

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580296

研究課題名 (和文) 乳腺組織におけるアルギニン代謝動態の網羅的解析

研究課題名 (英文) Dynamic metabolism of arginine and its relating compounds in mammary tissues of dairy cows

研究代表者

小櫃 剛人 (OBITSU TAKETO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：30194632

研究成果の概要 (和文)：

アルギニンの乳牛における栄養的意義を明らかにするために、アルギニンとその関連物質について、乳腺組織における代謝状況を検討した。乳腺組織でのアルギニンの取り込みが急激に増加する泌乳初期に低分解性の飼料タンパク質源を補給すると、アルギニンの乳腺組織への供給量は変わらないが、乳タンパク質への変換効率が高まることが判明した。さらに、乳腺組織へのアルギニン供給には内臓組織での代謝が関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The metabolism of arginine and its relating compounds by mammary tissues were investigated to clear the nutritional role of arginine in dairy cows. After calving, extraction rate of plasma arginine by mammary tissues dramatically increased. Supplementation of low degradable dietary protein increased the conversion ratio of the extracted arginine to milk protein without the elevation of arterial arginine. The extent of splanchnic extraction of absorbed arginine may restrict the arginine supply to the mammary tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：アルギニン、アミノ酸、尿素、乳腺組織、乳タンパク質、乳牛

## 1. 研究開始当初の背景

飼料価格の高騰や牛乳の生産調整など、酪農産業は厳しい状況にあり、牛乳の生産効率や生産物の価値を高めるような飼養管理技術の確立が望まれている。現在では、泌乳牛の栄養生理分野において、反芻胃や小腸内でのタンパク質の消化動態に関する知見が集積してきたことで、小腸内で消化されるタ

ンパク質を効率よく供給できるような飼料給与指針が確立されてきた。しかし、小腸から吸収されたアミノ酸から生産物に至るまでの体内でのアミノ酸の動態に関する知見は少なく、吸収アミノ酸から乳タンパク質への変換効率を高めるような技術は確立されていない。

アルギニンは、乳タンパク質を構成するア

ミノ酸のひとつであるが、乳腺組織では合成されない。そのため、乳タンパク質合成に必要なアルギニンは、小腸からの吸収や他組織での合成に依存している。また、乳腺組織では、乳中にタンパク質として分泌される量よりも多くのアルギニンが血中から取り込まれている。この過剰に取り込まれたアルギニンは、グルタミン酸やプロリンに変換されているとみられている。さらに、アルギニンは、抗菌性や免疫機能と関連する一酸化窒素やポリアミンの前駆体としても利用されている。このように、乳腺組織においては、アルギニンをめぐる多方面の代謝が営まれており、それらが相互に競合している可能性がある。これらのことから、乳腺組織でのアルギニンの供給量、アルギニンから他の物質への変換量およびそれらの相互関係によって、乳タンパク質合成量が制限されていることが想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、①泌乳牛の乳腺組織でのアルギニンと関連物質の代謝量を解析し、それらの相互関係を明らかにするとともに、②タンパク質補給に伴う乳腺組織へのアルギニンの供給量と代謝量との相互関係を明らかにすることで、乳タンパク質合成量の制限要因の一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 試験1：分娩前後での乳腺組織におけるアルギニンおよび関連物質の代謝状況の調査

分娩後の乳量増加時に乳タンパク率が低下しやすいことに着目し、分娩前後でのアルギニン代謝状況と乳タンパク質生産との関連を明らかにすることとした。

経産牛（5頭）を分娩20日前から分娩60日後まで供試した。分娩前は配合飼料の給与量を最大4kg/日とし、サイレージおよび乾草を飽食させた。分娩後は3日で1kgずつ配合飼料を増給していき（最大15kg/日）、サイレージを自由採食させた。分娩20日前から5日間隔で尾動脈と乳房静脈から採血した。また、飼料摂取量と乳生産状況を調査した。統計処理にはSASのGLMプロシジャを用い、各ウシをブロックとして測定日の影響を検定した。

(2) 試験2：タンパク質補給が分娩前後での乳腺組織におけるアルギニンおよび関連物質の代謝に及ぼす影響

小腸からのアミノ酸供給量を増加させるために、反芻胃内分解性の低いタンパク質源である加熱大豆粕を補給した際での、乳腺組

織でのアミノ酸、尿素、エネルギー基質などの代謝状況を調べた。

経産牛（7頭）を分娩20日前から30日まで供試した。2群に分け、一方を対照区とし、もう一方の群には加熱大豆粕を分娩前では0.5kg/日、分娩後では1kg/日補給した。分娩30日後でのエネルギーと粗タンパク質の摂取量が日本飼養標準での要求量を満たすように分娩後の配合飼料給与量を増加させ、サイレージを自由採食させた。分娩20日前から5日ごとに尾動脈および乳房静脈から採血し、乳腺組織でのアミノ酸や代謝物の動静脈差を求めた。さらに、乳タンパク質としてのアミノ酸分泌量を測定し、乳腺組織での取り込み量と乳タンパク質への変換効率を推定した。乳腺組織での血流量はフェニルアラニンとチロシンの動静脈差と乳分泌量を指標として推定した。飼料摂取量および乳生産成績についても調査した。統計処理にはSASのMIXEDプロシジャを用い、処理区を固定効果、ウシ個体と測定日を変量効果として、処理区と測定日の影響を検定した。

(3) 試験3：内臓組織でのアルギニン代謝量

試験2で、タンパク質を補給しても乳腺組織へのアルギニン供給量が増加しなかったことから、内臓組織でのアルギニンの代謝程度が、乳腺組織へのアルギニン供給量に影響すると考えられた。そこで、子牛をモデル動物として用い、アルギニンの内臓組織での代謝程度を検討した。

離乳後も第二胃溝反射を維持した10週齢の子牛4頭を用いた。子牛には日増体量0.7kg相当量の配合飼料と乾草からなる混合飼料を給与した。 $[^{15}\text{N}_2]$ アルギニンを頸静脈内へ6時間連続注入した場合と、第二胃溝反射を利用して経口的に頻回給与した場合での、循環血漿へのアルギニンの出現速度を測定した。両者の差分から内臓組織での初回通過代謝量（小腸管腔から吸収されたアルギニンが小腸組織および肝臓で代謝される量）を推定した。

## 4. 研究成果

(1) 分娩前後での乳腺組織におけるアルギニンおよび関連物質の代謝状況（試験1）

供試牛の乾物摂取量は、分娩15日前で11kg/日、分娩15日から30日後で17kg/日程度であったが、60日後に23kg/日ほどに増加した。分娩15、30および60日後での乳生産量は37、40および40kg/日であったが、乳タンパク率は2.67、2.56、3.06%で、15日から30日後まで低値で推移した。TDNおよび粗タンパク質摂取量の充足率（推定値）は分娩15日後と30日後ではそれぞれ70%程度であったが、60日後では90%程度であった。

こうした分娩後での飼料摂取・乳生産状況

において、乳腺組織に供給される動脈血中のアミノ酸濃度、乳腺組織での動静脈差と取り込み率を測定した（表1）。取り込み率は動静脈差を動脈濃度で割って計算される数値で、動脈血として供給されたアミノ酸が乳腺組織に取り込まれる程度を示す。この数値が大きいほど、活発に取り込まれるアミノ酸であり、乳腺組織での需要に対して供給量が逼迫しているアミノ酸とみられている。必須アミノ酸のうち、イソロイシン、スレオニンおよびトリプトファンは動脈濃度は分娩30日後に増加したが、アルギニンを含むそれ以外の必須アミノ酸では有意な増加はみられなかった。乳腺組織での動静脈差はほとんどの必須アミノ酸で分娩後に増加した。乳腺組織の取り込み率ではアルギニン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、スレオニンで分娩直後から急激に増加した。このことから、アルギニンは分娩直後から乳腺組織での需要が高く、乳腺組織にとって重要なアミノ酸であるが、分娩後の動脈中濃度の増加が緩やかであることがわかった。

表1. 分娩前後での乳腺組織における必須アミノ酸の動脈血漿中濃度と取り込み率の推移

	分娩20日前	15日後	30日後	60日後	SEM
動脈血漿中濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )					
Arg	43.7	41.5	72.6	60.7	7.49
His	47.0	36.3	46.5	46.6	6.74
Ile	91.9	111.5	145.3*	116.2	9.95
Leu	108.9	112.2	148.9	138.4	13.30
Lys	56.4	59.4	83.8	77.9	6.40
Met	21.6	20.2	26.5	26.2	2.00
Phe	41.4	37.4	49.3	44.2	4.33
Thr	44.9	49.7	89.4*	103.0*	8.41
Trp	34.7	54.9	87.2*	64.9	8.26
Val	161.5	174.0	239.6	209.1	18.05
取り込み率 (%)					
Arg	7.1	73.9*	77.0*	65.5*	6.12
His	13.3	18.5	35.1	28.3	5.41
Ile	7.3	28.8	38.5*	39.0*	5.82
Leu	6.9	44.8*	54.3*	47.3*	5.16
Lys	8.6	66.7*	68.7*	60.0*	5.12
Met	5.6	60.7*	71.5*	46.6*	8.48
Phe	2.9	50.7*	58.6*	50.9*	5.41
Thr	4.4	42.1*	42.3*	28.8	6.49
Trp	6.8	18.2	25.3	11.5	13.29
Val	1.6	18.5	29.8*	27.7*	4.95

SEM: 標準誤差. \* 分娩前に比べて有意差あり (P<0.05)

アルギニンの代謝に関連のあるオルニチンとプロリンの動静脈差と取り込み率も分娩後増加したが、シトルリンの動静脈差と取り込み率は低く推移し、分娩後の増加もみられなかった。尿素の動静脈差は分娩後5から20日の間、負の値となり、乳腺組織から血中に放出されることが認められた。これらのことは、分娩後の乳腺組織での乳タンパク質生産の増加によって、各種の可欠アミノ酸に変換されるオルニチンの乳腺組織での需要が増加し、アルギニンから生じるオルニチンが

それを補っていることが推察される。したがって、泌乳初期の乳腺組織でアルギニンは可欠アミノ酸給源として重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(2) タンパク質補給が分娩前後での乳腺組織におけるアルギニンおよび関連物質の代謝に及ぼす影響 (試験2)

試験1において、アルギニンなどのいくつかのアミノ酸で分娩後に動脈中濃度が有意に増加しなかったことから、アルギニンを含む必須アミノ酸の乳腺組織への供給量が、乳タンパク質合成の制限要因となっていることが考えられた。そこで、小腸でのアミノ酸の消化吸収量を増加させるために、反芻胃内分解性の低いタンパク質源である加熱大豆粕を補給して、乳腺でのアミノ酸やエネルギー基質の代謝状況を調べた。

供試牛の乾物摂取量は、分娩後15および30日で、対照区15および21 kg/日であったのに対し、添加区で18および23 kg/日と多い傾向にあった。15および30日後での脂肪補正乳量は、対照区で30および33 kg/日だったが、添加区で38および40 kg/日となり、添加区で多かった。乳タンパク率は対照区2.98および2.99%に対し、添加区で3.37および3.14%と高い傾向にあった。TDN充足率は両区とも70-80%程度であったが、粗タンパク質充足率は対照区82-100%であったのに対し、添加区で95-110%となった。

動脈血漿濃度は、ヒスチジンとトリプトファン以外の多くの必須アミノ酸で分娩後の増加はみられず、加熱大豆粕を添加しても増加しなかった。アルギニンを含む多くの必須アミノ酸で動静脈差は分娩後に増加したが、加熱大豆粕添加による影響はなかった (表2)。取り込み率では、アルギニン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニンで分娩後に増加した。対照区に比べ、添加区ではロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、バリンで取り込み率が高い傾向にあった。

アルギニンの代謝に関連のある、オルニチン、プロリン、シトルリン、グルタミンの動脈濃度や動静脈差には加熱大豆粕添加の影響はなかったが (表2)、プロリンの取り込み率が添加区で高い傾向にあった。

乳腺組織の血流量は分娩20-30日後に添加区で有意ではないが高値を示した。乳腺組織での取り込み量では、有意ではないものの必須アミノ酸の総和が添加区で多い傾向にあった。

乳腺組織に取り込まれたアミノ酸の乳タンパク質への変換効率では、アルギニンは他のアミノ酸に比べて低値(30-50%)を示した。添加区では、プロリンの取り込み率の高かった20-30日後で、アルギニンの変換効率が

対照区に比べて有意ではないが高値を示したことから（表2）、添加区では乳腺組織でプロリンの生成に使われるアルギニンが節約された可能性が考えられた。

添加区では飼料摂取量の多かったことを反映して、20-30日後での遊離脂肪酸、ケトン体、トリグリセリド、グルコースなどのエネルギー基質の、乳腺組織での動静脈差や取り込み量が多かった（表2）。こうしたエネルギー基質の取り込み量の増加が、乳腺組織でのアルギニンの乳タンパク質への変換効率を高めた可能性がある。

尿素およびクレアチニンの乳腺組織の動静脈差は両区とも負の値を示した（表2）。このことから、エネルギー基質の取り込み量の多少にかかわらず、乳腺組織で取り込まれたアルギニンの一部は、タンパク質合成以外の代謝経路に不可避免的に利用されることが示唆された。ただし、尿素動静脈差の値がアルギニン動静脈差よりもかなり大きいことから、正味に放出された尿素のすべてが、乳腺組織に取り込まれたアルギニンのみ由来したとは考えにくい。この尿素の由来についてはさらに検討を要すると思われた。

表2. 加熱大豆粕の添加が乳腺組織でのアルギニン関連物質とエネルギー基質の動静脈差およびアルギニンの乳タンパク質への変換効率に及ぼす影響

項目	分娩後の日数		SEM
	5-15日	20-30日	
動静脈差, $\mu\text{mol/L}$			
アルギニン			
対照区	21.8	36.0	3.66
添加区	20.9	27.5	
オルニチン			
対照区	15.3	24.4	4.95
添加区	14.0	24.9	
プロリン			
対照区	56.1	75.4	13.89
添加区	62.6	79.5	
尿素			
対照区	-21	-185	230.0
添加区	-421	-307	
遊離脂肪酸			
対照区	94.4	-0.5	28.0
添加区	69.6	63.0	
ケトン体			
対照区	211	279	43.1
添加区	188	347	
グルコース			
対照区	776	911	113.6
添加区	511	1004	
アルギニンの乳タンパク質への変換効率, %			
対照区	44.6	31.4	5.94
添加区	47.0	50.6	

負の値は乳腺組織から正味に放出されたことを意味する。

(3) 内臓組織でのアルギニン代謝量（試験3）  
試験2において、タンパク質源を補給して

も、アルギニンの動脈血漿濃度や乳腺組織への取り込み量は増加しなかった。小腸組織や肝臓にはアルギナーゼが存在することから、小腸へのアルギニンの移行量が増加しても、初回の吸収過程で一部のアルギニンは代謝されてしまい、乳腺組織へ到達する正味のアルギニン量は変化しないことが考えられる。そこで、乳牛と同様にタンパク質要求量の高い子牛をモデル動物として用い、アルギニンの初回通過代謝量を測定した。

供試した10週齢の子牛の増体量は0.7 kg/日、可消化窒素摂取量は0.5 g/kg体重/日であった。小腸管腔から吸収されたアルギニンの血漿への出現量は267  $\mu\text{mol/kg/時}$ となった。これに対し、同位体の頸静脈内注入により得られた、吸収を介さないアルギニンの血漿への出現量は152  $\mu\text{mol/kg/時}$ であった。両者の差は、吸収されたアルギニンが小腸や肝臓で代謝される量を表し、その値は114  $\mu\text{mol/kg/時}$ で、吸収による出現量の43%に相当した。このことから、小腸管腔から吸収されるアルギニンのかなりの部分が小腸組織や肝臓で代謝されてしまうことが示唆された。乳牛でも同程度の初回通過代謝が行われているとすると、乳腺組織での必要量の約2倍量のアルギニンを小腸内へ供給することが必要であると考えられた。

#### (4) まとめ

分娩後の泌乳開始に伴い、アルギニンの血液から乳腺組織への取り込み率が急激に上昇することが確認された（試験1、2）。しかし、乳腺組織へのアルギニン供給量の分娩後の上昇は緩やかであること（試験1）、乳腺組織内でのアルギニンの乳タンパク質への変換効率は低いこと（試験2）が明らかとなった。飼料タンパク質の補給をしても、アルギニンの乳腺組織への供給量は必ずしも増加しない（試験2、3）。しかし、タンパク質の補給によって同時にエネルギー摂取量が高まると、乳腺組織におけるエネルギー基質の取り込みが上昇し、プロリンなどへのアルギニンの乳腺組織内での代謝が節約され、アルギニンからの乳タンパク質への変換効率が高まる可能性がある（試験2）。消化管からアルギニンを補給してもかなりの部分が内臓組織で代謝される（試験3）ことから、アルギニンの前駆体であるシトルリンを補給することも、動脈血中のアルギニン濃度を高めるのに有効であると考えられる。

以上のように、本研究では、アルギニンに関連するアミノ酸や尿素およびエネルギー基質の乳腺組織への供給量、取り込み量、乳タンパク質への変換量について、分娩前後における動態を検討することによって、アルギニンの乳タンパク質生産における意義の一端を解明できた。本研究の成果は、乳腺組織

へ供給する栄養素を制御するような栄養管理技術を開発する上で、基礎的な知見を提供するであろう。

#### 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3件)

1. Obitsu T, Sugino T, Taniguchi K (他3名、1番目). Effects of high ambient temperature on urea-nitrogen recycling in lactating dairy cows. Animal Science Journal. 査読有. 82. 2011. 印刷中
2. 藤田智数・小櫃剛人・杉野利久・谷口幸三. 周産期乳牛における乳腺組織での血漿アミノ酸の動静脈差の推移. 広島大学大学院生物圏科学研究科瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター報告, 査読無, 7. 19-29. 2010.
3. Obitsu T, Taniguchi K. Quantitative Comparison of diversity and conformity in nitrogen recycling of ruminants. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 査読有. 22. 440-447. 2009.

[学会発表] (計4件)

1. Obitsu T, Sugino T (他3名、1番目). Change of plasma arginine flux around weaning period in young calves. 3<sup>rd</sup>International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. 6-11 Sep. 2010. Parma. Italy.
2. 藤田智数・小櫃剛人・杉野利久・谷口幸三. 周産期乳牛における乳腺組織での血漿アミノ酸の動静脈差の推移. 関西畜産学会. 2010. 9. 14. 京都.
3. 小櫃剛人・杉野利久 (他3名、1番目). シトルリンの経口給与が子牛の血漿アミノ酸およびホルモン濃度に及ぼす影響. 関西畜産学会. 2010. 9. 14. 京都.
4. 小櫃剛人・杉野利久 (他3名、1番目). 子牛へのシトルリン給与が血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響. 日本畜産学会. 2010. 3. 28. 東京.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shiyou/index.shtml>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小櫃 剛人 (OBITSU TAKETO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・  
准教授

研究者番号：30194632

##### (2) 研究分担者

杉野 利久 (SUGINO TOSHIHISA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科  
助教

研究者番号：90363035

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：