

<平成26年度助成>

アミノ酸代謝調節による嗜好性の制御

福 渡 努

(滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科)

1. 緒 言

健康を維持・増進するうえで適切な食習慣をもつことが重要である。食事内容の選択と摂取量に強く関与する嗜好性と摂食行動を制御することは、食品栄養学、脳神経科学における重要な課題であり、食品産業の発展、食生活の向上・安定に寄与するものと期待できる。

嗜好性の発現にはドーパミン機能が深く関与することが知られている。その一つに報酬効果がある。報酬効果とはあるものをもっと得たいという欲求のことであり、薬物依存に関与する。報酬効果のメカニズムとして、中脳の腹側被蓋野から放出されるドーパミンを大脳基底核の側坐核が受けとることで生じると考えられている。報酬効果は糖質や油脂が豊富に含まれる高嗜好性食品の摂取によっても生じ、この高嗜好性食品に対する報酬効果はドーパミン受容体の抑制によって減少する¹⁻³⁾。

本研究では、食品栄養学および脳神経科学の観点から嗜好性の制御を目指すうえで、トリプトファン代謝産物であるキヌレン酸に着目した。脳内において、キヌレン酸は生理的濃度でNMDA受容体および $\alpha 7$ 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する^{4,5)}。脳内キヌレン酸濃度の上昇によってドーパミン、グルタミン酸などの神経伝達物質の放出が抑制され^{6,7)}、記憶、学習などの高次脳機能が影響を受ける^{8,9)}。さらには、サルにおける脳内キヌレン酸濃度の上昇によって、カンナビノイドによる薬物依存を減少させることが可能であることが示さ

れている¹⁰⁾。我々は、脳内キヌレン酸濃度は食餌の影響を受けることを明らかにした。これは、ラットにおける高トリプトファン食摂取によって、脳内キヌレン酸濃度が上昇し、これによりドーパミンの放出が抑制されたというものである¹¹⁾。

本研究では、嗜好性の発現機序として脳内報酬系回路に着目し、キヌレン酸産生が高嗜好性の食物摂取におよぼす影響を明らかにすることを目的とする。まず、マウスにおけるキヌレニン経口投与による脳内キヌレン酸産生量を明らかにし、この知見に基づいてマウスにおける脳内キヌレン酸濃度の上昇が報酬系を介した食行動におよぼす影響について調べた。さらには、脳内キヌレン酸濃度の上昇が嗜好性形成におよぼす影響について調べた。

2. 方 法

2-1. 動 物

本実験は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℃前後、湿度は50%前後に維持し、明暗サイクルは、午後6時～午前6時を明、午前6時～午後6時を暗とした。BALB/c系雄マウス(6週齢)を日本クレア(株)から購入し、飼料としてオリエンタル酵母(株)のMFを与え、1週間馴化させてから実験に用いた。馴化期間中、飼料および水は自由摂取とした。

2-2. キヌレニン経口投与

ゾンデを用いて、マウスに100mg/kg BWもしくは200mg/kg BWのキヌレニンを強制経口投与した。強制経口投与前、投与後30分、1時間、2

時間、3時間、6時間にマウスを断頭屠殺し、脳を摘出し、採血した。また、マウスに0, 20, 50, 100, 200mg/kg BWのキヌレニン溶液もしくは対照として0.5mol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)を強制経口投与し、投与1時間後に断頭屠殺し、脳を摘出し、採血した。脳から大脳皮質を取り出し、キヌレニン含量をHPLC-UV法¹²⁾で、キヌレニン含量をHPLC-蛍光法¹³⁾で測定した。また、血清中のキヌレニン濃度を測定した。

2.3. 行動実験

報酬効果を評価するために、レバー押し行動を指標としたオペラント条件付けタスク試験を実施した。まず、レバー押しを学習させるトレーニングとして、体重が馴化期間の80～90%となるように食餌摂取時間を3～6時間/日に制限した状態で、一定回数のレバー押しによって試験液を得ることができるFixed Ratio (FR)トレーニングを行った。FRトレーニングは1日1回、30分間とし、試験液として25%コンデンスミルクを用いて、レバー押しを1回行うたびに試験液を得ることができるFR1トレーニングを5日間、続いて5回のレバー押しで試験液を得るFR5トレーニングを2日間実施した。3日間の回復期間ののち、FR5トレーニングを2日間実施した。試験液を得るためのレバー押し回数を増やしていくProgressive Ratio (PR)トレーニングを5日間実施した。レバー押し回数は1, 2, 5, 8, 13・・・と $n^2/2$ 回ずつ増えていくよう設定した。試験液を得てから、15分以内に次の試験液を得ることができなければ、試験終了とした。この時の最大のレバー押し回数をBreakpointと称し、報酬効果の指標とした。25%コンデンスミルクを用いたPRトレーニングの終了後、ミネラルオイルを用いたPRセッションを6日間実施し、6日目におけるミネラルオイルに対するBreakpointを測定した。ミネラルオイルに対するBreakpointの平均値が等しくなるようにマウスを2群に分け、コーン油を用いたPRセッ

ションを6日間実施した。コーン油として、ミネラルオイルで希釈した50%コーン油を用いた。脳内キヌレニン濃度の上昇が報酬効果におよぼす影響を調べる実験では、コーン油を用いたPRセッションを6日間実施したのち、7日目に試験群には200mg/kg BWのキヌレニンを、対照群には0.5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)を強制経口投与し、投与30分後にコーン油に対するPRセッションを実施し、Breakpointを測定した。脳内キヌレニン濃度の上昇が嗜好性形成におよぼす影響を調べる実験では、試験群には200mg/kg BWのキヌレニンを、対照群には0.5mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)を強制経口投与し、投与30分後にコーン油に対するPRセッションを6日間実施した。6日目のPRセッションにおいて、コーン油に対するBreakpointを測定した。

2.4. 統計解析

キヌレニン経口投与による脳内キヌレニンおよびキヌレニン濃度の変動を比較するうえで、一元配置分散分析を行い、差があると推定された際にはTukey法にて多重比較検定を行った。脳内キヌレニン濃度の上昇が報酬効果におよぼす影響を調べる実験、および脳内キヌレニン濃度の上昇が嗜好性形成におよぼす影響を調べる実験では、試験群と対照群のBreakpointについて t -検定を行った。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ を有意水準として、結果を判定した。計算にはGraphPad Prism 5 (GraphPad社)を用いた。

3. 結果

3.1. キヌレニン経口投与による脳内キヌレニンおよびキヌレニン濃度の変動

行動実験において、脳内キヌレニン濃度を上昇させるために、キヌレニン前駆体であるキヌレニンをマウスに経口投与することにした。キヌレニンの投与量と投与後のキヌレニンおよびキヌレニンの体内動態を明らかにするため、マウスに

キヌレニンを経口投与し、脳内のキヌレニンおよびキヌレン酸の濃度を測定した。脳内キヌレン酸濃度は経口投与0.5～1時間後にピークに達し、200 mg/kg BWのキヌレニン投与では投与前の約20倍、100 mg/kg BWのキヌレニン投与では投与前の6倍にまで達した(図1A)。200mg/kg BWのキヌレニン投与では投与3時間後まで50nmol/kgのキヌレン酸濃度を維持したが、100mg/kg BW投与では投与2時間後以降にキヌレン酸濃度は20nmol/kg以下に減少した。キヌレニン濃度は投与0.5～1時間後にピークに達し、その後、速やかに減少した(図1B)。20～200mg/kg BWのキヌレニン経口投与1時間後の脳内キヌレン酸濃度、脳内キヌレニン濃度は、投与量依存的に上昇した(図2)。以上の結果より、高濃度の脳内

キヌレン酸を維持した状態で行動実験を行うために、行動実験を実施する30分前に200 mg/kg BWのキヌレニンを経口投与することにした。

3.2. 脳内キヌレン酸濃度の上昇が報酬効果におよぼす影響

コーン油に対する報酬効果を示すマウスにおいて、キヌレニン経口投与による脳内キヌレニン濃度の上昇が報酬効果におよぼす影響について検討した。対照群では、ミネラルオイルに対するBreakpointが 69 ± 14 回だったが、コーン油を用いた6日間のPRセッション後、溶媒投与後のコーン油に対するBreakpointを測定すると、 158 ± 19 回であった。一方、キヌレニン投与後のコーン油に対するBreakpointは 172 ± 22 回と、キヌレニン投与による影響は認められなかった。

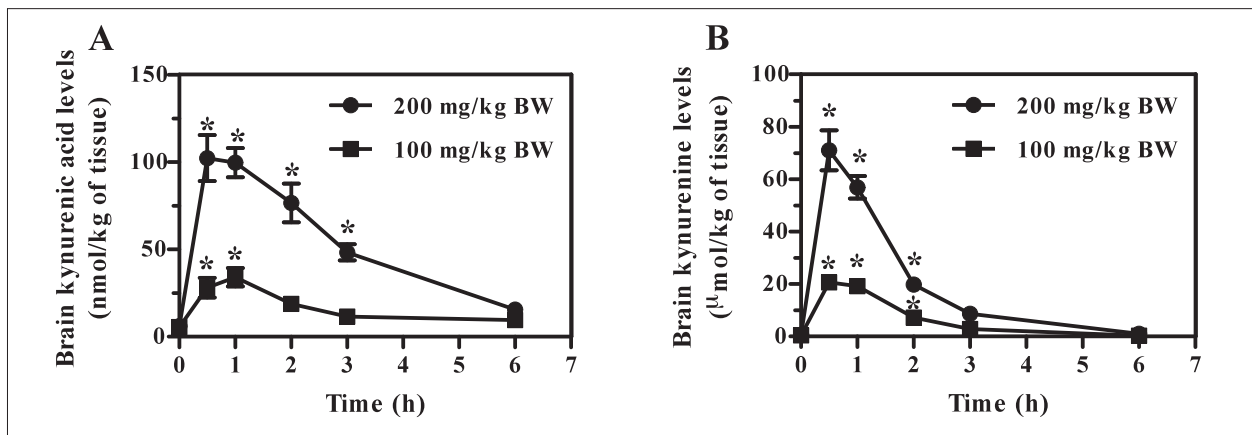


図1 キヌレニン経口投与による脳内キヌレン酸濃度(A)、脳内キヌレニン濃度(B)の経時的変動。値は平均±標準誤差として示した(n=8～10)。*投与前と比較して $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

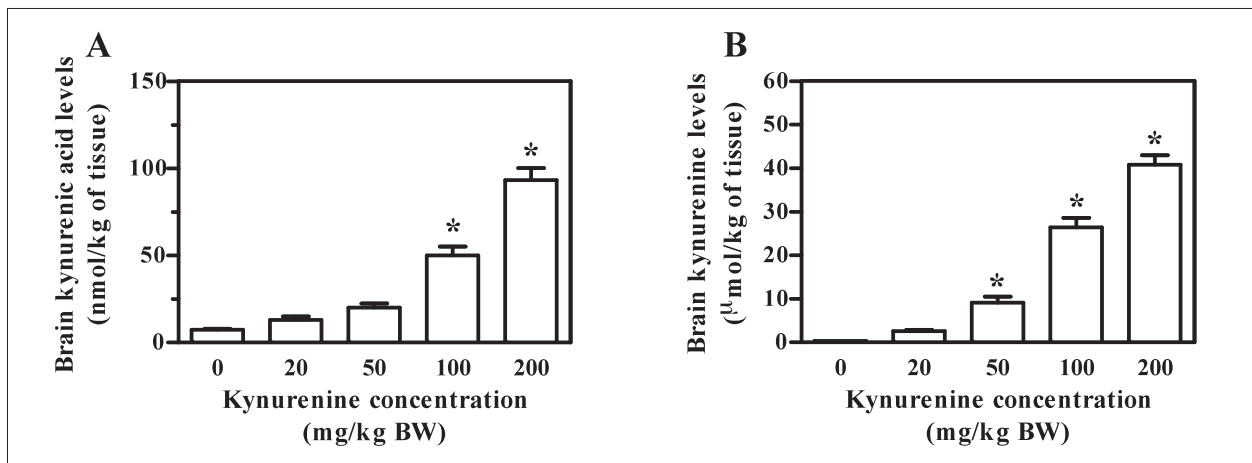


図2 様々な量のキヌレニン投与による脳内キヌレン酸濃度(A)、脳内キヌレニン濃度(B)の変動。値は平均±標準誤差として示した(n=5～6)。*溶媒と比較して $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

3.3. 脳内キヌレン酸濃度の上昇が嗜好性形成におよぼす影響

マウスがコーン油に対する報酬効果を形成する時期にキヌレニンを経口投与することにより、脳内キヌレン酸濃度の上昇が嗜好性形成におよぼす影響について検討した。対照群のマウスでは、ミネラルオイルに対する Breakpoint が 76 ± 16 回だったが、コーン油を用いた6日間のPRセッションによってコーン油に対する Breakpoint は 133 ± 22 回に増加した。一方、キヌレニン経口投与後にコーン油を用いたPRセッションを行ったマウスでは、ミネラルオイルに対する Breakpoint が 78 ± 20 回だったのに対し、コーン油に対する Breakpoint は 74 ± 16 回と増加せず、キヌレニンを投与しなかったマウスより低値を示した(図3)。

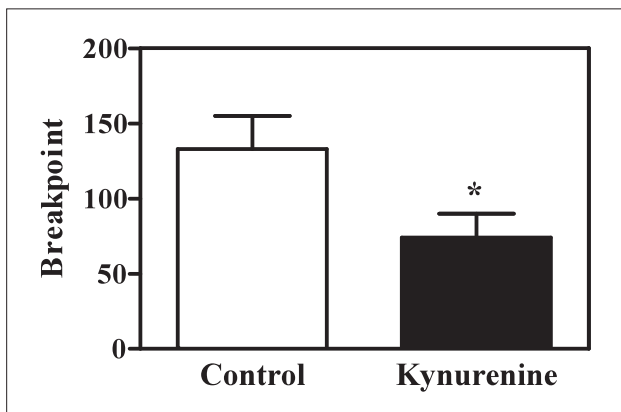


図3 嗜好性形成時のキヌレニン投与がコーン油に対する報酬効果におよぼす影響。値は平均±標準誤差として示した(n=5~10)。*対照群と比較してp<0.05で有意差があることを示す。

4. 考 察

本研究では、食事内容の選択と摂取量に強く関与する嗜好性と摂食行動を制御することを目的として、神経伝達調節因子であるトリプトファン代謝産物キヌレン酸に着目し、マウスにおける脳内キヌレン酸濃度上昇が高嗜好性食物に対する報酬効果におよぼす影響について検討した。まず、キヌレニン投与後のキヌレニンおよびキヌレン酸の体内動態を明らかにするため、マウスにおけるキヌレニン経口投与後の脳内キヌレニン濃度および

キヌレン酸濃度の変動について検討した。キヌレニン経口投与0.5時間後には脳内キヌレン酸濃度は著しく上昇し、高濃度を維持できるキヌレニン投与量は200mg/kg BWであった。この結果に基づき、マウスへの200mg/kg BWのキヌレニン経口投与がコーン油に対する報酬効果におよぼす影響について検討した。報酬効果を評価するために、レバー押し行動を指標としたオペラント条件付けタスク試験を実施した。これは、トレーニングしたマウスを用いて、試料を得るためにレバーを押す回数を測定する評価法である。コーン油に対して強い嗜好性を示すマウスにおいて、脳内キヌレン酸濃度を上昇させてもその嗜好性には影響しなかった。しかし、コーン油に対して嗜好性を形成する期間にキヌレニンを経口投与すると、コーン油に対する嗜好性の形成が抑制された。以上の結果は、脳内キヌレン酸濃度の上昇はすでに形成された嗜好性には影響しないが、嗜好性の形成を阻害することを示している。脳内キヌレン酸濃度を調節することによって嗜好性の形成を制御できる可能性を示している。

脳内キヌレン酸濃度は食餌の影響を受けることが報告されている。ラットに高脂肪-低炭水化物・たんぱく質食を長期間与えると、脳内キヌレン酸濃度が数倍上昇する¹⁴⁾。また、ラットに高トリプトファン食を与えると、脳内キヌレン酸濃度が上昇し、ドーパミンの放出が抑制される¹¹⁾。1.5%トリプトファン添加食の摂取によって脳内キヌレン酸濃度は約50nmol/kgにまで上昇するが、本研究で用いた200mg/kg BWのキヌレニン摂取によって脳内キヌレン酸濃度はより高濃度の約100nmol/kgにまで上昇した。これは、脳内キヌレン酸濃度を上昇させるにはトリプトファンよりもキヌレニンの摂取の方が有効である可能性を示している。本研究では、キヌレニンの単回投与によって脳内キヌレン酸濃度は投与0.5時間後にピークに達し、徐々に減少していった。脳内

キヌレン酸濃度を高濃度に保つことができる時間は、200 mg/kg BWのキヌレニンで3時間まで、100 mg/kg BWのキヌレニンでは2時間までであった。高トリプトファン食の摂取では、脳内キヌレン酸濃度および血清キヌレニン濃度は、一定時間以上維持されていることが推察される。したがって、投与する化合物をキヌレニンとトリプトファンから選択し、投与方法を食餌と単回投与から選択することによって、脳内キヌレン酸濃度を上昇させる程度とその持続時間を自在に調節できる可能性がある。

脳内キヌレン酸濃度の変動は高次脳機能に影響をおよぼし、脳内キヌレン酸濃度の上昇によって記憶、学習、認知機能が低下する^{8,9)}。本研究では、コーン油に対する報酬効果を形成するPRセッションの期間にキヌレニンを投与することによって、学習期間中の脳内キヌレン酸濃度の上昇が嗜好性の形成を抑制するという結果を得た。嗜好性を評価する方法の一つに条件づけ場所嗜好性試験がある。この方法を用いて、すでに脂肪に対して嗜好性を示すマウスにオピオイド拮抗薬を投与してもその嗜好性に影響をおよぼすことはできないが、嗜好性を形成する期間に投与すると脂肪への嗜好性が抑制されるという報告がある¹⁵⁾。これは、嗜好性の形成と形成された嗜好性の維持には異なるオピオイド系が関与することを示唆している。したがって、キヌレン酸は報酬効果の形成に関与するオピオイド系に作用し、形成された報酬効果の維持に関与するオピオイド系には作用しないことが示唆される。

本研究により、脳内キヌレン酸濃度の上昇は、すでに形成された嗜好性には影響をおよぼさないが、嗜好性の形成を抑制することが示唆された。この結果は、脳内キヌレン酸濃度が嗜好性の形成に影響をおよぼす因子の一つであり、キヌレン酸産生制御によって嗜好性を調節できる可能性を示している。ヒトへの応用を考えると、幼少期や成

長期など食物への嗜好性を形成する時期にキヌレン酸を介して嗜好性を調節できる可能性が考えられる。今後、脳内キヌレン酸濃度を変動させる食餌による影響についても検討を行えば、脳内キヌレン酸濃度の調節を介して高嗜好性の食物の摂取量を制御できる可能性を明らかにすることができるだろう。また、脳内キヌレン酸濃度の低下によってドーパミンの放出が亢進し、脳機能が影響を受けることから^{16,17)}、脳内キヌレン酸濃度の低下が嗜好性に影響をおよぼす可能性も考えられる。以上のように、本研究成果の知見に基づき、キヌレン酸産生調節の観点から嗜好性の制御に関する研究の発展が期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団および関係者の皆様に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Cheeta S, Brooks S, Willner P. Effects of reinforcer sweetness and the D2/D3 antagonist raclopride on progressive ratio operant performance. *Behav Pharmacol* 1995;6:127-32.
- 2) El-Ghundi M, O'Dowd BF, Erclik M, George SR. Attenuation of sucrose reinforcement in dopamine D1 receptor deficient mice. *Eur J Neurosci* 2003;17:851-62.
- 3) Yoneda T, Taka Y, Okamura M, Mizushige T, Matsumura S, Manabe Y, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T. Reinforcing effect for corn oil stimulus was concentration dependent in an operant task in mice. *Life Sci* 2007;81:1585-92.
- 4) Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 1989;52:1319-28.
- 5) Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci* 2001;21:7463-7473.
- 6) Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci* 2001;13:2141-7.

- 7) Rassoulpour A, Wu HQ, Ferré S, Schwarcz R. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J Neurochem* 2005;**93**: 762-5.
- 8) Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M. Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biol Psychiatry* 2004;**56**:255-60.
- 9) Chess AC, Landers AM, Bucci DJ. L-Kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behav Brain Res* 2009;**201**:325-31.
- 10) Justinova Z, Mascia P, Wu HQ, Secci ME, Redhi GH, Panlilio LV, Scherma M, Barnes C, Parashos A, Zara T, Fratta W, Solinas M, Pistis M, Bergman J, Kangas BD, Ferré S, Tanda G, Schwarcz R, Goldberg SR. Reducing cannabinoid abuse and preventing relapse by enhancing endogenous brain levels of kynurenic acid. *Nat Neurosci* 2013;**16**:1652-61.
- 11) Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K. High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum. *J Neurochem* 2011;**118**:796-805.
- 12) Holmes EW. Determination of serum kynurenine and hepatic tryptophan dioxygenase activity by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1988;**172**:518-25.
- 13) Shibata K. Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988;**430**:376-80.
- 14) Żarnowski T, Chorągiewicz T, Tulidowicz-Bielak M, Thaler S, Rejda R, Żarnowski I, Turski WA, Gasior. Ketogenic diet increases concentrations of kynurenic acid in discrete brain structures of young and adult rats. *J Neural Transm* 2012;**119**:679-84.
- 15) Sakamoto K, Matsumura S, Okafuji Y, Eguchi A, Yoneda T, Mizushige T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T. The opioid system contributes to the acquisition of reinforcement for dietary fat but is not required for its maintenance. *Physiol Behav* 2015;**138**:227-35.
- 16) Potter MC, Elmer GI, Bergeron R, Albuquerque EX, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacol* 2010;**35**:1734.
- 17) Kozak R, Campbell BM, Strick CA, Horner W, Hoffmann WE, Kiss T, Chapin DS, McGinnis D, Abbott AL, Roberts BM, Fonseca K, Guanowsky V, Young DA, Seymour PA, Dounay A, Hajos M, Williams GV, Castner SA. Reduction of brain kynurenic acid improves cognitive function. *J Neurosci* 2014;**34**:10592-602.

Regulation of palatability by control of amino acid metabolism

Tsutomu Fukuwatari

The University of Shiga Prefecture

Food palatability is highly related to feeding behavior such as appetite, food preference, food choice and amount of food intake. Since tryptophan metabolite kynurenic acid modulates dopamine function including reward system, we investigated the effect of higher brain kynurenic acid levels on the reinforcing effect of fat in mice to regulate food palatability. To determine the experimental conditions for dose and timing to administrate kynurenic acid precursor kynurenine, mice were orally administrated 100 or 200 mg/kg BW kynurenine, and brain kynurenine and kynurenic acid levels were measured 0.5, 1, 2, 3 and 6 hours after the administration. Brain kynurenine and kynurenic acid levels were rapidly increased within 0.5 hours after the administration, and sustained for 3 hours by 200 mg/kg BW kynurenine but not 100 mg/kg BW. Based on these results, we investigated the effects of 200 mg/kg BW kynurenine administration on the reinforcing effect for fat in mice. To evaluate the reinforcing effect for fat, we investigated the effect of kynurenine administration on reinforcement by using an operant behavioral paradigm under a progressive ratio schedule in which the number of lever presses required to obtain a test sample increased progressively. Mice were trained to press lever for receiving sweetened condensed milk and then 50% corn oil as reinforcers. Mice showed the strong reinforcing effect of corn oil by the training, and administration of kynurenine failed to reduce this reinforcing effect of corn oil. Learning period is required for acquisition of reinforcement effect, and higher brain functions such as learning, memory and cognition were affected by changes of brain kynurenic acid levels. Therefore, we investigated the effect of kynurenine administration during learning period on reinforce effect of corn oil. Mice were administrated 200 mg/kg BW kynurenine 0.5 hour before Progressive Ratio training to develop reinforcing effect of corn oil for consecutive 6 days. This kynurenine administration during Progressive Ratio conditioning suppressed the reinforcement induced by corn oil ingestion. These results suggest that the acquisition of reinforcement for dietary fat and its maintenance are independently regulated by the opioid system, and kynurenic acid can affect the acquiring reinforcement for fat but not required for maintenance of learned reinforcement. Our findings imply that kynurenic acid is one of factors to regulate the development of food palatability. Taken together with the previous findings that diet affects brain kynurenic acid levels, dietary manipulation of kynurenic acid formation in brain may provide useful approach for the regulation of food palatability.