

	マキノ リョウスケ
<b>氏 名</b>	<b>牧野 良輔</b>
本籍（国籍）	宮城県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 655 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
<b>学位論文題目</b>	<b>ニワトリにおける糖化トリプトファン化合物の代謝および生理機能（Metabolism and physiological function of glycosylated tryptophan compounds in chickens）</b>
学位審査委員	主査 岩手大学 教授 喜多 一美 副査 佐野 宏明(岩手 教授)、松崎 正敏(弘前 教授)、日高 智(帯広 教授)

## 論文の内容の要旨

必須アミノ酸の 1 つであるトリプトファンは酵素により代謝分解されており、その約 95% はキヌレニン経路によって、残りはセロトニン経路によって代謝されると言われている。しかし、トリプトファンは非酵素的な化学反応によってグルコースと結合し（糖化反応）、アマドリ化合物と PHP-TH $\beta$ C の 2 つの糖化トリプトファン化合物を形成することが知られている。この非酵素的糖化反応は生体内でも起こりうると考えられた。本研究では、高血糖動物であるニワトリを用いて、トリプトファンの非酵素的な代謝経路を明らかにすることを試みた。また、糖化トリプトファン化合物の生理機能を解明することも目的とした。

まず始めに、血漿中の糖化トリプトファン化合物濃度を明らかにするべく、トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに 14 日間給与し、血漿中のトリプトファンおよび糖化トリプトファン化合物濃度を測定した。血漿中のトリプトファンおよび糖化トリプトファン化合物濃度において、対照区とトリプトファン過剰添加飼料区間に有意な差は認められなかった。しかし、血漿中トリプトファン濃度と血漿中糖化トリプトファン化合物濃度間に有意な正の相関が認められたため、血漿中糖化トリプトファン化合物濃度は血漿中トリプトファン濃度に影響を受けることが示唆された。

食餌性トリプトファン量がニワトリの血漿中トリプトファン濃度に影響を及ぼさなかった理由として、トリプトファン異化経路の亢進が考えられた。トリプトファンの多くは酵素的異化経路であるキヌレニン経路によって分解される。一方で、非酵素的糖化反

応もトリプトファン異化経路の一つであると考えられる。そこで、トリプトファン過剰添加飼料を 1、3、7 および 14 日間与えたニワトリの血漿中トリプトファン、酵素的トリプトファン異化産物および糖化トリプトファン化合物濃度を測定し、継時的変化を調査した。血漿中トリプトファン濃度は、1 および 3 日目は食餌性トリプトファンの量に応じて有意に上昇したが、7 日目以降は低下し、対照区とトリプトファン過剰添加飼料区の間には有意な差が認められなかった。一方で、食餌性トリプトファン量を増やすにしたがって、キヌレニン経路のトリプトファン異化産物の血漿中濃度は 14 日間通して対照区よりも高濃度であった。よって、トリプトファン過剰添加飼料の給与はニワトリのトリプトファン異化を亢進することが示された。一方で、血漿中のトリプトファン濃度と糖化トリプトファン濃度が有意な高い相関を示すことから、基質であるトリプトファン濃度の影響を受けていると考えられる。

続いて、血漿中糖化トリプトファン化合物濃度の分解速度を明らかにするために、PHP-TH $\beta$ C をニワトリの翼下静脈から単回投与し、血漿中の PHP-TH $\beta$ C 濃度の継時的変化を非線形回帰式を用いて表し、分解速度の指標である半減期を計算した。その結果、血漿中 PHP-TH $\beta$ C の半減期は 99 分であることが示された。

さらに、血漿中の PHP-TH $\beta$ C がニワトリのどの組織で代謝されているのかを明らかにするために、放射性同位元素で標識した PHP-TH $\beta$ C をニワトリの翼下静脈より投与し、0.5、1、3 および 6 時間後にニワトリの組織、血漿および排泄物を採取し、放射線量を測定した。その結果、0.5 時間後の腎臓で放射線量が最も高く、時間の経過とともに排泄物中の放射線量が増加することが明らかとなった。このことから、血漿中の PHP-TH $\beta$ C は速やかに腎臓から排泄されることが明らかとなった。

過去にニワトリの腎臓、肝臓および脾臓中に糖化産物が移行することが報告されており、放射性 PHP-TH $\beta$ C の投与実験によって類似した結果を得ていることから、これら組織に糖化産物の取り込み機構が存在するのではないかと考えた。ニワトリ胚由来の初代培養系を用いて、糖化トリプトファン化合物の取り込み能を調査した。筋肉、腎臓、肝臓および脾臓由来の細胞の全ての細胞で糖化トリプトファン化合物の取り込みが確認された。特に筋肉由来の細胞に取り込まれることが示され、先の実験結果との矛盾が生じた。

細胞への糖化トリプトファン化合物の取り込み機構を明らかにするべく、PHP-TH $\beta$ C をニワトリ胚由来の初代培養細胞に取り込ませ、細胞をタンパク質画分、非タンパク質画分および全細胞画分に分画し、各画分の放射線量を測定した。その結果、非タンパク質画分に比べて、タンパク質画分の放射線量が高く、PHP-TH $\beta$ C と結合するタンパク質が存在することが示唆された。

次に、PHP-TH $\beta$ C の生理的意義を明らかにすることを試みた。まず始めに、筋肉のタンパク質合成に及ぼす影響を調査するべく、ニワトリ胚筋芽細胞培養系を用いて、PHP-TH $\beta$ C が筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響を調査した。その結果、PHP-TH $\beta$ C

がニワトリ胚筋芽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。

PHP-TH $\beta$ C によるタンパク質合成低下作用の機序を明らかにするために、筋肉タンパク質合成に重要なインスリン様成長因子 (IGF) に関連する遺伝子の mRNA 発現量を調査した。しかしながら、PHP-TH $\beta$ C は IGF 関連遺伝子の mRNA 発現量に影響を及ぼさなかったため、PHP-TH $\beta$ C のタンパク質合成低下作用は IGF 関連遺伝子発現の調節とはことなる作用であることが示唆された。

続いて、グルコースおよびトリプトファンがニワトリの摂食行動に影響を及ぼすことから、PHP-TH $\beta$ C が摂食行動に影響を及ぼす可能性があると考え、ニワトリの末梢から PHP-TH $\beta$ C を投与し、摂食量に影響を及ぼすか否かを調査した。その結果、PHP-TH $\beta$ C の投与によってニワトリの摂食量が亢進することが示された。

本研究の成果より、ニワトリの生体内ではトリプトファンの一部は非酵素的に代謝されることが明らかとなり、酵素を介さない異化経路が存在することを示した。また、糖化トリプトファン化合物が生理機能を有している可能性が示されたことから、今後の畜産栄養学において非酵素的糖化反応の知見を増やす必要性を見出した。

## 論文審査の結果の要旨

必須アミノ酸の1つであるトリプトファンは、その約95%がキヌレニン経路によって、残りはセロトニン経路によって代謝されると言われている。しかし、トリプトファンは非酵素的な化学反応によってグルコースと結合し(糖化反応)、トリプトファン-アマドリ化合物と PHP-TH $\beta$ C の2つの糖化トリプトファン化合物が生成される。この非酵素的糖化反応は生体内でも起こり得る反応である。そこで本研究では、高血糖動物であるニワトリを用いて、トリプトファンの非酵素的な代謝経路を明らかにするとともに、糖化トリプトファン化合物の生理機能を解明することを目的とした。

1. トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに給与し、血漿中のトリプトファン代謝産物および糖化トリプトファン化合物濃度を測定したところ、血漿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間に有意な正の相関が認められた。

2. ニワトリの静脈へ PHP-TH $\beta$ C を単回投与し、PHP-TH $\beta$ C の血漿中半減期およびニワトリ組織への蓄積を調査したところ、血漿中の PHP-TH $\beta$ C 半減期は 40-100 分であり、PHP-TH $\beta$ C は腎臓から速やかに排泄されることが明らかになった。

3. 放射性糖化トリプトファン化合物をニワトリ胚由来の初代培養細胞に取り込ませたところ、糖化トリプトファン化合物は、細胞のタンパク質画分に多く取り込まれることが示された。

4. PHP-TH $\beta$ C 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査したところ、PHP-TH $\beta$ C は筋芽細胞のタンパク質合成を低下させ、この変化に対してインスリン様成長因

子関連遺伝子発現の変化は関与していないことが明らかとなった。

5. ニワトリの翼下静脈から PHP-TH $\beta$ C を投与して摂食行動を調べたところ、PHP-TH $\beta$ C はニワトリの摂食を刺激することが示された。

本研究より、ニワトリの生体内ではトリプトファンの一部は非酵素的に異化されることを明らかにし、糖化トリプトファン化合物の代謝についても新たな知見を得た。また、糖化トリプトファン化合物が、生体内において様々な生理機能を有していることを明らかにした。これらの研究成果は、動物栄養学における新たな領域を開拓し、今後の研究の展開に大きく貢献するものである。

以上より、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

##### 主論文

1. Nishimagi, R. and Kita, K. (2012) Influence of  $\beta$ -carboline produced from glucose and tryptophan on protein synthesis of chicken embryo myoblasts. *Journal of Poultry Science*, 49 (4): 300-302.
2. Makino, R., Kawashima, Y., Kajita, Y., Namauo, T., Ogawa, S., Muraoka, H., Fujimura, S. and Kita, K. (2015) Glycated tryptophan in the plasma of chickens fed tryptophan-excess diets. *Journal of Poultry Science*, 52 (1): 23-27.
3. Makino, R., Sugahara, M. and Kita, K. (2015) Nutritional evaluation of glycated valine and tryptophan for protein synthesis in chicken embryo myoblasts. *Journal of Poultry Science*, 52 (4): 253-259.

##### 参考論文

4. Kita, K., Kawashima, Y., Makino, R., Namauo, T., Ogawa, S., Muraoka, H. and Fujimura, S. (2013) Detection of two types of glycated tryptophan compounds in the plasma of chickens fed tryptophan excess diets. *Journal of Poultry Science*, 50 (2): 138-142.
5. Kita, K. and Makino, R. (2014) Influence of Valine Analogues on Protein Synthesis of Chicken Embryo Myoblasts. *Journal of Poultry Science*, 51 (2): 191-194.
6. Kita, K., Ito, K. R., Sugahara, M., Kobayashi, M., Makino, R., Takahashi, N., Nakahara, H., Takahashi, K. and Nishimukai, M. (2015) Effect of In Ovo Administration of Branched-Chain Amino Acids on Embryo Growth and Hatching Time of Chickens. *Journal of Poultry Science*, 52 (1): 34-36.
7. 牧野良輔, 喜多一美 (2015) ニワトリにおける非酵素的糖化トリプトファンの代謝および

生理機能. 栄養生理研究会報, 59 (1): 35-40.

8. Nishimura, K., Hiramatsu, K., Watanabe, T., Makino, R., Sasaki, N. and Kita, K. (2015) Amino acid supplementation to diet influences the activity of the L cells in chicken small intestine. *Journal of Poultry Science*, 52 (3): 221-226.