

アミロイド β ペプチド 40 に対するテアニンの細胞保護作用

源 川 博 久

(令和 4 年 3 月)

郡山女子大学紀要 第 58 集別冊

(Vol.58) PP.107 ~ 113

郡山女子大学 郡山市開成 3 丁目 25 番 2 号

アミロイド β ペプチド40に対する テアニンの細胞保護作用

Theanine Protected SH-SY5Y Cells against Amyloid- β -Peptide 40

源 川 博 久^{*}

Hirohisa Minagawa

Theanine is a major amino acid of green tea and it is a glutamate derived. I previously reported that theanine inhibits aggregation of amyloid β peptide ($A\beta$) 40 in a dose- and a time-dependent manner, which are assumed to be one of the cause of the onset of Alzheimer's disease. In this study, I determined whether theanine inhibited cytotoxicity of $A\beta$ 40 against human neuroblastoma SH-SY5Y. I found that theanine protected SH-SY5Y cells by $A\beta$ 40 in a dose-dependent manner. Furthermore, theanine decreased the $A\beta$ 40 aggregation in the cultured medium. These results suggested that theanine prevented SH-SY5Y cell death by $A\beta$ 40 assembly.

はじめに

高齢化社会を迎えた日本において、特に高齢者の生活の質を維持・増進させるためには、神経変性疾患や認知症などの発症、進行、重症化を防ぐことが重要と考えられる。脳の神経細胞減少の原因として加齢や神経変性疾患が考えられる。食品成分による生活習慣病への影響に関する研究は数多く報告されているが、これらの研究と比べると食品成分が脳機能や神経変性疾患におよぼす影響に関する研究報告はまだまだ少ないのが現状である。

進行性の神経変性疾患の1つであるアルツハイマー病の病態として、老人斑、神経原線維変化、神経細胞死などが知られる¹⁾。アルツハイマー病では、アミロイド β ペプチド($A\beta$)が神経細胞死を誘導することが報告されていることから、原因物質の1つと考えられる²⁾。 $A\beta$ は4kDaのペプチドで、アミロイド前駆体タンパク質に β セクレターゼと γ セクレターゼが作用することで生成され、主に $A\beta$ 40と $A\beta$ 42に分類される。また、DHA³⁾やクルクミン⁴⁾などの食品成分が、 $A\beta$ の生成、 $A\beta$ 凝集、 $A\beta$ 沈着を抑制することが報告されている。

テアニンは緑茶に含まれるアミノ酸で、グルタミン酸の誘導體(γ -グルタミン酸エチルアミド)である。経口摂取したテアニンは血液脳関門を通過して脳へ至ることが知られており⁵⁾、神経伝達物質放出作用⁶⁾や記憶能力維持⁷⁾など中枢神経系におよぼす影響が報告されている。また、テアニンにはグルタミン酸⁸⁾やロテノン⁹⁾による神経細胞死の抑制作用も報告されている。

^{*}郡山女子大学短期大学部健康栄養学科

これまでに著者はAβ40の線維化をテアニン濃度ならびにテアニン処理時間依存的に抑制することを報告した¹⁰⁾。

そこで、本研究はヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞を用いて、Aβ40による細胞死に対するテアニンの影響について検討した。その結果、テアニンはAβ40による細胞死を濃度依存的に抑制し、その機構としてAβ40線維の形成抑制であることを示唆した。

実験方法

1. Aβ40溶液の調製

Aβ40 (ペプチド研) を0.01% アンモニア水に溶解して125 μM Aβ40溶液を作製した。この溶液を分離用小型超遠心機 (CS120GXL, HITACHI) にて540,000 × g、4℃、3時間遠心分離した。遠心分離後、上清を回収して使用するまで-80℃で保存した。

2. 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞は、10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific) および1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Thermo Fisher Scientific) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Thermo Fisher Scientific) を培養培地として、5% CO₂、37℃の条件で培養した。

3. SH-SY5Y細胞の生細胞率におよぼすAβ40およびテアニン濃度の検討

10cm シャーレにて培養したSH-SY5Y細胞を96wellカルチャープレートに 1×10^4 /mLの細胞密度で播種し、培養培地にて16時間培養した。その後、Aβ40溶液またはリン酸緩衝生理食塩水に溶解したテアニン (太陽化学) と7.5% bovine albumin fraction V (Thermo Fisher Scientific) を添加したOPTI-MEM培地 (Thermo Fisher Scientific) で5% CO₂、37℃、48時間処理した。

なお、Aβ40溶液の最終濃度は0、10、50、100 μM、テアニンの最終濃度は0、10、50、100、500 μMとした。

4. Aβ40に対するテアニンの細胞保護作用の検討

96wellカルチャープレートに 1×10^4 /mLの細胞密度でSH-SY5Y細胞を播種し、培養培地で16時間培養した。SH-SY5Y細胞をAβ40溶液ならびにテアニン溶液と7.5% bovine albumin fraction Vを添加したOPTI-MEM培地にて5% CO₂、37℃、48時間処理した。

なお、Aβ40の最終濃度は50 μM、テアニンの最終濃度は0、10、50、100、500 μMとした。

5. MTT 法による生細胞の検出

SH-SY5Y 細胞の生細胞の検出は MTT 法にておこなった。生細胞を検出する 96well カルチャープレートの OPTI-MEM 培地を除去し、10% MTT を含むダルベッコ改変イーグル培地に交換して 5% CO₂、37℃、4 時間培養した。その後、10% MTT を含むダルベッコ改変イーグル培地を完全に除去した後、細胞にジメチルスルホキシドを加えて完全に溶解し、カルチャープレートリーダー (SPECTRA MAX190、MOLECULAR DEVICES) を用いて、570nm の吸光度を測定した。また、SH-SY5Y 細胞の生細胞率は、Aβ40 およびテアニン濃度 0 μM を相対的生細胞率 100% として算出した。

6. Aβ40 のドットプロット解析

Aβ40 の解析は、ドットプロット法で検討した。ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories) に Aβ40 とテアニンを添加して培養した OPTI-MEM 培地を 2 μL プロットし、5% スキムミルク溶液を用いて 4℃、16 時間ブロッキングした。その後、1 次抗体である beta amyloid 1-16 (6E10) (COVANCE) ならびに anti-oligomer antibody (A11) (BIOSOURCE) で 4℃、16 時間反応させた。このニトロセルロース膜を 2 次抗体である anti-rabbit antibody HRP-linked IgG (Cell Signaling Technology) で室温、1 時間反応させた。ニトロセルロース膜のプロットの検出は ECL plus (GE Healthcare) で発光させ、Lumino-image analyzer (LAS-3000mini、FUJIFILM) を用いて解析した。なお、発光強度はコンピュータソフトウェアである imageJ (windows) を用いて定量した。

7. 統計解析

統計解析は、StatView コンピュータソフトウェア (windows) を用いた。サンプル間の有意差は ANOVA および Bonferroni t-test を用いて評価し、有意水準は 5% (両側) とした。

結果および考察

1. SH-SY5Y 細胞の生細胞率におよぼす Aβ40 およびテアニン濃度の決定

0 μM Aβ40 を相対的生細胞率 100% とすると Aβ40 で処理した SH-SY5Y 細胞の生細胞率は、48.9%、25.8%、13.4% であり、いずれの Aβ40 濃度においても有意に低下した (表 1、図 1)。

また、テアニン処理においては、いずれのテアニン濃度においても生細胞率に有意な低下は認められず、100%、97.2%、101.5%、90.0%、98.0% であった (表 2、図 2)。

アミロイドβペプチド40に対するテアニンの細胞保護作用

表1 Aβ40処理によるSH-SY5Y細胞の生細胞率

Aβ40 concentration (μM)	0	10	50	100
% of 0 μM Aβ40	100	48.9	25.8	13.4

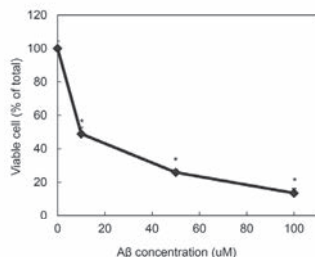


図1 Aβ40がSH-SY5Y細胞の生細胞率に及ぼす影響
SH-SY5Y細胞の生細胞率をMTTアッセイで求めた。
データは、0μM Aβ40(コントロール)に対する生細胞率
(%)を平均値±標準誤差であらわした(n=3)。*は、コ
ントロールと比較して有意に異なる(p<0.05)。

表2 テアニン処理によるSH-SY5Y細胞の生細胞率

Theanine concentration (μM)	0	10	50	100	500
% of 0 μM Theanine	100	97.2	101.5	90.0	98.0

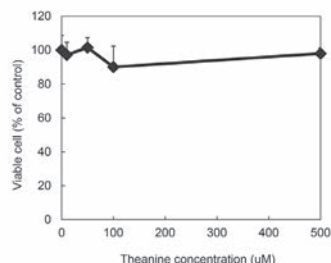


図2 テアニンがSH-SY5Y細胞の生細胞率に及ぼす影響
テアニンと培養したSH-SY5Y細胞の生細胞率のデータは、
0μM テアニン(コントロール)に対する生細胞率を平均値
±標準誤差であらわした(n=3)。

これらの結果から、Aβ40の濃度を50μMと決定した。また、テアニンは48時間処理において生細胞率を低下させなかったため、最大濃度を500μMと決定した。

2. Aβ40に対するテアニンの細胞保護作用の検討

Aβ40による生細胞率の低下は、テアニン濃度依存的に抑制され、29.6%、43.8%、48.0%、41.9%であった。テアニンはAβ40の細胞毒より細胞を保護し、生細胞率を有意に上昇させた(表3、図3)。

表3 テアニンとAβ40処理によるSH-SY5Y細胞の生細胞率

Theanine concentration (μM)	0	10	50	100	500
% of 0 μM Aβ40	16.8	29.6	43.8	48.0	41.9

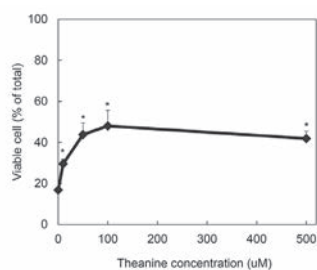


図3 テアニンとAβ40処理がSH-SY5Y細胞の生細胞率に及ぼす影響
50μM Aβ40とテアニンで48時間培養したSH-SY5Y細胞の生細胞率の
データは、OPTI-MEM培地のみで培養した生細胞率を相対的生細胞
率100%として、平均値±標準誤差であらわした(n=3)。*は、0μM テア
ニンと比較して有意に異なる(p<0.05)。

3. Aβ40のドットプロット解析

テアニンはAβ40によるSH-SY5Y細胞の細胞死を抑制したため、OPTI-MEM培地中に添加したAβ40の状態を解析した。一次抗体であるbeta amyloid 1-16 (6E10)はAβの状態に

関わらず、1-16位のアミノ酸残基に反応するため、単量体、オリゴマー、重合体、線維のAβを認識する。これに対して、anti-oligomer antibody (A11)はAβ単量体や線維は認識しない。beta amyloid 1-16 (6E10)のドットシグナルの強度は、テアニンの濃度による差は認められなかったことから、培地中に添加したAβ40量に差がないことが示された。これに対して、anti-oligomer antibody (A11)のドットシグナルの強度は、79、127、167、296、300とテアニン濃度依存的に増加したことから、OPTI-MEM培地中のAβ40はテアニン濃度依存的に線維化が抑制され、Aβ40オリゴマーやAβ40重合体として存在することが示唆された。(表4、図4)。

表4 Aβ40オリゴマーのシグナル強度

Theanine concentration (μM)	0	10	50	100	500
Arbitrary unit (A11)	79	127	167	296	300

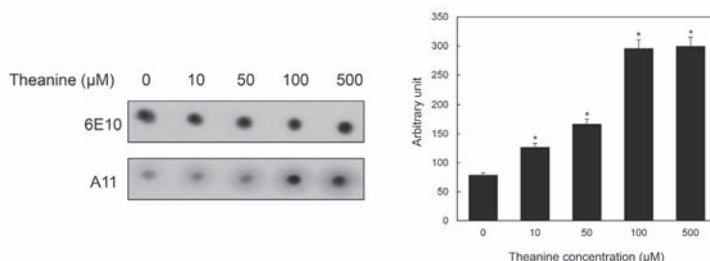


図4 Aβ40のイムノプロット解析
SH-SY5Y細胞を50μM Aβ40とテアニンで48時間処理した。OPTI-MEM培地中のAβ40の状態をイムノプロット解析にて検討した(n=3)。プロットの検出は、一次抗体としてbeta amyloid 1-16(6E10)とanti-oligomer antibody (A11)を用いた。*は、0 μM テアニンと比較して有意に異なる(p<0.05)。

著者は、緑茶に含まれるアミノ酸であるテアニンが、Aβ40の線維化をテアニン濃度ならびにテアニン処理時間依存的に抑制することを報告した¹⁰⁾。アミロイド線維の細胞毒性は、Aβ単量体よりも強いことが報告されていることから¹¹⁾、アルツハイマー病の発症の原因物質の1つと考えられるAβ40によるヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞の細胞死に及ぼすテアニンの影響について検討した。

テアニンはAβ40による細胞死を濃度依存的に有意に抑制し、テアニンによる生細胞率は、0μMテアニンに対して、10μMで1.76倍、50μMで2.61倍、100μMで2.86倍、500μMで2.49倍であった。テアニンによる細胞死抑制の作用機序として、OPTI-MEM培地に添加したAβ40単量体によるアミロイド線維形成に影響することが推測された。そこで、OPTI-MEM培地中のAβ40のアミロイド線維の形成をドットプロット法で検討したところ、テアニン濃度の上昇にともないAβ40線維の形成抑制が示唆された。また、テアニン濃度が高くなるほどドットシグナル強度が上昇した。これは、OPTI-MEM培地中にAβ40がオリゴマーやポリマーの

状態で存在することが推察される。アミロイド線維の形成はAβ単量体が重合することによると考えられる。そのため、テアニンが培地中においてAβ40の重合化を遅延させることで線維形成を抑制したことが考えられる。しかし、AβオリゴマーやポリマーにはAβ単量体やアミロイド線維よりも毒性が強いものも存在することが示唆されている¹²⁾。さらに、Aβオリゴマーやポリマーの分子サイズと細胞毒性の関係については不明のままであるため、Aβの重合状態と細胞死の関係について、さらなる検討が必要と考えられる。

また、テアニンはNMDA受容体に拮抗することで、脳虚血などにより過剰に分泌されたグルタミン酸による神経細胞死を防ぐことが報告されている⁸⁾。そのため、テアニンの細胞保護作用はAβ40のアミロイド線維の形成抑制による細胞毒性を示す物質の減少のみならず、NMDA受容体を介して細胞死を抑制することも推察されるため、細胞死の作用機序についても検討が必要であると考えられる。

本論文は、緑茶に含まれるアミノ酸であるテアニンが、アルツハイマー病発症の原因の一つと考えられるAβ40の細胞毒性に対する細胞保護作用について研究したものである。テアニンは濃度依存的に細胞保護作用を示し、その機構としてテアニンによるAβ40線維形成の抑制を示唆した。

参考文献

1. Alzheimer A, Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, Zeitschrift fuer Psychiatrie, 54, 146-148 (1907)
2. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB, Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate, J. Biol. Chem., 272, 22364-22372 (1997)
3. Cole GM, Frautschy SA, Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model, Nutr. Health., 18, 249-259 (2006)
4. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM, Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo, J. Biol. Chem., 280, 5892-5901 (2005)
5. 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)
6. 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)
7. Yamada T, Terashima T, Honma H, Nagata S, Okubo T, Juneja LR, Yokogoshi H. Effects of theanine, a unique amino acid in tea leaves, on memory in a rat behavioral test, Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1356-1359 (2008)
8. Kakuda T, Yanase H, Utsunomiya K, Nozawa A, Unno T, Kataoka K, Protective effect of

- gamma-glutamylethylamide (theanine) on ischemic delayed neuronal death in gerbils, *Neurosci. Lett.*, 289, 189-192 (2000)
9. Cho HS, Kim S, Lee SY, Park JA, Kim SJ, Chun HS, Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death, *Neurotoxicology*, 29, 656-662 (2008)
 10. 源川博久：テアニンによるアミロイド β ペプチド 40 の線維化抑制作用、*郡山女子大学紀要*、第 57 集、181-185 (2020)
 11. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA, Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides, *Science*, 250 (4978) , 279-82 (1990)
 12. Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K, A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from A β bearing the arctic mutation, *J. Biol. Chem.*, 282 (4) , 2646-2655 (2007)