

<平成25年度助成>

様々なタンパク質源摂取による冬季うつ病の 予防改善効果の解析

安尾 しのぶ

(九州大学大学院農学研究院 代謝・行動制御学)

1. 緒 言

哺乳類は環境の季節リズムに適応するため、季節の変化を日の長さから読み取り、生理機能や行動を季節に合わせて調節する「光周性」を獲得してきた。光周性の名残はヒトでも残っており、情動や社会性、睡眠、食欲、体重などに季節リズムが広く見られる。中でも、極端な季節リズムを示す場合には、特定の季節(多くは冬)に抑うつや過眠、過食、炭水化物渴望などの症状を示す季節性感情障害(SAD, 冬季うつ病)の基準に入る。SADの有病率は1-10%と高く、「ウィンターブルー」と呼ばれる重症候群も含めると10-25%にもなる¹⁾。SADの発症には、冬季における脳セロトニンの減少が原因の一つと知られるが²⁾、詳しいメカニズムは不明である。

従来、SADの優れた動物モデルが不足しており、SADのメカニズムや予防改善法を探索する基礎研究が停滞していた。最大のネックは、マウスやラットが周年繁殖動物であり、光周性を示さないと考えられてきたことである。このため、従来は代替モデルが提唱されてきた。例えば、砂漠由来で季節繁殖性を有するfat sand ratやNile grass ratが動物モデルとして報告されている^{3,4)}。しかし、これらの動物は入手が困難であり、近交系ではなくゲノム情報や研究ツールが充実していない等の欠点があり、より適切なモデルが望まれていた。

筆者は最近、繁殖の光周性を示さないC57BL/6Jマウスでも、情動関連の光周性を明

確に示すことを初めて見出した。すなわち、冬季の日長を模した短日条件では、夏季を模した長日条件に比べて、うつ様行動(強制水泳試験の無動時間)が増加することや、脳セロトニン量が減少することを報告した^{5,6)}。この結果は、マウスをSADのモデル動物として活用できることを示唆する。このマウスではまた、セロトニンの前駆体であるL-トリプトファン(Trp)の脳内取り込みが短日条件で低下していた。Trpは大分子中性アミノ酸(LNAA: Trp, チロシン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン)の一つであり、血液脳関門のトランスポーターがLNAAで共有されているため、Trpの脳移行は他の大分子中性アミノ酸との血中比(Trp/LNAA)に依存する⁷⁾。筆者らはさらに、短日条件のマウスでは血漿のTrp/LNAAが低値であることを明らかにした⁶⁾。つまり、短日条件では血漿遊離アミノ酸のバランスが不均衡になり、それがTrpの脳移行を妨げて情動悪化に繋がると推察される。この仮説に従えば、血漿Trp/LNAAを制御することにより、Trpの脳移行促進を介して冬季の抑うつを改善できる可能性が考えられる。そこで本研究では、様々なTrp/LNAAを含むタンパク質源(カゼイン、大豆タンパク質、グルテン、 α -ラクトアルブミン)の飼料を用いて、短日条件下におけるうつ様行動や不安様行動の改善及び予防を試みた。さらに、血漿遊離アミノ酸濃度を解析するとともに、遊離アミノ酸調節に深く関わる筋繊維型や筋代謝遺伝子の発現を解析した。

2. 方法

2-1. 実験動物・配合飼料

雄のC57BL/6Jマウス(4週齢)を日本SLCから購入し、室温25℃、自由飲水・自由摂食の条件において、長日条件(LD, 18時間明期6時間暗期)で約1週間馴化した。カゼインをタンパク質源とする標準飼料AIN-93の配合(Trp/LNAA=0.0388)を基に、タンパク質源を大豆タンパク質(Trp/LNAA=0.0405)、グルテン(Trp/LNAA=0.0543)、 α -ラクトアルブミン(Trp/LNAA=0.1287)のいずれかに変更した飼料を作製した。カゼインの配合飼料をコントロール飼料とし、全ての餌に17%の粗タンパク質が含まれるように配合した。

2-2. 実験デザイン

実験条件及びスケジュールを図1に示す。本実験では8群のマウスを使用した。短日条件(SD, 6時間明期18時間暗期)のコントロール群及びLDのコントロール群は、実験期間を通してコントロール飼料で飼育した。残り6群のうち、3群をLD-SDp、3群をLDp-SDの条件に用いた。LD-SDpのマウスについては、まずLDでコントロール飼料を用いて3週間飼育した後、日長をSDに切り

替えると同時に飼料をグルテン飼料、大豆タンパク質飼料、あるいは α -ラクトアルブミン飼料のいずれかに変更した。LDp-SDのマウスについては、LDでグルテン飼料、大豆タンパク質飼料、あるいは α -ラクトアルブミン飼料のいずれかを給餌した後、日長をSDに切り替えると同時に飼料をコントロール餌に戻した。3週間後、全群のマウスについてオープンフィールド試験(OFT)と強制水泳試験(FST)を行った。数日後に安楽死させ、血漿や精巣上体周囲の脂肪、また腓腹筋及びヒラメ筋を採取した。

2-3. 行動試験

OFTでは40 x 40 x 40cmの箱にマウスを入れ、5分間の探索行動をビデオで撮影した。ANY-mazeソフトウェア(Stoeling Co., IL, USA)を用いて底面を5x5グリッドに分け、グリッドラインを通過した回数を自発運動量の指標として、中央の9グリッドに滞在した時間を不安様行動の指標として用いた。中央滞在時間が長ければ長いほど、不安様行動は低いと評価される。

FSTはうつ様行動あるいは絶望行動を評価する試験であり、抗うつ薬のスクリーニングに広く用いられている。25℃の水を張ったシリンダーでマウスを泳がせ、7分間の行動を撮影した。泳ぐ

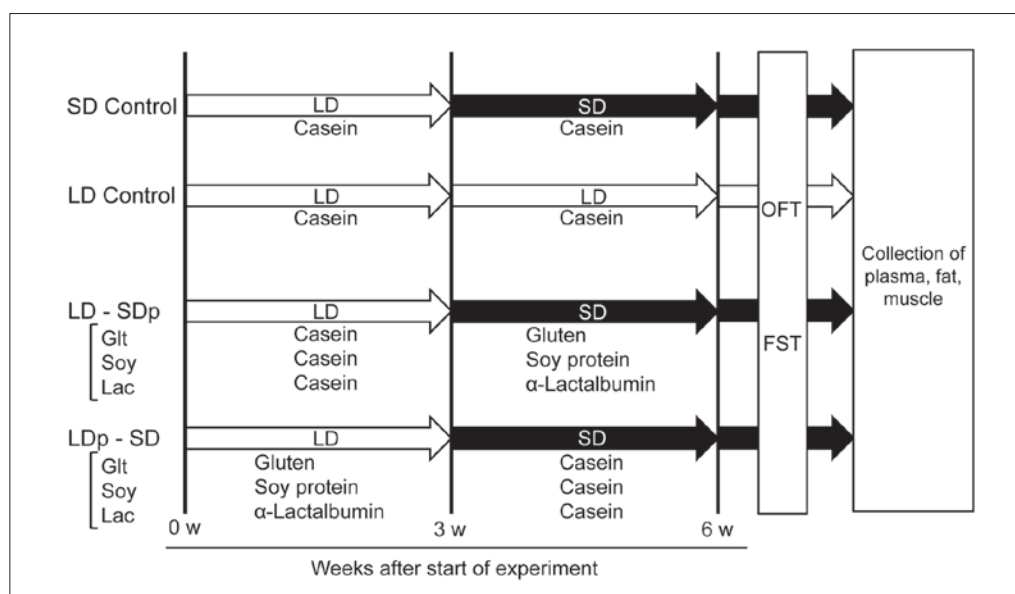


図1 実験条件及びスケジュール。SD: 短日条件、LD: 長日条件、OFT: オープンフィールド試験、FST: 強制水泳試験

のを諦めて浮かんでいる状態を無動時間とし、うつ様行動の指標とした。

2.4. 液体クロマトグラフィー

血漿遊離アミノ酸濃度を液体クロマトグラフィー (Pico-tagTM, Waters, Milford, MA, USA) により解析した。方法は以前の報告に従った⁸⁾。LNAAの各アミノ酸の濃度から、Trp/LNAAを計算した。

2.5. 筋繊維型および筋代謝遺伝子発現

筋繊維は含まれるミオシン重鎖アイソフォームにより、遅筋型であるタイプI、速筋型であるタイプIIb、および遅筋と速筋の中間型であるタイプIIaとIIxに分けられる。採取した腓腹筋サンプルを用いてミオシン重鎖アイソフォームをSDS-PAGEにより分離し、筋繊維型の分析を行なった⁹⁾。各アイソフォームの含有量を定量し、IIbとIIa+IIxの割合を計算した。

筋代謝遺伝子については、LDとSDによる発現量の違いを解析した。腓腹筋における種々の筋分解遺伝子の発現や、筋タンパク質の異化を誘導するグルコルチコイド受容体の発現、またグルコース取り込みを制御するグルコース輸送体の発現等について、real-time PCRにより解析した。

2.6. 統計解析

LD-SDpグループとLDp-SDグループの結果に分けて統計処理を行なった。SDコントロール群とLDコントロール群の値を両グループのコントロールとして用いた。各グループにおいて、SDコントロール群を基準としたDunnett testを行い、 $p < 0.05$ を有意水準として結果を判定した。

3. 結果

3-1. 様々なタンパク質配合餌が摂食、体重、精巢上体脂肪重量に及ぼす影響

SDコントロール群のマウスは、LDコントロール群のマウスに比べて、体重および精巢上体脂肪重量が高い値を示したが(体重： $p < 0.01$ ；脂肪： $p < 0.05$)、摂食量に有意な変化は見られなかった。

SDで α -ラクトアルブミン飼料を摂取したマウスでは(LD-SDp)、SDコントロール群のような体重増加や脂肪増加が抑制されていた($p < 0.0001$)。また、SD移行前に α -ラクトアルブミン飼料を摂取したマウスにおいても(LDp-SD)、SD移行後の体重増加や脂肪増加が抑えられた(体重： $p < 0.05$ ；脂肪： $p < 0.01$)。

3-2. 様々なタンパク質配合餌が短日条件の不安様行動及びうつ様行動に及ぼす影響

OFTにおいて、自発運動量を示すグリッドライン通過回数には、日長の影響やタンパク質配合餌の影響は見られなかった(図2A, B)。SDコントロール群の中央滞在時間は、LDコントロール群に比べて低い値を示しており($p < 0.05$, 図2C, D)、SDで強い不安様行動を示すことが明らかとなった。SDで α -ラクトアルブミン飼料を摂取したマウスでは(LD-SDp)、SDコントロール群に比べて中央滞在時間の値が高くなっており($p < 0.01$, 図2C)、不安様行動が緩和されていることが示唆された。SD移行前に各タンパク質を給餌したLDp-SDの条件では、グルテンを事前摂取したマウスにおいて、SD移行後も中央滞在時間の値が高く保持されていた($p < 0.05$, 図2D)。

FSTについては、SDコントロール群ではLDコントロール群よりも無動時間が長くなる傾向が見られた($p = 0.07$)。LD-SDpの条件ではタンパク質配合餌による有意な影響は見られなかったが(図2E)、LDp-SDの条件では大豆タンパク質を事前摂取したマウスにおいて、SD移行後に無動時間の減少が認められた($p < 0.01$, 図2F)。

3-3. 血漿中 Trp/LNAA、筋繊維型及び筋代謝遺伝子の発現

SDコントロール群の血漿中 Trp/LNAAは、LDコントロール群に比べて有意に低い値を示した($p < 0.05$, 図3B)。LD-SDpの条件では、 α -ラクトアルブミン飼料を摂取したマウスにおいて有意に高い値が見られた($p < 0.05$, 図3A)。一方、

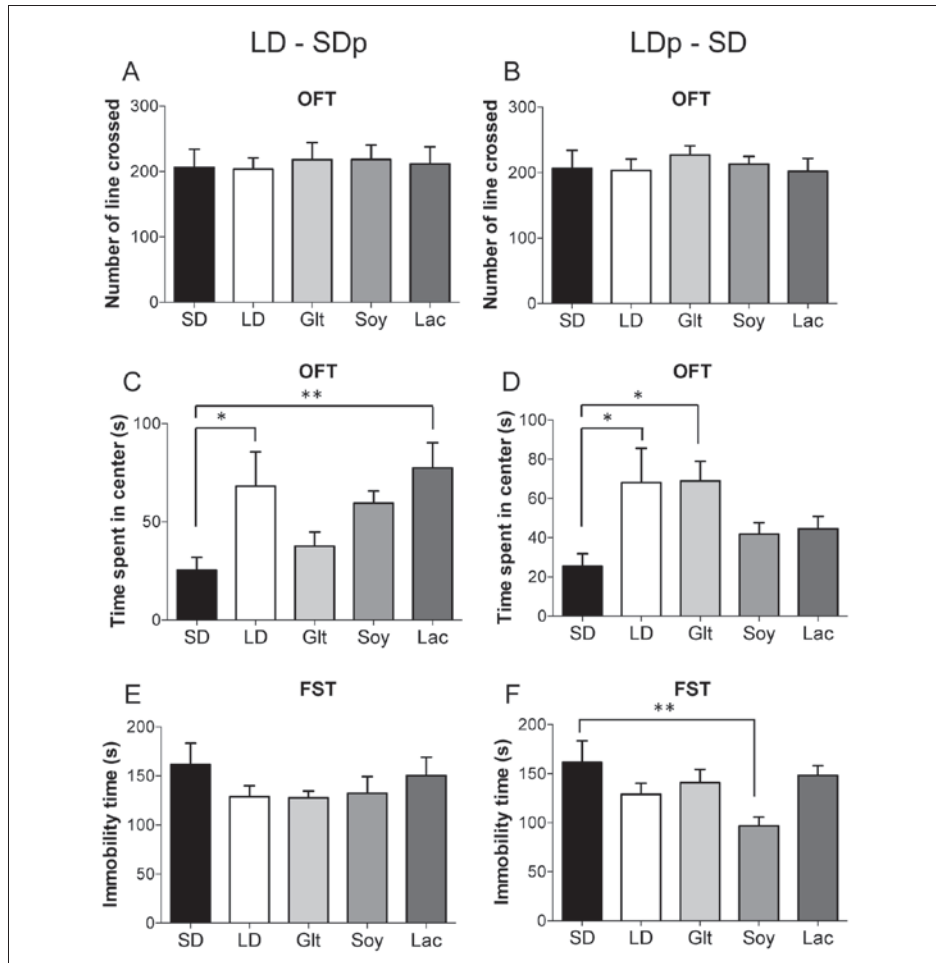


図2 様々なタンパク質配合飼料が短日条件におけるマウスの不安様行動およびうつ様行動に及ぼす影響。SD: 短日条件、LD: 長日条件、Glt: グルテン、Soy: 大豆タンパク質、Lac: α -ラクトアルブミン、OFT: オープンフィールド試験、FST: 強制水泳試験、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Dunnett test

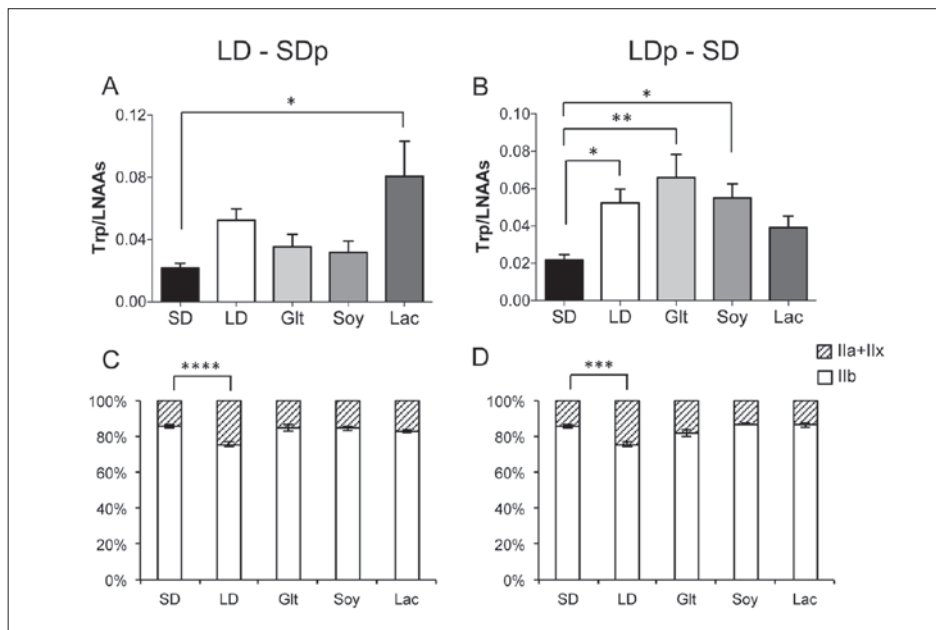


図3 様々なタンパク質配合飼料が短日条件におけるマウスの血漿 Trp/LNAA や腓腹筋の筋繊維型割合に及ぼす影響。SD: 短日条件、LD: 長日条件、Glt: グルテン、Soy: 大豆タンパク質、Lac: α -ラクトアルブミン、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Dunnett test

LDp-SDの条件においては、グルテンあるいは大豆タンパク質飼料を事前摂取したマウスにおいて、SD移行後に高いTrp/LNAAが保持されていた(グルテン： $p < 0.01$, 大豆タンパク質： $p < 0.05$, 図3B)。

腓腹筋における筋繊維型を解析した結果、SDコントロール群ではLDコントロール群に比べてIIbの割合が有意に高く、IIaとIIxは低い割合であった(図3C, D)。各種タンパク質配合飼料は筋繊維型に影響を及ぼさなかった(図3C, D)。日長が筋代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を解析したところ、SDでは腓腹筋における種々の筋分解遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。また筋分解を誘導するグルココルチコイド受容体のヒラメ筋における発現がSDで亢進しており、グルコースの取り込みを制御するGLUT4の腓腹筋における発現がSDで抑制されていた。

4. 考 察

本研究では、冬季の日長を模したSDにおける不安様行動やうつ様行動を改善できるタンパク質源を見出すことを目的として、様々なTrp/LNAAを含むタンパク質配合飼料の機能解析を行なった。SDで各飼料を給餌した条件(LD-SDp)におけるOFTの結果から、SDで亢進した不安様行動(中央滞在時間の減少)は、 α -ラクトアルブミン飼料により抑えられることが判明した。 α -ラクトアルブミン飼料を摂取したマウスでは血漿Trp/LNAAも亢進しており、Trpの脳移行量の増加を介して不安様行動を抑えた可能性が考えられる。実際に、 α -ラクトアルブミン飼料により、ラットの脳皮質におけるTrp量や視床下部におけるセロトニン量が増加することが報告されている¹⁰⁾。 α -ラクトアルブミンにはTrpが豊富に含まれるほか、筋肉代謝や運動機能に関わる分岐鎖アミノ酸の含有量も他のタンパク質に比べて高い。筋肉代謝が今回の結果に関与するならば、

冬季に α -ラクトアルブミン摂取と運動を組み合わせることで情動悪化を効率的に緩和できる可能性があり、今後の研究展開が望まれる。

本研究ではさらに、SDに移行する前に各飼料を給餌して予防効果を解析した(LDp-SD)。この実験条件は、夏から秋にかけて摂取することで冬季の情動悪化を予防できるタンパク質の探索を目的として設定した。行動解析の結果、グルテン飼料の事前摂取により、SDにおける不安様行動の亢進が抑制されること、また大豆タンパク質飼料の事前摂取より、SDにおけるうつ様行動の増加(強制水泳試験の無動時間)が緩和されることが示唆された。さらに、グルテンや大豆タンパク質を事前摂取したマウスでは、SD移行後の血漿Trp/LNAAが高値を保持しており、長期的な遊離アミノ酸調節機構の関与が示唆された。グルテンや大豆タンパク質の摂取は、アミノ酸の吸収や代謝を制御する腸内細菌叢に影響を及ぼす^{11,12)}。腸内細菌叢は長期的に変化することから、今回の結果との関連が示唆される。

本研究で見出された重要な点として、C57BL/6Jマウスの脂肪や骨格筋に日長の影響が顕著に見られた点が挙げられる。LDではSDに比べて、精巢上体周囲の脂肪量が少なく、IIa/x筋繊維型が高割合で含まれていた。IIa筋繊維型はIIbよりも酸化的代謝能に優れており¹³⁾、LDにおける脂肪分解で生じた脂肪酸の酸化と機能的関連があるのかもしれない。さらに、SDでは筋分解遺伝子の発現亢進や、筋タンパク質の異化を誘導するグルココルチコイド受容体遺伝子の発現増加、またグルコース取り込みを制御するグルコース輸送体の抑制が見られた。これらの結果は、SDにおける骨格筋の異化作用の促進及び同化作用の抑制を示唆している。骨格筋代謝は血中遊離アミノ酸プールの調節に深く関与するため、本研究結果のTrp/LNAAや情動関連行動との関連が示唆される。

本研究の結果により、冬季の日長下における摂取や、冬季を迎える前の摂取により、冬季の不安や抑うつを改善・予防できるタンパク質源が示唆された。動物の季節適応機構である光周性の名残がヒトにも残ること、また野生動物が自然条件下で摂食する食べ物には季節変動があることを今回の結果と統合して考慮すれば、我々人類にとっても、各季節において適切な栄養を選択することが、一年を通じた健康維持に繋がるのかもしれない。

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・食文化振興財団及び関係者の皆様に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 三島和夫 第17章「季節性感情障害」In: 気分障害, 上島国利ら編集, 医学書院
- 2) Gupta, A., Sharma, P.K., Garg, V.K., Singh, A.K. & Mondal, S.C. (2013) Role of serotonin in seasonal affective disorder. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 17, 49-55.
- 3) Einat, H., Kronfeld-Schor, N. & Eilam, D. (2006) Sand rats see the light: short photoperiod induces a depression-like response in a diurnal rodent. *Behav. Brain Res.*, 173, 153-157.
- 4) Leach, G., Adidharma, W. & Yan, L. (2013) Depression-like responses induced by daytime light deficiency in the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *PloS One*, 8, e57115.
- 5) Otsuka, T., Goto, M., Kawai, M., Togo, Y., Sato, K., Katoh, K., Furuse, M. & Yasuo, S. (2012) Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in Fischer 344 rats and C57BL/6J mice. *PloS One*, 7, e39090.
- 6) Otsuka, T., Kawai, M., Togo, Y., Goda, R., Kawase, T., Matsuo, H., Iwamoto, A., Nagasawa, M., Furuse, M. & Yasuo, S. (2014) Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice *Psychoneuroendocrinology*, 40, 37-47.
- 7) Fernstrom, J.D. & Wurtman, R.J. (1972) Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, 178, 414-416.
- 8) Rubio, L.A. (2003) Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 784, 125-129.
- 9) Mizunoya, W., Wakamatsu, J., Tatsumi, R. & Ikeuchi, Y. (2008) Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Anal. Biochem.*, 377, 111-113.
- 10) Choi, S., Disilvio, B., Fernstrom, M.H. & Fernstrom, J.D. (2009) Meal ingestion, amino acids and brain neurotransmitters: effects of dietary protein source on serotonin and catecholamine synthesis rates. *Physiol. Behav.*, 98, 156-162.
- 11) Bengmark, S. (2013) Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol. Res.*, 69, 87-113.
- 12) An, C., Kuda, T., Yazaki, T., Takahashi, H. & Kimura, B. (2014) Caecal fermentation, putrefaction and microbiotas in rats fed milk casein, soy protein or fish meal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 2779-2787.
- 13) van Wessel, T., de Haan, A., van der Laarse, W.J. & Jaspers, R.T. (2010) The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *Eur. J. Appl. Physiol.*, 110, 665-694.

Analysis of preventive and improvement effects of dietary protein sources on physiology and behaviors related to winter depression

Shinobu Yasuo

Faculty of Agriculture, Kyushu University

This study elucidated whether diets of various protein sources that contain different ratios of tryptophan to other large neutral amino acids (Trp/LNAAs) (casein, Trp/LNAAs = 0.0388; gluten, Trp/LNAAs = 0.0405; soy protein, Trp/LNAAs = 0.0543; α -lactalbumin, Trp/LNAAs = 0.1287) affect depression- and anxiety-like behaviors and body composition in C57BL/6J mice under short-day conditions (SD). In the control mice on a casein diet, time spent in the central area in the open field test (OFT) was lower in the mice under SD than in those under long-day conditions (LD), indicating that SD exposure induces anxiety-like behavior. The SD-induced anxiety-like behavior was countered by an α -lactalbumin diet given under SD. An α -lactalbumin diet under SD also resulted in decreased food intake and body and epididymal fat weights compared with the casein diet with SD. In the mice that were on a gluten diet before transition to SD, the time spent in central area in the OFT under SD was higher than that in the SD control mice, indicating that the gluten diet has a preventive effect on SD-induced anxiety-like behavior. Alternatively, mice that ingested soy protein before the transition to SD had lower immobility in the forced swim test, a depression-like behavior, compared with the SD control. Analysis of Trp/LNAAs revealed lower Trp/LNAAs in the SD control compared with the LD control, which was counteracted by an α -lactalbumin diet under SD. Furthermore, mice on gluten or soy protein diets before transition to SD maintained Trp/LNAAs at a high level under SD. Ratio of muscle fiber type in the gastrocnemius was altered by photoperiod but not by experimental diets. Expression of genes that are involved in muscle metabolism was also regulated by photoperiod in gastrocnemius and soleus. In conclusion, ingestion of specific proteins at different times relative to photoperiodic transition may modulate anxiety- and/or depression-like behaviors, partially through changes in plasma Trp/LNAAs.