

# テアニンによるアミロイド $\beta$ ペプチド40の 線維化抑制作用

Theanine Inhibits Aggregation of Amyloid- $\beta$ -Peptide 40

源 川 博 久\*

Hirohisa Minagawa

Theanine is an amino acid contained in green tea, and the effect of theanine on the central nervous system has been reported. In Japan, the patients with neurodegenerative diseases are increasing. Therefore, it is expected that food components affect the onset of neurodegenerative diseases. In this study, I examined that the effects of theanine on aggregation of amyloid beta peptide (A $\beta$ ) 40, which are assumed to be one of the cause of the onset of Alzheimer's disease. The results showed that A $\beta$ 40 aggregation was inhibited by theanine in a dose- and time-dependent manner. These results suggested that theanine may inhibit neuronal cell death induced by A $\beta$ 40.

## 背景と目的

高齢化社会を迎えた日本において、高齢期における生活の質がますます重要になると考えられる。そのため、生活習慣病などの疾患だけではなく、神経変性疾患や認知症などにも留意が必要と考えられる。

神経変性疾患の一つとしてアルツハイマー病があげられる。日本における患者数は、平成24年で約462万人、65歳以上人口の約15%と報告されており、令和7年には約700万人、65歳以上人口の約20%に増加すると予測されている<sup>1)</sup>。

アルツハイマー病は、記憶障害、言語障害、空間認知障害などの症状が知られ、アミロイド $\beta$ ペプチド (A $\beta$ ) の凝集蓄積による老人斑やタウタンパク質の過剰リン酸化による神経原線維変化などを神経病理学的特徴とし、大脳皮質や海馬の神経細胞の脱落や委縮を伴う<sup>2)</sup>。

アルツハイマー病で蓄積がみられるA $\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質に $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼが作用することで産生し、アミノ酸残基数から主にA $\beta$ 40とA $\beta$ 42に分けられる<sup>3)</sup>。高濃度のA $\beta$ は凝集してアミロイド線維を形成し老人斑をする<sup>4)</sup>。そして、アルツハイマー病の発症機構の1つとしてアミロイド仮説が知られ、アミロイド線維が細胞毒性を示すこ

---

\* 食物栄養学科

とを示唆している<sup>5)</sup>。

近年、菓子類や飲料などの食品やサプリメントなどの健康食品に用いられ、注目されている食品成分の1つにテアニンがある。テアニンは、緑茶の玉露などに含まれるアミノ酸でグルタミン酸のエチルアミド(図1)である。

経口より摂取されたテアニンは血液脳関門を通過して脳内へ取り込まれることが報告されている<sup>6)</sup>。また、テアニンの中枢神経系に対する生理作用として、神経伝達物質放出に及ぼす影響<sup>7)</sup>、ストレス軽減作用<sup>8)</sup>、リラククス効果<sup>9)</sup>などが報告されている。

そこで、血液脳関門を通過して脳機能に影響することが期待されるテアニンが主な脳内Aβの1つであるAβ40の線維化に及ぼす影響について検討した。

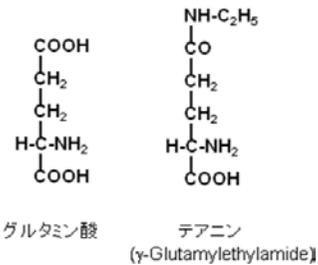


図1 グルタミン酸とテアニンの構造

## 材料と方法

### 1. Aβ40溶液の調製

Aβ40(ペプチド研)を0.02%アンモニア水で179μMに溶解し、分離用小型超遠心機(CS120G XL、HITACHI)を用いて540,000×gで3時間遠心分離した。遠心分離後、上清を回収し、使用するまで-80℃で保存した。

また、Aβ40の線維化にはトリス緩衝液(150mM 塩化ナトリウムを含む10mM Tris-HCl、pH7.4)で希釈して使用した。

### 2. Aβ40の線維化におよぼすテアニン濃度の検討

テアニン(太陽化学)をトリス緩衝生理食塩水で100mMに溶解した。これとAβ40溶液を混合し、37℃で24時間線維化させた。なお、テアニンの最終濃度は、0、10、25、50、100μM、Aβ40の最終濃度は50μMとした。

### 3. Aβ40の線維化におよぼすテアニン処理時間の検討

100μMテアニンとAβ40溶液を混合し、テアニンの最終濃度を10μM、Aβ40の最終濃度を50μMとした。この混合液を37℃で線維化させた。なお、テアニン処理時間は、0、1、2、4、8、16、24時間とした。

### 4. 線維化したAβ40の測定

線維化したAβ40の測定は、チオフラビンT法にておこなった<sup>10)</sup>。37℃で線維化させたテアニ

ンとAβ40の混合液10μlと990μlのチオフラビンT溶液を混合し、蛍光光度計 (F-3000、HITACHI) を用いて励起波長446nm、蛍光波長490nmで測定した。なお、チオフラビンT溶液は、チオフラビンT (Sigma-Aldrich) を50mMグリシン緩衝液 (pH8.5) で5μMに溶解した。

## 結果と考察

### 1. Aβ40の線維化に及ぼすテアニン濃度の検討

いずれのテアニン濃度においてもチオフラビンTの蛍光強度は、0μMテアニン群よりも低下した(図2)。0μMテアニンの蛍光強度を相対的100%とすると、各テアニン濃度におけるAβ線維は37.2%、30.7%、27.5%、37.2%であった(表1)。

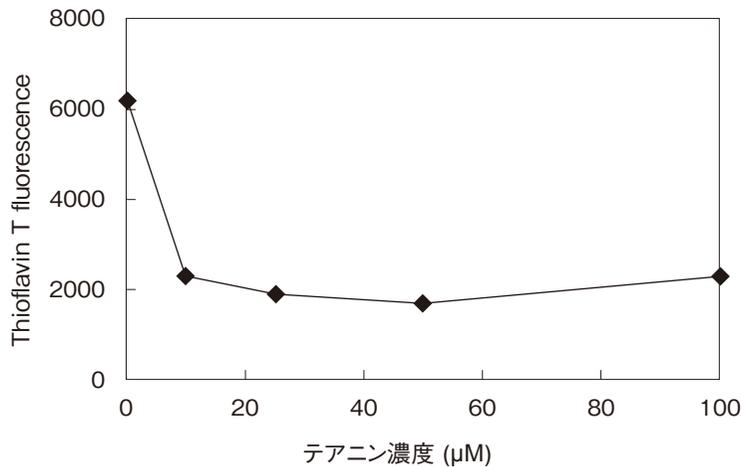


図2 テアニン濃度依存的Aβ40の線維化抑制

表1 テアニンによるAβ40の線維化抑制

Theanine concentration (μM)	0	10	25	50	100
% of 0 μM Theanine	100	37.2	30.7	27.5	37.2

### 2. Aβ40の線維化に及ぼすテアニン処理時間の検討

テアニン添加群はテアニン無添加群と比較して、いずれのテアニン処理時間においてもチオフラビンTの蛍光強度は低下した(図3)。各テアニン処理時間におけるテアニン無添加群の蛍光強度を相対的100%とすると、各テアニン処理時間におけるAβ線維は76.2%、60.5%、63.5%、64.1%、51.8%、50.1%であった(表2)。

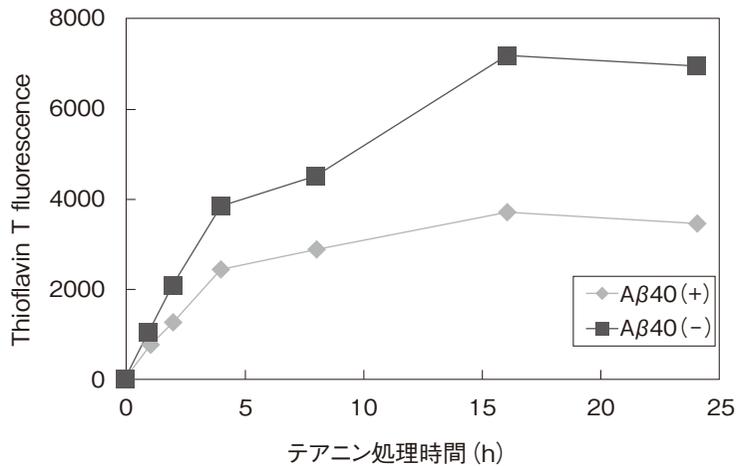


図3 テアニン処理時間依存的Aβ40の線維化抑制

表2 テアニン処理時間によるAβ40の線維化抑制

Treatment time (h)	0	1	2	4	8	16	24
% of 0 h	100	76.2	60.5	63.5	64.1	51.8	50.1

日本人が古来より常飲してきた緑茶に含有されるアミノ酸であるテアニンの栄養機能性の探索を目的として、高齢化の進んだ日本において問題となりつつあるアルツハイマー病の発症に及ぼす影響として、テアニンがAβ40の線維化に及ぼす影響について検討した。

テアニンはAβ40の線維化を濃度依存的かつ処理時間依存的に抑制することが示唆された。これらの結果から、テアニンがAβ40線維による細胞毒性から神経細胞を保護することが推測される。

また、アミロイド前駆タンパク質より産生される主要AβはAβ40のみならずAβ42も存在し、Aβの凝集性はAβ40よりもAβ42の方が高いと報告されている<sup>11)</sup>。そのため、テアニンがAβ40と同様にAβ42の線維化におよぼす影響について検討することで、テアニンのアルツハイマー病発症に対する生理作用の一端を明らかにすることが可能と考える。

#### 参考文献

1. 二宮利治、清原裕、小原知之、米本孝二:日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究、<https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=201405037A> (2020年 9月アクセス可)
2. 徳田隆彦:アルツハイマー病の病態発現仮説、京府医大誌、125 (12)、797-804 (2016)

3. Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E, Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Neuromolecular Med.*, 4 (1-2), 21-36 (2003)
4. Ohnishi S, Takano K, Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (5), 511-24 (2004)
5. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA, Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides, *Science* 250 (4978), 279-82 (1990)
6. Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, Terashima T, Effect of theanine, r-glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats, *Neurochem. Res.* 23 (5), 667-73 (1998)
7. Yamada T, Terashima T, Kawano S, Furuno R, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H, Theanine, gamma-glutamylethylamide, a unique amino acid in tea leaves, modulates neurotransmitter concentrations in the brain striatum interstitium in conscious rats, *Amino Acids.*, 36, 21-27 (2009)
8. Kimura K, Ozeki M, Juneja LR, Ohira H, L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses, *Biol. Psychol.* 74 (1), 39-45 (2007)
9. 小林加奈理、長戸有希子、青井暢之、L. R. ジュネジャ、金 武祚、山本武彦、杉本助男:L-テアニンのヒトの脳波に及ぼす影響、日本農芸化学会誌、72 (2)、153-157 (1998)
10. Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K, A Ganglioside-induced Toxic Soluble A $\beta$  Assembly ITS ENHANCED FORMATION FROM A $\beta$  BEARING THE ARCTIC MUTATION, *J. Biol. Chem.*, 282 (4), 2646-2655 (2007)
11. Jarrett JT, Lansbury PT Jr, Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?, *Cell*, 73, 1055-1058 (1993)

