

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02323

研究課題名(和文) アミノ酸アマドリ化合物によるニワトリ筋管細胞タンパク質合成促進機能の解明

研究課題名(英文) Studies on the influence of amino acid-Amadori products on protein synthesis of chicken embryonic myotubes

研究代表者

喜多 一美 (Kita, Kazumi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20221913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非酵素的糖化反応により生成されたアミノ酸アマドリ化合物が、ニワトリ胚由来筋管細胞へのアミノ酸やグルコース取り込みに及ぼす影響を調査した。その結果、フェニルアラニン-アマドリ化合物が筋管細胞へのフェニルアラニンの取り込みを抑制した。また、アスパラギン-アマドリ化合物が筋管細胞へのグルコース取り込みを抑制し、この抑制にはニワトリ骨格筋においてインスリン感受性を有するグルコーストランスポーター12の遺伝子発現の低下が関与することを明らかにした。さらに、一部の糖化アミノ酸はニワトリ胚由来筋管細胞に取り込まれることを示し、トランスポーターやレセプターの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸の糖化反応は非酵素的反応であり、生成されるアミノ酸アマドリ化合物の生理機能に関する研究報告は見当たらないことから、本研究の成果は非常に独創的であると考えられる。本研究で実験動物として用いたニワトリは高血糖動物であることから、ニワトリの体内ではアミノ酸の糖化が自発的に進むと考えられる。以前の研究において、糖化されたアミノ酸にはアミノ酸としての栄養素価値が無いことが明らかになっており、アミノ酸アマドリ化合物の生成は抑制されるべきである。今後、ニワトリの体内におけるアミノ酸アマドリ化合物を減少させることが可能となれば、ニワトリにおけるアミノ酸栄養価の向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the influence of amino acid-Amadori products generated from non-enzymatical glycation on the incorporation of amino acids and glucose into chicken embryonic myotubes was examined. Phenylalanine-Amadori product suppressed phenylalanine incorporation into myotubes. Asparagine-Amadori product suppressed glucose uptake into myotubes due to the decrease in the gene expression of GLUT12 which is known to be the main insulin-sensitive glucose transporter of chicken muscle. Some glycated amino acids can be incorporated into myotubes, which suggests the existence of transporter and receptor for glycated amino acids.

研究分野：動物栄養学

キーワード：糖化反応 アマドリ化合物 アミノ酸 筋管細胞 取り込み タンパク質合成 フルクトサミン-3-キナーゼ グルコース

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内のグルコースは、アミノ酸のアミノ基と非酵素的に結合する(糖化反応、メイラード反応)。グルコースと結合したアミノ酸は Schiff 塩基を形成し、アマドリ転位の後にアミノ酸アマドリ化合物を生成する。その後、各種反応を経て終末糖化産物(Advanced Glycation End Product: AGE)を形成し、糖尿病合併症の原因の一つとなる。

ニワトリの血糖値は約 200-300 mg/dl であり、ヒトの正常血糖値の 2-3 倍を示す。今までに研究代表者は、血漿中アミノ酸アマドリ化合物濃度の測定法を確立し、各種栄養条件下におけるニワトリの血漿中アミノ酸アマドリ化合物濃度を測定した。しかし、アミノ酸アマドリ化合物が筋管細胞における栄養素代謝に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸とグルコースから非酵素的に生成されるアミノ酸アマドリ化合物が、どのように筋管細胞における栄養素代謝に影響を及ぼすのか調査することを目的とし、以下の課題を設けた。

- (1) アミノ酸アマドリ化合物は、トランスポーターを介したアミノ酸吸収及びグルコース吸収を競合抑制するのか?
- (2) アミノ酸アマドリ化合物に対応するトランスポーターやレセプターは存在するのか?
- (3) アミノ酸アマドリ化合物は細胞内で分解可能か?
- (4) アミノ酸アマドリ化合物は in vivo 筋肉タンパク質合成を促進するのか?

3. 研究の方法

- (1) アミノ酸アマドリ化合物は、トランスポーターを介したアミノ酸吸収及びグルコース吸収を競合抑制するのか?

単冠白色レグホンの孵卵 14 日目の胚から浅胸筋を摘出し、筋芽細胞を調製した。10%ウシ胎児血清を含む Medium 199 培地で培養し、筋管細胞に分化させた。アミノ酸アマドリ化合物を加えない処理区を対照区とした。アミノ酸アマドリ化合物はメタノール還流法を用いて無水グルコースとアミノ酸から有機合成した。タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のアマドリ化合物をそれぞれ 1000 μ M になるように培養液に添加した。放射能が約 1 μ Ci/mL となるように、培養液にトレーサーを添加し、CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。筋管細胞へのアミノ酸吸収を調べるためのトレーサーとして、3H-フェニルアラニンおよび 3H-トリプトファンを用いた。筋管細胞へのグルコース吸収を調べるためのトレーサーとして 3H-2-デオキシグルコースを用いた。

筋管細胞へのアミノ酸吸収を調べる際には、筋管細胞を一晩培養後、ウェル中の培養液を除去し、細胞を洗浄後、5%トリクロロ酢酸を加えタンパクを沈殿させた。トリクロロ酢酸を除去後、0.5%NaOH/Triton-X を加えタンパク質を溶解した。タンパク質溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンターでタンパク質溶解液中の放射能を測定し、タンパク質中の放射能を筋管細胞へのアミノ酸吸収の指標とした。

筋管細胞へのグルコース吸収を調べる際には、筋管細胞を一晩培養後、ウェル中の培養液を除去し、細胞を洗浄後、0.5%NaOH/Triton-X を加え細胞を溶解した。細胞溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンターで細胞溶解液中の放射能を測定し、筋管細胞へのグルコース吸収の指標とした。

ニワトリ骨格筋においてインスリン感受性を有する主要なグルコーストランスポーターと考えられているグルコーストランスポーター12の遺伝子発現を調査するために、リアルタイム PCR を用いてグルコーストランスポーター12の mRNA 量を測定した。

統計処理は、市販統計パッケージ SAS を用いて行った。一元配置分散分析法を用いてアミノ酸アマドリ化合物の効果を要因分析した後、Tukey の多重比較検定を行った。P < 0.05 で有意差ありとした。

- (2) アミノ酸アマドリ化合物に対応するトランスポーターやレセプターは存在するのか?

必須アミノ酸の一種であるトリプトファンはグルコースによって糖化されると、トリプトファン-アマドリ化合物と(1R, 3S)-1-(D- gluco-1, 2, 3, 4, 5-pentahydroxypentyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro- -carboline-3-carboxylic acid (PHP-TH C)の2種類の糖化化合物を形成する。

単冠白色レグホンの孵卵 14 日目の胚から浅胸筋、肝臓、脾臓、腎臓、腺胃、筋胃および皮膚を摘出し、細胞を調製した。10%ウシ胎児血清を含む Medium 199 培地で培養し、L-[5-3H]-トリプトファンと非放射性グルコースから放射性 PHP-TH C を合成し、最終濃度が 0、200、400、600 および 800 μM となるように 3H-PHP-TH C を細胞培養液に添加した。ニワトリ胚由来細胞を 18 時間培養した後に、ウェル中の培養液を除去し、細胞を洗浄後、5%トリクロロ酢酸を加えタンパクを沈殿させた。タンパク質沈殿後、トリクロロ酢酸中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、細胞中の遊離アミノ酸画分に取り込まれた PHP-TH C の指標とした。沈殿させたタンパク質は、0.5%NaOH/Triton-X を加えて溶解した。タンパク質溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンターでタンパク質溶解液中の放射能を測定し、細胞中のタンパク質画分に取り込まれた PHP-TH C の指標とした。細胞中の遊離アミノ酸画分に取り込まれた PHP-TH C とタンパク質画分に取り込まれた PHP-TH C の合計を全細胞画分中の PHP-TH C とした。

標識された PHP-TH C が細胞中のタンパク質画分や全細胞画分中に検出された場合、糖化アミノ酸に対するトランスポーターやレセプターが存在することが強く示唆される。

統計処理は、市販統計パッケージ SAS を用いて行った。一元配置分散分析法を用いてアミノ酸アマドリ化合物濃度の効果を要因分析した後、Tukey の多重比較検定を行った。P < 0.05 で有意差ありとした。

(3) アミノ酸アマドリ化合物は細胞内で分解可能か？

生体内におけるアマドリ化合物は、フルクトサミン-3-キナーゼによって分解される。そこで、タンパク質源を大豆、小麦、トウモロコシの 3 種類の植物性タンパク質とし、不足する必須アミノ酸を添加または無添加の飼料をニワトリに給与し、浅胸筋、心臓、肝臓、腎臓および大脳におけるフルクトサミン-3-キナーゼ遺伝子発現に対する影響を調査した。フルクトサミン-3-キナーゼの遺伝子発現を調査するためにリアルタイム PCR を用いてフルクトサミン-3-キナーゼの mRNA 量を測定した。

統計処理は、市販統計パッケージ SAS を用いて行った。二元配置分散分析法を用いて飼料タンパク質源の違いとアミノ酸添加の有無を要因分析した後、スチューデントの t 検定を行った。P < 0.05 で有意差ありとした。

(4) アミノ酸アマドリ化合物は in vivo 筋肉タンパク質合成を促進するのか？

ニワトリ血漿中のアミノ酸アマドリ化合物を上昇させることが可能であるか否かを調査するために、アラニンアマドリ化合物を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋め、フェニルアラニンアマドリ化合物を 3 日間投与した後に血液を採取した。その後、血漿中のアラニンアマドリ化合物濃度を高速液体クロマトグラフィー質量分析計により測定した。

4 . 研究成果

(1) アミノ酸アマドリ化合物は、トランスポーターを介したアミノ酸吸収及びグルコース吸収を競合抑制するのか？

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞におけるタンパク質合成に及ぼす影響について、3H-フェニルアラニンおよび 3H-トリプトファンの 2 種類のトレーサーを用いて実験を行った。

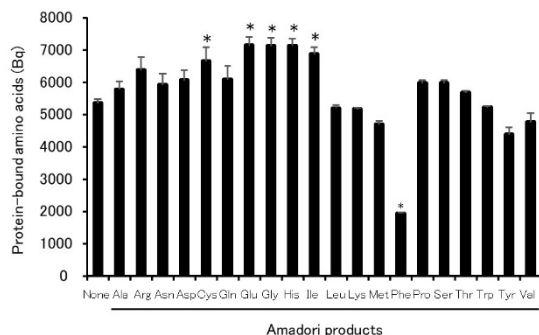


Fig. 1. Influence of amino acid-AP on protein synthesis of chicken embryonic myotubes. For measuring protein synthesis, ^3H -Phe was added into M199 and incubated overnight. Asterisks indicate that protein synthesis was significantly higher than the control (P<0.05). Sharps indicate that that protein synthesis was significantly lower than the control (P<0.05).

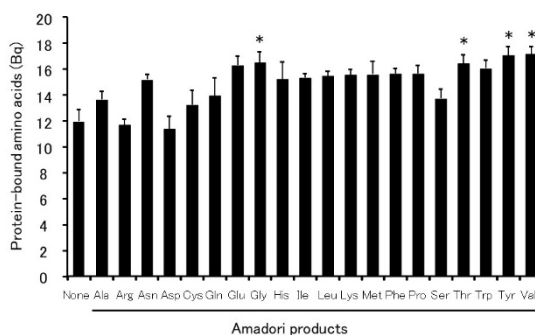


Fig. 2. Influence of amino acid-AP on protein synthesis of chicken embryonic myotubes. For measuring protein synthesis, ^3H -Trp was added into M199 and incubated overnight. Asterisks indicate that protein synthesis was significantly higher than the control (P<0.05).

その結果、3H-フェニルアラニンをトレーサーとして用いた場合、フェニルアラニンアマドリ化合物の添加によりタンパク質結合 3H-フェニルアラニンの放射能が有意に低下した。この原因として、フェニルアラニンアマドリ化合物による細胞への 3H-フェニルアラニンの取り込みの阻害が考えられた (Fig. 1)

3H-トリプトファンをトレーサーとして用いた場合、アミノ酸アマドリ化合物の添加によるタンパク質結合 3H-フェニルアラニン放射能の有意な低下は認められなかった。この原因としてアミノ酸アマドリ化合物は細胞への 3H-トリプトファンの取り込みを抑制しないためであると考えられた (Fig. 2)。

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞におけるグルコース取り込みに及ぼす影響について、3H-2-デオキシグルコースを用いて調査した。その結果、対照区と比較してアスパラギン-アマドリ化合物添加区ではグルコース取り込みが有意に減少した (Fig. 3)。

さらに、培養液にアスパラギン-アマドリ化合物を添加した時、ニワトリ骨格筋においてインスリン感受性を有する主要なグルコーストランスポーターと考えられているグルコーストランスポーター-12 の遺伝子発現が有意に低下した (Fig. 4)。この結果から、アスパラギン-アマドリ化合物は、グルコーストランスポーター-12 の遺伝子発現を抑制することで筋管細胞へのグルコースの取り込みを低下させる可能性が示唆された。

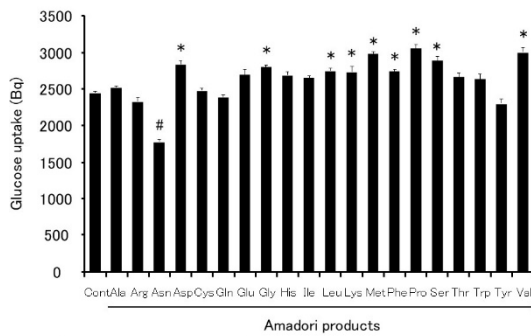


Fig. 3. Influence of amino acid-AP on glucose uptake of chicken embryonic myotubes. For measuring glucose uptake, ³H-2-deoxy-D-glucose was added into M199 and incubated overnight. Asterisks indicate that glucose uptake was significantly higher than the control (P<0.05). Sharps indicate that glucose uptake was significantly lower than the control (P<0.05).

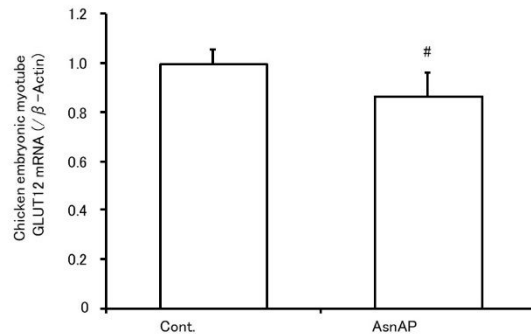


Fig. 4. Influence of amino acid-AP on the gene expression of GLUT12 in chicken embryonic myotubes. β -actin was used as a house-keeping gene. Sharp indicates the significant difference compared to the control (P<0.05).

(2) アミノ酸アマドリ化合物にトランスポーターやレセプターは存在するのか？

培養液中の PHP-TH C 濃度が 0 から 600 μ M まで上昇した際に、全てのニワトリ胚由来細胞において全細胞画分への PHP-TH C の蓄積が直線的に増加した。全細胞画分で PHP-TH C の蓄積が飽和したことから、PHP-TH C の細胞内取り込みには何らかの輸送体タンパク質が関与していることが示唆された (Fig. 5)。

培養液中の PHP-TH C 濃度が 0 から 800 μ M まで増加した際に、タンパク質画分の PHP-TH C 蓄積は直線的に増加し続けた (Fig. 6)。この結果は全細胞画分に取り込まれた PHP-TH C の一部がニワトリ胚由来細胞のタンパク質画分中に検出されたことを示す最初の知見である。

これらの結果から、ニワトリ胚由来筋管細胞にはアミノ酸アマドリ化合物を細胞内に取り込むトランスポーターやレセプターが存在する可能性が示唆された。

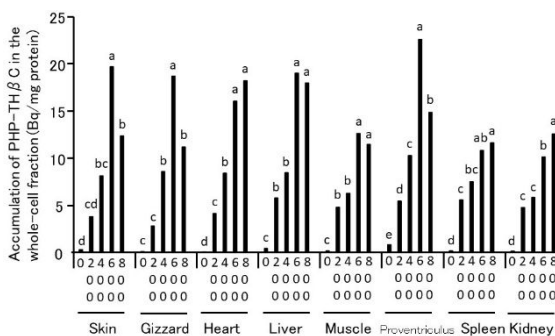


Fig. 5. Influence of varying PHP-TH β C concentrations from 0 to 800 μ M in the culture medium on the accumulation of PHP-TH β C in the whole-cell fraction of various chicken embryonic cells. Bars represent means \pm SE. a-e, Means with different superscripts in each tissue are significantly different at P < 0.05.

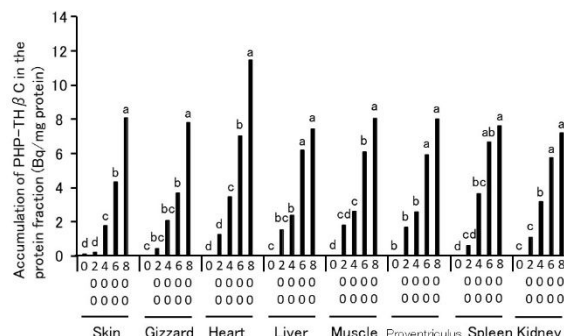


Fig. 6. Influence of varying PHP-TH β C concentrations from 0 to 800 μ M in the culture medium on the accumulation of PHP-TH β C in the protein fraction of various chicken embryonic cells. Bars represent means \pm SE. a-d, Means with different superscripts in each tissue are significantly different at P < 0.05.

(3) アミノ酸アマドリ化合物は生体内で分解可能か？

異なる植物性タンパク質源を原料とし、不足する必須アミノ酸を添加または無添加の飼料をニワトリに給与したところ、浅胸筋、心臓、肝臓および大脳におけるフルクトサミン-3-キナーゼ遺伝子発現に対して、異なる植物性タンパク質源による有意な影響および必須アミノ酸添加の有無による有意な影響は認められなかった (Fig. 7)。しかし、腎臓におけるフルクトサミン-3-キナーゼ遺伝子発現は、異なる植物性タンパク質源によって有意な影響を受けた (Fig. 8)。

これらの結果より、フルクトサミン-3-キナーゼは、ハウスキープ遺伝子の一つである可能性が示唆された。

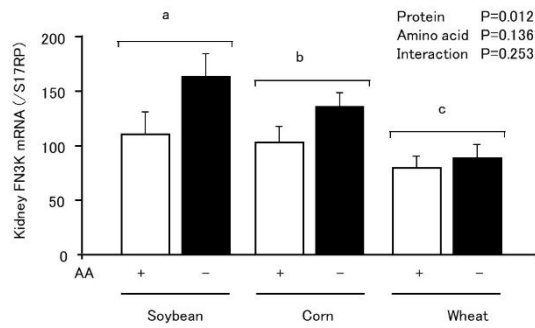


Fig. 7. Influence of varying dietary protein sources supplemented with or without essential amino acids on the gene expression of fructosamine-3-kinase (FN3K) in the kidney of chickens. Bars represent means \pm SE. a-c. Means with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

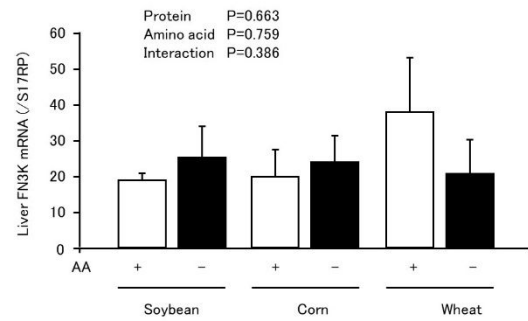


Fig. 8. Influence of varying dietary protein sources supplemented with or without essential amino acids on the gene expression of fructosamine-3-kinase (FN3K) in the liver of chickens. Bars represent means \pm SE.

(4) アミノ酸アマドリ化合物は in vivo 筋肉タンパク質合成を促進するのか？

アラニン-アマドリ化合物を充填した浸透圧ミニポンプを皮下に埋め、フェニルアラニン-アマドリ化合物を 3 日間投与した後に、血漿中のアラニン-アマドリ化合物濃度を測定したところ、濃度の上昇は認められず、今後新たな投与方法の検討が必要であると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Makino Ryosuke, Abe Kayoko, Kita Kazumi	4. 巻 58
2. 論文標題 Glycated Tryptophan PHP-TH C Incorporated into Various Chicken Embryonic Cells Constitutes Cellular Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 258-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0200076	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川嶋夏輝・瀧田千恵・喜多一美
2. 発表標題 アミノ酸アマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞におけるアミノ酸取り込みに及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧田千恵・平川祥・喜多一美
2. 発表標題 異なるタンパク質源の摂取がニワトリ組織中のフルクトサミン3キナーゼ(FN3K)遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧田千恵・榊元鈴菜・喜多一美
2. 発表標題 動物性タンパク質源摂取がニワトリ組織中のフルクトサミン3キナーゼ遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川嶋夏輝・喜多一美
2. 発表標題 タンパク質を構成するアミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響
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 川嶋夏輝・喜多一美
2. 発表標題 タンパク質を構成するアミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞のグルコース吸収に及ぼす影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋夏輝・喜多一美
2. 発表標題 アミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞のアミノ酸取り込み及びタンパク質合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋夏輝・喜多一美
2. 発表標題 アミノ酸のアマドリ化合物がニワトリ胚由来筋管細胞におけるGLUT12遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川祥・喜多一美
2. 発表標題 生理的濃度のアミノ酸アマドリ化合物がニワトリ胚由来筋芽細胞および筋管細胞のタンパク質合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	村岡 宏樹 (Muraoka Hiroki) (50546934)	岩手大学・理工学部・准教授 (11201)	
研究分担者	牧野 良輔 (Makino Ryosuke) (80772821)	愛媛大学・農学研究科・特任講師 (16301)	

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
---------	---------