

마우스에서 L-Theanine의 기억력 회복능 및 Acetylcholinesterase 활성 억제

육동연 · 김태일 · 박상기* · 박형국* · 윤여경* · 홍진태#

충북대학교 약학대학, *LG 생활건강 기술연구원
(Received August 13, 2007; Revised November 22, 2007)

Improvement of Memory Impairment by L-Theanine Through Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in Mice

Dong Yeon Yuk, Tae Il Kim, Sang Gi Park*, Hyoung Kook Park*, Yeo Kyeung Yoon* and Jin Tae Hong#
College of Pharmacy, Chungbuk National University, 48, Gaesin-dong, Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
*LG Household and Health Care Research Park, 84, Jang-dong, Youseng gu, Daejeon 305-343, Korea

Abstract — Acetylcholinesterase (AChE) plays a role in the progression of Alzheimer's disease (AD). In this study, we examined the improving effect of L-theanine, a major amino acid in Japanese green tea (*Camellia sinensis*) on the scopolamine (1 mg/kg/mouse)-induced memory dysfunction in mice. Treatment with L-theanine (2, 4 mg/kg/mouse p.o.) in the drinking water for 7 days reversed the scopolamine-induced latency time and distance in the water maze test, latency time in the passive avoidance test, and inhibited AChE activity. This study suggests that L-theanine may be a useful agent for prevention of progression of AD.

Keywords □ theanine, Alzheimer's disease, memory, acetylcholinesterase

뇌세포 손상을 동반하는 치매의 일종인 Alzheimer's disease (AD)는 치매의 원인 중 약 50%를 차지하는 가장 중요한 질환이다. 이 노인성 치매질환은 아직 발병원인이 정확히 밝혀지지 않았지만 대부분 65세 이상의 고령인구에서 발병을 하며,^{1,4)} 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 고령인구가 증가하는 현대사회에서 최대의 노화질환일 뿐만 아니라 21세기에 인류가 당면할 가장 큰 보건문제 중 하나가 될 것으로 예상되고 있다. AD는 신경전달물질을 통한 신경세포간 정보교환 과정이 파괴됨에 따라 신경세포의 기능이 저하되고 신경세포간의 연결이 끊어져 결국 신경세포사로 이어지게 된다.⁵⁻⁹⁾ 이 중에서 뇌의 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 중추신경, 특히 대뇌피질(cortex)와 해마(hippocampus)의 신경파괴가 기억력장애와 사고능력 저하로 이어지게 된다. 해마영역은 기억을 조절하는 부위로서 이곳이 파괴되면 단기기억력(short-term memory)이 감소하고 친숙한 일을 수행하는 능력이 떨어진다. 대뇌피질은 사고능력을 조절하는 부위로서 이곳의 파괴에 의해 언

어능력과 사고능력이 감소하게 된다.^{9,10)} 따라서 AD는 비가역적인 행동과 인성의 변화, 사고능력의 저하와 같은 증상을 동반하게 되며 이러한 병의 정확한 원인과 치료법이 밝혀지지 않는 동안, 신경전달체계인 콜린성 신경계의 기능저하와 인지기능의 손상과 밀접한 관계가 있다는 것이 밝혀지면서 뇌에서 아세틸콜린의 분해효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 활성을 억제하여 아세틸콜린의 농도를 유지하여 일차적으로 나타나는 주 증상인 기억력 감퇴 증상을 억제하려는 노력이 최근까지 활발하게 진행되고 있다. 원인적인 치료방법이 아니라도 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 콜린성 신경계를 보충해주고 개선해주어 저하된 인지기능을 개선해 줄 수 있으며 부작용이 적은 약물을 개발하는데 초점이 맞춰지고 있다.

한편 이러한 AD의 발병기전에 산화적 스트레스가 주요 원인의 하나로 알려짐에 따라^{11,12)} 항산화활성을 가진 물질로부터 치매치료제를 개발하기 위한 연구가 진행되고 있다. 최근 생각에서 추출되어 뇌내 AChE의 활성억제효과를 가지는 항산화물질들이 주목 받고 있는데 남아시아에서 널리 분포되어 있는 *Tabernaemontana divaricata*추출물이나 오미자로 알려진 *Schizandra chinensis*의 열매에서 분리된 gomisins A, 또 tea tree oil 등 여러 가지 생약 추출물들에서 AChE 억제활성이 보고되는

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2813 (팩스) 043-268-2732
(E-mail) jinthong@cbucc.chungbuk.ac.kr

등,¹³⁻¹⁵⁾ 현재 임상적으로 사용되고 있는 AChE 활성 억제약물들보다 부작용이 적으며 효능이 좋고, 원인적 치료까지 가능한 새로운 학습, 기억력 증진효과를 갖는 새로운 치매치료제를 찾는 데 여러 연구팀들이 관심을 가지고 연구를 진행하고 있는 상태이다.

본 연구에서 사용한 L-theanine은 뛰어난 항산화효과와 신경보호효과 알려진 녹차 구성성분 중의 하나인 amino acid로, glutamate receptor에 경쟁적으로 작용하는 천연 glutamate 유사 화합물로 중추신경계에 작용할 것으로 판단되어^{16,17)} L-theanine이 항무스카린성 약물로 작용하여 중추신경을 억제 및 기억력 상실을 유발하는 scopolamine에 대해 방어작용을 나타내는지를 행동약리 및 bioassay를 통해 알아보았고 그 기전이 AChE 억제에 의한 것인지를 확인하였다.

실험 방법

실험동물 및 시료

생후 9주 된 수컷 ICR 마우스를 중앙실험동물(주)로부터 구입하여, 1주간 순화시키면서 일반증상을 관찰하였고, 체중을 측정하여 건강한 것만을 선별하여 사용하였다. 실험동물은 충북대학교 실험동물연구지원센터에서 GLP 수준의 관리기준에 따라 사용하고, 관리, 투여, 실험을 실시하였다. 물과 실험동물용 사료는 자유로이 섭취하도록 하였고, 약물을 물에 녹여 투여하기 위해 1일 평균 물 섭취량을 측정하였다. 본 실험에 사용한 L-theanine은 일본 태양화학(Taiyo kagaku, Japan) 제품을 (주)LG생활건강으로부터 제공받아 사용하였다.

L-Theanine 및 scopolamine의 투여

마우스를 평균체중과 분산이 균질 하도록 군을 나누고, 각 군 당 10마리씩 4군으로 하였으며, 1일 물 섭취량을 고려하여 용매 자체 또는 시험물질(L-theanine 2, 4 mg/kg)을 음용수에 녹여 7일간 투여하였다. 마우스는 자극할만한 요인을 없애고 같은 조건하에서 사육하였다. Scopolamine 1 mg/kg을 trial 30분 전에 복강 내 투여하였다.

수동회피시험(Passive avoidance test)

마우스의 기억능을 측정하기 위하여 step through 장치(Med associated Inc., VT, USA)를 사용하였다. 한쪽은 밝고 한쪽은 어두운 부분으로 연결된 상자(4×13×10 cm)로 바닥은 7 mm 간격으로 grid가 설치되어 있으며 어두운 상자 부분에는 전류가 흐르게 되어있다. 마우스를 밝은 부분에 놓으면 마우스의 어두운 부분으로 가려는 성질로 인하여 어두운 곳으로 옮겨가는데 이때 전류를 2초간 0.4 mA로 흐르게 하여 마우스가 다시 밝은 곳으로 옮겨가게 고안되었다. 24시간 후에 마우스를 위와 같은 상자 중 밝은 곳에 놓으면 전날의 전기쇼크로 인하여 상자의 검은 부

분으로 들어가지 않게 된다. 이때 밝은 부분에 체류하는 시간(최대 180초, cut off time)을 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다.

수중미로시험(Water maze test)

빛이 물에 비치지 않게 사방에 칸막이를 설치하고 원형 물탱크(지름 100 cm, 높이 35 cm)에 온도 22~25°C의 물을 표식통 위 1 cm 정도까지 채우고 식용색소를 넣어 바닥이 비치지 않게 만든다. 원형 물탱크 특정한 한 곳에 표식통(지름 4.5 cm, 높이 14.5 cm)을 위치시킨다. 마우스를 입수시켜 살아남기 위해 헤엄쳐 표식통을 찾아가게 고안되었다. 마우스를 입수시켜 표식통을 찾아 갈 때까지 체류하는 시간, 거리, 속도를 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다. L-theanine을 7일간 투여하여 training trial(물에 입수하여 표식통을 찾아가는 능력)를 3일간 3회씩 총 9회 시행하였다. 마우스의 기억력을 측정하기 위하여 마지막 training trial 24시간 후에 scopolamine을 투여하고 30 분 후 수중미로장치를 이용하여 마우스가 표식통에 도달한 체제시간과 거리, 속도를 측정했다.

Acetylcholinesterase assay

Acetylcholinesterase assay는 Ellman's method¹⁸⁾에 따라서 수행하였다. 행동약리 실험 후 마우스의 뇌를 해마와 대뇌피질로 나누었다. PRO-PREP Protein Extraction Solution(iNtRON Bio Technology Co., Ltd)로 균질 분쇄한 뒤 10분간 vortex한 후 4°C에서 15,000 rpm로 2시간 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit(Bio-rad Co.)를 사용하여 측정하였다. 단백질양의 측정방법은 다음과 같다. 1.46 mg/ml bovine plasma gamma globulin stock standard를 희석하여 표준액을 준비하였다(표준액 희석배수; 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml). 단백질 표준액과 준비한 시료를 각각 20 ml씩 96 well microplate에 넣고 Bio-rad protein dye reagent를 180 ml씩 혼합하여 5분 동안 반응시킨 후 ELISA plate reader에서 595 nm로 흡광도를 측정하여 표준액에 대한 정량곡선에 대입하여 시료의 단백질 정량 값을 산출하였다. 단백질량이 맞춰진 시료를 5~10 ml 반응완충액(50 mM Tris-HCL pH 8.0 containing 0.01% DTNB, 0.02% acetylthiocholine, 0.1 mM

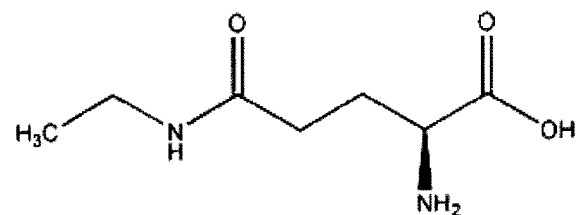


Fig. 1 - Chemical structure of L-theanine.

iso-OMPA)과 섞어 200 ml을 동일하게 만들어 96 well microplate에 넣고 10분간 37°C에서 incubation 후 ELISA plate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 활성을 측정하였다. 효소 활성은 units of nmole/min/mg/protein으로 표현하였다.

통계

연구 결과치는 one-way AVOVA로 분석하여 군간 유의성 여부를 판별하고 그 결과 군간 유의성은 Dunnett's test로 분석하였다. P<0.05 및 P<0.01로 유의적 차이를 나타내었다.

실험결과

Scopolamine으로 유도된 기억력 상실에 대한 수동회피시험에서 L-theanine의 기억력 회복능 효과

대조군은 전날에 받은 전기쇼크를 기억해 어두운 상자로 들어가는 시간이 training 때보다 현저히 증가하였으나, scopolamine (1 mg/kg, i.p.)을 처리한 동물은 기억력 상실로 인하여 어두운 상자로 이동하여 밝은 상자에서의 체류시간(8±1.7 sec)이 크게 증가하지 않았다. 반면 7일간 L-theanine을 투여 후 scopolamine (1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 밝은 상자에서의 체제 시간은 L-theanine 2 mg/kg 투여 시 2배 정도(16±3.2 sec), 4 mg/kg 투여 시는 3배 정도(20±2.7 sec)로 농도 의존적으로 기억력 회복기능을 보였다(Fig. 2).

Scopolamine으로 유도된 기억력 상실에 대한 수중미로시험에서 L-theanine의 기억력 회복능 효과

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)을 처리한 동물은 기억력 상실로 인하여 비교적 다른 경로를 거치지 않고 자신이 헤엄쳐 다닌 위치를 기억하여 표식통을 찾는 대조군에 비해 이동거리와 체제시간

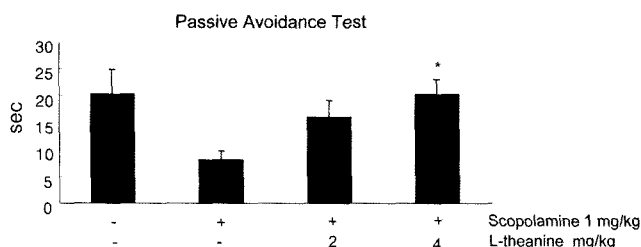


Fig. 2 – The improving effect of L-theanine on memorial impairment induced by scopolamine in passive avoidance test. The mice fed drinking water containing 2 and 4 mg/kg of L-theanine for 7 days were given electric shock when entered dark room in training trial. After 24 hr of the trial, the retention time was recorded 30 min after scopolamine injection (i.p. 1 mg/kg). Each value represents mean±S.E. * p<0.05 compared with scopolamine treated control.

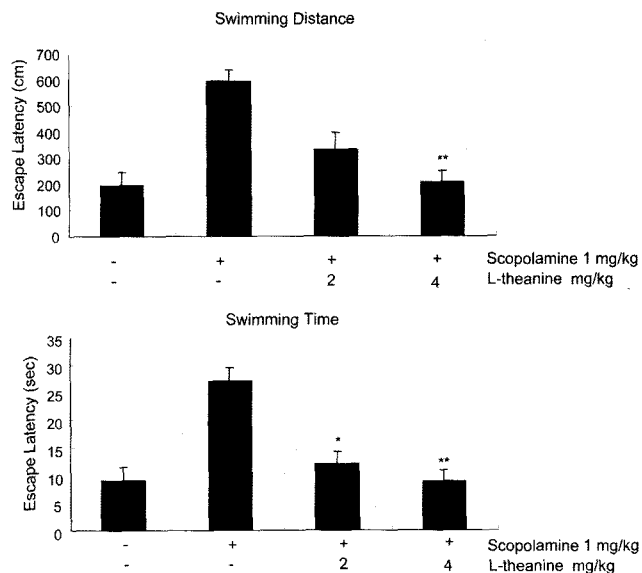


Fig. 3 – The improving effect of L-theanine on memorial impairment induced by scopolamine in water maze test. Mice were fed L-theanine (2 and 4 mg/kg) in the drinking water for 7 days and given training 3 times a day for 3 days. The maze test was then performed after 24 hr of the last training with the injection of scopolamine to induce memory impairment, and the latency time and distance were recorded. Each value represents mean±S.E. * p<0.05 and ** p<0.01 compared with scopolamine treated control.

이 늘어났다. 반면 7일간 L-theanine을 투여 후 scopolamine (1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 체제 거리는 scopolamine 군(594±63 cm)에 비해 L-theanine 2 mg/kg 투여 시 10% 정도(334±92 cm), 4 mg/kg 투여 시는 35% 정도(206±57 cm)로 감소하는 등 농도 의존적으로 현저한 기억력 회복기능을 보였으며, 체제 시간은 scopolamine 군(27±3.5 sec)에 비해 L-theanine 2 mg/kg 투여 시 15% 정도(12±3.2 sec), 4 mg/kg 투여 시는 35% 정도(8±2.5 sec)로 감소하는 등 농도 의존적으로 현저한 기억력 회복기능을 보여 상대적으로 표식통을 찾는 속도도 농도 의존적으로 빨라짐을 보였다(Fig. 3).

Scopolamine으로 유도된 acetylcholinesterase에 대한 L-theanine의 억제효과

뇌내의 acetylcholinesterase의 활성 정도를 보기 위해 마우스의 대뇌피질과 해마 영역을 나누어 acetylcholinesterase의 활성을 측정된 결과, 대뇌피질에 비해 해마영역에서 acetylcholinesterase 활성이 높았으며, scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 대조군과 비교해서 현저하게 acetylcholinesterase가 유도되었다, 7일간 L-theanine을 투여 후 scopolamine(1 mg/kg, i.p.)를 처리한 동물에서 acetylcholinesterase 활성은 scopolamine 투여시(대뇌피질 154±41 nmole/min/mg/protein, 해마 136±8.7 nmole/min/mg/protein)보다 L-theanine 2 mg/kg 투여 시 30%

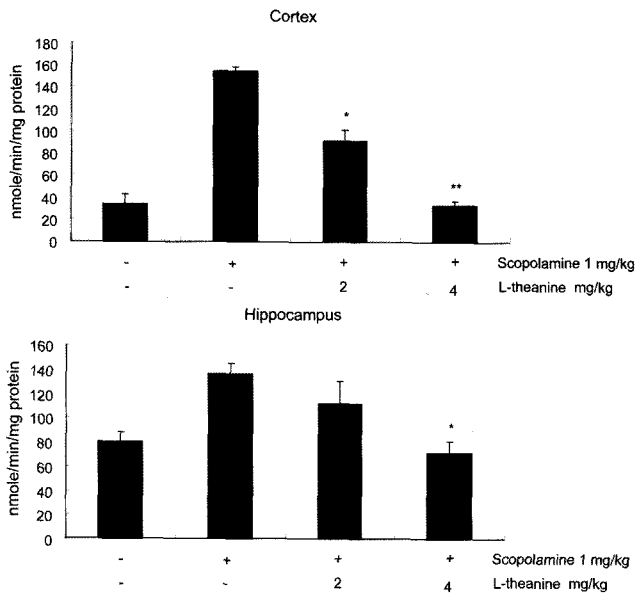


Fig. 4 - The inhibitory effect of L-theanine on AChE activity in cortex and hippocampus of scopolamine-induced mice. Mice were treated with L-theanine (2 and 4 mg/kg) for 7 days and the AChE activity was measured. Each value represents mean \pm S.E. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with scopolamine treated control.

정도(대뇌피질 90 ± 9.9 nmole/min/mg/protein, 해마 111 ± 17.7 nmole/min/mg/protein)로 억제되었고, 4 mg/kg 투여 시는 대조군 수준(대뇌피질 32 ± 3.9 nmole/min/mg/protein, 해마 70 ± 9 nmole/min/mg/protein)으로 억제되었으며 이는 농도 의존적인 양상을 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

퇴행성 신경질환인 알츠하이머병은 비가역적으로 진행되는 치매로 60세 이상의 인구에서 나타나는 치매의 50% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있으며,¹⁴⁾ 주 증상의 하나로 기억력과 학습능력이 감퇴되는데 이 증상은 시냅스의 콜린성 신경계 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 효소 즉 acetylcholinesterase가 과도하게 발현되어 뇌내 아세틸콜린의 농도를 유지하지 못하여 발생한다. 본 연구는 항산화물질이 신경세포사를 억제하여 신경세포를 보호함으로써 인지능 개선에 효과가 있다는 점에 착안하여,¹⁹⁻²¹⁾ 항산화작용이 있으며 본 연구팀에 의하여 기억력회복효과가 입증된 바 있는^{22,23)} 녹차에서 추출한 L-theanine에 대하여 수동회피시험 및 수중미로시험을 통하여 scopolamine에 의한 기억력 억제에 대한 보호효과를 관찰하였다. 그 결과 L-theanine은 그 자체로는 마우스의 기억능 변화에는 영향이 없었지만, scopolamine에 의한 기억 및 학습능력억제에 대한 회복능력을 농도 의존적으로 증가시켰다.

또한 scopolamine을 투여한 마우스의 대뇌피질과 해마영역에서의 AChE의 활성을 측정된 결과 L-theanine이 대뇌피질과 해마영역에서 AChE를 농도의존적으로 억제하였는데 이는 L-theanine이 실제로 혈관뇌장벽(blood brain barrier)을 통과한 후 뇌내 AChE 활성억제를 통해 뇌내 아세틸콜린의 농도를 적절하게 유지함으로써 뇌의 시냅스에서 콜린성 신경계의 기능을 높여 주어 학습과 기억력 감퇴를 억제하여 주었다는 것을 의미한다.

AChE의 발현을 억제하는 것은 치매 치료에 있어서 현재 가장 큰 비중으로 임상에서 사용되고 있으며, 아세틸콜린의 농도를 유지하는 것은 치매의 일차적 증상인 기억력 감퇴현상이 진행되는 것을 막아주어 병의 진행을 지연시키고 인지능을 증진시킨다는 점에서 큰 의미를 가지고 있다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 치매관련 약물로는 tacrine(Cognex, 1994)과 donepezil(Aricept, 1996)이 있으며 성인 1회 상용 복용량은 10 mg이다. 이 약물들은 대표적인 AChE inhibitor로 미국 FDA에서 승인을 받아 치매에 임상적으로 가장 빈번하게 사용되지만 tacrine은 심각한 간독성이 수반되고, donepezil의 경우 오심, 구토 등의 부작용이 보고되는 등 사용하는데 주의를 요하는 약물들이다.

L-Theanine은 녹차에서 유래한 성분으로 녹차는 오랜 기간 동안 그 안전성이 인정되었고 또한 장기간 복용하여도 특이 부작용이 보고되지 않은 천연물로서 주성분 중 하나인 L-theanine도 인체에 특이부작용이 알려져 있지 않다. 실제 연구결과에서도 L-theanine은 13주 반복투여 독성시험결과에서 특이 부작용이 발견되지 않았으며 NOAEL 치가 4000 mg/kg으로써 매우 안전한 물질로 판단된다.²⁴⁾ 이 수치는 본 연구에서 기억력회복효과가 나타나는 복용량인 4 mg의 1000배로 안전성이 높아 기능성식품 등에 사용하기에 적합한 이점이 있다고 사료된다.

또한 항산화물질로 AChE 억제활성을 나타내는 다른 천연물에서 유래된 물질들과 비교를 해보면, 오미자에서 추출된 gomisin A는 5 mg/kg(p.o.)에서 약 50%의 AChE 억제능을 보였고, Tabernaemontana divaricata 추출물(TDE)은 500 mg/kg를 랫드에 투여할 때 25% 정도의 억제효과를 보여 L-theanine이 다른 물질의 억제능보다 용량대비 우수한 것으로 판단된다.^{13,14)}

구조적으로 L-theanine은 glutamate의 gamma 위치에 ethylamide기만 치환되어 있는 화학구조를 가지고 있다(Fig. 1). 이런 신경전달물질과의 구조적 유사성 때문에 glutamate receptor들에 binding할 수 있다고 밝혀져 있으며,¹⁶⁾ 이 같은 특징으로 인해 중추신경에 작용하여 AChE 억제활성으로 인한 인지능개선 작용 외에 신경세포보호작용이 나타나는 것으로 판단된다.²⁵⁾ 한편 L-theanine의 신경세포보호작용은 alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA), N-methyl-D-aspartate (NMDA), 및 kainate와 같은 glutamate receptor subtype들에 대해 antagonist로 작용하여 glutamate에 의해 유도되는 신경세포사를 억제해주는 기능과 중요한 연관성이 있는 것으로 판단

된다.²⁶⁾

또한 중추신경에 작용한다는 또 다른 증거자료 중 하나로 L-theanine과 신경안정제인 alprazolam과의 비교효능 테스트에서 약 70%에 해당하는 anxiety 효과를 나타냈다는 연구결과도 보고되어 있다.²⁷⁾ 또 다른 연구에 의하면 donepezil과 tacrine과 같은 AChE inhibitor 약물들이 기존의 약효 이외에 루이체(lewy bodies)를 동반한 치매에서 피질에 축적된 아밀로이드 베타 단백질을 줄여준다는 결과가 보고되었고,²⁸⁾ neuroinflammation을 유발하는 lipopolysaccharide(LPS)를 투여한 마우스에 tacrine과 rivastigmine, donepezil을 투여하였을 때, 염증유발의 marker가 되는 Interleukin-2(IL-2)의 발현을 줄여주어 neuroinflammation을 억제하는 효과가 있다는 것도 보고되었다.²⁹⁾ L-Theanine의 경우도 이와 같은 작용에 의해서도 기억력회복효과가 있을 수 있다고 판단된다. 실제 본 연구자들의 연구에서 L-theanine은 치매 원인물질인 beta amyloid에 의한 기억력저하를 회복시켰으며, 신경세포사가 감소함을 확인하였다(미발표자료). 따라서, L-theanine이 scopolamine에 의한 AChE의 생성 억제를 통한 신경전달물질의 유지, 보호작용과 기억력회복의 효과적인 후보물질로 판단된다.

감사의 말씀

본 실험은 LG 생활건강에서 지원한 연구비로 수행하였으며 이에 감사 드립니다.

문헌

1) Hardy, J. A. and Higgins, G. A. : Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **10**, 184 (1992).
 2) Checler, F. : Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **65**, 1431 (1995).
 3) Harada, J. : Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **4**, 154 (1997).
 4) Hwang, D. Y., Chae, K. R., Kang, T. S., Hwang, J. H., Lim, C. H., Kang, H. K., Goo, J. S., Lee, M. R., Lim, H. J., Min, S. H., Cho, J. Y., Hong, J. T., Song, C. W., Paik, S. G., Cho, J. S. and Kim, Y. K. : Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **16**, 805 (2002).
 5) Ho, P. I., Collins, S. C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E. and Shea, T. B. : Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* **78**, 249 (2001).
 6) Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchen, M. R. : Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the

primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci.* **15**, 5088 (2003).
 7) Parks, J. K., Smith, T. S., Trimmer, P. A., Bennett, J. P. Jr. and Parker, W. D. Jr. : Neurotoxic Abeta peptides increase oxidative stress *in vivo* through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition *in vitro*. *J. Neurochem.* **76**, 1050 (2001).
 8) Butterfield, D. A. : beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 495 (1997).
 9) Pappolla, M. A., Chyan, Y. J., Omar, R. A., Hsiao, K., Perry, G., Smith, M. A. and Bozner, P. : Evidence of oxidative stress and *in vivo* neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **152**, 871 (1998).
 10) Jain, N. K., Patil, C. S., Kulkarni, S. K. and Singh, A. : Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging- and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice. *Behav. Brain Res.* **133**, 369 (2002).
 11) Zhu, X., Raina, A. K., Lee, H. G., Casadesus, G., Smith, M. A. and Perry, G. : Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1000**, 32 (2004).
 12) Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A. and Carney, J. M. : Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* **131**, 193 (1995).
 13) Chattipakorn, S., Pongpanparadorn, A., Pratchayasakul, W., Pongchaidacha, A., Ingkaninan, K. and Chattipakorn, N. : *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J. Ethnopharmacol.* **110**, 61 (2007).
 14) Kim, D. H., Hung, T. M., Bae, K. H., Jung, J. W., Lee, S., Yoon, B. H., Cheong, J. H., Ko, K. H. and Ryu, J. H. : Gomisin A improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **542**, 129 (2006).
 15) Mills, C., Cleary, B. J., Gilmer, J. F. and Walsh, J. J. : Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 375 (2004).
 16) Takami, K. : Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1513 (2002).
 17) Yokogoshi, H., Kobayashi, M., Mochizuki, M. and Terashima, T. : Effect of theanine, gamma-glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem. Res.* **23**, 667 (1998).
 18) Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. : A new and rapid colorimetric determination of

- acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
- 19) Grundman, M., Grundman, M. and Delaney, P. : Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. *Proc. Nutr. Soc.* **61**, 191 (2002).
- 20) Mazziro, E. A., Harris, N. and Soliman, K. F. : Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta. Med.* **64**, 603 (1998).
- 21) Kim, S. R., Um, M. Y., Ahn, J. Y., Hong, J. T. and Ha, T. Y. : The Protective effects of sesaminol glucosides against cognitive deficits and oxidative stress induced by beta-amyloid protein in mice. *Physiologic Functions and Disease Risk Reduction* **3**, 120 (2003).
- 22) Lin, A. M., Chyi, B. Y., Wu, L. Y., Hwang, L. S. and Ho, L. T. : The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat brain. *Chin. J. Physiol.* **41**, 189 (1998).
- 23) Hong, J. T., Ryu, S. R., Kim, H. J., Lee, J. K., Lee, S. H., Yun, Y. P., Lee, B. M. and Kim, P. Y. : Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res.* **5**, 11 (2001).
- 24) Borzelleca, J. F., Peters, D. and Hall, W. : A 13-week dietary toxicity and toxicokinetics study with L-theanine in rats. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1158 (2006).
- 25) Nathan, P. J., Lu, K., Gray, M. and Oliver, C. : The neuropharmacology of L-theanine(N-ethyl-L-glutamine): a possible neuroprotective and cognitive enhancing agent. *J. Herb. Pharmacother.* **6**, 21 (2006).
- 26) Kakuda, T., Nozawa, A., Sugimoto, A. and Niino, H. : Inhibition by theanine of binding of [3H]AMPA, [3H]kainate, and [3H]MDL 105,519 to glutamate receptors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2683 (2002).
- 27) Lu, K., Gray, M. A., Oliver, C., Luley, D. T., Harrison, B. J., Barholomeusz, C. F., Phan, K. L. and Nathan, P. J. : The acute effects of L-theanine in comparison with alprazolam on anticipatory anxiety in humans. *Hum. Psychopharmacol.* **19**, 457 (2004).
- 28) Ballard, C. G., Chalmers, K. A., Todd, C., McKeith, I. G., O'Brien, J. T., Wilcock, G., Love, S. and Perry, E. K. : Cholinesterase inhibitors reduce cortical Abeta in dementia with Lewy bodies. *Neurology* **15**, 1726 (2007).
- 29) Ethika, T., Rahul, A., Chandishwar, N. and Rakesh, S. : Effect of anti-dementia drugs on LPS induced neuroinflammation in mice. *Life Sci.* **80**, 1977 (2007).