を維持しつつ，病気の原因となっている異常な神経活動をコントロールすることである．そのためにも分子レベ

- 果。” アミノ酸研究 Vol. 2, No.2 (2008), pp. 155-157.
- 7) D'Hulst C., Atack, J. R., and Kooy R. F., “ The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles” *Drug Discov. Today*, Vol. 14, (2009) pp. 866-875.
 - 8) Kumar S., Porcu. P. Werner D. F., Matthews D. B., Diaz-Granados J. L., Helfand R. S., and Morrow A. L., “ The role of GABA_A receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress” *Psychopharmacology (Berl)*, Vol. 205, (2009) pp. 529-264.
 - 9) Wafford, K. A., Burnett D. M., Dunwiddie T. V., and Harris R. A., “Genetic differences in the ethanol sensitivity of GABA_A receptors expressed in *Xenopus oocytes*.” *Science*, Vol. 249, (1990) pp. 291-293.
 - 10) 伊豆英恵, 後藤邦康 “マウスを用いた酒類飲用による酔いの評価 “, 日本醸造協会誌, Vol. 104, (2009), pp. 787-795.
 - 11) 伊豆英恵, 山田康枝, 後藤邦康, 須藤茂俊 “清酒飲用の抗不安作用—マウスの高架式十字迷路試験による評価— “, 日本醸造協会誌, Vol. 105, (2010), pp. 664-671.
 - 12) 山田康枝, 江口将也, 伊豆英恵, 後藤邦康, 須藤茂俊 “GABA_A 受容体に対する日本酒成分の効果 “, 日本醸造協会誌, Vol. 105, (2010), pp. 609-614.