1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 １４ 日現在

機関番号：３２７０１

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：２１Ｋ０５９１０

研究課題名（和文）ブタの時間栄養学 ー時間限定給餌で空腸の膜消化酵素活性が高くなる時間を操作するー

研究課題名（英文）Chrono-nutrition of the pig—manipulation of the time enhancing membrane digestive enzymes activities with time-restricted feeding

研究代表者

勝俣　昌也（Katsumata, Masaya）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：６０３５５６８３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、光環境と飼料摂取の影響を分離できる時間制限給餌を実施し、視交叉上核と末梢組織の時計遺伝子のmRNA発現、空腸のグルコーストランスポーターのmRNA発現、盲腸の細菌叢について、その影響を検討した。
　視交叉上核と末梢の各組織におけるいくつかの時計遺伝子および空腸のグルコーストランスポーターのmRNA発現に日内変動がみられた。暗期限定給餌と明期限定給餌を比較するとその発現にはおよそ12時間の差がみられた。つまり、ブタでは視交叉上核と末梢の各組織の日内変動には飼料摂取が強く影響することが示唆された。腸内細菌叢も部の細菌で種レベルの日内変動がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　離乳育成豚を24時間不断給餌の条件で飼育すると、空腸の時計遺伝子とグルコーストランスポーターのmRNA発現量が日内変動した。この実験では明期の飼料摂取量が高かったので、これらの遺伝子発現の日内変動が、光環境あるいは飼料摂取、どちらの影響を受けたのか明確にできなかった。本研究では、明期限定給餌と暗期限定給餌で、それぞれの遺伝子発現の日内変動に12時間のずれがあり、とくに末梢組織では飼料摂取の影響を強く受けることを明らかにできた。また、腸内細菌叢にも飼料摂取による日内変動を観察した。これは、腸内細菌叢の代謝産物にも日内変動があり、ひいては、宿主ブタへの影響にも日内変動があることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this study, time-restricting feeding was implemented to isolate the effects of lighting environment and feed intake on mRNA abundances of clock genes in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues, mRNA abundances of glucose transporters in the jejunum, and bacterial flora in the cecum.
Diurnal variation was observed in the abundances of mRNA of several clock genes in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues and in the glucose transporter in the jejunum. The abundances of these genes differed by approximately 12 hours when dark period-limited feeding was compared with light period-limited feeding. This suggests that feed intake has a strong influence on the diurnal variation of mRNA abundances of clock genes and glucose transporters in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues in pigs. Diurnal variation at the species level was also observed in the gut microbiota.

研究分野：家畜栄養

キーワード：ブタ　時間栄養学　時計遺伝子　グルコーストランスポーター　腸内細菌叢

※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（共通）

１．研究開始当初の背景

現在、高値を維持している飼料価格は養豚場の経営を圧迫しており、生産費削減のための飼料費を削減する手段として、飼料効率を向上させる技術の開発が求められている。わたしたちはこの技術開発に時間栄養学の考え方を導入できないかと考えた。つまり、飼料給与の時間を調節することで、ブタによる栄養素の消化吸収を改善し、ひいては、飼料効率を改善できないかと考えたのである。

栄養素の消化吸収や体内での代謝の日内変動には時計遺伝子群がかかわっており、中枢の視交叉上核や末梢組織の各所で発現している。われわれは、ブタの空腸において、時計遺伝子の発現が日内変動しており、それらの制御で空腸からの糖の吸収を担うグルコーストランスポーターの発現も日内変動することを示唆するデータを得た。しかし、この先行研究ではブタを 24 時間不断給餌で飼養しており、明期の飼料摂取量が暗期よりも多かった。つまり、これらの遺伝子発現が光環境の影響を受けたのか飼料摂取の影響を受けたのかを明確にできなかったことになる。また、空腸と回腸の膜消化酵素マルターゼ、スクラーゼ、ラクターゼ、アミノペプチダーゼ N の活性は、24 時間不断給餌の条件では日内変動しなかった。

このように、空腸などの末梢組織における時計遺伝子とグルコーストランスポーターの遺伝子発現が、光環境と飼料摂取、どちらの影響を受けるのか明らかにすることが課題として残された。さらに、時間限定給餌を実施すれば膜消化酵素活性に日内変動を誘起できるかどうかも、新たな課題として取り組む必要が生じた。

２．研究の目的

光環境と飼料摂取の影響を切り離して、ブタの末梢組織における時計遺伝子とグルコーストランスポーターの mRNA 発現量の日内変動を明らかにするために、明期限定給餌と暗期限定給餌という時間制限給餌の条件で飼養試験を実施することとした。加えて、時間制限給餌であれば膜消化酵素活性に日内変動が生じるのか明らかにすることを目的とした。最後に、宿主の健康状態や代謝に影響を及ぼす腸内細菌叢が時間限定給餌で日内変動するのか明らかにすることも目的とした。

３．研究の方法

3 週齢の離乳去勢雄ブタ４頭を１反復として、４反復を暗期限定給餌(消灯している午後 7 時から午前 7 時まで給餌)、残り４反復を明期限定給餌(点灯している午前 7 時から午後 7 時まで給餌)に供した。給餌量、残飼料、体重を測定し、増体量と飼料効率を算出した。サンプル採取は 1 反復につき午前 3 時、午前 9 時、午後 3 時、午後 9 時に 1 頭ずつ行った。mRNA の発現量はリアルタイム RT-PCR 法、タンパク質の発現量はウェスタンブロッティング法にて測定し、腸内細菌叢の解析はシープメディカル社に外注した。

４．研究成果

飼養成績

表１に飼養成績の結果を示した。日増体量と飼料効率は暗期限定給餌のほうが高かった（P<0.05）。この結果は、暗期限定給餌することでブタの増体の効率がよくなることを示唆している。

表１

	明期限定給餌	暗期限定給餌	Pooled SE	P 値
日飼料摂取量[g/d]	1086	1114	43	0.6451
日増体量[g/d]	640	736	25	0.0118
飼料効率	0.59	0.66	0.01	0.0015

空腸と回腸のマルターゼとアミノペプチダーゼ活性

現在まだ分析が終了していないが、現在までのところ、空腸でも回腸でも、いずれの酵素の活性も日内変動しないというデータを得ている。また、暗期限定給餌と明期限定給餌のあいだに活性の差も検出していない。

時計遺伝子とグルコーストランスポーターの mRNA 発現量の日内変動

① 視交叉上核；暗期限定給餌条件では、Bmal1 の mRNA 発現量が午前 9 時に高く、午前 3 時と午後 9 時に低くなった(図 1a、P<0.01)。明期限定給餌条件では、Period1 の mRNA 発現量が午前 9 時に高く、午前 3 時と午後 9 時に約半分の値となった(図 1b、P=0.02)。データは示さないが、明期限定給餌条件では、Bmal1 の mRNA 発現量は午後 9 時にもっとも高く、暗期限定給餌条件でもっとも高くなる時刻と 12 時間のずれがあった。同様に、暗期限定給餌では Period１の mRNA 発現量は午後 9 時にもっとも高く、明期限定給餌条件でもっとも高くなる時刻と 12 時間のずれがあった。これらの結果は、ブタの視交叉上核の時計遺伝子発現の日内変動には飼料摂取の影響があることを示唆している。

② 空腸；暗期限定給餌条件では、Period2 の mRNA 発現量が午後 9 時に高くなった(図 2、P<0.05)。明期限定給餌条件では、Period2 の mRNA 発現量が午前 9 時に高くなった(図 2、P<0.05)。また、暗期限定給餌条件では SGLT1mRNA 発現が日内変動する傾向があり（P=0.08)、午後 3 時の発現量がもっとも高かった。一方、統計処理による差は検出しなかったものの、明期限定給餌条件では午前 3 時の SGLT1mRNA の発現量がもっとも高かった。このように、Period2、SGLT1 のいずれも、発現量がもっとも高くなる時刻が 12 時間ずれていた。これらの結果は、空腸では、時計遺伝子とグルコーストランスポーターの mRNA 発現量の日内変動は飼料摂取の影響を受けることを示唆し

ている。

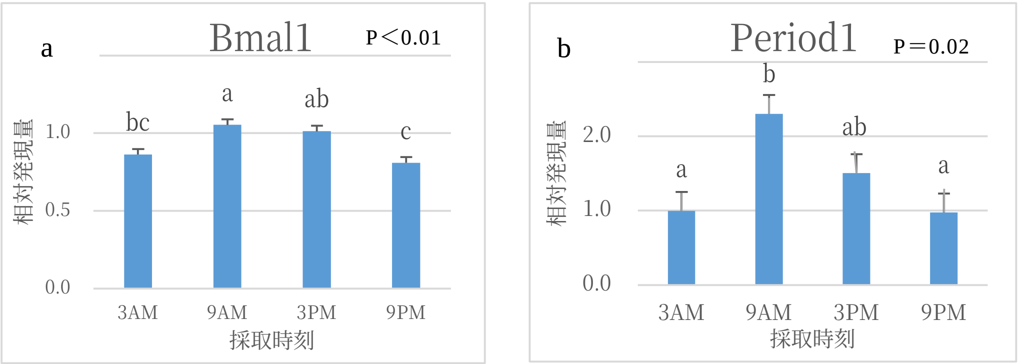

図１　視交叉上核における時計遺伝子（Bmal1 と Period1）の mRNA 発現量の日内変動
a **暗期限定給餌したときの** Bmal1 **の** mRNA **発現量、**b **明期限定給餌したときの** Period1 **の** mRNA **量。** a,b,c; P<0.05

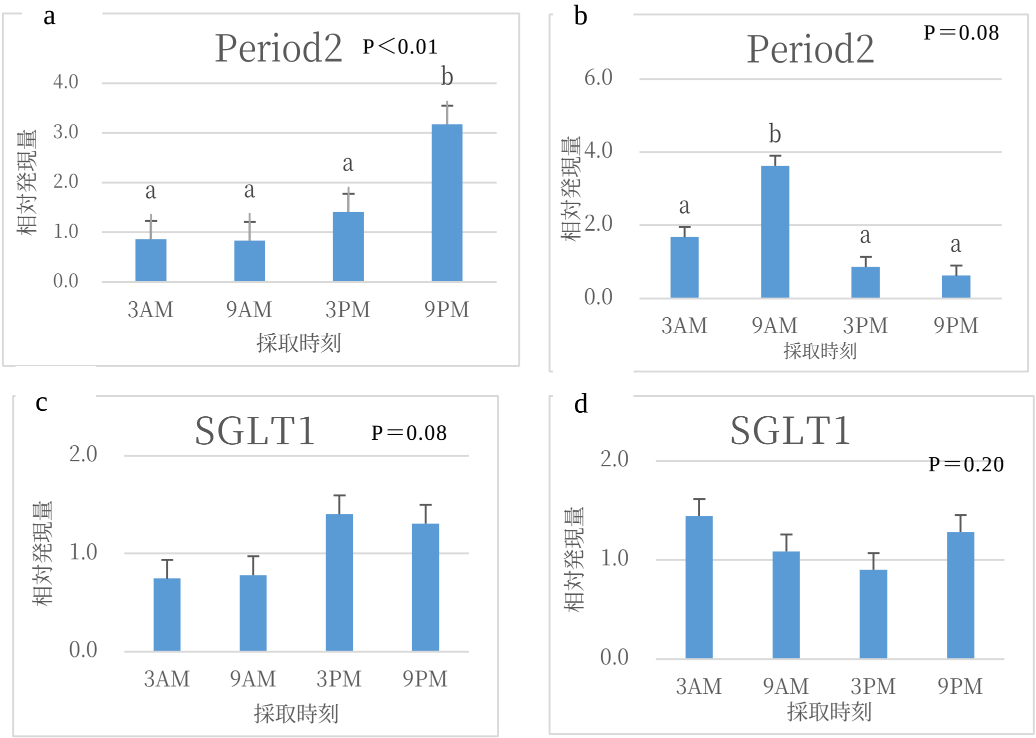

図２　空腸における時計遺伝子 Period2 **とグルコーストランスポーター**SGLT1 **の** mRNA **発現量の日内変動**
a **暗期限定給餌したときの** Period2 **の** mRNA **発現量、**b **明期限定給餌したときの** Period2 **の** mRNA **量、**c **暗期限定給餌したときの** SGLT1 **の** mRNA **発現量、**d **明期限定給餌したときの** SGLT1mRNA **発現量。** a,b; P<0.05

腸内細菌叢の日内変動

暗期限定給餌条件では、Limosilactobacillus reuteri **および** Lactobacillus taiwanesis **の割合が午後** 9 **時に増加した**(P<0.05)**。明期限定給餌条件では、**L. reuteri **の割合が午前 9 時に増加し**(P<0.10)**、**L. taiwanesis **の割合が午前 9 時に増加した**(P<0.05)**。**L. reuteri **も** L. taiwanesis **も、割合がもっとも高くなる時刻は暗期限定給餌と明期限定**

給餌で 12 時間ずれており、これらの細菌種の割合の日内変動には飼料摂取の影響があることを示唆している。種レベルでは、その他の腸内細菌の割合は変化しなかった。データは示さない。

まとめ

24 時間不断給餌すると明期の後半に活発に飼料摂取するので、ブタは昼行性の動物だと考えてよい。そのこともあり、わたしたちは明期限定給餌するほうが増体の効率がよいと予想していたが、本研究では予想とはちがい、暗期限定給餌するほうが増体の効率がよいという結果になった。空腸、回腸いずれでも、明期限定給餌と暗期限定給餌の間に膜消化酵素マルターゼとアミノペプチダーゼ N の活性に差はなかった。したがって、膜消化酵素活性のちがいではこの結果は説明できない。暗期限定給餌で増体の効率がよくなるという現象に再現性はあるのか、どのようなメカニズムが介在しているのか、これらを明らかにすることが今後の課題として残された。現在（2024 年 6 月）、24 時間不断給餌、明期限定給餌、暗期限定給餌によってブタの消化能が影響を受けるか、消化試験を実施中である。

本研究のように時間限定給餌しても、膜消化酵素活性は日内変動しないという結果を得つつある。一方で、空腸では、グルコーストランスポーターSGLT1 の mRNA 発現量が飼料摂取の影響を受けて日内変動した。24 時間不断給餌した先行研究でも同様の結果だった。ブタの消化吸収の日内変動を活用して飼養成績を改善するためには、消化酵素活性よりもグルコーストランスポーター発現量あるいはその機能の日内変動に注目するべきなのかもしれない。

視交叉上核における時計遺伝子の日内変動は光環境の影響を受け、飼料摂取の影響を受けないとされている。本研究では、光環境よりもむしろ飼料摂取の影響を受けるという結果になった。この結果には 2 つの説明が考えられる。ひとつめは、ブタの視交叉上核の時計遺伝子の発現は、多くの研究者が供してきたマウスなどとちがい、飼料摂取の影響を受けると解釈することである。もうひとつは、視交叉上核の採取にあたり、視床下部の腹内側核などの部位もあわせて採取してしまったことである。腹内側核に発現する時計遺伝子は飼料摂取の影響を受けることが考えられるので、今回の結果はその影響を受けてしまったのかもしれない。この点を明確にするためには、in situ hybridization あるいは免疫組織化学により検討する必要がある。

空腸では、時計遺伝子発現は明確に日内変動し、光環境ではなく、飼料摂取の影響を受けるという結果になった。データは示さなかったが、肝臓と菱形筋でも同様だった。このように、末梢の時計遺伝子発現の日内変動は、ブタでも光環境よりも飼料摂取の影響を強く受けることを確認できた。

腸内細菌では、L. reuteri と L. taiwanesis の割合が飼料摂取の影響を受けて日内変動した。このように、ブタの腸内細菌叢は飼料摂取の影響を受けて日内変動することが明らかとなった。腸内細菌叢が変化したということは、代謝産物の量や代謝経路の活性にも日内変動があった可能性がある。ブタへの時間制限給餌が腸内細菌の代謝産物、腸内細菌の代謝経路の活性にも影響するのか明らかにすることが、今後の課題として残された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 木下優希・勝俣昌也
２．発表標題 離乳育成豚の小腸の時計遺伝子とグルコーストランスポーターの発現量の日内変動
３．学会等名 第118回日本養豚学会大会
４．発表年 2023年

１．発表者名 春口知輝・鴨島　遥・勝俣昌也
２．発表標題 離乳育成豚の血清の必須アミノ酸とグルコース濃度の日内変動におよぼす時間制限給餌の影響
３．学会等名 第10回日本時間栄養学会学術大会
４．発表年 2023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

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