

遺伝性セリン合成不全疾患モデルマウスの
脳内遊離アミノ酸組成に及ぼす大豆ペプチド摂取効果の定量的検討

古屋茂樹*

九州大学農学研究院生命機能科学部門

Effect of Soy Peptide Ingestion on the Free Amino Acid Contents in Adult
Brain of Genetic Serine Deficiency Model Mice

Shigeki FURUYA

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Dietary ingestion of soy proteins has been proven successful at improving several disease-related parameters including blood pressure and insulin sensitivity. However, the effects of dietary soy proteins on brain are less well described. The aim of this study was to assess effects of dietary soy peptide administration on free amino acid levels in the brain of genetic serine deficiency model and C57BL/6 wild type mice. We compared the effects of oral ingestion of soy peptide mixture (Hinute-AM), which is mainly composed of di- and tripeptides, and L-serine alone at a equimolar concentration of that in Hinute-AM. After 9 hours' free oral ingestion of Hinute-AM or L-serine solution, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, cerebellum, and blood were sampled to analyze amino acid concentrations. L- and D-Serine contents in the brain of genetic serine deficiency model mice, which were markedly lower compared to that of C57BL/6 mice, were more increased after ingestion of L-serine in four brain regions examined, compared to Hinute-AM. However, the ingestion of Hinute-AM significantly enhance tissue contents of some amino acids including branched-chain amino acids and some neurotransmitters/modulators in the cerebral cortex and hippocampus of the model mice. The L-serine ingestion did not alter these amino acids. We observed similar effects of Hinute-AM on the amino acid contents in the cerebral cortex and hippocampus of C57BL/6 mice. The present observations leads to the possibility that increased amino acids derived from soy peptides may have some beneficial effects on brain functions. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 109-115, 2010.

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

Key words : soy peptide, serine deficiency, brain, disease model, D,L-amino acid analysis.

可欠(非必須)アミノ酸であるセリンは哺乳動物体内で比較的大量に合成されるが¹⁾, 内在性合成の生理的意義や組織特異機能との関連は, 1990年代後半までほとんど未解明のままであった。セリンの生理機能が進まなかった最大の理由は, 可欠アミノ酸では実験動物レベルでの栄養介入実験を行っても劇的に体内含量を変化させることは難しいことが挙げられる。我々は神経細胞の初代培養系を検討している過程で, 単離神経細胞に対してL-セリンが神経栄養活性を持ち, アストロサイトから細胞外に活発に放出されていることを見いだした^{2, 3)}。さらに解糖系中間体3-ホスホグリセリン酸からセリン合成を開始する「リン酸化経路」の初発酵素である3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素(Phgdh)が中枢神経系では胎児期から成熟期にかけて放射状グリア/アストロサイトとして知られるグリア細胞の系譜に選択的に発現し, 神経細胞では転写レベルで抑制されていることを明らかにした^{3, 4)}。培養条件下で神経栄養活性として観察された単離神経細胞のL-セリン要求性は, この細胞タイプ別のPhgdh発現に起因すると考えられる。これらの発見を踏まえ, 動物体内でのL-セリン合成の生理的意義解明を目的に, 我々はPhgdh遺伝子のKOマウスを作成し表現型の解析を行ってきた。全組織でPhgdh遺伝子を不活性化したKOマウスは, 胚発生中期に全身レベルの発達遅滞と脳形態形成の異常を呈し⁵⁾, 組織内のL-セリン含量は野生型の10%以下に激減していた⁶⁾。さらにグリシンも残存含量は30%程度であった。以上の結果より, マウス胚内ではリン酸化経路による内在性合成がL-セリンの主要な供給源であり, グリシンもL-セリンを主な前駆体として合成されていることが示された。さらに予想外であったことに, 全てのKO胚が胎生14日以降に致死となった⁵⁾。これらの表現型は, 胚内でリン酸化経路によって合成されるL-セリンが発達と生存の維持に不可欠であり, その合成能を失った個体は胎生後期にかけて淘汰されることを示している。

マウスだけでなく, ヒトにおいても遺伝性セリン合成不全疾患からリン酸化経路による内在性L-セリン合成の重要性は示されている。リン酸化経路を構成する酵素PHGDH, PSAT, PSPHのいずれかに塩基置換変異によって酵素活性または安定性が低下することにより, 血清や脳脊髄液でL-セリン濃度が低下する。同疾患患者は生後ほぼ全員が共通に小頭症, 精神運動

発達遅滞, および難治性痙攣発作など重度の神経発達障害を呈す⁷⁾。経口投与によってセリン(0.1 ~ 0.5 g/kg体重)を補充すると神経症状は改善され, 精神運動発達遅滞も回避できる。しかし補充療法は生後早期から開始して継続する必要がある。診断が遅れると小頭症は改善するが精神運動発達遅滞は回避できない。これまでにセリン合成不全疾患と診断された患者に対し補充療法が続けられているが, 同疾患の発見が比較的最近のため, いずれもまだ成人に達していない。ヒト以外の哺乳類成獣の場合, L-セリンの血液脳関門透過効率は著しく低いことが知られており⁸⁾, 経口補充療法が成人後も安定して効果を示すかは不明である。そのため, 詳細な実験動物レベルの検討が必要である。しかし全組織でPhgdhを不活性化されたKOマウスは胎生致死となったため, 厳密にはヒトセリン合成不全疾患のモデル動物としては扱えない。

そこで我々は同疾患の神経病態を再現した疾患モデルマウスの作成と解析を目的とし, Cre-lox/P組換システムを用いて脳特異的Phgdh KOマウスの作成を行った。その結果, 同マウスは胎生致死を免れて出生するが, 成獣脳はL-セリンおよびグリシンの含量低下を伴った小頭症を発症することを見いだした⁹⁾。これらの表現型はヒト疾患の主要病態と一致することから, この脳特異的KOマウスは病態モデルに相当すると判断した。またDL-アミノ酸分析により, 同マウスは脳内でNMDA型グルタミン酸受容体イオンチャンネルの活性化に必要なコアゴニスト(活性化因子)であるD-セリン含量も激減していることも確認した⁹⁾。そこで我々は同マウスを生体スクリーニング系として利用し, 経口摂取によって脳内L-またはD-セリン含量を増加させる食品成分の探索を進めている。

本研究では食品添加成分として多方面に用いられている大豆ペプチドを取り上げ, その摂取によるCKO脳内L,D-セリンおよび他のアミノ酸含量への効果を定量的に検討した。大豆ペプチドは主成分がジペプチドやトリペプチドであり, 低抗原性であることから安全に摂取できるため, 各種食品添加として幅広く応用されている。ジペプチドやトリペプチドはアミノ酸単体と細胞膜上の輸送体が異なり, 基質配列特異性が低いペプチドトランスポーター(PepT 1, PepT 2)によって輸送される。大豆ペプチドの主成分である11SグロブリンのL-セリン含量は5%であり, 多様なペプチド配

列中に含まれることが考えられた。必須アミノ酸にくらべて血液脳関門の透過効率が低いL-セリンについても、大豆ペプチド中のL-セリンを含む配列を介した脳内含量の増加効果が期待された。また、これまでに大豆ペプチド摂取による脳内アミノ酸含量変化についても報告がない。そこで、L,D-セリンを含む主要アミノ酸について、L-セリン単体摂取の場合と比較検討を行った。

方 法

(1) 動物および遺伝子型同定

動物実験は全て、九州大学農学研究院動物実験委員会の認可を受けている。使用するマウスは、大学が管理している医学部附属動物飼育施設で、12時間明暗サイクル(明期8:00~20:00)、室温25℃の恒温室内で飼育し、20%カゼインを含む市販固形飼料を自由摂取させて飼育した。

脳特異的Phgdh KOマウス(CKOマウス)はPhgdh^{lox/lox}個体に、Albee Messing教授(Univ. Wisconsin)より供与されたhGFAP^{+Cre}トランスジーンを持つトランスジェニックマウスを交配することにより導入して作成した¹⁰⁾。CKOマウスの同定は、ゲノムDNAを鋳型としたpolymerase chain reaction法(PCR)により、hGFAP^{+Cre}トランスジーンに特異的なプライマーによって行った^{5,9)}。

(2) 大豆ペプチド溶液の調製と投与

大豆ペプチドは不二製油株式会社から提供されたHinute-AMを使用した。提供された大豆ペプチドは、主に11Sおよび7Sグロブリンを酵素分解したペプチドである。Hinute-AMの粉末をRO水に溶かした35%(w/v)溶液を調製して投与に使用した。さらに、比較投与したL-セリン単体溶液の濃度は、11Sグロブリンのアミノ酸組成を基に35%(w/v)Hinute-AM溶液のセリン濃度を概算し、150 mMとした。

動物飼育施設よりCKOマウスを搬出後、同日の18時より給水を止め、24時に大豆ペプチド(n=5)またはセリン溶液(n=4)を自由摂取できるようにケージに配置した。固形飼料に含まれるカゼイン由来アミノ酸の影響を排除するために給餌は行わず絶食させた。対照として大豆ペプチドとセリン溶液の作成に用いた逆浸透圧膜(RO)水と同じスケジュールで与えた(n=6)。翌朝9時に解剖を行った。

(3) 脳組織アミノ酸濃度測定サンプルの調製

CKOマウス脳から大脳皮質、海馬、小脳、視床下部の分析サンプル調製は、以下の手順で行った。採取し

た各領域の湿重量を測定後、湿重量1 mgあたり5 μ LのH₂Oを加え、ホモジナイズ後遠心分離(15,000 rpm, 30分)を行い、上清を得て2.5 μ Lの過塩素酸を加え、水中に15~30分間静置した。その後遠心分離(15,000 rpm, 20分)し上清を得た。上清を8N KOHでpH7に中和後、再度遠心分離(15,000 rpm, 10分)を行い、上清をアミノ酸分析に供した。

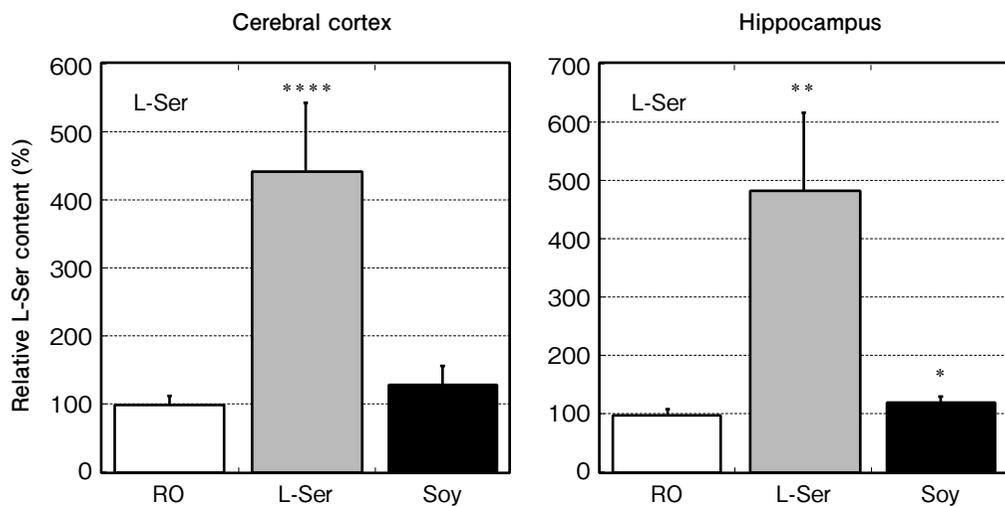
(4) 遊離L,D-アミノ酸の測定

遊離L,D-アミノ酸濃度測定は九州大学大学院農学研究院・生命機能科学専攻・微生物遺伝子工学分野の大島敏久教授が所有するACQUITY UPLC (Waters)を使用して測定した。測定にはOPA-NAC試薬を用いた。各アミノ酸濃度はRO水投与の対照群で測定された組織内含量(nmol/mg wet tissue)に対する相対変化でグラフ化した。統計解析には、KaleidaGraph 4.0を用い、RO水投与群に対する処理群での変化について有意差をDunnet法により検定した。

結果と考察

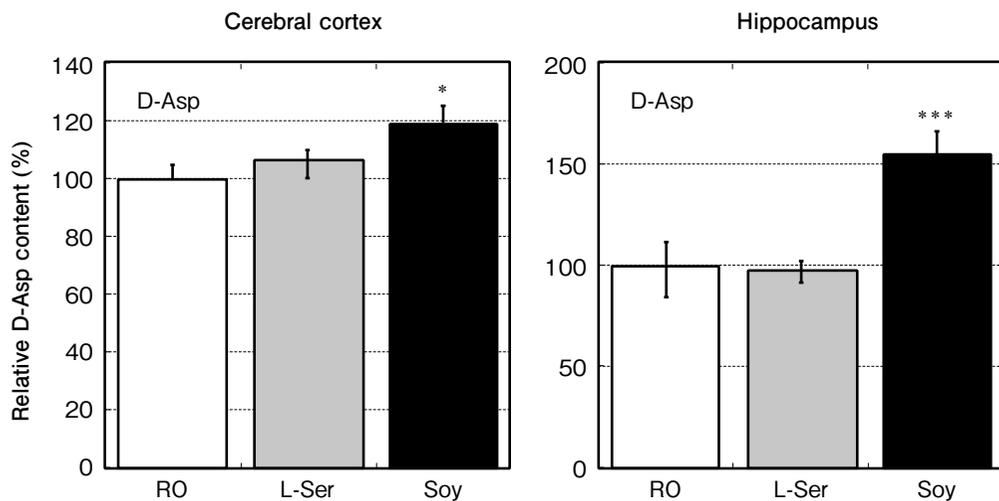
大豆ペプチドの投与は、35%(w/v) Hinute-AM溶液の自由摂取(9時間)によって行った。摂取後のCKOマウスから大脳皮質、海馬、視床下部および小脳を取出しL,D-セリンおよび他主要アミノ酸含量について、同条件で摂取させたセリン単体溶液(150 mM)の場合と比較した。L-セリン含量は、L-セリン溶液投与群において大脳皮質と海馬で対照の4.4倍($p < 0.005$)、5.0倍増加($p = 0.06$)したのに対し、大豆ペプチド投与ではそれぞれ1.3倍程度しか増加しなかった(Fig. 1)。しかし海馬での含量増加は統計学的に有意な変化であった($p < 0.05$)。D-セリンについては、両摂取群とも有意な含量増加は認められなかった。この傾向は視床下部と小脳においても観察された。ただし視床下部ではL-セリン溶液投与群においてD-セリンが有意に増加した(3.6倍, $p < 0.05$)。

今回用いた実験条件では、大豆ペプチド摂取によるL,D-セリン含量増加効果を観察できなかった。しかし、他のアミノ酸について興味深い変化を見いだした。CKOマウス大脳皮質と海馬において、D-アスパラギン酸がそれぞれ1.2倍($p < 0.05$)、1.6倍($p < 0.01$)に増加していた(Fig. 2)。グルタミンも大脳皮質と海馬でそれぞれ1.3倍($p < 0.01$)、1.8倍($p < 0.01$)の含量増加を検出した。さらに分岐鎖アミノ酸も両領域で有意な含量増加を確認した。イソロイシン、バリンのいずれについても大脳皮質に比べ海馬での含量増加が著しく、それぞれ対照に比べ1.7倍($p < 0.01$)、1.8倍($p < 0.01$)、1.8



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ (versus RO group)

Fig. 1. Effect of soy peptide ingestion on L-serine content in cerebral cortex and hippocampus of brain-specific *Phgdh* KO mouse. Abbreviations (RO: control group, L-Ser: L-serine-ingested group, Soy: soy peptide-ingested group)



* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ (versus RO group)

Fig. 2. Effect of soy peptide ingestion on D-aspartate content in cerebral cortex and hippocampus of brain-specific *Phgdh* KO mouse. Abbreviations (RO: control group, L-Ser: L-serine-ingested group, Soy: soy peptide-ingested group)

倍 ($p < 0.01$) に増えていた。Fig. 3にロイシンとバリンの結果を示す。これらのアミノ酸以外に、海馬でのみ有意に含量が増加したアミノ酸として以下が同定された：L-アスパラギン酸(1.4倍, $p < 0.05$)、L-グルタミン酸(1.4倍, $p < 0.05$)、L-アルギニン(1.4倍, $p < 0.05$)、L-アラニン(1.4倍, $p < 0.05$)、タウリン(1.4倍, $p < 0.05$)、GABA(1.4倍, $p < 0.05$)。L-セリン溶液投与群で上記のアミノ酸について有意な変化を認めなかった。

L,D-セリン以外のアミノ酸について、小脳と視床下部でも大豆ペプチド摂取の効果を検討したところ、グルタミン、バリン、D-アスパラギン酸が小脳で有意に増加していた ($p < 0.05$)。上記アミノ酸に加え、チロシンは測定した4領域すべてで増加する傾向を示した ($p < 0.1$)。他のアミノ酸についてはいずれの領域でも有意な変化は検出されなかった。

脳内L,D-セリン含量増加効果について、大豆ペプチド摂取は期待された効果を示さなかったが、脳機能

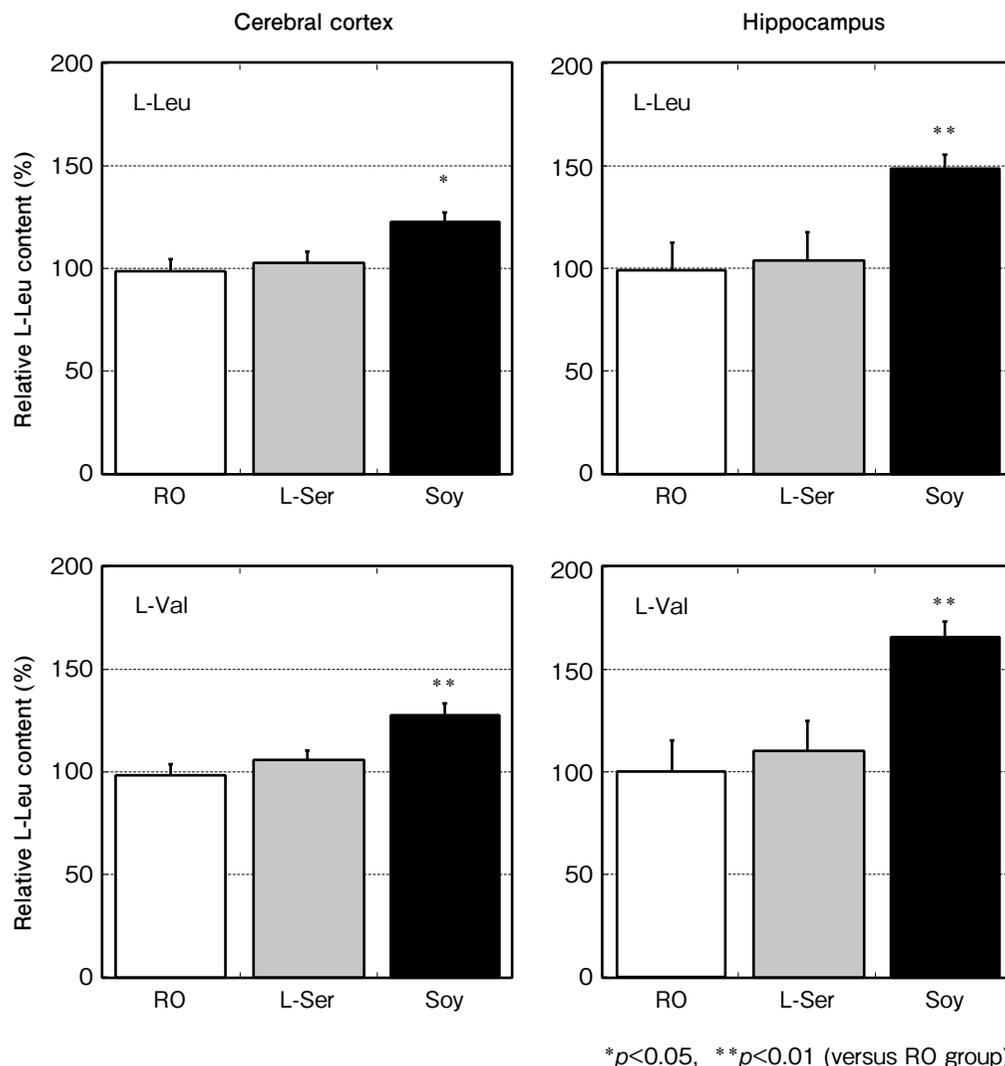


Fig. 3. Effect of soy peptide ingestion on L-Leu and L-Val contents in cerebral cortex and hippocampus of brain-specific *Phgdh* KO mouse. Abbreviations (RO: control group, L-Ser: L-serine-ingested group, Soy: soy peptide-ingested group)

に関連する幾つかのアミノ酸の含量を増加させた。これらのアミノ酸の中でも、グルタミン酸、GABA、分岐鎖アミノ酸およびD-アスパラギン酸は、脳の神経情報伝達や再生・修復に関与し得る点が特に興味深い。グルタミン酸とGABAはそれぞれ興奮性、抑制性の神経伝達物質である。さらにグルタミン酸はセリンの生合成に際しては主要なアミノ基供給源であるため、その含量増加は間接的にL-セリン合成レベルに影響を与える可能性がある。分岐鎖アミノ酸は主要な窒素源として脳内でのグルタミン酸合成に必要である¹¹⁾。さらに近年の報告では、経口投与により物理的な脳損傷からの認知機能回復を促進することが示されている¹²⁾。D-アスパラギン酸はNMDA型グルタミン酸受容体の内因性アゴニストであり、近年の報告では経口投与により老化による海馬のシナプス可塑性減少を回復できることが報告されている¹³⁾。また、海馬での成体神経幹細胞から分化する新生ニューロンの生存と突起

伸長にもD-アスパラギン酸の供給が必要であることが動物実験で示されている¹⁴⁾。

本研究により、大豆ペプチド摂取によって脳機能に重要な役割を果たすアミノ酸の脳内遊離含量が増加することが示された。我々は野生型マウスについても同様の解析を行い、グルタミン酸、分岐鎖アミノ酸、およびD-アスパラギン酸についてはCKOマウス同様に大豆ペプチド摂取後の脳内含量が有意に増加することを確認している。すなわち今回得られた結果はCKOマウスに特異的な現象ではない。大豆ペプチド摂取は、これらのアミノ酸含量を増加させることにより、中枢神経系の生理機能促進または機能低下予防に有益な効果を持つ可能性がある。本研究の成果を踏まえ、大豆ペプチド摂取による神経系への作用について、今後は培養系や行動レベルでの実験を含む神経科学的研究が必要となるであろう。

要 約

脳特異的Phgdh KOマウスに大豆ペプチドを飲水摂取させることにより、特定のアミノ酸の脳内含量を有意に増加した。同様の効果は野生型マウス脳においても認められた。これらのアミノ酸には分岐鎖アミノ酸、グルタミン酸、D-アスパラギン酸など、脳神経系の機能促進や保護作用を持つものが含まれていた。本研究課題遂行の帰結として、大豆ペプチド摂取がアミノ酸含量増加を介して脳機能に有益な効果を持つ可能性が示された。

謝 辞

アミノ酸分析に関しご指導いただいた大島敏久教授(九州大学大学院農学研究院)および大島研究室の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) Snell K (1984): Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Adv Enzyme Regul*, **22**, 325-400.
- 2) Mitoma J, Furuya S and Hirabayashi Y (1998): A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: Non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons. *Neurosci Res*, **30**, 195-199.
- 3) Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, Makino A, Yamamoto T, Watanabe M, Kano M and Hirabayashi Y (2000): L-Serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 11528-11533.
- 4) Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y and Watanabe M (2001): 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *J Neurosci*, **21**, 7691-7704.
- 5) Yoshida K, Furuya S, Osuka S, Mitoma J, Shinoda Y, Watanabe M, Azuma N, Tanaka

- H, Hashikawa T, Itohara S and Hirabayashi Y (2004): Targeted disruption of the mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene causes severe neurodevelopmental defects and results in embryonic lethality. *J Biol Chem*, **279**, 3573-3577.
- 6) Furuya S, Yoshida K, Kawakami Y, Yang JH, Sayano T, Azuma N, Tanaka H, Kuhara S and Hirabayashi Y (2008): Inactivation of the 3-phosphoglycerate dehydrogenase gene in mice: changes in gene expression and associated regulatory networks resulting from serine deficiency. *Funct Integr Genomics*, **8**, 235-249.
- 7) Tabatabaie L, Klomp LW, Berger R and de Koning TJ (2010): L-Serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders. *Mol Genet Metab*, **99**, 256-262.
- 8) Lefauconnier JM and Trouve R (1983): Developmental changes in the pattern of amino acid transport at the blood-brain barrier in rats. *Brain Res*, **282**, 175-182.
- 9) Yang J, Wada A, Yoshida K, Miyoshi Y, Sayano T, Esaki K, Kinoshita OM, Tomonaga S, Azuma N, Watanabe M, Hamase K, Zaitu K, Machida T, Messing A, Itohara S, Hirabayashi Y and Furuya S (2010): Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an NMDA receptor co-agonist, in adult brain. *J Biol Chem*, in press
- 10) Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K and Messing A (2001): hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis*, **31**, 85-94.
- 11) Sakai R, Cohen DM, Henry JF, Burrin DG and Reeds PJ (2004): Leucine-nitrogen metabolism in the brain of conscious rats: its role as a nitrogen carrier in glutamate synthesis in glial and neuronal metabolic compartments. *J Neurochem*, **88**, 612-622.
- 12) Cole JT, Mitala CM, Kundu S, Verma A, Elkind JA, Nissim I and Cohen AS (2010): Dietary branched chain amino acids ameliorate injury-induced cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 366-371.
- 13) Errico F, Nisticò R, Napolitano F, Mazzola C, Astone D, Pisapia T, Giustizieri M, D'Aniello A, Mercuri NB and Usiello A (2010): Increased D-aspartate brain content rescues hippocampal age-related synaptic plasticity deterioration of mice. *Neurobiol Aging*, in press
- 14) Kim PM, Duan X, Huang AS, Liu CY, Ming GL, Song H and Snyder SH (2010): Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 3175-3179.