

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882051

研究課題名(和文) 疲労動物モデルにおける尿素回路の代謝変化と、オルニチン投与による抗疲労効果検証

研究課題名(英文) Metabolic alterations of urea cycle and anti-fatigue effect of ornithine administration in fatigued animals

研究代表者

久米 慧嗣 (Kume, Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号：30708441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラット血漿を対象に網羅的代謝物解析を実施したところ、疲労負荷ラットでは、分岐鎖アミノ酸代謝、尿素回路やプロリン代謝が特徴的に変動していた。さらに、肝臓や筋肉におけるATPレベルも有意に減少しており、組織レベルでエネルギー産生の低下が引き起こされていることがわかった。尿素回路の代謝物であるオルニチンが、尿素回路の代謝やエネルギー代謝の動きを促進するかを生化学的に検証したところ、オルニチン投与によるエネルギー代謝への影響は限定的であった一方、他の代謝経路へオルニチンが流入する知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：By conducting a plasma metabolomic analysis of a rat model of fatigue, the fatigued rats showed distinctive changes in metabolites related to branched-chain amino acid metabolism, urea cycle, and proline metabolism. Further, the levels of ATP were significantly decreased in the liver and skeletal muscle of the fatigued rats, indicative of a deterioration in energy metabolism in these organs. We biochemically examined an influence of ornithine, one of metabolites in urea cycle, forward the urea cycle and energy metabolism. The ornithine administration has limited effectiveness on energy metabolism and urea cycle while a flow of ornithine to other pathways was observed.

研究分野：疲労の生化学

キーワード：疲労科学 疲労・慢性疲労 代謝解析 バイオインフォマティクス 予防医学 酵素遺伝子発現解析
尿素回路 代謝性炎症

1. 研究開始当初の背景

慢性疲労症候群 (Chronic Fatigue Syndrome: CFS) は、原因不明の強い全身疲労倦怠感などが長期間に渡り継続する病態である。われわれは、疲労行動を呈する疲労負荷動物を対象にした代謝物解析、および数理モデル解析を進めることにより、エネルギー代謝異常には尿素回路の代謝変化が深く関わるのが分かりつつある。そこで、疲労病態においてオルニチンを中心とする尿素回路がエネルギー代謝全体をコントロールしているのではないかと仮説を立て、オルニチンの摂取が尿素回路の働きを促進させ、疲労病態の改善や予防に資する効果を発揮するのではないかと予想した。

2. 研究の目的

本研究では、水浸疲労負荷を与えた疲労負荷動物の肝臓や血漿中に含まれる代謝物を網羅的に解析すること (メタボローム) によって、疲労時における代謝病態の全体像を把握することを目指した。また、オルニチンを中心とする尿素回路の代謝変化がエネルギー代謝全体 (特に、解糖系、クエン酸回路) へ与える影響を実験的に証明することを目指した。

3. 研究の方法

疲労負荷動物は、8週齢のオスSD系ラットを水深2.2 cmの水を張った飼育ケージで3~5日間飼育することにより作製し(引用) 疲労負荷後、ラットの肝臓や血液などを採取した。また、対照群として、疲労負荷を与えていないコントロール群を設定した。疲労負荷の程度は、ATP産生量やクエン酸回路の代謝物量を生化学的に測定することにより評価した。尿素回路内の代謝物であるオルニチン、シトルリン、アルギニン、および総窒素酸化物などを定量し、本病態における尿素回路の代謝変化を調べた。また、疲労負荷ラットの肝臓において、尿素回路やグルタミン代謝に関わる酵素やトランスポータなどの遺伝子発現を半定量的PCR法により

調べた。さらに、オルニチンを毎日1回経口投与した疲労負荷ラットの肝臓や血液などを採取し、エネルギー代謝、および尿素回路の代謝物濃度を測定した。

4. 研究成果

ラット血漿を対象に網羅的代謝物解析を実施したところ、疲労負荷群の血漿代謝物プロファイルは、コントロール群における代謝プロファイルと全く異なることが分かった。疲労負荷ラットでは、分岐鎖アミノ酸代謝、尿素回路やプロリン代謝が特徴的に変動しており、特に、バリン、ロイシン、イソロイシン、オキソペンタン酸が有意に増加すること、ハイドロキシプロリンの有意な減少、シトルリン-アルギニンバランスの変化や総一酸化窒素量の増加などを見出した。さらに、クエン酸回路の代謝物である *cis*-アコニット酸、およびイソクエン酸が疲労負荷群で減少することに加え、肝臓や筋肉におけるATPレベルも有意に減少しており、組織レベルでエネルギー産生の低下が引き起こされていることがわかった(引用)。

また、尿素回路やグルタミン代謝に関わる酵素やトランスポータの遺伝子発現などを通じて、疲労負荷を与えたラットの肝臓では、尿素回路やグルタミン酸代謝を介してTCA回路内のコハク酸に流入することでエネルギー代謝を回復させようとする疲労特有の代謝経路(疲労代謝経路)の存在が予測された。われわれは、同経路の酵素阻害実験や肝組織の免疫染色を行い、疲労時における疲労代謝経路の活性化を確認した。

尿素回路の代謝物であるオルニチンが、尿素回路の代謝やエネルギー代謝の働きを促進するかを生化学的に検証した。その結果、オルニチン投与によるエネルギー代謝への影響は限定的であった一方、他の代謝経路へオルニチンが流入する知見が得られた。現在、オルニチンが解糖系やクエン酸回路を含むエネルギー代謝に与える影響を確定させるために、¹³C-グルコース

をトレーサーとする代謝フラックス実験にも取り組み、エネルギー代謝への影響を調査中である。

< 引用文献 >

Tanaka, M. *et al.*, *Neurosci Lett*, 11; 352(3): 159-62., 2003.

Kume, S. *et al.*, *PLoS ONE*, 10(3): e0120106, 2015.

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)

Kume, S., Yamato, M., Tamura, Y., Jin, G., Nakano, M., Miyashige, Y., Eguchi, A., Ogata, Y., Goda, N., Iwai, K., Yamano, E., Watanabe, Y., Soga, T., Kataoka, Y. Potential Biomarkers of Fatigue Identified by Plasma Metabolome Analysis in Rats, *PLoS ONE*, 査読有り, 10(3): e0120106, 2015

久米慧嗣, 山野恵美, 片岡洋祐, メタボローム解析による疲労病態研究と慢性疲労症候群診断バイオマーカーの開発, *医学のあゆみ*, 査読無し, 249 巻 4 号, p.299-303, 2014 年

[学会発表](計 10 件)

久米慧嗣, 大和正典, 中野真行, 江口麻美, 田村泰久, 山野恵美, 渡辺恭良, 曾我朋義, 片岡洋祐 水浸疲労負荷モデル動物の肝臓における疲労代謝回路の活性化と組織炎症 第10回日本疲労学会, 2015年5月15-16日, 山口県総合保健会館(山口県・山口市)

Yamato, M., Kume, S., Miyashige, Y., Nakano, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Kataoka, Y. Neuroinflammation is possibly involved in prolonged suppression of rat spontaneous

activity induced by monofluoroacetate, an inhibitor for TCA cycle, SOCIETY for NEUROSCIENCE, November 15-19, 2014, Washington (DC, U.S.A.)

大和正典, 久米慧嗣, 金光華, 宮繁志治, 中野真行, 田村泰久, 江口麻美, 片岡洋祐 Possible involvement of neuroinflammation in prolonged suppression of rat spontaneous activity by monofluoroacetate, an inhibitor for TCA cycle 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11-13日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Kume, S., Yamato, M., Miyashige Y., Nakano, M., Eguchi, A., Tamura, Y., Kataoka, Y., Fatigue Metabolic Pathway and Hepatic Inflammation in a Rat Model of Fatigue 第4回理研 Genomic Sciences Research Complex セミナー, 2014年7月11日, 理化学研究所 横浜キャンパス(神奈川県・横浜市)

Kume, S., Yamato, M., Miyashige, Y., Nakano, M., Eguchi, A., Tamura, Y., Kataoka, Y. Activation of Fatigue Metabolic Pathway Induces Hepatic Inflammation in a Rat Model of Fatigue. *Metabolomics* 2014, June 23-26, 2014, Tsuruoka (Yamagata, Japan)

Yamano, E., Kume, S., Yamato, M., Tajima, S., Hirayama, A., Fukuda, S., Kuratsune, H., Watanabe, Y., Soga, T., Kataoka, Y., Metabolome analysis for identifying biomarkers of Chronic Fatigue Syndrome. *Metabolomics* 2014, June 23-26, 2014, Tsuruoka (Yamagata, Japan)

大和正典, 久米慧嗣, 金光華, 宮繁志治, 中野真行, 江口麻美, 田村泰久, 片岡洋祐 エネルギー代謝の低下に着目した疲労動物モデルの作製と評価 第10回日本疲労学会, 2014年5月30-31日, グランフロント大阪(大阪府・大阪市)

久米慧嗣, 大和正典, 宮繁志治, 中野真行,

江口麻美、田村泰久、片岡洋祐 水浸疲労
負荷モデル動物の肝臓における疲労代謝
回路の活性化と組織炎症 第10回日本疲
労学会, 2014年5月30-31日, グランフロン
ト大阪 (大阪府・大阪市)

Kume, S., Yamato, M., Jin, G., Miyashige, Y.,
Nakano, M., Tamura, Y., Soga, T., Kataoka, Y.
Metabolic Biomarkers of Fatigue in a Rat
Model Using Multivariate Analysis. AMT-BHI
2013, October 29-31, 2013, Maebashi (Gunma,
Japan)

久米慧嗣、大和正典、宮繁志治、中野真
行、田村泰久、曾我朋義、片岡洋祐 ラ
ットモデルを用いた疲労バイオマーカー
の同定 第8回メタボロームシンポジウム、
2013年10月3-4日、九州大学 (福岡県・
福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 慧嗣 (Kume, Satoshi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス
技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号：30708441

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者