

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892027

研究課題名(和文)反芻家畜におけるUmami受容体を介した成長ホルモン分泌調節の解明

研究課題名(英文) Study on the regulations of growth hormone secretion via Umami receptor in ruminants.

研究代表者

高橋 辰行 (TAKAHASHI, TATSUYUKI)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：80707852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はL-アスパラギン酸(L-Asp)による成長ホルモン(GH)分泌におけるUmami受容体の介入を検討することを目的とした。本研究より、Umami受容体は下垂体前葉において発現していることが明らかとなり、L-Aspの血中投与は血中GH濃度を大きく上昇させた。しかしながら、下垂体前葉組織を用いた器官培養では、L-AspおよびL-GluによるGH刺激効果が認められなかった。このことから、L-AspによるGH分泌刺激効果は下垂体前葉に直接作用しないことが示唆され、下垂体におけるL-AspによるGH分泌にUmami受容体は介入していない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether L-Aspartic acid stimulates growth hormone (GH) via Umami receptor in the anterior pituitary of ruminants. This receptor was expressed in the anterior pituitary and the continuous intravenous infusion of L-Asp increased GH concentrations. However, L-Asp and L-Glutamic acid (L-Glu) did not stimulate GH secretion in the anterior pituitary that was sliced by Microslicer. Therefore, these results suggest that L-Asp does not directly act on the anterior pituitary to stimulate GH secretion and does not promote GH secretion via Umami receptor that is expressed in the anterior pituitary.

研究分野：農学

キーワード：L-アスパラギン酸 成長ホルモン Umami受容体 反芻家畜

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜において脳下垂体から分泌される成長ホルモン(GH)は個体の成長に最も深く関わるホルモンの一つであり、エネルギー代謝調節にも関与している。GHは成長促進の他に増乳効果も有していることから、安全かつ簡便で効果的なGH分泌促進剤の開発が望まれている。アミノ酸、なかでもアスパラギン酸(L-Asp)はGH分泌を強力に刺激することが知られており、アミノ酸の一種でもあることから安全かつ新規のGH分泌促進剤になり得る可能性が考えられる。しかしながら、L-Aspがどのような認識機構を経てGH分泌を促進するかは未だ不明である。近年、アミノ酸を認識する受容体としてUmami受容体が同定され、この受容体はグルタミン酸の他にL-Aspも同程度認識することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、L-AspによるGH分泌にUmami受容体が関わっているかどうかを検討するとともに、反芻家畜におけるUmami受容体の役割を検討することとした。

- (1) 下垂体前葉におけるUmami受容体の発現とその遺伝子配列の解析
- (2) L-アスパラギン酸の血中投与による血中成長ホルモン濃度の解析
- (3) 下垂体前葉へのL-アスパラギン酸あるいはL-グルタミン酸刺激による成長ホルモン分泌の解析

3. 研究の方法

(1) ヒツジの下垂体におけるUmami受容体の発現

去勢ヒツジから下垂体前葉を採取し、RT-PCRによるUmami受容体の遺伝子発現およびその配列を解析した(各3頭)。また、下垂体におけるUmami受容体の局在を解析するために、ヒツジとウシの下垂体前葉を固定・包埋後(各3頭)、マイクロトームにより薄

切し、免疫組織化学染色を行った。

(2) L-アスパラギン酸の血中投与による成長ホルモン分泌効果

L-アスパラギン酸による成長ホルモン分泌の効果を検討するために、*in vivo*でまず検討を行った。L-アスパラギン酸を頸静脈内に15分間連続投与した。投与30分前から15分間隔で採血を行い、投与90分後まで採血を行った(各3頭)。また、コントロールとして生理食塩水を用いた(各3頭)。得られた血液サンプル中のGH濃度を測定した。

(3) L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸刺激による下垂体前葉における成長ホルモン分泌機序

*in vivo*で得られた結果を踏まえ、下垂体前葉におけるL-アスパラギン酸の成長ホルモン分泌に対する直接効果を検討した。去勢ヒツジから下垂体前葉を採取し(各4頭)、その後、マイクロスライサーを用いて薄切した。薄切した下垂体前葉を培養液で満たしたネットウェル上で器官培養し、培養48時間後、種々の濃度のL-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、Umami受容体阻害剤、PLCβ阻害剤で刺激した。刺激後に培養上清を回収し、培養上清中のGH濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒツジのゲノム情報と報告されているウシのUmami受容体(T1R1およびT1R3)の遺伝子配列からヒツジのT1R1およびT1R3の遺伝子配列を予測し、予想配列に基づいてPCRを行い、その後遺伝子配列を確認した。その結果、ヒツジ下垂体前葉においてUmami受容体は発現しており、また得られたバンドの遺伝子配列はUmami受容体であることが確認された。次にウシの下垂体を用いて免疫組織化学染色法によってこの受容体の局在を解析した。弱い染まりではあったがT1R1およびT1R3の陽性細胞が観察され、成長ホルモン分泌細胞と思われる細胞にお

いて発現していた (図 1)。このことより、下垂体前葉において Umami 受容体は発現しており、何かしらの役割を果たしていることが示唆された。



図1: ウシの下垂体前葉におけるGHおよびUmami受容体の発現

(2) 血中への L-アスパラギン酸連続投与は投与開始直後に GH 濃度の大きな上昇が確認された。一方、コントロールでは投与後の GH 濃度には大きな変動が見られなかった。したがって、L-アスパラギン酸はこれまでの報告通りに、ヒツジにおいては GH 分泌を刺激することが明らかとなった (図 2)。

(3) これまでの報告において、下垂体前葉細胞を用いた実験では L-アスパラギン酸は 10^{-4} M で最も刺激効果があることがわかっている。本実験でも 10^{-4} M を用いて GH 分泌の

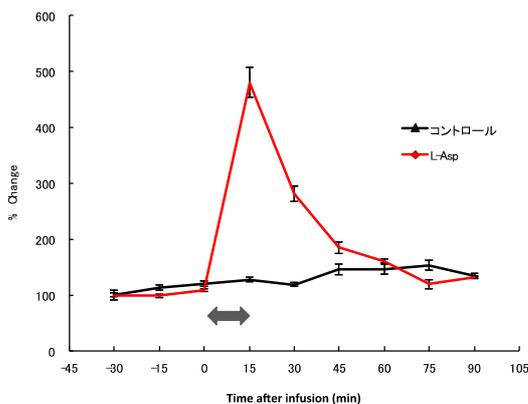


図2: L-Asp血中投与による血中GH濃度の変化

刺激効果およびその機序を検討した。

GHRH 刺激では GH 分泌の上昇が確認されたが、L-アスパラギン酸刺激では GH 分泌

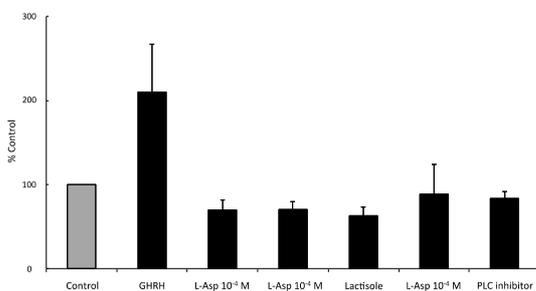


図3: 下垂体前葉組織におけるL-Asp刺激によるGH分泌効果

の上昇が確認できなかった。また、このことから Umami 受容体の阻害剤および PLC 阻害剤の効果も確認することができなかった (図 3)。次に、L-アスパラギン酸が最も GH 分泌を刺激する濃度を検討した。 10^{-6} M でやや GH 分泌は上昇したものの、GHRH ほどの効果は見られなかった。このことから L-アスパラギン酸による GH 分泌効果は下垂体に直接作用しないことが示唆された (図 4)。また、

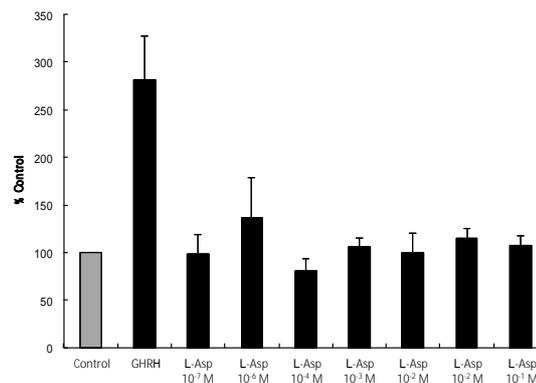


図4: 下垂体前葉組織におけるL-Asp刺激によるGH分泌効果

L-グルタミン酸刺激においては、 10^{-3} M で GH 分泌の上昇が確認されたが、L-アスパラギン酸と同様に GH 分泌効果は認められなかった (図 5)。

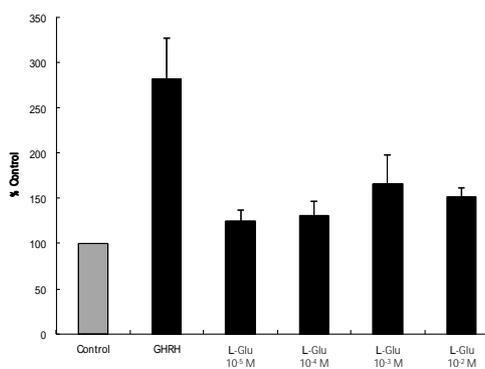


図5: 下垂体前葉組織におけるL-Glu刺激によるGH分泌効果

本研究より、ヒツジの下垂体前葉には Umami 受容体が発現していることが明らかとなった。また、その局在は GH 分泌細胞に発現している可能性が示唆された。一方、L-アスパラギン酸の血中投与では血中 GH 濃度を上昇させ、下垂体に直接作用していることが考えられたが、器官培養の結果と照らし合わせると、L-アスパラギン酸による GH 分泌刺激効果は直接下垂体に作用していないことが示唆された。したがっ

て、下垂体で発現している Umami 受容体はL-アスパラギン酸によるGH分泌に関与していないことが考えられた。しかしながら、本研究で用いた去勢ヒツジは3-5歳齢であったため、L-アスパラギン酸によるGH応答が減弱していることも考えられることから、今後は年齢も考慮する必要がある。また、L-アスパラギン酸によるGH分泌刺激効果が下垂体に直接作用して引き起こらなかったことから、上流の視床下部神経ペプチドであるGHRHあるいはソマトスタチンに作用することでGH分泌が引き起こった可能性があり、これについては現在調査中である。

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. Takahashi T, Sato K, Kato S, Yonezawa T, Kobayashi Y, Ohtani Y, Ohwada S, Aso H, Yamaguchi T, Roh SG, Katoh K. Increased plasma ghrelin suppresses insulin release in wethers fed with a high-protein diet. 査読有. 2014.221.371-380.

2. Roh SG, Koiwa K, Sato K, Ohtani Y, Takahashi T, Katoh K. Actions of intravenous injections of AVP and oxytocin on plasma ACTH, GH, insulin and glucagon concentrations in goats. 査読有.2014.85.286-292.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 辰行 (TATSUYUKI TAKAHASHI)
北里大学・獣医学部・助教
研究者番号：80707852

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：