

ストレスとGABA摂取による臓器中アミノ酸含量とGABA合成・代謝酵素への影響

Effects of stress and gamma-amino butyric acid (GABA) on GAD,
GABA-T and Amino acid in rat liver and brain

築館 香澄¹, 大森 正司¹, 青江 誠一郎¹, 明渡 陽子¹

¹人間文化研究科人間生活科学専攻

キーワード: γ -アミノ酪酸 (GABA), グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD),
GABAトランスアミナーゼ (GABA-T), ストレス, 肝臓, 脳

1. 研究の目的

γ -アミノ酪酸 (GABA) は自然界に広く分布するタンパク質非構成アミノ酸であり, 野菜, 果物をはじめ様々な食品素材に含まれている. 動物においては, 抑制性の神経伝達物質として主に脳内に存在している. GABA は生体内において, グルタミン酸 (Glu) からグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) によって脱炭酸されることにより生成され, GABA トランスアミナーゼ (GABA-T) によりコハク酸セミアルデヒドに代謝され, コハク酸を介して TCA サイクルに入る. 近年, 食品を様々な条件下 (窒素充填, 微生物による発酵等) に置いて GABA 含量を増加させ, これを摂取することで血圧上昇抑制作用や抗ストレス作用が得られるといった研究が行われ, 実用化もされている. また GABA は, 成長ホルモン分泌促進作用, 腎機能障害抑制作用, 中性脂肪増加抑制作用を有することも知られ機能性食品素材として注目されている. しかしながら, GABA は血液脳関門を通過しないため脳実質内には取り込まれないと言われており, 食餌性 GABA の抗ストレス作用に対する作用機序については不明な点が多い.

そこで本研究では, 食餌性 GABA とストレス負荷が代謝臓器である肝臓および抗ストレス作用の直接組織である脳の GABA 合成と分解に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした.

2. 活動実施報告

本研究の動物実験は, 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づいて行い, 大妻女子大学動物実験委員会の承認を得た. 実験は 2 回行い, それぞれ Ex.1, Ex.2 とした.

1) 実験動物と飼料組成

6 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い (Ex.1; n=24,

Ex.2; n=16), AIN-76 組成の飼料で 7 日間予備飼育した. その後, 体重が均一になるように対照群, GABA 投与群, ストレス負荷群, GABA 投与ストレス負荷群の 4 群に分け, 7 日間の試験飼育をした. ラットは, アルミメッシュ個別ケージに入れ, 室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $60\pm 2\%$, 明暗サイクル 12 時間 (明期 8:00~20:00) で飼育した. 試験開始後, 飼料および飲料水は午前 10 時から午後 6 時の 8 時間自由摂取させた.

2) GABA 投与と拘束ストレス負荷

GABA 投与群, GABA 投与ストレス負荷群には, GABA 溶液 1ml/day (100mg/100gBW) を午後 6 時に胃ゾンデにて経口投与した. また, ストレス負荷群, GABA 投与ストレス負荷群は, 午後 6 時から翌日午前 10 時までラットホルダー (夏目 KN323: 夏目製作所 (株)) に入れて 16 時間拘束した. ストレス負荷群, GABA 投与ストレス負荷群が拘束されていて絶食状態の間は, 対照群, GABA 投与群も同時間絶食とした. GABA 投与およびストレス負荷を 7 日間繰り返し, 7 日目の拘束ストレスが終了した後に, 二酸化炭素下で安楽死させ解剖した.

3) 測定

開腹後心臓採血を行い, 血漿に 10%トリクロロ酢酸溶液を終濃度 5%になるように加えた. その後左心室より生理食塩水を灌流して脱血し, 肝臓, 脳を摘出し重量を測定した. 摘出した肝臓, 脳に 10%トリクロロ酢酸溶液を終濃度 5%になるように加え磨砕した. これらを, 遠心分離 (3000r.p.m., 15 分) した後, 上清をフィルター濾過 (0.45 μm) し, Glu, GABA 量をアミノ酸分析計 (L-8800 型日立高速アミノ酸分析計: (株)日立製作所) を用い生体分析法によって定量した. 摘出した肝臓, 脳から 15~20mg を RNA later ((株)キアゲン) に

入れ安定化させた。肝臓は RNeasy Mini Kit ((株)キアゲン), 脳は RNeasy Lipid Tissue Mini Kit ((株)キアゲン) 使用マニュアルに従って抽出し, 総 RNA 量を 260nm の吸光度から求めた。抽出した RNA にランダムプライマー (Invitrogen), RiverTraAce (東洋紡 (株)), 10mM dNTPs (東洋紡 (株)) を添加して RT-PCR を行い, cDNA を調製して mRNA 発現量の測定に用いた。mRNA 発現量は, 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて, SYBR Green 法 (Power SYBER Green PCR Master Mix ; Applied Biosystems) にて, 内部標準として用いた β -actin との相対比より求めた。

4) 統計処理

実験データは, 2 回の実験データを用い, 最小二乗平均値 \pm プールした標準誤差で表した。血漿中の Glu, GABA 濃度については, 検出された数値についてのみを用い統計処理を行った。統計処理には, JMP (JMP8 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。肝臓中 GABA 含量と血漿中 GABA 濃度との相関性は Pearson の相関係数を求めた。2 回の実験をブロック因子とし, GABA 投与とストレス負荷との比較には, 乱塊法による二元配置分散分析を用いた。統計的有意水準は 5%未満とした。

3. 研究目標の達成状況

7 日間の繰り返し GABA 投与により, 肝臓中の GABA 含量が増加し, この増加した分の GABA は血中へ移行し, 血漿中の GABA 濃度が増加したと考えられた(表 1)。この時の肝臓中 GABA 含量の増加は, GAD 活性による GABA 合成によるものではなく, 投与した GABA が影響しているものと考えられた(表 2)。また, 繰り返しのストレスが負荷されると, 肝臓中の GAD65 遺伝子発現量が有意に増加し(表 2), 肝臓での GABA 含量の増加が確認できた(表 2)。肝臓での GABA 含量が増加すると血中へ移行した GABA により, 血漿中の GABA 濃度も増加したのと考えられた。これらの結果から, 食餌性の GABA は肝臓における GABA 合成を阻害したり分解を誘導することなく, 血中へ移行しやすいと考えられる。また, ストレスが負荷されると, 肝臓での GABA 合成が活発となり, 多くの GABA が血中へ移行して, ストレスを鎮静化するよう応答をしているものと推察された。

本研究報告は, 7 日間の繰り返しのストレス負荷および繰り返しの GABA 投与における影響について示した。急性ストレス負荷や GABA の単回投与における, 臓器中アミノ酸含量と GABA 合成・代謝酵素への影響については, 繰り返しのストレス負荷および GABA 投与の影響とは異なる反応を示すことがわかっており, 再度追試験を行い, その後, 考察検討する必要がある。

表1 肝臓,脳および血漿中のGlu,GABA量

Amino acids	cont.	GABA	stress	stress+GABA	二元配置分散分析			
					GABA	stress	交互作用	
肝臓 (μ g/liver)	Glu	2234.9 \pm 236.9	2653.3 \pm 273.7	2281.2 \pm 250.8	2351.6 \pm 240.3	NS	NS	NS
	GABA	52.5 \pm 6.5	64.9 \pm 7.5	64.5 \pm 6.9	102.5 \pm 6.6	p<0.05	p<0.05	NS
肝臓 (μ g/g liver)	Glu	255.6 \pm 23.2	277.6 \pm 23.2	321.6 \pm 23.1	298.9 \pm 24.7	NS	NS	NS
	GABA	6.1 \pm 0.8	7.1 \pm 0.9	8.9 \pm 0.8	13.1 \pm 0.9	p<0.05	p<0.05	NS
脳 (μ g/brain)	Glu	3239.3 \pm 109.5	3391.2 \pm 126.5	3261.9 \pm 115.9	3270.0 \pm 111.1	NS	NS	NS
	GABA	611.1 \pm 24.8	659.8 \pm 28.6	653.2 \pm 26.2	637.1 \pm 25.1	NS	NS	NS
脳 (μ g/g brain)	Glu	1795.3 \pm 45.8	1809.0 \pm 50.0	1773.0 \pm 48.5	1761.7 \pm 43.7	NS	NS	NS
	GABA	339.2 \pm 10.6	352.5 \pm 11.5	355.0 \pm 11.2	341.7 \pm 10.1	NS	NS	NS
血漿 (μ g/100mL)	Glu	5448.6 \pm 316.8	4284.7 \pm 316.8	5260.5 \pm 332.6	5245.3 \pm 336.7	NS	NS	NS
	GABA	108.0 \pm 51.0	182.7 \pm 27.8	153.5 \pm 51.0	344.5 \pm 27.8	p<0.05	p<0.05	NS

数値は,最小二乗平均値 \pm プールした標準誤差を示す。NS:有意差なし。

表2 肝臓,脳中のGAD67,GAD65およびGABA-TのmRNA発現

Primer	cont.	GABA	stress	stress+GABA	二元配置分散分析			
					GABA	stress	交互作用	
肝臓	GAD67	1.00 \pm 0.25	0.99 \pm 0.24	1.37 \pm 0.24	1.00 \pm 0.24	NS	NS	NS
	GAD65	1.00 \pm 0.47	1.12 \pm 0.42	1.64 \pm 0.42	2.34 \pm 0.42	NS	p<0.05	NS
	GABA-T	1.00 \pm 0.18	0.96 \pm 0.17	1.25 \pm 0.17	0.78 \pm 0.17	NS	NS	NS
脳	GAD67	1.00 \pm 0.11	0.89 \pm 0.11	0.90 \pm 0.11	0.11 \pm 0.11	NS	NS	NS
	GAD65	1.00 \pm 0.11	0.86 \pm 0.11	0.81 \pm 0.11	0.67 \pm 0.12	NS	NS	NS
	GABA-T	1.00 \pm 0.09	0.82 \pm 0.09	1.02 \pm 0.09	1.03 \pm 0.09	NS	NS	NS

値は,最小二乗平均値 \pm プールした標準誤差を示す。NS:有意差なし。cont.発現量を1とにおいて β -actinで補正した。

4. まとめと今後の課題

本研究により, 食餌性 GABA は血中へ移行しやすく, また, ストレスが負荷されると, 肝臓での GABA 合成が活発となり多くの GABA が血中へ移行することが示された。これら血中へ移行した GABA が, どのようなメカニズムで抗ストレス作用を示しているか, 今後検討する必要がある。

5. 研究成果

1) 著書, 学術雑誌

[1] 築館香澄ほか. γ -アミノ酪酸 (GABA) の投与が繰り返しストレス下のラットの肝臓および脳の GABA 代謝に及ぼす影響. 日本家政学会誌. 2012 年 6 月第 6 月号掲載予定

2) 学会発表

[1] 築館香澄ほか. ラットの肝臓・脳における GAD,GABA-T およびアミノ酸に対するストレスと GABA 投与の影響. 日本家政学会第 63 回大会. 和洋女子大学. 2011. p. 141.