

博士論文

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

2016年3月

岩手大学大学院連合農学研究科  
生物生産科学専攻

牧野 良輔

## 目次

第1章	序論.....	3
	付表 .....	12
第2章	トリプトファン過剰添加飼料を給与したニワトリにおける血漿中糖化トリプトファン化合物濃度.....	17
	第1節 目的.....	17
	第2節 材料および方法.....	18
	第3節 結果.....	24
	第4節 考察.....	25
	付表 .....	27
第3章	トリプトファンを過剰給与したニワトリの血漿中トリプトファン、トリプトファン代謝産物、糖化トリプトファン化合物濃度の継時的変化.....	32
	第1節 目的.....	32
	第2節 材料および方法.....	33
	第3節 結果.....	38
	第4節 考察.....	39
	付表 .....	41
第4章	ニワトリにおける糖化トリプトファン化合物の血漿中半減期 .....	44
	第1節 目的.....	44
	第2節 材料および方法.....	45
	第3節 結果.....	48
	第4節 考察.....	49
	付表 .....	50
第5章	ニワトリ組織中への糖化トリプトファン化合物の蓄積 .....	51
	第1節 目的.....	51
	第2節 材料および方法.....	52
	第3節 結果.....	56
	第4節 考察.....	58
	付表 .....	59
第6章	ニワトリ胚由来細胞への糖化トリプトファン化合物の取り込み.....	66
	第1節 目的.....	66
	第2節 材料および方法.....	67
	第3節 結果.....	72
	第4節 考察.....	73

付表 .....	74
第7章 ニワトリ胚由来細胞への PHP-TH $\beta$ C の取り込み.....	75
第1節 目的.....	75
第2節 材料および方法.....	76
第3節 結果.....	80
第4節 考察.....	81
付表 .....	82
第8章 糖化トリプトファン化合物がニワトリ胚由来細胞のタンパク質代謝に及ぼす影響 .....	83
第1節 目的.....	83
第2節 材料および方法.....	84
第3節 結果.....	86
第4節 考察.....	87
付表 .....	88
第9章 糖化トリプトファン化合物がニワトリ胚筋芽細胞の IGF 関連遺伝子の発現に及ぼす影響 .....	89
第1節 目的.....	89
第2節 材料および方法.....	90
第3節 結果.....	93
第4節 考察.....	94
付表 .....	95
第10章 糖化トリプトファン化合物がニワトリの摂食行動に及ぼす影響.....	97
第1節 目的.....	97
第2節 材料および方法.....	98
第3節 結果.....	99
第4節 考察.....	100
付表 .....	101
第11章 要約.....	102
謝辞.....	104
参考文献.....	105

## 第1章 序論

### 1-1. 糖質の代謝

糖質は生物にとって主要なエネルギー源である。従属栄養生物である動物にとって、摂食からのエネルギー供給は非常に重要である。食餌性の糖質は主にデンプン(グルコースの重合による高分子)の形で摂取される。摂取されたデンプンは消化管を通過する間に消化酵素によって分解され、グルコースの形で小腸から吸収される。吸収されたグルコースは血液中を循環し、グルコースが細胞内に取り込まれると、解糖系およびTCA回路によってエネルギーの直接的な供給源であるアデノシン三リン酸(Adenosine triphosphate:ATP)に変換される(Uldry and Thorens, 2004; Chen and Russo, 2012)。

血液を循環するグルコースの動態は、血中グルコース濃度(血糖値)に反映される。グルコースの消費やグルコースの貯蔵形態であるグリコーゲンの合成によって血糖値は低下し、食餌やグリコーゲン分解によってグルコースが供給されれば血糖値が上昇する。グリコーゲンはグルコースが脱水縮合した重合体であり、血糖値の低下や激しい運動によって分解されて、グルコースを供給する。一方で血糖値の上昇によってインスリンが分泌されるとグリコーゲンの合成が行われる(Takagi and Manabe, 2014)。エネルギー源であるグルコースは、動物の体内では一定の濃度に保たれている。エネルギーの枯渇は生命維持の危機に直結する。そのため、絶食時にはグリコーゲンを分解し血糖値を維持するが、長時間の絶食などに陥るとグリコーゲンの分解で供給できる範囲を逸脱する。そこで動物は、糖質以外の化合物からグルコースを合成する能力を有しており、この合成を糖新生と呼ぶ。糖新生では、解糖系におけるグルコース分解物である乳酸や、タンパク質分解によって供給されるアミノ酸、脂質代謝によって供給されるグリセロールなどが原料として利用される(Adeva *et al.*, 2012)。血中のグルコースの消費および供給は、多くのホルモンによって制御されている。中でもインスリンとグルカゴンはグルコースの消費と供給を司る最も主要なホルモンである(Braun and Sweazea, 2008)。インスリンは血糖値の上昇を刺激として膵臓のB( $\beta$ )細胞から分泌され、筋肉や脂肪組織でのグルコース取り込みを促進する。細胞内へと取り込まれたグルコースは、解糖系によって分解される。また、肝臓ではグリコーゲンの合成を促進し、血糖値の低下を促す。一方、グルカゴンは血糖値の低下に応答して膵臓のA( $\alpha$ )細胞から分泌される(Braun and Sweazea, 2008)。グルカゴンは、肝臓におけるグリコーゲンの分解と糖新生を促進し、血糖値の上昇に寄与する。このように、インスリンとグルカゴンは作用が拮抗している。

ニワトリの血糖値は250 mg/dl 前後である(Hazelwood and Lorenz, 1959)。ヒトでは空腹時血糖が126 mg/dl を超えると糖尿病が疑われることから(American Diabetes Association, 2010)、ニワトリの血糖値は極めて高いと言える。ニワトリに限らず多くの鳥類は、空腹時血糖値が哺乳類の1.5 から3 倍程度ある。さらに24 時間から48 時間の絶食下であっても、血糖値は10-15% しか低下しない(Hazelwood, 1999)。絶食時における血糖値の変化は、絶対量としては低下

するものの、体重当たりで換算すると血糖値はほぼ一定を示すことが明らかとなっている。(Hazelwood, 1999; Simon and Rosselin, 1979)。

哺乳類、鳥類を問わず、血糖値の調節に重要な器官は膵臓である。前述したとおり、膵臓からは血糖値をコントロールするホルモンが分泌される。膵臓にはランゲルハンス島と呼ばれる内分泌細胞が存在し、A( $\alpha$ )細胞、B( $\beta$ )細胞、D( $\delta$ )細胞、 $\epsilon$ 細胞、PP細胞の5つが知られている(Jain and Lammert, 2009)。このうち、血糖値のコントロールに大きく関わるのは、グルカゴンを分泌する A( $\alpha$ )細胞、インスリンを分泌する B( $\beta$ )細胞、そしてグルカゴンおよびインスリンの分泌を抑制するソマトスタチンを分泌する D( $\delta$ )細胞である (Dubois, 1975)。

## 1-2. トリプトファン

トリプトファンは生体を構成するタンパク質の基質となる 20 種類のアミノ酸の 1 つであり、必須アミノ酸の 1 つでもあるが、タンパク質中含量や血中における存在量が最も少ないアミノ酸でもある(Sainio *et al.*, 1996)。しかしながら、トリプトファンはタンパク質の基質としてだけでなく、摂食行動(Lacy *et al.*, 1986)に関与する他、情動行動(Silber and Schmitt, 2010)および免疫反応(Munn *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 2007)を調節する役割も担う。トリプトファンやトリプトファン代謝産物は様々な生理的機能を有しており、これまでに数多くの研究が行われてきた。古くは Sidransky ら (1968)が肝臓におけるタンパク質合成の促進作用を報告し、以後多くの研究がこの結果を支持している(Rothschild *et al.*, 1969; Ponter *et al.*, 1994)。肝臓において生産される主要なタンパク質に血漿タンパク質がある。トリプトファンは他のアミノ酸と異なり、血中では主に血漿タンパク質の 1 つであるアルブミンと結合して循環しており(Pardridge, 1979)、遊離状態で存在するトリプトファンは 10–20%程度と見られている。

トリプトファンは神経伝達物質の一つであるセロトニン(5-Hydroxytryptamin)の前駆体である。セロトニンは、主に脳内で働くインドールアルカロイドであり、摂食行動(Schwartz *et al.*, 2000)、うつ病(Nestler *et al.*, 2002)への関与の他、消化器機能、情動および血行動態を調節する神経伝達物質でもある(Le Floc'h *et al.*, 2011)。さらにセロトニンはメラトニンへと変換され、睡眠や概日リズムに関与することが知られている(Reiter, 1991; Maestroni, 1993)。また、トリプトファンは N-ホルミルキヌレニンの前駆体でもあり、N-ホルミルキヌレニンはアリアルホルムアミダーゼによってキヌレニンへと変換される。キヌレニンは更なる酵素反応によって、N-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartate:NMDA)型受容体のアンタゴニストであるキヌレン酸および NMDA 型受容体のアゴニストとして働くキノリン酸などの代謝産物へと変換される。キノリン酸は更にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(Nicotinamide adenine dinucleotide: NAD)へと転換され、多くの酸化還元反応の電子受容体、あるいは水素受容体として作用している(Ball *et al.*, 2009; Oxenkrug, 2010)。更にトリプトファンからのキヌレニン異化がアルツハイマー患者で亢進するなど(Widner *et al.*, 2000)、脳機能との関与も報告されている。トリプトファンの異化経路の主たるものはこの 2 つであり、それぞれセロトニン経路およびキヌレニン経路と呼ば

れる。トリプトファンの 90%以上がキヌレニン経路で代謝されるという報告もある (Gál and Sherman, 1980; Oxenkrug, 2007; Fig. 1)。

以上のように、トリプトファンは存在量が少ないながらも多くの生理的機能を有しており、生体にとって重要な必須アミノ酸である。しかしながら、肝臓、脳、消化器官および免疫細胞におけるトリプトファンの代謝および生理的役割は数多く研究されているものの、筋肉のタンパク質代謝に及ぼす影響を調べた研究はさほど多くない。また、上述したセロトニン経路およびキヌレニン経路におけるトリプトファン代謝に関する研究は広く行われているものの、トリプトファンの非酵素的な化学反応による分解経路に関する報告は見当たらない。トリプトファンおよびトリプトファン代謝物が持つ生理的役割の包括的な解明は、畜産物の生産性を向上させる可能性を秘めており重要であると考えている。

### 1-3. 糖化反応

1900年代の初めに、グルコースとアミノ酸が非酵素的な化学反応を起こし、茶色の色素を持つ化合物を形成することが発見された (Maillard, 1912)。これはメイラード反応、もしくは非酵素的糖化反応と呼ばれる反応であり、タンパク質やアミノ酸などのアミノ基と、グルコースなどの還元糖が持つカルボニル基が脱水縮合を起こす。メイラード反応は一般的に食品の調理および貯蔵中に進行し香気成分に寄与する一方で、タンパク質の消化率の低下などを招き栄養学的価値を損なうと言う報告もある (Tessier and Birlouez-Aragon, 2012)。非酵素的糖化反応は食品中のみならず、生体内でも起こる化学反応であり、特に糖尿病患者のように恒常的な高血糖状態では非酵素的糖化反応生成物が多く産生される (Ulrich and Cerami, 2001)。高血糖は最終的に網膜症、腎症、神経症などのいわゆる糖尿病の三大合併症を誘発するとともに、動脈硬化や心不全などによる死亡リスクを高める。例えば、非酵素的糖化反応によって血漿タンパク質のアルブミンにグルコースが結合したグリコアルブミンは、死亡リスクの推定に用いられる (Freedman *et al.*, 2011)。

これら糖尿病合併症の原因物質はいくつか推定されており、グルコースの代謝産物であるソルビトールの蓄積や脂質酸化などの他に、タンパク質の非酵素的糖化反応によって形成される終末糖化産物 (AGEs: Advanced glycation end-products) が挙げられている。AGEs の形成は大きく初期段階反応と後期段階反応の 2 つの段階反応に分けられる。まず、グルコースとタンパク質が Schiff 塩基を形成した後、アマドリ転位によってアマドリ化合物を形成する (Amadori, 1925)。ここまです初期段階反応と呼ぶ。初期段階反応で形成されたアマドリ化合物は後期段階反応で酸化、脱水、縮合などの複雑な反応経路を経て褐色や蛍光を特徴とした化合物を形成する (Fig. 2)。これらの化合物が AGEs と呼ばれ、架橋によるタンパク質の機能喪失や AGEs 受容体 (Receptor for AGEs; RAGE) からのシグナル伝達による細胞応答など様々な特徴を示す (Brownlee, 2001; Singh *et al.*, 2001; Goh and Cooper, 2008; Zhang *et al.*, 2009)。RAGE を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは糖尿病腎症が進行し (Price *et*

al., 2006)、逆に RAGE ノックアウトマウスでは糖尿病腎症の発症が予防されたことから (Pande *et al.*, 2011)、AGEs が糖尿病合併症の一因となることが示唆されている。さらに RAGE は AGE の結合によって転写因子である NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B) を活性化する (Bierhaus *et al.*, 2001)。活性化した NF- $\kappa$ B によって炎症性サイトカインであるインターロイキンの遺伝子発現が増加し、血管炎症の惹起や血圧の上昇を引き起こすことが知られている (Reddy and Beyaz, 2006; Kierdorf and Fritz, 2013)。上記のように、AGEs の生理的機能に関する研究は広く行われている。その一方、アミノ酸の非酵素的糖化反応化合物に関する知見はほとんど見当たらない。非酵素的糖化反応はグルコースのカルボニル基とアミノ基が結合する反応であるため、アミノ酸も非酵素的糖化反応の基質となる。グルコースと必須アミノ酸の 1 つであるトリプトファンの中で非酵素的糖化反応が起こると、グルコース-トリプトファン Schiff 塩基を形成した後、2 つの化合物を形成する。1 つは先述したタンパク質でも起こるアマドリ転位によってグルコース-トリプトファンアマドリ化合物が形成される。もう 1 つはピクテ・スペングラー反応によって (1R,3S)-1- (D-gluco- 1,2,3,4,5- pentahydroxypentyl) -1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3- carboxylic acid (PHP-TH $\beta$ C) が形成される (Röper *et al.*, 1983; Rönner *et al.*, 2000; Fig. 3)。PHP-TH $\beta$ C はインドール骨格にピリジンが結合した  $\beta$ -カルボリンの一種である。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 は共にインドールアルカロイドに分類される。アルカロイドは多くの植物に含まれ、植物毒に代表されるように強い生理活性を有するものが多い (Cao *et al.*, 2007)。同じくトリプトファン由来で、動物におけるインドールアルカロイドにはセロトニンおよびメラトニンがある。ヒトにおいて空腹時血糖値が 126 mg/dl (約 7 mM) を超えると糖尿病が疑われるが、ニワトリは高血糖 (約 15 mM、ヒトの 2 倍以上) を特徴とする動物である (Hazelwood and Lorenz, 1959)。また、ヒトに比べて高体温 (約 42°C) でもあるため、上記で述べた非酵素的糖化反応が起こりやすいことが報告されている (Klandorf *et al.*, 1995; Iqbal *et al.*, 1999)。しかしながら、アミノ酸の非酵素的糖化反応によって生成されたアマドリ化合物およびインドールアルカロイドの生理的濃度や生理機能に関する研究はほとんど行われていない。

#### 1-4. タンパク質代謝

動物の成長は栄養によって大きく左右される。特に栄養素の一つであるタンパク質は、動物の成長や発達に大きく関与している。タンパク質は酵素や生理活性物質の合成素材として不可欠なものであると同時に、体組織の構成物でもある。体タンパク質の約半分が骨格筋のタンパク質であり、その骨格筋は体重の 40~50% を占める主要な体組織である (Sandri, 2010)。そのため骨格筋の発達は動物の成長へ大きく影響しており、さらに筋肉は家畜および家禽における主要な畜産物である。

動物に給与する飼料のタンパク質含量の違いが、尿中に排泄される窒素含量に大きく影響を及ぼすという事実から、Folin (1905) は 2 種類のタンパク質代謝が存在すると仮定した。1 つ

は食餌タンパク質の影響を受けて変動する外因性代謝、もう1つは食物に影響を受けず生命維持に不可欠な内因性代謝である。しかしながら、この概念は Schoenheimer らの実験(1939)によって打ち破られた。Schoenheimer らは  $^{15}\text{N}$  で標識したロイシンを含む食餌を成熟ラットに摂取させ、排泄物と組織を分析した。実験期間に体重の変化が観察されなかったにもかかわらず、筋肉、心臓、肝臓、腸管、腎臓、脾臓など、あらゆる体組織に  $^{15}\text{N}$  が取り込まれていた。つまり、体タンパク質量が変化していないので、食餌からのアミノ酸が新たなタンパク質として取り込まれた分、同じ量のタンパク質がアミノ酸へと分解、排泄されたこととなる。このことから体タンパク質の外因性代謝と内因性代謝は明確に区別されるものではなく、体タンパク質はあらゆる組織で合成と分解を繰り返す動的状態にあることが示された(Schoenheimer and Rittenberg, 1940)。このように、タンパク質が合成と分解を繰り返すことをタンパク質の代謝回転と呼び、タンパク質栄養を考える上で最も基本的かつ重要な考え方である(Garlick and Millward, 1972; Young and Ajami, 1999; Fig. 4)。

生体内に存在するアミノ酸は主に3つのルートに由来する。第一に体タンパク質の分解による供給、第二に食餌からの供給、そして第三に体内で生合成される非必須アミノ酸の供給である。これらのアミノ酸はタンパク質合成の基質として用いられる。細胞内におけるタンパク質の合成は、核内に存在するDNAの塩基配列をメッセンジャーRNA(mRNA)に転写することから始まる。細胞質に出てきたmRNAは、粗面小胞体上のリボソームと結合し、mRNAの塩基配列(コドン)に対応したアミノアシル-トランスファーRNA(Aminoacyl-tRNA)と結合する。個々のアミノアシル-tRNAは特定のアミノ酸を運搬し、このアミノ酸はmRNAの情報に基づき一定のアミノ酸配列で結合する。これを翻訳と呼び、アミノ酸はペプチド結合によって直鎖状のポリペプチドを形成する。ペプチド結合とは、アミノ酸同士が一方のカルボキシル基と他方のアミノ基との間で脱水縮合によって形成される結合である。合成されたポリペプチドは最終的にmRNAから遊離し、様々な修飾を受けて機能を持ったタンパク質になる。

一方、飢餓状態ではタンパク質合成よりもタンパク質分解が亢進することが知られている。これは自身の体タンパク質を分解することによりアミノ酸を補給するためであり(Millward *et al.*, 1976; Levine and Klionsky, 2004)、再給餌を行うとタンパク質分解が抑制されることが示されている(Kee *et al.*, 2003)。このように細胞内における体タンパク質の分解は不要なタンパク質の除去だけでなく、不足したアミノ酸を供給するという役割も担っている。細胞内には数多くのプロテアーゼが存在し、それだけにタンパク質の分解機構も複雑である。大きくタンパク質分解のメカニズムを分類するとタンパク質の分解はカルパイン系、オートファジー・リソソーム系、ユビキチン・プロテアソーム系の3つの系で行われている(Jackman and Kandarian, 2004)。この3つのタンパク質分解系にはそれぞれ特徴があり、カルパイン系およびユビキチン・プロテアソーム系は選択的なタンパク質分解を、オートファジー・リソソーム系は非選択的なタンパク質分解を行う。まず、カルパイン系は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のタンパク質分解酵素であるカルパインによって細胞内タンパク質を分解する。カルパインには2つのアイソフォームが存在し、それぞれ  $\mu$ -カルパインおよび  $m$ -カルパインと呼ぶ。この2つのカルパインは  $\text{Ca}^{2+}$  の要求量が異なり、それぞ

れ  $\mu\text{M}$  および  $\text{mM}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を要求する (Thompson and Palmer, 1998)。カルパインが分解するタンパク質には特異性があり、筋線維タンパク質であるチチン (Titin)、ビンキュリン (Vinculin) およびネブリン (Nebulin) を分解するが、アクチン (Actin) およびミオシン (Myosin) は分解されない (Thompson and Palmer, 1998; Jackman and Kandarian, 2004)。次に、ユビキチン・プロテアソーム系も選択的なタンパク質分解を行う系である。ユビキチンが複数結合したタンパク質 (ポリユビキチン化タンパク質) をプロテアソームが分解する。ユビキチンの結合およびプロテアソームによるタンパク質分解には ATP が必要とされるため、ユビキチン・プロテアソーム系は ATP 依存性のタンパク質分解系であると言える。ユビキチンの結合には E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素)、E3 (ユビキチン連結酵素) の 3 つの酵素が関与しており、ユビキチンの C 末端にあるグリシンのカルボニル基と標的タンパク質のリジン残基のアミノ基が結合する。プロテアソームは 20S プロテアソームと 19S 複合体が結合したプロテアーゼである。20S プロテアソームは 7 つの  $\alpha$  サブユニットと 7 つの  $\beta$  サブユニットが 2 つずつ組み合わさったリング状のタンパク質である。20S プロテアソームと 19S 複合体の複合体は 26S プロテアソームと呼ばれ、ポリユビキチン化したタンパク質を ATP のエネルギーを用いて分解する (Nury *et al.*, 2007)。オートファジー・リソソーム系は非選択的なタンパク質分解系である。栄養飢餓状態などで誘発され、細胞内のタンパク質を分解し、遊離アミノ酸を増やして再利用することが目的の一つであると考えられている。まず、隔離膜と呼ばれる脂質二重膜によって細胞内のタンパク質を包み、オートファゴソームと呼ばれる構造体を形成する。オートファゴソームは加水分解酵素を含むリソソームと結合し、オートファゴソーム内のタンパク質を分解する (Sandri, 2010)。

アミノ酸はタンパク質の構成成分であるが、アミノ酸自体が筋肉タンパク質代謝を調節することも知られている。特に分岐鎖アミノ酸であるロイシンに関する研究が盛んである。分岐鎖アミノ酸の 1 つであるロイシンは mRNA 翻訳開始段階において、翻訳開始因子 Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) を活性化することによりタンパク質合成を促進する機能を有している (Dodd and Tee, 2012; Duan *et al.*, 2015)。eIF4E には、4EBP (4E Binding protein) と呼ばれる結合タンパク質が存在し、ロイシンは 4EBP のリン酸化を誘導し、eIF4E から 4EBP の解離を促すことで、eIF4E を活性化させることが報告されている (Bolster *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2005; Kimball and Jefferson, 2006)。

以上のようにタンパク質代謝回転に関する研究は古くから行われ、その調節メカニズムが次々と明らかになっている。筋肉は家畜および家禽の主な畜産物であり、その筋肉タンパク質代謝を明らかにすることは生産性を向上させる上で欠かせない研究である。

#### 1-5. $\beta$ -カルボリン

アルカロイドは植物に多く含まれる、窒素含有複素環を持つ化合物の総称である。大部分のアルカロイドは塩基性を示し、様々な生理活性物質として働くことが知られている (Cao *et al.*,

2007)。植物由来のアルカロイドの例としてとして、モルヒネ、コカイン、カフェイン、ニコチン、ジャガイモの芽に含まれる毒であるソラニンおよびトリカブトの主な毒成分であるアコニチンなどが挙げられる。インドール骨格を持つアルカロイド(インドールアルカロイド)の中で、さらにピリジンが結合した  $\beta$ -カルボリン骨格を持つ化合物群を  $\beta$ -カルボリン類と呼ぶ(Allen and Holmstedt, 1980)。糖化トリプトファンの一つである PHP-TH $\beta$ C はこの  $\beta$ -カルボリン類に属する。 $\beta$ -カルボリン類の化合物は窒素を含む六員環(三環構造の右側)の飽和度によって分類される(Fig. 5)。例えば、窒素含有六員環が不飽和結合のみの場合は全芳香族  $\beta$ -カルボリン( $\beta$ Cs)と呼び、一部または完全に単結合で構成される場合はそれぞれジヒドロ- $\beta$ -カルボリン(DH $\beta$ Cs)またはテトラヒドロ- $\beta$ -カルボリン(TH $\beta$ Cs)と区別される。また、 $\beta$ -カルボリン骨格に様々な側鎖が結合することで、多様な生理機能を持つ  $\beta$ -カルボリン誘導体となる(Herraiz, 2000; Cao *et al.*, 2007)。

$\beta$ -カルボリン類の生理的および薬理的作用は古くから薬として利用されている。中東と北アフリカでは、*Peganum harmala* (Zygophyllaceae, Syrian Rue)から単離された  $\beta$ -カルボリンが通経薬および墮胎薬として用いられてきた(Cao *et al.*, 2007)。また、 $\beta$ -カルボリンを含むアマゾン流域の植物は幻覚剤や嗅ぎたばことして広く使われ、*Peganum harmala* の種子抽出物は、中国北西部で何百年の間伝統的に、消化器系のガンおよびマラリアの治療に使われてきた(Chen *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2007)。この様に多様な生理機能を持つ  $\beta$ -カルボリンは、その薬理作用が注目され、様々な植物、食品、海洋生物、昆虫および哺乳類などからの単離や全合成に多くの研究者が取り組んできた。また、ノルハルマン(Norharman)およびハルマン(Harman)などの  $\beta$ -カルボリンの特徴や食品中における  $\beta$ -カルボリンの存在量が報告されている(Pfau and Skog, 2004)。

$\beta$ -カルボリンの持つ主な生化学的特徴として、細胞周期の回転に関与するサイクリン依存性キナーゼ(CDK)活性、DNA鎖を切断するトポイソメラーゼおよびモノアミン酸化酵素(MAO)の阻害、DNA二本鎖の間に入るインターカレーション作用およびベンゾジアゼピン受容体と5-ヒドロキシセロトニンレセプターへの相互作用がある。また  $\beta$ -カルボリンの持つ主な薬理的性質としては鎮静剤、抗不安薬、睡眠薬、抗けいれん薬、抗腫瘍薬、抗ウイルス剤、駆虫薬および抗菌剤と多様な働きがある(Cao *et al.*, 2007)。

アルカロイドには植物由来の化合物が多いが、動物においても様々な生理機能に関与している。例えば、トリプトファンを前駆体とするセロトニンおよびセロトニン代謝物のメラトニンはインドールアルカロイドの仲間である。しかしながら、かつてアルカロイドの定義が「含窒素化合物で一般に生理作用が顕著なアミン性植物成分」とされ、日本では植物塩基(Plant base)という訳語が用いられたように、アルカロイド研究の多くは植物由来の化合物が大半である。 $\beta$ -カルボリンも例外ではなく、*Peganum harmala* や *Banisteriopsis caapi* (ayahuasca) といった植物に含まれるハルミン(Harmine)、ハルマリン(Harmaline)およびハルモール(Harmol)などはよく調査されてきたものの(Frison *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010)、動物の生体内で産生される  $\beta$ -カルボリンの研究はほとんど行われてこなかった。多様かつ強力な生理活性を持つ  $\beta$ -カ

ルボリンの生理機能を解明することは、動物における生命現象の機序を明らかにするためには重要である。

## 1-6. 摂食行動

ニワトリを含む家畜の生産性向上を考える場合、摂食行動の制御を理解することは非常に重要である。動物は生命を維持するために飼料を摂取する。生産物を得るということは、生命維持以上の栄養素を動物に摂取させ、その余剰分を畜肉や卵に変換させることである。このことから明らかなように、摂食を亢進させることは生産物を増やすために必要不可欠である。肉養鶏は多くの畜肉を産生できるニワトリを選抜し作出した系統で、これは摂食量の多いニワトリを選抜してきたことと同じである。しかし、肉養鶏はその摂食量の多さゆえ、過肥による突然死を起こし、生産効率を低下させるという短所も有する(Olkowski, 2007; Hassanzadeh *et al.*, 2014)。このため摂食量を増やすだけでなく、生産性を維持しつつ疾病の発症を抑制させ得るような飼料摂取量の適正化が求められている。摂食行動には多くの因子が関与しており、トリプトファンもその 1 つである。一般的に、飼料中に過剰のトリプトファンを加えると摂食量が低下する。トリプトファン (Lacy *et al.*, 1986) およびトリプトファンの代謝産物であるセロトニン (Denbow *et al.*, 1982) を中枢に投与することで摂食量の低下が引き起こされるため、飼料摂取量低下の原因は、トリプトファンの代謝産物であるセロトニンによるものであると考えられている。

摂食行動を制御する中心的部位は脳である。特に、脳の視床下部に存在する弓状核が摂食行動制御の中心であると考えられている。弓状核には摂食行動を促進するニューロペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) およびアグーチ関連ペプチド (Agouti-related peptide: AgRP) を産生する神経細胞 (NPY/AgRP 神経細胞) と、摂食行動を抑制する  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone:  $\alpha$ -MSH) を産生するプロオピオメラノコルチン (Proopiomelanocortin: POMC) 神経細胞が存在する。NPY/AgRP 神経細胞および POMC 神経細胞による摂食行動制御機構は、ニワトリでも哺乳類でも同様のメカニズムがあることが示されている (Bungo *et al.*, 2011)。セロトニンの受容体は POMC 神経細胞には存在するものの、NPY/AgRP 神経細胞には存在しないことから、セロトニンによる摂食量の低下は、POMC 神経細胞を介した作用であると考えられる (Schwartz *et al.*, 2000; Arora and Anubhuti, 2006)。NPY/AgRP 神経細胞には NPY 受容体および GABA ( $\gamma$ -Aminobutyric acid) 受容体が存在し、それぞれ NPY および GABA の結合によって摂食を促進する (Arora and Anubhuti, 2006; Bungo *et al.*, 2011)。

セロトニンと同様に、トリプトファン由来のアルカロイドである糖化トリプトファン化合物も摂食行動に関与する可能性は十分にあると考えられる。しかしながら、糖化トリプトファン化合物が摂食行動に及ぼす影響を調べた報告はこれまでにない。そこで、糖化トリプトファン化合物が摂食行動を制御可能か否か明らかにする必要がある。

## 1-7. 目的

本研究では大きく2つの課題を解決することを目的とした。

第一の目的は、ニワトリ生体内における糖化トリプトファン化合物の動態を明らかにすることである。第二の目的は、糖化トリプトファンがニワトリの生理機能に及ぼす影響を調査することである。

ニワトリ生体内における糖化トリプトファン化合物の動態を調べるため、トリプトファン過剰飼料を給与したニワトリ血漿中における糖化トリプトファン化合物(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)濃度の経時的変化を明らかにすることを試みた。続けて、糖化トリプトファン化合物の1つである PHP-TH $\beta$ C の血中半減期を計算するとともに、トリプトファン過剰飼料の給与が PHP-TH $\beta$ C の血中半減期に影響を及ぼすのか否か調査した。また、血中の糖化トリプトファン化合物がニワトリのどの臓器によって代謝されているのかを検討するために、化学合成した  $^3\text{H}$  標識 PHP-TH $\beta$ C をニワトリ翼下静脈より投与し、放射能の組織分布を調査した。最後に、ニワトリ胚より調製した初代培養細胞を用いて、PHP-TH $\beta$ C が細胞に取り込まれるのか否かを調査した。

糖化トリプトファン化合物が持つ生理機能について調べるために、まず PHP-TH $\beta$ C がニワトリ胚由来細胞のタンパク質合成へ及ぼす影響を調査した。続けて、ニワトリのタンパク質合成に大きな役割を持つインスリン様成長因子関連遺伝子の発現についても調査した。さらに、糖化トリプトファン化合物の基質であるトリプトファンはニワトリの摂食行動に影響を及ぼすことから、糖化トリプトファン化合物の一つである PHP-TH $\beta$ C がニワトリの摂食行動に影響を及ぼすのか否かを調査した。

以上の研究を通して、これまで着目されてこなかった非酵素的なトリプトファン異化経路の存在を示すとともに、ニワトリのトリプトファン代謝において、非酵素的異化経路の寄与の度合いを明らかにする。また、糖化トリプトファン化合物がニワトリの生理機能に及ぼす影響を明らかにすることで、新たなトリプトファン代謝産物の機能を解明する。本研究で得られた知見から、家禽の栄養学における新たな視点が獲得できると期待している。

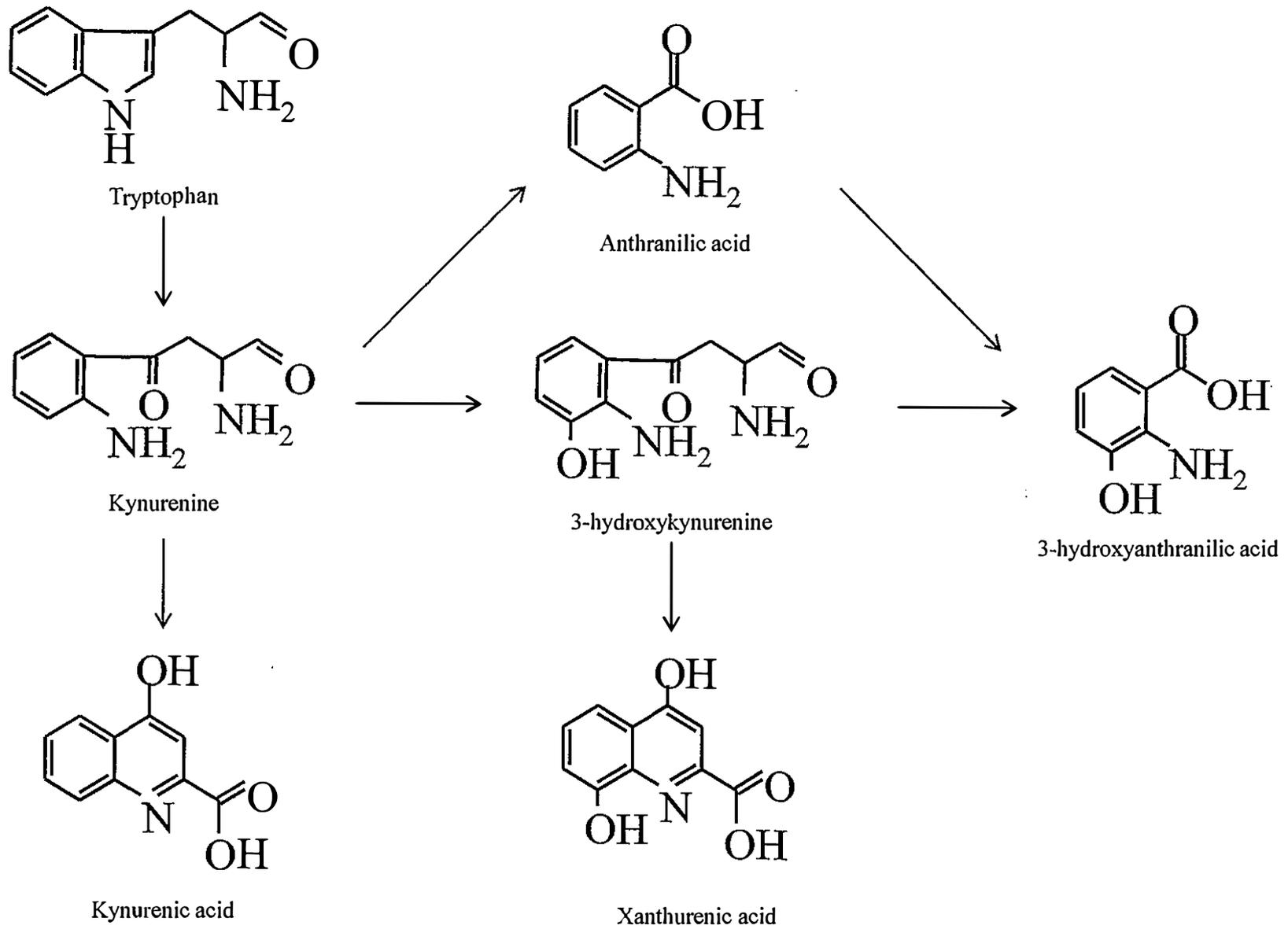


Fig. 1. Major metabolites in kynurenine pathway

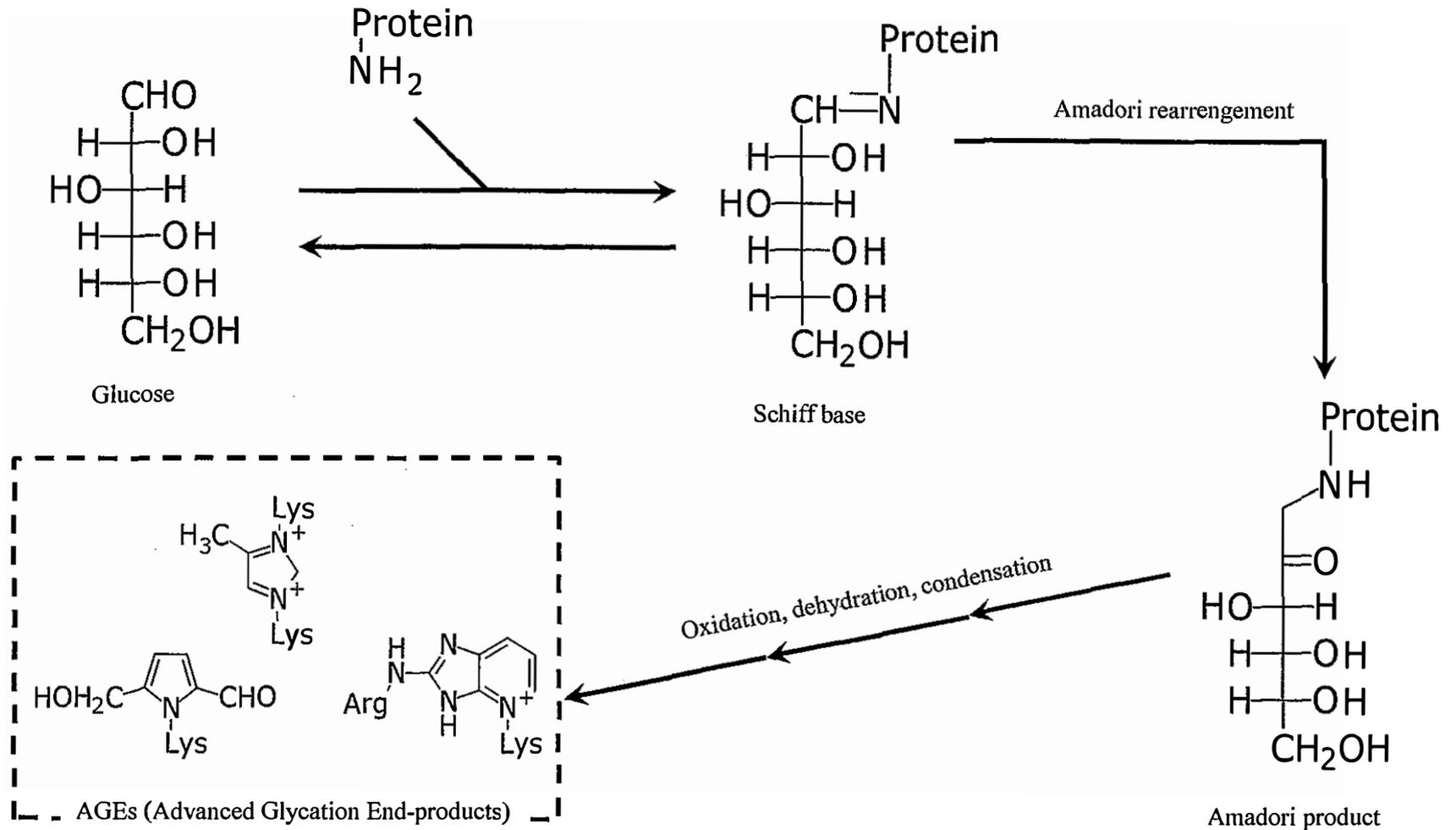


Fig. 2. Glycation between glucose and protein producing advanced glycation end-products via Amadori product

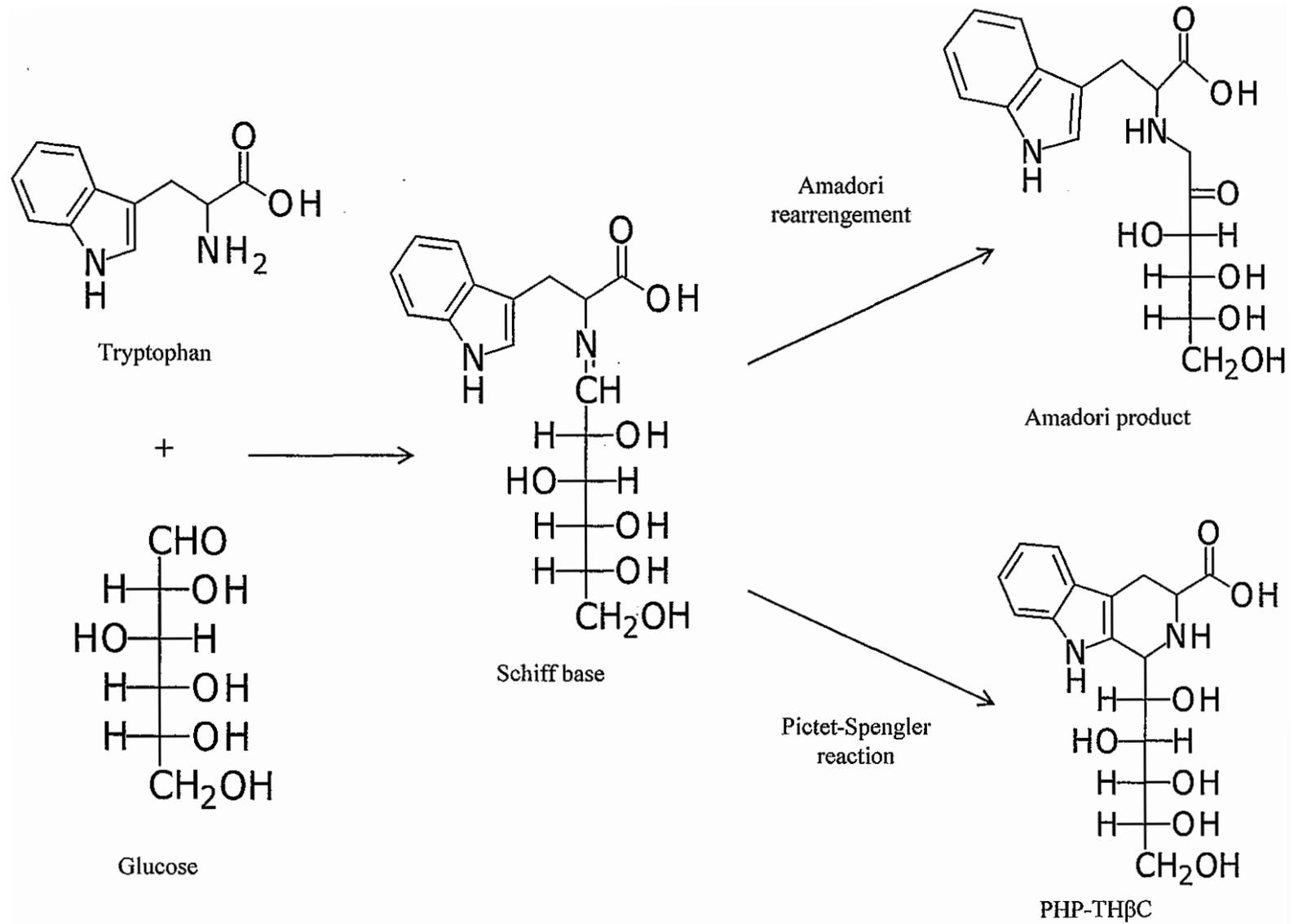


Fig. 3. Glycation between glucose and tryptophan producing Amadori product and PHP-THβC

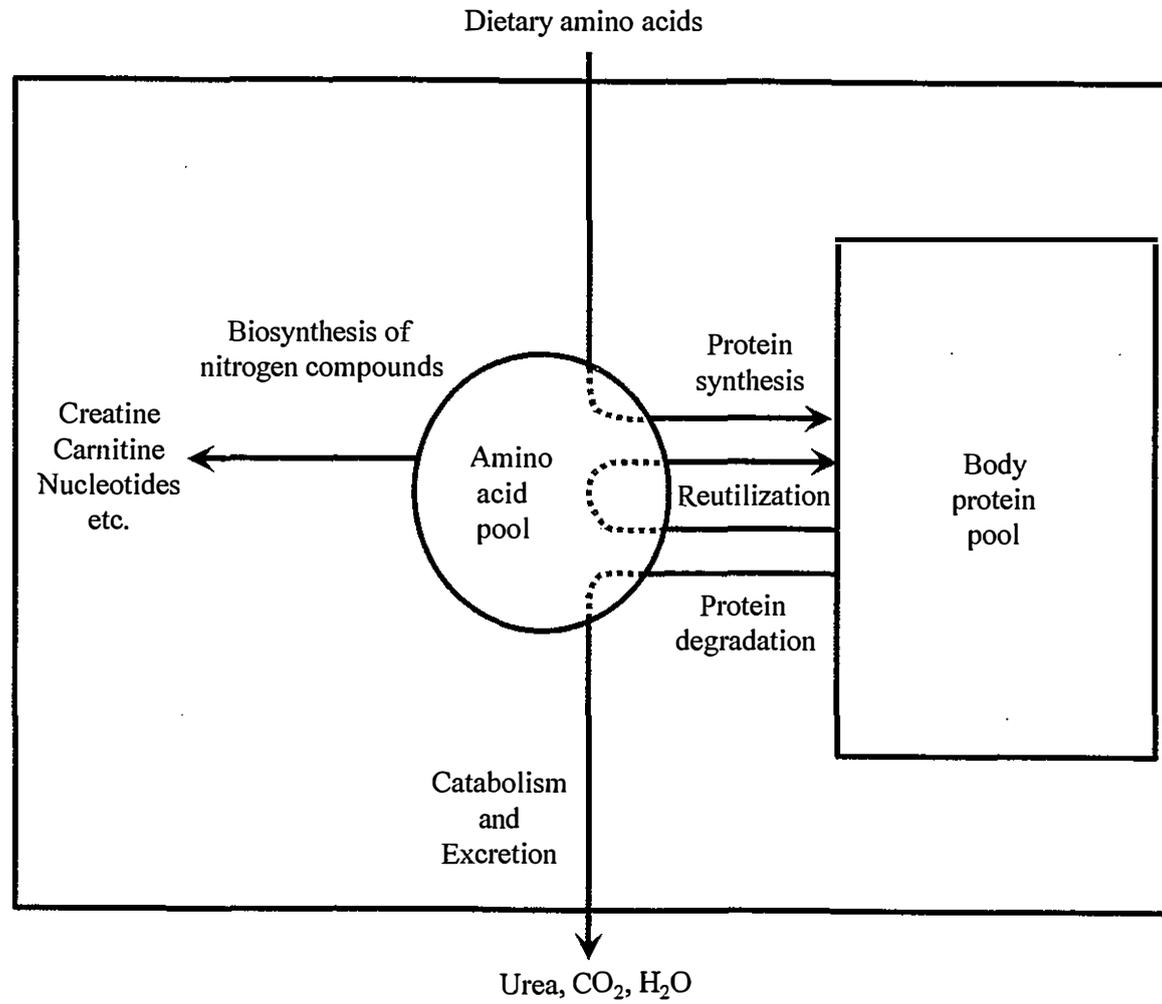
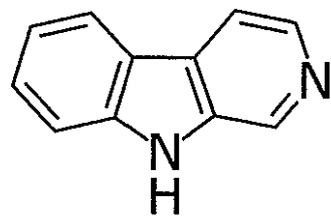
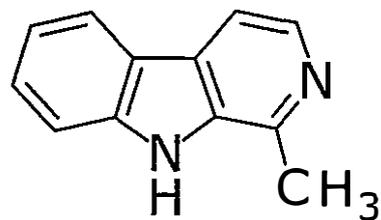


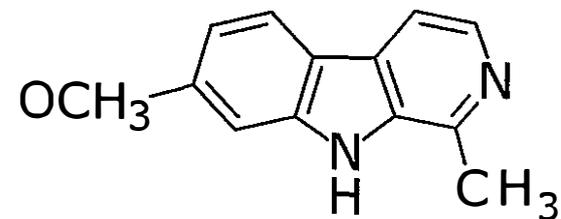
Fig. 4. Scheme of body protein turnover.



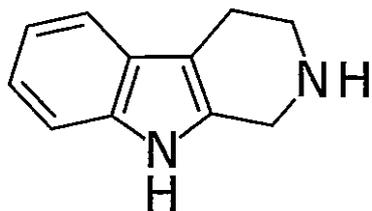
$\beta$ -Carboline skeleton  
(Norharman)



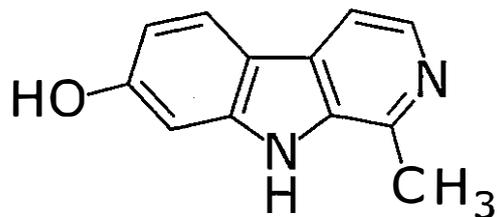
Harman



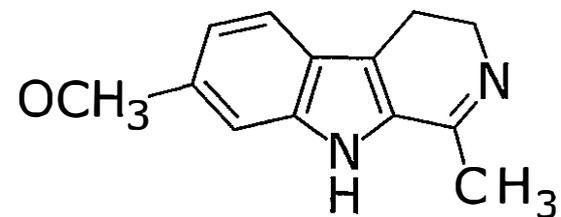
Harmine



TH $\beta$ C



Harmol



Harmaline

Fig. 5. Structure of  $\beta$ -carbolines

## 第2章 トリプトファン過剰添加飼料を給与したニワトリにおける血漿中糖化トリプトファン化合物濃度

### 第1節 目的

トリプトファンを過剰添加した飼料をニワトリに給与すると摂食量および増体量が減少することが報告されている (Edmonds and Baker, 1987; Baker *et al.*, 1996)。トリプトファンはセロトニンの前駆体であり、トリプトファンを脳室内に投与するとセロトニン作動性ニューロン系を介して摂食が抑制されることが示唆されている (Bungo *et al.*, 2008)。

トリプトファンの非酵素的糖化反応化合物であるグルコース - トリプトファンアマドリ化合物および PHP-TH $\beta$ C は、セロトニン同様、インドールアルカロイドに分類される化合物である。また、ニワトリは高血糖・高体温を特徴とする動物であり、非酵素的糖化反応化合物が産生されやすいことが知られている (Klandorf *et al.*, 1995; Iqbal *et al.*, 1999)。しかしながら、非酵素的糖化反応によって生成されたアミノ酸糖化産物の生理的血漿中濃度や生理機能に関する研究はほとんど行われていない。

そこで本章では、ニワトリにトリプトファンを過剰添加した飼料を給与し、血漿中のトリプトファン濃度と非酵素的糖化トリプトファン化合物濃度の関係を明らかにすることを目的とした。

## 第2節 材料および方法

### 1. 実験飼料の作製

#### 【材料】

- ・ 実験飼料の組成は Table 1 に示した。
- ・ Table 1 中のビタミン混合物およびミネラル混合物の組成を Table 2 に示した。
- ・ 大豆抽出タンパク質（不二製油株式会社、大阪）
- ・ コーンスターチ（日本食品加工株式会社、東京）
- ・ セルロース（日本製紙ケミカル株式会社、東京）
- ・ コーンオイル（J-オイルミルズ株式会社、東京）
- ・ 上記以外の材料は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。

#### 【操作】

- 1). Table 2 に示した組成表に従い、ビタミン混合物およびミネラル混合物を作製した。
- 2). Table 1 に示した組成表に従い、コントロール飼料（トリプトファン 0%過剰飼料）、トリプトファン 2%過剰飼料およびトリプトファン 3%過剰飼料を作製した。

### 2. ニワトリの飼養管理

#### 【材料】

- ・ 単冠白色レグホン雄ヒナ（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 幼雛用市販飼料（CP 20.7%、ME 2,892 kcal/kg、豊橋飼料株式会社、愛知）
- ・ ケージ（自作）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京）

#### 【操作】

- 1). 単冠白色レグホン雄ヒナ 60 羽を 8 日齢まで幼雛用市販飼料を与え、育雛器内で育てた。
- 2). 8 日齢のヒナ全てをケージ 1 区画あたり 2 羽ずつになるよう入れ、コントロール飼料を与えてケージおよび実験飼料に対する馴致を行った。この際、ケージから抜け出すまたは飼料を摂取しないヒナは淘汰した。
- 3). 10 日齢時に各処理区の平均体重が同じになるようにヒナを 27 羽選抜し、1 処理区当たり 9 羽ずつ 3 処理区に振り分けた。その後、それぞれの処理区用の実験飼料を自由摂取で 14 日間給与した。
- 4). 飼養試験最終日にヒナの体重および飼料摂取量を測定した後、エーテル麻酔をかけ心臓から採血を行った。

5). 血液は 5,000 x g、4℃の条件下で 20 分間遠心分離を行い、血漿を分離した後、-20℃で冷凍保存した。

### 3. 血漿の除タンパク質および脱脂

#### 【材料】

- ・ ニワトリ血漿 (3 処理区 × 9 反復 計 27 本)
- ・ アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 高速液体クロマトグラフ用蒸留水 (以下、蒸留水) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ クロロホルム (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ メタノール (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ アセチルトリプトファン (渡辺化学工業株式会社、広島)
- ・ 1/3 mM アセチルトリプトファン水溶液: アセチルトリプトファン 2.45 mg を 10 ml の蒸留水に溶解し調製した 1 mM アセチルトリプトファン水溶液を、3 倍希釈することで調製した。
- ・ サンプリングチューブ (0.6 ml、ビーエム機器株式会社、東京)
- ・ サンプリングチューブ (1.5 ml、イナ・オプティカ株式会社、大阪)
- ・ キャップ付滅菌凍結保存チューブ (2 ml、株式会社アシスト、大阪)
- ・ 遠沈管 (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ ダウエックス 50W × 8 50 - 100 メッシュ 強酸性陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>形) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA 1720、久保田商事株式会社、東京)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA 5910、久保田商事株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE - 2000、東京理科器械株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE - 3100、東京理科器械株式会社、東京)
- ・ 冷却トラップ装置 (UT - 1000、東京理科器械株式会社、東京)

#### 【操作】

- 1). 解凍した 27 本の血漿をそれぞれ 500 μl ずつ 15 ml 遠沈管に入れ、さらに内部標準として 1/3 mM アセチルトリプトファン水溶液を 63 μl 加えた後、アセトニトリルを 2 ml ずつ加えた。
- 2). 4℃、9,500 x g で 10 分間 × 2 回遠心分離し、上清を 2 ml 採取した。
- 3). 上清を遠心エバポレーターで乾固した。
- 4). 乾固したサンプルを蒸留水 500 μl で溶かし、クロロホルム-メタノール混合溶液 (2 : 1) を 2.5 ml 加えた。
- 5). 4℃、9,500 x g で 20 秒間遠心分離し、上層 (水層) を別の遠沈管に採取した。

- 6). 上清を採取した残りの下層（有機層）に、さらに蒸留水 500  $\mu\text{l}$  とクロロホルム-メタノール混合液（2 : 1）を 500  $\mu\text{l}$  加えた。
- 7). 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9,500 x g で 20 秒間遠心分離し、上層を採取して先の水層サンプルと一緒にした後、採取した水層サンプルを遠心エバポレーターで乾固した。
- 8). 0.6 ml サンプリングチューブにダウエックス 50W $\times$ 8 樹脂（以下、樹脂）を入れ、そこに蒸留水 200  $\mu\text{l}$  で溶かした乾固サンプルを注入し、トリプトファン、グルコース - トリプトファンアマドリ化合物、PHP-TH $\beta$ C およびアセチルトリプトファンを樹脂に吸着させた。
- 9). サンプリングチューブの底に小さい穴をあけ、キャップを切り取ったキャップ付滅菌凍結保存チューブに重ねて遠心分離（5,000 x g、1 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ ）を行い、樹脂に吸着後の溶液を取り除いた。そこに蒸留水を加えて樹脂を洗浄した。この操作を 10 回繰り返した。
- 10). 洗浄した後、樹脂に 3N  $\text{NH}_3$  を 200  $\mu\text{l}$  加えて一晩静置した。
- 11). 静置したサンプルを遠心分離（5,000 x g、1 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ ）し、 $\text{NH}_3$  溶液に溶出したトリプトファン、グルコース - トリプトファンアマドリ化合物、PHP-TH $\beta$ C およびアセチルトリプトファンを回収した。
- 12). 残った樹脂に 3N  $\text{NH}_3$  を 100  $\mu\text{l}$  加えて室温で 1 時間静置した後、5,000 x g、1 分間、4 $^{\circ}\text{C}$  で遠心分離して  $\text{NH}_3$  を回収した。この操作を 2 回行った。
- 13). 遠心エバポレーターを用いて  $\text{NH}_3$  溶液を乾固した。

#### 4. PHP-TH $\beta$ C の合成

##### 【材料】

- ・ D-グルコース (Glc、180.16 g  $\cdot$  mol $^{-1}$ ) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-トリプトファン (Trp、204.23 g  $\cdot$  mol $^{-1}$ ) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ NaOH (40.0g  $\cdot$  mol $^{-1}$ ) (5 N= 10 g/50 mL) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ダウエックス 50W $\times$ 8 50 - 100 メッシュ 強酸性陽イオン交換樹脂 (H $^+$ 形) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 3 N  $\text{NH}_3$  (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 250 mL ポリプロピレン製容器 (アズワン株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 50 ml シリンジ (テルモ株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE-2200 型 : 東京理科学機器株式会社、東京)

##### 【操作】

- 1). トリプトファン 0.51 g、グルコース 90 g および 5N NaOH を 2.5 ml を 250 ml の超純

水に溶解した。

- 2). 1) の溶液を 37 °C で 3 日間インキュベーションした。
- 3). ダウエックス 50W-X8 樹脂 (以下、樹脂) を 25 g 加え、よく振り混ぜた。
- 4). 3) を 37°C で 2 時間インキュベートした。
- 5). 50 mL シリンジに脱脂綿を入れ、25 ml の超純水で 8 回洗った。
- 6). 樹脂を脱脂綿ごと新しい容器に入れ、3N NH<sub>3</sub> を 150 mL 加えた。
- 7). 4°C で一晩インキュベーションした。
- 8). 50 mL シリンジに脱脂綿を詰め、7) の樹脂をシリンジに入れ、3N NH<sub>3</sub> を排出した。
- 9). 8) の溶液を 15 ml 遠沈管に 10 ml ずつ分注し遠心エバポレーターで真空濃縮した。
- 10). 9) の溶液を静置すると白色の結晶が析出する。上清を除き、結晶を超純水で懸濁してアシストチューブへ移した。
- 11). 23,000 x g で 1 分間遠心分離する。上清を除き、沈殿に少量の超純水を加えて懸濁した。
- 12). 11) を 9 回繰り返した。
- 13). 12) で残った結晶を水で懸濁し、遠心エバポレーターで乾固した。
- 14). LCMS を用いて (第 2 章第 2 節-5) 乾固物が PHP-THβC であることを確認した。

## 5. トリプトファン、グルコース - トリプトファンアマドリ化合物および PHP-THβC の検出

### 【材料】

- ・ HPLC ポンプ (PV-2080 型、日本分光株式会社、東京)
- ・ 脱気装置 (DG-2080-54 4 連型、日本分光株式会社、東京)
- ・ 低圧グラジェントユニット (LG-2080-04 型、日本分光株式会社、東京)
- ・ 磁場型質量分析計 (JMS-700 MStation、日本電子株式会社、東京)
- ・ HPLC カラム (100 mm×2 mm GEMINI 3 μm C18 110Å、Phenomenex、Torrance、CA、USA)
- ・ LCMS 用メタノール (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ギ酸アンモニウム (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 高速液体クロマトグラフ用蒸留水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ PHP-THβC (自作)

### 【操作】

- 1). LCMS の設定



中グルコース - トリプトファンアマドリ化合物濃度または血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度の間の相関係数および回帰式を SAS の REG プロシージャを用いて解析した。

血漿中グルコース - トリプトファンアマドリ化合物および PHP-TH $\beta$ C 濃度を次の回帰式で表した。

$$\text{アマドリ化合物 } (\mu\text{M}) = a + b \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M})$$

$$\text{PHP-TH}\beta\text{C } (\mu\text{M}) = a + b \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M})$$

### 第3節 結果

トリプトファン過剰飼料を給与したニワトリの、実験期間中における増体量、飼料摂取量および飼料効率を Table 3 に示した。増体量および摂食量は飼料へのトリプトファン添加量に伴い、有意に低下した ( $P < 0.05$ )。飼料効率は対照区とトリプトファン2%過剰区間に有意な差は認められなかった。一方、トリプトファン3%過剰区は対照区および2%過剰区と比較して有意な飼料効率の低下が認められた ( $P < 0.05$ )。

各処理区における血漿中のトリプトファン、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 濃度を Table 4 に示した。全ての処理区において血漿中のトリプトファン、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 濃度について有意な差は認められなかった。

血漿中のトリプトファン濃度と血漿中グルコース - トリプトファンアマドリ化合物または PHP-TH $\beta$ C 濃度との関係を明らかにするため回帰分析を行い、直線式を得た。その結果を Fig. 6 に示した。回帰式は以下の通りである。

$$\text{Amadori product } (\mu\text{M}) = 0.003 + 0.03 \text{ Tryptophan } (\mu\text{M}) \quad (r = 0.813, P < 0.05)$$

$$\text{PHP-TH}\beta\text{C } (\mu\text{M}) = -0.67 + 0.11 \text{ Tryptophan } (\mu\text{M}) \quad (r = 0.899, P < 0.05)$$

#### 第4節 考察

グルコースは非酵素的糖化反応によりアミノ酸やタンパク質と脱水縮合を起こし、シッフ塩基を形成する。シッフ塩基はさらに、アマドリ転位によってアマドリ化合物を形成する。アマドリ化合物はさらに多段階的な反応を起こし、AGEs となることが知られている。高血糖状態により糖化反応が亢進すると、AGEs の産生および蓄積量が増大する。また、AGEs は糖尿病合併症を引き起こす原因物質の 1 つと考えられている (Brownlee, 2001; Singh *et al.*, 2001; Goh and Cooper, 2008; Zhang *et al.*, 2009)。このように、AGEs の生理的機能に関する研究は広く行われている。その一方で、アミノ酸の非酵素的糖化反応化合物に関する知見はほとんど見当たらない。そこで本実験では、ニワトリにトリプトファンを過剰添加した飼料を与え、血漿中のトリプトファン濃度とトリプトファンの非酵素的糖化反応化合物濃度の関係を明らかにすることを目的とした。

Table 3 に示したように、トリプトファンを過剰添加した飼料を給与したニワトリの成長成績は有意に低下し、これは過去に報告された結果と一致した (Edmonds and Baker, 1987; Baker *et al.*, 1996)。

Table 4 に示したように、ニワトリの血中トリプトファン、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 濃度は各処理区間で有意な差は認められなかった。アミノ酸バランスを変化させた飼料をニワトリに給与するとアミノ酸異化酵素の活性が変化することが知られている (Das and Waterlow, 1974; Keene and Austic, 2001)。同様に、トリプトファンをラットに経口摂取させるとトリプトファンペルオキシダーゼ (トリプトファン-2,3-ジオキシゲナーゼ) 活性が亢進することが報告されている (Knox, 1951)。また、トリプトファンは代謝速度が早く (Møller, 1981)、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の中で、タンパク質および血漿中で割合が最も少ないアミノ酸であることが知られている (Le Floc'h *et al.*, 2011)。このことから、トリプトファン過剰添加飼料を 14 日間給与した本実験においては、トリプトファン過剰飼料にニワトリが適応し、トリプトファンの異化が亢進した可能性が存在する。それゆえトリプトファン過剰添加飼料の給与が血漿中のトリプトファン濃度に影響を与えなかったのではないかと考えられる。また、血漿中の糖化トリプトファン化合物濃度も飼料トリプトファン添加による影響を受けなかった。血漿中に存在する糖化トリプトファン化合物の量は、糖化トリプトファン化合物の合成量と、血漿中から各組織へ取り込み、体外への排泄、および分解などにより消失した量との差し引きで決まる。したがって、糖化トリプトファン化合物濃度が飼料中のトリプトファン量に影響を受けなかった原因としては以下の理由が考えられる。第一に、血漿中糖化トリプトファンの分解速度、排出速度、取り込み速度が合成速度に対して速い場合、血漿中トリプトファン濃度は低下する。第二に、血漿中トリプトファン合成速度が非常に緩やかであり、血漿中糖化トリプトファンの分解速度、排出速度、取り込み速度が速い場合にも血漿中トリプトファン濃度は低下する。

しかし、本研究の結果らから理由を特定するには至らず、今後の研究が必要である。

血漿中タンパク質の一つであるヘモグロビンとグルコースが結合したヘモグロビン A1c (HbA1c) は、およそ 1-2 ヶ月にわたる血中グルコース濃度の指標として用いられている (Koenig *et al.*, 1976; American Diabetes Association, 2010)。また、同じく血漿タンパク質の一つであるアルブミンとグルコースが結合したグリコアルブミンは、2 週間程度の血中グルコース濃度の指標になると報告されている (Tahara and Shima, 1995)。これは、HbA1c とグリコアルブミンが分解する速度、すなわち半減期の違いによるものである。これまで糖化トリプトファン分解速度は調べられてこなかったため、今後、糖化トリプトファン分解速度および分解機序を解明する必要があると考えられた。

また、血漿中のトリプトファン濃度と血漿中グルコース - トリプトファンアマトリ化合物濃度または血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度との間で正の相関が認められたことから (Fig. 6)、血漿中の糖化トリプトファン化合物濃度は、基質となる血漿中のトリプトファン濃度に依存している可能性も示された。

附表

Table 1. Composition of control (0%) and tryptophan-excess (2 and 3%) diets <sup>a</sup>

Tryptophan-excess level	0%	2%	3%
Composition	g/kg	g/kg	g/kg
ISP <sup>b</sup>	217.4	217.4	217.4
L-Methionine	1.3	1.3	1.3
L-Cystine	2.2	2.2	2.2
L-Threonine	0.4	0.4	0.4
L-Tryptophan	0.0	20.0	30.0
Cornstarch	489.4	469.4	459.4
Cellulose	194.8	194.8	194.8
Corn oil	30.0	30.0	30.0
Vitamin mixture	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture	60.0	60.0	60.0
Choline chloride	1.5	1.5	1.5
Inositol	1.0	1.0	1.0
CP (g/kg)	180.0	180.0	180.0
ME (kcal/kg)	2849.7	2847.9	2847.0

<sup>a</sup> Composition of diets was calculated according to NRC (1994).

<sup>b</sup> ISP is isolated soybean protein which contains 828 g CP/kg

Table 2. Composition of mineral and vitamin mixtures for young chickens

Mineral mixture	/kg of diet	Vitamin mixture	/kg of diet
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20.7 g	Thiamin hydrochloride	3 mg
CaCO <sub>3</sub>	14.8 g	Riboflavin	6 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0 g	Pyridoxine hydrochloride	4 mg
KCl	3.0 g	Nicotinic acid	40 mg
NaCl	6.0 g	Calcium pantothenate	15 mg
MgSO <sub>4</sub>	3.0 g	Folic acid	1.5 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	500 mg	Biotin	200 µg
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	350 mg	Cyanocobalamine	20 µg
KI	2.6 mg	Cholecalciferol	5 µg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	40 mg	Menadione	500 µg
ZnO	62 mg	D-Glucose	1.9 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.7 mg	Retinol acetate, in oil	1 mg in 30 g oil
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.3 mg	D,L-α-Tocopherol acetate, in oil	10 mg in 30 g oil
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	400 µg		

Table 3. Body weight gain, feed intake and feed efficiency of young chickens fed tryptophan-excess diets\*

Tryptophan-excess level	0%	2%	3%
Body weight gain (g)	124.6 ± 5.4 <sup>a</sup>	93.7 ± 6.3 <sup>b</sup>	63.9 ± 7.5 <sup>c</sup>
Feed intake (g)	313.0 ± 10.5 <sup>a</sup>	265.7 ± 8.3 <sup>b</sup>	222.0 ± 11.3 <sup>c</sup>
Feed efficiency (%)	39.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	35.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	28.2 ± 2.3 <sup>b</sup>

\* Experiment was performed for 14 days.

<sup>a-c</sup> Means with different superscript letters within the same row are significantly different (P<0.05) .

Values are means ± SE. n=9

Table 4. Tryptophan, Amadori product and PHP-TH $\beta$ C concentrations in the plasma of young chickens fed tryptophan-excess diets

Tryptophan-excess level	0%	2%	3%	P
Tryptophan ( $\mu$ M)	33.8 $\pm$ 2.8	28.3 $\pm$ 5.6	43.9 $\pm$ 15.3	0.513
Amadori product ( $\mu$ M)	1.4 $\pm$ 0.3 (4%)	0.8 $\pm$ 0.2 (3%)	1.4 $\pm$ 0.6 (3%)	0.420
PHP-TH $\beta$ C ( $\mu$ M)	3.1 $\pm$ 0.5 (9%)	2.5 $\pm$ 0.5 (9%)	3.9 $\pm$ 1.9 (9%)	0.717

There are no significance differences among all dietary treatment.

Values are means  $\pm$  SE. n=9.

\* % of Tryptophan concentration in the serum.

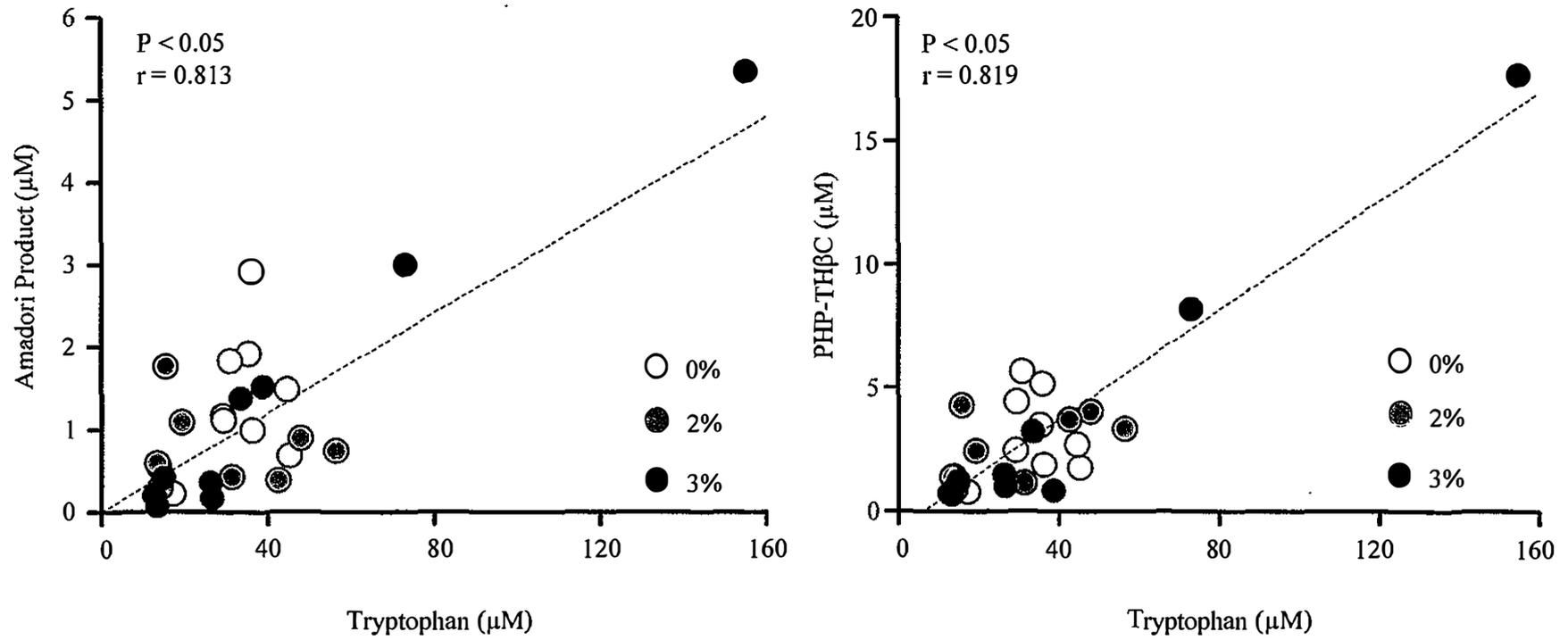


Fig. 6. Regression between tryptophan and either Amadori product or PHP-THβC in the plasma of chickens fed either control (0%) or tryptophan-excess (2 or 3%) diet for 14 days.

### 第3章 トリプトファンを過剰給与したニワトリの血漿中トリプトファン、トリプトファン代謝産物、糖化トリプトファン化合物濃度の経時的変化

#### 第1節 目的

前章ではトリプトファン過剰添加飼料をニワトリに14日間給与したにも関わらず、トリプトファンおよび糖化トリプトファン化合物の血漿中濃度に有意な差が認められなかった。これは、アミノ酸過剰飼料を長期的に動物へ給与すると、恒常性を保つためにアミノ酸異化が亢進したためであると考えられた。非酵素的ではあるが、アミノ酸の糖化反応はアミノ酸異化経路の一つであると考えられる。しかしながら、トリプトファンの糖化反応と他のトリプトファン異化反応との関係について調査した研究は見当たらない。

そこで本章では、食餌性のトリプトファン過剰が、トリプトファン異化反応を亢進するか否かを明らかにするため、トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに給与し、経時的な血漿中トリプトファン、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の経時的変化を調査した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 実験飼料の作製

#### 【材料】

実験飼料の組成および材料は第2章に準じた。

#### 【操作】

第2章と同様の方法で飼料を作製した。

### 2. ニワトリの飼養管理

#### 【材料】

- ・ 単冠白色レグホン雄ヒナ（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 幼雛用市販飼料（CP 20.7%、ME 2,892 kcal/kg、豊橋飼料株式会社、愛知）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京）

#### 【操作】

- 1). 単冠白色レグホン雄ヒナ 200 羽を 8 日齢まで幼雛用市販飼料を与え、育雛器内で育てた。
- 2). 8 日齢のヒナ全てをケージ 1 区画あたり 2 羽ずつになるよう入れ、コントロール飼料を与えてケージおよび実験飼料に対する馴致を行った。この際、ケージから抜出すまたは飼料を摂取しないヒナは淘汰した。
- 3). 10 日齢時に各処理区の平均体重が同じになるようにヒナを 72 羽選抜し、1 処理区当あたり 24 羽ずつ 3 処理区に振り分けた。その後、それぞれの処理区用の実験飼料を自由摂取で給与した。
- 4). 給与開始前のヒナを 3) と同じ平均体重のヒナを 6 羽選抜し、エーテル麻酔をかけた心臓から血液を採取した。
- 5). 血液は 5,000 x g、4℃の条件下で 20 分間遠心分離を行い、血漿を分離した後、-20℃で冷凍保存した。
- 6). 飼料を給与したヒナは 1, 3, 7 および 14 日目に各処理区 6 羽ずつエーテル麻酔をかけて心臓から採血した。
- 7). 血液は 5) の操作に準じて処理し、血漿は分析まで冷凍保存した。

### 3. 血漿の除タンパク質および脱脂

#### 【材料】

- ・ ニワトリ血漿
- ・ アセトニトリル（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ 蒸留水（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ クロロホルム（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ メタノール（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ ジエチルエーテル（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ 1 mM アセチルトリプトファン水溶液（第 2 章参照）
- ・ サンプリングチューブ（1.5 ml、イナ・オプティカ株式会社、大阪）
- ・ 遠沈管（グライナー・ジャパン株式会社、東京）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA 1720、久保田商事株式会社、東京）
- ・ 遠心エバポレーター（CVE - 3100、東京理科器械株式会社、東京）
- ・ 冷却トラップ装置（UT - 1000、東京理科器械株式会社、東京）

#### 【操作】

- 1). 解凍した血漿をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ 2 本の 1.5 ml サンプリングチューブに入れ、さらに内部標準として 1 mM アセチルトリプトファン水溶液を 5  $\mu$ l 加えた後、アセトニトリルを 400  $\mu$ l ずつ加えた。
  - 2). 4°C、9,500 x g で 10 分間 × 2 回遠心分離し、上清を 400  $\mu$ l 採取した。
  - 3). 上漿を遠心エバポレーターで乾固した。
  - 4). 乾固したサンプルを蒸留水 100  $\mu$ l で溶かし、1 本にはクロロホルム-メタノール混合溶液（2 : 1）を 500  $\mu$ l 加え、1 本にはジエチルエーテルを 500  $\mu$ l 加えた。
  - 5). 4°C、9,500 x g で 30 秒間遠心分離し、クロロホルム-メタノール混合溶液を加えたサンプルは上層（水層）を、ジエチルエーテルを加えたサンプルは下層（水層）を別のサンプリングチューブに採取した。
  - 6). 水層を採取した残りの層（有機層）に、さらに蒸留水 100  $\mu$ l とクロロホルム-メタノール混合液（2 : 1）またはジエチルエーテルを 200  $\mu$ l 加えた。
  - 7). 4°C、9,500 x g で 20 秒間遠心分離し、それぞれ水層を採取して先の水層サンプルと一緒にした後、採取した水層サンプルを遠心エバポレーターで乾固した。
4. トリプトファン、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 の検出

#### 【材料】

- ・ 液体クロマトグラフシングル四重極型質量分析計（LCMS-2020、株式会社島津製作所、京都）

- ・ HPLC カラム (50 mm × 2 mm GEMINI 3 μm C18 110Å、Phenomenex、Torrance、CA、USA)
- ・ LCMS 用アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ギ酸 (和光純薬工業株式会社、大阪)

## 【操作】

### 1). LCMS の設定

流速 0.4 ml/min

移動相 A : 0.1%ギ酸超純水

移動相 B : 0.1%アセトニトリル

B: 5 → 5 → 10 → 35 → 35%

0 → 2 → 3 → 5 → 7 min

イオン化法 DUIS positive

測定モード SIM (Selected Ion Monitoring)

トリプトファン (m/z = 205)

アマドリ化合物 (m/z = 367)

PHP-THβC (m/z = 367)

アセチルトリプトファン (m/z = 247)

- トリプトファン、トリプトファンおよびグルコース - トリプトファンアマドリ化合物の混合物、精製した PHP-THβC およびアセチルトリプトファンを 5 μl ずつ LCMS に連続して導入し、検量線を作成した。
- 第 2 節 3. で調製した乾固サンプルを 79.2 μl の蒸留水で溶解した後、LCMS-2020 に 5 μl ずつ導入し、トリプトファン、グルコース - トリプトファンアマドリ化合物および PHP-THβC を検出した。
- サンプル間に一定の間隔で等しい濃度のアセチルトリプトファンを 5 μl 導入し、機械の感度を補正した。
- 検出された血漿サンプルのピーク面積をスタンダードのピーク面積から作成した検量線に当てはめ、血漿サンプル中のトリプトファン、グルコース - トリプトファンアマドリ化合物、PHP-THβC およびアセチルトリプトファンの回収率を算出した。この結果、アセチルトリプトファンの回収率に差が見られなかったため、回収率による補正を行わなかった。

### 4. トリプトファン代謝産物の検出

## 【材料】

- ・ 高速液体クロマトグラフシングル四重極型質量分析計 (LCMS-2020、株式会社島津製作所、京都)
- ・ HPLC カラム (50 mm×2 mm GEMINI 3 μm C18 110Å、Phenomenex、Torrance、CA、USA)
- ・ LCMS 用アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ギ酸 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 3-ヒドロキシアントラニル酸 (3HAA、SIGMA-ALDRICH JAPAN、東京)
- ・ アントラニル酸 (AnA、和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ キヌレン酸 (KA、和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ キヌレニン (KYN、SIGMA-ALDRICH JAPAN、東京)
- ・ キサンツレン酸 (XA、和光純薬工業株式会社、大阪)

## 【操作】

### 1). LCMS の設定

流速 0.4 ml/min

移動相 A : 0.1%ギ酸超純水

移動相 B : 0.1%アセトニトリル

B: 0 → 40%

0 → 10 min

イオン化法 ESI positive

測定モード SIM (Selected Ion Monitoring)

3HAA (m/z = 154.2)

AnA (m/z = 138.2)

KA (m/z = 190.2)

KYN (m/z = 209.1)

XA (m/z = 206.2)

アセチルトリプトファン (m/z = 247.0)

- 2). 3HAA、AnA、KA、KYN、XA およびアセチルトリプトファンの混合物を 5 μl ずつ LCMS に連続して導入し、検量線を作成した。
- 3). 第 2 節 3. で調製した乾固サンプルを 79.2 μl の超純水で溶解した後、LCMS-2020 に 5 または 20 μl ずつ導入し、3HAA、AnA、KA、KYN、XA およびアセチルトリプトファンを検出した。
- 4). サンプル間に一定の間隔で等しい濃度のアセチルトリプトファンを 5 μl 導入し、機械の感度を補正した。
- 5). 検出された血漿サンプルのピーク面積をスタンダードのピーク面積から作成した

検量線に当てはめ、血漿サンプル中の 3HAA、AnA、KA、KYN、XA およびアセチルトリプトファンの濃度を算出した。

## 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 9, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 2013) を用いて統計処理を行った。二元配置分散分析を用いてトリプトファン過剰飼料給与および飼料給与日数の効果を要因分析した。

また、血漿中トリプトファン濃度と血漿中グルコース - トリプトファンアマドリ化合物濃度または血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度の間の相関係数および回帰式を SAS の REG プロシージャを用いて解析した。

血漿中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 濃度を次の回帰式で表した。

$$\text{アマドリ化合物 } (\mu\text{M}) = a + b \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M})$$

$$\text{PHP-TH}\beta\text{C } (\mu\text{M}) = a + b \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M})$$

### 第3節 結果

トリプトファン過剰添加飼料を給与したニワトリの増体量、飼料摂取量および飼料効率を Fig. 7 に示した。実験飼料給与開始から3日目以降で、トリプトファン3%過剰飼料給与群の増体量が対照区（トリプトファン過剰添加飼料0%区）と比較して有意に低下した。また、14日目ではトリプトファン2%過剰添加飼料区においても対照区と比較して有意に増体量が減少した。飼料摂取量は、トリプトファン3%過剰添加飼料区では7日目から、トリプトファン2%過剰添加飼料区では14日目に対象区と比べて有意に低下した。飼料効率においては、1日目はトリプトファン2%過剰添加飼料区が対照区に比べて有意に高い値となったがその後は有意な差が認められなかった。一方、トリプトファン3%過剰添加飼料区では実験期間中を通して、対照区よりも有意に低い値であった。

トリプトファン過剰添加飼料を給与したニワトリの血漿中トリプトファンおよびトリプトファン代謝産物の濃度を Fig. 8 に示した。血漿中トリプトファン濃度は、1日目ではトリプトファン2 および3%過剰添加飼料区で、3日目はトリプトファン3%過剰添加飼料区において対照区よりも有意に高い値を示した。その後、7日目以降は処理区間に有意な差は認められなかった。血漿中アマドリ化合物濃度は、飼料給与1日目では食餌性トリプトファン過剰レベルに応じて有意に上昇した。また、3日目では3%トリプトファン過剰飼料区で、7日目および14日目は2%トリプトファン過剰飼料区で対照区と比較して、有意に血漿中アマドリ化合物濃度が上昇した。血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度は飼料給与期間と飼料の間に交互作用が認められず、飼料の主効果のみが有意であった。血漿中キヌレニン濃度は、1 および3日目まで食餌性のトリプトファン過剰レベルに応じて有意に上昇した。7日目はトリプトファン2 および3%過剰添加飼料区が、14日目はトリプトファン3%過剰添加飼料区が対照区よりも有意に血漿中キヌレニン濃度を高めた。対照区のキサンツレン酸濃度は検出限界（100 fmol、signal-noise ratio (S/N 比) >10) 以下であった。また、3日目においてのみトリプトファン3%過剰添加飼料区が2%過剰添加飼料区に比べて有意にキサンツレン酸濃度が高かった。血漿中アントラニル酸濃度は、1日目はトリプトファン2 および3%過剰添加飼料区において対照区よりも有意に高く、3日目以降はトリプトファン3%過剰添加飼料区が対照区に対して有意に濃度が高まった。また、キヌレン酸および3-ヒドロキシアントラニル酸の定量も試みたが、全ての処理区でどちらも検出限界（それぞれ250 fmol および300 fmol）以下であった。

血漿中のトリプトファン濃度と糖化トリプトファン化合物であるアマドリ化合物または PHP-TH $\beta$ C 濃度の間の相関を統計処理ソフト (SAS) を用いて算出した。その結果を Fig. 9 に示した。回帰式は以下のとおりである。

$$\text{アマドリ化合物 } (\mu\text{M}) = 5.08 + 0.106 \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M}) \quad (r = 0.776, P < 0.05)$$

$$\text{PHP-TH}\beta\text{C } (\mu\text{M}) = 5.06 + 0.134 \cdot \text{トリプトファン } (\mu\text{M}) \quad (r = 0.756, P < 0.05)$$

#### 第4節 考察

生物には自身の状態を一定に保っておこうとする性質、すなわち恒常性（ホメオスタシス）が備わっている。例えば、食餌によって一過性に血糖値が上がると、膵臓からインスリンが分泌されて血糖値を低下させる。また、絶食により血糖値が低下した場合は膵臓からグルカゴンが分泌されて、グリコーゲンの分解などにより血糖値を押し上げる（Braun and Sweazea, 2008）。これはグルコースに限らず、トリプトファンのようなアミノ酸が一過性に上昇した時にも恒常性を保とうとする機構が働くと考えられる。前章ではニワトリにトリプトファン過剰添加飼料を14日間給与したにも関わらず、血漿中のトリプトファン濃度への影響が認められなかった。このことから、ニワトリにおいて、トリプトファン過剰飼料に対する恒常性が14日間の間に働いたと推察される。そこで本章では、トリプトファン過剰添加飼料を1、3、7および14日間給与したニワトリの血漿中トリプトファン代謝産物濃度を調査した。トリプトファンの9割以上はキヌレニン代謝経路によって分解されることが定説である（Takikawa, 2005）。そこで、酵素によるトリプトファン異化産物としてキヌレニン、キヌレン酸、アントラニル酸、3-ヒドロキシアントラニル酸およびキサントレン酸の血漿中濃度を、非酵素的なトリプトファン異化産物としてトリプトファン分解代謝産物としてアマドリ化合物および PHP-TH $\beta$ C の血漿中濃度を測定した。

Fig. 7に示したとおり、トリプトファン過剰添加飼料を給与すると成長成績は低下することが示された。この結果は前章で得られた結果と一致する。

Fig. 8では血漿中のトリプトファンおよびトリプトファン異化産物濃度の継時的変化を示した。トリプトファンの血漿中濃度は7日目以降でトリプトファン過剰添加飼料の影響が認められなかった。この結果は前章で得られた結果と一致する。すなわち、トリプトファン過剰添加飼料の給与によって3日目までは血漿中トリプトファン濃度は上昇するが、その後、トリプトファン異化経路が亢進することで恒常性が保たれるものと推察される。糖化トリプトファンであるアマドリ化合物と PHP-TH $\beta$ C の血漿中濃度の経時的変化は、統計的に一致しなかったが、Fig. 9に示したように、血漿中のトリプトファン濃度と糖化トリプトファン化合物濃度が有意な高い相関を示したことから、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た。

酵素によるトリプトファン分解では、Tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO) および Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) が律速酵素であると考えられている。特に肝臓で強発現する TDO の欠損は、血漿中トリプトファン濃度を9.3倍にまで引き上げることが報告されている（Kanai *et al.*, 2009）。血漿中キヌレニン濃度は、飼料給与14日間を通して対照区よりもトリプトファン3%過剰添加飼料区の方が有意に上昇していることから、トリプトファン異化酵素の発現が強まったと考えられる。また、キヌレニンからアントラニル酸への異化は、Kynureninaseによって、キサントレン酸への異化は Kynurenine 3-monooxygenase (KMO) によって3-ヒドロキシキヌレニンに変換された後に

Kynurenine aminotransferase (KAT)によって変換される (Maddison and Giorgini, 2015)。Fig. 8 に示したように、アントラニル酸およびキサントレン酸の血漿中濃度も飼料給与14日間通して上昇した。特に、キサントレン酸は対照区では検出限界 ( $100 \text{ fmol}/5 \mu\text{l} = 0.02 \mu\text{M}$ ) を下回ったのに対し、トリプトファン過剰添加飼料区では14日間高濃度を維持していた。この結果から、トリプトファン過剰添加飼料によって KMO または KAT の酵素活性が高まったと推察された。

トリプトファン過剰添加飼料を給与したにも関わらず血漿中トリプトファン濃度が上昇しなかった前章の結果は、トリプトファン異化酵素活性の高まりによって血漿中トリプトファンがキヌレニン代謝経路へと流れたことが原因である可能性が示唆された。また、糖化トリプトファン濃度は、血漿中トリプトファン濃度に依存することも明らかになった。

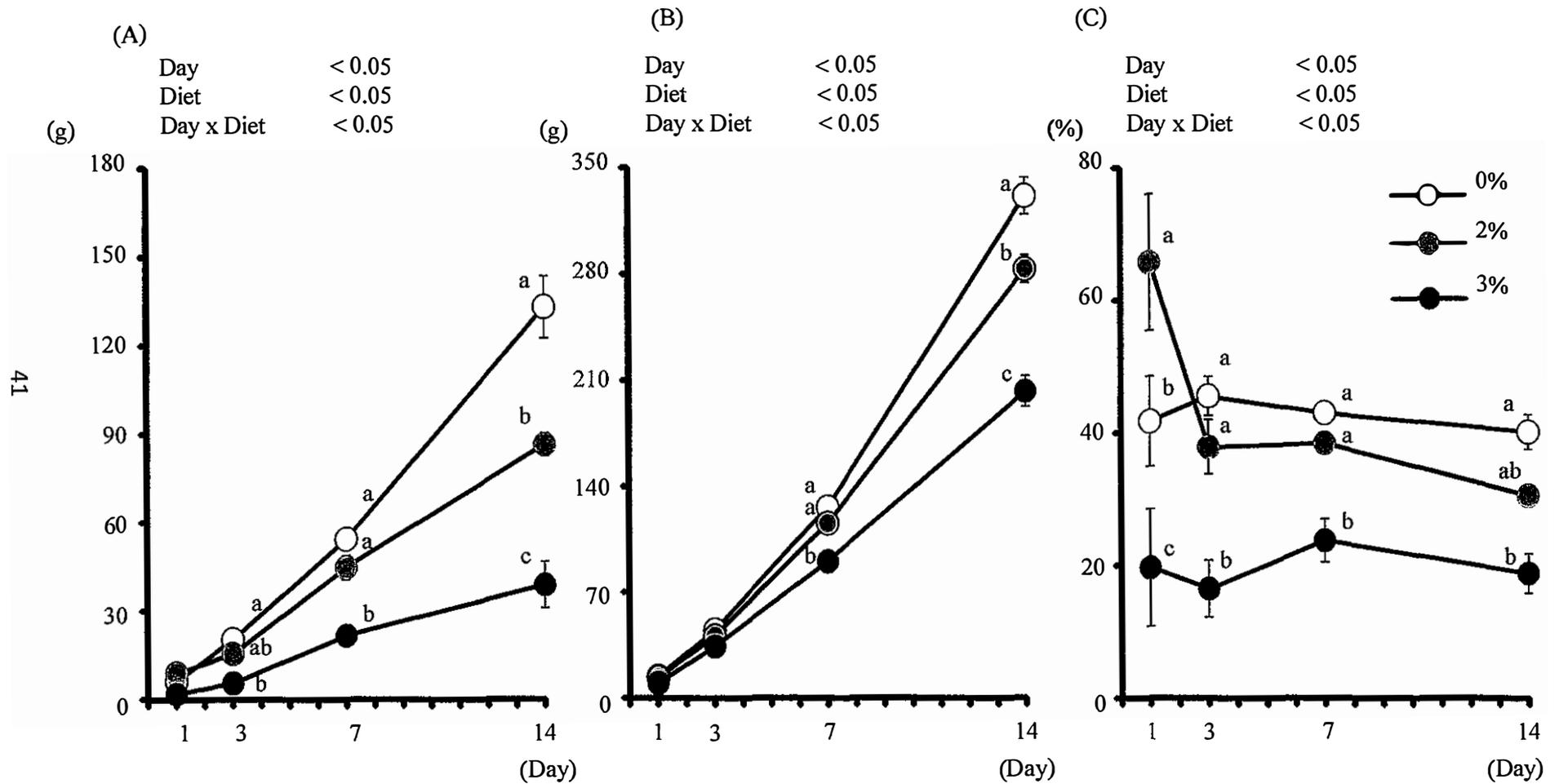


Fig. 7. Influence of excess dietary tryptophan intake on body weight gain (A), feed intake (B) and feed efficiency (C) of young chickens.  
<sup>a-c</sup> Means on the same day with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

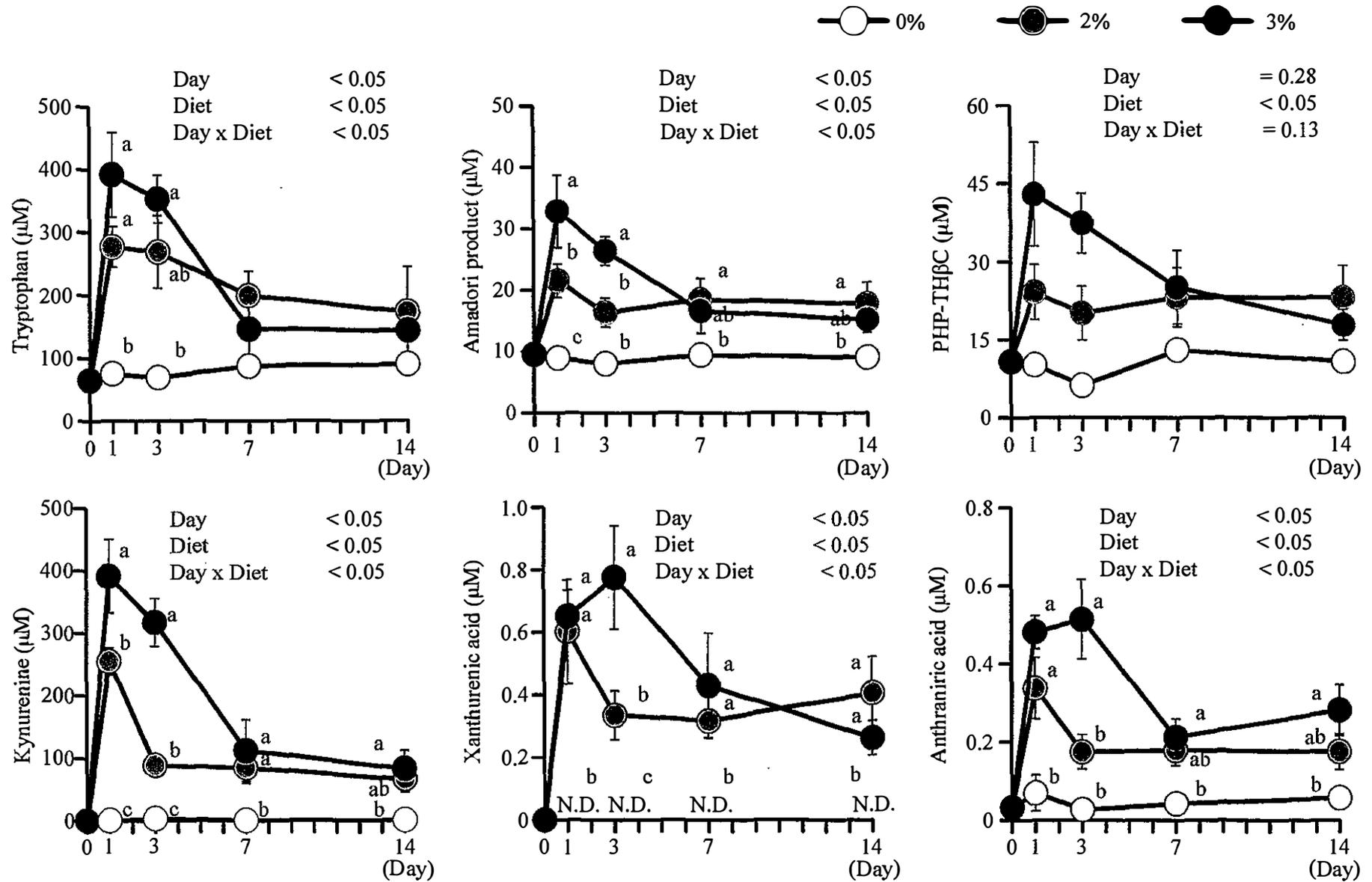


Fig. 8. Time course changes in tryptophan and its metabolites concentration in the plasma of chickens fed tryptophan-excess diets for 14 days.  
<sup>a-c</sup> Means on the same day with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

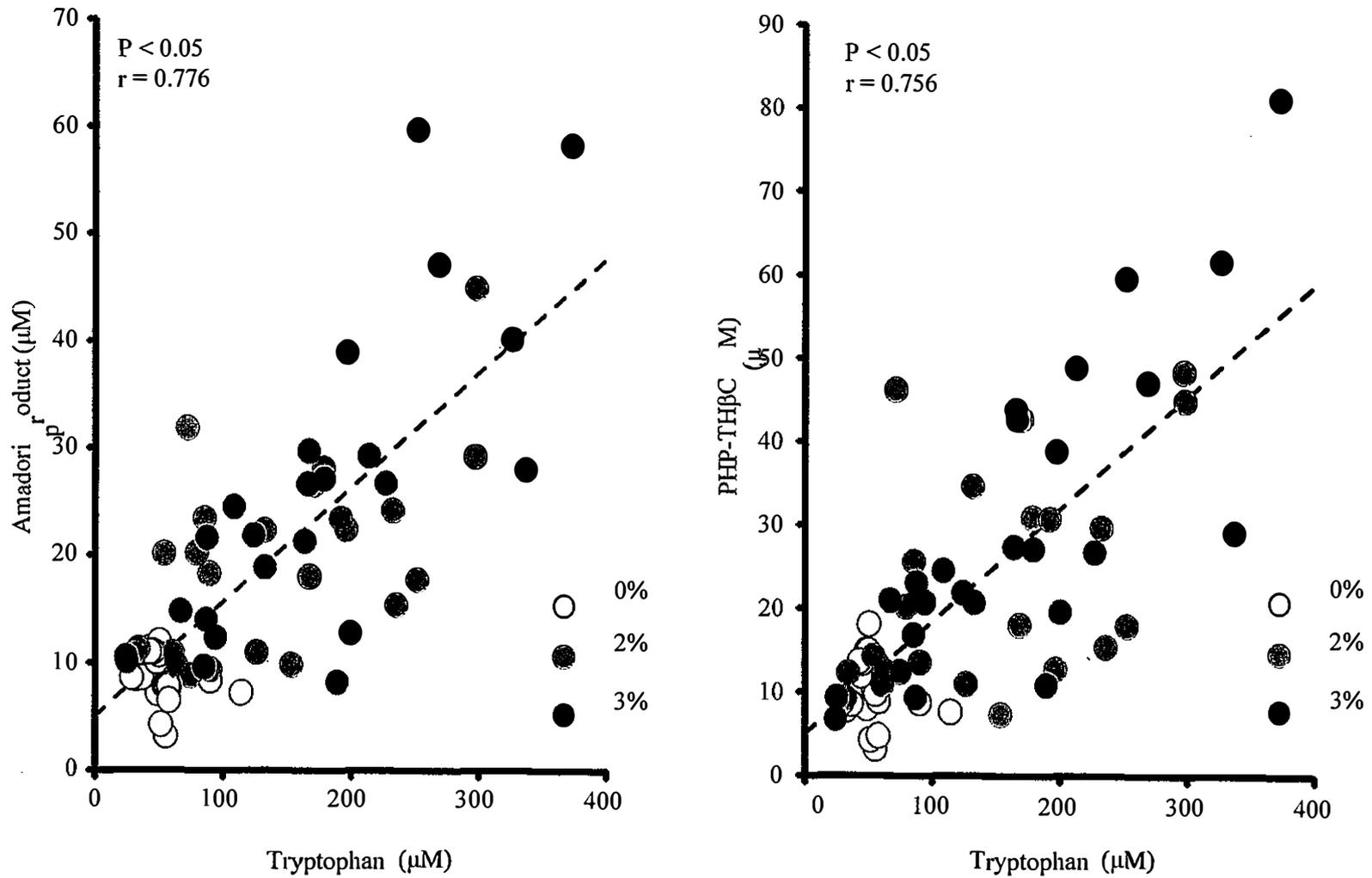


Fig- 9. Regression between tryptophan and either Amadori product or PHP-THβC in the plasma of chickens fed either control (0%) or tryptophan-excess (2 or 3%) diet for 14 days.

## 第4章 ニワトリにおける糖化トリプトファン化合物の血漿中半減期

### 第1節 目的

前章では、血漿中の糖化トリプトファン化合物濃度が血漿中トリプトファン濃度に依存していることが示された。生体内に存在する多くの化合物は合成と分解のバランスによって恒常性が保たれている。しかし、これまで糖化トリプトファン化合物の合成および分解速度について調査した報告は見当たらない。

本章では糖化トリプトファン化合物、特に PHP-TH $\beta$ C の分解に着目した。生体内における物質の分解は、その物質の半量が入れ替わる時間（半減期）を指標とすることができる (Sugden and Fuller, 1991; Funatogawa *et al.*, 2007)。そこで本章では、ニワトリに PHP-TH $\beta$ C を静脈注射し、血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度の経時的変化を非線形回帰式を用いて表すことにより半減期を求め、PHP-TH $\beta$ C の異化速度について論じることを目的とした。

## 第2節 材料および方法

### 1. PHP-TH $\beta$ C の合成

#### 【材料】

材料は第2章に準じた。

#### 【操作】

第2章と同様の方法で PHP-TH $\beta$ C を合成した。

### 2. ニワトリの飼養管理

#### 【材料】

- ・ 単冠白色レグホン雄ヒナ（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 幼雛用市販飼料（CP 20.7%、ME 2,892 kcal/kg、豊橋飼料株式会社、愛知）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京）
- ・ DPBS（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ PHP-TH $\beta$ C

#### 【操作】

- 1). 単冠白色レグホン雄ヒナ 100 羽を 7 日齢まで幼雛用市販飼料を与え、育雛器内で育てた。
- 2). 7 日齢のヒナを各処理区の平均体重が同じになるようにヒナを 60 羽選抜した。1 処理区あたり 6 羽ずつ振り分けた。生理食塩水投与群を 15 分および 1440 分後採血群に、PHP-TH $\beta$ C 投与群を 15、30、60、180、360、720 および 1440 分後採血群とした。
- 3). 給与開始前のヒナを 3) と同じ平均体重のヒナを 6 羽選抜し、エーテル麻酔をかけ心臓から血液を採取した。
- 4). 生理食塩水投与群には DPBS を、PHP-TH $\beta$ C 投与群には PHP-TH $\beta$ C を 114 nmol/0.2 ml/70 g BW となるように翼下静脈から投与した。
- 5). 投与後、0、15、30、60、180、360、720 および 1440 分が経過したヒナにエーテル麻酔をかけ心臓から血液を採取した。
- 6). 血液は 5,000 x g、4°C の条件下で 20 分間遠心分離を行い、血漿を分離した後、-20°C で冷凍保存した。

### 3. 血漿の除タンパク質および脱脂

### 【材料】

第3章に準じた。

### 【操作】

第3章と同様の方法で血漿の除タンパク質および脱脂を行った。

## 4. PHP-TH $\beta$ C の検出および定量

### 【材料】

- ・ 液体クロマトグラフシングル四重極型質量分析計 (LCMS-8040、株式会社島津製作所、京都)
- ・ HPLC カラム (50 mm  $\times$  2 mm GEMINI 3  $\mu$ m C18 110Å、Phenomenex、Torrance、CA、USA)
- ・ LCMS 用アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ギ酸 (和光純薬工業株式会社、大阪)

### 【操作】

#### 1). LCMS の設定

流速 0.4 ml/min

移動相 A : 0.1%ギ酸超純水

移動相 B : 0.1%アセトニトリル

B: 5  $\rightarrow$  5  $\rightarrow$  10  $\rightarrow$  35  $\rightarrow$  35%

0  $\rightarrow$  2  $\rightarrow$  3  $\rightarrow$  5  $\rightarrow$  7 min

イオン化法 APCI positive

測定モード SIM (Selected Ion Monitoring)

トリプトファン (m/z = 205)

アマドリ化合物 (m/z = 367)

PHP-TH $\beta$ C (m/z = 367)

アセチルトリプトファン (m/z = 247)

その他操作は第3章に準じた。

## 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 9, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 2013) を用いて統計処理を行った。PHP-TH $\beta$ C 投与群の投与 30、60、180、360 分後の血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度から、SAS の非線形回帰分析 (NLIN Procedure) を用いて PHP-TH $\beta$ C の半減期を計算した。血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度を次の回帰式で表した。

$$\text{PHP-TH}\beta\text{C } (\mu\text{M}) = a \cdot \exp(-\lambda \cdot \text{投与後時間}) + b$$

また、この減少関数において、血漿中 PHP-TH $\beta$ C の存在量が半分になるために要する時間 ( $t_{1/2}$ ; 半減期) は次の式で表せる。

$$t_{1/2} = \log 2 / \lambda$$

### 第3節 結果

PHP-TH $\beta$ C を投与したニワトリの血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度の継時的変化を Fig. 10 に示した。

投与前の血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度は 9.1  $\mu$ M であった。血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度は、投与後 30 分で最も高くなり、16.1  $\mu$ M まで上昇した。また、投与後 360 分でニワトリの血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度は 9.1  $\mu$ M まで減少し、投与前と同等の濃度まで低下した。そこで、PHP-TH $\beta$ C 投与 30 分後を血漿中 PHP-TH $\beta$ C の最高濃度、投与 360 分後に PHP-TH $\beta$ C が消失したとして、統計処理ソフトを用いてニワトリ生体内における PHP-TH $\beta$ C の半減期を算出したところ、PHP-TH $\beta$ C の生体内半減期は 99.02 分であった。また、血中 PHP-TH $\beta$ C の消失速度を求めるため、非線形回帰分析を行い、次式を得た：PHP-TH $\beta$ C 濃度 ( $\mu$ M) =  $9.04 \cdot \exp(-0.007 \cdot \text{投与後時間 (min)}) + 8.82$ 。

#### 第4節 考察

タンパク質の糖化ではタンパク質のリジン残基に存在するアミノ基をグルコースが修飾することが知られている (Ikeda *et al.*, 1996; Rabbani and Thornalley, 2012)。この化合物をリジンアマドリ化合物 (フルクトースリジン) と呼び、さらに酸化的開裂によってカルボキシメチルリジン (CML : Carboxy methyl lysine) と呼ばれる AGEs を生成する (Ikeda *et al.*, 1996; Hudson *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2012)。アマドリ化合物をラットの尾静脈から投与すると、投与したアマドリ化合物の 45% は 60 分で尿中へと排泄されることが報告されている (Hultsch *et al.*, 2006)。また、CML をマウスに静脈投与した際に、投与後 60 分で 41% が、120 分で 72% が膀胱へと移行することが報告されている (Xu *et al.*, 2013)。

本実験では、トリプトファンとグルコースが結合した PHP-TH $\beta$ C をニワトリの翼下静脈から投与した。血漿中 PHP-TH $\beta$ C 濃度の経時的変化から、PHP-TH $\beta$ C の血中半減期を計算したところ、99.02 分という結果を得た (Fig. 10)。先に報告されていたリジンアマドリ化合物および CML の報告と概ね一致していることから、血漿中からの PHP-TH $\beta$ C の消失には、アマドリ化合物や AGEs の排泄機構が関与している可能性が示唆された。

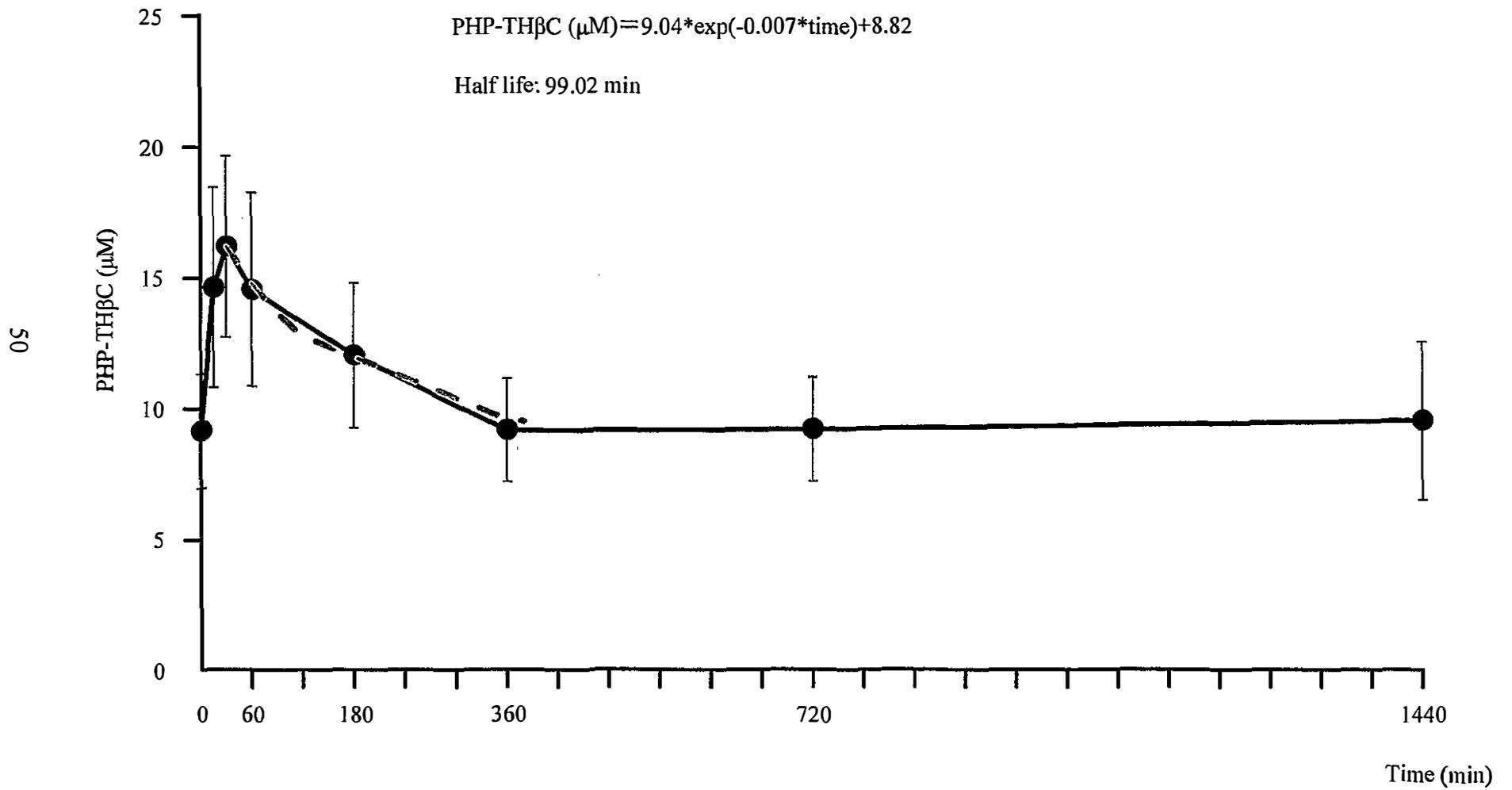


Fig. 10. Time course change in PHP-TH $\beta$ C concentration in the plasma of chickens after intravenous administration of PHP-TH $\beta$ C.

## 第5章 ニワトリ組織中への糖化トリプトファン化合物の蓄積

### 第1節 目的

これまでの結果から、ニワトリの血中糖化トリプトファン化合物濃度が血中トリプトファン濃度に依存することを示した。また、糖化トリプトファン化合物の一つである PHP-TH $\beta$ C の半減期が 99 分程度であることを明らかにした。しかし、糖化トリプトファンの代謝に関する各組織の関与については不明な点が多い。そこで本章では、糖化トリプトファンの一つである 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ことを目的とした。

Kita (2011, 2014) の研究によって、グルコースとアルブミンまたは 20 種類のアミノ酸混合物を基質とする糖化反応化合物をニワトリに静脈注射した後に、糖化反応化合物が、ニワトリのどの組織に蓄積するかを明らかにした。しかしながら、単一アミノ酸から得られた糖化反応化合物の組織取り込みに関する知見はなく、その継時的な変化も明らかにされていない。

そこで本章では、放射性同位元素で標識した PHP-TH $\beta$ C をニワトリに静脈注射し、ニワトリのどの組織に PHP-TH $\beta$ C が取り込まれるかを調査した。また、投与後の組織を継時的に採取し、組織に取り込まれた PHP-TH $\beta$ C の経時的变化を調査し、各組織における PHP-TH $\beta$ C の代謝について検討した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 実験飼料の作製

#### 【材料】

実験飼料の組成および材料は第2章に準じた。

#### 【操作】

第2章と同様の方法で飼料を作製した。

### 2. 放射性標識した PHP-TH $\beta$ C の合成

#### 【材料】

- ・ グルコース (Glc, 180.16 g  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ トリプトファン (Trp, 204.23 g  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-[5-<sup>3</sup>H]-トリプトファン (0.74-1.11 TBq/mmol, 1 mCi=37 MBq/ml) (American Radiolabeled Chemicals Inc., MO, USA)
- ・ NaOH (40.0 g  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) (5 N= 10 g/50 mL) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ ダウエックス 50W  $\times$  8 50 - 100 メッシュ 強酸性陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>形) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 3 N NH<sub>3</sub> (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 250 mL ポリプロピレン製容器 (アズワン株式会社、大阪)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 50 ml シリンジ (テルモ株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE-2200 型 : 東京理科機器株式会社、東京)

#### 【操作】

- 1). トリプトファン 0.51 g、L-[5-<sup>3</sup>H]-トリプトファン 500  $\mu$ l、グルコース 90 g および 5N NaOH を 2.5 ml を 250 ml の超純水に溶解する。この時、トリプトファンの比放射線量は 7.4 GBq/mmol となった。
- 2). 1) の溶液を 37  $^{\circ}$ C で 3 日間インキュベーションした。
- 3). ダウエックス 50W - X8 樹脂 (以下、樹脂) を 25 g 加え、よく振り混ぜた。
- 4). 3) を 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。
- 5). 50 mL シリンジに脱脂綿を入れ、25 ml の超純水で 8 回洗った。
- 6). 樹脂を脱脂綿ごと新しい容器に入れ、3N NH<sub>3</sub> を 150 mL 加えた。
- 7). 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。

- 8). 50 mL シリンジに脱脂綿を詰め、7) の樹脂をシリンジに入れ、3N NH<sub>3</sub> を排出した。
- 9). 8) の溶液を 15 ml 遠沈管に 10 ml ずつ分注し遠心エバポレーターで真空濃縮した。
- 10). 9) の溶液を静置すると白色の結晶が析出する。上清を除き、結晶を超純水で懸濁してアシストチューブへ移した。
- 11). 23,000 xg で 1 分間遠心分離する。上清を除き、沈殿に少量の超純水を加えて懸濁した。
- 12). 11) を 9 回繰り返した。
- 13). 12) で残った結晶を水で懸濁し、真空エバポレーターで乾固した。
- 14). 得られた PHP-TH $\beta$ C を 5 mM となるように超純水に溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定したところ、PHP-TH $\beta$ C の比放射線量は 1.11 MBq/mmol であった。

## 2. ニワトリの飼養管理

### 【材料】

- ・ 単冠白色レグホン雄ヒナ (小岩井農牧株式会社、岩手)
- ・ 幼雛用市販飼料 (CP 20.7%、ME 2,892 kcal/kg 豊橋飼料株式会社、愛知)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京)
- ・ 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (PerkinElmer Inc., CA, USA)
- ・ ポリ濾紙 (ポリエチレンろ紙 Aqua、株式会社千代田テクノル、東京)

### 【操作】

- 1). 単冠白色レグホン種雄ヒナ 50 羽を 8 日齢まで幼雛用市販飼料を与え、育雛器内で育てた。
- 2). 8 日齢のヒナ全てをケージ 1 区画あたり 2 羽ずつになるよう入れ、コントロール飼料を与えてケージおよび実験飼料に対する馴致を行った。この際、ケージから抜け出すまたは飼料を摂取しないヒナは淘汰した。
- 3). 10 日齢時に各処理区の平均体重が同じになるようにヒナを 16 羽選抜し、コントロール (トリプトファン過剰 0%) 飼料給与区とトリプトファン過剰添加飼料給与区に 8 羽ずつ振り分けた。
- 4). 各処理区のヒナに [<sup>3</sup>H] で標識した PHP-TH $\beta$ C を翼下静脈から 1,000 Bq/0.2 ml/100 g BW となるように投与した。
- 5). 投与したヒナはコート紙を底面に敷いた単飼ケージで所定の時間単飼した。
- 6). PHP-TH $\beta$ C 投与後、30、60、180 および 360 分後に各処理区、各時間 2 羽のニワトリにジエチルエーテルで麻酔をかけ、心臓から血液を採取し、大脳、中脳、小脳、眼、心臓、肺、腺胃、筋胃、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、精巣、十二指腸、空腸、回

腸、盲腸、直腸、浅胸筋、深胸筋および皮膚を採取した。

- 7). 採取した血液は 5,000  $\mu$ g、4°C の条件下で 20 分間遠心分離を行い、血漿を分離した後に -20°C で冷凍保存した。
- 8). 採取した組織は重量測定後、およそ 0.4 g を取り分け、サンプリングチューブに入れて液体窒素で速やかに凍結した。凍結後は分析まで -20°C で保存した。
- 9). 単飼期間中の排泄物を回収し、ガラスバイアルへ採取した。
- 10). 排泄によって濡れたポリ濾紙を 2.5 x 2.5 cm に裁断し、ガラスバイアルに採取した。
- 11). 上記 1) から 10) の操作をさらに 2 回繰り返した。

#### 【材料】

- 水酸化ナトリウム (和光純薬株式会社、大阪)
- ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (以後 Triton-X) (和光純薬株式会社、大阪)
- 0.5%NaOH/0.1%Triton-X:超純水 200 ml に水酸化ナトリウム 1 g と Triton-X を 0.2 ml 加えて溶解した。
- ペッスル型ホモジナイザー (アズワン株式会社、大阪)
- 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold, PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb B3 110TR, PerkinElmer Inc., CA, USA)

#### 【操作】

- 1). 血漿を 200  $\mu$ l ずつ液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れ、液体シンチレーションカクテルを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。
- 2). 組織サンプルの入ったサンプリングチューブは、サンプリングチューブ重量を測定した後に、組織を含めた重量を測定した。
- 3). サンプリングチューブに 0.5% NaOH/0.1% Triton-X を 0.6 ml 加えて、重量を測定した。
- 4). ペッスル型ホモジナイザーで組織サンプルを破砕した後に、重量を測定した。
- 5). 組織サンプルを 80°C で 16 時間インキュベートした後に、重量を測定した。
- 6). 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルの重量を測定した。
- 7). 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに組織サンプルを移し、重量を測定した。
- 8). 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに液体シンチレーションカクテルを 5 ml 加えてよく混合した後に、液体シンチレーションカウンターで放射線量

を測定した。

- 9). 測定した重量から操作で失った組織重量を補正し、組織 1 g 当たりの放射線量を計算した。
- 10). 排泄物が入ったガラスバイアルへ液体シンチレーションカクテルを 5 ml 加え、放射線量を測定した。
- 11). ポリ濾紙が入ったガラスバイアルへ液体シンチレーションカクテルを 5 ml 加え、放射線量を測定した。
- 12). 10 および 11 の放射線量を加算し、排泄物中の放射能とした。

## 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 9, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 2013) を用いて統計処理を行った。組織中の放射線量は、三元配置分散分析法を用いて、飼料、組織および PHP-TH $\beta$ C 投与後時間の効果を要因分析した。血漿中および排泄物中の放射線量は二元配置分散分析法を用いて、飼料と PHP-TH $\beta$ C 投与後の時間の効果を要因分析した。また、PHP-TH $\beta$ C 投与 30、60、180 および 360 分後の血漿中および組織中放射線量から、SAS の非線形回帰分析 (NLIN Procedure) を用いて血漿中および各組織中の PHP-TH $\beta$ C の半減期を計算した。血漿中および組織中の放射線量の変化を次の回帰式で表した。

$$\text{血漿中放射線量 (Bq/ml)} = a \cdot \exp(-\lambda \cdot \text{投与後時間}) + b$$

$$\text{組織中放射線量 (Bq/g tissue)} = a \cdot \exp(-\lambda \cdot \text{投与後時間}) + b$$

この時、回帰式のパラメーターが収束しなかった組織および回帰式の Probability が  $P > 0.05$  となる組織については回帰式を求めなかった。

回帰式が求められた場合、放射線量が半分になるまでに要する時間 ( $t_{1/2}$ ; 半減期) は次の式で表した。

$$t_{1/2} = \log 2 / \lambda$$

### 第3節 結果

Table 5 に各臓器中の放射線量に対する分散分析表を、Fig. 11 に投与後時間毎の組織中放射線量を示した。飼料（トリプトファン添加0 および3%）の主効果は認められず、 $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C 投与後時間および組織の主効果が有意であった（ $P<0.01$ ）。また、3 要因の交互作用は認められなかったものの、飼料と投与後時間の間（ $P<0.05$ ）および投与後時間と組織（ $P<0.01$ ）の間に交互作用が認められた。給与飼料の違いを考慮せず  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C 投与後時間ごとに組織 1 g 当たりの放射線量を調査すると、0.5 および1 時間までは腎臓中への放射線量が多く、3 時間以降は盲腸中の放射線量が高いことが示された。

Table 6 に血漿中の放射線量に対する分散分析表を、Fig. 12 に血漿中放射線量の継時的変化を示した。飼料の違いと  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C 投与後時間の間には交互作用は認められず、投与後時間のみが有意であった（ $P<0.01$ ）。投与時間の経過に伴い、血漿中の放射線量が減少することが示された。

Table 7 に排泄物中の放射線量に対する分散分析表を、Fig. 13 に排泄物中の放射線量の継時的変化を示した。飼料の違い（ $P<0.05$ ）と  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C 投与後時間（ $P<0.01$ ）の主効果がそれぞれ有意であった。飼料の違いと投与後時間の間には交互作用は認められなかった。トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに給与すると排泄物中の放射線量は有意に減少した。また、排泄された放射線量は継時的に増加することが示された。

Table 8 に血漿中および組織中の放射線量の回帰式および半減期を示した。大脳および盲腸は飼料の違いに関係なく、回帰式を得ることができなかった。また、小脳は対照飼料区のみ、中脳、回腸および直腸はトリプトファン過剰添加飼料区においてのみ、回帰式が得られた。線胃は PHP-TH $\beta$ C 投与 1 時間後の組織中放射線量が最も高かったため、1 時間後から 6 時間後までの放射線量で回帰式を計算した。その他の組織および血漿は有意な回帰式を求めることができた。トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける中脳中半減期は 3199.1 分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける小脳中半減期は 2520.5 分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける眼中的  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C の半減期は 24.2 分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける眼中半減期は 71.1 分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける心臓中の  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C の半減期は 78.2 分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける心臓中半減期は 42.3 分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける肺中の  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C の半減期は 46.2 分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける肺中半減期は 49.2 分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける線胃中の  $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ C の半減期は 72.4 分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける線胃中半減期は 106.7 分であった。トリプトファン

ン0%添加飼料を給与したニワトリにおける筋胃中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は55.8分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける筋胃中半減期は45.6分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける肝臓中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は48.1分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける肝臓中半減期は47.8分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける腎臓中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は69.6分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける腎臓中半減期は30.2分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける脾臓中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は110.1分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける脾臓中半減期は143.7分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける膵臓中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は11.7分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける膵臓中半減期は47.6分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける精巢中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は105.7分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける精巢中半減期は32.1分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける十二指腸中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は112.8分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける十二指腸中半減期は55.2分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける空腸中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は203.3分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける空腸中半減期は49.4分であった。トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける回腸中半減期は128.1分であった。トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける直腸中半減期は85.4分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける浅胸筋中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は48.3分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける浅胸筋中半減期は44.8分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける深胸筋中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は54.7分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける深胸筋中半減期は25.0分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける皮膚中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は52.4分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける皮膚中半減期は29.1分であった。トリプトファン0%添加飼料を給与したニワトリにおける血漿中中の $^3\text{H}$ -PHP-TH $\beta$ Cの半減期は42.8分であり、トリプトファン3%添加飼料を給与したニワトリにおける血漿中中半減期は31.9分であった。

## 第4節 考察

アルブミンまたは 20 種類のアミノ酸混合物とグルコースから生成した糖化化合物をニワトリに静脈注射すると、投与後 30 分後で肝臓、腎臓および脾臓に糖化反応化合物が蓄積した (Kita, 2011, 2014)。これらの報告では肝臓への蓄積が顕著であったが、本研究においては腎臓への蓄積が著しく多く、PHP-TH $\beta$ C は腎臓に速やかに取り込まれることが明らかとなった。血漿中および腎臓中において放射線量が継時的に低下し、同時に排泄物中の放射線量が増加していることから、翼下静脈から投与した PHP-TH $\beta$ C は腎臓を介して排泄されていることが明らかになった。この結果は、前章で述べたように、リジンアマドリ化合物や CML の排泄と同様であった (Hultsch *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013)。したがって、ニワトリの生体内における PHP-TH $\beta$ C の排泄には、アマドリ化合物や AGEs の排泄機構が関与している可能性が示唆された。

血漿中の放射線量はトリプトファン過剰添加飼料給与による影響を受けなかった。その一方で、排泄物中の放射線量はトリプトファン過剰添加飼料給与によって低下したことから、食餌性トリプトファンは血漿中の PHP-TH $\beta$ C 異化速度を変化させないものの、生体内からの PHP-TH $\beta$ C 排泄を抑制する可能性が示された。

そこで、各組織中放射線量の継時的変化から回帰式を得て、組織中の PHP-TH $\beta$ C 半減期を計算した (Table 8)。大脳、中脳および小脳中の放射線量は投与後ほぼ一定であり、トリプトファン 3% 過剰添加飼料区の中脳および対照飼料区の小脳を除き、有意な回帰式を得ることはできなかった。眼、腺胃、脾臓および膀胱はトリプトファン過剰添加飼料区が対照区に比べて半減期が 130-400% に長くなっており、その他の組織ではトリプトファン過剰添加飼料区が対照区よりも半減期が短かった。このことから、眼、腺胃、脾臓および膀胱は PHP-TH $\beta$ C の排泄が遅い可能性が考えられた。PHP-TH $\beta$ C 投与 3 および 6 時間後において盲腸の放射線量が有意に高くなっていたニワトリの盲腸は哺乳類とは異なった形状をしており、その機能も哺乳類とは大きく異なっている。しかし、なぜニワトリの盲腸に PHP-TH $\beta$ C が集積しているのかは不明であり、今後の研究が必要であると考えられた。

第4章において血漿中 PHP-TH $\beta$ C の半減期は 99 分と示したが、本章の実験では対照区では 42.8 分、トリプトファン過剰添加飼料区では 31.9 分となった (Table 8)。第4章では 7 日齢のニワトリヒナを、本章では 17 日齢のニワトリヒナを用いたことから、前章と本章における結果の違いとして、実験に用いたニワトリの日齢の違いが考えられた。

附表

Table 5. Three-way ANOVA of the incorporation of [<sup>3</sup>H]-PHP-TH $\beta$ C in various tissues of chickens fed tryptophan-excess diets

Factors	Degree of freedom	Probability of F ratio
Diet	1	=0.15
Time	3	<0.01
Tissue	20	<0.01
Diet x Time	3	<0.05
Diet x Tissue	20	=0.99
Time x Tissue	60	<0.01
Diet x Time x Tissue	60	=0.88

Table 6. Two-way ANOVA of radioactivity in the plasma of chickens administrated [<sup>3</sup>H]-PHP-TH $\beta$ C via wing vein

Factors	Degree of freedom	Probability of F ratio
Diet	1	=0.53
Time	3	<0.01
Diet x Time	3	=0.83

Table 7. Two-way ANOVA of radioactivity in the excreta of chickens administrated [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC via wing vein

Factors	Degree of freedom	Probability of F ratio
Diet	1	<0.01
Time	3	<0.01
Diet x Time	3	=0.44

Table 8. Regression equation and half life of radioactivity in various tissues and plasma of chickens fed tryptophan-excess diet and administrated [<sup>3</sup>H]-PHP-TH $\beta$ C via wing vein

Tissue	Diet	Regression equation	Probability	Half life (min)
Cerebrum	0%	-	=0.26	-
	3%	-	=0.69	-
Mesencephalon	0%	Convergence criterion did not met	-	-
	3%	=0.7234exp(-0.0130·TIME)	<0.01	3199.1
Cellebrullem	0%	=0.5585exp(-0.0165·TIME)	<0.01	2520.5
	3%	-	=0.33	-
Eye	0%	=1.1964exp(-1.7166·TIME)+0.4417	<0.01	24.2
	3%	=1.007exp(-0.585·TIME)+0.3026	<0.05	71.1
Heart	0%	=2.7654exp(-0.5319·TIME)	<0.01	78.2
	3%	=3.4032exp(-0.9836·TIME)+0.4205	<0.01	42.3
Lung	0%	=2.9525exp(-0.8999·TIME)+0.3411	<0.01	46.2
	3%	=3.9088exp(-0.8459·TIME)+0.2618	<0.01	49.2
Proventriculus *	0%	=1.1273exp(-0.5743·TIME)+0.6394	<0.05	72.4
	3%	=1.3546exp(-0.3899·TIME)+0.4747	<0.01	106.7
Gizzard	0%	=1.5024exp(-0.7453·TIME)+0.5922	<0.01	55.8
	3%	=2.5177exp(-0.9126·TIME)+0.4745	<0.01	45.6
Liver	0%	=15.9002exp(-0.864·TIME)+0.5354	<0.01	48.1
	3%	=15.9146exp(-0.8693·TIME)+0.5121	<0.01	47.8
Kidney	0%	=35.0235exp(-0.5976·TIME)	<0.01	69.6
	3%	=69.2218exp(-1.3786·TIME)+1.3794	<0.01	30.2
Spleen	0%	=5.1957exp(-0.3778·TIME)+0.079	<0.01	110.1
	3%	=3.9273exp(-0.2894·TIME)+1.4484	<0.01	143.7
Pancreas	0%	=6.7713exp(-3.5418·TIME)+1.1968	<0.01	11.7
	3%	=2.3010exp(-0.8744·TIME)+1.0309	<0.01	47.6
Testis	0%	=7.3743exp(-0.3933·TIME)+1.3858	<0.01	105.7
	3%	=14.6677exp(-1.2944·TIME)+2.4483	<0.01	32.1
Duodenum	0%	=1.7715exp(-0.3687·TIME)+0.4916	<0.01	112.8
	3%	=2.0949exp(-0.7531·TIME)+0.657	<0.01	55.2
Jejunum	0%	=2.1873exp(-0.2046·TIME)	<0.01	203.3
	3%	=3.2952exp(-0.8423·TIME)+0.5582	<0.01	49.4
Ileum	0%	Convergence criterion did not met	-	-
	3%	=4.0938exp(-0.3247·TIME)+0.3077	<0.01	128.1
Cecum	0%	-	-	-
	3%	-	-	-
Rectum	0%	-	=0.70	-
	3%	=17.2837exp(-0.4868·TIME)+1.7964	<0.01	85.4
Major	0%	=2.4447exp(-0.8602·TIME)+0.3925	<0.01	48.3
	3%	=1.665exp(-0.9273·TIME)+0.3832	<0.01	44.8
Minor	0%	=1.8586exp(-0.7597·TIME)+0.3495	<0.01	54.7
	3%	=4.2107exp(-1.6663·TIME)+0.3209	<0.01	25.0
Skin	0%	=9.2836exp(-0.7941·TIME)+0.4406	<0.01	52.4
	3%	=17.5049exp(-1.4281·TIME)+1.3170	<0.01	29.1
Plasma	0%	=13.611exp(-0.9715·TIME)+0.8449	<0.01	42.8
	3%	=18.1457exp(-1.3049·TIME)+1.1421	<0.01	31.9

\* The regression equation of proventriculus was calculated by using data after administration from 1 to 6 hours.

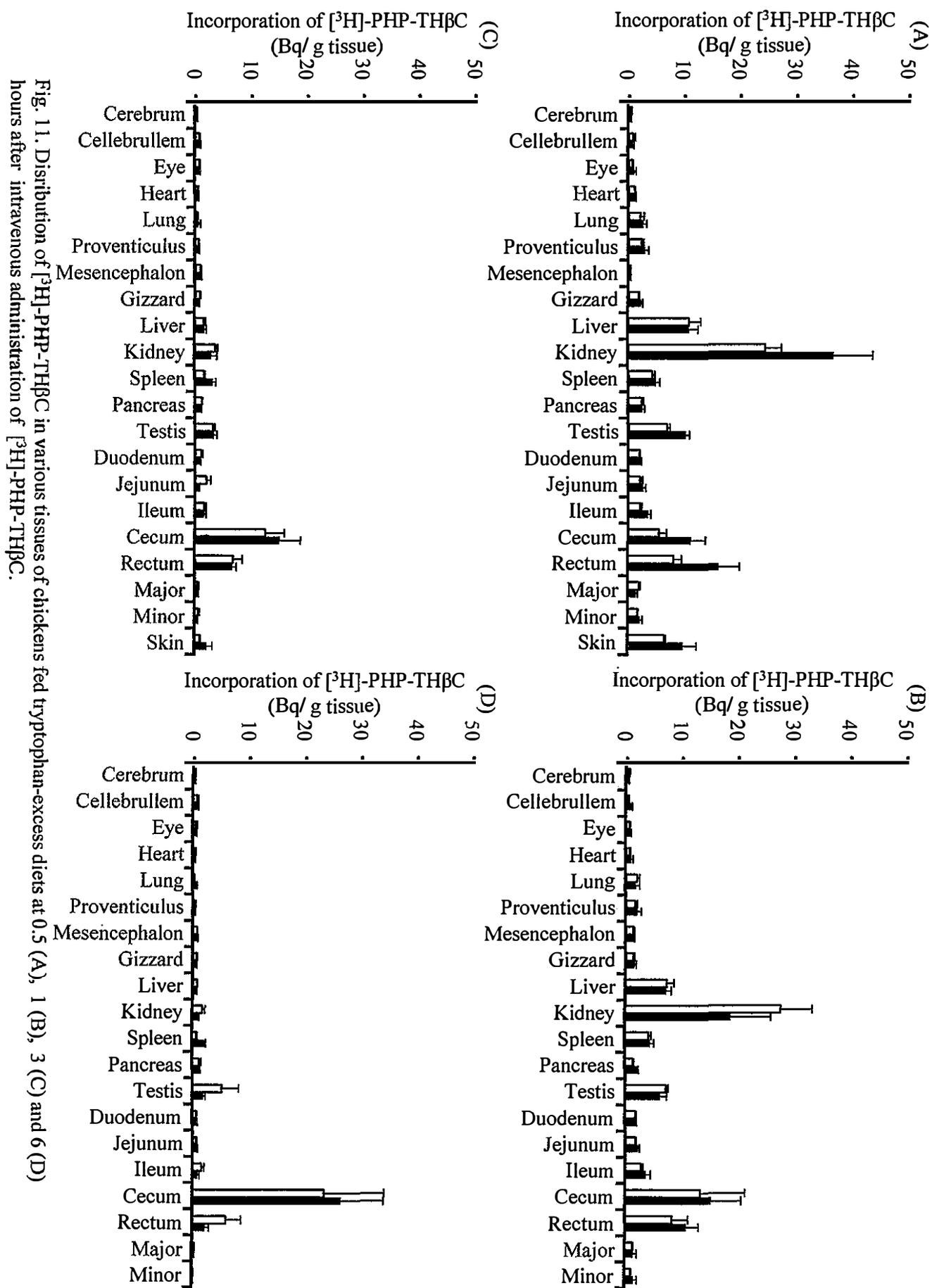


Fig. 11. Distribution of  $[^3\text{H}]\text{-PHP-TH}\beta\text{C}$  in various tissues of chickens fed tryptophan-excess diets at 0.5 (A), 1 (B), 3 (C) and 6 (D) hours after intravenous administration of  $[^3\text{H}]\text{-PHP-TH}\beta\text{C}$ .

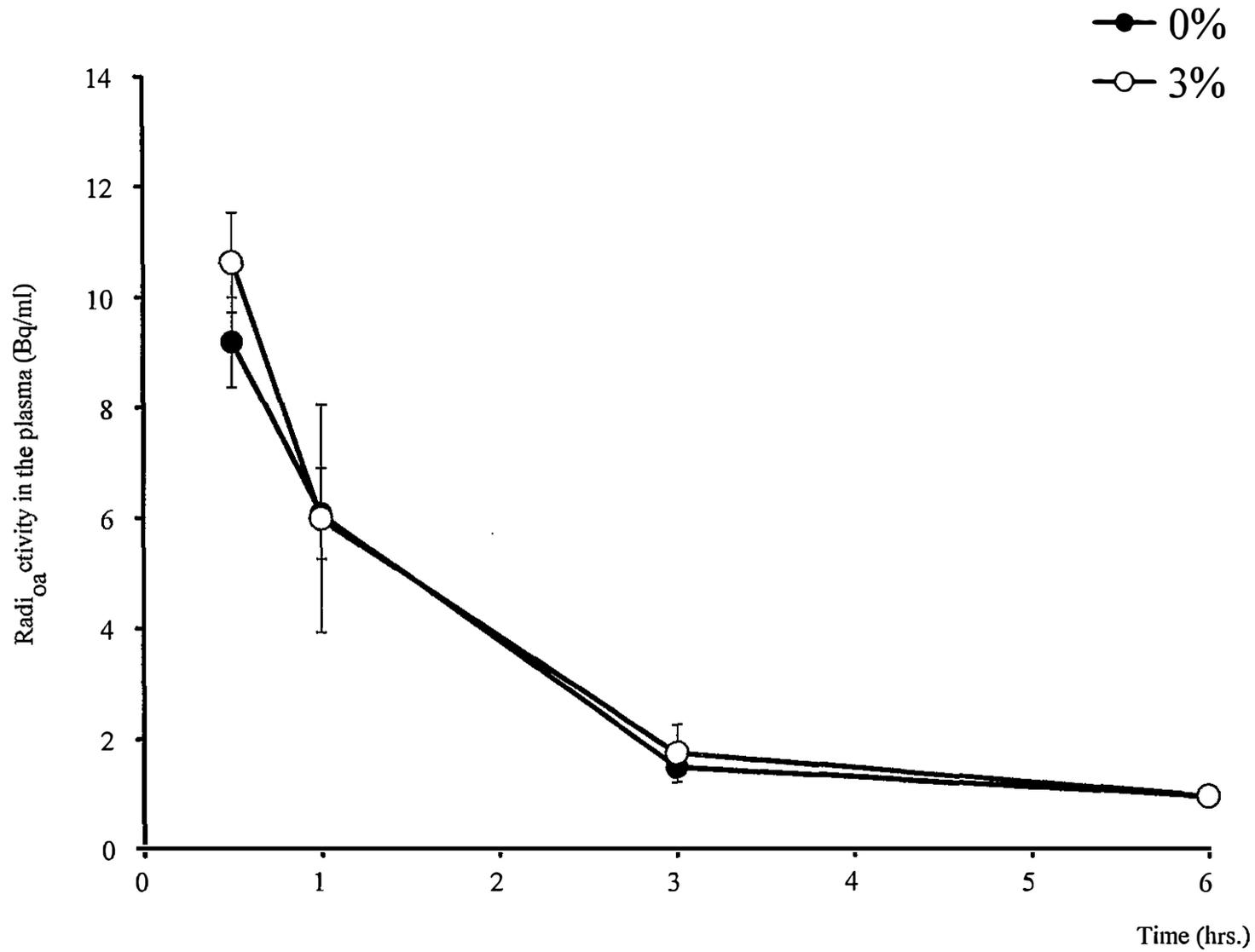


Fig. 12. Time course change in  $[^3\text{H}]\text{-PHP-TH}\beta\text{C}$  in the plasma of chickens fed tryptophan-excess diets and administered  $[^3\text{H}]\text{-PHP-TH}\beta\text{C}$  via wing vein.

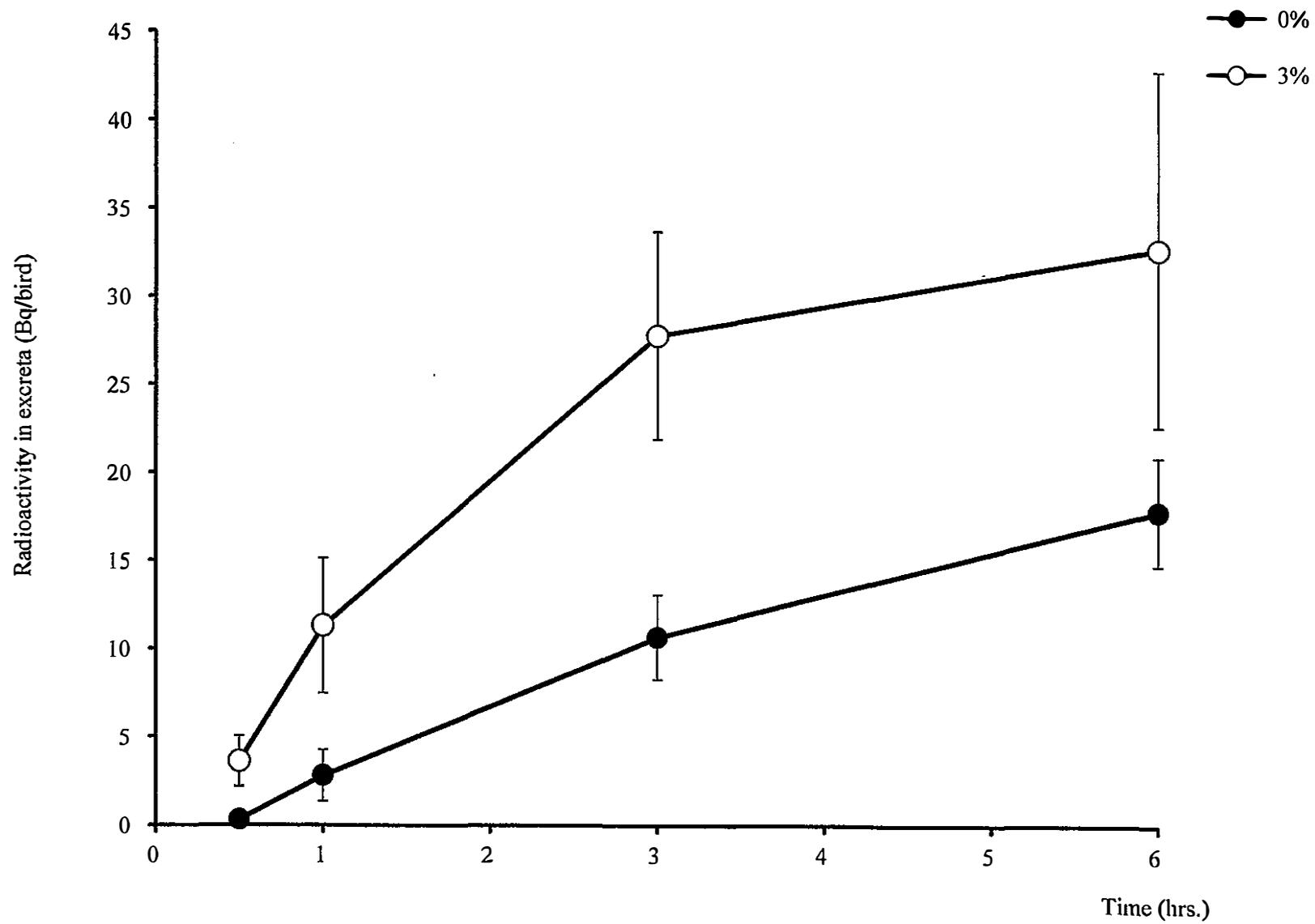


Fig. 13. Time course change in  $[^3\text{H}]$ -PHP-TH $\beta$ C in the excreta of chickens fed tryptophan-excess diet and administrated  $[^3\text{H}]$ -PHP-TH $\beta$ C via wing vein.

## 第6章 ニワトリ胚由来細胞への糖化トリプトファン化合物の取り込み

### 第1節 目的

前章では、ニワトリの翼下静脈から糖化トリプトファン化合物の一つである PHP-TH $\beta$ C を投与し、各組織への取り込みおよび半減期を求めた。その結果から、肝臓および腎臓が糖化トリプトファン代謝に重要な働きを有している可能性が示された。また、Kita (2011、2014) の報告から、ニワトリにおける糖化化合物代謝には脾臓も関与している可能性がある。

そこで本章では、放射性同位元素で標識した糖化トリプトファン化合物を用いて、ニワトリ胚から採取した初代培養細胞への糖化トリプトファン化合物取り込み能を調査した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 放射性糖化トリプトファン化合物の作製

#### 【材料】

- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ D-グルコース (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ U-<sup>14</sup>C-D-グルコース (Moravек Biochemicals, Inc., CA, USA)
- ・ L-トリプトファン (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ 水酸化ナトリウム (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ 恒温器 (MALTI-SHAKER OVEN HP、タイテック株式会社、埼玉)
- ・ ダウエックス 50W × 8 50 - 100 メッシュ 強酸性陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>形) (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ 25%アンモニア水 (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ テストチューブ (栄研チューブ 1号、栄研化学株式会社、東京)
- ・ アスピレーター (A-3S型、東京理化学器械株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE-2000型、東京理科学機株式会社、東京)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA1720、久保田商事株式会社、東京)

#### 【操作】

- 1). 1 mM の U-<sup>14</sup>C-D-グルコースを含む 19 mM の D-グルコース溶液に 20 mM の L-トリプトファン溶液を 100 μl ずつ混和した。
- 2). 1) の溶液を 37°C の恒温器で 7 日間保温した。
- 3). 2) の溶液に強酸性陽イオン交換樹脂を 0.4 ml 加え、超純水で 9 回洗浄し、グルコースを除いた。
- 4). 3) で出た洗浄水を液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、放射線量がバックグラウンドと同等であることを確認した。
- 5). 3 N の NH<sub>3</sub> を 0.3 ml 加え、4°C で一晩静置した。
- 6). 5) を 15,000 xg で 5 分間、4°C で遠心分離した。
- 7). 3 N の NH<sub>3</sub> を 0.1 ml 加え、15,000 xg で 5 分間、4°C で遠心分離した。
- 8). 7) を繰り返した。
- 9). 遠心エバポレーターおよびアスピレーターを用いて、NH<sub>3</sub> を揮発させた。
- 10). 6) から 9) で得られたサンプルから 5 μl 採取し、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定した。この時の放射線量は 4.5 Bq/ μl であり、これを放射性糖化トリプトファン化合物とした。
- 11). 得られた放射性糖化トリプトファン化合物は 4°C で保存した。

## 2. ニワトリ胚からの組織由来細胞の調製

### 【材料】

- ・ ニワトリ（単冠白色レグホン）受精卵（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 消毒用エタノール（和光純薬株式会社、大阪）
- ・ ダルベッコ改変リン酸緩衝生理食塩水（Dulbecco's phosphate-buffered saline, 以後 DPBS）（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 滅菌シャーレ（浅型 90 × 15 mm、旭テクノグラス株式会社、東京）
- ・ 滅菌済み 50 ml チューブ（グライナー・ジャパン株式会社、東京）
- ・ 2.5%トリプシン（10x、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 199 アール液体培地（以後 Medium199）（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ ウシ胎児血清（Fetal calf serum, 以後 FCS）（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ アンフォテリシン（250 µg/ml, インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ ペニシリン-ストレプトマイシン（ペニシリン 10,000 units/ml, ストレプトマイシン 10 mg/ml, Biological Industries Ltd. Israel）
- ・ ゲンタマイシン（10 mg/ml、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 0.22 µm メンブレンフィルター（GV Durapore Membren, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）
- ・ M199+10%FCS : Medium199 を 437.5 ml、アンフォテリシンとペニシリンをそれぞれ 5.0 ml、ゲンタマイシンを 2.5 ml、FCS を 50 ml 混合した培養液。
- ・ ガーゼ（30 cm×10 m、株式会社長谷川綿行、愛知）
- ・ トリパンプルー（和光純薬株式会社、大阪）
- ・ 0.3%トリパンプルー : トリパンプルー30 mg を 10 ml の DPBS に溶解し、0.22 µm メンブレンフィルターに通して滅菌した。
- ・ サンプルングチューブ（1.5 ml、イナ・オプティカ株式会社、大阪）
- ・ コラーゲンコート 48-ウェルプレート（Collagen I cellware 48-well Plate, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA）
- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター（4020 型、朝日ライフサイエンス株式会社、東京）
- ・ 孵卵器（ベビーB 型、株式会社昭和フランキ、埼玉）
- ・ 恒温水槽（以後、ウォーターパス）（THERMO MINDER SM-05、タイテック株式会社、埼玉）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京）
- ・ 血球計算盤（4 × 2 cell（0.04 mm<sup>2</sup> × 0.1 mm）、Improved Neubauer、萱垣医理科工業株式会社、東京）

### 【操作】

- 1) 30 個の受精卵を、37.6°Cに設定した孵卵器内で 19 日間孵卵した。
- 2) クリーンベンチ内で、孵卵 19 日目の受精卵を消毒用アルコールで拭いた。
- 3) 受精卵の鈍端をピンセットでつついて割り、ニワトリ胚を採取した。
- 4) ニワトリ胚の首を切断し、胸部および腹部を切開して浅胸筋、脾臓、腎臓および肝臓を採取した。採取した組織は DPBS を満たした滅菌シャーレに入れた。
- 5) ピンセットを用いて、脂肪や血管などの目的以外の組織を浅胸筋から除去した。
- 6) 各組織を別の滅菌シャーレに移し DPBS を除去した。
- 7) ハサミを用いて組織を細かく刻んだ。
- 8) 滅菌済み 50 ml 遠沈管に DPBS 45 ml と 2.5%トリプシンを 5 ml 入れ、その中に細かく刻んだ組織をそれぞれ入れた。
- 9) 37°Cに設定したウォーターバスで浅胸筋、脾臓、腎臓および肝臓をそれぞれ約 50、45、40 および 30 分間インキュベーションした。
- 10) 5,000 x g で 3 分間遠心分離して細胞を沈殿させ、上清を除去した。
- 11) M199+10%FCS を 25 ml 加え、5,000 x g で 3 分間遠心分離し、上清を除去した。
- 12) M199+10%FCS を 25 ml 加え、濁るまでピペッティングした。
- 13) 新しい 50 ml 遠沈管の上に滅菌したガーゼを置き、その上から細胞懸濁液を流し、未消化の組織片を取り除いた。
- 14) 5,000 x g で 15 分間遠心分離し、細胞を集めた。
- 15) 上清を捨て、細胞を 25 ml の M199+10%FCS で再懸濁した。
- 16) 細胞懸濁液 100  $\mu$ l を 1.5 ml サンプルングチューブにとり、100  $\mu$ l の 0.3%トリパンブルーを加えて混ぜた。
- 17) 血球計算盤を用いて細胞の数を計測した。
- 18)  $4 \times 2 \text{ cell} / (0.04 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}) = 8 \text{ cell} / 0.004 \text{ mm}^3 = 2,000 \text{ cells/mm}^3 = 2,000,000 \text{ cells/cm}^3 = 2 \times 10^6 \text{ cells/ml} = 5.0 \times 10^5 \text{ cells}/250 \mu\text{l/well}$  (9.8 mm diameter)
- 19) (17) の計算結果をもとに、直径 9.8 mm のウェル 1 つあたりの細胞の数が  $5.0 \times 10^5$  cells となるように、コラーゲンコートした 48 ウェルプレートに播種した。
- 20) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下のもと、37°Cでコンフルエントになるまで培養した。

### 3. 実験培養液の作製

#### 【材料】

- Medium199 (インビトロジェン株式会社、東京)
- 放射性糖化トリプトファン化合物溶液
- 滅菌済み超純水：オートクレーブした超純水を無菌環境下で 0.22  $\mu$ m メンブレンフ

フィルターに通して滅菌した。

- ・ FCS (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 15 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 50 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ 250 mL ポリプロピレン製容器 (アズワン株式会社、大阪)
- ・ 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (6 ml、 WHWATON SCIENCE PRODUCTS, Millville, NJ, USA)
- ・ 液体シンチレーター (Ultima Gold、PerkinElmer Inc., CA, USA)
- ・ 液体シンチレーションカウンター (LSC-1500、アロカ株式会社、東京)

#### 【操作】

- 1) FCS を 10%含む Medium199 を 5 ml、滅菌済み 15 ml チューブに分注し、放射線量が約 60 Bq/ml となるように、培養液に放射性糖化トリプトファン化合物溶液を 65  $\mu$ l 添加した。こちらを糖化トリプトファン化合物培養液とする。
- 2) 対照として、FCS を 10%含む Medium199 を 5 ml、滅菌済み 15 ml チューブに分注し、滅菌済み超純水を 65  $\mu$ l 添加した。こちらを対照培養液とする。

#### 4. 細胞への糖化トリプトファン化合物取り込みの測定

##### 【材料】

- ・ 対照培養液 (自作)
- ・ 糖化トリプトファン化合物培養液 (自作)
- ・ Medium199 (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ DPBS (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ 水酸化ナトリウム (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ Triton-X (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ 0.5% NaOH/0.1% Triton-X (第 5 章に準じて作製した)
- ・ 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (6 ml、 WHWATON SCIENCE PRODUCTS, Millville, NJ, USA)
- ・ 液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold、PerkinElmer Inc., CA, USA)
- ・ 液体シンチレーションカウンター (LSC-1500、アロカ株式会社、東京)

##### 【操作】

- 1) 対照培養液または糖化トリプトファン培養液を 48 ウェルプレートに 400  $\mu$ l ずつ入れた。
- 2) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下、37°Cで一晩培養した。

- 3) ウェル中の培養液を除去した。
- 4) 氷冷した Medium199 を 400  $\mu$ l ずつウェルに入れ、直ちに取り除いて細胞を洗浄した。
- 5) 4) をさらに 2 度繰り返した。
- 6) 洗浄した Medium199 中の放射能がバックグラウンドと同程度であることを確認し、0.5% NaOH/0.1% Triton-X を 400  $\mu$ l ずつウェルに入れて約 30 分間室温に放置し、細胞を溶解した。
- 7) 得られた細胞溶解液をピペッティングすることにより均一にした。
- 8) 細胞溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れた。液体シンチレーターを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、糖化トリプトファン化合物取り込みの指標とした。

## 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 1999) を用いて統計処理を行った。二元配置分散分析法を用いて糖化トリプトファン化合物および組織由来細胞の種類の効果を要因分析した。

### 第3節 結果

Fig. 14 に各組織由来細胞への糖化トリプトファン化合物取込みを示した。糖化トリプトファン化合物の添加および細胞が由来した組織の種類の主効果が全て有意であり ( $P<0.01$ )、さらに、2 要因の交互作用も有意 ( $P<0.01$ ) であった。全ての組織において、糖化トリプトファン化合物区は対照区と比べて放射線量は有意に高かった。また、筋肉、腎臓、脾臓、肝臓の順に糖化トリプトファン化合物が取り込まれることが示された。

#### 第4節 考察

ニワトリの翼下静脈から糖化タンパク質由来 AGEs を投与した際、糖化タンパク質由来 AGEs は投与 30 分後に腎臓および脾臓に蓄積し、次いで腎臓に蓄積することが報告されている (Kita, 2011)。また、同様に糖化アミノ酸由来 AGEs 溶液をニワトリに投与すると、投与 30 分後に肝臓、脾臓、腎臓の順に蓄積したと報告されている (Kita, 2014)。一方で、両報告とも浅胸筋への蓄積はわずかであった。

Fig. 14. に示したように、糖化トリプトファン化合物は全ての臓器由来細胞で取込みが認められた。さらに、筋肉由来の細胞に最も多くの糖化トリプトファン化合物が取り込まれた。この結果は、先の報告とは異なり、糖化トリプトファン化合物が筋肉に優先的に取り込まれる可能性を示唆した。

しかし、第 6 章では、糖化トリプトファン化合物である PHP-TH $\beta$ C をニワトリに投与しても、浅胸筋への蓄積はわずかであった。この矛盾の原因はいくつか考えられる。第一に、本章の実験で用いた糖化トリプトファン化合物が、トリプトファンアマドリ化合物および PHP-TH $\beta$ C の混合物であるという点が挙げられる。すなわち、トリプトファンアマドリ化合物および PHP-TH $\beta$ C のどちらが取り込まれているかの区別ができない。第二に、17 日齢のヒナと、胚発生時のニワトリでは糖化トリプトファン化合物の取り込み機構に違いがあるかもしれない。第三に、ヒナを用いた系では循環する血液中に存在する PHP-TH $\beta$ C を取込んでいるが、本章では初代細胞培養系を用いており、糖化トリプトファン化合物を細胞内へ取込むまでの過程が異なる。したがって、今後、細胞へ糖化トリプトファン化合物が取り込まれる機構を調べる必要があると考えられた。

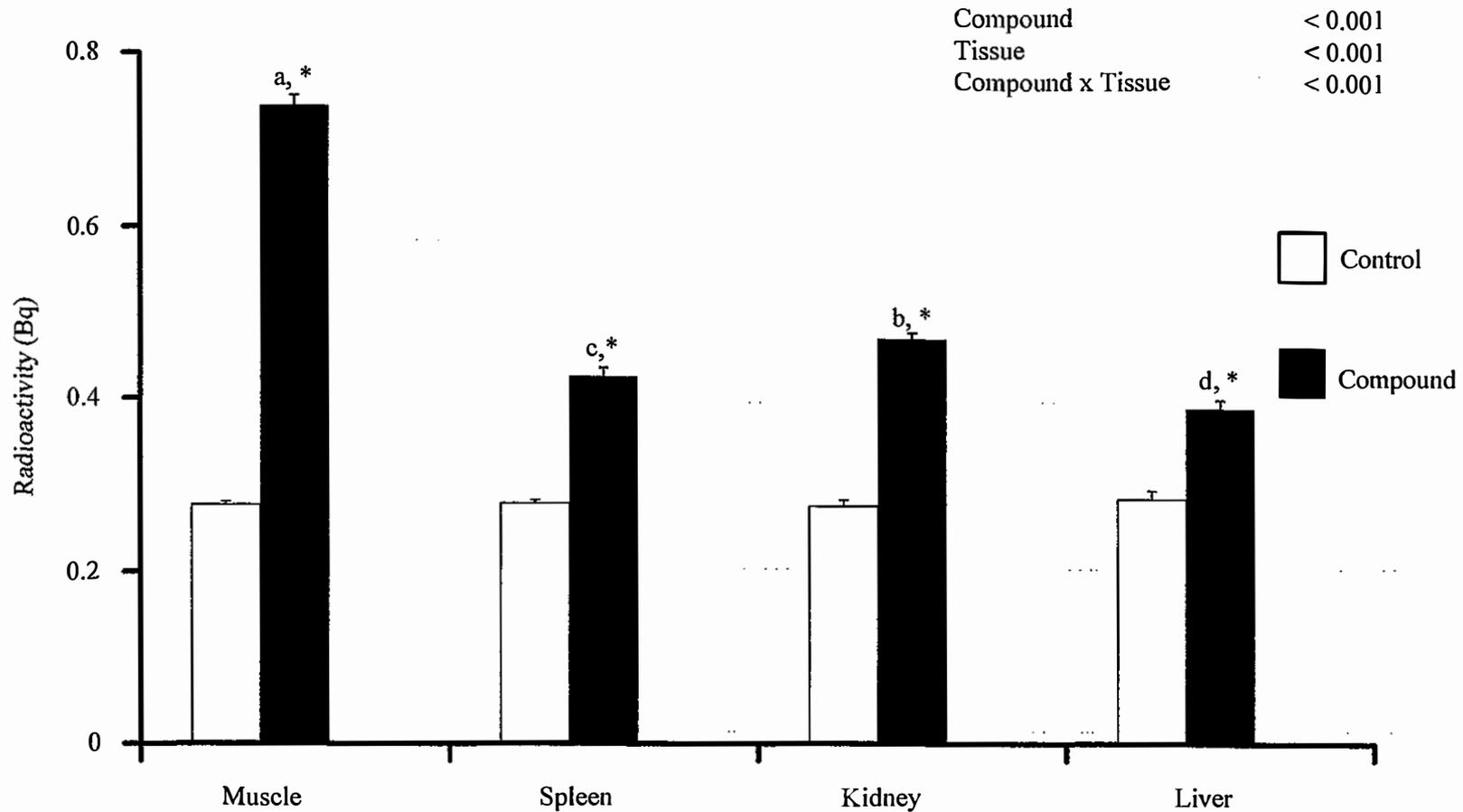


Fig. 14. The incorporation of glycated tryptophan compounds into various cells from chicken embryonic tissues.

White bars indicate the value for the control group. Black bars indicate the value for the glycated tryptophan compound group.

<sup>a-d</sup> Means with different superscript letters within the same additive are significantly different at  $P < 0.05$ . \* Means within the same tissue are significantly different at  $P < 0.05$ .

Values are means  $\pm$  SE.  $n=6$

## 第7章 ニワトリ胚由来細胞への PHP-TH $\beta$ C の取り込み

### 第1節 目的

第6章において、ニワトリ胚由来の初代培養細胞では、筋肉由来細胞に糖化トリプトファン化合物がより取り込まれる可能性が示唆された。この結果は第5章において PHP-TH $\beta$ C をニワトリヒナに投与した際に、筋肉にはあまり取り込まれなかったと言う結果とは異なるものであった。

第5章において行ったニワトリヒナを用いた実験と、第6章において行った初代培養細胞系ではいくつかの相違点がある。一つはニワトリの日齢である。第5章では孵化後17日目のニワトリヒナを用いたが、第6章では孵化前のニワトリ胚から調製した初代培養細胞である。もう一つは、第6章において培養液に添加した糖化トリプトファン化合物が、アマドリ化合物と PHP-TH $\beta$ C の混合物であったのに対して、第5章では PHP-TH $\beta$ C のみをニワトリヒナに投与した。

そこで本章では、単一の糖化トリプトファン化合物である PHP-TH $\beta$ C を放射性同位元素で標識し、細胞への PHP-TH $\beta$ C 取り込み能を評価した。また、PHP-TH $\beta$ C が細胞にどのように取り込まれるのかは未解明のままである。そこで、培養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けて PHP-TH $\beta$ C の取り込まれた放射線量を測定した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 放射性 PHP-TH $\beta$ C の作製

#### 【材料】

- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ D-グルコース (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-[5-<sup>3</sup>H]-トリプトファン (0.74 TBq/mmol、37 MBq/ml) (American Radiolabeled Chemicals Inc., MO, USA)
- ・ 水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 恒温器 (MALTI-SHAKER OVEN HP、タイテック株式会社、埼玉)
- ・ ダウエックス 50W×X8 50 - 100 メッシュ 強酸性陽イオン交換樹脂 (H<sup>+</sup>形) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 25%アンモニア水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 250 mL ポリプロピレン製容器 (アズワン株式会社、大阪)
- ・ 滅菌済み 15 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ アスピレーター (A-3S 型、東京理化学器械株式会社、東京)
- ・ 遠心エバポレーター (CVE-2000 型、東京理科学機株式会社、東京)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA1720、久保田商事株式会社、東京)

#### 【操作】

- 1) D-グルコース 180 g、L-トリプトファン 0.51 g、L-[5-<sup>3</sup>H]-トリプトファン 1 ml および 5N NaOH 5 ml を超純水で 500 ml になるように調製した。
- 2) 1) の溶液を 37°C の恒温器で 3 日間保温した。
- 3) 2) の溶液に強酸性陽イオン交換樹脂を 75 g 加え、よく振り混ぜた後に 1.5 時間静置した。
- 4) 3) の陽イオン交換樹脂と溶液の混合物を脱脂綿を詰めた 50 ml シリンジに入れた。
- 5) 25 ml の超純水を 4) のシリンジに 8 回加えて、グルコースを除いた。
- 6) シリンジに入っている脱脂綿および陽イオン交換樹脂を 250 ml ポリプロピレン製容器に移し、3 N NH<sub>3</sub> を 150 ml 加えた。
- 7) 4°C で 3 時間静置した。
- 8) 50 ml シリンジに脱脂綿を詰め、7) の溶液をシリンジに入れ、3 N NH<sub>3</sub> を新しい 250 ml ポリプロピレン製容器へと移した。
- 9) 15 ml 遠沈管に 10 ml ずつ分注し、遠心エバポレーターで遠心濃縮を行った。
- 10) 濃縮溶液を 4°C で静置し、白色の沈殿を得た。

- 11) 白色沈殿を少量の超純水に溶かし、1.5 ml チューブへと分注した。
- 12) 4℃、23,000 xg で1 分間遠心分離した。
- 13) 上清を除き、沈殿物に少量の水を加えて懸濁する。
- 14) 12) から 13) の操作をさらに 9 回行った。
- 15) 得られた懸濁液を秤量した 2.0 ml チューブに分注し、遠心エバポレーターで乾固後秤量した。
- 16) 得られたサンプルの一部を超純水で希釈し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。得られた<sup>3</sup>H]-PHP-THβC の比放射能は 1.11 MBq/mmol であった。

## 2. ニワトリ胚からの組織由来細胞の調製

### 【材料】

- ・ ニワトリ（単冠白色レグホン）受精卵（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 消毒用エタノール（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ DPBS（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 滅菌シャーレ（10x、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 滅菌済み 50 ml チューブ（グライナー・ジャパン株式会社、東京）
- ・ 2.5%トリプシン（10x、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ Medium199（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ FCS（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ アンフォテリシン（250 μg/ml、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ ペニシリンーストレプトマイシン（ペニシリン 10,000 units/ml, ストレプトマイシン 10 mg/ml, Biological Industries Ltd. Israel）
- ・ ゲンタマイシン（10 mg/ml、インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ 0.22 μm メンブレンフィルター（GV Durapore Membren, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）
- ・ M199+10%FCS（第 6 章に準じて作製した）
- ・ ガーゼ（30 cm×10 m、株式会社長谷川綿行、愛知）
- ・ 0.3%トリパンブルー（第 6 章に準じて作製した）
- ・ サンプルングチューブ（1.5 ml、イナ・オプティカ株式会社、大阪）
- ・ コラーゲンコート 48-ウェルプレート（Collagen I cellware 48-well Plate, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA）
- ・ CO<sub>2</sub>インキュベーター（4020 型、朝日ライフサイエンス株式会社、東京）
- ・ 孵卵器（ベビーB 型、株式会社昭和フランキ、埼玉）
- ・ ウォーターバス（THERMO MINDER SM-05、タイテック株式会社、埼玉）
- ・ 遠心分離機（KUBOTA5910、久保田商事株式会社、東京）

- ・ 血球計算盤 (4x2 cell (0.04 mm<sup>2</sup> x 0.1 mm)、Improved Neubauer、萱垣医理科工業株式会社、東京)

#### 【操作】

第6章に準じて操作した。第6章で採取した組織に加えて、心臓、筋胃、腺胃および皮膚も採取し、トリプシン処理によって細胞を採取し、初代培養を行った。

### 3. 実験培養液の作製

#### 【材料】

- ・ Medium199 (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC
- ・ DPBS (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ FCS (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 15 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 50 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル
- ・ 液体シンチレーター
- ・ 液体シンチレーションカウンター

#### 【操作】

- 1) 5 mM になるように [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC を DPBS に溶解した。
- 2) FCS を 10% 含む Medium199 を 33.6 ml、滅菌済み 50 ml チューブに分注し、5 mM [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC を終末濃度が 0、200、400、600 および 800 μM となるように 0、1.6、3.2、4.8 および 6.4 ml 加えた。続けて、DPBS を 6.4、4.8、3.2、1.6 および 0 ml 加えた。

### 4. 細胞へ取り込まれた [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC 放射線量の測定

#### 【材料】

- ・ 対照培養液
- ・ 糖化トリプトファン PHP-THβC 培養液
- ・ Medium199 (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ DPBS (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ トリクロロ酢酸 (以後 TCA) (和光純薬株式会社、大阪)
- ・ 5%TCA:500 g の TCA を 227 ml の超純水に溶解して 100% TCA を調製し、100%

TCA 25 ml を 475 ml の超純水と混合し、5% TCA とした。

- 0.5%NaOH/0.1%Triton-X (第 5 章に準じて作製した)
- 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold、PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb B3110TR、PerkinElmer Inc., CA, USA)

#### 【操作】

- 1) 対照培養液または PHP-TH $\beta$ C 培養液を 48 ウェルプレートに 400  $\mu$ l ずつ入れた。
- 2) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下、37°C で一晩培養した。
- 3) ウェル中の培養液を除去した。
- 4) 氷冷した Medium199 を 400  $\mu$ l ずつウェルに入れ、直ちに取り除いて細胞を洗浄した。
- 5) 4) をもう 1 度繰り返した。
- 6) 各 PHP-TH $\beta$ C 濃度区の半数に 5% TCA を 400  $\mu$ l 加え、室温で 20 分間静置した。
- 7) TCA を全量回収し、液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れた。液体シンチレーターを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定し、非タンパク質画分への PHP-TH $\beta$ C 取込みの指標とした。
- 8) TCA を除いた細胞を 400  $\mu$ l の DPBS で洗浄し、速やかに取り除いた。
- 9) DPBS で洗浄した細胞へ 0.5% NaOH/0.1% Triton-X を 400  $\mu$ l/well ずつ加えて 30 分間室温に静置した。
- 10) 得られた細胞溶解液をピペッティングすることにより均一にした。
- 11) 細胞溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れた。液体シンチレーターを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定し、タンパク質画分への PHP-TH $\beta$ C 取込みの指標とした。
- 12) 残りの半数には 0.5% NaOH /0.1% Triton-X を 400  $\mu$ l ずつウェルに入れて 30 分間室温に静置した。
- 13) 得られた細胞溶解液をピペッティングすることにより均一にした。
- 14) 細胞溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れた。液体シンチレーターを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、細胞全画分への PHP-TH $\beta$ C 取り込みの指標とした。

#### 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 1999) を用いて統計処理を行った。二元配置分散分析法を用いて PHP-TH $\beta$ C 濃度および細胞画分の効果を要因分析した。

### 第3節 結果

Fig. 15 に、各組織由来細胞への [<sup>3</sup>H]-PHP-THβC 放射線量を示した。PHP-THβC の濃度および細胞が由来した組織の種類の主効果が全て有意であり (P<0.01)、加えて2要因の交互作用も有意 (P<0.01) であった。いずれの組織においても、取り込まれた放射線量は全画分、タンパク質画分、非タンパク質画分の順に高い値を示した。多くの組織由来細胞において、各画分に取り込まれた放射線量は、添加した PHP-THβC の濃度が 600 μM になるまでは、培養液に添加した PHP-THβC 量依存的に増加することが示された。心臓由来細胞においてのみ、全画分、タンパク質画分および非タンパク質画分のいずれにおいても、培養液に添加した PHP-THβC 量依存的に取り込まれた放射線量が直線的に増加した。

#### 第4節 考察

第6章では、ニワトリ胚の筋肉由来細胞が糖化トリプトファン化合物を有意に多く取り込むことが示された。本章では、前章で用いた組織由来細胞（筋肉、脾臓、腎臓および肝臓）に加え、心臓、筋胃、腺胃および皮膚由来の細胞を初代培養して、PHP-TH $\beta$ Cの取り込みを調査した。さらに、PHP-TH $\beta$ Cの濃度を段階的に変化させるとともに、細胞をタンパク質画分と非タンパク質画分に分けることで、PHP-TH $\beta$ Cが細胞のどの画分へ取り込まれるのかを調査した。

Fig. 15で示したように、添加したPHP-TH $\beta$ Cの濃度上昇に伴ってPHP-TH $\beta$ Cが細胞へ取り込まれることが示された。さらに、PHP-TH $\beta$ Cは全画分、タンパク質画分、非タンパク質画分の順に多く取り込まれていた。この結果から、各種細胞にはPHP-TH $\beta$ Cと結合するタンパク質が存在することが強く示唆された。その一方で、心臓由来の細胞を除き、全画分またはタンパク質画分、もしくはその両方を含む全画分において、PHP-TH $\beta$ C 600  $\mu$ Mと800  $\mu$ Mの間に有意な取り込み量の変化が認められなかった。このことから、細胞へのPHP-TH $\beta$ C蓄積量には限りがあることが示唆された。しかしながら、第2および3章で示したように、トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに給与した際の最大血漿中PHP-TH $\beta$ C濃度は約45  $\mu$ Mであり、本実験の濃度よりもはるかに低い。したがって、生理的条件下では、PHP-TH $\beta$ Cは十分に各組織のタンパク質へと結合し得ると考えられた。また、第5章で示したように、血漿中のPHP-TH $\beta$ Cは様々な組織に一度は取り込まれるものの、短時間でその大部分が腎臓を介して排泄される可能性があるため、最終的に組織にとどまる量は限られているものと考えられた。

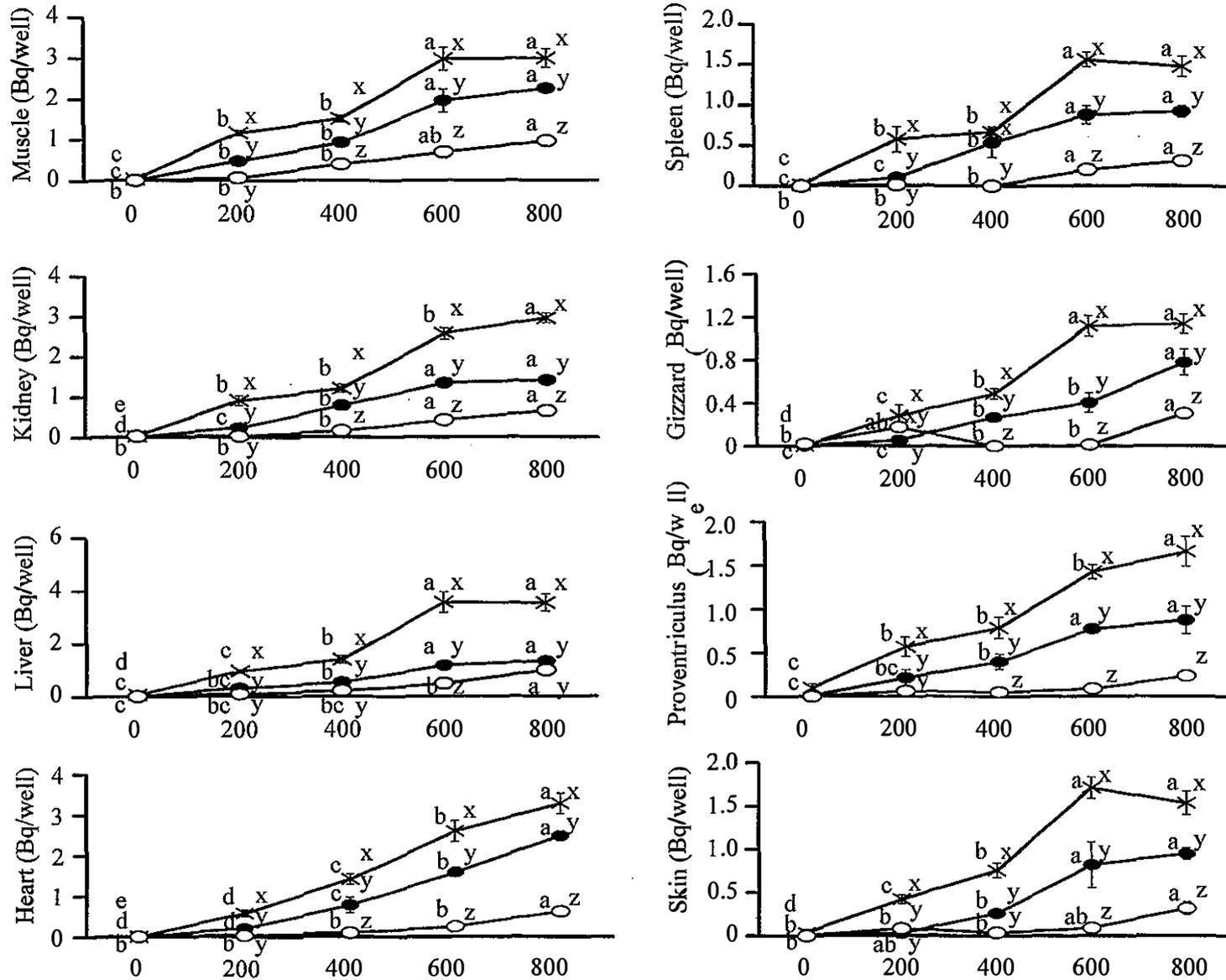


Fig. 15. The incorporation of  $[^3\text{H}]\text{-PHP-TH}\beta\text{C}$  into several fractions of cells derived from the chicken embryonic tissues.

Open circles (○), closed circles (●) and x symbols (x) indicate the values for non-protein, protein and whole cell fraction, respectively.

a-e Means with different superscript letters within the same fraction are significantly different at  $P < 0.05$ . x-y Means with different letters within the same concentration are significantly different at  $P < 0.05$ .

Values are means  $\pm$  SE. n = 6

## 第8章 糖化トリプトファン化合物がニワトリ胚由来細胞のタンパク質代謝に及ぼす影響

### 第1節 目的

ニワトリを含む家畜は主にヒトの食料生産を目的として飼育されている。とりわけニワトリは非常に高い飼料効率を示し、ウシおよびブタと比較して非常に経済的な産肉性を示す家畜である。

また、これまでにニワトリにおける糖化トリプトファン化合物、とりわけ PHP-TH $\beta$ C の代謝経路を明らかにしてきた。しかし、PHP-TH $\beta$ C の生理的意義については不明な点が多い。

そこで本章では、ニワトリの筋肉のタンパク質代謝に PHP-TH $\beta$ C が及ぼす影響を明らかにするために、ニワトリ胚筋芽細胞初代培養系を用いて、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。

## 第2節 材料および方法

### 1. ニワトリ胚からの筋芽組織の調製

#### 【材料】

・ ニワトリ（単冠白色レグホン）受精卵（株式会社ゲン・コーポレーション、岐阜）  
その他、第6章に準じた。

#### 【操作】

ニワトリ胚から浅胸筋を採取し、第6章に準じて操作し、筋芽細胞の初代培養を行った。

### 2. 実験培養液の調製

#### 【材料】

- ・ M199+10%FCS（第6章に準じて作製した）
- ・ PHP-TH $\beta$ C（自作）
- ・ DPBS（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ L-[ring-2,6-<sup>3</sup>H]フェニルアラニン（37 MBq/ml、American Radiolabeled Chemicals, Inc., MO, USA）
- ・ 滅菌済み 15 ml チューブ（グライナー・ジャパン株式会社、東京）
- ・ 滅菌済み 50 ml チューブ（グライナー・ジャパン株式会社、東京）
- ・ 液体シンチレーションカウンター用ミニパイアル（6 ml、WHWATON SCIENCE PRODUCTS, Millville, NJ, USA）
- ・ 液体シンチレーションカクテル（Ultima Gold、PerkinElmer Inc., CA, USA）  
液体シンチレーションカウンター（LSC-1500、アロカ株式会社、東京）

#### 【操作】

- 1) 滅菌済み 15mL チューブに、M199+10%FCS を 10.8 ml ずつ 5 本分注した。
- 2) 分注した M199+10%FCS のうちの 1 本に DPBS を 1.2 ml 加えた。これを対照培養液とした。
- 3) DPBS で PHP-TH $\beta$ C を溶解し、終末濃度が 25、250 および 2,500 nM になるように M199+10%FCS 溶液と混和した。
- 4) 培養液の放射能が 1  $\mu$ Ci (37 kBq) /ml となるように、各培養液へ L-[ring-2,6-<sup>3</sup>H]フェニルアラニンを 12  $\mu$ l 添加した。
- 5) 培養液から 10  $\mu$ l を液体シンチレーションカウンター用ミニパイアルへ移し、液体

シンチレーションカクテルを 2 ml 加えた。

- 6) 液体シンチレーションカウンターで培養液中の放射線量を測定し、各培養液の放射線量がほぼ等しいことを確認した。

### 3. タンパク質合成の測定

#### 【材料】

- Medium199 (インビトロジェン株式会社、東京)
- 5% TCA (第 7 章に準じて作製した。)
- DPBS (インビトロジェン株式会社、東京)
- 水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、東京)
- 0.5% NaOH/0.1% Triton-X (第 5 章に準じて作製した)
- 液体シンチレーションカウンター用ミニバイアル (PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーター (Ultima Gold、PerkinElmer Inc., CA, USA)
- 液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb B3110TR、PerkinElmer Inc., CA, USA)

#### 【操作】

- 1) 対照培養液および PHP-TH $\beta$ C 添加培養液を各ウェル当たり 400  $\mu$ l ずつ入れた。
- 2) CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下、37°C で一晩培養した。
- 3) ウェル中の培養液を除去した。
- 4) 氷冷した Medium199 を 400  $\mu$ l ずつウェルに入れ、直ちに取り除いて細胞を洗浄した。
- 5) 5% TCA を 400  $\mu$ l 加え、室温で 10 分以上静置した。
- 6) 5% TCA を除いた細胞を 400  $\mu$ l の DPBS で洗浄し、速やかに取り除いた。
- 7) DPBS で洗浄した細胞へ 0.5% NaOH/0.1% Triton-X を 400  $\mu$ l/well ずつ加えて 30 分間室温に静置した。
- 8) 得られた細胞溶解液をピペッティングすることにより均一にした。
- 9) 細胞溶解液を全量取り、液体シンチレーションカウンター用ミニバイアルに入れた。液体シンチレーターを 2 ml 加えてよく混合した後、液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定し、タンパク質合成の指標とした。

### 5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 1999) を用いて統計処理を行った。一元配置分散分析法を用いて PHP-TH $\beta$ C の効果を要因分析した。平均値の差の検定は Tukey の多重検定により解析した。

### 第3節 結果

Fig. 16 に PHP-TH $\beta$ C を培養液に添加した際の、ニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成を示した。各処理区のタンパク質合成の値は、対照区を 100 とした相対値で表した。培養液への PHP-TH $\beta$ C 添加は、対照区と比較し有意にニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成を低下させた。

#### 第4節 考察

第2および3章の結果から、生理的条件下におけるニワトリ血漿中の PHP-TH $\beta$ C 濃度はおよそ 3-10  $\mu$ M であることが示された。本章では、設定した最大濃度が 2,500 nM (=2.5  $\mu$ M) であることから、生理的濃度もしくはそれ以下の濃度条件下で行った実験である。Fig. 16 に示したように、PHP-TH $\beta$ C はごく低濃度であっても、ニワトリ胚由来の筋肉細胞のタンパク質合成を低下させた。この結果は、生理的条件下でニワトリの筋肉のタンパク質合成が抑制されている可能性を示唆する。

タンパク質合成の調節には多くの調節因子が関与していることが明らかにされてきた。例えば、タンパク質の構成成分であるアミノ酸自身がタンパク質合成を制御する。分岐鎖アミノ酸の一つであるロイシンが代表的であり、タンパク質代謝調節と関わりの深いシグナル伝達経路である Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /Akt 経路を介してタンパク質合成を促進することが知られている (Kimball *et al.*, 1999; Duan *et al.*, 2015)。ロイシンは哺乳類のみならず、ニワトリ胚由来の筋芽細胞においてもタンパク質合成を促進させる (Oki *et al.*, 2007)。また、インスリンやインスリン様成長因子-I (Insulin-like growth factor-I: IGF-I) といったホルモンもタンパク質合成の制御因子として重要な役割を果たしている (Glass, 2005)。これらのホルモンが受容体に結合すると、PI3K/Akt シグナル伝達経路のリン酸化カスケードによってタンパク質合成を促進し、筋肥大を引き起こす (Vandenburgh *et al.*, 1991)。この IGF-I による筋肥大効果は、筋肉において IGF-I を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた実験でも確認されている (Coleman *et al.*, 1995; Musarò *et al.*, 2001)。ニワトリの IGF-I は自己分泌 (オートクライン) 様にも働いていると考えられており、タンパク質合成の重要な調節因子である (McMurtry *et al.*, 1997; Duclos, 2005)。また、Kita and Okumura (2001) は、FCS によるニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成促進作用の 50% は IGF-I で説明できることを報告している。一方で、PHP-TH $\beta$ C と同じく  $\beta$ -カルボリン類に属する Harmol は、ヒトグリオーマ細胞 (U251MG) の PI3K/Akt 経路のリン酸化カスケードを抑制することが報告されている (Abe and Kokuba, 2013)。

以上の様に、PHP-TH $\beta$ C によるニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成抑制作用機序を明らかにするためには、IGF 関連遺伝子の関与について調査することが有効であると考えられた。

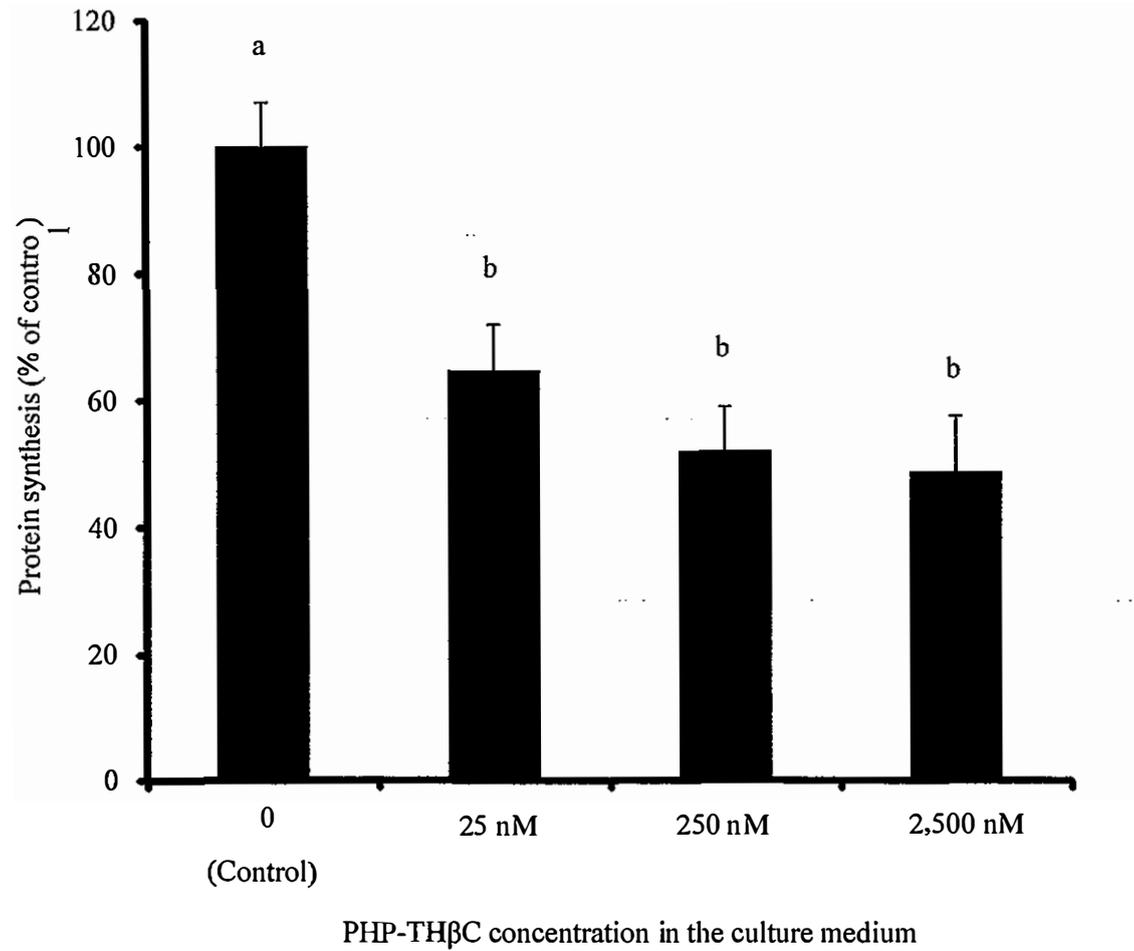


Fig. 16. Influence of varying PHP-THβC concentrations in the culture medium on protein synthesis of muscle cells derived from chicken embryos.

<sup>a-b</sup> Means with different superscript letter significantly different at  $P < 0.05$ .

Values are means  $\pm$  SE.  $n=12$ .

## 第9章 糖化トリプトファン化合物がニワトリ胚筋芽細胞のIGF 関連遺伝子の発現に及ぼす影響

### 第1節 目的

前章の結果から、PHP-TH $\beta$ C はニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成を低下させる可能性が示された。

筋肉タンパク質の代謝には多くの因子が関与しているが、とりわけニワトリ胚の筋肉では IGF-I が重要な働きを担っている。Kita and Okumura (2001) は、FCS によるニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成促進作用の 50% は、IGF-I の作用で説明可能であることを報告している。

そこで本章では、PHP-TH $\beta$ C を添加した培養液で培養したニワトリ胚筋芽細胞における IGF 関連遺伝子の mRNA 発現を調べることで、PHP-TH $\beta$ C によるタンパク質合成低下の作用機序を明らかにすることを目的とした。

## 第2節 材料および方法

### 1. ニワトリ胚筋芽からの組織由来細胞の調製

#### 【材料】

第8章に準じた。

#### 【操作】

第6章に準じてニワトリ胚から浅胸筋を採取し、ニワトリ胚筋芽細胞の初代培養を行った。

### 2. 実験培養液の調製

#### 【材料】

第8章に準じた。

#### 【操作】

- 1) 滅菌済み 15ml チューブに、Medium199 を 14.75 ml ずつ 5 本分注した。
- 2) 分注した Medium199 のうちの 1 本に DPBS 0.24 ml および IGF-I 15  $\mu$ l を加えた。これを対照培養液とした。
- 3) DPBS で PHP-TH $\beta$ C を溶解し、終末濃度が 4 および 16  $\mu$ M になるように Medium199 と混和した。それぞれに IGF-I を 15  $\mu$ l 添加した。

### 3. 総 RNA の抽出

#### 【材料】

- ・ 対照培養液 (自作)
- ・ PHP-TH $\beta$ C 添加培養液 (4  $\mu$ M および 16  $\mu$ M)
- ・ 滅菌済み 15 ml チューブ (グライナー・ジャパン株式会社、東京)
- ・ TRIZOL Reagent (インビトロジェン株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 2 ml チューブ (ザルスタット株式会社、東京)
- ・ 滅菌済み 1.5 ml チューブ (ビーエム機器株式会社 東京)
- ・ 超音波破碎機 (US-50、株式会社日本精機製作所、東京)
- ・ LCMS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ クロロホルム (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ イソプロパノール (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 100%エタノール (和光純薬工業株式会社、大阪)

- ・ 遠心分離機 (KUBOTA1720、久保田商事株式会社、東京)
- ・ 紫外可視分光光度計 (UV-1800、株式会社島津製作所、京都)

#### 【操作】

- 1). 対照培養液および PHP-TH $\beta$ C 添加培養液を各ウェル当たり 2 ml ずつ加えて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下、37° で一晚培養した。
- 2). 対照培養液および PHP-TH $\beta$ C 添加培養液を取り除き、DPBS を各ウェル当たり 2 ml ずつ加えて細胞を洗浄した。
- 3). TRIZOL Reagent を 1 ml ずつウェルに加え、氷上で 3 分間静置した後に、ピペッティングを行って細胞を回収し、2 ml チューブへ移した。
- 4). 超音波破碎機を用いて、氷上で 15 秒間細胞を破碎した後に、室温で 5 分間静置した。
- 5). 2 ml チューブにクロロホルムを 200  $\mu$ l 加え、15 秒間力強く振り、室温で 3 分間静置した。
- 6). 4°C、12,000 x g で 15 分間遠心分離した後に、上清を滅菌済み 1.5 ml チューブへと移動した。
- 7). 1.5 ml チューブへイソプロパノールを 500  $\mu$ l 加え攪拌し、室温で 10 分間静置した後に、4°C、12,000 x g で 10 分間遠心分離を行った。
- 8). 上清を除き、70%エタノールを 500  $\mu$ l 加えて攪拌し、4°C、12,000 x g で 10 分間遠心分離を行った。
- 9). 8) の操作を 2 度行った。
- 10). 1.5 ml チューブの蓋を開けて 15 分程度風乾させ、20  $\mu$ l の DEPC 水で沈殿物を溶解した。これを総 RNA とした。
- 11). 総 RNA を 200 倍に希釈し、紫外可視分光光度計で 260 nm の吸光度を測定した。吸光度 1 の時の RNA 溶液濃度を 40  $\mu$ g/ml としてサンプル中の RNA 濃度を計算し、1  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように調製した。

#### 4. cDNA の合成

##### 【材料】

- ・ RNA (1  $\mu$ g/1  $\mu$ l)
- ・ Oligo (dT)<sub>15</sub> (10 pmoles/ $\mu$ l) (タカラバイオ株式会社、滋賀)
- ・ 5x Buffer (東洋紡株式会社、大阪)
- ・ dNTPs (2.5  $\mu$ M) (タカラバイオ株式会社、滋賀)
- ・ ReverTra Ace (東洋紡株式会社、大阪)
- ・ 25 mM MgCl<sub>2</sub> (タカラバイオ株式会社、滋賀)

### 【操作】

- 1). RNA 2  $\mu$ l、Oligo (dT)<sub>15</sub> 1  $\mu$ l、5x Buffer 4  $\mu$ l、2.5  $\mu$ M dNTPs 8  $\mu$ l、ReverTra Ace 1  $\mu$ l および 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l を混和し、遠心分離機で溶液をサンプルチューブの底に集めた。
- 2). サーマルサイクラーを 42°C で 30 分、99°C で 5 分および 4°C で 5 分のプログラムで用いて、逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

## 5. 遺伝子発現量の測定

### 【材料】

- ・ cDNA (ReverTra Ace 使用 : 20  $\mu$ l)
- ・ 滅菌済み超純水 (東洋紡株式会社、大阪)
- ・ THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社、大阪)
- ・ 50X ROX reference dye (東洋紡株式会社、大阪)
- ・ Forward Primer (10  $\mu$ M) (Table 9、株式会社 日本遺伝子研究所、仙台)
- ・ Reverse Primer (10  $\mu$ M) (Table 9、株式会社 日本遺伝子研究所、仙台)
- ・ 48 ウェル PCR プレート (Bio-Rad,CA, USA)
- ・ MiniOpticon リアルタイム PCR 増幅システム (Bio-Rad,CA, USA)

### 【操作】

- 1). cDNA 2 $\mu$ l、滅菌済み超純水 5.6  $\mu$ l、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 10  $\mu$ l、50X ROX reference dye 0.4  $\mu$ l、Forward Primer 1  $\mu$ l および Reverse Primer 1  $\mu$ l を 48 ウェル PCR プレートに加え、均一になるよう混和した。
- 2). MiniOpticon リアルタイム PCR 増幅システムを初期変性 95°C で 60 秒行った後に、変性 95°C で 15 秒、アニーリング 60°C で 15 秒、伸長反応 72°C で 30 秒のプログラムを 50 サイクル反応させて増幅曲線を得た。
- 3). 得られた増幅曲線の測定データより、 $\Delta\Delta$ CT 法を用いてリファレンス遺伝子 (RPS17) に対する各標的遺伝子の発現量を計算した。

## 6. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6, SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS, 1999) を用いて統計処理を行った。一元配置分散分析法を用いて PHP-TH $\beta$ C の効果を要因分析した。平均値の差の検定は Tukey の多重検定により解析した。

### 第3節 結果

Fig. 17 に IGF 関連遺伝子 (IGF-I、IGF-II、IGF type-1 レセプター、IGF type-2 レセプター) の mRNA 発現量を示した。PHP-TH $\beta$ C 添加は、全ての IGF 関連遺伝子発現量に影響を及ぼさなかった。

#### 第4節 考察

細胞の増殖および分化は成長因子と呼ばれるタンパク質群によって制御されている。成長因子の一種である IGF には IGF-I と IGF-II の2種類のペプチドが存在する。ニワトリの IGF-I は、ヒトの IGF-I 同様 70 個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、ヒトの IGF-I アミノ酸配列とは 8 つのアミノ酸が異なっている (Ballard *et al.*, 1990)。IGF-II は 187 個のアミノ酸からなる prepro-IGF-II から開裂して産生され、成熟ペプチドとしては 67 個のアミノ酸から成る。ニワトリの IGF-II とヒトの IGF-II の相同性は 82% であり、ヒトの IGF-II と近い機能を有すると見なされていた (Upton *et al.*, 1995; McMurtry *et al.*, 1997)。

IGF のレセプターには IGF type 1 レセプターおよび IGF type 2 レセプターが存在する。哺乳類においては、IGF-I は type 1 レセプターへの親和性が高く、IGF-II では type 2 レセプターとの親和性が高い。しかしながら、ニワトリの IGF-I と IGF-II のどちらも IGF type 1 レセプターに結合し、Type 2 レセプターへは結合しないとされる (Duclos and Goddard, 1990; Yang *et al.*, 1991)。IGF-I は IGF type 1 レセプターと結合し、細胞周期進行、生存、分化、成長を調節する (De Pablo *et al.*, 1993; LeRoith *et al.*, 1995; Stewart and Rotwein, 1996)。また、ニワトリの type 2 レセプターには IGF-II との結合部位が存在しないため、ニワトリにおける IGF-II の作用は IGF-I と同じであると考えられている (Canfield and Kornfeld, 1989; Duclos *et al.*, 1999)。

前章の結果から、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示された。そこで本章では、ニワトリの筋肉タンパク質合成に関わりの深い、IGF 関連遺伝子の発現量に PHP-TH $\beta$ C が関与するか否かを調査した。Fig. 17 に示したように、IGF-I、IGF-II、IGF type 1 レセプターおよび IGF type 2 レセプターのいずれの遺伝子発現においても、PHP-TH $\beta$ C を培養液に添加した影響は認められなかった。この結果から、PHP-TH $\beta$ C は IGF 関連遺伝子の発現調節には関与せずにタンパク質合成を低下させる作用があると考えられる。PHP-TH $\beta$ C と同じく  $\beta$ -カルボリン類に属するホルモンが PI3K/Akt 経路のリン酸化カスケードを抑制することが報告されているが、その作用機序は不明である (Abe and Kokuba, 2013)。もし、PHP-TH $\beta$ C が直接的に PI3K/Akt のリン酸化を阻害するのであれば、ニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成を抑制する可能性も考えられる。

附表

Table 9. Primer sequences of IGFs, IGF receptors and ribosomal protein S17

Gene	Sequence	NCBI ID	Amplicon
IGF-I	F: GGCCCAGAAACACTGTGTGGT	NM_001004384	102
	R: GCTGGATCCATACCCTGTAGGCTT		
IGF-II	F: GAGCTGGTGGACACACTGCAG	NM_001030342	136
	R: GCAGAGCCAGGTACAGCTCCGAA		
IGF type 1 receptor	F: GGCCAAACGTTGACATTGCA	NM_205032	137
	R: GGTCAGTTTCGGGAAGCGGAAGTT		
IGF type 2 receptor	F: TGAGCCCGGACGAGCCGTTCTT	NM_204970	147
	R: CAACGTCATAGGCACAGACTGCAC		
Ribosomal protein S17	F: CGTGAGGACGAAGACGGTGAAGAA	NM_204217	89
	R: GCTTGTTGGTGTGGAAGTCGTTGC		

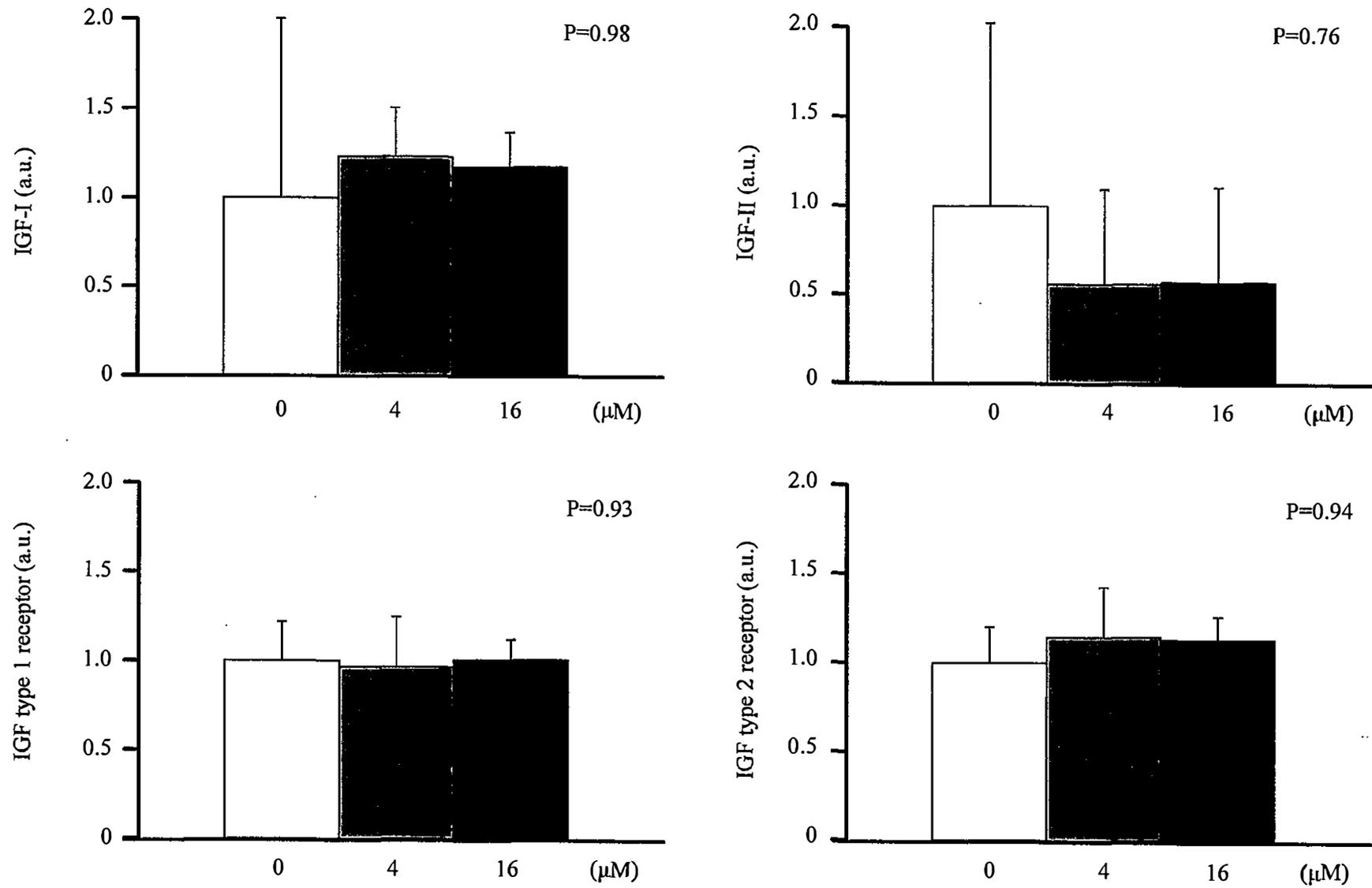


Fig. 17. Influence of varying PHP-THβC concentrations in the culture medium on mRNA expressions of IGF related genes in muscle cells derived from chicken embryos. Values are means  $\pm$  SE. n=6.

## 第 10 章 糖化トリプトファン化合物がニワトリの摂食行動に及ぼす影響

### 第 1 節 目的

これまで、ニワトリの生産性向上のために、PHP-TH $\beta$ C が筋肉のタンパク質代謝に及ぼす影響を調査してきた。ここで、PHP-TH $\beta$ C における構造上の特徴を考えると、PHP-TH $\beta$ C にはトリプトファンとグルコースの構造の一部を有している。どちらの基質もニワトリの摂食行動を調節する機能があることが知られている。トリプトファンをニワトリの腹腔内へ投与すると、容量依存的に摂食行動を抑制する (Lacy *et al.*, 1986) また、トリプトファンの代謝産物であるセロトニンも摂食行動を抑制する (Denbow *et al.*, 1983)。グルコースも同様に、ニワトリの摂食量を低下させることが示されている (Lacy *et al.*, 1985)。また、グルコースの経口投与が血中インスリン濃度を上昇させ (Simon and Rosselin, 1979)、インスリンが摂食行動を低下させることも古くから知られている (Woods *et al.*, 1979)。これら結果より、トリプトファンとグルコースから成る化合物である PHP-TH $\beta$ C も摂食行動を低下させる可能性が考えられた。

そこで本章では、PHP-TH $\beta$ C をニワトリの静脈中に末梢投与し、摂食量に影響を及ぼすか否かを調査した。

## 第2節 材料および方法

### 1. ニワトリの飼養管理

#### 【材料】

- ・ 単冠白色レグホン雄ヒナ（小岩井農牧株式会社、岩手）
- ・ 幼雛用市販飼料（CP 20.7%、ME 2,892 kcal/kg、豊橋飼料株式会社、愛知）
- ・ DPBS（インビトロジェン株式会社、東京）
- ・ PHP-TH $\beta$ C（自作）

#### 【操作】

- 1). 単冠白色レグホン雄ヒナを13日齢まで幼雛用市販飼料を与え、育雛器内で育てた。
- 2). 各処理区の平均体重が同じになるようにヒナを16羽選抜し、各処理区8羽ずつに分け、単飼環境下で4時間の絶食を行った。
- 3). 一方の処理区にはDPBSを0.2 ml/100 g BWとなるように翼下静脈より投与し、もう一方の処理区にはPHP-TH $\beta$ Cを1,090 nmol/0.2 ml/100 g BWとなるように翼下静脈より投与した。
- 4). 投与後に飼料を自由摂食させ、1、2、3、4、5および6時間後に摂食量を測定した。

### 2. 統計処理

市販統計パッケージSAS（SAS/STAT Version 9, SAS Institute, Cary, NC, USA）（SAS, 2013）を用いて統計処理を行った。二元配置分散分析を用いてPHP-TH $\beta$ Cおよび投与後時間の効果を要因分析した。

### 第3節 結果

Fig. 18 に DPBS および PHP-TH $\beta$ C を投与したニワトリの摂食量を示した。PHP-TH $\beta$ C の投与と投与後時間間に交互作用は認められなかったが、PHP-TH $\beta$ C の投与と投与後時間の主効果はそれぞれ有意であった。PHP-TH $\beta$ C の投与によって摂食量は亢進し、継続的に摂食量も増加した。

#### 第4節 考察

摂食中枢は脳の視床下部に存在する弓状核にあるとされる。弓状核には摂食行動を促進するペプチドである NPY および AgRP を産生する NPY/AgRP 神経細胞と、摂食行動を抑制する  $\alpha$ -MSH を産生する POMC 神経細胞が存在する。NPY/AgRP 神経細胞および POMC 神経細胞による摂食行動制御機構は、ニワトリでも哺乳類でも同様のメカニズムがあることが示されている (Bungo *et al.*, 2011)。摂食量を低下させたセロトニンの受容体は POMC 神経細胞には存在するものの、NPY/AgRP 神経細胞には存在しない。NPY/AgRP 神経細胞には NPY 受容体および GABA 受容体が存在し、それぞれ NPY および GABA の結合によって摂食を促進することが報告されている (Arora and Anubhuti, 2006; Bungo *et al.*, 2011)。

$\beta$ -カルボリンの一つである FG7142 は、GABA<sub>A</sub> 受容体のベンゾジアセピン結合部位へと結合することが知られている (Evans and Lowry, 2007)。ニワトリに FG7142 を腹腔内投与すると不安惹起作用がもたらされることが報告されている (Martijena, 1997)。また、ニワトリの脳内にある GABA<sub>A</sub> 受容体には、様々な  $\beta$ -カルボリン類が結合する可能性も示唆されている (Forster *et al.*, 2001)。

Fig. 18 に示したように、PHP-TH $\beta$ C の投与によってニワトリの摂食量が亢進した。この結果から、PHP-TH $\beta$ C は前駆体であるグルコースとトリプトファンに対して拮抗的にはたらく可能性が考えられた。また、 $\beta$ -カルボリン類が GABA<sub>A</sub> 受容体に結合するとの報告があることから、NPY/AgRP 神経細胞に PHP-TH $\beta$ C が作用し、摂食量を促進した可能性も考えられた。

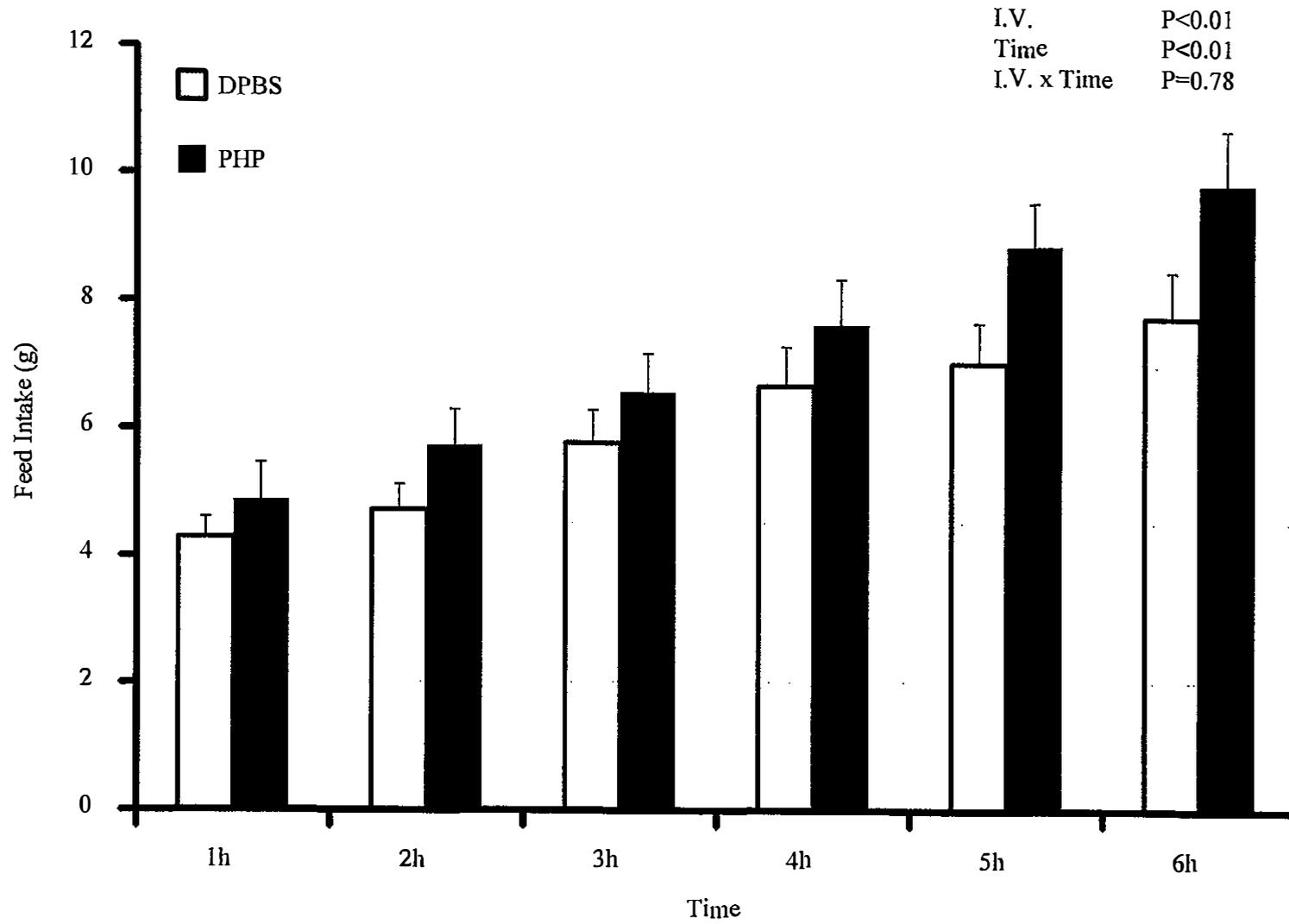


Fig. 18. Feed intake after intravenous injection of DPBS and PHP-TH $\beta$ C of chickens. Values are means  $\pm$  SE. n=8.

## 第11章 要約

必須アミノ酸の1つであるトリプトファンは生体を構成するタンパク質の基質となる。また、トリプトファンおよびその代謝産物は、摂食行動および情動行動を調節するなど様々な生理機能を有していることが明らかにされている。トリプトファンは多くのアミノ酸同様、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ことが一般的に知られている。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する(糖化反応)ことが知られており、この非酵素的糖化反応は生体内でも起こりうると思われた。トリプトファンは糖化反応によって、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。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ために、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の間には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の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。

過剰の食餌性トリプトファン給与にも関わらず、ニワトリの血漿中トリプトファン濃度が変化し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。トリプトファン代謝の多くはキヌレニン経路と呼ばれる酵素的異化経路によって分解されることが定説となっている。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、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、飼料給与期間中の継時的変化を調査した。血漿中トリプトファン濃度は、飼料給与1および3日目において食餌性トリプトファンの量に応じて有意に上昇した。飼料給与7日目以降では、血漿中トリプトファン濃度は低下し、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代謝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代謝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化合物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た。

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、PHP-TH $\beta$ C の投与実験と似た結果であることから、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、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。その結果、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。一方で、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、放射性 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ために、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の作用機序を明らかにするために、筋肉タンパク質合成にとって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 関連遺伝子発現による調節とは異なる調節機構によ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、ニワトリの静脈から 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。

以上の結果から、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があると考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、また日常生活においても多大なご指導とご助言を賜りました本大学教授・喜多一美博士に深い感謝の意を表します。

また、本論文の御校閲を賜りました本大学教授・佐野宏明博士、弘前大学教授・松崎正敏博士、および帯広畜産大学教授・日高智博士に厚く御礼申し上げます。

本論文の完遂は、小岩井農牧株式会社の皆様、地域連合推進センター技官の皆様、RI 総合実験センター技官の皆様、ならび本学の諸先生方のご理解、ご協力なくては為し得ませんでした。この場を借りて深く御礼申し上げます。

愛媛大学准教授の橘哲也博士には多くの融通を利かせていただき、なみなみならぬ助力をいただきました。拝謝いたします。

家畜飼養学研究室博士課程 2 年の伊藤謙君とは 5 年半の長きにわたり、多くの刺激と示唆をいただきました。感謝の念に堪えません。

共に卒業する同研究室修士 2 年の高橋夏生君、高橋孝介君には実験の補助や研究上の議論等々、様々な協力をいただきました。心より感謝いたします。

同研究室修士 1 年の本間彩香さんには、化合物の測定条件検討などで多くの相談に乗っていただきました。深く感謝いたします。

同研究室 4 年生の阿部佳世子さん、笹渡翔君にもお世話になりました。本当にありがとうございます。

そして、研究という学問の追求のために尊い命を犠牲にしてくれた動物達に感謝と哀悼の意を捧げます。

最後に、大学生活への深い理解と援助を続けてくれた家族に、深く感謝と敬愛の意を表したいと思います。

## 参考文献

- Abe, A. and Kokuba, H. (2013) Harmol induces autophagy and subsequent apoptosis in U251MG human glioma cells through the downregulation of survivin. *Oncology Reports* 29, 1333–1342.
- Adeva, M.M., Calviño, J., Souto, G. and Donapetry, C. (2012) Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids* 43, 171–181.
- Allen, J.R.F. and Holmstedt, B.R. (1980) The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. *Phytochemistry* 19, 1573–1582.
- Amadori, M. (1925) Products of condensation between glucose and p-phenetidine I. *Atti Della Accademia Nazionale Dei Lincei* 2, 337–342.
- American Diabetes Association (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, S62–S69.
- Arora, S., Anubhuti (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. *Neuropeptides* 40, 375–401.
- Baker, D.H., Fernandez, S.R., Edwards, H.M. and Parsons, C.M. (1996) Efficacy of a lysine-tryptophan blend for growth of chicks. *Journal of Animal Science* 74, 1063–1066.
- Ball, H.J., Yuasa, H.J., Weiser, S. and Hunt, N.H. (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41, 467–471.
- Ballard, F.J., Johnson, R.J., Owens, P.C., Francis, G.L., Upton, F.M., McMurtry, J.P. and Wallace, J.C. (1990) Chicken insulin-like growth factor-I: amino acid sequence, radioimmunoassay and plasma levels between strains and during growth. *General and Comparative Endocrinology* 79, 459–468.
- Bierhaus, A., Schiekofér, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P.M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Kloting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A.M., Stern, D.M., Haring, H.U., Schleicher, E. and Nawroth, P.P. (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Diabetes* 50, 2792–808.
- Bolster, D.R., Vary, T.C., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2004) Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *Journal of Nutrition* 134, 1704–1710.
- Braun, E.J. and Sweazea, K.L. (2008) Glucose regulation in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 151, 1–9.
- Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*

414, 813–820.

- Bungo, T., Shiraishi, J. and Kawakami, S.I. (2011) Hypothalamic melanocortin system on feeding regulation in birds: a review. *Journal of Poultry Science* 48, 1–13.
- Bungo, T., Yahata, K., Izumi, T., Dodo, K.-I., Yanagita, K., Shiraishi, J.-I., Ohta, Y. and Fujita, M. (2008) Centrally administered tryptohan suppresses food intake in free fed chicks through the serotonergic system. *Journal of Poultry Science* 45, 215–219.
- Canfield, W.M. and Kornfeld, S. (1989) The chicken liver cation-independent mannose 6-phosphate receptor lacks the high affinity binding site for insulin-like growth factor II. *Journal of Biological Chemistry* 264, 7100–7103.
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z. and Xu, A. (2007)  $\beta$ -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry* 14, 479–500.
- Chen, J.-Q. and Russo, J. (2012) Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1826, 370–384.
- Chen, Q., Chao, R., Chen, H., Hou, X., Yan, H., Zhou, S., Peng, W. and Xu, A. (2004) Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer* 114, 675–682.
- Coleman, M.E., DeMayo, F., Yin, K.C., Lee, H.M., Geske, R., Montgomery, C. and Schwartz, R.J. (1995) Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 270, 12109–12116.
- Crozier, S.J., Kimball, S.R., Emmert, S.W., Anthony, J.C. and Jefferson, L.S. (2005) Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *Journal of Nutrition* 135, 376–382.
- Das, T.K. and Waterlow, J.C. (1974) The rate of adaptation of urea cycle enzymes, aminotransferases and glutamic dehydrogenase to changes in dietary protein intake. *British Journal of Nutrition* 32, 353–373.
- De Pablo, F., Pérez-Villamil, B., Serna, J., González-Guerrero, P.R., López-Carranza, A., la Rosa, de, E.J., Alemany, J. and Caldés, T. (1993) IGF-I and the IGF-I receptor in development of nonmammalian vertebrates. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 35, 427–432.
- Denbow, D.M., Van Krey, H.P., Lacy, M.P. and Dietrick, T.J. (1983) Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: effects of ICV injections of biogenic amines. *Physiology and Behavior* 31, 85–90.
- Denbow, D.M., Van Krey, H.P. and Cherry, J.A. (1982) Feeding and drinking response of young chicks to injections of serotonin into the lateral ventricle of the brain. *Poultry Science*

61, 150–155.

- Dodd, K.M. and Tee, A.R. (2012) Leucine and mTORC1: a complex relationship. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 302, E1329–E1342.
- Duan, Y., Li, F., Tan, K., Liu, H., Li, Y., Liu, Y., Kong, X., Tang, Y., Wu, G. and Yin, Y. (2015) Key mediators of intracellular amino acids signaling to mTORC1 activation. *Amino Acids* 47, 857–867.
- Dubois, M.P. (1975) Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1340–1343.
- Duclos, M.J. (2005) Insulin-like growth factor-I (IGF-1) mRNA levels and chicken muscle growth. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 25–35.
- Duclos, M.J. and Goddard, C. (1990) Insulin-like growth factor receptors in chicken liver membranes: binding properties, specificity, developmental pattern and evidence for a single receptor type. *Journal of Endocrinology* 125, 199–206.
- Duclos, M.J., Beccavin, C. and Simon, J. (1999) Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. *Domestic Animal Endocrinology* 17, 231–243.
- Edmonds, M.S. and Baker, D.H. (1987) Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: effects on growth and dietary choice in the chick. *Journal of Animal Science* 65, 699–705.
- Evans, A.K. and Lowry, C.A. (2007) Pharmacology of the  $\beta$ -carboline FG-7142, a partial inverse agonist at the benzodiazepine allosteric site of the GABA<sub>A</sub> receptor: Neurochemical, neurophysiological, and behavioral effects. *CNS Drug Reviews* 13, 475–501.
- Folin, O. (1905) A theory of protein metabolism. *American Journal of Physiology* 13, 117–138.
- Forster, I.C., Harvey, R.J., Darlison, M.G. and Benson, J.A. (2001) Functional pharmacology of GABA<sub>A</sub> receptors containing the chicken brain  $\gamma$ 4 subunit. *European Journal of Pharmacology* 419, 1–7.
- Freedman, B.I., Andries, L., Shihabi, Z.K., Rocco, M.V., Byers, J.R., Cardona, C.Y., Pickard, M.A., Henderson, D.L., Sadler, M.V., Courchene, L.M., Jordan, J.R., Balderston, S.S., Graham, A.D., Mauck, V.L., Russell, G.B., Bleyer A.J. (2011) Glycated albumin and risk of death and hospitalizations in diabetic dialysis patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6, 1635–1643.
- Frison, G., Favretto, D., Zancanaro, F., Fazzin, G. and Ferrara, S.D. (2008) A case of  $\beta$ -carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Science International* 179, e37–e43.
- Funatogawa, T., Funatogawa, I. and Yafune, A. (2007) An estimation method of the half-life for

- a one-compartment model of a single bolus intravenous injection by a single sampling. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 17, 827–837.
- Gál, E.M. and Sherman, A.D. (1980) L-kynurenine its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochemical Research* 5, 223–238.
- Garlick, P.J. and Millward, D.J. (1972) An appraisal of techniques for the determination of protein turnover in vivo. *Proceedings of the Nutrition Society* 31, 249–255.
- Glass, D.J. (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37, 1974–1984.
- Goh, S.-Y. and Cooper, M.E. (2008) The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 1143–1152.
- González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V.J. and Guillén, H. (2010)  $\beta$ -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology* 48, 839–845.
- Hassanzadeh, M., Buyse, J., Toloei, T. and Decuyper, E. (2014) Ascites syndrome in broiler chickens: A review on the aspect of endogenous and exogenous factors interactions. *Journal of Poultry Science* 51, 229–241.
- Hazelwood, R.L. (1999) Pancreas. In *Sturkie's Avian Physiology*, G.G. Whittow, ed. (Academic press), pp. 539–555.
- Hazelwood, R.L. and Lorenz, F.W. (1959) Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of the domestic fowl. *American Journal of Physiology* 197, 47–51.
- Herraiz, T. (2000) Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- $\beta$ -carboline and  $\beta$ -carboline in food. *Journal of Chromatography A* 881, 483–499.
- Hudson, B.I., Hofmann, M.A., Bucciarelli, L., Wendt, T., Moser, B., Lu, Y., Qu, W., Stern, D.M., D'Agati, V., Yan, S.D., Yan, S.F., Grant, P.J., Schmidt, A.M. (2002) Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Current Science* 83, 1515–1521.
- Hultsch, C., Hellwig, M., Pawelke, B., Bergmann, R., Rode, K., Pietzsch, J., Krause, R. and Henle, T. (2006) Biodistribution and catabolism of  $^{18}\text{F}$ -labeled N- $\epsilon$ -fructoselysine as a model of Amadori products. *Nuclear Medicine and Biology* 33, 865–873.
- Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S. and Horiuchi, S. (1996) N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* 35, 8075–8083.
- Iqbal, M., Kenney, P.B. and Klandorf, H. (1999) Age-related changes in meat tenderness and tissue pentosidine: effect of diet restriction and aminoguanidine in broiler breeder hens. *Poultry Science* 78, 1328–1333.

- Jackman, R.W. and Kandarian, S.C. (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Cell Physiology* 287, C834–C843.
- Jain, R. and Lammert, E. (2009) Cell–cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11, 159–167.
- Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa, T., Mizuno, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (2009) Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Molecular Brain* 2, 8.
- Kee, A.J., Combaret, L., Tilignac, T., Souweine, B., Arousseau, E., Dalle, M., Taillandier, D. and Attaix, D. (2003) Ubiquitin–proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *Journal of Physiology* 546, 765.
- Keene, J.C. and Austic, R.E. (2001) Dietary supplements of mixtures of indispensable amino acids lacking threonine, phenylalanine or histidine increase the activity of hepatic threonine dehydrogenase, phenylalanine hydroxylase or histidase, respectively and prevent growth depressions in chicks caused by dietary excesses of threonine, phenylalanine, or histidine. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12, 274–284.
- Kierdorf, K. and Fritz, G. (2013) RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of Leukocyte Biology* 94, 55–68.
- Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2006) Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *Journal of Nutrition* 136, 227S–231S.
- Kimball, S.R., Shantz, L.M., Horetsky, R.L. and Jefferson, L.S. (1999) Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *Journal of Biological Chemistry* 274, 11647–11652.
- Kita, K. (2011) Tissue distribution of albumin-glucose advanced glycation end products administered to chickens. *Animal Science Journal* 82, 291–295.
- Kita, K. (2014) The spleen accumulates advanced glycation end products in the chicken: tissue comparison made with rat. *Poultry Science* 93, 429–433.
- Kita, K. and Okumura, J. (2001) Chicken insulin-like growth factor-I stimulates protein synthesis of chicken embryo myoblasts cultured in serum-free medium. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 17–20.
- Klandorf, H., Holt, S.B., McGowan, J.A., Pinchasov, Y., Deyette, D. and Peterson, R.A. (1995) Hyperglycemia and non-enzymatic glycation of serum and tissue proteins in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 110, 215–220.
- Knox, W.E. (1951) Two mechanisms which increase in vivo the liver tryptophan peroxidase

- activity: specific enzyme adaptation and stimulation of the pituitary adrenal system. *British Journal of Experimental Pathology* 32, 462–469.
- Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.L., Saudek, C., Lehrman, M. and Cerami, A. (1976) Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 295, 417–420.
- Lacy, M.P., Van Krey, H.P., Skewes, P.A. and Denbow, D.M. (1985) Effect of intrahepatic glucose infusions on feeding in heavy and light breed chicks. *Poultry Science* 64, 751–756.
- Lacy, M.P., Van Krey, H.P., Skewes, P.A. and Denbow, D.M. (1986) Intraperitoneal injections of tryptophan inhibit food intake in the fowl. *Poultry Science* 65, 786–788.
- Le Floch, N., Otten, W. and Merlot, E. (2011) Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* 41, 1195–1205.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. and Roberts, C.T. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine Reviews* 16, 143–163.
- Levine, B. and Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* 6, 463–477.
- MacKenzie, C.R., Heseler, K., Müller, A. and Däubener, W. (2007) Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Current Drug Metabolism* 8, 237–244.
- Maddison, D.C. and Giorgini, F. (2015) The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 40, 134–141.
- Maestroni, G.J.M. (1993) The immunoneuroendocrine role of melatonin. *Journal of Pineal Research* 14, 1–10.
- Maillard, L.C. (1912) Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences* 154, 66–68.
- Martijena, I.D. (1997) Effect of diazepam and a  $\beta$ -carboline on open-field and T-maze behaviors in 2-day-old chicks. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58, 915–921.
- McMurtry, J.P., Francis, G.L. and Upton, Z. (1997) Insulin-like growth factors in poultry. *Domestic Animal Endocrinology* 14, 199–229.
- Millward, D.J., Garlick, P.J., Nnanyelugo, D.O. and Waterlow, J.C. (1976) The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochemical Journal* 156, 185–188.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Shimasaki, S. and Nagai, R. (2012) Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino Acids* 42, 1163–1170.

- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A.L. (1998) Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 281, 1191–1193.
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L. and Rosenthal, N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genetics* 27, 195–200.
- Møller, S.E. (1981) Pharmacokinetics of tryptophan, renal handling of kynurenine and the effect of nicotinamide on its appearance in plasma and urine following L-tryptophan loading of healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 21, 137–142.
- National Research Council (1994) Nutrient requirements of poultry: 9<sup>th</sup> revised edition. National Academies Press. Washington, D.C., USA.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J. and Monteggia, L.M. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25.
- Nury, D., Doucet, C. and Coux, O. (2007) Roles and potential therapeutic targets of the ubiquitin proteasome system in muscle wasting. *BMC Biochemistry* 8, S7.
- Oki, M., Sato, H. and Nakagawa, K. (2007) Influence of leucine on protein metabolism of chicken embryo myoblasts is modulated by varying serum concentrations in the medium. *Journal of Poultry Science* 44, 161–167.
- Olkowski, A.A. (2007) Pathophysiology of heart failure in broiler chickens: structural, biochemical, and molecular characteristics. *Poultry Science* 86, 999–1005.
- Oxenkrug, G.F. (2007) Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1122, 35–49.
- Oxenkrug, G.F. (2010) Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences* 47, 56–63.
- Pande, M., Hur, J., Hong, Y., Backus, C., Hayes, J.M., Oh, S.S., Kretzler, M. and Feldman, E.L. (2011) Transcriptional profiling of diabetic neuropathy in the BKS db/db mouse: a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 60, 1981–1989.
- Pardridge, W.M. (1979) Tryptophan transport through the blood-brain barrier: in vivo measurement of free and albumin-bound amino acid. *Life Sciences* 25, 1519–1528.
- Pfau, W. and Skog, K. (2004) Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. *Journal of Chromatography B* 802, 115–126.
- Ponter, A.A., Cortamira, N.O., Seve, B., Salter, D.N. and Morgan, L.M. (1994) The effects of energy source and tryptophan on the rate of protein synthesis and on hormones of the

- entero-insular axis in the piglet. *British Journal of Nutrition* *71*, 661–674.
- Price, S.A., Zeef, L.A., Wardleworth, L., Hayes, A. and Tomlinson, D.R. (2006) Identification of changes in gene expression in dorsal root ganglia in diabetic neuropathy: correlation with functional deficits. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* *65*, 722–732
- Rabbani, N. and Thornalley, P.J. (2012) Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* *42*, 1087–1096.
- Reddy, V.P. and Beyaz, A. (2006) Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* *11*, 646–654.
- Reiter, R.J. (1991) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews* *12*, 151–180.
- Rothschild, M.A., Oratz, M., Mongelli, J., Fishman, L. and Schreiber, S.S. (1969) Amino acid regulation of albumin synthesis. *Journal of Nutrition* *98*, 395–403.
- Rönner, B., Bergmüller, W., Freilinger, C., Severin, T. and Pischetsrieder, M. (2000) Formation of tetrahydro- $\beta$ -carbolines and  $\beta$ -carbolines during the reaction of l-tryptophan with d-glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *48*, 2111–2116.
- Röper, H., Röper, S., Heyns, K. and Meyer, B. (1983) N.M.R. spectroscopy of N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-amino acids (“fructose-amino acids”). *Carbohydrate Research* *116*, 183–195.
- Sainio, E.L., Pulkki, K. and Young, S.N. (1996) L-tryptophan: biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids* *10*, 21–47.
- Sandri, M. (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Letters* *584*, 1411–1416.
- SAS Institute. *SAS User’s Guide: Statistics*, 8th edition. Cary, NC, USA, 1999.
- SAS Institute. *SAS/STAT User’s Guide*. 9.4 Cary, NC, USA, 2013.
- Schoenheimer, R. and Rittenberg, D. (1940) The study of intermediary metabolism of animals with the aid of isotopes. *Physiological Reviews* *20*, 218–248.
- Schoenheimer, R., Ratner, S. and Rittenberg, D. (1939) Studies in protein metabolism X. The metabolic activity of body proteins investigated with l (-)-leucine containing two isotopes. *Journal of Biological Chemistry* *130*, 703–732.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr, Seeley, R.J. and Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* *404*, 661–671.
- Sidransky, H., Sarma, D.S.R., Bongiorno, M. and Verney, E. (1968) Effect of dietary tryptophan on hepatic polyribosomes and protein synthesis in fasted mice. *Journal of Biological Chemistry* *243*, 1123–1132.
- Silber, B.Y. and Schmitt, J.A.J. (2010) Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* *34*, 387–407.

- Simon, J. and Rosselin, G. (1979) Effect of intermittent feeding on glucose-insulin relationship in the chicken. *Journal of Nutrition* 109, 631-641.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L. (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.
- Stewart, C.E.H. and Rotwein, P. (1996) Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 271, 11330-11338.
- Sugden, P.H. and Fuller, S.J. (1991) Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochemical Journal* 273, 21-37.
- Takagi, M. and Manabe, Y. (2014) Mechanisms underlying alterations in glucose metabolism due to exercise. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 3, 423-427.
- Takikawa, O. (2005) Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2, 3-dioxygenase-initiated 1-tryptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 12-19.
- Tahara, Y. and Shima K. (1995) Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* 18, 440-447.
- Tessier, F.J. and Birlouez-Aragon, I. (2012) Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids* 42, 1119-1131.
- Thompson, M.G. and Palmer, R.M. (1998) Signalling pathways regulating protein turnover in skeletal muscle. *Cellular Signalling* 10, 1-11.
- Uldry, M. and Thorens, B. (2004) The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 447, 480-489.
- Ulrich, P. and Cerami, A. (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progress in Hormone Research* 56, 1-21.
- Upton, Z., Francis, G.L., Wallace, J.C. and Ballard, F.J. (1995) Production and characterization of recombinant chicken insulin-like growth factor-II from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Endocrinology* 14, 79-90.
- Vandenburgh, H.H., Karlisch, P., Shansky, J. and Feldstein, R. (1991) Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 260, C475-C484.
- Widner, B., Leblhuber, F., Walli, J., Tilz, G.P., Demel, U. and Fuchs, D. (2000) Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 107, 343-353.
- Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D. and Porte, D. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503-

- Xu, H., Wang, Z., Wang, Y., Hu, S. and Liu, N. (2013) Biodistribution and elimination study of fluorine-18 labeled N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine following intragastric and intravenous administration. *PLoS ONE* 8, e57897.
- Yang, Y.W., Robbins, A.R., Nissley, S.P. and Rechler, M.M. (1991) The chick embryo fibroblast cation-independent mannose 6-phosphate receptor is functional and immunologically related to the mammalian insulin-like growth factor-II (IGF-II)/man 6-P receptor but does not bind IGF-II. *Endocrinology* 128, 1177–1189.
- Young, V.R. and Ajami, A. (1999) Isotopes in nutrition research. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 15–32.
- Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W. and Metz, T.O. (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Journal of Proteome Research* 8, 754–769.