

環状テアニンの脳線条体からの脳内神経伝達物質の放出に及ぼす影響について

寺島 健彦 (常葉大学 健康プロデュース学部, terasima@hm.tokoha-u.ac.jp)

山崎 美咲 (中部大学 応用生物学部, mi-5.zkym@docomo.ne.jp)

吉田 真夕 (中部大学 応用生物学部, snoopy.12.0620@i.softbank.jp)

陽東 藍 (静岡県立大学 食品栄養環境科学研究所, gp1485@u-shizuoka-ken.ac.jp)

渡辺 裕美 (日研フード株式会社 研究開発部, sinkinousyuhin@nikkenfoods.co.jp)

九島 祥弘 (日研フード株式会社 研究開発部, sinkinousyuhin@nikkenfoods.co.jp)

衛藤 英男 (静岡大学, srqe4yj@qc.commufa.jp)

横越 英彦 (中部大学 応用生物学部, h.yokogoshi@gmail.com)

Effect of cyclic theanine on the release of neurotransmitters from the striatum in the brain

Takehiko Terashima (Department of Health and Nutritional Sciences, Tokoha University, Japan)

Misaki Yamazaki (Department of Food & Nutritional Sciences, Chubu University, Japan)

Mayu Yoshida (Department of Food & Nutritional Sciences, Chubu University, Japan)

Ai Yoto (Graduate Division of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, Japan)

Hiroki Watanabe (R&D Department, Nikken Food Co., Ltd., Japan)

Yoshihiro Kushima (R&D Department, Nikken Food Co., Ltd., Japan)

Hideo Eto (Shizuoka University, Japan)

Hidehiko Yokogoshi (Chubu University, Japan)

要約

緑茶特有のアミノ酸であるテアニン (γ -グルタミルエチルアミド) には脳内神経伝達物質を変動させ、記憶・学習能の改善や、ヒト試験ではアルファ波の放出作用を有することなどを明らかにしてきた。テアニンをはじめとした茶葉に含まれる有効成分を効率よく抽出することが、期待される。茶葉を亜臨界水抽出することにより、テアニンは環状テアニンとして抽出される。そこで、テアニンと環状テアニンとの生理機能を比較するために神経伝達物質の面から調べた。環状テアニンは腸管から吸収され、脳内神経伝達物質に影響を及ぼす可能性が示唆されたので、脳線条体切片からのドーパミン放出を調べた結果、テアニンよりもその作用の強いことが示唆された。テアニンよりも呈味性の強いことから、今後の食品開発への利用が期待される。

キーワード

環状テアニン, 亜臨界水抽出, 脳内神経伝達物質, ドーパミン, 脳切片浸漬法

1. はじめに

これまで各種栄養素、食品成分、栄養条件、ある種の病的状態、また、ストレス負荷時などに、比較的容易に脳内の物質代謝や脳内神経伝達物質が変化し、また、ある種の行動も影響を受けることを明らかにしてきた (Yokogoshi and Terashima, 2000; Yokogoshi et al., 1998)。特に、緑茶に関しては、緑茶特有のアミノ酸であり旨味成分と考えられているテアニン (γ -グルタミルメチルアミド) が、脳内の神経伝達物質であるドーパミン放出を上昇させ、血圧降下作用や脳神経細胞保護作用に加え、動物実験での記憶・学習能の向上や (Yokogoshi et al., 1998; 横越他, 2005; Yamada et al., 2009)、ヒトボランティア試験では脳波の内、 α 波の放出を促進し、お茶を摂取したときのリラクゼーションに関わっていることを明らかにしてきた (Juneja et al., 1999)。緑茶にはカテキン、カフェイン、テアニン、ビタミン、ミネラル、食物繊維など、われわれの健康維持に関わる多くの有効成分が含まれており、それらの機能性成分を効率よく抽出することは、緑茶の保健機能を高めるために有効である。近年開発されてきた新しい食品加工技術である連続式亜臨界水抽出法を用いて (衛藤, 2016)、

緑茶成分を抽出したところ、アミノ酸については一部環状化したアミノ酸が抽出され、テアニンについては環状化した環状テアニン (サイクリックテアニン) が得られる。テアニンは、緑茶の旨味成分であるので味覚センサーを用いてサイクリックテアニンを比較した結果では、テアニンよりも旨味・苦味・収斂性の高いことが示された (Miyashita et al., 2014)。また、高血圧の予防と関係するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性もテアニンよりも強いことが報告されている (宮下他, 2015)。そこで、脳神経系への影響を調べるために、まず、脳内神経伝達物質代謝について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

亜臨界水抽出は、通常の熱水抽出に比べて高温、高圧、短時間で有用成分を高濃度に抽出できる。水は、374.2 °C・22.1 MPa 以上の高温・高圧状態では、液体とも気体とも言えない超臨界状態となる。これを超臨界水と呼び、それよりやや低温・低圧で液体状態にある水を「亜臨界水」と呼んでいる (図1) (衛藤, 2016)。

この状態では、優れた成分抽出作用と強い加水分解作用があり、テアニンから環状テアニンを生成することができる。今回研究に用いる環状テアニンは、テアニンを亜臨界水抽出することにより生じた、エチル基のついた無色・油状の物質

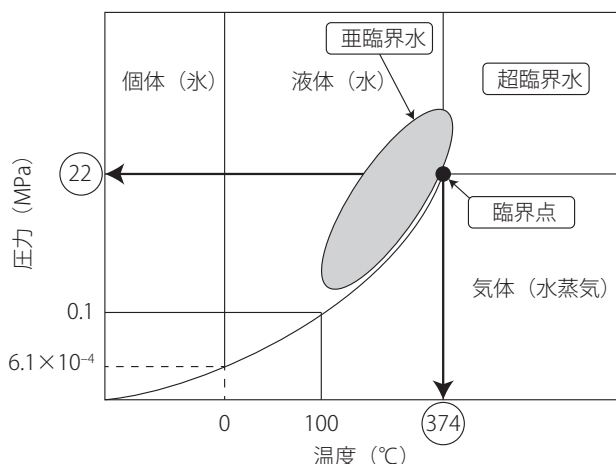


図1：水の状態図

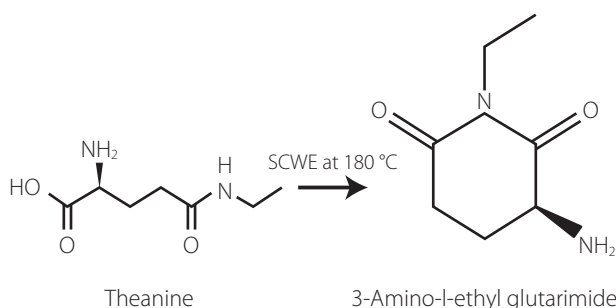


図2：環状テアニンの構造式

である(図2)。

2.2 実験 1: 環状テアニンは吸収されるか

経口投与された環状テアニンが腸管から吸収されるか、また、血液脳関門を介して脳に取り込まれるかを調べた。なぜなら、これまでの研究でテアニンは腸管から吸収され、血流に乗り、脳に取り込まれ、また、脳内神経伝達物質に影響を及ぼし、特に、脳線条体からのドーパミン放出に影響を及ぼすことを明らかにしている (Yamada et al., 2009)。そこで、Wistar系雄ラット (9匹、平均体重 200 g) に環状テアニン (140 mg/1.5 ml/rat、生理食塩水で溶解) を経口投与し、0、1、3 時間後にそれぞれ 3 匹ずつ断頭屠殺し、血液から血清を得た。また、速やかに脳を摘出した後、大脳皮質、線条体、海馬を分画し測定まで -80°C で冷凍保存した。血清については、蒸留水で 100 倍に希釈し、MeOH を等量混和した後、 4°C 、15,000 g、15 分間遠心分離した。得られた上清中の環状テアニン量を、LC/MS/MS (UPLC: Inert Sustain AQ-C18 column, MS: LTQ Orbitrap) を用いて定量した。脳の分画については、環状テアニンが何らかの影響を与えているかを調べるため、神経伝達物質であるモノアミン量を、高速液体クロマトグラフィー法で分析した。カラムは EICOMPAK SC-50DS (3.0 mm \times 150 mm; エイコム製)、流速 0.5 mL/min、カラム温度 32°C 、電化検出器は Coulochem III (esa 社)、Analytical Cell として Model 5010 (450 mV) で分析した。移動相は 0.1 M 酢

酸-クエン酸緩衝液 (pH3.5) 85 %、メタノール 15 %、EDTA 5 mg/ml、SOS 200 mg/L の組成を用い分析した。

2.3 実験 2: 脳線条体からのドーパミン放出に及ぼす環状テアニンの影響

テアニンは脳線条体からのドーパミン放出を促進し、また、動物実験では各種の記憶・学習能を改善し (寺島他, 2000)、ヒト試験では睡眠改善効果などを示すので (小関他, 2004)、環状テアニンにも同様の効果があるのかを比較検討した。用いた手法は、脳切片浸漬法であり、脳の切片を作成し、作成した脳切片を緩衝液 (クレブスバッファー) に入れ、サンプルとしてテアニン、環状テアニンを加えることで脳から放出される神経伝達物質を測定する方法である (図3) (福本他, 2006)。

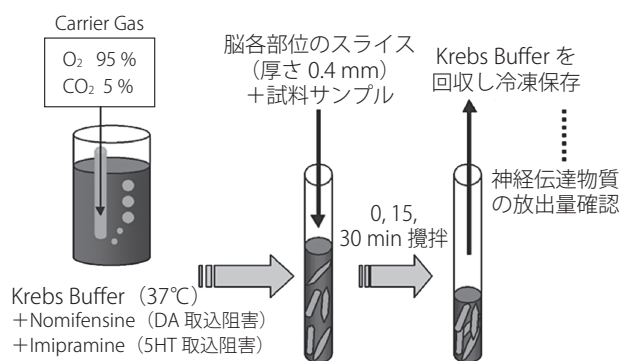


図3：脳切片浸漬法の概要

放出された脳内神経伝達物質の濃度によって評価が可能で、今回は実験1同様、高速液体クロマトグラフィーにより脳線条体からのドーパミン放出量を測定した。Wistar系雄ラット (15匹、平均体重 212 g) を用い、断頭により屠殺後、すばやく脳線条体を分画し、ティッシュチョッパー (ML-100; メイワフォーシス) 上にセットし、0.4 mm厚にスライスした。切片を緩衝液 (36°C 、混合気体 (O_2 -95 %, CO_2 -5 % で飽和)) に入れ、細い毛筆で各エッペンチューブに分配した。緩衝液 (1,000 ml) の組成は、NaCl: 121.0 mM、 MgCl_2 : 1.2 mM、CaCl: 1.3 mM、 NaHCO_3 : 25 mM、 NaH_2PO_4 : 1.0 mM、グルコース: 10.0 mM、KCl: 13.5 mM、Nomifensine: 10 μM 、Imipramine: 50 μM 、L-チロシン: 50 μM 、L-トリプトファン: 10 μM である。脳線条体切片の入ったエッペンチューブ (400 μL) に、テアニン (0.2 M、2.0 M)、または、環状テアニン (0.2 M、2.0 M) を 100 μL 投与 (チューブ内濃度は、4 μmol 及び 40 μmol) し、 36°C の恒温にて 0分、15分及び 30分間放置後、上澄み液を採取し測定用試料とした。また、各チューブで用いた脳線条体の重量を測定し、ドーパミン放出量の補正に用いた。

3. 結果及び考察

3.1 実験 1: 環状テアニンは腸管から吸収され、脳内物質に影響を与えるか

環状テアニンを投与したラットの血清を調べた結果、各ラットの血清において表1に示したような検出パターンが見られた。

表1：環状テアニン投与後の各ラット血清中環状テアニンの検出パターン

投与後	0時間	1時間	3時間
ND		0.203 mg/ml	0.053 mg/ml
ND		0.107 mg/ml	0.051 mg/ml
ND		0.119 mg/ml	0.061 mg/ml

このことから環状テアニンはテアニンと同様に、腸管から吸収されると考えられた。そこで吸収された環状テアニンが、脳内物質に影響を及ぼすかを検討した。図4に、脳線条体のカテコールアミン量を示した。

ドーパミンは3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) を経て、ホモバニリン酸 (HVA) に代謝される。線条体でのドーパミン・DOPACは、環状テアニン投与後1時間までは増加する傾向が見られ、ホモバニリン酸には大きな変動は観察されなかった。このことから、環状テアニンの投与は、ドーパミン代謝に何らかの影響のあることが示された。一方、図5には、大脳皮質、脳線条体、海馬におけるセロトニン(5HT)濃度を示した。

いずれの部位においてもセロトニン濃度は、環状テアニン投与1時間後に高値を示した。以上の結果、環状テアニンの投与により、脳内神経伝達物質(ドーパミン、セロトニン)が何らかの影響を受けていることが示唆された。このことは、

環状テアニンがテアニンと同様に、血液脳関門を介して脳内に取り込まれる可能性を示唆すると思われた。

3.2 実験2：環状テアニンは脳線条体からのドーパミン放出を促進するか

これまでの研究結果から、テアニンはドーパミン作動性神経の幾つかの受容体を介して、ドーパミン放出を促進することを報告してきた(Yamada et al., 2005)。今回、環状テアニンにも同様の作用があるかを脳切片浸漬法で調べた。クレブス緩衝液(脳脊髄液)中に脳線条体切片を入れたエッペンチューブに、濃度を変えたテアニン及び環状テアニンを加え、0、15、30分後の緩衝液を回収し、そこに放出されたドーパミン量を高速液体クロマトグラフィーで分析した。どのサンプルも15分、30分と時間経過にともない、ドーパミン量が増えていたので、0分の時の値を100%として、15、30分後の値の増加量を比較した(図6)。

テアニンについては、15、30分後とも、4 μmolより40 μmolの方がドーパミン放出量の多いことが確認できた。環状テアニンについても、15分よりも30分後の方が多くのドーパミン量が観察され、その量は4 μmolに比べ40 μmol投与の方がより多かった。しかし投与15分後の濃度による顕著な差異は見られなかった。テアニンと環状テアニンとの影響の違いとしては、15分後では顕著な違いは見られなかったが、30

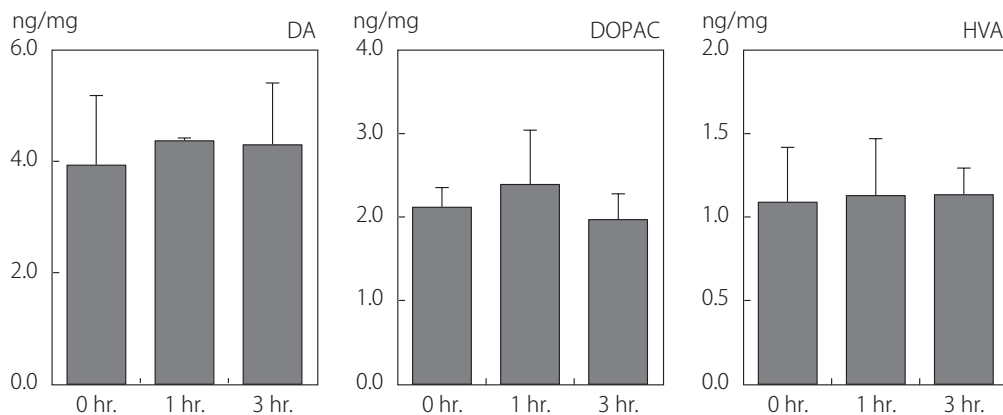


図4：環状テアニン投与後の脳線条体のカテコールアミン含量

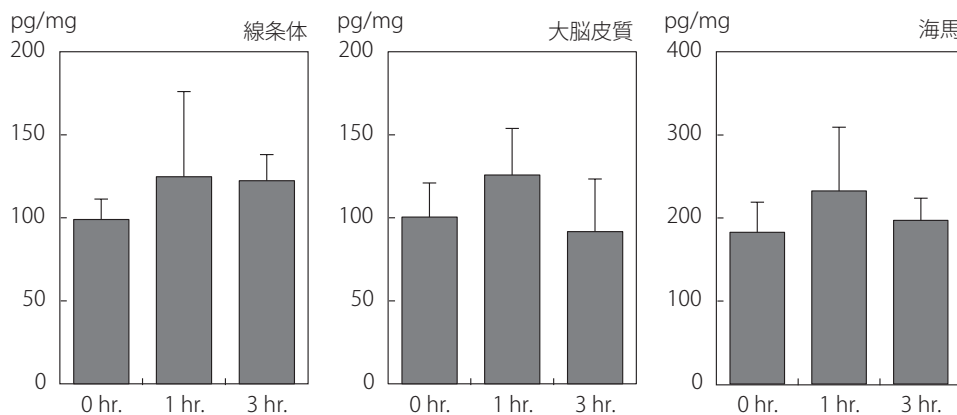


図5：環状テアニン投与後の脳線条体、大脳皮質、海馬のセロトニン含量

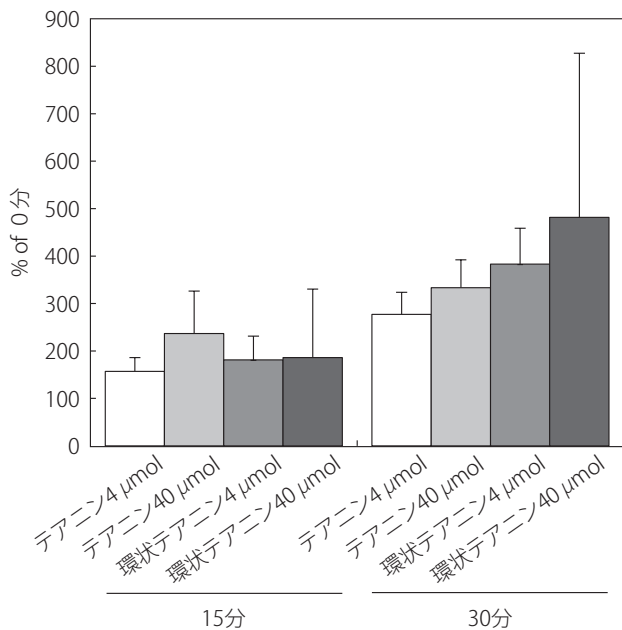


図6：脳切片浸漬法を用いたテアニン、環状テアニン投与後の脳線条体からのドーパミン放出量の変化

分後は環状テアニンの投与によるドーパミン放出作用の大きいことが観察され、その作用は濃度依存的であった。

4. まとめ

緑茶中には、ビタミン、ミネラル、食物繊維の他に、中枢神経系にも影響を及ぼすカフェイン、カテキン、テアニンなど、多くの生理活性を有する成分が含まれている。その中で、これまで、緑茶の旨味成分とも言われているテアニンが、動物実験では脳内神経伝達物質を変動させ、また、幾つかの記憶・学習試験での改善が観察された（寺島他, 2000; Yokogoshi and Terashima, 2000; Yokogoshi et al., 1998）。また、ヒトボランティア試験では脳波のうちのアルファ波の放出頻度を高める作用のあることを明らかにした（Juneja et al., 1999）。緑茶は多くの効能を有することから、効率よく有効成分を抽出することが出来ないかと考え亜臨界水抽出を試したところ、一部のアミノ酸の環状化が観察され、テアニンについても環状テアニンが抽出された。呈味試験の結果では、テアニンよりも環状テアニンの方が後味などの優れていることが報告されている（Miyashita et al., 2014）。そこで、今回、環状テアニンの生体への吸収性と脳神経伝達物質に及ぼす作用についてテアニンと比較試験を行った。その結果、環状テアニンを投与することで血中へ移行することが明らかとなり、脳内神経伝達物質量が変化することが観察された。また脳切片浸漬法を用いた実験では、環状テアニン投与30分後における脳線条体からのドーパミン放出作用は、テアニンに比べ環状テアニンの方が強いことが示された。環状テアニンは味の面からだけでなく、高血圧予防と関係するアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害作用も強いことから、その生理機能性が期待される。今後は、環状テアニンの機能性としてドーパミン放出作用の機構、また、脳機能としての記憶・学習能や睡眠への影響、そして、食品

成分としての有効性や応用性への検証が必要とされる。

謝辞

環状テアニンの分析についてご教授いただきました、静岡大学大学院 河岸洋和博士に感謝申し上げます。

引用文献

- 衛藤英男 (2016). 新しい食品加工技術である連続式亜臨界水抽出法はどのような食品に応用できるか. *科学・技術研究*, Vol. 5, No. 1, 5-8.
- 福本 修一・澤崎 絵美・寺島 健彦・横越英彦 (2006). 柑橘モノテルペン類摂取がストレス負荷時の脳内カテコールアミン代謝に及ぼす影響. *Aroma Research*, Vol. 7, No. 2, 158-163.
- Juneja, L. R., Chu, D-C., Okubo, T., Nagato, Y., and Yokogoshi, H. (1999). L-theanine,—a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in human. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 10, 199-204.
- Miyashita, T., Okamura, T., Iijima, Y., Suzuki, H., Shibata, D., Takaya, Y., Tanaka, H., and Etoh, H. (2014). (S)-3-Amino-1-ethylglutarimide from green tea (*Camellia sinensis*). *Studies in Science and Technology*, Vol. 3, No. 1, 45-48.
- 宮下知也・横田正・木戸康嗣・岡村拓哉・飯島陽子・鈴木英之・柴田大輔・衛藤英男 (2015). 亜臨界水抽出による緑茶の高品質化. *科学・技術研究*, Vol. 4, No. 1, 95-100.
- 小関 誠・レカラジュ・ジュネジャ・白川 修一郎 (2004). アクチグラフを用いたL-テアニンの睡眠改善効果の検討. *日本生理人類学会誌*, Vol. 9, No. 4, 143-150.
- 寺島健彦・横越英彦 (2000). 緑茶成分(テアニン)の行動科学的解析. *必須アミノ酸研究*, No. 158, 27-37.
- Yamada, T., Terashima, T., Okubo, T., Juneja, L. R., and Yokogoshi, H. (2005). Effects of theanine, γ -glutamylethylamide, on neurotransmitter release and its relationship with glutamic acid neurotransmission. *Nutritional Neuroscience*, Vol. 8, No. 4, 219-222.
- Yamada, T., Terashima, T., Kawano, S., Furuno, R., Okubo, T., Juneja, L. R., and Yokogoshi, H. (2009). Theanine, γ -glutamylethylamide, a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats. *Amino Acids*, Vol. 36, No. 1, 21-27.
- Yokogoshi, H., Kobayashi, M., Mochizuki, M., and Terashima, T. (1998). Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochemical Research*, Vol. 23, 667-673.
- Yokogoshi, H. and Terashima, T. (2000). Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines, striatal dopamine release and some kinds of behavior in rats. *Nutrition*, Vol. 16, 776-781.
- 横越英彦・山田貴史・寺島健彦 (2005). 茶の機能〔10〕お茶と脳機能—病気予防からリラックスまで—. *食品と容器*, Vol. 46, No. 9, 494-501.

(受稿：2017年9月29日 受理：2017年10月4日)