

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12724

研究課題名(和文) 加齢に伴う雌性繁殖・養育能力の減退改善に向けたアミノ酸栄養学の構築

研究課題名(英文) Construction of amino acid nutrition for improving decline of female breeding and child care capacity with aging

研究代表者

古瀬 充宏 (Furuse, Mitsuhiro)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30209176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの遊離アミノ酸が若齢期のマウスに比して中年期のマウスの子宮と卵巣で有意に高くなることが判明した。子宮と卵巣の遊離アミノ酸含量にストレスの影響は認められなかった。また、若齢期に比べ、中年期のマウスの卵子では活性酸素の増加は見られたが、卵子の質の低下は確認されなかった。妊娠期のストレス負荷群において、母体血漿の一部のアミノ酸で有意な減少が認められた。一方、ミルク中の遊離アミノ酸濃度に変化は見られなかった。授乳期におけるストレス負荷は母マウスの血漿遊離アミノ酸の多くを有意に低下させることが判明した。また、授乳期に直接ストレス負荷を受けることによりミルクの遊離アミノ酸含量に変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Many free amino acids were found to be significantly higher in the uterus and ovary of middle age mice than in those of young age mice. There was no effect of stress on the free amino acid concentration of uterus and ovary. In addition, compared to the young age, reactive oxygen species increased in the oocytes of middle age mice, but no deterioration in egg quality was confirmed. Significant decreases were observed in some free amino acids of maternal plasma in the stress-loaded group during pregnancy. On the other hand, there was no change in free amino acid concentration in milk. It was revealed that the stress burden during lactation significantly lowered plasma many free amino acids in mother mice. In addition, changes in the free amino acid concentration of milk were observed by receiving stress directly during lactation.

研究分野：栄養制御学

キーワード：加齢 ストレス 子宮 卵巣 酸化ストレス 妊娠期 授乳期 ミルク

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では女性の社会進出に伴い、結婚年齢が高まる晩婚化が進んだ。それにより出生数の減少や高齢出産の増加が社会現象として捉えられるようになった。子供を求める家族にとって、加齢の影響を軽減することが必要と思われる。

加齢はストレスにより加速することが知られており、生活の質 (QOL) の改善がその対処に繋がる。その改善策の一つが「食」すなわち「栄養」を介してなし得るものと考えられる。申請者は、イヌを用いた研究で加齢に伴い血漿の L-アルギニンと L-プロリンが減少することを認めた (日本ペット栄養学会誌、14,13-17, 2011)。一方、中枢においてアミノ酸は QOL の改善に役立つ可能性も報告してきた。行動を鎮静化するあるいは鎮静・催眠を促すアミノ酸とその代謝産物を見出し、その一連の成果を総説として公表している (Invited Review: Eur J Pharmacol, 762,382-393, 2015)。その鎮静・催眠を促すアミノ酸には L-アルギニンと L-プロリンも含まれる。しかし、加齢に伴い生殖器官のアミノ酸代謝にどのような影響が及んでいるかは明らかではない。

また、母乳による栄養ではカゼインなどの乳タンパク質に注目が集まるが、乳中のアミノ酸はタンパク質に組み込まれたものだけではなく、非タンパク態窒素化合物としての遊離アミノ酸も重要な栄養源となる。人乳の総窒素における 20%-25% は非タンパク態窒素化合物であり、そのうちの 8%-22% は遊離アミノ酸である (Nutrients, 5, 4800-4821, 2013)。加齢により血漿アミノ酸濃度が変化することは、母乳中の遊離アミノ酸濃度が加齢と共に変化する可能性を示唆する。

上述より、中年期 (高齢初産) の妊娠に向けてあるいは出産後の授乳に対して、ア

ミノ酸栄養を考慮することで、母子の健康状態の改善を図ることができると考えた。

## 2. 研究の目的

以下に述べる 3 つの目的をもって研究を遂行した。

実験 1 : 高齢化社会である日本では、健康寿命の延伸が大きな課題となるが、その障壁となる因子の一つに、ストレスがあげられる。課題解決には、老化が始まる前の中年期からの生活の改善、食事からの栄養摂取が重要であると考えられる。最近では高齢期におけるタンパク質摂取の重要性が唱えられているが、加齢に伴い特定のアミノ酸要求量が変化することは想定されていない。そこで今回は、加齢とストレスによるアミノ酸代謝に及ぼす影響を雌性について調べた。

実験 2 : 現代社会における高齢出産の機会の増加により、不妊率や妊娠・出産の際に母子共々にリスクが上昇することが問題視されている。これらを引き起こす要因の一つには、酸化ストレスが挙げられる。酸化ストレスによるミトコンドリアの損傷とその機能の低下が、卵子の質も下げると考えられている。また、3-ニトロプロピオン酸 (3-NPA) はミトコンドリアの神経毒であり、酸化ストレスを増加させ加齢を促進させることが知られている。しかし、生殖機能への影響に関してはまだ解明されていない点も多い。そこで、本実験では、主に卵子の質という観点から、加齢が生殖機能に与える影響を調べ、また、3-NPA の投与による雌マウスの生殖機能や身体機能の変化を探ることを目的とした。

実験 3 : 妊娠。授乳期間に母体がストレスを受けると、子供への影響として体重の減少、夜泣きの増加、うつ病の増加など様々な症状が現れる。そこで本実験は妊娠期間あるいは授乳期間に母体にストレスを負荷することで、母体血漿とミルク中の遊離アミノ酸にど

のような影響が現れるかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験 1 : ICR マウス ( 5 週齢, 雌 / 若齢期 ) および ICR リタイアマウス ( 9 ヶ月齢, 雌 / 中年期 ) を、1 週間の馴化後、コントロール群とストレス群に分け、ストレス群には 28 日間連続で拘束ストレスを負荷し、自由摂食自由飲水で飼育した。拘束ストレスは、1 日当たり 30 分間施した。実験終了後に、子宮と卵巣を採取した。その後、UPLC を用いアミノ酸濃度を測定した。子宮と卵巣における遊離アミノ酸濃度の単位は pmol / mg 湿重量である。

実験 2 : 【方法】 C57BL/6J マウスの若齢期 ( 7 週齢 )、中年期 ( 8 ヶ月齢 ) において活性酸素 ( ROS ) を測定し、卵子の質を免疫蛍光染色によって観察した。卵子の質は、紡錘体の乱れや染色体の配置の変化を確認した。また、3-NPA を若齢期と中年期のマウスに投与し、酸化ストレスにより卵子の質がどのように変化するかを確認した。次いで、若齢期マウスの急激な加齢モデルとして高濃度の 3-NPA の投与の影響を調査した。生殖機能におけるアミノ酸代謝の変化を UPLC で分析した。また、抗酸化酵素の mRNA 発現を qRT-PCR を用いて調べ、酸化ストレス増加の指標とした。

実験 3 : マウスを交配後、ストレス処理群の母マウスに妊娠 10 日目から 18 日目まで毎日 30 分間の拘束ストレスを負荷した。出産 10 日目に搾乳を行い、ミルク中の遊離アミノ酸組成を UPLC により分析した。出産後 21 日目に離乳し、母マウスから血液を採取した。また仔マウスに対して血液のサンプリングを生後 21, 28, 35 日目にそれぞれ実施し解析した。母マウスと仔マウスの血液についても UPLC を用いてアミノ酸組成を調べた。

授乳期間のストレスは、出産後 2 ~ 20 日の

間に計 10 回 30 分の拘束ストレスを負荷した。アミノ酸の分析は Pico-Tag を用いたため、L 型と D 型アミノ酸の識別はできなかった。

妊娠期ならびに授乳期の血漿ならびにミルクの遊離アミノ酸濃度の単位は pmol /  $\mu$  l である。

### 4. 研究成果

実験 1 : 子宮ではタウリンと L-アラニンを除き、また、卵巣では L-セリン、L-グルタミン、L-チロシンおよび L-バリンを除き多くのアミノ酸で中年期マウスの方が有意に高くなる結果となった ( 表 1 )。これは、タンパク質合成が速やかに行われなくなった結果と考えることができる。一方、子宮と卵巣ともストレスの影響は認められなかった ( 表 1 )。今回の実験より、ストレスよりも加齢が雌性生殖器官のアミノ酸代謝に強く影響することが明らかとなった。

表 1. 加齢とストレスが子宮と卵巣の遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

	子宮			
	若齢期対照	若齢期ストレス	中年期対照	中年期ストレス
L-Asp	1335 ± 85	1253 ± 87	1597 ± 158	1668 ± 149
L-Ser	1702 ± 110	1536 ± 117	2268 ± 292	2480 ± 240
L-Gln	2148 ± 141	1936 ± 150	2865 ± 372	3130 ± 307
L-His	471 ± 45	415 ± 27	585 ± 74	633 ± 52
L-Arg	403 ± 49	305 ± 68	1079 ± 211	1070 ± 121
Tau	16960 ± 1343	13442 ± 471	16135 ± 1470	16990 ± 771
L-Ala	2506 ± 153	2252 ± 162	2702 ± 249	2765 ± 202
L-Tyr	509 ± 70	418 ± 37	724 ± 107	804 ± 83
L-Val	868 ± 59	789 ± 46	1280 ± 178	1429 ± 144
L-Met	623 ± 48	577 ± 39	924 ± 129	994 ± 92
L-Phe	484 ± 42	430 ± 36	834 ± 134	955 ± 102
L-Ile	439 ± 35	396 ± 32	827 ± 139	939 ± 105
L-Leu	1071 ± 83	949 ± 74	1714 ± 261	1958 ± 210
	卵巣			
	若齢期対照	若齢期ストレス	中年期対照	中年期ストレス
L-Asp	996 ± 101	868 ± 49	1562 ± 176	1522 ± 86
L-Ser	962 ± 58	880 ± 59	1004 ± 48	1011 ± 69
L-Gln	1744 ± 73	1736 ± 93	1610 ± 36	1611 ± 88
L-His	602 ± 30	513 ± 55	740 ± 38	885 ± 50
L-Arg	443 ± 29	433 ± 30	537 ± 27	545 ± 34
Tau	10088 ± 516	9438 ± 511	14027 ± 608	14645 ± 758
L-Ala	2857 ± 167	2617 ± 184	2477 ± 86	2504 ± 164
L-Tyr	314 ± 25	265 ± 22	322 ± 20	315 ± 18
L-Val	633 ± 43	542 ± 23	617 ± 27	633 ± 27
L-Met	277 ± 18	247 ± 16	301 ± 15	329 ± 24
L-Phe	360 ± 24	320 ± 19	383 ± 20	393 ± 22
L-Ile	285 ± 18	246 ± 15	321 ± 17	337 ± 19
L-Leu	879 ± 75	871 ± 55	1030 ± 56	1036 ± 56

実験 2 : 若齢期に比べ、中年期のマウスの卵子では活性酸素の増加は見られたが、卵子の質の低下は確認されなかった。そこで、3-NPA の投与により酸化ストレスを増加させると、若齢期および中年期のマウス共に、3-NPA の濃度依存的に卵子の質の低下割合は増加した。しかし、老齢のマウスと同レベルまで卵子の質を低下させることはできず、繁殖老齢

モデルマウスを作製するには、更なる検討が必要であろう。高濃度の 3-NPA を投与すると、マウスの体重と身体機能は著しく低下した。これは、身体機能を調整する線条体に 3-NPA が悪影響を及ぼすことを示唆する。また、アミノ酸代謝に変化を生じたことから、3-NPA がミトコンドリアに影響を与え、代謝に乱れを生じさせた可能性が考えられる。また、線条体と子宮においてカタラーゼの mRNA 発現が増加したことから、酸化ストレスの上昇が確認された (図 1)。生殖器では子宮のみに遺伝子発現の変化が認められたため、酸化ストレスは生殖器官間で異なる影響を及ぼす可能性が示唆された。

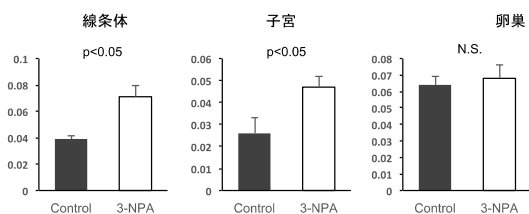


図 1. 3-ニトロプロピオン酸 (3-NPA) 投与が線条体、子宮および卵巣のカタラーゼ mRNA 発現に及ぼす影響。

**実験 3 : 母体の血漿のアミノ酸濃度はストレス群において、すべてのアミノ酸で減少傾向を示し、中でもグルタミン酸、アスパラギン酸、L-セリン、L-グルタミン、L-ヒスチ**

表 2 . 妊娠中のストレスが母マウスの血漿遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

アミノ酸	母マウス血漿		
	対照	ストレス	P 値
L-Asp	12.0±1.0	9.3±0.6	NS
Glu	27.0±2.5	18.7±1.5	<0.05
Asp	27.6±1.9	17.8±1.8	<0.01
D-Ser	ND	ND	
L-Ser	172±7	115±10	<0.001
L-Glu	713±40	463±24	<0.001
L-His	100±5	76±1	<0.05
L-Arg	247±19	185±21	NS
Tau	382±20	333±82	NS
D-Ala	ND	ND	
L-Ala	ND	ND	
L-Tyr	91.5±10	78.2±11	NS
L-Val	467±44	363±97	NS
L-Met	88.0±5.5	70.0±6.3	NS
L-Phe	98.3±8.5	84.8±7.4	NS
L-Ile	188±19	180±22	NS
L-Leu	324±35	273±35	NS

ジンでは有意な減少が認められた (表 2)。一方ミルク中と、仔マウスの血漿中の遊離アミノ酸濃度に変化は見られなかった。しかし、ストレスに対する抵抗性を示すアミノ酸の中で、アスパラギン酸とグルタミンの濃縮率 (ミルク中の濃度/母体血漿中の濃度) はストレス群で有意に増加し、セリンにおいても濃縮率はストレス群で増加傾向を示した。

これらのことから妊娠期間中の母体へのストレス負荷は、母体のアミノ酸濃度やその他の因子の発現を変化させ、胎盤を通して出生後の初期成長と行動に影響を与えている可能性がある。またストレスを受けた個体はストレス耐性のあるアミノ酸をミルク中に特異的に取り込み、仔マウスに供給している可能性が示唆された。

一方、授乳期におけるストレス負荷は母マウスの血漿遊離アミノ酸の多くを有意に低下させることが判明した (表 3)。

また、妊娠期におけるストレスがミルクの遊離アミノ酸組成に影響しないのとは異なる

表 3 . 授乳期間中のストレスが母マウスの血漿遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

アミノ酸	母マウス血漿		
	対照	ストレス	P 値
Asp	17.8±1.0	12.6±1.1	<0.01
Glu	42.9±0.9	43.8±3.7	NS
Ser	122±8	61.9±4	<0.001
Asp	56.9±5.7	24.9±1.8	<0.001
Gly	155±2	77±6	<0.001
Gln	656±24	425±14	<0.001
β-Ala	ND	ND	
Tau	220±12	225±27	NS
His	70.5±0.9	54.6±5.3	<0.05
GABA	89±5	115±5	<0.01
Thr	261±6	104±4	<0.001
Ala	320±6	184±12	<0.001
Arg	272±8	199±13	<0.01
Pro	149±16	68±6	<0.01
Tyr	86.7±5.2	60.5±5.9	<0.01
Val	379±21	209±3	<0.001
Met	77.8±4.7	40.8±2.0	<0.001
Cystathionine	230±12	244±12	NS
Cys+Cystine	15.7±1.0	12.8±1.1	NS
Ile	137±10	74±4	<0.001
Leu	248±11	127±11	<0.001
Phe	102±6	70±7	<0.01
Trp	71.4±3.4	69.5±6.5	NS
Orn	98.1±7.3	37.9±3.7	<0.001
Lys	308±20	142±9	<0.001

り、授乳期に直接ストレス負荷を受けることによりミルクの遊離アミノ酸含量に変化が認められた。血漿アミノ酸はストレスにより減少するのに対し、有意な効果が認められたアスパラギン酸、 $\beta$ -アラニンおよびタウリンの濃度はストレスにより上昇した(表4)。アスパラギン酸には鎮静・催眠作用(Eur J Pharmacol, 762,382-393, 2015)、 $\beta$ -アラニンおよびタウリンにはそれぞれ抗不安様作用と抗うつ様作用(Amino Acids, 39,427-434,

表4. 授乳期間中のストレスがミルク中の遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

アミノ酸	ミルク		P 値
	対照	ハトレス	
Asp	38.5±3.4	42.2±6.2	NS
Glu	134±9	181±26	NS
Ser	33.9±2.4	37.0±4.0	NS
Asp	14.3±0.5	23.6±0.9	<0.001
Gly	53.1±3.7	62.0±3.3	NS
Gln	10.1±1.1	11.0±1.2	NS
$\beta$ -Ala	26.7±0.4	41.4±2.6	<0.001
Tau	425±13	686±82	<0.05
His	ND	ND	
GABA	ND	ND	
Thr	11.5±0.9	10.8±1.9	NS
Ala	98±9	106±8	NS
Arg	ND	ND	
Pro	87.0±9.6	110±11	NS
Tyr	6.09±0.43	8.92±1.08	NS
Val	21.7±2.5	32.0±4.4	NS
Met	2.57±0.12	2.78±0.09	NS
Cystathionine	189±11	161±23	NS
Cys+Cystine	6.99±0.84	8.79±0.94	NS
Ile	6.63±0.67	8.20±1.01	NS
Leu	2.95±0.44	3.37±0.87	NS
Phe	ND	ND	
Trp	5.18±1.28	7.11±1.88	NS
Orn	4.58±0.55	6.30±1.29	NS
Lys	11.4±0.8	12.1±0.4	NS

2010) が認められることから、このようなミルク中の遊離アミノ酸の変化により仔へのストレスの影響を軽減するものと推察された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Nishigawa, T., Nagamachi, S., Takakura, M., Ikeda, H., Kodaira, M., Yamaguchi, T., Chowdhury, V. S., Yasuo, S. and Furuse, M. (2018).

Maternal stress during the lactation period rather than the gestation period strongly influences the amino acid composition in milk and affects growth and behaviour in offspring.

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 63,61-70.

査読無

2. Kodaira, M., Nagasawa, M., Yamaguchi, T., Ikeda, H., Minaminaka, K., Chowdhury, V. S., Yasuo, S. and Furuse, M. (2017).

Aging rather than stress strongly influences amino acid metabolisms in the brain and genital organs of female mice.

Mechanisms of Ageing and Development, 162,72-79.

doi: 10.1016/j.mad.2016.12.006.

査読有

[学会発表](計 1 件)

1. Kodaira, M., Ikeda, H., Yamaguchi, T., Yamauchi, N., Chowdhury, V.S., Yasuo, S. and Furuse, M. (2016).

Aging and additive oxidative stress influences female ovarian functions in mice.

17th AAAP Animal Science Congress. August 22-25, Fukuoka, Japan.

[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

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/lrmb/>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000452/>

<http://orcid.org/0000-0002-7474-1165>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

古瀬 充宏 (Furuse, Mitsuhiro)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：30209176