

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14963

研究課題名（和文）高血糖動物であるニワトリにおいてジカルボニル化合物が果たす役割の解明

研究課題名（英文）Physiological roles of dicarbonyl compounds in chickens as a hyperglycemic animal

研究代表者

牧野 良輔 (Makino, Ryosuke)

愛媛大学・農学研究科・講師

研究者番号：80772821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ニワトリにおけるジカルボニル化合物の生体内濃度と生理機能を明らかにすることを目的とした。その成果として、週齢毎のニワトリ生体内ジカルボニル化合物濃度を定量することに成功した。また、ジカルボニル化合物がニワトリの血糖値および耐糖能に影響を与える可能性を見出した。加えて、酸化ストレスに関する反応性は、哺乳類の報告と異なることを明らかにした。今後は、ジカルボニル化合物とニワトリの生産性の関係を詳細に検討することが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、家畜の生産性を向上させるには育種改良や飼養条件の改善を試みていたが、これらは既に相当の成果が得られているため、現在これらの手法で劇的に飼料効率を改善することは難しいと思われる。本研究では、ニワトリが高血糖動物であるがゆえに生体内で多量に蓄積されているであろうジカルボニル化合物に着目した。生体内濃度を把握することと、ジカルボニル化合物の生理機能の一端を明らかにすることで、家禽の生産性向上に対する新しい方策を見出すことを目指した。本研究はその端緒を開き、ニワトリにおけるジカルボニル化合物の研究に必要な基礎的知見を提供する。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to investigate the levels of dicarbonyl compounds in the plasma and organs of chickens and their physiological functions. As a result, quantifying the concentration of dicarbonyl compounds in chickens at each weekly age was succeeded. This study also found that dicarbonyl compounds would affect blood glucose levels and glucose tolerance in chickens. In addition, the result showed that the influence of dicarbonyl compounds on oxidative stress might differ between chickens and mammals. Further studies are needed about the relationship between dicarbonyl compounds and poultry production.

研究分野：家畜飼養学

キーワード：ジカルボニル化合物 ニワトリ グリオキサール メチルグリオキサール 3-デオキシグルコソン 糖
化反応 耐糖能 酸化ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内のグルコースはタンパク質やアミノ酸と非酵素的に結合する(糖化反応)。グルコースと結合したタンパク質はシッフ塩基、続いてアマドリ化合物を形成する。その後、様々な終末糖化産物(Advanced Glycation End-products; AGEs)を形成する。AGEs形成の過程で、シッフ塩基やアマドリ化合物の分解から、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)および3-デオキシグルコソン(3-DG)などのジカルボニル化合物が生成される。その他にも、ジカルボニル化合物は解糖系、ポリオール経路等でも産生する。ジカルボニル化合物はグルコースよりも約20,000倍高い反応性を有しており、グルコースと同等かそれ以上にAGEs形成の前駆体として重要である(Ann. N. Y. Acad. Sci. 1043: 111-117. 2005)。

哺乳類において、AGEsがインスリン抵抗性や酸化ストレスを引き起こすことが報告されていたが、その影響の一部はジカルボニル化合物が直接的にもたらしている可能性が示されつつあった。インスリン抵抗性および酸化ストレスはニワトリ骨格筋重量の低下に関与する。ニワトリの血糖値はヒトの正常な血糖値よりも2~3倍(約200~300 mg/dL)高いため、ヒトよりもジカルボニル化合物が生体内で多量に生成されていると考えられる。すなわち、高血糖という特徴がニワトリの生産性を低下させている可能性が考えられた。しかしニワトリにおいて、ジカルボニル化合物に関する知見はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究はニワトリにおけるジカルボニル化合物の基礎的知見となる生体内濃度を明らかにするとともに、ジカルボニル化合物がニワトリの生理機能に与える影響を見出すことを目的とした。具体的には、以下3点について検討した。

- (1) ニワトリ生体内に存在するジカルボニル化合物の測定
- (2) ジカルボニル化合物がニワトリの耐糖能に与える影響
- (3) ジカルボニル化合物がニワトリ骨格筋細胞の酸化ストレスに与える影響

3. 研究の方法

- (1) ニワトリ生体内に存在するジカルボニル化合物の測定

供試動物には0日齢の白色レグホンを用い、市販飼料(粗タンパク質23%、代謝エネルギー3,050 kcal/kg)および水を自由摂取させて6週間飼育した。各週6羽のニワトリをランダムに選び、麻酔下で血液、心臓、肺、腺胃、筋胃、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、浅胸筋および皮膚を採取した。各臓器は速やかに液体窒素で凍結させた。また、血液の遠心分離によって血漿を得た。各試料は分析まで-80℃で凍結保存した。

各臓器はビーズ破碎装置によりホモジネートを得た。血漿と臓器ホモジネートに、内部標準物質を含む有機溶媒を加えることで除タンパク質をおこなった。除タンパク質後の試料に誘導体化試薬を加え、60℃で3時間インキュベートした。インキュベート後の試料をフィルター濾過したのちに、分析用のスクリーバイアルへ移した。

調製した試料中のジカルボニル化合物濃度を液体クロマトグラフ三連四重極型タンデム質量分析計(LC-MS/MS)で定量した。移動相は超純水とメタノールを用い、C18の逆相カラムで誘導体化したジカルボニル化合物を分離した。各測定化合物は質量分析計のMRM(multiple reaction monitoring)モードで設定した質量電荷比(m/z)に従い同定した。

- (2) ジカルボニル化合物がニワトリの耐糖能に与える影響

供試動物には11~12日齢の白色レグホンを用いた。自由飲水下で14時間絶食させた後に、GOまたはMGOを腹腔内投与した。対照のニワトリにはダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)を投与した。腹腔内投与2時間後にグルコースが2 g/kg体重となるようにグルコース水溶液を経口投与した。経口投与の直前、30、60および120分後に左右の翼下静脈から採血を行い、血漿を得た。その後、市販のキットを用い血糖値を測定した。

- (3) ジカルボニル化合物がニワトリ骨格筋細胞の酸化ストレスに与える影響

孵卵17日目の白色レグホン胚から、浅胸筋を採取し細胞を調製した。細胞をCollagen Iコートの96 wellプレートに播種し、37℃、5%CO₂条件下で、Medium 199にウシ胎児血清(FBS)を10%となるように添加したM199+10%FBS培養液で3日間培養した。M199+10%FBS培養液で培養した細胞を対照とし、培養液にジカルボニル化合物を1、10および100 μMとなるように添加して、再度24時間培養した。市販の活性酸素種(ROS)の蛍光プローブによってROS発生量を評価した。細胞数による補正のために、Hoechst33342を用いて蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

- (1) ニワトリ生体内に存在するジカルボニル化合物の測定

誘導体化処理を行なったニワトリ血漿および各臓器中のジカルボニル化合物濃度を測定した

(Figure 1)。血漿中において、GO および 3-DG の濃度は週齢の違いによる影響を受けなかった。一方で MGO 濃度は 0 週齢時が最も高濃度を示し、それと比較して 4~5 週齢時が有意に低かった。ジカルボニル化合物の前駆体であるグルコースの血漿中濃度も測定したところ、1 週齢時が最も高く、それと比較して 5~6 週齢時が有意に低かった。ジカルボニル化合物濃度とグルコース濃度の比を計算したところ、GO/Glc および 3-DG/Glc 比はどちらも週齢の影響を受けないが、MGO/Glc 比は 0 週齢時が最も高く、それと比較して 3~5 週齢時が有意に低かった。前駆体である Glc の血漿中濃度とジカルボニル化合物の濃度の変化に関連が見られないことから、ジカルボニル化合物の濃度を調節するメカニズムが生体内に存在すると考えられる。

続いて、各臓器におけるジカルボニル化合物の濃度を測定した (Figures 2~4)。まず GO に関して、臓器の違いと週齢の違いの間に交互作用が認められた。組織重量当たりの GO 濃度は、0 週齢時において脾臓、肺および腎臓が他の臓器と比較して有意に高かった。1 週齢時では、肺および腎臓が他の組織と比較して有意に高かった。次に濃度の高い脾臓と比較すると、筋胃、脾臓、心臓および腺胃との間に有意差はなかったが、皮膚、肝臓および浅胸筋が有意に低かった。2 週齢時では肺および腎臓が他の組織と比較して有意に高く、次に濃度の高い脾臓は脾臓、腺胃、肝臓、皮膚および浅胸筋と比較して高かった。3 週齢時では肺が最も高く、腎臓は肺よりもやや低い傾向にあった。脾臓は筋胃と比較して有意差はなく、肺、腎臓および筋胃以外の組織と比べて有意に高かった。4 週齢時では、肺、腎臓および脾臓が他の組織と比較して有意に高かった。5 週齢時では腎臓での濃度が最も高く、肺と比べて有意差が認められなかったが、他の組織と比較して有意に高かった。また、肺および脾臓は腎臓以外の組織と比較して有意に高かった。6 週齢時では腎臓および肺は他の組織と比較して有意に高かった。次に濃度が高い組織である脾臓は脾臓、心臓、腺胃、肝臓、皮膚および浅胸筋と比べて有意に高かった。同一組織の週齢間を比較すると、組織重量当たりの GO 濃度に有意な変化が認められたのは脾臓および腎臓であった。脾臓は 0 週齢時が 1 から 6 週齢時よりも有意に濃度が高かった。腎臓では 5 週齢時が最も高く、0 から 2 および 4 週齢時が 5 週齢時と比較して有意に低かった。

MGO でも臓器の違いと週齢の違いの間に交互作用が認められた。組織重量当たりの MGO 濃度は、0 週齢時に有意差が認められなかった。1、3 および 5 週齢時において肺が他の組織と比較して濃度が有意に高かった。4 週齢時において肺は心臓と筋胃を除いた組織と比較して有意に高かった。6 週齢時において肺が脾臓、皮膚、肝臓および浅胸筋と比較して有意に高かった。同一組織の週齢間を比較すると、組織重量当たりの MGO 濃度に有意な変化が認められたのは肺であった。肺は 3 週齢時が最も濃度が高く、0、2、4 および 6 週齢時と比較して有意に高かった。さらに、5 週齢時が 0 週齢時と比較して有意に高かった。

3-DG においても臓器の違いと週齢の違いの間に交互作用が認められた。同一週齢の組織間を比較すると、組織重量当たりの 3-DG 濃度は全ての週齢時において、腎臓が他の組織と比較して有意に高かった。同一組織の週齢間を比較すると、腎臓に影響が認められた。4 週齢時が最も高く、6 週齢時を除いて他の週齢よりも有意に濃度が高かった。また、0 週齢時がいずれの週齢よりも有意に低かった。

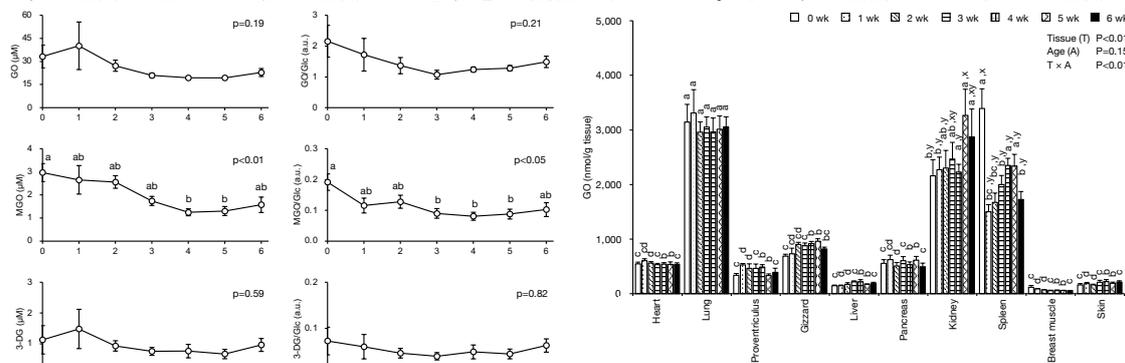


Figure 2. Glyoxal levels in the peripheral tissues of 0- to 6-week-old chickens. Bars represent as means \pm SE, n=5-6. * Means with different superscripts in each tissue of the same week-old are significantly different at P<0.05. ** Means with different superscripts in each week-old of the same tissue are significantly different at P<0.05. GO, glyoxal

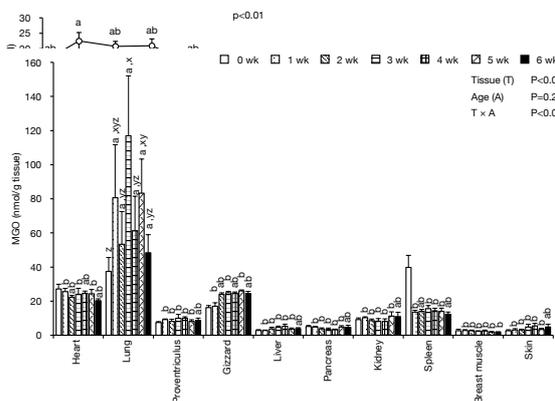


Figure 3. Methylglyoxal levels in the peripheral tissues of 0- to 6-week-old chickens. Bars represent as means \pm SE, n=5-6. * Means with different superscripts in each tissue of the same week-old are significantly different at P<0.05. ** Means with different superscripts in each week-old of the same tissue are significantly different at P<0.05. MGO, methylglyoxal.

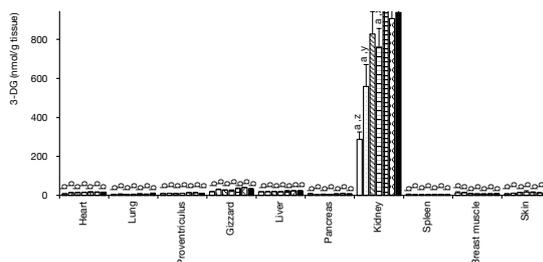


Figure 4. 3-Deoxyglucosone levels in the peripheral tissues of 0- to 6-week-old chickens. Bars represent as means \pm SE, n=5-6. * Means with different superscripts in each tissue of the same week-old are significantly different at P<0.05. ** Means with different superscripts in each week-old of the same tissue are significantly different at P<0.05. 3-DG, 3-deoxyglucosone.

りも有意に低く、次に1週齢時の濃度が低かった。6週齢時は0、1および3週齢時よりも濃度が有意に高かった。

(2) ジカルボニル化合物がニワトリの耐糖能に与える影響

ニワトリの耐糖能にジカルボニル化合物が影響を与えるか検討するため、ジカルボニル化合物を腹腔内投与した白色レグホンをを用いて経口糖負荷試験を行なった。GOの投与2時間後の時点で、DPBSを投与したニワトリと比べて血糖値が有意に上昇した。さらにグルコースを経口投与してから2時間後の時点においても、GOを投与されたニワトリの血漿中グルコース濃度はDPBS投与よりも高かった。一方で、GOを投与されたニワトリはグルコースを経口投与しても血漿中グルコース濃度の上昇は認められず、高い血糖値を維持した。このことから、GOはニワトリ消化管からのグルコース吸収および生体内における血糖コントロールの両方において生理的機能を持つ可能性が示された。

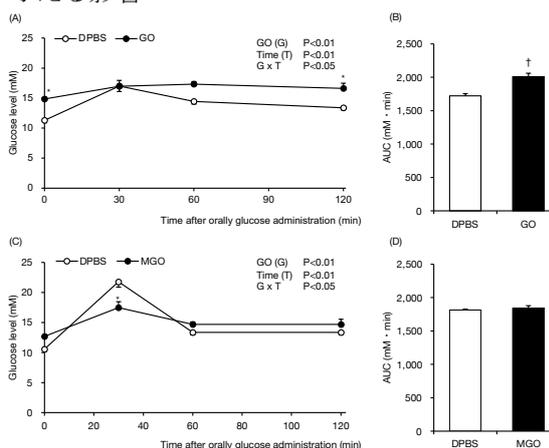


Figure 5. Glucose tolerance test in the layer chickens intraperitoneally administered dicarbonyl compounds. Plasma glucose level in the chickens administered glyoxal are shown individual time points (A) and AUC (B). Plasma glucose level in the chickens administered methylglyoxal are shown individual time points (C) and AUC (D). Data represent means \pm SE. n=6. * P<0.05 compared with the value of chickens administered DPBS at the same time. † P<0.05 compared with the value of AUC of chickens administered DPBS.

一方、MGO投与のニワトリにおいては、グルコースの経口投与30分後の血中グルコース濃度がDPBSを投与されたニワトリと比較して有意に低かった。その後、血糖値はグルコースの経口投与前まで低下した。哺乳類の研究においては、MGOがインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能を低下させることが知られている (Mol. Biosyst., 13: 2338-2349, 2017)。しかしながら本研究の結果は、MGOは消化管からのグルコース取り込みに影響を与えるが、耐糖能には影響を与えないという可能性を示した。

(3) ジカルボニル化合物がニワトリ骨格筋細胞の酸化ストレスに与える影響

ニワトリ骨格筋に対するジカルボニル化合物の生理機能を調べるために、ジカルボニル化合物が酸化ストレスに与える影響をROSの発生量を指標として評価した。GOを100 μ Mとなるように添加した培地において細胞内ROS産生量が有意に低下した (Figure 6)。MGOがラット心筋細胞内ROSを増加させることが報告されているが、本研究ではMGOによる影響は認められなかった。

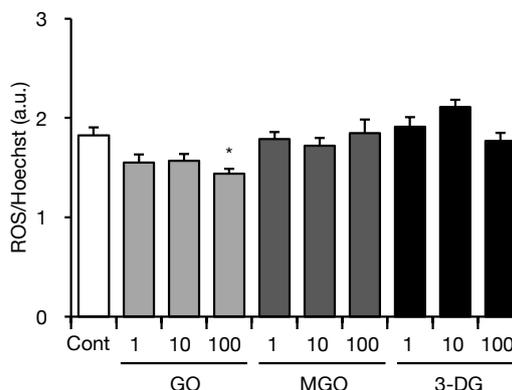


Figure 6. ROS levels in the skeletal muscle cells incubated in the medium supplemented dicarbonyl compounds. Bars represent as means \pm SE. n=8. * P<0.05 compared with the value of Cont.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 牧野良輔
2. 発表標題 糖化反応中間体がニワトリの骨格筋に与える影響
3. 学会等名 第24回日本畜産学会若手企画シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖野芽衣子、橘哲也、牧野良輔
2. 発表標題 ジカルボニル化合物がニワトリ筋芽細胞の細胞生存能に与える影響
3. 学会等名 第72回関西畜産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Makino, Maaya Uda, Tetsuya Tachibana
2. 発表標題 Influence of dietary metformin on muscle weight and glycation in two types of chickens
3. 学会等名 26th World 's Poultry Congress（国際学会）
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
---------	---------