

果実香気成分がグルタミン酸トランスポーターに  
与える影響について

栗 脇 淳 一

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第61号抜刷）

## 果実香気成分がグルタミン酸トランスポーターに与える影響について

Effects of fruit flavor components ( $\gamma$ -Decanolactone, Geraniol)  
on L-glutamate uptake activity of cultured astrocytes in rats.

栗脇 淳一<sup>i)†</sup>

キーワード：うつ病、 $\gamma$ -デカノラクトン、ゲラニオール、グルタミン酸トランスポーター

### 序 論

近年、香気成分が人体に様々な影響を及ぼすことが科学的に明らかとなっている。例えば、柑橘類の香気成分の暴露により脳内の神経伝達物質の濃度に影響を与え、また動物の行動にも影響を与えるという報告<sup>1),2)</sup>や、交感神経活動を高め、副交感神経（迷走神経）活動を抑制する<sup>3),4)</sup>といった報告がある。また、柑橘類以外にもヒトを対象とした脳波測定実験において、緑茶成分であるテアニンの経口摂取により、安静（リラックス）状態で出現頻度が増すことが知られている $\alpha$ 波の出現頻度が高くなることが報告<sup>5)</sup>されている。

一方、グルタミン酸は中枢神経系において興奮性神経伝達物質として重要な役割を持つ反面、脳内に過剰に分泌されることで、神経細胞障害作用を示し、様々な精神疾患に関与しているということが知られている。例えば、脳内のグルタミン酸トランスポーター欠損マウスを用いた実験において、社会性行動の異常、繰り返し行動、統合失調症の陰性症状や陽性症状に相当する行動異常が起こることが報告<sup>6)</sup>されている。脳内におけるグルタミン酸濃度はグルタミン酸トランスポーターにより厳密に制御されている。特に、神経細胞間の情報伝達に重要な働きを持つシナプス間隙におけるグルタミン酸の濃度調節は神経膠細胞の一つであるアストロサイトに存在する2種類のグルタミン酸トランスポーター GLAST (glutamate-aspartate transporter)、

GLT1 (EAAT 2 ; excitatory amino acid transporter 2) の活性により制御されている。それゆえに、グリア型グルタミン酸トランスポーターの異常により精神疾患を発症する患者が一定の割合存在することが報告<sup>7),8)</sup>されている。

そこで本研究では、脳内シナプス間隙におけるグルタミン酸濃度の制御に重要な働きを持つアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み機能への桃の香気成分である $\gamma$ -デカノラクトン ( $\gamma$ -Decanolactone)<sup>9)</sup> 及びネオマスカットの香気成分である (Geraniol)<sup>10)</sup> の影響について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 動物

実験には10週齢の雌ラット (Wistar) 2匹を用いた。動物は個別のケージで飼育し、室温 24℃、湿度 60%、明期 8時-20時・暗期 20時-8時の条件で飼育し、飼育期間中の飼料および水は自由摂取とした。また、動物の飼育および実験は美作大学・美作大学短期大学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

#### 1-1. 妊娠ラット

雌ラットは、動物飼育室へ搬入後、1週間の馴化期間をおき実験を開始した。馴化期間後、スミア検査を行い性周期を把握し、同種・同週齢の雄ラットと24時間同一ケージで飼育し、翌日スミアプラグの有無に

i)† 美作大学短期大学部栄養学科

より交配が行われたことを確認した。また、交配を確認した日を妊娠0日として、実験日（脳細胞の採取）まで個別に飼育した。

## 1-2. 仔ラット

出生後、仔ラットは母ラットと同一のケージで飼育した。出生後3日目に大脳皮質よりグリア細胞を含む脳細胞の採取を行った。

## 2. アストロサイトの単離と培養<sup>11)</sup>

氷冷麻酔下、新生3日目のラットの脳を無菌的に摘出した。氷冷したリン酸緩衝液（PBS）中、実体顕微鏡下で大脳皮質領域を切り取った。摘出した大脳皮質をメスで細断し、0.25%トリプシン、0.01% DNase I の酵素液とともに37℃の恒温水槽内で40分間インキュベートし、酵素処理を行った。2 mL の fetal bovine serum（FBS）を加えて反応を止め、1500 rpm で5分間遠心後、上澄を除去し、10% FBS, 1% PSA 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）を2 mL 加え、ナイロンフィルター（40~45 μm）でろ過して単離細胞浮遊液を得た。単離細胞浮遊液は、10% FBS, 1% PSA 含有 DMEM 50 mL で希釈し、底面積75 cm<sup>2</sup> のプラスチックフラスコに播種して、37℃、5% CO<sub>2</sub> - 95% air の条件下で培養した。播種1日後に全量培地交換を行い、以後3~4日毎に培地交換しアストロサイトが単層石垣状（confluent）になるまで10日から15日間培養を続けた。アストロサイトがフラスコ底面に confluent になった後、フラスコを振とうさせアストロサイト以外の細胞を除去し、再び confluent になるまで培養した。0.1% trypsin-EDTA 2.0 mL で10分間37℃でインキュベートし、酵素処理を行うことによりアストロサイトを剥離し等量の培地を加え、1500 rpm で5分間遠心して得た細胞分画を培地で再分散し、96 well プレートに4~6×10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup> の密度で再播種後、37℃、5% CO<sub>2</sub> - 95% air の条件下で培養した。

## 3. 薬物処理

桃の主用香気成分であるγ-デカノラクトンおよびマスカットの主用香気成分であるゲラニオール100 mM ストック溶液を、使用直前に DMEM にて希釈した。各薬物の暴露濃度は、0 M（対照群）、1.0 pM、1.0 nM、1.0 μM、1.0 mM とし、全量培地交換により24時間薬物暴露を行った。

## 4. L-glutamate 取り込み活性の測定

Abe らの方法<sup>12)</sup>に従い、アストロサイトの L-glu 取り込み活性を評価した。L-glu を100 μM の濃度で添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub> - 95% air の条件下で60分間インキュベート後、各 well から50 μL の培地を96 well プレートに分取した。分取した培地に50 μL の assay buffer を加え7分後に stop solution 100 μL を加え反応を終了した。96 well プレートはマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。測定波長は570 nm とした。既知の濃度の L-glu 希釈系列により検量線を作成、残留 L-glu 濃度を算出した後、アストロサイトグルタミン酸取り込み量（μg）を算出した。この条件では L-glu 自然分解が起こらないことは既に確かめられている。

## 結 果

### 1. γ-デカノラクトン暴露によるグルタミン酸トランスポーターへの影響（図1）

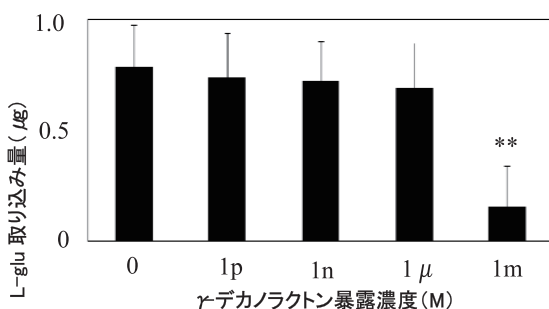


図1 γ-デカノラクトン暴露によるアストロサイトグルタミン酸取り込み量への影響

対照群との比較。縦軸：アストロサイトグルタミン酸取り込み量（μg）、横軸：γ-デカノラクトン暴露濃度（各群 n = 12）（\*\*； p < 0.01, tukey's test following ANOVA）。

$\gamma$ -デカノラクトン暴露群と対照群との比較では、 $\gamma$ -デカノラクトン 1mM 暴露群が対照群に比べ有意にアストロサイトグルタミン酸取り込み量が低下した。しかしながら、他濃度での $\gamma$ -デカノラクトン暴露群においては、対照群との間に有意な差は見られなかった。

## 2. ゲラニオール暴露によるグルタミン酸トランスポーターへの影響 (図2)

ゲラニオール暴露群と対照群との比較では、ゲラニオール 1mM 暴露群が対照群に比べ有意にアストロサイトグルタミン酸取り込み量が低下した。しかしながら、他濃度でのゲラニオール暴露群においては、対照群との間に有意な差は見られなかった。

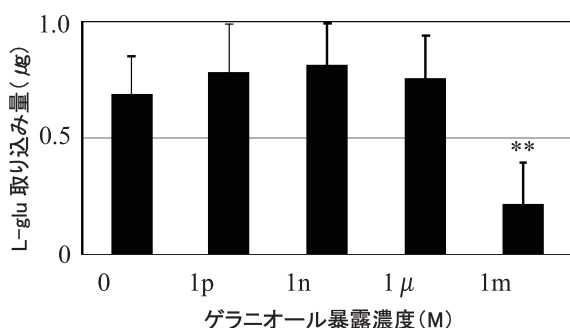


図2 ゲラニオール暴露によるアストロサイトグルタミン酸取り込み量への影響

対照群との比較。縦軸：アストロサイトグルタミン酸取り込み量 ( $\mu\text{g}$ )、横軸：ゲラニオール暴露濃度 (各群  $n = 12$ ) (\*\*;  $p < 0.01$ , tukey's test following ANOVA)。

## 考 察

果実は古くから多くの人々に食され、その香りのもつ薬理的な効用・効果については、経験的によく知られている。本研究では、桃の主要な香気成分として $\gamma$ -デカノラクトンを、また、マスカットの主要な香気成分としてゲラニオールを用い、うつ病との関連性が報告されているアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み能への影響について検討した。

今回の実験では桃の主要香気成分である $\gamma$ -デカノ

ラクトンをアストロサイト培養細胞に 1pM, 1nM, 1 $\mu$ M の濃度で暴露した結果、アストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み能への影響は見られなかった。また、ゲラニオールを同様に 1pM, 1nM, 1 $\mu$ M の濃度で暴露した結果、アストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み能への影響は見られなかった (図2)。一方、両試薬とも 1mM の濃度でアストロサイト培養細胞に暴露した結果、アストロサイトグルタミン酸トランスポーターを介したアストロサイト細胞内へのグルタミン酸取り込み能が有意に抑制された (図1、図2)。しかしながら、薬物暴露 24 時間後に位相差顕微鏡を用いて細胞の状態を観察したところ、両試薬を 1mM の濃度で暴露したアストロサイト培養細胞に細胞毒性が観察された。よって、両試薬 1mM の濃度で暴露して得られたアストロサイトグルタミン酸トランスポーターを介したアストロサイト細胞内への有意なグルタミン酸取り込み能の抑制は、細胞毒性によるものと推測される。

今回の研究から桃およびネオマスカットの香気成分によるアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み機能への影響は見られなかった。

現在、 $\gamma$ -デカノラクトンおよびゲラニオールの暴露時間の設定を変更し、両香気成分によるアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み能への影響を検討中である。

今後は、他の食品および植物の香気成分についてもアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み機能への影響について検討し、ストレスに苦しむ方々のストレスの軽減および気分の改善に貢献したいと考えている。

## 参考文献

1. Fukumoto S, Sawasaki E, Okuyama S, Miyake Y, Yokogoshi H. Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain

- slices. *Nutr Neurosci.* 2006 Feb-Apr; 9(1-2): 73-80.
2. Zhou W, Yoshioka M, Yokogoshi H. Sub-chronic effects of s-limonene on brain neurotransmitter levels and behavior of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009 Aug; 55(4): 367-73.
  3. Tanida M, Nijjima A, Shen J, Nakamura T, Nagai K. Olfactory stimulation with scent of essential oil of grapefruit affects autonomic neurotransmission and blood pressure. *Brain Res.* 2005 Oct 5; 1058(1-2): 44-55. Epub 2005 Oct 5.
  4. Shen J, Nijjima A, Tanida M, Horii Y, Maeda K, Nagai K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 3; 380(3): 289-94. Epub 2005 Feb 5.
  5. Junea L.R., Chu D-C., Okubo T, Nagato Y and Yokogoshi H. L-theanine, -a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in human. *Trends in Food Science & Technology.* 1999 Dec; 10(6-7): 199-204.
  6. Tanaka K. Role of glutamate transporters in the pathophysiology of major mental illnesses. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2013 Dec; 142(6): 291-296.
  7. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2007 Dec 1; 62(11): 1310-6.
  8. Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Fujimoto M, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Abe N, Higuchi F, Shibata T, Hasegawa S, Kida S, Nakai A, Watanabe Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25; 108(4): 1681-6.
  9. Jia H.J., and Okamoto G. Distribution of volatile compounds in peach fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 2001; 70(2): 223-225.
  10. Williams P.J., Strauss C.R., and Wilson B. Classification of the Monoterpenoid Composition of Muscat Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 1981; 32: 230-235.
  11. Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Estrogens inhibit l-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor alpha. *J Neurochem.* 2003 Sep; 86(6): 1498-505.
  12. Abe K, Saito H. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem.* 2001 Jan; 76(1): 217-23.