

	トウモロコシ
氏 名	伊藤 謙
本籍（国籍）	愛知県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 680 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	食物由来ペプチドがニワトリの栄養素吸収に及ぼす影響 (Influence of food-derived peptides on nutrient absorption in chickens)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 喜多 一美 副査 西向 めぐみ(岩手 准教授),松崎 正敏(弘前 教授),堀口 健一(山形 教授)

論文の内容の要旨

食物中のタンパク質は、消化管内においてペプチドやアミノ酸まで消化され、栄養素として体内に吸収される。近年、食物中のタンパク質から生成された機能性ペプチドには、血糖値上昇抑制作用および脂質吸収抑制作用などヒトの生活習慣病を改善するものが多い。しかし、飼料タンパク質由来のペプチドが生産動物の生理機能、特に栄養素吸収に及ぼす影響を調査した報告はほとんど無い。そこで本研究では、ニワトリ飼料の代表的な原料穀物である小麦、大豆およびトウモロコシに着目し、それぞれの主要タンパク質由来のペプチドが、腸管からの栄養素吸収へ影響を及ぼすか否か調査した。小麦、大豆およびトウモロコシの主要タンパク質をトリプシンで消化し、得られたペプチドをグルコース - アミノ酸混合溶液と共にニワトリへ経口投与した。その後、腸間膜静脈血中のアミノ酸濃度を測定することで飼料タンパク質由来ペプチドが腸管からのアミノ酸吸収に影響を及ぼすか否か調査した。その結果、小麦の主要タンパク質であるグルテンの消化産物が、腸管からのアミノ酸吸収を促進したことを示した。さらに、小麦グルテン由来ペプチドを分子量毎に分画し、分子量 3,000 以下、分子量 3,000~10,000 および分子量 10,000 以上の画分を調製した。それぞれの画分とグルコース - アミノ酸混合溶液をニワトリへ経口投与し、腸間膜静脈血中のアミノ酸濃度を測定したところ、分子量 3,000 以上のペプチドに腸管からのアミノ酸吸収を促進する効果があることを明らかにした。

しかし、小麦グルテン由来ペプチドが腸管の上皮細胞に直接作用してアミノ酸吸収を促進したのか、小腸上皮から吸収された後にアミノ酸吸収を促進したのか不明である。

また最近、高分子ペプチドがそのまま血中へと移行することが報告されている。そこで、ニワトリの消化管内において小麦グルテン由来ペプチドが直接吸収されるか否かを調査した。ニワトリの小腸から反転腸管を作製し、小麦グルテン由来ペプチドを封入してペプチドが腸管を通過するか否かを調査した。腸管を通過した小麦グルテン由来ペプチドの検出には、ウェスタンブロット法とオービトラップ質量分析計を用いた。しかし、ニワトリの腸管を通過した小麦グルテン由来ペプチドは検出されなかった。これらの結果から、小麦グルテン由来ペプチドが小腸上皮細胞に直接作用してアミノ酸吸収を促進させた可能性が示唆された。

小腸上皮細胞における栄養素吸収の機構を詳細に調査するためには *in vivo* おける実験が必要不可欠となる。しかし、ニワトリ由来の小腸上皮細胞の細胞株は存在しない。そこで、小腸上皮細胞の初代培養系である腸管オルガノイド培養に着目し、ニワトリ小腸からオルガノイド形成が可能か否かを調査した。ニワトリ胚の腸管からオルガノイドを形成したとの報告があるが、一方で胚由来の腸管からはオルガノイドではなく、未分化な細胞を多く含んだスフ

ェロイドが形成されることが報告されている。そこで、成鶏の腸管からオルガノイドを形成させることを試みた。その結果、**Wnt3a**、**R-spondin3**、**Noggin** を含む **L-WRN conditioned medium** を用いることで成鶏から腸管オルガノイドを形成させることが可能となった。次に、調製したオルガノイドを用いてペプチドの吸収試験が可能であるか否かを調査した。腸管オルガノイドは中心に管腔構造を形成するため、マイクロマニピレーターを用いてオルガノイドの中心にサンプルを投与する必要がある。そこで、マイクロマニピレーターを用いてオルガノイドの中心へ蛍光標識されたデキストランを注入し、投与したデキストランがオルガノイドの管腔内で保持されるか否かを調査した。その結果、投与したデキストランがインジェクションした箇所から漏出してしまったため、ペプチドの吸収試験に用いることは困難であることが明らかとなった。

本研究では、オルガノイドを用いて小腸からの小麦グルテン由来ペプチドのアミノ酸吸収促進機構を調査する予定であった。しかし、オルガノイドを用いたペプチドの吸収試験は困難であり、別の手法を用いる必要性が示された。ここで、トランズウェル上に線維芽細胞をフィーダー細胞として培養し、その上で腸管オルガノイドを培養した後、液相気相界面培養を用いることで小腸上皮を模した単層培養が可能であることが報告されている。今後は、放射性標識した小麦グルテン由来ペプチドのオートラジオグラフィを用いて小腸から吸収されるペプチドの探索を行いつつ、液相気相界面培養法を用いたニワトリ腸管オルガノイドの平面培養が可能か否かを調査する予定である。

本研究より、ニワトリの主要飼料穀物である小麦由来のペプチドにアミノ酸吸収を促進するペプチドが存在することを示した。また、小腸上皮細胞における栄養素吸収機構の解明に不可欠である腸管オルガノイドを成鶏の小腸から調製することに初めて成功した。以上の成果は、今後の畜産栄養学において栄養素吸収機構の更なる解明に大きく貢

献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

生体内においてトリプトファンは酵素により代謝分解されるのが一般的だが、トリプトファンは非酵素的な化学反応によってグルコースと結合し（糖化反応）、アマドリ化合物と PHP-TH β C の 2 つの糖化トリプトファン化合物を形成することが知られている。この非酵素的糖化反応は生体内でも起こりうると考えられた。本研究では、高血糖動物であるニワトリを用いて、トリプトファンの非酵素的な代謝経路を明らかにし、糖化トリプトファン化合物の生理機能を解明することを目的とした。

1. トリプトファン過剰添加飼料をニワトリに給与し、血漿中のトリプトファンとトリプトファン異化産物の濃度を測定した。その結果、トリプトファン過剰添加飼料の給与は、ニワトリの酵素的トリプトファン異化経路を亢進することを明らかにした。また、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濃度の間に有意な正の相関が認められ、血漿中糖化トリプトファン化合物濃度は基質であるトリプトファン濃度の影響を受けることが示唆された。

2. 糖化トリプトファンの代謝経路を明らかにするため、ニワトリの静脈へ PHP-TH β C を単回投与することにより PHP-TH β C の血中半減期およびニワトリ組織への蓄積を調査した。ニワトリ血漿中の PHP-TH β C 半減期は 40-100 分程度であることが示され、PHP-TH β C は腎臓から速やかに排泄されることが示唆された。この結果は糖化トリプトファン以外の糖化化合物の結果と類似しており、血中糖化化合物の特異的な排泄機序が存在する可能性が示唆された。3. 放射性糖化トリプトファン化合物をニワトリ胚由来の初代培養細胞に取り込ませることで、糖化トリプトファン化合物が細胞に取り込まれる機序を調査した。その結果、糖化トリプトファンは細胞のタンパク質画分に多く取り込まれることが明らかとなったため、糖化トリプトファンに結合するタンパク質の存在が示唆された。

4. PHP-TH β C がニワトリ胚筋芽細胞のタンパク質合成に及ぼす影響を調査した。PHP-TH β C は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ため、その作用機序を明らかにするべく、PHP-TH β C がインスリン様成長因子（IGF）関連遺伝子の mRNA 発現量に及ぼす影響を調査した。その結果、IGF 関連遺伝子発現量に PHP-TH β C が関与していないことが示唆された。

5. PHP-TH β C がニワトリの摂食行動に及ぼす影響を調べるために、ニワトリの翼下静脈から PHP-TH β C を投与して摂食量を測定した。その結果、PHP-TH β C の末梢投与によって、ニワトリの摂食が亢進した。

本研究の成果より、ニワトリの生体内ではトリプトファンの一部は非酵素的に代謝されることが明らかとなり、酵素を介さない異化経路が存在することを示した。また、糖化トリプトファン化合物が生理機能を有している可能性が示されたことから、今後の畜

産栄養学において非酵素的糖化反応の知見を増やす必要性を見出した。

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

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

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

参考論文

1. Kita, K., Y. Kawashima, R. Makino, T. Namauo, S. Ogawa, H. Muraoka and S. Fujimura (2013). Detection of two types of glycated tryptophan compounds in the plasma of chickens fed tryptophan excess diets. *Journal of Poultry Science*, 50 (2): 138-142.
2. Kita, K. and R. Makino (2014). Influence of Valine Analogues on Protein Synthesis of Chicken Embryo Myoblasts. *Journal of Poultry Science*, 51 (2): 191-194.
3. Kita, K., K. R. Ito, M. Sugahara, M. Kobayashi, R. Makino, N. Takahashi, H. Nakahara, K. Takahashi and M. Nishimukai (2015). Effect of In Ovo Administration of Branched-Chain Amino Acids on Embryo Growth and Hatching Time of Chickens. *Journal of Poultry Science*, 52 (1): 34-36.
4. 牧野良輔, 喜多一美 (2015). ニワトリにおける非酵素的糖化トリプトファン代謝および生理機能. *栄養生理研究会報*, 59 (1): 35-40.
5. Nishimura, K., K. Hiramatsu, T. Watanabe, R. Makino, N. Sasaki and K. Kita (2015). Amino acid supplementation to diet influences the activity of the L cells in chicken small intestine. *Journal of Poultry Science*, 52 (3): 221-226.