

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15360

研究課題名（和文）新規トリプトファン代謝経路の解明および制御によるニワトリ生産性向上の試み

研究課題名（英文）Attempt to improve chicken productivity by elucidation and regulation of novel tryptophan metabolic pathway

研究代表者

牧野 良輔 (Makino, Ryosuke)

愛媛大学・農学研究科・助教

研究者番号：80772821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ニワトリにおける、糖化反応によるトリプトファンの新規代謝経路について明らかにするとともに、糖化反応の制御によりニワトリの生産性を向上させる可能性を検討することを目的とした。トリプトファンの新規代謝経路に関係するメチルグリオキサールの測定系を確立した。また、トリプトファンの新規代謝産物の候補として想定された化合物の化学合成を行った。しかし、それら候補化合物をニワトリ生体内で検出するには至らなかった。一方、糖化反応を阻害する糖尿病治療薬のメトホルミンをニワトリに与えると、生体内での糖化が抑制され、浅胸筋重量が増加した。今後、糖化と筋重量の増加の関係を詳細に検討する必要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、家畜の生産性を向上させるには育種改良や飼養条件の改善を試みていたが、これらは既に相当の成果が得られているため、現在これらの手法で劇的に飼料効率を改善することは難しいと思われる。また、これまでの栄養学は個々の栄養素の機能に着目していたが、生体内でどのような形で利用されているのかはほとんど考えられていない。本研究では、ニワトリが高血糖動物であるがゆえにアミノ酸の利用率が低下している点に着目し、非酵素的なアミノ酸代謝経路を把握し、制御することで生産性の向上を目指した。本研究はこれまでとは異なる視点から、家禽の生産性を向上させる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to find novel tryptophan metabolites derived by glycation in chickens and investigating the possibility of improving the productivity of chickens by regulating glycation. A measurement method of methylglyoxal, which is related to a novel metabolic pathway of tryptophan, was established. In addition, the candidates for novel metabolites of tryptophan were synthesized. However, these candidates were not detected in the plasma of chickens. On the other hand, when chickens were fed the experimental diet with metformin, a therapeutic drug for type II diabetes known by inhibiting glycation, the concentration of a glycated compound in the plasma was reduced and the weight of breast muscle (*M. pectoralis major*) increased. These results indicate the necessity of further elucidation about the novel amino acid metabolic pathway by glycation and the inhibiting glycation might promote meat production in chickens.

研究分野：家畜飼養学

キーワード：アミノ酸 糖化反応 トリプトファン ニワトリ 非酵素的化学反応 メトホルミン メチルグリオキサール リサイクル分取

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

必須アミノ酸の1つであるトリプトファンは生体を構成するタンパク質の基質となる。また、トリプトファンおよびその代謝産物は、摂食行動および情動行動を調節するなど様々な生理機能を有していることが明らかにされている。トリプトファンは多くのアミノ酸同様、酵素により代謝分解されており、その約95%はキヌレニン経路によって、残りはセロトニン経路によって代謝されることが一般的に知られている(Biochem. Biophys. Res. Commun. 338: 12-19, 2005)。しかし、アミノ酸は非酵素的な化学反応によっても代謝されることが明らかにされている。例えばトリプトファンとグルコースの非酵素的反応によってアマドリ化合物と PHP-TH β C が生産される。ただし、これまでのトリプトファンの代謝研究は酵素代謝経路のみが着目されており、非酵素的な代謝産物についてはほとんど注目されてこなかった。

非酵素的な化学反応の代表例は、グルコースのカルボニル基とアミノ酸由来のアミノ基が結合する糖化反応である。しかし、タンパク質を構成するアミノ酸の糖化反応に着目した研究は数少ない。特に、生体内での糖化アミノ酸の測定系が存在しないことが大きな課題となり、研究の進展を妨げていた。このような非酵素的な化学反応は従来の栄養学では考慮されておらず、アミノ酸の非酵素的代謝経路を明らかにすることが望まれていた。我々は過去にニワトリヒナを用いて、血漿中の糖化トリプトファンの検出・測定を試み、高速液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)を用いた測定系の確立に成功した。この測定系の確立により、ニワトリ血漿中トリプトファンのおよそ10%程度がグルコースにより糖化していることを明らかにした。

しかしながら、非酵素的なアミノ酸代謝の全容はいまだ解明されていない。グルコースの解糖系の副産物として知られるメチルグリオキサールがトリプトファンのアミノ基と結合しうることが示されており、(Bioorg. Med. Chem. 16: 4551-4562, 2008)。ニワトリは血中のグルコース濃度が高いことから、メチルグリオキサールの濃度も高いことが予測された。さらに、メチルグリオキサールはグルコースよりも20,000倍高い反応性を有するため(Ann. N. Y. Acad. Sci. 1043: 111-117, 2005)、トリプトファンの糖化を急速に進行する可能性を有する。しかしながら、ニワトリ血中のメチルグリオキサール濃度を測定した報告は見当たらず、ましてメチルグリオキサールによる非酵素的トリプトファン代謝産物の濃度も明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は糖化反応によるトリプトファンの非酵素的代謝経路について明らかにするとともに、糖化反応の制御によりニワトリの生産性を向上させる可能性を検討することを目的とした。具体的には、以下3点について調査した。

- 1). ニワトリ生体内に存在するメチルグリオキサールの測定
- 2). ニワトリ生体内に存在する非酵素的トリプトファン代謝産物の測定
- 3). 非酵素的糖化反応の阻害によるニワトリ成長成績の向上

3. 研究の方法

(1). メチルグリオキサールの分析系確立

トリプトファンの新規代謝産物の前駆体となるメチルグリオキサールの測定系を確立すべく、誘導体化による分析法の血漿サンプルにタンパク質変性剤を加え、遠心分離してタンパク質を沈殿させた。この上清に o-フェニレンジアミンまたはジメチルフェニレンジアミンを添加し、メチルグリオキサールを誘導体化した。その後、C18の固相抽出カラムで精製した後に、液体クロマトグラフ三連四重極質量分析装置(LC-MS/MS)で定量した。

(2)-①. 非酵素的トリプトファン代謝産物候補の合成

トリプトファンとメチルグリオキサールが結合した化合物を得るために、既報の条件を参考に化学合成を実施した(Bioorg. Med. Chem. 19: 1674-1682, 2011; J. Asian. Nat. Prod. Res. 17: 299-305, 2015)。具体的には、酸触媒下でトリプトファンとメチルグリオキサールを混和し、加熱還流を行った後、分取リサイクルHPLCシステムとC18カラムを用いて精製した。また、トリプトファンのカルボキシ基を予めメチルエステル化によって保護した化合物をメチルグリオキサールと反応させた。最後に強塩基条件下で脱保護し、HPLCで精製した。精製した化合物はLC-MS/MSと核磁気共鳴装置(NMR)を用いて同定した。

(2)-②. ニワトリ血漿中の非酵素的トリプトファン代謝産物候補の分析系確立

(2)-①で合成した非酵素的トリプトファン代謝産物候補がニワトリ生体内に存在することを確認すべく、酸、有機溶媒または固相抽出カラムを用いて血漿サンプルから不純物を除去した。その後、LC-MS/MSを用いて非酵素的トリプトファン代謝産物候補の検出を試みた。

(3). 非酵素的糖化反応の阻害がニワトリの生産性とアミノ酸濃度に与える影響の解明

高血糖動物であるニワトリのグルコースまたはメチルグリオキサールによる非酵素的糖化反応が生産性を低下させるのではないかと考え、糖化反応の阻害作用を持つ糖尿病治療薬であるメトホルミンを添加した飼料をニワトリに給与した。具体的には、1週齢のレイヤーまたはブロイラーオスを6羽ずつ3群に分けた。飼養標準(NRC, 1994)を満たすよう配合した飼料を対照群とし、メトホルミン塩酸塩を150または300 mg/kgとなるように添加した飼料をそれぞれ

ニワトリに給与した。飼養試験は2週間行い、1週間に1度、体重および摂食量を測定した。試験期間終了時に、心臓から採血を行い、浅胸筋の重量を測定した。得られた血液は遠心分離によって血漿を回収し、分析に供するまで-80°Cで保存した。

血漿中のグルコース濃度は市販の分析キット（グルコース CII-テストワコー）を用いて定量した。また、血漿中遊離アミノ酸および N ϵ -(Carboxymethyl)lysine (CML; 糖化の指標) 濃度を LC-MS/MS を用いて定量した。

4. 研究成果

(1). メチルグリオキサールの分析系確立

メチルグリオキサールの測定系を確立すべく、誘導体化による分析法を確立した。誘導体化の試薬として、o-フェニレンジアミンおよびジメチルフェニレンジアミンの2種類を検討した。その結果、ジメチルフェニレンジアミンによる誘導体化の方が、良好な結果が得られることを明らかにした。

(2)-①. 非酵素的トリプトファン代謝産物候補の合成

非酵素的トリプトファン代謝産物候補として、トリプトファンとメチルグリオキサールが結合した化合物を得た。その中でも収率が比較的良好であった化合物を同定したところ、1-acetyl-3-carboxylic- β -carboline、1-Acetyl- β -carboline および 1-(9H- β -carbolin-1-yl)-ethanol を得た。事前にトリプトファンのカルボキシ基をメチルエステル化で保護することで、1-acetyl-3-carboxylic- β -carboline を高収率で得ることが可能となった。一方、カルボキシ基を保護せずにメチルグリオキサールとトリプトファンを反応させると、1-Acetyl- β -carboline および 1-(9H- β -carbolin-1-yl)-ethanol を得ることができた。

(2)-②. ニワトリ血漿中の非酵素的トリプトファン代謝産物候補の分析系確立

(2)-①で合成した 1-acetyl-3-carboxylic- β -carboline、1-Acetyl- β -carboline および 1-(9H- β -carbolin-1-yl)-ethanol がニワトリ生体内に存在することを確認することを目的として、血漿中でこれらの化合物の定量を試みた。血漿の前処理として、酸、有機溶媒または固相抽出カラムを用いて血漿サンプルから不純物を除去した。その後、LC-MS/MS を用いて非酵素的トリプトファン代謝産物候補の検出を試みたが、シグナルノイズ比 (S/N) の値が低く、信頼性のある測定系を確立するには至らなかった。検出感度の向上が今後の課題であり、血漿サンプルの濃縮または誘導体化法等によって達成できると考えている。

(3). 非酵素的糖化反応の障害がニワトリの生産性とアミノ酸濃度に与える影響の解明

メトホルミンの飼料添加はレイヤーおよびブロイラーのどちらにおいても、増体量、摂食量および飼料効率に影響を与えなかった。メトホルミンを 150 mg/kg 添加した飼料を摂取したレイヤーおよびブロイラーでは浅胸筋重量が増加した。メトホルミン添加飼料の給与は、レイヤーにおいて血漿中分岐鎖アミノ酸を増加させ、CML 濃度を低下させた。一方で、血漿中グルコース濃度はレイヤーおよびブロイラーのどちらでも影響を受けなかった。以上の結果から、糖化障害の働きを有するメトホルミンを飼料に添加することで、糖化の抑制をもたらすと同時に、血漿中のアミノ酸濃度を増加させ、浅胸筋重量を増加させる可能性が示唆された。今後はトリプトファンを含む非酵素的アミノ酸経路とニワトリの生産性の関係についてさらなる研究の必要性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryosuke Makino, Maaya Uda, Syoko Shuto, Kazumi Kita, Tetsuya Tachibana	4. 巻 -
2. 論文標題 Influence of dietary metformin on growth performance, and plasma concentrations of amino acid and advanced glycation end product in two-types of chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 -
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇田麻郁、牧野良輔、橋哲也
2. 発表標題 メトホルミンがニワトリの成長成績および生体内遊離アミノ酸濃度に与える影響
3. 学会等名 第68回関西畜産学会徳島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野良輔、橋哲也
2. 発表標題 成長に伴うプロイラー血漿中および組織中メチルグリオキサールおよび終末糖化産物濃度の推移
3. 学会等名 日本家禽学会2017年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牧野良輔、橋哲也
2. 発表標題 急性および慢性寒冷暴露がプロイラーの血漿中メチルグリオキサール濃度に与える影響
3. 学会等名 第67回関西畜産学会大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牧野良輔、首藤晶子、橘哲也
2. 発表標題 メトホルミンの経口投与が低タンパク質飼料を給与したニワトリの血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野良輔、宇田麻郁、橘哲也
2. 発表標題 メトホルミンがブロイラーの成長成績および生体内遊離アミノ酸濃度に与える影響
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

〔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