

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05947

研究課題名(和文)反芻家畜の栄養素代謝に対するメチル基転移経路の寄与

研究課題名(英文)The contribution of transmethylation pathway in the ruminant nutrition

研究代表者

小櫃 剛人(Obitsu, Taketo)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：30194632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の生合成などに重要な役割を担っているメチル基代謝のうち、メチオニン回路に着目して、反芻家畜における変動要因とそれが栄養素代謝に及ぼす影響について明らかにすることを目的に子牛およびヒツジを用いて一連の研究を行い、以下の成果を得た。1) 出生後に摂取する初乳によって、メチル基給源となるギ酸やアミノ酸の血漿濃度が増加する。2) 単胃動物とは異なり、反芻家畜においては飼料中エタノールによるメチオニン回路の代謝活性への影響は軽微である。3) 牧草クロロフィルの構成要素であるフィトールは、血漿中のギ酸、セリン、グリシン濃度を高め、メチル基代謝を活性化する一方で、血漿トリグリセリド濃度も高める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ギ酸が生体分子のメチル基給源となることは知られていたが、これまで報告の少なかった反芻家畜における血漿中のギ酸濃度とその変動要因の一端を明らかにした。クロロフィルを構成するフィトールがメチル基代謝を活性化させるという新規の成果を得た。生体の恒常性にとって重要な代謝経路であるメチル基代謝に関して得られた基礎的知見は、家畜の健全飼育のための技術開発に貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the factors affecting methyl group metabolism (one-carbon metabolism), especially in methionine cycle, in ruminants and their effects on nutrient metabolism. Following novel results were obtained using newborn calves and mature sheep. 1) Colostrum feeding enhances plasma concentration of formic acid and amino acids relating with methyl group metabolism. 2) Dietary ethanol does not affect the activity of the methionine cycle in ruminants. 3) Phytol, a component of chlorophyll in forage, enhances plasma concentration of methyl donors of formic acid, serine and glycine, while it increases plasma triglyceride concentration as well.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：メチオニン回路 ギ酸 フィトール 発酵TMR エタノール 初乳 ホモシステイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物体内でのメチル基転移を伴う代謝経路は、生体恒常性の維持にとって重要である。特に、葉酸とメチオニンの関わる一連のメチオニン回路では、S-アデノシルメチオニンから転移するメチル基が、ホスファチジルコリンの生成や DNA メチル化など様々な反応に利用されている。S-アデノシルメチオニンはメチル基を他の物質に受け渡した後にホモシステインとなり、これは葉酸の誘導体(5-メチルテトラヒドロ葉酸)からのメチル基転移によって再びメチオニンとなる(再メチル化)。この再メチル化は主に肝臓で行われ、ビタミン B₁₂ とメチオニン合成酵素が関与する。5-メチルテトラヒドロ葉酸のメチル基はセリンやグリシンなどのアミノ酸に由来するが、別のメチル基給源として、クロロフィルに由来するフィタン酸の体内代謝などで生じるギ酸が利用されていることが示唆されている(Lamarre ら, 2013)。こうしたメチル基転移代謝は、メチオニンからの体タンパク質の合成や、肝臓でのエネルギー代謝関連酵素遺伝子のメチル化、ホスファチジルコリンを含むリポタンパク質による脂質輸送・蓄積といった、家畜のアミノ酸やエネルギー基質の代謝にも影響を及ぼし、家畜の生産や健全性にも影響すると考えられる。

反芻家畜では、クロロフィル(フィトール)に富む牧草が主要な飼料となる。また飼料として用いられる発酵飼料にはメチル基代謝に影響する(Schalinske と Nieman, 2005)ことが知られているアルコールが含まれている。さらに反芻家畜では、反芻胃内微生物による合成産物(アミノ酸など)にメチル基給源を依存している。そのため、メチル基転移に関連する代謝に反芻家畜特有の特徴があることが予想されるが、その詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メチル基給源の供給量およびメチル基転移代謝活性の変動が、反芻家畜におけるメチル基転移代謝量とそれに関連したアミノ酸およびエネルギー基質の代謝への影響を明らかにすることである。本研究では、メチル基給源としてギ酸とアミノ酸に着目し、以下の点について検討した。

- (1) 哺乳子牛の血漿ギ酸およびメチル基代謝関連アミノ酸濃度に及ぼす影響
- (2) 酒粕給与が血漿ギ酸濃度およびメチオニン代謝に及ぼす影響
- (3) フィトール給与に伴う血漿ギ酸、メチル基代謝関連アミノ酸、脂質代謝への影響

3. 研究の方法

(1) 哺乳子牛の血漿ギ酸およびメチル基代謝関連アミノ酸濃度に及ぼす影響

反芻胃が未熟な出生直後から反芻胃発酵が発達しつつある離乳までの血漿ギ酸濃度の推移を調べることで、血漿ギ酸に対するミルクの給与ならびに反芻胃発酵の影響について検討した。ホルスタイン種初生子牛 10 頭を用いた。生後 10 時間以内に初乳 3 L を給与した。その 24 時間後に、さらに 3L の初乳を給与した。その後、1 日 3 L の移行乳を 5 日間、1 日 2 回に分けて給与した。7 日目以降からは 1 日 6-8L の全乳を給与し、45 日目で離乳した。この間、カーフスターターと乾草は自由採食とした。出生直後(初回初乳給与前)および初回初乳給与 24 時間後ならびに哺育中の 6、13、28 日目、さらに離乳後の 47 日目に頸静脈から採血を行い、血漿中のギ酸およびアミノ酸濃度を測定した。

血漿のギ酸と酢酸濃度は、2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロベンジルブロミド(PFBBBr)を用いて PFBBBr 誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によって測定した。¹³C-ギ酸および²H₄-酢酸を内部標準に用いた。血漿アミノ酸のうち、システインとホモシステインの濃度については、ジチオスレイトールを用いてジスルヒド結合を解離して単量体にしたのち、N-tert-ブチルジメチルシリル-N-メチルトリフルオロアミドによって t-BDMS 誘導体として測定した。血漿には²H₈-ホモシステインおよび²H₄-システインを加え、それらをそれぞれ²H₄-ホモシステインおよび²H₂-システインに変換し内部標準とした。他の血漿アミノ酸濃度については、自動アミノ酸分析計を用いて測定した。

(2) 酒粕給与が血漿ギ酸濃度およびメチオニン代謝に及ぼす影響

酒粕を配合した TMR を発酵処理することで、飼料中のアルコール含量が増加するとともに、可溶性タンパク質が増加することが予想された。そこで酒粕を含む混合飼料(TMR)とそれを発酵処理した発酵 TMR を給与し、飼料からのアルコール摂取および飼料タンパク質分解性が、血漿のギ酸およびアミノ酸に及ぼす影響について検討した。飼料タンパク質の分解性が増加することで、小腸へ移行し吸収されるアミノ酸量が低下し、メチル基給源のアミノ酸量が低下するという仮説のもとで試験を行った。

メンヨウ 4 頭を用い、普通酒粕あるいは液化仕込酒粕を配合した TMR を給与する区、ならびにそれらを発酵処理した発酵 TMR を給与した、都合 4 つの飼料区を設けた。いずれの区も粗タンパク質含量は 17% となるようにし、維持エネルギー量の 1.4 倍に相当する量を給与した。1 期 2 週間とする 4 x 4 ラテン方格法で試験を実施した。各期後半の 7 日間に糞と尿を採取し消化率と窒素出納を測定した。また最終日には給餌前および給餌 2、4 時間後に頸静脈血とルーメン液を採取した。さらに、最終日には¹⁻¹³C メチオニンと [methyl-²H₃] メチオニンを含む生理食塩水を頸静脈から 6 時間、連続定速注入した。注入 5 時間目から 15 分間隔で頸静脈血を採取し、同

位体希釈法によって血漿のメチオニンフラックスおよびメチオニン再合成速度を推定した。

飼料、ルーメン液、および血漿中のアルコール濃度については、ヘッドスペース法を用いて GC-MS によって測定した。血漿中のメチオニン同位体比については、システインおよびホモシステインの濃度測定と同時に、GC-MS を用いて測定した。

(3) フィトール給与に伴う血漿ギ酸、メチル基代謝関連アミノ酸、脂質代謝への影響

飼料中フィトールの一部は反芻胃内でフィタン酸となり吸収され、一部はフィトールのまま吸収されて体内でフィタン酸となる。このフィタン酸の α 酸化によってギ酸が生じる。したがって、フィトール摂取に伴って生じるギ酸を介してメチル基代謝が変化することが予想された。また、フィトールとフィタン酸はペルオキシソーム増殖因子応答性受容体 (PPAR α) に作用する。PPAR α の活性化はセリン合成に関与する遺伝子発現を高めることが報告されている (Sheikh ら, 2007) ことから、PPAR α を介したメチル基代謝への影響も予想された。そこで、フィトールを飼料に添加してヒツジに給与し、血漿のギ酸とアミノ酸濃度、ならびにエネルギー代謝について検討した。

サフォーク種成去勢メンヨウ 4 頭を供試し、維持エネルギー要求量の 1.5 倍相当量の飼料を給与した。1 期 2 週間とする試験期を 3 期設け、1 期と 3 期を対照区とし、2 期目に飼料の 1.2% 量のフィトールを飼料に添加して給与した。各期 2 週目に、消化試験と採血を行い、乾物消化率と血漿中のギ酸およびアミノ酸濃度を測定した。さらにヘッドケージ法による呼吸試験を行い間接熱量測定によって熱産生量を測定した。別途、別のヒツジ 4 頭を用い、2 頭にはフィトール添加飼料を、2 頭には無添加飼料を維持エネルギー量の 1.1 倍相当、9 日間給与し、10 日目にと殺し、肝臓と腰最長筋から組織を採取し、肝臓および筋肉組織中の脂質含量を測定した。

4. 研究成果

(1) 哺乳子牛の血漿ギ酸およびメチル基代謝関連アミノ酸濃度に及ぼす影響

出生直後に比べて、初乳摂取 24 時間後 (2 回目の採血) での血漿ギ酸濃度は大きく増加し、その後出生時レベルまで低下してのち、離乳までほぼ一定の値で推移した (表 1)。このことから、初乳の摂取が、子牛の血漿ギ酸濃度の上昇と関連があることが示唆された。離乳期では血漿ギ酸濃度の上昇がみられなかったのに対して、血漿酢酸濃度はこの時期での飼料摂取量の増加と反芻胃発酵の発達を反映して増加した。このことから、反芻胃の発達に伴い反芻胃内でギ酸が生成したとしても血漿濃度には反映されないことが示唆され、血漿ギ酸は主に外因性の乳中のギ酸あるいは子牛の体内代謝で生じる内因性のギ酸に由来すると考えられた。血漿中のメチル基代謝関連アミノ酸のうち、セリンはギ酸と似た経日変化を示したが、グリシンには初乳摂取に伴う上昇は認められなかった。興味深いことに、成畜では血漿中にはほとんど検出されないサルコシン (N-メチルグリシン) が出生時および初乳摂取後で高い値を示した。このことは、胎児期から存在するチル基や初乳摂取によって上昇する体内のメチル基がサルコシンとして保留されている可能性を示している。一方、メチオニンやシステインに比べて、ホモシステイン濃度は極めて低かった。このことは、メチオニンから生じるホモシステインの代謝回転が速く、ホモシステインからのシステイン生成やメチオニン再合成の速度が高いことを示唆している。こうした血漿中ギ酸およびメチル基代謝関連アミノ酸の出生から離乳までの濃度変化から、初乳摂取が子牛のメチル基代謝に大きく影響することが示唆された。

(2) 酒粕給与が血漿ギ酸濃度およびメチオニン代謝に及ぼす影響

試験に用いた酒粕中のエタノール含量は乾物中で 15% 程度であり、TMR 中では乾物中 1% 程度、発酵 TMR 中では 7% 程度のエタノール含量を示した。発酵 TMR 中には微量であるがメタノールも検出された。しかし、ルーメン液および血漿中のエタノール濃度およびメタノール濃度に飼料区間での違いは認められず、いずれも給餌後に上昇した。血漿ギ酸濃度も飼料区による違いはなかったが (表 1)、血漿メタノール濃度が上昇した後で増加する経時変化を示した。このことは、飼料由来あるいはルーメン発酵で生じるメタノールが血漿ギ酸給源になることを示唆している。血漿アミノ酸では、メチル基代謝と関連のあるグリシン、メチオニン、ホモシステイン、システインの濃度には飼料区間で違いはなかったが、その他の多くのアミノ酸では発酵 TMR 給与によって血漿中濃度が低下した。発酵 TMR 中の可溶性タンパク質区分の割合は TMR に比べて増加していたが、ルーメン液のアンモニア濃度には飼料区間に違いがなく、血漿尿素濃度は発酵 TMR 給与で低下した。これらのことから、発酵 TMR 区では TMR 区に比べてアミノ酸の吸収量が少なく、その結果多くのアミノ酸で血漿濃度が低下したと考えられた。しかし、そのような状態でもメチル基代謝に関連するアミノ酸の濃度には影響が認められなかった。さらに、[1- ^{13}C]メチオニンおよび [methyl- $^2\text{H}_3$]メチオニンをを用いた同位体希釈法によって測定された血漿メチオニン代謝量 (フラックス) はそれぞれ 32 ± 3 および $37 \pm 6 \mu\text{mol/kg/hr}$ 、血漿メチオニンへの再メチル化速度は $4 \pm 3 \mu\text{mol/kg/hr}$ であり、いずれも飼料による影響は認められなかった。このことから、メチオニン回路での再メチル化速度はメチオニン代謝量の 10% 程度であり、エタノール摂取量やアミノ酸供給レベルによる影響を受けにくいことが示唆された。

(3) フィトール給与に伴う血漿ギ酸、メチル基代謝関連アミノ酸、脂質代謝への影響

フィトール給与に伴う消化機能への影響の有無を確認するために、乾物消化率を測定した結果、乾物消化率はフィトール給与によりわずかに低下したものの、その程度は大きなものではなかった(表2)。血漿ギ酸濃度はフィトール給与によって増加した(表1および表3)。またフィトール給与によって、血漿セリンおよびグリシン濃度の2倍近い上昇が認められた(表3)。フィトール給与によって血漿メチオニン濃度も増加したが、ホモシステインおよびシステイン濃度への影響は明確ではなかった。その他のアミノ酸のうち、フィトール給与によってリジンおよびスレオニン、オルニチン、シトルリンなどの血漿濃度が上昇したが、グルタミン酸濃度は低下した。これらのことから、給与したフィトールからフィタン酸が生じ、それに由来するギ酸によってメチル基の供給が増え、セリン、グリシンの増加を経て、メチオニンの増加につながったと考えられた。また、フィトールおよびフィタン酸が PPAR α リガンドとして作用して、セリン合成系を高めた可能性もある。3-ホスホグリセリン酸からのセリン生成に利用されるグルタミン酸の血漿濃度が低下したことからこの点は支持される。これらのことから、フィトールはギ酸生成やセリン合成を高めることでメチル基転移ならびにメチオニンへの再メチル化を高めることが示唆された。

一方、血漿脂質成分では、フィトール給与によってトリグリセリド濃度が上昇し、リン脂質やコレステロール濃度は逆に低下した(表4)。血漿トリグリセリド濃度の上昇は、予想していたフィトールの PPAR α リガンドとしての抗高脂血症効果とは相反するものであった。この現象のメカニズムについて今後の検討が必要であるが、別途行ったと殺試験によっても、肝臓重量と肝脂質重量ならびに筋肉中の脂質含量がフィトール給与区で高くなる傾向が認められた。したがって、フィトールには肝臓での脂質生成を高める作用があることが伺える。こうしたフィトール給与に伴うエネルギー代謝基質濃度の変化から、酸化基質の組成や量が変わることによって全身でのエネルギー消費量が変わることが予想された。しかし、呼吸試験の結果からは、代謝体重あたりの熱産生量には、フィトール給与区と対照区との間で違いはなかった(表2)。これらのことから、フィトールによってメチル基供給が高まりアミノ酸代謝や脂質代謝が変動するが、全身でのエネルギー消費量には影響しないことが示唆された。

(4) まとめ

本研究では、メチル基供給源としてギ酸およびアミノ酸に焦点をあてて、反芻家畜におけるメチル基供給の変動要因を解析した。これまで、反芻家畜の血漿ギ酸濃度に関するデータがほとんどなかったが、本研究において子牛およびヒツジでの値を示すことができた(表1)。本研究を通じて、出生直後の初乳摂取がギ酸やアミノ酸の血漿濃度を高めメチル基代謝を活性化させる可能性、発酵飼料やルーメン発酵由来によるメタノールを介したギ酸の生成、牧草に含まれるフィトールおよびそれに由来するギ酸などが、反芻家畜のメチル基代謝変動要因となりうるということが示唆された。こうした飼料要因とメチル基代謝の全体像がさらに深く理解されることによって、反芻家畜の健全な飼育に貢献すると考えられる。

表1. 子牛およびヒツジの血漿ギ酸濃度 ($\mu\text{mol/L}$)

子牛		ヒツジ	
出生直後	49	酒粕配合 TMR	38
初乳給与後 (1日齢)	108	酒粕配合発酵 TMR	40
哺育期 (28日齢)	66	フィトール非添加	30
離乳後 (47日齢)	65	フィトール添加	39

表 2. フィトールの経口給与が乾物摂取量、消化率および熱産生量に及ぼす影響

項目	1 期	2 期	3 期
	対照区	フィトール給与区	対照区
乾物摂取量 (g/kg ^{0.75} per day)	49.0 ^B	55.7 ^A	55.4 ^A
乾物消化率 (%)	66.5 ^a	63.7 ^b	66.8 ^a
熱産生量 (kcal/kg ^{0.75} per day)	112 ^b	127 ^a	127 ^a

^{a, b} 異符号間に 5%水準で有意差あり. ^{A, B} 異符号間に 1%水準で有意差あり.

表 3. フィトールの経口給与が血漿中ギ酸および関連アミノ酸濃度(μmol/L)に及ぼす影響

項目	1 期	2 期	3 期	標準誤差
	対照区	フィトール給与区	対照区	
ギ酸	27.2 ^B	39.1 ^A	33.3 ^{AB}	1.94
セリン	95.5 ^B	192 ^A	96.5 ^B	15
グリシン	655 ^B	1011 ^A	603 ^B	117.6
メチオニン	29.8 ^B	42.7 ^A	36.4 ^{AB}	4.35
ホモシステイン	16.5 ^A	15.6 ^A	13.6 ^B	1.21
システイン	76.3	83.2	83.3	3.98
グルタミン酸	54.5 ^{ab}	44.1 ^b	65.4 ^a	8.44

^{a, b} 異符号間に 5%水準で有意差あり. ^{A, B} 異符号間に 1%水準で有意差あり.

表 4. フィトールの経口給与が血漿脂質濃度に及ぼす影響

項目	1 期	2 期	3 期	標準誤差
	対照区	フィトール給与区	対照区	
遊離脂肪酸 (μmol/L)	201	115	108	44.1
トリグリセリド (mg/dL)	13.2 ^{ab}	21.0 ^a	11.6 ^b	2.63
総コレステロール (mg/dL)	95.2 ^A	59.4 ^B	96.0 ^A	6.43
リン脂質 (mg/dL)	141 ^A	114 ^B	151 ^A	6.8

^{a, b} 異符号間に 5%水準で有意差あり. ^{A, B} 異符号間に 1%水準で有意差あり.

<引用文献>

- Schalinske, K. L., Nieman, K. M. 2005. Disruption of methyl group metabolism by ethanol. *Nutrition Reviews*, 63:387-391.
- Lamarre, S.G., Morrow, G., Macmillan, L., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T. 2013. Formate: an essential metabolite, a biomarker, or more? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51:571-578.
- Sheikh, K., Camejo, G., Lanne, B., Halvarsson, T., Landergren, M.R., Oakes, N.D., 2007. Beyond lipids, pharmacological PPAR α activation has important effects on amino acid metabolism as studied in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292:1157-1165.

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 Ding, L., Matsumura, M., Obitsu, T., Sugino, T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Phytol supplementation alters plasma concentrations of formate, amino acids, and lipid metabolites in sheep	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal	6. 最初と最後の頁 100174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.animal.2021.100174	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ding, L., Matsumura, M., Obitsu, T., Sugino, T.
2. 発表標題 Phytol alters plasma concentrations of formic acid and amino acids related to one-carbon donors in sheep fed a high-fat diet
3. 学会等名 The 12th Joint Rumen Metabolism and Physiology Symposium（国際学会）
4. 発表年 2019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	杉野 利久 (Sugino Toshihisa) (90363035)	広島大学・統合生命科学研究科（生）・准教授 (15401)	

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