

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688027

研究課題名(和文) 生後脳機能発達期における栄養学の確立

研究課題名(英文) Establishment of nutritional science in the developmental period

研究代表者

友永 省三 (Tomonaga, Shozo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00552324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,300,000円

研究成果の概要(和文)：動物において、ストレスに対する過剰な生理反応を緩和できれば、各種疾患の予防に貢献できる可能性がある。本研究では、過剰なストレス反応の軽減を目的とした発達期における栄養学の確立を目指している。その初期段階として、ニワトリとラットの各発達段階における血漿および組織の低分子代謝物質濃度を網羅的に調べた結果、発達に伴い顕著な変動を示す低分子代謝物質を幾つか見出した。更に、両動物種において、ストレス負荷により血漿中の幾つかの低分子代謝物質濃度が変動することを見出した。加えて、得られた結果から着目した α -アミノ酪酸の投与が、成長および血漿・組織中低分子代謝物質濃度に及ぼす影響も調べた。

研究成果の概要(英文)：In animals, attenuation of excessive physiological stress response could be effective to prevent some diseases. The present study aimed at the establishment of nutritional science in the developmental stage to attenuate the excessive stress response. For the early step, we investigated low-molecular-weight metabolite levels in plasma and tissues in the developmental stage. It was found that some metabolite levels were influenced by the developmental stage in rats and chickens. Furthermore, we confirmed that some stressors affect some metabolite levels of plasma in rats and chickens. In addition, we investigated effects of administration of α -aminobutyrate, whose levels were influenced by the developmental stage, on growth and metabolite levels in plasma and tissues in rats and chickens.

研究分野：発達期栄養学

キーワード：生後発達期 ラット ニワトリ アミノ酸 有機酸 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

日々のストレスは、我々の日常生活の質を左右する。適度だと良い意味での緊張感および充実感をもたらすが、慢性的かつ過度の場合、ストレスに対する過剰な生理反応が、心身を摩耗させる結果、様々な疾病の発症につながりうる。実際、現代社会において、ストレスが関連しうつ病などの精神疾患の罹患率は増加しており、対処法を見出すことは人類の健康増進に重要である。一方、家畜における過度のストレスは、様々な疾病の発症につながりうるだけでなく、畜産物の品質および生産性の低下なども引き起こしうる。このとき、ストレスに対する過剰な反応を緩和できるのなら、これら負の影響の緩和が期待できる。研究代表者は、ストレスに対する過剰な生理反応の緩和のために、ストレス反応制御機構形成期である生後脳機能発達期と、本時期特異的に強発現し重要な生理機能を担う興奮性神経伝達物質の代謝に着目している。

L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸およびN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)等は、興奮性神経伝達物質であり、各受容体に結合して働く。中でも、グルタミン酸受容体のひとつである NMDA 受容体(NMDA-R)は、生後発達期の脳において一過性に強発現し、正常な神経細胞間ネットワーク形成に必須の“刈込み”と呼ばれる役割を担う。それだけでなく、ストレス反応の緩和や、成長ホルモンの放出促進に働く場合が報告されている。以上より、本時期における NMDA-R への刺激は成体期まで大きく影響しうると推測した。他の内因性の NMDA-R 作動物質として、L-アスパラギン酸から合成される D-アスパラギン酸およびL-トリプトファン代謝産物のキノリン酸が挙げられる。一方、本受容体の十分な活性化には、これら物質が結合する部位とは異なるグリシン結合部位への刺激も必須である。L-セリンから合成されるグリシンおよび D-セリンは本結合部位の作動物質である。一方、脳内グルコース代謝におけるリン酸化経路は生後脳機能発達期に活性が高く、本経路からの L-セリン、グリシンおよび D-セリンの合成が高いことが示唆される。したがって、生後脳機能発達期の糖質代謝と NMDA-R の関連が推測される。

以上より、生体内の低分子代謝、特に上記に関連する代謝を介した脳内 NMDA-R の制御は、生後脳機能発達期に多大な影響をおよぼす結果、発達期にとどまらず成体期のストレス反応にも影響を与えうると仮説を立てた。

2. 研究の目的

NMDA-R を制御するアミノ酸代謝関連物質群の高感度定量分析および低分子代謝物質群の網羅的半定量分析(メタボローム解析系)を導入し、生後の脳機能発達に伴う脳、血漿および末梢組織中の各代謝物質群の挙動を明らかにする。また、生後脳機能発達期

におけるストレス負荷が生体内代謝物質群におよぼす影響を調べる。ニワトリならびにラットを用いることで比較生理学的視点を取り入れる。得られた膨大なデータから効果が期待できる栄養処理を推測して生後脳機能発達期に施し、影響を調べる。

3. 研究の方法

本研究助成により導入したガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS、GCMS-QP2010 Ultra、島津製作所)を用いて、メタボローム解析と ezfaast 法によるアミノ酸の定量分析が適用可能なか確認した。更に、得られた膨大なデータから有用な情報を効率的に抽出するための多変量解析ソフトウェア SIMCA(Umetrics)による解析も検討した。

ラットにおける生後脳機能発達期の生体内低分子代謝物質の網羅的解析を行った。

ニワトリにおける成長やストレス感受性が大きく異なる2タイプにおける生後の脳機能発達期における生体内低分子代謝物質の網羅的解析を行った。

生後脳機能発達期におけるストレスが生体内代謝物質に及ぼす影響を調べた。

と 着目した低分子代謝物質の発達期における投与が及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

今回のメタボローム解析法として2種類を比較検討した。一つ目は、島津製作所のデータベースソフトウェアを用いた解析法である。研究期間中に本データベースソフトウェアを毎年更新することができた結果、最終年度には、初年度(約300成分)よりも大幅に増加して約600成分が収録されたデータベース(Smart Metabolites Database、島津製作所)による解析が可能になった。一方で、二つ目の解析法として、前述の解析法とは収録成分数、同定法等が異なる Aloutput ソフトウェアによる解析法を採用した。両解析法には、それぞれ独自の長所が認められたことから、今回の研究では、各実験の目的に応じて使い分けることとした。両メタボローム解析法では、目的で述べたような興奮性神経伝達物質として働くアミノ酸やその代謝物質の多くが同定・半定量解析が可能であった。しかしながら、本解析法では、光学異性体の分離は不可能であることから、D-セリンに関しては、先行研究を参考にして、キラルカラムを用いた GC/MS による定量分析系の導入を目指したが、十分な感度を得ることができなかったことから、今回は分析対象から外した。一方、キノリン酸の定量分析系は、GC/MS を用いた先行研究の解析法を検討した結果、感度等に問題がなく用いることができた。ezfaast 法によるアミノ酸の定量分析では、興奮性神経伝達物質であるいくつかのアミノ酸が短時間で感度よく分析できることを確認した。また、多変量解析ソフトウェア SIMCA を用いて、これら分析結果から有用な

情報を抽出する方法を確認した。以後、これらの分析・解析法を用いた研究を遂行した。

ラットにおいて、生後の発達に伴い、血漿ならびに各組織（脳、筋肉など）におけるトレオニンとその代謝物質である γ -アミノ酪酸の濃度が減少する傾向が強く認められた。一方で、脳内におけるグルタミン酸、アスパラギン酸などの興奮性神経伝達に關与するアミノ酸の含量には生後の発達に伴う影響は認められなかった。影響が認められた γ -アミノ酪酸とトレオニンの關連を考察するために、ラットにおいてトレオニンの単回経口投与による影響を検討した結果、血漿ならびに組織中の γ -アミノ酪酸濃度が増加したことから、トレオニンから γ -アミノ酪酸への代謝と、生後の発達との關連を詳細に研究する意義を見出した。

ニワトリにおいて生後の発達に伴い、タイプに關係なく血漿中 γ -アミノ酪酸濃度は減少した。一方で、様々な低分子代謝物質（アミノ酸、有機酸等）において、タイプによる影響が認められた。中でも、トリプトファン代謝物質であり NMDA-R の作動物質でもあるキノリン酸に影響が認められたことから、両タイプ間で大きく異なるストレス感受性や成長割合の差異と、キノリン酸および NMDA-R との關連を今後詳細に研究する意義を見出した。

複数種類のストレス負荷を試みたところ、ニワトリとラットにおいて、ストレス負荷は血漿中低分子代謝物質に影響を及ぼしうることが明らかとなった。中でも、ラットにおけるマグネシウム欠乏の影響は、カルシウムチャンネルである NMDA-R と低分子代謝の關連を考察する上で、重要な基盤情報を含むと考えられた。今後、ストレスの種類や、動物種による影響について、より詳細に検討する意義を見出した。

との成果に基づき、ニワトリとラットにおいて、生後脳機能発達期における γ -アミノ酪酸の投与がおよぼす影響を調べたところ、今回用いた投与方法・投与量では、成長には影響が認められないことを確認した。更に、メタボローム解析で血漿や各組織における低分子代謝物質に顕著な影響を与えないことも確認した。今後は、この投与量・投与方法を参考にして、ストレス負荷時の影響などを調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計16件)

友永省三・松尾康平・太田能之・白石純一、もみじとチャンキーにおける幼雛期の鶏種差に關連する血漿中低分子代謝物質の探索、日本家禽学会 2015年度春季大会、2015年3月30日

友永省三・松尾康平・太田能之・白石純一、卵用鶏と肉用鶏における血漿中低分子代謝物質の網羅的解析、日本畜産学会 第119回大会、2015年3月29日

友永省三・山本茜・舟場正幸・松井徹、L型カルシウムチャンネル阻害剤がマグネシウム欠乏ラットの血漿中低分子代謝物質濃度に及ぼす影響、第34回日本マグネシウム学会学術集会、2014年11月22日

矢野純司・友永省三、成長期ラットにおけるトレオニン投与がトレオニン代謝に及ぼす影響、日本アミノ酸学会 第8回学術大会、2014年11月9日

山本茜・矢野純司・友永省三・舟場正幸・松井徹、マグネシウム欠乏ラットの血漿中メタボローム解析、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2014年10月25日

友永省三・後藤圭太・伊勢瑛・鈴木司・山本祐司・福岡伸一・佐々木隆造・柴田克己・小林謙一、QPRT ノックアウトマウスの血清メタボローム解析、第36回日本トリプトファン研究会学術集会、2014年10月17日

松尾康平・矢野純司・太田能之・白石純一・友永省三、もみじ種とチャンキー種における初期発育と血漿中遊離アミノ酸濃度の経日変化、日本家禽学会 2014年度秋季大会、2014年9月28日

友永省三・白石純一、畜産学研究におけるメタボローム解析の可能性、Umetrics 日本ユーザー会 2014、2014年8月29日

矢野純司・友永省三、ラットの成長過程における血漿および骨格筋中遊離アミノ酸濃度の変化、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月31日

友永省三・太田能之・白石純一、もみじ種とチャンキー種の鶏種差に關連する血漿中低分子代謝物質の探索、日本家禽学会 2014年度春季大会、2014年3月29日

友永省三・太田能之・白石純一、ニワトリヒナの鶏種と性に關連する血漿中低分子代謝物質の探索、日本畜産学会 第118回大会、2014年3月28日

矢野純司・西浦誠・舟場正幸・松井徹・友永省三、ラットにおける成長が血漿中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響、日本アミノ酸学会 第7回学術大会、2013年11月2日

西浦誠・友永省三・矢野純司・舟場正幸・松井徹、ラットにおいてマグネシウム欠乏が血漿および組織中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響、第33回日本マグネシウム学会学術集会、2013年9月28日

友永省三・金 己鉉・舟場正幸・松井徹、ラットにおけるマグネシウム欠乏が含硫アミノ酸代謝に及ぼす影響、第30回日本微量栄養素学会学術集会、2013年6月8日

友永省三・武本智嗣・舟場正幸・松井徹、マグネシウム欠乏と高脂肪・高スクロース飼料がラットの血漿遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月26日

友永省三・金 己鉉・舟場正幸・松井徹、ラットにおけるマグネシウム欠乏が血漿遊離アミノ酸に及ぼす影響、第32回日本マグネシウム学会学術集会、2012年11月17日

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/tomonagashozo/>

6．研究組織
(1)研究代表者
友永 省三 (TOMONAGA, Shozo)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00552324