

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05891

研究課題名（和文）メタボローム解析を用いた黒毛和種牛の代謝と枝肉形質の関連解析

研究課題名（英文）Analysis of the relationship between metabolism and carcass traits of Japanese Black cattle by metabolomics

研究代表者

友永 省三（Tomonaga, Shozo）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00552324

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血漿メタボローム解析を用いた黒毛和種の代謝と枝肉形質の関連解析を目的として以下の検討を行った。肥育期における血漿メタボローム解析で用いる分析系において、従来法よりも優れた分析系を確立した。その中には、アミノ酸代謝、脂肪酸代謝、有機酸代謝およびビタミン代謝の把握に有用なものが含まれる。次に、本分析系を用いて肥育期代謝と枝肉形質の関連解析を行ったところ、幾つかの代謝経路の関連が推測されたが、当初期待していたキヌレニンとの関連は認められなかった。ただし、肥育中期におけるビタミンA制限との関連においては、キヌレニンが示唆されたことから更なる研究の必要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、黒毛和種における代謝研究において有用な分析法を提案することができた。具体的には、アミノ酸、有機酸およびビタミンといった、黒毛和種の枝肉成績に大きく関与する重要な栄養素代謝の関連研究の発展に貢献することが期待される。本分析法は、原著論文として公開しており他の研究者も用いるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted with the aim of analyzing the relationship between the metabolism of Japanese black cattle and carcass traits using plasma metabolome analysis. We have established new analytical method superior to conventional method for plasma metabolome analysis. This method will be useful for understanding amino acid metabolism, organic acid metabolism, and vitamin metabolism. Next, we used this method to analyze the relationship between metabolism during fattening and carcass traits, and found that there was a relationship between several metabolic pathways, but the relationship with kynurenine was not confirmed. However, kynurenine was suggested to be involved in the association with vitamin A restriction during the mid-fattening stage, suggesting the need for further research.

研究分野：栄養生理学

キーワード：黒毛和種 メタボロミクス 枝肉成績 アミノ酸 有機酸 ビタミン

1. 研究開始当初の背景

牛肉の価格は、脂肪交雑に大きく左右される。この脂肪交雑は、遺伝形質、肥育期間および給与飼料の影響を受けるが、給与飼料の中ではビタミン A の影響が大きい。ビタミン A 制限による脂肪交雑向上技術は、生産現場の経験を基盤として開発されたものであり、典型的なビタミン A 欠乏症状を生じることなく脂肪交雑を向上させることが可能である。したがって、前臨床的なビタミン A 欠乏によって、脂肪交雑が向上すると言える。黒毛和種牛の脂肪前駆細胞においてビタミン A が脂肪細胞への分化を抑制することから、ビタミン A 制限が脂肪細胞への分化促進を介して脂肪交雑に貢献することが推測されている。

黒毛和種牛の飼養管理では、脂肪交雑形成期の肥育中期にビタミン A 制限を行っている。申請者らは、本時期の代謝と出荷時の脂肪交雑との関わりを解析するために、血漿中の低分子代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)から代謝と出荷時の脂肪交雑基準(BMS)との関連を調べた。その結果、アミノ酸であるトリプトファン、リジンおよびヒドロキシリジンの代謝下流にあるグルタル酸が BMS と正の関連を示した(第 70 回関西畜産学会口頭発表)。更に、キヌレニン(グルタル酸代謝上流にあるトリプトファン代謝物)も BMS と正の関連を示した(未発表)。キヌレニンは、芳香族炭化水素受容体(AhR)の内因性リガンドである。他の AhR リガンドは脂肪細胞への分化抑制に働くことから、同様に働く可能性がある。また、キヌレニンは、飼養管理で問題となるストレスにより増加するホルモンである糖質コルチコイドや、炎症により増加する炎症性サイトカインにより、合成酵素活性が高まる。以上より、キヌレニンは更なる研究を行う価値があると考えた。

以上に基づき、血漿メタボローム解析による黒毛和種の肥育期代謝と出荷時の枝肉形質の更なる関連解析の意義を見出した。具体的には、黒毛和種においてビタミン A 制限に着目した全肥育期間の血漿メタボローム解析から、脂肪交雑を含む枝肉成績や成長指標との関連解明の基盤を得ることが重要であると考えた。また、キヌレニンにおいて、上記背景に基づいた培養細胞を用いた解析や代謝の流れを評価可能なフラックス解析も行う価値があることから、研究の進捗次第では行う予定とした。

2. 研究の目的

血漿メタボローム解析による黒毛和種の肥育期代謝と出荷時の枝肉形質の関連解析を目的とした。黒毛和種においてビタミン A 制限の程度が異なる 2 群を設け、全肥育期間の血漿メタボローム解析から、脂肪交雑を含む枝肉成績や成長指標との関連を解析した。

3. 研究の方法

黒毛和種肥育牛の血漿中アミノ酸およびその代謝物におけるガスクロマトグラフ質量分析計を用いた新規定量分析系を数種類検討した。これは、当初の計画で用いる予定であった半定量分析系では求める精度が得られなかったことが予備検討の結果明らかになり、新たに有用な分析系を確立する必要性が生じたためである。

黒毛和種においてビタミン A 制限の程度が異なる 2 群を設け、肥育期の血漿を採取した。具体的な採取時期は、肥育前期(12ヶ月齢)、肥育中期(18ヶ月齢、22ヶ月齢)、肥育後期(28ヶ月齢)である。これら血漿におけるアミノ酸代謝に及ぼす影響を上記の定量分析系などを用いて評価した。枝肉成績との関連およびビタミン A 制限の影響を解析した。

4. 研究成果

当初の予定通り、黒毛和種肥育牛のビタミン A 制限の程度が異なる 2 群の各肥育時期における血漿および出荷時の枝肉成績を入手することができた。この血漿を用いて当初予定していた分析系によるメタボローム解析を試みたが、注目するキヌレニンを含むアミノ酸代謝について求める精度が得られず、より良い分析系の必要性が生じたため、そのための新規分析系を確立した。具体的には、ガスクロマトグラフ質量分析計によるアンターゲット分析で広く用いられている誘導体化法(トリメチルシリル化)では幾つかのアミノ酸の分析精度に問題があり、特に注目しているキヌレニンの分析精度が安定しなかった。そこで、アミノ酸およびその代謝物のターゲット分析に特化した誘導体化法(*tert*-ブチルジメチルシリル化)による定量分析系を確立して前述の分析系と比較したところ、確立した分析系はキヌレニンなどにおいて求める精度を有することが確認され、他のアミノ酸およびその代謝物でもより優れた分析精度を有することが確認できた。これは新規分析系であったことから原著論文として報告した。本分析系を以後の解析に用いることができたことは想定外の成果であった。たとえば、キヌレニンだけでなく、分枝アミノ酸とその代謝物で生理活性物質として知られているケト酸(黒毛和種血漿では良い定量分析系が報告されていない)も定量可能となった。更に、この *tert*-ブチルジメチルシリル化を用いて夾雑成分の除去に有用な固相抽出も自動で行うことができる「固相誘導体化法」の検討を行った結果、葉酸もしくはビタミン B₁₂ の不足指標としてもちいることができる血漿における総ホモシステインおよびメチルマロン酸や、TCA 回路にある有機酸の定量分析系も確立することができ

た。これら一部前処理の自動化法により、今後の関連研究においてより多検体の分析を高精度に行う目途をつけることができた。更に、別の誘導体化法を用いて黒毛和種血中の短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸およびブチ酸）の定量分析系も確立し、ルーメン内の短鎖脂肪酸濃度との関連があることも確認した。血中の短鎖脂肪酸は微量であり、その分析は黒毛和種だけでなく他の動物種でもしばしば困難であるとされている。一方で、様々に重要な生理機能に關与する可能性があることから重要視されているが、黒毛和種においてはその研究は黎明期にある。したがって、本分析系は有用であると考えた。以上より、当初予定していたアミノ酸代謝だけでなく、他の栄養素が關わる代謝経路にも着目した研究の遂行が可能となった。

黒毛和種肥育牛の血漿および出荷時の枝肉成績を用いた検討を行った。具体的には、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたアンターゲット分析およびワイドターゲット分析（前述の我々が確立した複数種類）から、枝肉成績と関連する低分子代謝物質を探索した。その結果、幾つかの低分子代謝物質と枝肉成績（BMS など）との関連を見出すことができた。ただし、当初注目していたキヌレニンについては、肥育中期では関連が認められなかったことから以前とは異なる結果となった。したがって、当初予定していたその延長にあるキヌレニンの培養細胞を用いた解析などは行わないこととした。

ビタミン A 制限に着目した解析では、高ビタミン A 群に比して、低ビタミン A 群はトリプトファン代謝物で炎症に關連しうるキヌレニン濃度の高値が認められた。低ビタミン A 群において分枝アミノ酸のバリンおよびその代謝物である α -ケトイソ吉草酸の濃度は低値を示したが、他の分枝アミノ酸であるロイシンおよびイソロイシンと、各代謝物の α -ケトイソカプロン酸および α -ケト- β -メチル吉草酸の濃度に差異は認められなかった。以上より、肥育中期における血漿中ビタミン A 濃度は、トリプトファンおよびバリンの代謝に影響を及ぼす場合があることが示唆された。

以上より、一部当初の背景に基づいた研究の遂行とはならなかったものの、黒毛和種の血漿における代謝物の新規定量分析系を複数確立し、それらを用いた評価を行うことができた。今回、確立した分析系群は、黒毛和種の研究において大きなインパクトを与えうると考えている。一部を論文として公表済みであるが、他も速やかに論文として公開し、関連する研究者が用いるきっかけとなることを目指す。

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 0件）

1. 著者名 Do Hanwool, Yoshida Emi, Masaki Tatsunori, Oosaki Shigeru, Sakase Mitsuhiro, Iwamoto Eiji, Tomonaga Shozo	4. 巻 95
2. 論文標題 Gas chromatography-mass spectrometry-based quantitative method using tert-butyl dimethylsilyl derivatization for plasma levels of free amino acids and related metabolites in Japanese Black cattle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都ハンウル、吉田恵実、正木達規、岩本英治、友永省三
2. 発表標題 黒毛和種の血漿およびルーメン液における揮発性脂肪酸新規分析系の確立および評価
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 都ハンウル、友永省三
2. 発表標題 黒毛和種肥育牛血漿中遊離アミノ酸およびその代謝産物における分析系の検討
3. 学会等名 日本微量栄養素学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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