

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07989

研究課題名(和文) 幼雛期のニワトリにおけるキヌレニン経路の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Study on physiological functions of kynurenine pathway in chicks

研究代表者

友永 省三 (Tomonaga, Shozo)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00552324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：幼雛期のニワトリにおいて、キヌレニン経路やその他経路の代謝物質が、ストレス負荷や成長の影響を受けるのかをメタボローム解析を用いて調べた。まず、暑熱ストレスにより、キヌレニンやキノリン酸などのキヌレニン経路代謝物の増加を確認することができた。次に、成長に伴う変動を調べたところ、幾つかの興味深い代謝物質の変動が認められたものの、キヌレニン経路代謝物においては十分な分析感度が得られず、明らかにできなかった。そこで、キヌレニン経路を含むトリプトファン代謝物の網羅的高精度分析系を検討する意義を見出し、取り組んだ結果、キヌレニン経路代謝物だけでなく、他の経路代謝物も含む有用な分析系を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリにおいて、成長やストレスとキヌレニン経路の関係は不明な点が多かった。本研究から、これらの関係解明に向けて有用な基盤情報と分析系を得ることができた。これらを用いた更なる研究は、ニワトリにおける生産向上に係る生理機能の解明に向けて有用である。今後、関連する研究成果の蓄積から、食糧自給率の改善が望まれる我が国における鶏卵や鶏肉の生産に資することを目指す。

研究成果の概要(英文)：I investigated influences of stress and growth on metabolite levels in kynurenine pathway and other metabolic pathways in chicks by GC/MS metabolomic analysis. Heat stress increased levels of kynurenine pathway metabolites, kynurenic acid and quinolinic acid. Growth affected some interesting metabolites levels while changes of kynurenine pathway metabolites could not be checked because the sensitivity of analytical method was not enough. Therefore, I established new analytical method to quantify various tryptophan metabolites including kynurenine pathway metabolites in chicks.

研究分野：生後脳機能発達期の栄養学

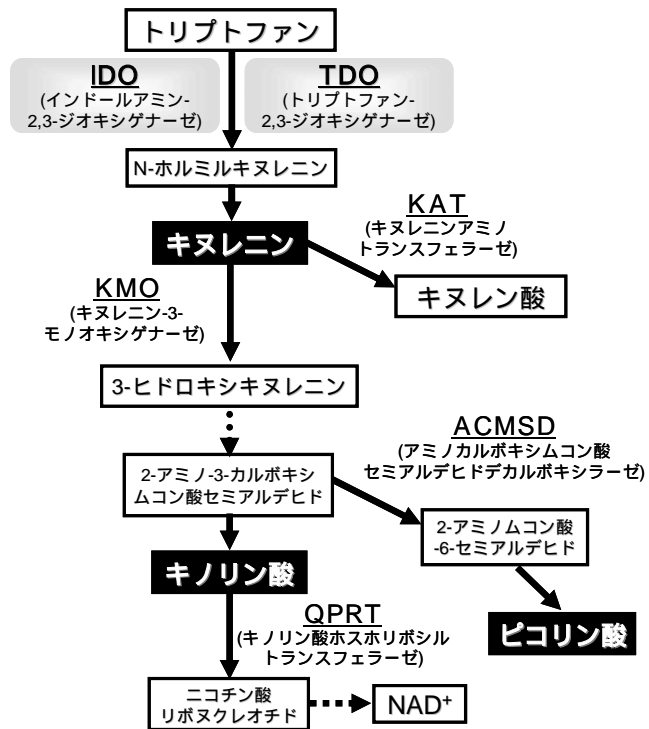
キーワード：キヌレニン ニワトリ 成長 ストレス メタボローム解析 ガスクロマトグラフ質量分析計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

必須アミノ酸であるトリプトファンは、ヒトにおいて食事から摂取する9割がキヌレニン経路(右図)を介して代謝される。本経路はNAD⁺生合成経路として知られている。近年、ヒトやげっ歯類において免疫や神経伝達に関与することが明らかになり、心身の健康維持・向上に重要な役割を担っている。

産業動物のキヌレニン経路は、ほとんどの代謝酵素の遺伝子配列が明らかになっている。しかしながら、げっ歯類と十分に比較可能な生理機能や代謝制御機構の研究成果は蓄積されていない。申請者は、幼雛期のニワトリにおいて、増体重に優れた鶏種の血中キノリン酸濃度が高いことを見出した。一方、増体重や摂食行動を抑制を誘導する慢性暑熱ストレスにより、血中のキヌレニンとキノリン酸濃度が増加することを確認した。更に、キヌレニン酸やキノリン酸の脳内投与が、急性ストレスに対する反応を緩和することも見出した。以上から、ニワトリのキヌレニン経路は、「成長ならびにストレス反応」に関与すると仮説を立て、詳細に検証する価値があると考えた。



2. 研究の目的

ニワトリの成長ならびにストレス反応におけるキヌレニン経路の生理的意義の解明を目指した。具体的には、幼雛期のニワトリにおいて、キヌレニン経路の代謝物質が、成長ならびにストレス反応と関連するのかをより詳細に調べた。キヌレニン経路は、他の様々な低分子代謝物質と代謝などで関連しうることから、初期段階では、これらの多くを含めた分析が可能であったガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いた低分子代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)を用いた。しかしながら、研究が進むにつれて、本方法では、キヌレニン経路代謝物質が分析できない場合が生じてきたことから、キヌレニン経路代謝物質の分析系の安定化を目指し幾つかの改良を試みた。用いてきたメタボローム解析の改良だけでなく、より抜本的な分析方法の変更、すなわち、キヌレニン経路を含むトリプトファン代謝物質に適した網羅的分析系を検討する意義を見出し、取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 幼雛期ニワトリ(卵用種、オス)の暑熱ストレス負荷における血漿のGC/MSメタボローム解析結果の再確認を行った。

(2) 本研究の遂行においてメタボローム解析は重要であるが、申請者らは、GC/MSのSCANデータを用いた手動同定に基づく解析を行ってきた。手動同定は、熟練者が行う場合には有用ではあるが、それでもある程度の時間を要し個人差が生じうる。これらを軽減可能な半自動同定に基づく解析に有用なソフトウェアMS-DIAL(理化学研究所)を用いたメソッドが本申請研究の遂行中に公開されたことから(Lai et al., Nat Methods, 2018, 15(1):53-56)、本方法の導入と検討を行った。

(3) 成長およびストレス反応が異なる複数鶏種の血漿あるいは組織を用いて、GC/MSメタボローム解析を用いた成長に伴う代謝変動の解析を行った。解析には(2)で検討したMS-DIALを用いた。具体的には、

3a) 成長が異なる2つの肉用種(オス)における成長に伴う変動の比較

(血漿および浅胸筋、1、3および7週齢)

3b) 卵用種(オス)における成長に伴う変動の評価

(血漿および浅胸筋、1、3および7週齢)

3c) 卵用種と肉用種(オスおよびメス)における孵化直後における成長に伴う変動(血漿)以上、3つの実験に取り組んだ。

(4) 本研究の遂行においてメタボローム解析は重要であるが、申請者が用いてきた方法とは前処理とGCカラムでの分離までは同じであるが質量分析計における検出が異なる方法、すなわち、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS/MS)のMRMデータを用いる新規手法が、国内企業からメソッドパッケージとして市販されている。申請者が用いてきたGC/MSのSCANデータを用いる方法と比して、新規化合物の探索能は劣る一方、MRMによる夾雑物との分離能の向上が期待できる結果、選択性や感度の向上につながることから本方法の導入

と検討を行った。

(5) メタボローム解析で用いてきた分析系よりもキヌレニン経路代謝物質に関して優れることが期待される GC-MS/MS の負化学イオン化法 (NCI 法) を用いた分析系の確立を行った。試薬ガスとしてメタンガスをを用いた。キヌレニン経路代謝物質だけでなく、他のトリプトファン代謝物質、更には、それら以外の低分子代謝物質も分析可能なのか調べることで、分析系の詳細な評価を行った。

4. 研究成果

(1) では、分析データの再確認を行った結果、キヌレニン経路への影響は確実であることから論文として報告する価値があると考え、論文として学術誌に投稿し受理された (雑誌論文)。ニワトリにおけるストレスとキヌレニン経路の関連解明の意義を議論した。本研究では、4日間連続して暑熱ストレスを負荷した。明らかな負の影響 (増体重の減少や摂食量の抑制) が認められる一方、死亡には至らない条件下で行った。一方で、実際の産業の現場では、暑熱ストレスは非連続的に生じ、増体重の減少や摂食量の抑制だけでなく、死亡率の上昇が認められる。したがって、家禽産業における暑熱ストレスと同じ条件ではない。しかしながら、メタボローム解析を行う場合には、死亡に至る条件では、個体差が生じ安定したデータを得ることができないと推測している。たとえば、死亡した個体からは、サンプルを採取できず、その結果、生存した個体のみから採取したサンプルを解析した場合は、暑熱ストレスに強い個体のみ結果となることから解釈が困難となる可能性があると考えている。本研究では、特に重要視したキヌレニン経路のキノリン酸の増加を定量分析で再確認したが、このことにより、ニワトリにおいてストレス負荷条件の血漿キノリン酸濃度を定量分析したはじめての報告となった。加えて、ニワトリの暑熱ストレス研究では既に複数の関連が報告されているメチオニン代謝に影響を及ぼしたことや、暑熱ストレスは、酸化ストレスと関連するが、抗酸化物質であるカルノシンを含む β -アラニン代謝に影響を及ぼしたこと、機能は不明だが、他の動物種において生理活性が報告されている幾つかの低分子代謝物質に及ぼす影響についても確認して議論できたことなどから、ニワトリにおいて、ストレスと生体内低分子代謝物質の関連における新規かつ多様な基盤情報を提供することができた。

(2) では GC/MS の SCAN で取得した幾つかのデータについて、従来の手動同定に基づく解析と MS-DIAL を用いた半自動同定に基づく解析の結果を比較したところ、幾つかの差異は認められたものの、有意な影響が認められる大部分は同様の結果が出力されたことから、新規手法が有用であることを確認することができた。従来の手動同定でしか得られないケース、たとえば半自動同定では同定物質として採用できないくらい類似度が低いとその物質由来として特異性が高いイオンのクロマトグラムを手動で見た場合は採用できる場合、などもあることから、費用対効果も含めて状況に応じた選択を行う必要があると考えている。

(3) では、以前 ((1) の結果および雑誌論文) とは異なり、メタボローム解析において、キヌレニン経路の代謝物質は、分析感度の不足等により同定できない場合がほとんどとなってしまい、変動を確認することができなくなった。その結果としてキヌレニン経路への影響については議論することができなかった。一方、その他の幾つかの低分子代謝物質について日齢や鶏種差の影響が認められた。その中でも、(3a) および (3b) の一部について学会発表を行い (学会発表) 投稿論文として準備中である。また、(3c) では、成長および性別に関して幾つか興味深い変動が認められ、その中でも微量栄養素の1種であるパントテン酸が成長に優れる肉用種で顕著に多いことは重要であると推測し、他の実験から再現性も確認できたことから、論文として報告する価値があると考え、論文として学術誌に投稿し受理された (雑誌論文)。

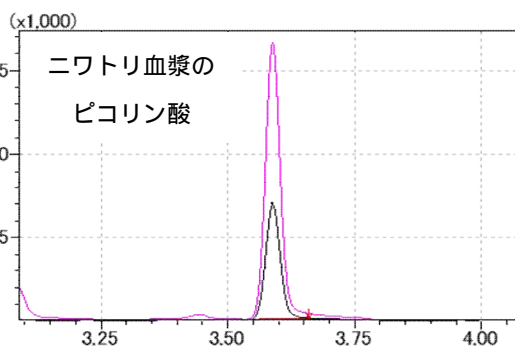
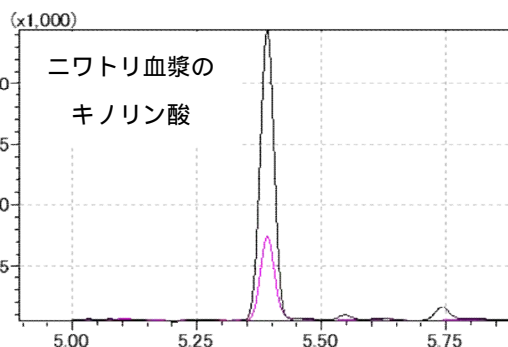
(4) では、新規手法の方が従来法に比べ、一部成分について夾雑物からの分離に優れることを確認した。これは、MRM による選択性の向上が寄与したことによると推測された。また、キヌレニン経路の代謝物質の中では、キヌレニンは従来法よりも高精度に分析できることがわかった。ただし、新規手法は、MRM を用いるため、網羅的なイオンの取得による SCAN と比べ同定の判断材料が少ない。これを改善するために、全サンプルから少量採取して合わせることで得る QC サンプルの SCAN データの MS-DIAL を用いた解析結果を組み合わせることが有用であることを確認した。また、MRM データの効率的な解析に有用な MRM-PROBS (理化学研究所、Tsubawa et al., Anal Chem. 2013, 85(10):5191-5199) を検討した。これは、関連研究集会に参加することにより (学会発表 および) 本ソフトの開発者と情報交換することができた結果、導入に成功した。

(5) では、内標として、MRM 条件が設定できた3種類を選択した。具体的には、キノリン酸に対してキノリン酸-d3、ピコリン酸に対してピコリン酸-d4、全成分に対して2-イソプロピルリンゴ酸が有用であると考え、これら3成分を検討した結果、検出可能であり MRM 条件を設定することができた。トリプトファン代謝物質として、ピコリン酸、キノリン酸、アントラニル酸、3-ヒドロキシアントラニル酸、キヌレニン酸、インドール酢酸、キサンツレン酸、5-ヒドロキシインドール酢酸、インドールプロピオン酸、キヌレニン、3-ヒドロキシキヌレニン、トリプタミン、セロトニン、トリプトファンおよびメラトニンが検出可能であり、MRM 条件を設定することができた。その他の低分子代謝物質として、アミノ酸 (グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、シスチン、トレオニン、 β -アミノ酪酸、アスパラギン、グルタミン酸、フェニルアラニン、チロシン、リジン、メチオニンおよびメチオニンスルホン)。

ポリアミン（プトレシン、1,6-ジアミノヘキサン、スペルミジンおよびスペルミン）およびジペプチド（アンセリン、カルノシンおよびバレニン）においても、同様にMRM条件を設定することができた。ただし、幾つかのアミノ酸（アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、グルタミン、システイン酸、システイン、セリン、ヒスチジン、プロリン、ヒドロキシプロリン、オルニチン、シトルリンおよびノルバリン）、タウリン、TCA回路を構成する有機酸（クエン酸、コハク酸、フマル酸およびリンゴ酸）では、最適な検出条件を見出せず、したがって次の段階であるMRM条件を設定できなかった。以上から、本分析系の有用性を評価することができた。たとえば、トリプトファン代謝における、キヌレニン経路以外の経路にあるセロトニンやインドール酢酸などの生理活性物質が分析可能であることは、トリプトファン代謝を俯瞰する研究に有用である。更に、トリプトファンと輸送体が拮抗する幾つかのアミノ酸との同時分析が可能であることから、各組織へのトリプトファンの取り込みに関する研究に本分析系が有用な可能性がある。一方で、トリプトファン代謝の各経路で代謝される割合を評価するフラックス解析を行うためには、トリプトファン代謝の下流にあるTCA回路を構成する有機酸の分析系が必要であることから、フラックス解析を検討する場合は他の分析系を用意する必要がある。

本分析系を用いて、ニワトリの血漿を検討したところ、(3)では分析できなかったキノリン酸およびピコリン酸の定量分析が可能であることを確認した(右図は各クロマトグラム)。本定量分析系では、メタボローム解析で用いてきた2-イソプロピルリンゴ酸ではなく、各安定同位体(キノリン酸-d3およびピコリン酸-d4)を内標として用いることにより、定量可能範囲が広がるなど高精度な分析系であることを確認した。

今後は、これらの成果に基づき、ニワトリにおけるキヌレニン経路代謝物質、ストレスおよび成長の関連解明に向けた研究を進めていく。特に、今回確立できた分析系は大きな成果と言える。トリプトファン代謝のキヌレニン経路以外にある生理活性物質が複数検出できたことや、トリプトファンと輸送体で拮抗するアミノ酸群が分析できることは、より詳細な研究に有用であることが期待される。更に、ニワトリだけでなく、ウシやブタなど他の産業動物においても、キヌレニン経路の代謝物質に着目した研究は発展途上であることから、畜産学分野において幅広い貢献が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Tomonaga S, Okuyama H, Tachibana T, Makino R. Effects of high ambient temperature on plasma metabolomic profiles in chicks. *Animal Science Journal* 89(2) 448-455 2018 (査読有) <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12951>

塩田駿介、友永省三 ニワトリのふ化直後における血漿中の成長関連低分子代謝物質の探索
微量栄養素研究 35 34-40 2018 (査読有) <http://www.jtnrs.com/sym35/35-P34.pdf>

〔学会発表〕(計 5件)

ニワトリの成長に関するふ化直後の低分子代謝物質の探索
 塩田駿介・友永省三
 第12回メタボロームシンポジウム 2018年10月

採卵鶏雄における浅胸筋のイミダゾールジペプチド含量と血漿の分枝アミノ酸代謝物濃度は成長に伴い変動する
 友永省三・白石純一・川瀬貴博・塚原隆充・太田能之
 日本家禽学会2018年度秋季大会 2018年9月

ふ卵期のニワトリにおける成長に関する低分子代謝物質の探索
 塩田駿介・友永省三
 第35回微量栄養素学会学術集会 2018年6月

チャンキーと熊野地鶏の浅胸筋におけるメタボローム解析
友永省三・白石純一・川瀬貴博・塚原隆充・渡邊治貴・市川隆久・太田能之
日本畜産学会第124回大会 2018年3月

ニワトリヒナの成長に伴う低分子代謝物質濃度の変化
松尾康平・岡田直樹・友永省三
第10回メタボロームシンポジウム 2016年10月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://researchmap.jp/tomonagashozo/>
<http://orcid.org/0000-0003-0888-1407>

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者
研究協力者氏名：白石純一
ローマ字氏名：SHIRAIISHI Jun-ichi

研究協力者氏名：牧野良輔
ローマ字氏名：MAKINO Ryosuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。