

令和元年6月19日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19327

研究課題名(和文) 血中アミノ酸プロファイルのリプログラミングとトランスレーショナルリサーチ

研究課題名(英文) Re-programming and translational research of blood amino acid profile

研究代表者

村上 昇 (Murakami, Noboru)

宮崎大学・農学部・特別教授

研究者番号：80150192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず始めに、血中アミノ酸プロファイルが先天的肥満(遺伝性)と後天的肥満(高脂肪食摂取による食餌性)マウスで異なるのかを調べた。その結果、遺伝性肥満では血中アミノ酸プロファイルは正常に維持されているのに対し、食餌性肥満マウスではアミノ酸プロファイルに異常を来していることが判明した。次に、妊娠期あるいは授乳期の母親にバリンとロイシンを毎日過剰に投与し、胎児や幼児が母親を介して高アミノ酸に暴露された時の成長後のアミノ酸プロファイル調べた。その結果、通常の動物とは異なるアミノ酸プロファイルと筋肉機能の相違が示された。このアミノ酸プロファイルの胎児・幼児期でのリプログラミングは豚でも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

20種類のアミノ酸それぞれの血中濃度は生まれながらにして決められており、その閾値は厳密に維持されている。アミノ酸のプロファイルは個体が異なってもほぼ同じである。今回の結果は、遺伝的な肥満はアミノ酸プロファイルに影響を与えないが、後天的な高カロリー摂取での肥満ではこのプロファイルが異常を示すことを明らかにした。つまり、食餌性肥満の診断に利用できることを示している。またバリン欠乏食により体重減少や内臓脂肪の減少が起こること、あるいは胎児期や幼児期に高アミノ酸に曝されると成長後のアミノ酸プロファイルが変化することを示したことは、肥満の治療、胎児・幼児の成長や家畜の育種などに利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：At first, it was examined whether blood amino acid profile was different between congenital obesity (hereditary) and acquired obese (dietary by the high-fat meal intake) mouse. As a result, blood amino acid profile was maintained normally in hereditary obesity mouse. On the other hand, abnormality in an amino acid profile was shown in alimentary dietary obese mouse. The second, I gave valine and leucine to mother during the pregnancy or lactation periods excessively every day, and exposed high concentration of these two amino acids to fetus and infant through mother (or milk). The amino acid profile and muscle functions after the growth in those animals were different from the normal animals. The re-programming by the amino acid during the period of fetus- infant was confirmed in the pigs also.

研究分野：神経生理学、内分泌学、代謝学

キーワード：アミノ酸 成長 畜産 代謝、 リプログラミング

## 1. 研究開始当初の背景

動物は様々な生理状況下にあっても内分泌系や自律神経系による恒常性維持機構によって、血液中のグルコースやトリグリセリド、あるいは各種アミノ酸濃度はおおよそ一定に保たれている。しかし、血液中アミノ酸濃度は血糖などに比べると、比較的インバランスを起しやすく、私達はこれまでも実験動物の様々な生理的状況下（運動時、繁殖・妊娠期、加齢）で、血液中のアミノ酸プロファイルが異なる事を証明してきた（J. Vet. Med. Sci. 77(6): 661-668, 2015 および 77(7): 815-821, 2015）。近年、この血液中のアミノ酸解析（アミノ酸プロファイル解析）で健康状態や病気の可能性を調べるアミノインデックス診断が人で実施されており、すでに癌や糖尿病のスクリーニング検査に応用されている。しかし、アミノインデックス診断には、種々の生理的状況下でのアミノ酸プロファイルを知っておく事が重要と思われ、そのようなプロファイル作成は喫緊の課題であるとも言える。さらに私達は、アミノ酸の恒常性の破綻が生体機能にどのような影響をおよぼすかを、必須アミノ酸のバリン欠乏食をラットやマウスに給餌することで検討してきた。バリン欠乏餌の摂食によって、内臓脂肪重量が著しく減少し、同時に肝臓の *Enho* mRNA 発現が有意に増加した。対照的に、ob/ob マウスでは、バリン欠乏餌を摂食すると体重が有意に減少するにもかかわらず、内臓脂肪重量に変化が認められなかった。また、肥満の ob/ob マウスでは、バリン欠乏餌の摂食による肝臓の *Enho* mRNA 発現の増加は引き起こされず、マウスと比較して低レベルなままであった。

このようなアミノ酸のプロファイルは生まれながらにして決定されており、個体にかかわらずほぼ同じプロファイルを示す。もし、このプロファイルを生後に恒常的に変化させる（リプログラミング）ことできれば、様々な分野での応用が可能になるかも知れない。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでのアミノ酸の研究成果をベースにして、以下の4つの課題を検討する。(1) 肥満と血中アミノ酸の関係を調べることを目的に、先天的肥満（遺伝性）と後天的肥満（高脂肪食摂取による食餌性）モデルマウスを用いて、それら肥満マウスの血中アミノ酸プロファイルは正常に維持されているのか、あるいは肥満の種類で異なるのかを検討する。(2) 近年、授乳期マウスにセリンを投与すると乳汁中のセリン濃度が増加したという報告があるが、セリンは体内で合成される非必須アミノ酸であり、乳腺上皮細胞で合成されたものである可能性も否定できない。そこで、乳児の筋肉の成長に不可欠な必須アミノ酸である分岐鎖アミノ酸を母親に経口投与した時に、乳汁（あるいはそれを介して乳児の血中）に移行するか否か、また、その乳汁を摂取した幼児の血中にそのアミノ酸が高濃度で検出されるかを検討する。(3) 妊娠母親や授乳中の母親にバリンとロイシンを高濃度で毎日給餌し、それらに育てられた子供が成長後に通常とは異なるアミノ酸プロファイルを示すか、すなわちアミノ酸のリプログラミングが起こるかを調べ、さらにその動物の筋肉機能が通常と異なるか否かを検討する。また、豚でもこのリプログラミングが起こるかを調べる。(4) *Enho* は肝臓と脳に発現しており、分泌ペプチド Adropin をコードする。そこで Adropin を腹腔内投与し、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現への影響を調べる。

### 3. 研究の方法

実験(1): 内臓脂肪蓄積型の遺伝性肥満マウスには c57-Black-Daruma マウスを使用し、後天的な食餌性肥満マウスには 5 週齢から高脂肪食 (60kcal% 脂肪含有量) を給餌した c57-Black マウスを使用した。対照には通常食給餌の c57-Black-wild マウスを用いた。それぞれ、5、7、9 および 11 週齢時に採血し、血中アミノ酸濃度を測定し、アミノ酸プロファイルを作成した。血中アミノ酸濃度は、血漿をトリクロロ酢酸で除蛋白処理し、島津製作所のアミノ酸分析システムで解析した。

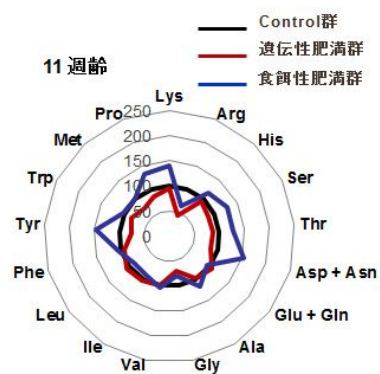
実験(2): 授乳期ラットに分岐鎖アミノ酸を 25%(g/g)の割合で、4 日間経口投与し、血液中や乳汁への移行および乳汁中の他のアミノ酸濃度へ及ぼす影響について調べた。乳汁や血液は採取後直ちに実験(1)と同様な処理でアミノ酸を測定した。次に、授乳期マウスに 3 週間、25%(g/g)の割合で分岐鎖アミノ酸を餌に添加して与え、離乳直前の乳児と離乳後の幼児の血中アミノ酸濃度へ及ぼす影響について調べた。

実験(3): 妊娠 15 日から離乳するまでの約 4 週間、分岐鎖アミノ酸を 25%(g/g)の割合でラットに給餌し、その子供の離乳後、7 週齢で血液中のアミノ酸プロファイルを作成し、通常のラットと比較した。またトレッドミルによる筋肉疲労度を測定した。

実験(4): ob/ob マウスに Control 餌、バリン欠乏餌、Pair fed の各条件で 15 日間給餌し、給餌 6 日目から 15 日目までの 10 日間、Adropin を 0.10nmol/g BW/day の用量で腹腔内投与し、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現への影響を調べた。

### 4. 研究成果

実験(1): Daruma マウスは wild マウスと比較し、5 週齢から終始有意な過食と体重増加を示したにも関わらず、血中アミノ酸濃度は 5 週齢のみ幾つかのアミノ酸で差を認めしたが、その後は差を認めなかった。これに対して食餌性肥満マウスでは、Wild マウスと比較して 5 週齢から 11 週齢までのすべてで、いくつかのアミノ酸に有意な差が見られ、アミノ酸プロファイルはインバランスを生じた。右図は、11 週齢での血中アミノ酸プロファイルを示している。青で示す食餌性肥満のマウスは



100%から外れたアミノ酸が多い事がわかる。以上の結果、高脂肪食給餌による食餌性肥満においては血中アミノ酸濃度のプロファイルにインバランスを生じるが、遺伝的肥満マウスでは離乳後のみの一過的变化を除き、血液中アミノ酸濃度の恒常性は極めて巧妙に調節されていることが示唆された。

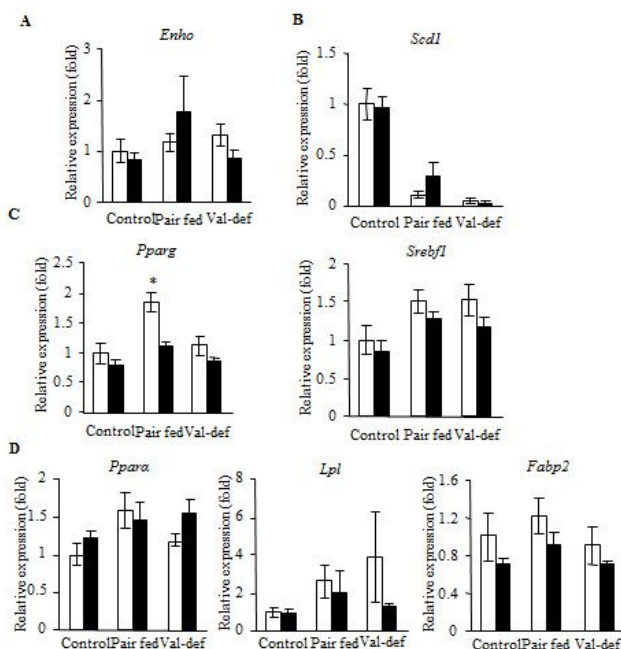
実験(2): バリンあるいはロイシン投与群の乳中では、対照群と比較して乳汁あるいは血液中のバリンあるいはロイシンの有意な増加が認められた。母親の血中と乳汁中に高濃度のバリン

が検出された。また、他のアミノ酸濃度にも影響が及んだ。授乳期マウスに3週間、分岐鎖アミノ酸添加餌を与え、離乳直前の乳児と離乳後の幼児の血中アミノ酸濃度へ及ぼす影響について調べた。その結果、バリン投与群の母親が授乳した乳児においては、離乳時の血中バリン濃度が有意に増加していたが、離乳後5週齢以降の幼児マウスの血中アミノ酸濃度では有意な変化は見られなかった。以上の結果、分岐鎖アミノ酸のうちバリンおよびロイシンは経口投与により乳汁に移行し易いこと、また、移行したアミノ酸の一部は乳児の血液にも反映されることが判明した。しかし、これらのアミノ酸を投与する事で他のアミノ酸の濃度に影響が及ぶことやイソロイシンは移行し難く、アミノ酸の乳汁への移行の機序は非常に複雑であることが推察される。

実験(3): 胎児期および離乳までに母親から多量のバリン、ロイシンを供給された子供の成長曲線は通常の動物と差は示さなかったが、7週齢で調べた血中アミノ酸プロファイルは、通常の動物と明らかに異なった。特にメチオニン、トリプトファン、スレオニンの閾値は通常より低下しており、一方でアルギニン、グリシン、バリン、ロイシンの閾値は通常よりも有意に増加していた。この結果は、胎児期や幼児期に幾つかの高濃度のアミノ酸に暴露されると、アミノ酸の閾値がリセットされ、通常とは異なる血中アミノ酸のプロファイルを獲得することを示唆している。これが遺伝するか否かは今後の課題である。ところで、このようなバリン、ロイシンを多量に摂取した子供は、成長後のトレッドミルによる筋肉疲労度試験において、有意に疲労度が少ないことが示された。次に、トレッドミルで10分間に30回以上の電気ショックを受けた動物の割合を開始後の時間経過別に比較した。バリン、ロイシンでリプログラミングされた動物ではトレッドミル開始後80分で7匹中1匹、90分~120分で7匹中3匹に対し、通常の動物では開始50分で9匹中6匹、70分で9匹中全例が10分間に30回以上の電気ショックを受けた。すなわち、バリン、ロイシンでリプログラミングされた動物では著しく筋肉疲労度が小さいことが判明した。このことは産業動物等において、種々の有用性を示唆するものである。

実験(4): Enho mRNA 発現量は、Control 餌/ Saline 群、Pair fed 欠乏餌/ Saline 群、およびバリン欠乏餌/ Saline 群の間で、有意な変化は認められなかった。いずれの群においても、Adropin 投与による Enho mRNA 発現量への影響は認められなかった。脂質生合成に関与する Scd1 mRNA の発現量は、Control 餌/ Saline 群と比較して、Pair fed / Saline 群およびバリン欠乏餌/ Saline 群で有意に減少し、Pair fed / Saline 群よりもバリン欠乏餌/ Saline 群でより減少している傾向が見られた(下図 A)。いずれの群においても、Adropin 投与による Scd1 mRNA 発現量への影響は認められなかった。次に、脂質生合成に関与する遺伝子の発現を制御する転写因子である Pparg と Srebf1 の発現を調べた。Pparg の発現は、Control 餌/ Saline 群とバリン欠乏餌/ Saline 群と比較して、Pair fed / Saline 群で有意に増加した(図 B)。Control 餌群とバリン欠乏餌群では Adropin 投与による Pparg mRNA 発現への影響は認められなかったが、Pair fed / Adropin 群において、Pair fed / Saline 群と比較して Pparg mRNA の発現は有意に増加した(右図 C)。Srebf1 mRNA の発現量は、Control 餌/ Saline 群、Pair fed 欠乏餌/ Saline 群、およびバリン欠乏餌/ Saline 群の間で、有意な変化は認

められなかった。いずれの群においても、Adropin 投与による Srebf1 mRNA 発現量への影響は認められなかった。脂肪の異化作用に  
 関与する Ppara、Lpl、および Fabp2 mRNA の発現量は、Control 餌/ Saline 群、Pair fed 欠乏餌/ Saline 群、およびバリン欠乏餌/ Saline 群の間で、有意な変化は認められなかった(右図D)、  
 いずれの群においても、Adropin 投与による Ppara、Lpl、および Fabp2 mRNA 発現への影響は認められなかった Pair fed 群において Adropin 投与によって肝臓の PPAR $\gamma$  mRNA 発現が減少したことから、Adropin 投与によって脂質代謝が変化したと考えられる。しかしながら、その他の脂質代謝関連遺伝子の発現に Adropin 投与による有意な変化は認められず、  
 WAT 重量の減少も認められなかった  
 ことから、本研究においてこの可能性を証明することはできなかった。今後、制限給餌やバリン欠乏餌給餌条件の ob/ob マウスへの Adropin の投与による筋分解や WAT における脂肪分解への影響を調べることで、この可能性について検証することができると思われる。



Val欠乏食給餌およびAdropinによるob/obマウスの肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現への影響  
 A. 脂質生成に関与する遺伝子の相対的発現量。  
 B. 脂質生成の制御に関与する遺伝子の相対的発現量。  
 C. 脂肪分解および脂肪酸輸送に関与する遺伝子の相対的発現量。  
 D. 脂肪分解および脂肪酸輸送に関与する遺伝子の相対的発現量。  
 値はControl餌/Saline群の発現量に対する相対値を示している。各群n=4。\*P<0.05 vs Saline群。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

R Terao, (他 10 名, 8 番目) 査読有り, Immunostimulatory effect of kumquat (*Fortunella crassifolia*) and its constituents,  $\beta$ -cryptoxanthin and R-limonene. *Food & Function*. 10(1):38-48, 2019, doi: 10.1039/c8fo01971a

K Mori, T Ida, M Mori, H Kaiya, J Hino, M Fudetani, K Nakahara, N Murakami, M Miyazato, K Kangawa, 査読有り, Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its possible role in the regulation of prolactin release. *Scientific Reports* 7: 10468, 2017, doi:10.1038/s41598-017-10319-9

T Ensho, K Maruyama, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, K Nakahara, N Murakami, 査読有り, Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492(3):412-418, 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.084

Y Suzuki, K Nakahara, T Ensho, N Murakami, 査読有り, Sex difference of hyperinsulinemia in the C57BL/6J-Daruma (obese) mouse. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(7):1284-1293, 2017, doi: 10.1292/jvms.17-0006.

T Ensho, K Nakahara, Y Suzuki, N Murakami, 査読有り、Neuropeptide S increases motor activity and thermogenesis in the rat through sympathetic activation .Neuropeptides 65:21-27, 2017, doi: 10.1016/j.npep.2017.04.005.

〔学会発表〕(計 7件)

村上 昇、プロラクチン分泌調節の謎、平成 30 年度日本獣医師会獣医学術会年次大会  
2019.2.10

村上 昇、走行運動と摂食機構の相反的制御機構について、2018 年度日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部大会、 2018.10.20

村上 昇、ニューロメジン U (NMU)、ニューロメジン S (NMS) とそれらの前駆体関連ペプチドのプロラクチン分泌への影響について、第 91 回日本内分泌学会、2018.04.26

大谷 瞳、ニューロメジン U (NMU) のプロラクチン (PRL) 分泌抑制作用、第 160 回日本獣医学会、2017.09.14

中山瑞紀、ラットにおける走行運動と高脂肪食の優先的嗜好性について、第 160 回日本獣医学会、2017.09.14

Abdul Wahid Abdul Wahab、インスリン分泌抑制物質デクレチンの本体はニューロメジン U (NMU) なのか? *in vivo* での検証、第 160 回日本獣医学会、2017.09.14

筆谷麻未、ニューロメジン U 前駆体中の新規ペプチド (NURP) のプロラクチン分泌促進作用機序、第 160 回日本獣医学会、2017.09.14

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：永延清和

ローマ字氏名：(NAGANOBU, kiyokazu)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40264353

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：小林郁雄

ローマ字氏名：(KOBAYASI, ikuo)

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20576293