

平成30年6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：2015～2017

課題番号：15H04580

研究課題名(和文) 高血糖動物であるニワトリにおける生体内アミノ酸糖化に関する栄養生理学的研究

研究課題名(英文) Influence of nutritional status on amino acid glycation in the chicken with high blood glucose

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリは高血糖動物であり、体内ではグルコースがアミノ酸と非酵素的に結合し、アマドリ化合物が生成される。本研究では、ニワトリ体内におけるアミノ酸アマドリ化合物の生理機能について調査した。ニワトリに異なるタンパク質含量の飼料(0%、10%、20%、20%及び40%)を給与したところ、血漿中バリンアマドリ化合物濃度のバリン濃度に対する割合は、飼料タンパク質含量の低下に伴って上昇した。また、バリンアマドリ化合物をニワトリの静脈中注射したところ、バリンアマドリ化合物の血漿中半減期は約277分であることが明らかとなった。さらに、アミノ酸アマドリ化合物は、ニワトリ胚由来細胞に取り込まれることを示した。

研究成果の概要(英文)：As chickens are hyperglycemic animals, amino acids bind non-enzymatically to glucose leading to form Amadori products. In this study, physiological roles of Amadori products in chickens were examined in vivo. When experimental diets containing various protein levels (crude protein 0%, 10%, 20% (Control), 40% and 60%) were given to young chickens, the ratio of plasma valine-Amadori product concentration to plasma valine concentration was significantly increased by the decrease in dietary crude protein levels. It was revealed that half-life of valine-Amadori product in the plasma was estimated to be 277 min by investigating the time course change of plasma valine-Amadori product concentration after intravenous administration of valine-Amadori product. Furthermore, it was shown that amino acid-Amadori product can be incorporated into chicken embryo derived cells.

研究分野：動物栄養学

キーワード：糖化反応 ニワトリ アマドリ化合物 栄養

1. 研究開始当初の背景

高血糖動物であるニワトリでは体内のアミノ酸が糖化され、体タンパク質合成に十分利用されていない可能性がある。しかし、体タンパク質合成の材料となるアミノ酸の糖化割合や糖化されたアミノ酸の栄養価は明らかにされていない。また、糖化されたアミノ酸は、飼料中及び生体内のアミノ酸の栄養価に対する新しい指標となる可能性があり、もしアミノ酸の糖化を抑制できればアミノ酸の利用効率が改善され、養鶏産業における生産性の向上に役立つものと考えられる。さらに、今まで不明であった糖化されたアミノ酸の生成・分解(代謝)に関する生理学的知見が得られることにより、現在国内に訳2,000万人存在する糖尿病患者または糖尿病予備軍における糖尿病合併症の予防に役立つ可能性がある。当該研究分野におけるこのようなアプローチは今まで実施されたことは無く、本研究における独創的な点となっている。

生体内に存在するグルコースは、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シッフ塩基を形成し、アマドリ転位の後にアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を形成する。ニワトリの血糖値は通常200-300 mg/dl であり、ヒトの正常血糖値の2-3倍を示す。そこで、高血糖動物であるニワトリにおける生体内アミノ酸の糖化に着目し、必須アミノ酸の一つであるトリプトファンの糖化産物について調査した。トリプトファンは糖化されると2つの糖化産物、トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物とピクテ・スベングレー反応を介した PHP - TH C ((1R, 3S)-1-(D-gluco - 1, 2, 3, 4, 5 - pentahydroxypentyl)- 1, 2, 3, 4 tetrahydro - - carboline -3-carboxylic acid) が生成される。また、ニワトリの血中にも両糖化産物が存在することを見出し(Kita K, Kawashima Y, Makino R., Namao T, Ogawa S, Muraoka H and Fujimura S. Detection of two types of glycosylated tryptophan compounds in the plasma of chickens fed tryptophan excess diets. Journal of Poultry Science, 50: 138-142. 2013) さらに両糖化産物の血中濃度の測定にも成功した(Makino, R., Kawashima, Y., Kajita, Y., Namao, T., Ogawa, S., Muraoka, H., Fujimura, S. and Kita, K. Glycosylated tryptophan in the plasma of chickens fed tryptophan-excess diets. Journal of Poultry Science. 52: 23-27. 2015)。その結果、血中のトリプトファン-グルコース-アマドリ化合物と PHP-TH C の濃度は、血中トリプトファン濃度のそれぞれ約 3%と 10%であることが明らかとなった。

次に、ニワトリ胚筋芽細胞をバリン欠乏培養液で培養し、段階的にバリン又はバリン-

グルコース-アマドリ化合物を添加したところ、バリン添加量の増加に伴ってタンパク質合成は上昇したが、バリン-グルコース-アマドリ化合物を添加した際にはタンパク質合成は上昇しなかった(Makino, R., Sugahara, M. and Kita, K. Nutritional evaluation of glycosylated valine and tryptophan for protein synthesis in chicken embryo myoblasts Journal of Poultry Science. Journal of Poultry Science. 52: 253-259. 2015)。生体内のタンパク質合成は、異なるアミノ酸のアミノ基とカルボキシル基が結合する反応であり、この結果は、アミノ酸のアミノ基がグルコースにより糖化された場合、タンパク質合成には利用されない可能性を示している。我が国の畜産において、ニワトリを用いた鶏肉・鶏卵の生産を更に効率化するためには、今まで以上に飼料効率を改善する必要がある。ここで、生体内におけるアミノ酸の糖化を抑制できれば、アミノ酸の利用効率を更に高めることが可能となる。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景を踏まえ、以下の研究目的を設定した。

- (1) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の有機合成と生体内代謝速度の調査
- (2) 栄養条件の違いが血漿中アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物濃度に及ぼす影響
- (3) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の栄養価評価
- (4) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物が筋芽細胞タンパク質合成に及ぼす影響の調査

3. 研究の方法

- (1) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の有機合成と生体内代謝速度の調査

実験 1

糖化アミノ酸の一つであるバリン-グルコース-アマドリ化合物をニワトリに経口投与し、血中へ移行するか否かを調査した。アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物は標品が市販されておらず、自ら合成・精製を行った。具体的には、Wang, J. et al. (J. Mass Spectrom. 43: 262-264. 2008)による無水メタノール還流系を改良することにより、アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を有機合成した。バリン-グルコース-アマドリ化合物(300 μmol/kg 体重)をニワトリに経口投与し、投与後 0、20、40、60、120 および 180 分に血液サンプルを採取した。ニワトリの血漿は、

アセトニトリルによる除タンパク質を行い、クロロホルム-メタノール混合液(2:1)によって脱脂を行う。その後、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて ESI (Electro Spray Ionization、エレクトロスプレーイオン化)法によるイオン化を行い、SIM (Single Ion Monitoring) によりアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を定量した。

実験 2

糖化アミノ酸の一つである PHP-TH C のニワトリ血液循環中における半減期を明らかにするために、PHP-TH C (114 nmol/0.2 ml/70 g 体重)をニワトリ翼下静脈から投与し、血液サンプルを投与前、投与 15、30、60、180、360、720 および 1440 分後に採取した。ニワトリの血漿は、アセトニトリルによる除タンパク質を行い、クロロホルム-メタノール混合液によって脱脂を行う。その後、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて ESI 法によるイオン化を行い、SIM によりアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を定量した。

実験 3

糖化アミノ酸の一つであるバリン-グルコース-アマドリ化合物のニワトリ血液循環中における半減期を明らかにするために、バリン-グルコース-アマドリ化合物 2,250 nmol/kg 体重)をニワトリ翼下静脈から投与し、血液サンプルを投与前、投与 15、30、60、120、180、360、720 および 1440 分後に採取した。ニワトリの血漿は、アセトニトリルによる除タンパク質を行い、クロロホルム-メタノール混合液によって脱脂を行う。その後、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて ESI 法によるイオン化を行い、SIM によりアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を定量した。

(2) 栄養条件の違いが血漿中アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物濃度に及ぼす影響

飼料蛋白質含量の変化が、ニワトリの血漿中トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物およびバリン-グルコース-アマドリ化合物濃度に及ぼす影響を調査した。ニワトリに飼料蛋白質含量 0、10、20、40 および 60% の飼料を 7 日間自由摂取させ、実験最終日に血液サンプルを採取した。ニワトリの血漿は、アセトニトリルによる除タンパク質を行い、クロロホルム-メタノール混合液によって脱脂を行う。その後、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて ESI 法によるイオン化を行い、SIM によりアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を定量した。

(3) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の栄養価評価

ニワトリ生体内におけるアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の栄養としての価値については明らかにされていない。そこで本研究は、トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物またはバリン-グルコース-アマドリ化合物が、ニワトリ胚由来細胞に取り込まれるのか否かを調査した。3H 標識グルコースとトリプトファンまたはバリンの混合溶液を 37 °C で 7 日間保温し、3H 標識トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物またはバリン-グルコース-アマドリ化合物を調製した。孵卵 19 日目のニワトリ胚から肝臓、腎臓、脾臓および浅胸筋を摘出し、トリプシン処理によって細胞を得た。Medium199+10% ウシ胎児血清にダルベッコ改変リン酸緩衝生理食塩水を添加した培養液を対照区とし、実験区には 3H 標識トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物またはバリン-グルコース-アマドリ化合物を 60 Bq/mL となるように Medium199 培養液に添加した。この培養液で各細胞を一晚培養した。その後、NaOH/Triton-X で溶解し、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(4) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物が筋芽細胞タンパク質合成に及ぼす影響の調査

アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の生理機能には不明の点が多い。そこで本研究では、ニワトリ胚由来筋管細胞の培養液中にアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物を添加し、アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物が筋管細胞のタンパク質合成に及ぼす影響について調査した。孵卵 16 日目のニワトリ胚から浅胸筋を摘出し、筋芽細胞を調製後、CO₂ インキュベーター内で 8 日間培養して筋管細胞に分化させた。10% ウシ胎児血清を含む 199 培地に、アラニン-グルコース-アマドリ化合物を 100 μM、500 μM および 1000 μM となるように添加し、3H 標識したフェニルアラニンを添加して一晚培養した。タンパク質への放射能の取り込み量をタンパク質合成の指標とした。また、アスパラギン、イソロイシン、スレオニンおよびバリンのアマドリ化合物が筋管細胞のタンパク質合成に及ぼす影響も同様の方法で測定した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の有機合成と生体内代謝速度の調査

実験 1

血漿中バリン-グルコース-アマドリ化合物濃度は投与後 0 分から 180 分にかけて経時的に上昇したが、コントロール区では変化しなかった(図 1)。この結果より、ニワトリに経口投与したバリン-グルコース-アマド

リ化合物は消化管から吸収され、血中に移行することが明らかとなった。

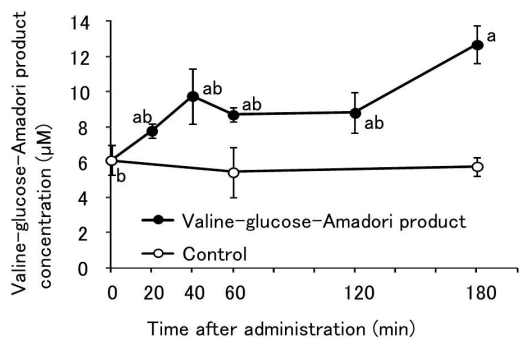


図1. 経口投与後のバリン-グルコース-アマドリ化合物の血中濃度変化

実験 2

血漿中 PHP-TH β C 濃度は投与 30 分後に 16.1 μM まで上昇し、その後速やかに低下した。投与 360 分後に血漿中 PHP-TH β C 濃度が投与前の生理的濃度まで低下した。血漿中 PHP-TH β C の半減期を非線形回帰分析により求めたところ 107 分であった (図 2)。

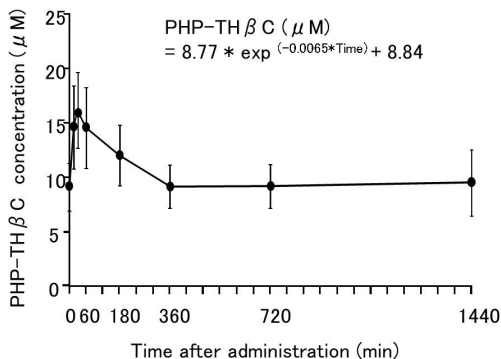


図2. PHP-TH β C の血中半減期

実験 3

血漿中バリン-グルコース-アマドリ化合物濃度は投与 15 分後にピークに達し、その後速やかに低下した。投与 360 分後に血漿中バリン-グルコース-アマドリ化合物濃度が投与前の生理的濃度まで低下した。血漿中バリン-グルコース-アマドリ化合物の半減期を非線形回帰分析により求めたところ 231 分であった (図 3)。

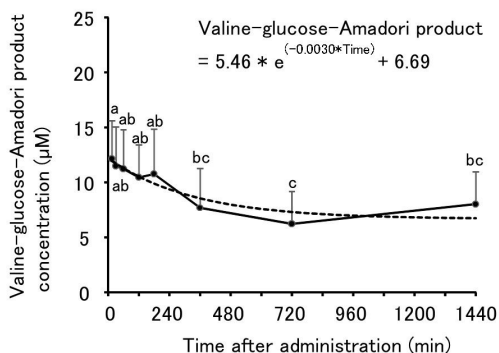


図3. バリン-グルコース-アマドリ化合物の血中半減期

(2) 栄養条件の違いが血漿中アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物濃度に及ぼす影響

飼料タンパク質含量が低下すると、血漿中のトリプトファンに対する PHP-TH β C の割合は上昇し、飼料タンパク質含量が 0% の時、割合は最も高くなった。飼料タンパク質含量が低下すると、血漿中のバリンに対するバリン-グルコース-アマドリ化合物割合は上昇し、飼料タンパク質含量が 0% の時、対照区 (CP 20%) と比べて割合は有意に高くなった (図 4)。

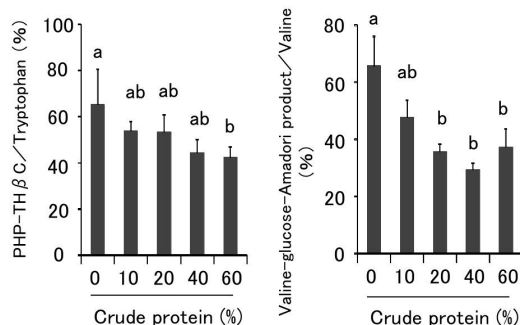


図4. 血漿中アミノ酸濃度に対するアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物濃度の割合

(3) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の栄養価評価

いずれの組織においても、3H 標識トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物またはバリン-グルコース-アマドリ化合物の細胞内への取込みが認められた。また、筋肉細胞では、トリプトファン-グルコース-アマドリ化合物の方がバリン-グルコース-アマドリ化合物より多く細胞内に取り込まれた。以上の結果から、アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物は細胞内において何らかの機能を果たしている可能性が示唆された (図 5)。

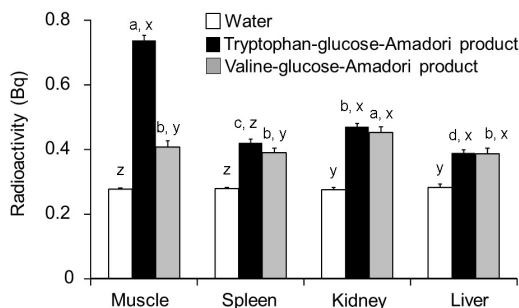


図5. ニワトリ胚由来組織細胞へのアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物の取込

(4) アミノ酸-グルコース-アマドリ化合物が筋芽細胞タンパク質合成に及ぼす影響の調査

スレオニン-グルコース-アマドリ化合物が 1,000 μM の時、筋管細胞のタンパク質合

成を有意に促進した。また、バリン-グルコース-アマドリ化合物が 500 μ M の時、筋管細胞のタンパク質合成を有意に促進した(図6)。以上の結果より、一部のアミノ酸-グルコース-アマドリ化合物には、筋管細胞のタンパク質合成を上昇させる可能性が示唆された。

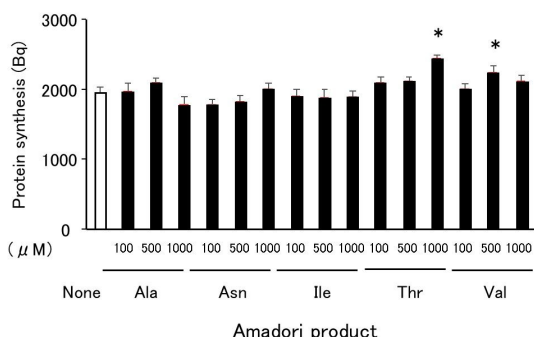


図6. アミノ酸アマドリ化合物がニワトリ筋管細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

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5件)

Makino, R. and Kita, K. Half-life of glycated tryptophan in the plasma of chickens. *Journal of Poultry Science*. 55, 2018, 116-118. (査読有)
DOI:10.2141/ jpsa.0170158

Honma, A., Ogawa, C., Sugahara, M., Fujimura, S. and Kita, K. Influence of varying dietary protein levels on glycation of albumin, tryptophan and valine in the plasma of chickens. *Journal of Poultry Science*. 54, 2017, 242-246. (査読有)
DOI:10.2141/ jpsa.0160146

牧野良輔・喜多一美. ニワトリにおける非酵素的糖化トリプトファンの代謝および生理機能. *栄養生理研究会報*, 59: 35-40. 2016. (査読有)

Takahashi, N. and Kita, K. Fructosyl-valine orally administrated to chickens is incorporated from gastrointestinal tract. *Journal of Poultry Science*. 53, 2016, 153-155. (査読有)
DOI:10.2141/ jpsa.0150001

Makino, R., Sugahara, M. and Kita, K. Incorporation of glycated tryptophan and valine into various cells derived from chicken embryos. *Journal of Poultry Science*. 53, 2016, 220-222.

(査読有)

DOI:10.2141/ jpsa.0150112

〔学会発表〕(計12件)

川嶋夏輝・喜多一美, 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、日本家禽学会 2018 年度春季大会(2018 年)、東京大学、2018 年 3 月 30 日.

川嶋夏輝・喜多一美, 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グルコース吸収に及ぼす影響、第 40 回日本分子生物学会(2017 年)、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6-9 日.

川嶋夏輝・喜多一美, 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タンパク質合成に及ぼす影響、日本家禽学会 2017 年度秋季大会(2017 年)、信州大学、2017 年 9 月 5 日.

谷澤里沙・喜多一美, 飼料タンパク質源の違いがニワトリの血中アマドリ化合物濃度に及ぼす影響、第 71 回日本栄養・食糧学会大会(2017 年)、沖縄コンベンションセンター、2017 年 5 月 20 日.

本間彩香・喜多一美, 日本家禽学会 2016 年度春季大会(2016 年)、ニワトリヒナの成長に伴う血漿中糖化反応生成物濃度の変化、日本獣医生命科学大学、2016 年 3 月 31 日.

牧野良輔・喜多一美, 日本畜産学会第 121 回大会(2016 年)、ニワトリ組織中へのトリプトファン由来 -カルボリン蓄積、日本獣医生命科学大学、2016 年 3 月 28 日.

本間彩香・喜多一美, 日本畜産学会第 121 回大会(2016 年)、尿素サイクル構成アミノ酸給与がニワトリの血中糖化産物生成に及ぼす影響、日本獣医生命科学大学、2016 年 3 月 28 日.

本間彩香・諸橋朋美・喜多一美, 第 38 回日本分子生物学会(2015 年)、飼料蛋白質の種類や質の違いがニワトリの血漿中アミノ酸およびタンパク質の糖化に及ぼす影響神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1-4 日.

牧野良輔・阿部佳世子・喜多一美, 日本家禽学会 2015 年度秋季大会(2015 年)、ニワトリ胚由来細胞におけるトリプトファン由来 -カルボリンの取込み、酪農学園大学、2015 年 9 月 10 日.

Makino, R. and Kita, K. (2015)
Metabolism of glycated tryptophan
compounds in the chickens fed
tryptophan-excess diets. In
'Proceedings of 12th Asian Congress
of Nutrition'. p.311. Japan Society
of Nutrition and Food Science. 2015
年5月14日-18日.

Takahashi, N. and Kita, K. (2015)
Glycated amino acid orally
administrated to the chicken can be
incorporated into the blood. In
'Proceedings of 12th Asian Congress
of Nutrition'. p.311. Japan Society
of Nutrition and Food Science. 2015
年5月14日-18日.

Honma, A. and Kita, K. (2015)
Influence of feeding diets high in
citrulline, ornithine or taurine on
glycation of plasma tryptophan and
valine in chickens. In 'Proceedings
of 12th Asian Congress of Nutrition'.
p.311. Japan Society of Nutrition and
Food Science. 2015年5月14日-18日.

〔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：
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

喜多 一美 (KITA Kazumi)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：20221913

(2) 研究分担者

西向 めぐみ (NISHIMUKAI Megumi)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：40374730

村岡 宏樹 (MURAOKA Hiroki)
岩手大学・農学部・助教
研究者番号：50546934

平松 浩二 (HIRAMATSU Kozhy)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号：80238386

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()