

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08040

研究課題名(和文)トレハロース給与牛における抗酸化乳生産メカニズム-微生物と牛の新たな相互作用-

研究課題名(英文)dairy cows fed a trehalose-supplemented diet

研究代表者

佐藤 幹 (Sato, Kan)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20250730

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)：乳牛の酸化ストレスは、生産性の低下の要因となるだけでなく、乳質、特に酸化臭を引き起こす原因となり、酪農産業における大きな問題となっている。我々は、乳牛用配合飼料にトレハロースを添加することがこの問題解決に有効であること実証してきた。本研究では、なぜトレハロースが抗酸化活性を持つのかを明らかにすることを試みた。本研究から、トレハロースは、乳牛のルーメン内の微生物、特にルーメンプロトゾアに作用し、プロトゾアが生産する分子が吸収され、乳腺細胞に作用して乳の抗酸化を向上させることが明らかとなった。以上の結果は、栄養 微生物 宿主 生産物の相互作用により発現する新たな抗酸化機構を提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、牛の健康を守り、ヒトに品質の高い乳や乳加工品を供給するための基礎試験を行ったものである。これまで、体の酸化ストレスを低減させる抗酸化栄養素は、小腸でそのまま吸収され、体内で抗酸化物質として機能することがほとんどであった。一方、本研究で対象としたトレハロースは、反芻動物のルーメン内微生物によって代謝され、その代謝産物が体内に移行して、細胞の遺伝子発現を変化させ、抗酸化を発揮するといった、非常に珍しい抗酸化機能を発揮することが明らかとなった。よって、本研究の成果は、学術的にも価値があり、また、この新奇な作用機作によって、抗酸化ミルクを提供する手法を確立した点で、社会的価値も高い。

研究成果の概要(英文)：Dairy cows are often susceptible to a variety of metabolic and infectious diseases during the periparturient period, which is the result of increased oxidative stress. We previously reported that dietary supplementation with trehalose brings about an improvement of oxidative status in milk of cows treated in this manner compared to control. However, the mechanism underlying the antioxidant activity associated with trehalose supplementation of the diet in dairy cows has not been elucidated. The present study shows that trehalose affects to the microorganisms, particularly protozoa, in rumen, and then the products of rumen protozoa regulates the gene expression of mammary gland cells in dairy cows, resulting that the antioxidant activities are improved in the milks of dairy cows fed a trehalose supplemented diets. These results provided the evidence that the interactions of nutrients, microorganism, dairy cows, and these products involved in the production of the antioxidant milks.

研究分野：動物栄養生化学

キーワード：抗酸化 乳牛 ルーメン微生物 トレハロース

1. 研究開始当初の背景

乳牛は、これまでの育種改良により、泌乳量の高能力化や分娩間隔の短縮、体格や体重の増加など、目覚ましい技術革新を遂げてきた。しかし一方で、それに見合った適切な栄養とエネルギーを供給しなければ、その能力を発揮できないばかりか、繁殖成績の低下や代謝性疾患を含む周産期疾病を引き起こし、生産寿命の低下やコストの増大を引き起こすことになる。周産期疾病の多発や生産寿命の短縮の原因の一つに、酸化ストレスが挙げられる。すなわち、乳牛は分娩時に、大きな酸化ストレスがかかる。その結果、繁殖障害、免疫能の低下、それに伴う乳房炎などの感染症の罹患、あるいは肝機能の低下による代謝障害など様々な周産期疾病などが誘発されている。近年では乳牛の高能力化にともない、負のエネルギーバランスと栄養不足が加速し、酸化ストレスも増加し、それによって誘発される繁殖障害、代謝疾病、周産期疾病が大きな問題となっており、この対策が急務となっている。これを改善するためには、抗酸化物質の飼料への添加が有効であることが報告されており、様々な研究が進められている。しかしながら、天然物質でもっとも有名な抗酸化物質であるビタミン E の飼料への添加でも、分娩時の血中の酸化ストレス、そしてミルクの過酸化脂質濃度を変えるには至っていない。

我々は、従来の抗酸化物質であるビタミン、カロテノイド、ポリフェノールではなく、二糖類であるトレハロースに着目して研究を進めてきた。その結果、これまで実現不可能であった乳中の抗酸化活性を上昇させ、過酸化脂質濃度を低減することに成功した(Aoki, Sato et al., 2010)。すなわち、我々のグループは国内外を含めて革新的な結果を先進的に公表している。トレハロースの飼料添加は、乳牛用飼料乾物当たり 0.25~1% 添加することが適切であると明らかにしており、この研究成果は、国内外の酪農産業からの注目も高く、特許の取得 (2 件) および実際の酪農現場に応用され、その利用は徐々に広がりを見せており、特に、優良な酪農家での導入が多い。

一方で、なぜトレハロースを泌乳牛に給与すると抗酸化作用を発揮するのかは未だ明らかとなっていない。よって、トレハロースによる抗酸化乳生産メカニズムを探求する予備試験を行った。当初は、トレハロース自身が抗酸化作用を持っているため、他の抗酸化物質と同様に、トレハロースが体内に吸収され、抗酸化機能を発揮しているものと推測していたが、驚くべきことに、トレハロースはルーメン内で速やかに分解され、血中には移行していないことが明らかとなった。すなわち、他の抗酸化物質とは異なるメカニズムで、抗酸化乳を生産していることが明らかとなった。トレハロースを乳牛に乾物当たり 0.5% 給与すると、ルーメン内のプロトゾア数が増加すること、酸化ストレスを改善する酵素であるスーパーオキシドデスムターゼ(SOD)様活性がルーメン内容液で上昇すること、そしてトレハロースを給餌後 7 日目ではじめて乳中の抗酸化能が上昇すること、トレハロース給与休止してもその活性は一週間高いままであることが明らかとなった。よって、トレハロースは微生物、特にルーメンプロトゾアに影響して生成されたものが血中に移行し、乳中の抗酸化能を亢進したとの新たな仮説にたどり着いた。

2. 研究の目的

本研究は、我々がこれまでの積み重ねてきた成果から、トレハロース給与牛における抗酸化乳の生産メカニズムを明らかにすることにより、これまで実現されていない「微生物の活性化→生体応答の制御→高品質畜産物生産」を証明するとともに、家畜の新たな酸化ストレス低減技術の基盤を提示する。具体的には、トレハロース給与牛の微生物叢の解析から、ルーメン微生物の活性化による抗酸化能向上作用を証明し、トレハロース給与牛のルーメン、血漿、乳を分画して、細胞生物学的に解析することにより、ルーメン微生物→血清→乳腺細胞の関係を明らかにして、微生物-宿主間の相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トレハロース給与牛の抗酸化能改善作用はルーメン微生物に依存することを証明する

トレハロースは、ルーメン内で微生物により急速に分解される。そこで、以下の 3 試験を行い、トレハロース給与牛の抗酸化能改善作用がルーメン微生物に依存することを証明する。

①トレハロース給与により乳中の抗酸化能の改善が再現できるかどうかを確認する。

②トレハロース給与牛のトレハロースを摂取した乳牛のルーメン液を、トレハロースを摂取していない乳牛へ経口投与することによって、乳中抗酸化活性の向上を実証する。

③泌乳牛へのトレハロース給与がルーメン微生物数、細菌叢および SOD 活性に及ぼす影響について検討する。ルーメン細菌数は 16SrDNA を、細菌叢解析には DGGE 法を用いて解析する。

(2) ルーメンプロトゾアの抗酸化に対する代謝的役割をプロトゾア存在牛と非存在牛で比較することにより明らかにする

出生直後から母牛と分離することによりプロトゾア非存在牛が作成できる。そこで、プロトゾア存在牛と非存在牛を作成し、トレハロースを給与することにより、抗酸化に対するプロトゾアの代謝的役割を検証する。本試験では、プロトゾア存在牛と非存在牛を作成するのに時間がかかるため、育成牛を用いて、乳と同様に変動する血漿中の抗酸化を指標とすることも考慮に入れて計画を進める。

(3) トレハロース給与牛のミルクを分画し抗酸化活性を持つ因子を探索する

トレハロース給与牛から採取したミルクと対照牛から採取したミルクを脂質画分、タンパク質画分、それ以外の画分で分画し、水溶性の抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性を用いて、ミルク中の抗酸化活性を発現する因子を探索する。抗酸化活性が存在する画分が脂質画分の場合は逆相 HPLC で、タンパク質画分の場合は分子量で、そ

れ以外の画分では順相 HPLC で分離して、測定する。

(4) 乳腺細胞にトレハロース給与牛の血清およびその分画したものを添加して、同定した因子が増加するかを検索する

前試験において、ルーメン微生物が生成したものが直接ミルクに移行していない場合、乳腺細胞で抗酸化物質が生成されている。よって、血清を分子量で分画し、乳腺細胞に添加して、抗酸化物質の生成を遺伝子発現から解析する。直接移行していると前試験で推定された場合、その移行量を測定する。

(5) トレハロース給与牛の血清におけるメタボローム解析あるいはプロテオーム解析を行い、トレハロース給与牛で特異的に認められる血清因子を同定する

トレハロース給与牛で特異的に認められる血清因子を解析して抗酸化発現因子候補とする。メタボローム解析は、本学の LC-MS/MS では分離の限界があるため、専門業者に外注を行う予定である。

(6) 同定された血清因子を乳腺細胞に添加し、抗酸化能発現因子が増加するかを確認する

前試験で同定された血清因子を乳腺細胞に添加し、抗酸化物質の発現を遺伝子レベル、およびタンパク質レベルで解析する

(7) 血清因子がルーメン微生物由来であることを *in vitro* 培養系で証明する。

血清で検出された因子がルーメン微生物由来であることを、*in vitro* 微生物培養の培養液にトレハロースを添加して、証明する。

4. 研究成果

(1) トレハロース給与牛の抗酸化能改善作用はルーメン微生物に依存することを証明する

①トレハロースを1%、14日間給与した牛のミルクを採取し、DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、DPPH ラジカル消去活性がトレハロース給与牛で増加し、TBARS が低下していることを再確認した (表1)。

表1 トレハロース給与牛の乳中酸化状態

	対照区	トレハロース区	SEM
TBARS($\mu\text{M MDA}$)	4.6 ^a	2.6 ^b	0.4
DPPH(U/ml)	85.3 ^a	116.8 ^b	4.5

異符号は区間に有意な差があることを示す(P<0.05, n=9)

②トレハロースを1%、14日間給与した牛のルーメン液を採取し、トレハロースを摂取していない乳牛へ各400~500ml 経口投与した。なお、採取したルーメン液からトレハロースは検出されなかった。その結果、投与10日目でミルクの DPPH ラジカル消去活性とルーメン内容液の SOD 活性が増加した (図1)。

Units/ml

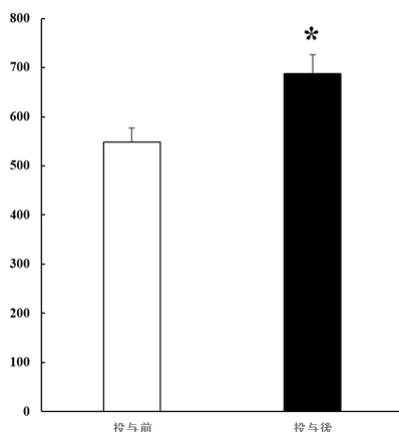
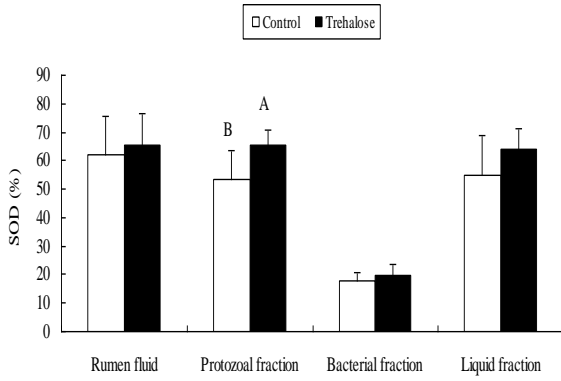


図1 トレハロース給与牛のルーメン内容液を10日間投与した時の乳中 DPPH ラジカル消去活性

③泌乳牛へのトレハロース給与がルーメン微生物数、細菌叢および SOD 活性に及ぼす影響について検討した。トレハロースを給与すると、ルーメン内容物内のプロトゾア画分における SOD 活性も増加し、プロトゾア数も増加していた。よって、トレハロースの抗酸化能発現メカニズムはルーメン内容液の抗酸化、特にプロトゾア数の増加を介した SOD 活性の増加によるものと推測された。同時に、血中の他の水溶性抗酸化物質も測定したところ、ビタミン C や尿酸濃度は変動していないことを明らかにした。なお、ルーメン内細菌叢を DGGE で検討したが、現時点でトレハロースによる優占種の変動は確認できなかった。よって、SOD 活性を持つルーメンプロトゾアが関与している可能性が示唆された (図2)。

A



B

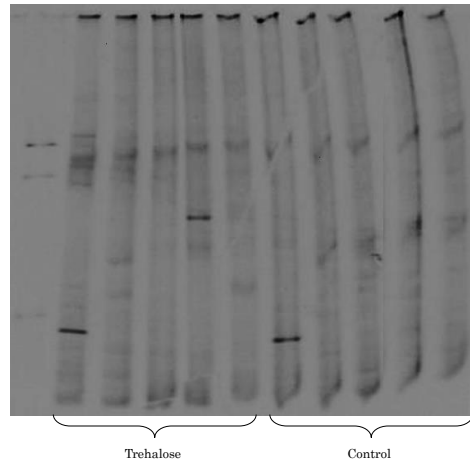


図2 トレハロース給与牛のルーメン内容液中の微生物変動
A:微生物を分画した時の SOD 活性、B:DGGE による細菌叢パターンの比較

(2) ルーメンプロトゾアの抗酸化に対する代謝的役割をプロトゾア存在牛と非存在牛で比較することにより明らかにする

プロトゾア存在牛と非存在牛を作成し、トレハロースを給与して血中の抗酸化活性を経時的に採取したところ、プロトゾア存在牛で抗酸化活性が有意に高い値を示した。よって、トレハロースによる抗酸化発現メカニズムに、ルーメンプロトゾアが重要な役割を果たしていることが実証された (図3)。

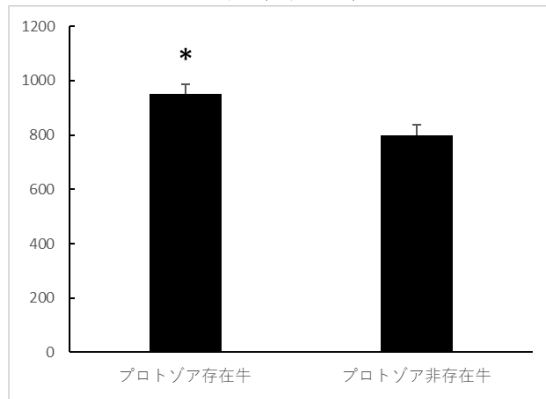


図3 プロトゾア存在牛および非存在牛へのトレハロース給与効果
*は区間に有意な差があることを示す (P<0.05)

(3) トレハロース給与牛のミルクを分画し抗酸化活性を持つ因子を探索する

トレハロース給与牛から採取したミルクと対照牛から採取したミルクを脂質画分、タンパク質画分、それ以外の画分で分画し、水溶性の抗酸化活性の指標となる DPPH ラジカル消去活性を用いて、ミルク中の抗酸化活性を発現する因子を探索したところ、10kDa 以上のタンパク質画分にその活性が認められた。よって、乳中の抗酸化成分はある特定のタンパク質であることが示された。

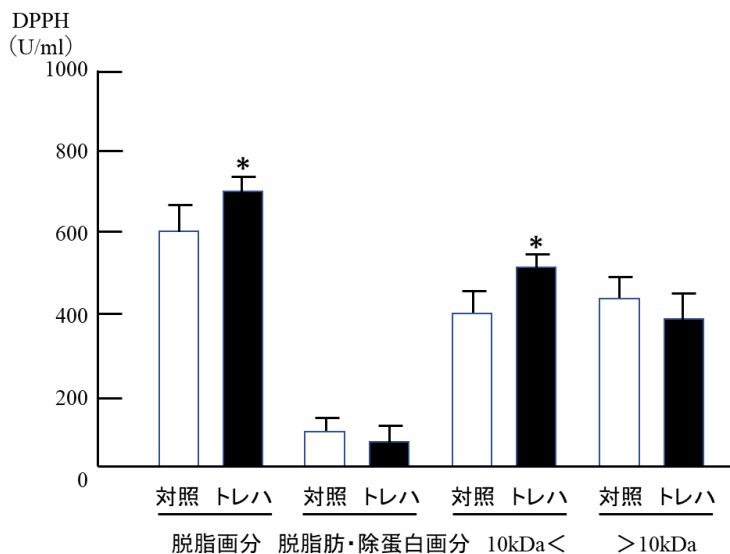


図4 乳中の抗酸化物質の分画
*は区間に有意な差があることを示す (P<0.05)

(4) 乳腺細胞にトレハロース給与牛の血清およびその分画したものを添加して、同定した因子が増加するかを検索する

対照牛の血清に比べ、トレハロース給与牛の血清を培養して分化させた乳腺細胞に30%添加すると培地中のDPPHラジカル消去活性が上昇していた。また、その成分は5000Da以下の低分子成分であることを明らかにした(図5)。

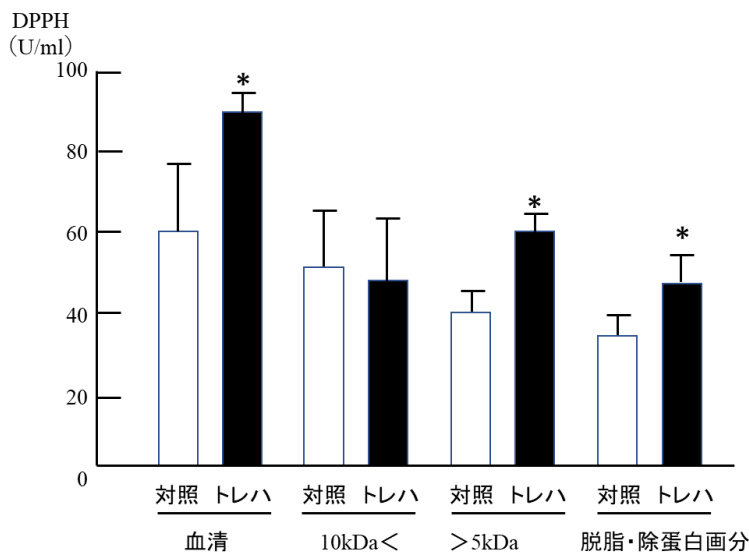


図5 各血清画分を乳腺細胞に添加した時の抗酸化能
*は区間に有意な差があることを示す (P<0.05)

(5) トレハロース給与牛の血清におけるメタボローム解析あるいは乳中のプロテオーム解析を行い、トレハロース給与牛で特異的に認められる血清因子および乳中因子を同定する

トレハロース給与牛で特異的に認められる血清因子を解析して抗酸化発現因子候補とするために、メタボローム解析を行った。約250の分子が検出され、そのうち4種の分子が上昇している可能性が示された。この分子をA~Dとして、解析したが、その分子を分子量等から特定するには至らなかった。

乳中の蛋白質の解析をSDS-PAGEや2D-PAGEによって試みたが、同様に、同定には至らなかった。この分子量に存在する主要タンパク質は、lactoferrin; bovine serum albumin (BSA); bovine immunoglobulin G (IgG), β -lactoglobulin (β -LG); α -lactalbumin (α -LA)であることが知られているため、今後の個々の解析が必要である。

(6) 血清因子がルーメン微生物由来であることをin vitro培養系で証明する。

血清で検出された因子がルーメン微生物由来であることを、in vitro微生物培養の培養液にトレハロースを添加して、先に検出された血中分子A~Dが増加するかを検証することを試みた。ルーメンプロトゾアにトレハロースを添加して、6時間嫌氣的に培養すると、血中のメタボローム解析で認められた未同定の分子が、培養液中で増加した(表2)。

表2 トレハロース添加培地による微生物の培養

	対照培養	トレハロース添加培養
分子A	440480	702320
分子B	244539	512694
分子C	41502	45590
分子D	46577	45376

値はピークエリアで示した。n=3

考察および結論

トレハロースによって示された本研究の成果において、最も特徴的なところはトレハロースを乳牛に給与し、生産物である乳の抗酸化活性を向上させ、過酸化脂質を低減させたことである。これまで乳中の抗酸化活性は多くの報告において、ビタミンなどの抗酸化物質が乳中へと直接移行することで向上するものと考えられてきた。これに対して、本研究で示された乳牛へのトレハロース給与による血中および乳中の抗酸化活性の向上は、これまで認められてきた機構とはまったく異なるメカニズムによるものであることが示された。乳牛に摂取されたトレハロースはルーメン内のプロトゾアの生育を促進する。トレハロースによって増加したプロトゾアはルーメン内のSOD様活性を増加させ、ルーメン内の抗酸化機能を向上させる。ルーメン内で増加したSOD様活性は、活性酸素を除去し、血中内の抗酸化活性の向上や過酸化脂質濃度の減少によって酸化ストレスを低減させる。本研究では、トレハロースによる抗酸化乳の生産は、この機構だけではないことを明らかにした。すなわち、ルーメン内の微生物がトレハロースと同時に新在することにより産生された低分子化合物のいくつかは、吸収されて血中を増加させ、乳腺における蛋白質成分の合成を増加させる、一連の代謝相関によって、抗酸化乳を生産するメカニズムを提唱することができた。残念ながら、分子自体の同定は今後の課題となったが、本研究では、トレハロース→ルーメン微生物→乳腺細胞の経路による新たな抗酸化発現メカニズムの一つが提示できた点で、価値が大きいものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Amin O. Hendawy, Miho Shirai, Hikari Takeya, Satoshi Sugimura, Setsuko Miyanari, Sin Taniguchi, Kan Sato	4. 巻 102
2. 論文標題 Effects of 5-aminolevulinic Acid Supplementation on Milk Production, Iron Status, and Immune Response of Dairy Cows	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 11009-11015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3168/jds.2018-15982.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hendawy AO, Khattab MS, Sugimura S, Sato K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of 5-Aminolevulinic Acid as a Supplement on Animal Performance, Iron Status, and Immune Response in Farm Animals: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animals (Basel)	6. 最初と最後の頁 1352-1369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani10081352.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toshiyuki Ishii, Koichi Shibata, Shinichi Kai, Keiichi Noguchi, Amin O. Hedwy, Kan Sato	4. 巻 56
2. 論文標題 Dietary Supplementation with Lysine and Threonine Modulates the Performance and Plasma Metabolites of Broiler Chicken	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 204-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0180104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐藤幹、大津晴彦、松下浩一、青木直人	4. 巻 7
2. 論文標題 機能性栄養素を用いた家畜のストレス制御による生産性の向上	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 家畜感染症学会	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------