

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658215

研究課題名（和文） ニワトリにおける非酵素的糖化合物の代謝機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of metabolic mechanism of non-enzymatic glycation compounds in chickens

研究代表者

喜多 一美 (KITA KAZUMI)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20221913

研究成果の概要（和文）：

第一に、PHP-TH $\beta$ C とウシ胎児血清がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響を調べたところ、培養液中のウシ胎児血清濃度が 10%の時に、PHP-TH $\beta$ C 濃度が 4  $\mu$ M 以上になるとタンパク質合成が有意に上昇した。

第二に、PHP-TH $\beta$ C の栄養学的価値を調べたところ、PHP-TH $\beta$ C はトリプトファンの代わりとしてタンパク質合成の前駆体として利用されないことが示された。

第三に、通常状態における血漿中のグルコース - トリプトファンアマドリ化合物濃度は約 1.5  $\mu$ M、PHP-TH $\beta$ C 濃度は約 3.0  $\mu$ M であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Firstly, the interactive effect of PHP-TH $\beta$ C on protein synthesis of chicken embryo myoblasts was examined. When fetal calf serum in the medium was 10%, protein synthesis was significantly increased by elevating PHP-TH $\beta$ C concentration more than 4  $\mu$ M.

Secondly, the investigation to study the nutritional value for PHP-TH $\beta$ C revealed that PHP-TH $\beta$ C could not be a precursor for protein synthesis instead of tryptophan.

Thirdly, under normal condition, the concentrations of PHP-TH $\beta$ C and glucose-tryptophan Amadori product were approximately 1.5 $\mu$ M and 3.0  $\mu$ M, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ニワトリ、筋芽細胞、タンパク質合成、グルコース、トリプトファン、アマドリ化合物、 $\beta$ -カルボリン

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて、早朝空腹時血糖値が 126 mg/dl 以上または随時血糖値が 200 mg/dl を越える場合には糖尿病が疑われる。糖尿病を発症すると、最終的には網膜症、腎症、神経障害などの合併症を誘発する。糖尿病合併症は、高血糖状態の持続に伴うグルコース代謝産

物であるソルビトールの蓄積およびタンパク質の非酵素的糖化反応により生成される終末糖化物質 (AGE: Advanced glycation end product) が原因となっている。ニワトリの血糖値はヒトの約 3 倍あり、常に高血糖の状態にある。しかし、ニワトリでは高血糖にも関わらず糖尿病合併症の発症事例は報告されていない。そこで、ニワトリを高血糖モデル

動物として用い、非酵素的糖化反応化合物の生理的機能を調査することにより、将来的には生体内非酵素的糖化反応の抑制を通じた糖尿病合併症の予防につながるのではないかと期待された。

## 2. 研究の目的

非酵素的糖化反応化合物の生理的機能を調査するためには、標品となる非酵素的糖化反応化合物の合成と単離精製が不可欠である。我々は、必須アミノ酸の一種であるトリプトファンとグルコースが非酵素的に結合し、続くピクテースペングラー反応によって生成される PHP-TH $\beta$ C ((1R, 3S)-1-(D-gluco-1,2,3,4,5-pentahydroxypentyl)-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid) の合成および単離精製に成功した。

そこで、高血糖状態における非酵素的糖化反応の抑制を最終的な目標とし、ニワトリを高血糖モデル動物として用い、生体内における非酵素的糖化アミノ酸化合物 (PHP-TH $\beta$ C およびグルコース-トリプトファン-アマドリ化合物) の生理機能について調査することを本課題の目的とした。

具体的な小課題は以下のとおりである。

(1) グルコース-トリプトファン化合物がニワトリ胚から採取した各種細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

(2) PHP-TH $\beta$ C およびウシ胎児血清がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

(3) トリプトファン欠乏培養液への PHP-TH $\beta$ C 添加がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

(4) 生体内における糖化トリプトファン化合物の定量

## 3. 研究の方法

(1) グルコース-トリプトファン化合物がニワトリ胚から採取した各種細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

本研究では、グルコースとトリプトファンから生成されたメイラード反応生成物 (グルコース-トリプトファン-アマドリ化合物 および PHP-TH $\beta$ C, Figure 1) を培養液に加え、ニワトリ胚から採取した細胞のタンパク質合成に及ぼす影響を調べた。

孵卵 20 日目のニワトリ胚から浅胸筋、肝臓、腎臓、脾臓を取り出し、トリプシン処理によって得た細胞を 10% ウシ胎児血清入り

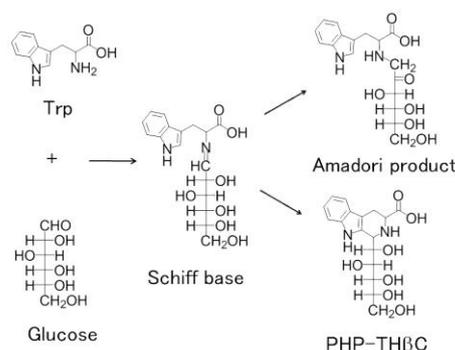


Figure 1. Scheme of glycation of tryptophan.

Medium 199 の中で一晩培養した。その後、グルコース-トリプトファン化合物を添加した培養液と置換した。タンパク質合成を測定するために培養液にトレーサー ( $^3\text{H}$ -フェニルアラニン) を添加した。一晩培養した後に、細胞内のタンパク質に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、タンパク質合成の指標とした。グルコース-トリプトファン化合物は、トリプトファンを 2M グルコース溶液に溶解し、37°C で約 18 月間保温した後に、イオン交換樹脂を用いてトリプトファンと共に回収した。また、グルコース-トリプトファン化合物には過剰のトリプトファンが残存しているため、トリプトファン過剰の影響も調べた。

(2) PHP-TH $\beta$ C およびウシ胎児血清がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

本研究では、グルコースとトリプトファンから生成された PHP-TH $\beta$ C を培養液に加え、ニワトリ胚から採取した細胞のタンパク質合成に及ぼす影響を調べた。同時に、PHP-TH $\beta$ C と培養液に添加するウシ胎児血清との相互作用についても検討した。

孵卵 17 日目のニワトリ胚から浅胸筋を取り出し、トリプシン処理によって得た細胞を、ウシ胎児血清を 10% 添加した Medium 199 の中で一晩培養した。その後、PHP-TH $\beta$ C を添加した培養液と置換した。培養液は、ウシ胎児血清を 0%、1% および 10% 添加した Medium 199 を用いた。タンパク質合成を測定するために培養液にトレーサー ( $^3\text{H}$ -フェニルアラニン) を添加した。一晩培養した後に、細胞内のタンパク質に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、タンパク質合成の指標とした。

タンパク質分解は、筋芽細胞をトレーサー ( $^3\text{H}$ -フェニルアラニン) 添加培養液中で一晩培養した後に、トレーサー無添加培養液で一晩培養し、細胞から培養液に放出された放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、タンパク質分解の指標とした。

(3) トリプトファン欠乏培養液への PHP-TH $\beta$ C 添加がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

本研究では、トリプトファンの非酵素的糖化反応生成物である PHP-TH $\beta$ C の栄養学的価値を調べるために、PHP-TH $\beta$ C をトリプトファン欠乏培養液に添加して、ニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響を調べた。

実験 1 では、孵卵 19 日目のニワトリ胚から浅胸筋を取り出し、トリプシン処理によって筋芽細胞を得た。その後、トリプトファン欠乏培養液を対照区とし、処理区には添加物（トリプトファンまたは PHP-TH $\beta$ C）を段階的に培養液へ添加した。また培養液の IGF-I 濃度は 0 および 20 ng/ml の 2 レベルとした。タンパク質合成を測定するために培養液にトレーサー ( $^3$ H-フェニルアラニン) を添加した。一晚培養した後に、細胞内タンパク質画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し、タンパク質合成の指標とした。

実験 2 では、実験 1 と同様にニワトリ胚から筋芽細胞を得た後、トレーサーを加えた培養液で一晩培養した。その後、実験 1 の培養液と同様のトレーサー無添加培養液を調製し、一晚培養した。細胞から培養液に放出された放射能を実験 1 と同様に測定し、タンパク質分解の指標とした。

(4) 生体内における糖化トリプトファン化合物の定量

本研究では、生体内で生成された PHP-TH $\beta$ C とグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度を定量するために、10 日齢の単冠白色レグホン雄にトリプトファン過剰レベル 0% 飼料（対照区）、トリプトファン過剰レベル 2% 飼料およびトリプトファン過剰レベル 3% を 2 週間自由摂取させた。試験終了時に血液を採取し、血漿を分離した。血漿中の PHP-TH $\beta$ C とグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度を高速液体クロマトグラフィー質量分析計で測定した。

4. 研究成果

(1) グルコーストリプトファン化合物がニワトリ胚から採取した各種細胞のタンパク質合成に及ぼす影響

本研究においてトリプトファン過剰の影響は認められなかった。

各細胞のグルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) に対する感受性には差があり、脾臓細胞では低濃度のグルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) でタンパク

質合成が低下した (Figure 2)。

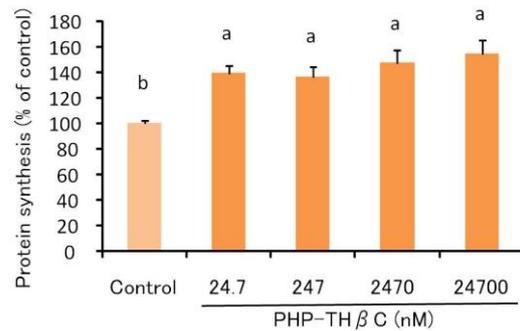


Figure 2. Influence of PHP-TH  $\beta$  C on protein synthesis of spleen cells.

しかし、筋芽細胞では高濃度の場合のみタンパク質合成が低下した (Figure 3)。

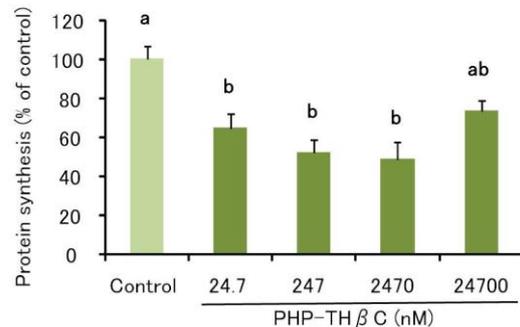


Figure 3. Influence of PHP-TH  $\beta$  C on protein synthesis of myoblasts.

また腎臓細胞にはグルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) は影響を及ぼさなかった (Figure 4)。

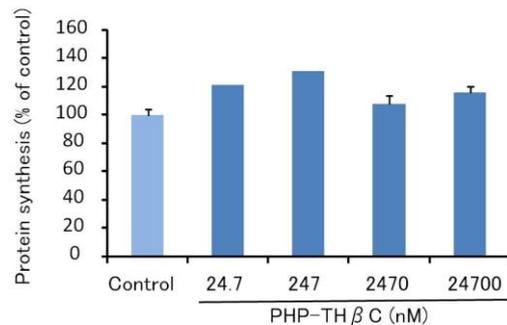


Figure 4. Influence of PHP-TH  $\beta$  C on protein synthesis of kidney cells.

さらに、低濃度のグルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) は肝臓細胞のタンパク質合成を促進したが、高濃度のグルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) はタンパク質合成を低下させた (Figure 5)。

以上の結果より、グルコーストリプトファン化合物 (PHP-TH $\beta$ C) はニワトリ胚から

採取した一部の細胞のタンパク質合成を低下させることが明らかとなった。

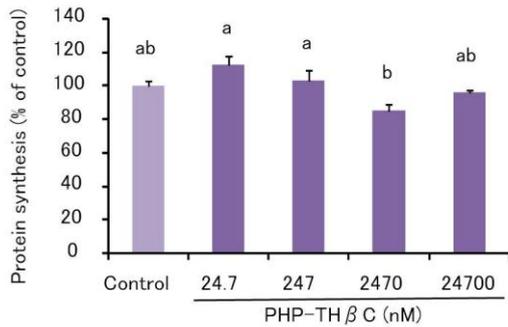


Figure 5. Influence of PHP-THβC on protein synthesis of hepatocytes.

(2) PHP-THβC およびウシ胎児血清がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

PHP-THβC およびウシ胎児血清がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響において交互作用が認められた。培養液中のウシ胎児血清濃度が 0% および 1% の時には、培養液中の PHP-THβC 濃度が 0 μM から 32 μM まで変化してもニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に影響を及ぼさなかった。しかし、培養液中のウシ胎児血清濃度が 10% の時には、培養液中の PHP-THβC 濃度が 4 μM 以上になるとニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成が有意に上昇した。さらに PHP-THβC によるニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成の上昇は、PHP-THβC 濃度が 32 μM まで持続した (Figure 6)。

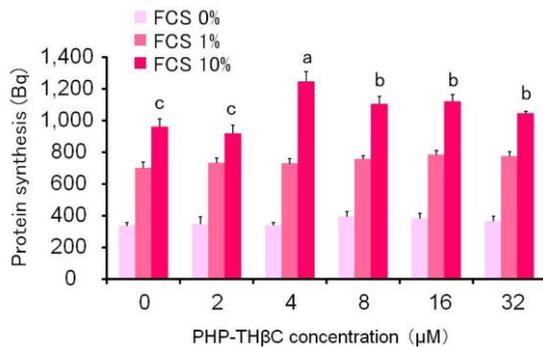


Figure 6. Interactive effect of PHP-THβC and fetal calf serum (FCS) on protein synthesis of myoblasts.

(3) トリプトファン欠乏培養液への PHP-THβC 添加がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響

実験 1 において、トリプトファン欠乏培養液へのトリプトファン添加は、ニワトリ胚筋

芽細胞のタンパク質合成を IGF-I 添加区において対照区の 146%、IGF-I 無添加区では対照区の 136% まで促進した。

一方、トリプトファン欠乏培養液への PHP-THβC 添加によるニワトリ胚筋芽細胞に対するタンパク質合成促進効果は、IGF-I 添加時では対照区の 126%、無添加区では対照区の 107% にとどまった (Figure 7)。

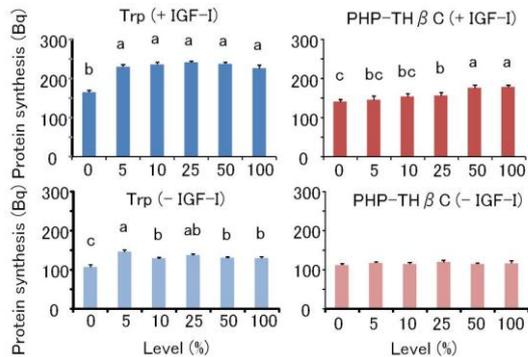


Figure 7. Interactive effect of PHP-THβC and insulin-like growth factor-1 (IGF-I) on protein synthesis of myoblasts.

実験 2 において、トリプトファン欠乏培養液へトリプトファンを添加した際、IGF-I 添加は対照区と比べてタンパク質分解を 88% まで抑制した。また、トリプトファン欠乏培養液へトリプトファンを添加した際、IGF-I 無添加区には、PHP-THβC の添加がタンパク質分解を 114% まで促進した。

以上の結果から、PHP-THβC は、トリプトファンの代わりとしてタンパク質合成の前駆体となりえないこと、さらにタンパク質分解を促進する可能性が示唆された (Figure 8)。

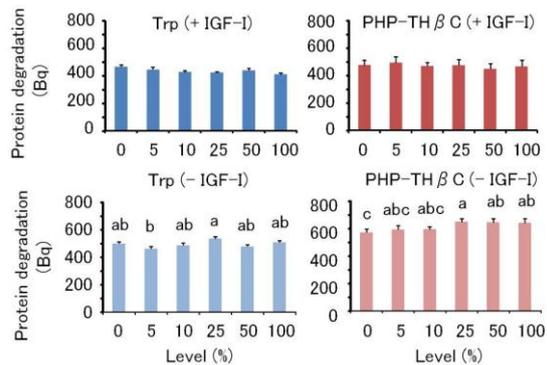


Figure 8. Interactive effect of PHP-THβC and insulin-like growth factor-1 (IGF-I) on protein degradation of myoblasts.

(4) 生体内における糖化トリプトファン化合物の定量

ニワトリに通常飼料およびトリプトファン過剰飼料を自由摂取させ、血漿中のトリプトファン濃度、グルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度および PHP-THβC 濃度を測定したところ、血漿中トリプトファンは

飼料トリプトファン含量を過剰にすると上昇する傾向 ( $P=0.513$ ) を示した。また、血漿中のグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度およびPHP-TH $\beta$ C濃度の定量に成功し、飼料タンパク質含量の増加は血漿中のグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度およびPHP-TH $\beta$ C濃度に影響を及ぼさなかった (Figure 9)。

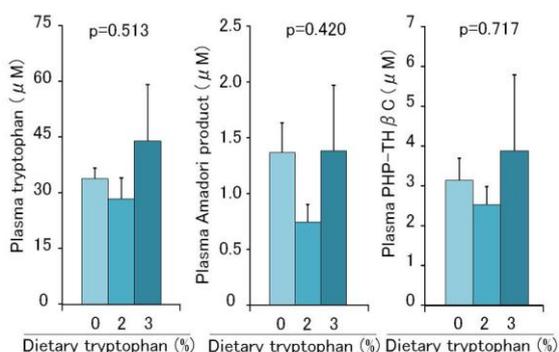


Figure 9. Influence of excess dietary tryptophan intake on plasma concentration of tryptophan, Amadori product and PHP-TH $\beta$ C.

本実験では、トリプトファン過剰飼料を2週間自由摂取させた。この間にニワトリがトリプトファン過剰飼料に順応し、血漿中のトリプトファン濃度が通常値に近づき、そのため血漿中のグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度およびPHP-TH $\beta$ C濃度に影響を及ぼさなかったものと考えられた。

さらに、血漿中のトリプトファン濃度とグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度またはPHP-TH $\beta$ C濃度の間に有意な正の相関が認められた (Figure 10)。また、通常状態における血漿中のグルコーストリプトファンアマドリ化合物濃度は約 1.5  $\mu$ M、PHP-TH $\beta$ C濃度は約 3.0  $\mu$ M であることが明らかとなった。

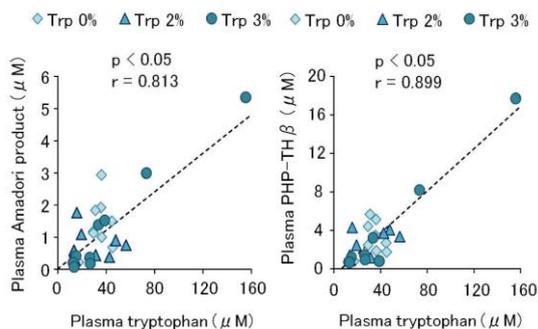


Figure 10. Relation of either plasma Amadori product or PHP-TH $\beta$ C concentration to plasma tryptophan concentration in chickens.

## 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2件)

- ① Kita, K., Kawashima, Y., Makino, R., Namao, T., Ogawa, S., Muraoka, H. and Fujimura, S. Detection of two types of glycated tryptophan compounds in the plasma of chickens fed tryptophan excess diets. *Journal of Poultry Science*. 50: 138-142. 2013. (査読あり)
- ② Nishimagi, R. and Kita, K., Influence of  $\beta$ -carboline produced from glucose and tryptophan on protein synthesis of chicken embryo myoblasts. *Journal of Poultry Science*. 49: 299-301. 2012. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① 牧野良輔・喜多一美、日本家禽学会第2013年度春季大会(2013年)、トリプトファン欠乏培養液へのPHP-TH $\beta$ C添加がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成および分解に及ぼす影響、安田女子大学、広島県、2013年3月29日。
- ② 西間木良輔・喜多一美、第35回日本分子生物学会(2012年)、トリプトファンの糖化反応によって生成された $\beta$ -カルボリンがニワトリ胚から採取した筋芽細胞のタンパク質代謝に及ぼす影響、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県、2012年12月11-14日。
- ③ 西間木良輔・喜多一美、日本家禽学会第2012年度春季大会(2012年)、トリプトファン過剰飼料を給与したニワトリにおける血中トリプトファン濃度と糖化トリプトファン化合物濃度の関係、名古屋大学、愛知県、2012年3月30日。
- ④ 西間木良輔・喜多一美、日本家禽学会第2011年度秋季大会(2011年)、バリンおよびバリン誘導体とIGF-Iがニワトリ胚から採取した細胞の蛋白質合成に及ぼす影響、北里大学、青森県、2011年8月24-25日。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

喜多一美 (KITA KAZUMI)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：20221913