

博士論文

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

2017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
動物生産学連合講座

伊藤 謙

目次

	頁
第1章 序論	1
引用文献	5
付表	8
第2章 ニワトリにおける腸管からのグルコースおよびアミノ酸吸収の 経時的変化	
第1節 目的	11
第2節 材料と方法	11
第3節 結果	15
第4節 考察	16
引用文献	17
付表	18
第3章 穀物タンパク質のトリプシン消化産物が小腸からのグルコースおよび アミノ酸吸収に及ぼす影響	
第1節 目的	20
第2節 材料と方法	20
第3節 結果	25
第4節 考察	26
引用文献	27
付表	28

第4章 限外ろ過膜分画による小麦グルテントリプシン消化産物画分が 小腸からのアミノ酸吸収へ及ぼす影響	
第1節 目的	30
第2節 材料と方法	30
第3節 結果	34
第4節 考察	34
引用文献	36
付表	37
第5章 反転腸管法を用いたニワトリ腸管から吸収される 小麦グルテンペプチドの探索	
第1節 目的	38
第2節 材料と方法	38
第3節 結果	47
第4節 考察	47
引用文献	49
付表	50
第6章 ニワトリ腸管オルガノイド培養法の確立	
第1節 目的	51
第2節 材料と方法	51
第3節 結果	57
第4節 考察	57
引用文献	58

付表	60
第7章 マイクロマニピレーターを用いた腸管オルガノイドへのサンプルインジェクション法の確立	
第1節 目的	61
第2節 材料と方法	61
第3節 結果	62
第4節 考察	62
引用文献	63
付表	64
第8章 総括	65
主論文・参考論文	67
謝辞	68

第1章 序論

【畜産飼料におけるタンパク質の役割】

畜産において飼料中の粗タンパク質(Crude protein: CP)含量は家畜・家禽の成長に大きく関わり、その重要性から日本飼養標準[1]および NRC 飼養標準[2]ではニワトリの発育ステージ毎に CP 要求量が定められている。例えば、単冠白色レグホンの場合、日本飼養標準では、幼雛期(0~4 週齢)、中雛期(4~10 週齢)、大雛期(10 週齢~初産)、産卵期に分けられ、それぞれの時期における飼料中 CP 含量は 19.0%、16.0%、13.0%および 15.5%と定められている。NRC 飼養標準では 0~6 週齢期、6~12 週齢期、12~18 週齢期および 18~初産期に分けられ、それぞれ飼料中の CP 要求量は 18.0%、16.0%、15.0%および 17.0%と定められている。現在、採卵鶏の飼料として使用されている代表的な飼料原料としては大豆、小麦およびトウモロコシが挙げられる。ニワトリにおけるそれぞれの CP 消化率は、小麦では 82%、トウモロコシでは 85%、大豆では 85%であり、数多く存在する飼料原料の中でも消化率の高いものが使用されている[3]。飼料原料として用いる際に重要視されるのはタンパク質の含量および消化率であり、タンパク質が保有する機能性については考慮されていない。

【機能性食品としてのタンパク質】

長年、栄養学的にはタンパク質は 5 大栄養素に位置付けられており、アミノ酸栄養を補給するものという位置付けであった。しかし、ヒトにとって難消化性タンパク質が第 6 の栄養素と言われる食物繊維と類似した生理機能を示すことや、ペプチドが血圧上昇抑制効果[4]や血糖値上昇抑制効果[5]を示すことが明らかとなり、タンパク質やペプチドが単なる生体の構成材料としてではなく、生理活性を示す機能性食品成分として注目を集めている。上記のような生理活性を

持つペプチドは「機能性ペプチド」と呼ばれ、消化管での消化・吸収過程において機能を発揮するものや、消化管内で吸収された後に標的細胞に作用するものなどが存在する。

機能性ペプチドの歴史は古く、1950年にくる病乳児のビタミンD依存性の骨石灰化を促進させる初めての機能性ペプチドとして、乳カゼイン由来のリン酸化カゼインペプチドが発見された[6]。このペプチドは、1986年には小腸管腔内における不溶性カルシウムの吸収効率を上昇させるCPP(Casein phosphopeptides)として同定された[7]。その後も、血圧降下作用[8]、血糖値上昇抑制作用[9][10]、脂質吸収抑制作用[11]など多岐に亘って生理機能を示す食物由来ペプチドが報告されてきた。2007年にはHartmannとMeiselが生理機能を持つ食物由来ペプチドをリスト化している[12](Table 1)。

上記の生理機能を持つ食物由来ペプチドは糖尿病予防や高血圧抑制などヒトの生活習慣病に対する機能を対象としており、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をトリプシン消化した際に、得られたペプチドが、腸管からの栄養素吸収へ及ぼす影響を調査することを第1の目的とした(第2~4章)。

【小腸における機能性ペプチドの吸収機構】

消化管における機能性ペプチドの作用機序には2つ機構が存在する。一つ目は腸管上皮細胞のL細胞がペプチドを認識し、腸管ホルモン分泌を促進することで生体の生理機能に影響を及ぼす場合である[13]。二つ目は、ペプチドが小腸

から吸収された後、血中へと移行して、標的細胞に直接作用する場合である[14]。ペプチドの吸収機構も 2 種類存在しており、ジペプチドおよびトリペプチド等の低分子ペプチドはペプチドトランスポーター(PEP1)を介して腸管から血中へと移行する[15]。さらに、近年、9~22 個のアミノ酸から成る高分子ペプチドが小腸上皮細胞のマクロピノサイトーシスやエンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれることが明らかとなっており、小腸上皮細胞間のタイトジャンクションを通過する経路も提唱されている(Figure 1) [16]。

一方、血中に取り込まれた高分子ペプチドが生体へ及ぼす影響に関する報告は見当たらない。そこで、ニワトリへ強制経口投与した小麦グルテンペプチドが消化酵素の影響を受けず腸管から吸収され、血中へと移行するか否か調査することを第 2 の目的とした (第 5 章)。

【小腸上皮細胞の初代培養】

腸管上皮細胞における物質の吸収機構の調査には Caco-2 や IEC6、IEC18 等の細胞株が用いられているが、これらの細胞株はガン細胞由来であり、ヒト、ラットなどの哺乳類動物から得られた細胞である。しかし、ニワトリ由来の腸管上皮細胞株は存在しない。これまでに腸管上皮細胞の初代培養系の確立が試みられてきたが[17-19]、確立された培養手法は、胎児から小腸を採取し腸管上皮細胞の培養を行うものであった。

ところが、2009 年に Sato らが成体のマウス腸管陰窩(クリプト)から腸管オルガノイドを形成させる培養法を確立し、成体由来の腸管上皮細胞初代培養が可能となった[17]。この方法では、マウスから採取したクリプトをマトリゲルに包埋し、Wnt3a、R-spondin および Noggin といったサイトカインを含む培地を用いることにより、小腸上皮細胞の初代培養系を構築した。この培養法で用いられ

た Wnt3a、R-spondin および Noggin 等のサイトカインは、Lgr5 の発現量を高める目的で用いられている(Figure 2)[18]。この手法を用いることで、杯細胞や内分泌細胞等の高度に分化した腸管上皮細胞を培養することも可能になっている。

近年、ニワトリ胚から採取した腸管を用いた腸管オルガノイドの培養法が報告された[19]。しかし、胚時期の腸管は未発達であり、胚時期のクリプトから培養した腸管上皮幹細胞は、分化したオルガノイドではなく、未分化な状態を維持したスフェロイドを形成することが明らかとなっている[20]。また、腸管上皮細胞における物質の透過を調査するためには、吸収上皮細胞を含む段階まで分化を誘導する必要がある。そこで本研究では、成体のニワトリから腸管オルガノイドを形成させることを第3の目的とした(第6章)。

【オルガノイドを用いた腸管上皮細胞からのペプチド吸収の調査】

腸管上皮細胞を用いてペプチドの吸収機構を解明をするためには、腸管オルガノイドを用いることになる。しかし、腸管オルガノイドは中心に管腔内を模した構造を形成させるため、腸管上皮細胞の物質透過試験を行うためには、ペプチドを腸管オルガノイドの中心に注入した後に、培養を継続する必要がある。今までに腸管オルガノイドの中心へサンプルを注入する実験が試みられており、Wilson らはマイクロインジェクターを用いてオルガノイドの管腔内にサンプルを注入している[21]。そこで本研究において、マニピレーターを用いてオルガノイドにペプチドを注入することにより腸管からのペプチド吸収を調査することを第4の目的とした(第7章)。

引用文献

- [1] 日本飼養標準 家禽, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構編, 中央畜産会. 2011.
- [2] Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition, Subcommittee on Poultry Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. 1994.
- [3] 日本標準飼料成分表, 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構編, 中央畜産会. 2009.
- [4] Rubattu S, Calvieri C, Pagliaro B and Volpe M. Atrial natriuretic peptide and regulation of vascular function in hypertension and heart failure: implications for novel therapeutic strategies. *Journal of Hypertension*, 31: 1061-1072. 2013.
- [5] Mochida T, Hira T and Hara H. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151: 3095-3104. 2010.
- [6] Mellander O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis*, 55: 247-255. 1950.
- [7] Sato R, Noguchi T and Naito H. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32: 67-76. 1986.
- [8] Meisel H and FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1289-1295. 2003.

- [9] Mochida T, Hira T and Hara H. The corn protein, hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-I secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151: 3095-3104. 2010.
- [10] Ito R K, Yokoyama J and Kita K. Suppression of intestinal glucose absorption by administering iodine-enriched eggs to chickens as hyperglycemic experimental animals. *Anti-Aging Medicine*, 10: 135-141. 2014.
- [11] Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G and Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 129: 1725-1730. 1999.
- [12] Hartmann R and Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163-169. 2007.
- [13] Gribble FM and Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 78: 277-299. 2016.
- [14] Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, Ueda H, Watanabe T, Araya T, Irie S and Takehana K. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52: 211-215. 2006.
- [15] Fricker G and Drewe J. Current concepts in intestinal peptide absorption. *Journal of Peptide Science*, 2: 195-211. 1996.
- [16] Madani F, Lindberg S, Langel Ü, Futaki S and Gräslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of Biophysics*, Article ID 414729. 2011.
- [17] Evans GS, Flint N, Somer AS, Eyden B and Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *Journal of Cell Science*, 101: 219-231. 1992.

- [18] Caldwell DJ, Droleskey RE, Elissalde MH, Kogut MH, DeLoach JR and Hargis BM. Isolation and primary culture of chicken intestinal epithelial cells retaining normal in vivo-like morphology. *Journal of Tissue Culture Methods*, 15: 15-18. 1993.
- [19] Ali A and Reynolds DL. Primary cell culture of turkey intestinal epithelial cells. *Avian Diseases*, 40: 103-108. 1996.
- [20] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ and Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459: 262-265. 2009.
- [21] 細胞工学 Vol. 32 No.4, p423 図 3. 学研メディカル秀潤社.
- [22] Pierzchalska M, Grabacka M, Michalik M, Zyla K and Pierzchalski P. Prostaglandin E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *Biotechniques*, 52: 307-315. 2012.
- [23] Mustata RC, Vasile G, Fernandez-Vallone V, Strollo S, Lefort A, Libert F, Monteyne D, Pérez-Morga D, Vassart G and Garcia MI. Identification of Lgr5-independent spheroid-generating progenitors of the mouse fetal intestinal epithelium. *Cell Reports*, 5: 421-432. 2013.
- [24] Wilson SS, Tocchi A, Holly MK, Parks WC and Smith JG. A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen-epithelial cell interactions. *Mucosal Immunology*, 8: 352-361. 2015.

Table 1. Examples of bioactive peptides derived from food

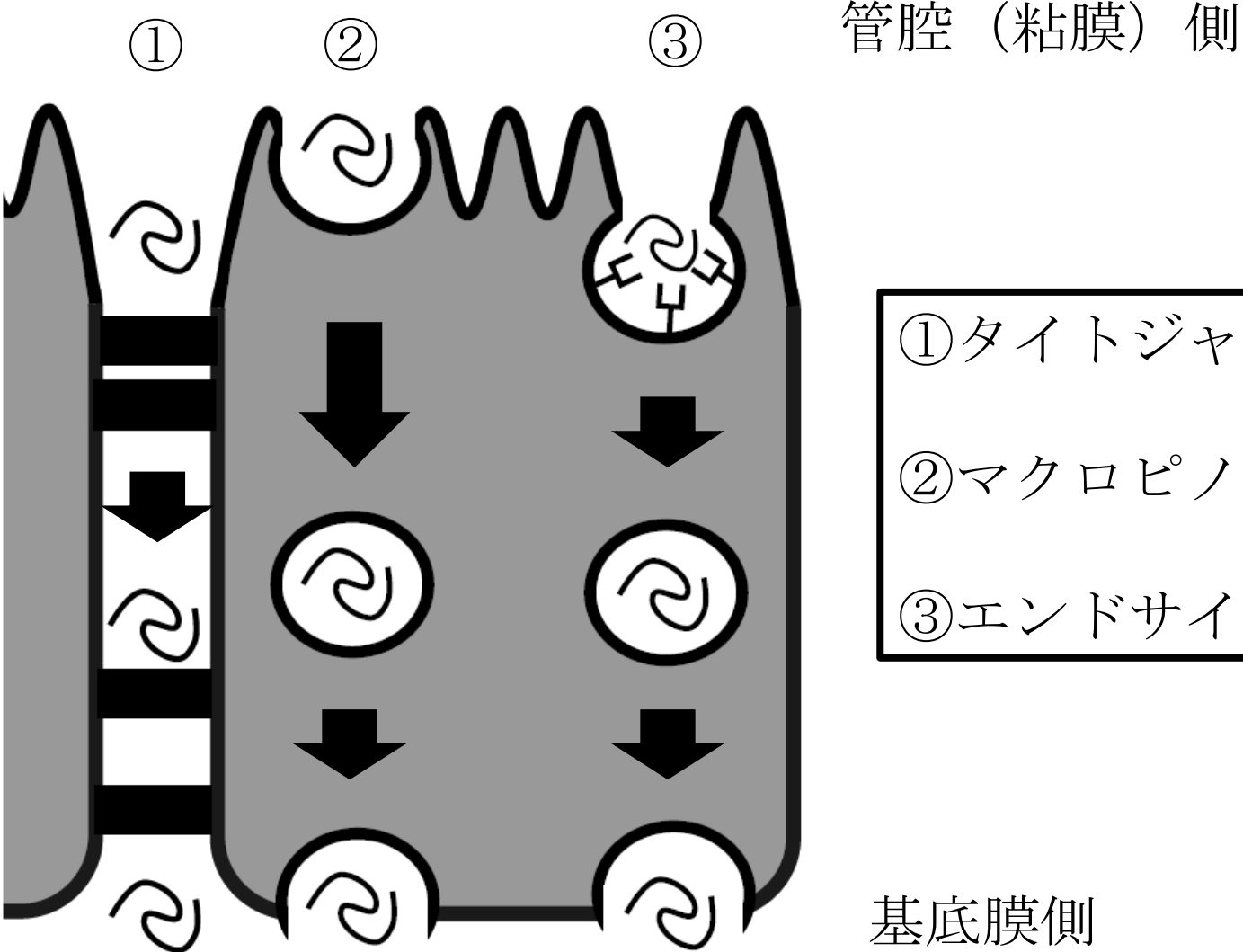
Effect	Origin	Encrypting protein(s)	Name/remarks/sequence (in single-letter code)
ACE inhibitory	Soy	Soy protein	NWGPLV
Hypotensive	Fish	Fish muscle protein	LKP, IKP, LRP (derived from sardine, bonito, tuna, squid)
	Meat	Meat muscle protein	IKW, LKP
	Milk	α -LA, β -LG	Lactokinins (e.g. WLAHK, LRP, LKP)
		α -, β -, κ -CN	Casokinins (e.g. FFVAP, FALPQY, VPP)
	Egg	Ovotransferrin	KVREGTTY
		Ovalbumin	Ovokinin (FRADHPPL) Ovokinin (2-7) (KVREGTTY)
Immunomodulatory	Wheat	Wheat gliadin	IAP
	Broccoli	Plant protein	YPK
	Rice	Rice albumin	Oryzatensin (GYPMYPLR)
	Egg	Ovalbumin	Peptides not specified
	Milk	α -, β -, κ -CN, α -LA	Immunopeptides (eg. α ₅₁ -immunocasokinin) (TTMPLW)
Cytomodulatory	Wheat	Wheat gluten	Immunopeptides
	Milk	α -, β -CN	α -Casomorphin (HIQKED(V)) β -casomorphin-7 (YPPFGPI)
Opioid agonist	Wheat	Wheat gluten	Gluten-exorphins A4, A5 (GYYPT), B4, B5, and C (YPISL)
	Milk	α -LA, β -LG	α -Lactorphins, β -lactorphins
		α -, β -CN	Casomorphins
Opioid antagonist	Milk	Lactoferrin	Lactoferroxins
		κ -CN	Casoxins
Antimicrobial	Egg	Ovotransferrin	OTAP92 (f109-200) ^a
		Lysozyme	Peptides not specified
Antithrombotic	Milk	Lactoferrin	Lactoferricin
		α -, β -, κ -CN	Casecidins, isracidin, kappacin
		κ -CN (glycomacropeptide)	κ -CN (f106-116) ^b , casoplælin
Mineral binding, anticariogenic	Milk	α -, β -CN	Caseinophosphopeptides
Hypocholesterolemic	Soy	Glycinin	LPYPR
	Milk	β -LG	IIAEK
Antioxidant	Fish	Sardine muscle	MY
	Wheat	Wheat germ protein	Peptides not specified
	Milk	α -LA, β -LG	MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI

CN, casein; LA, lactalbumin; LG, lactoglobulin.

^a f, fragment

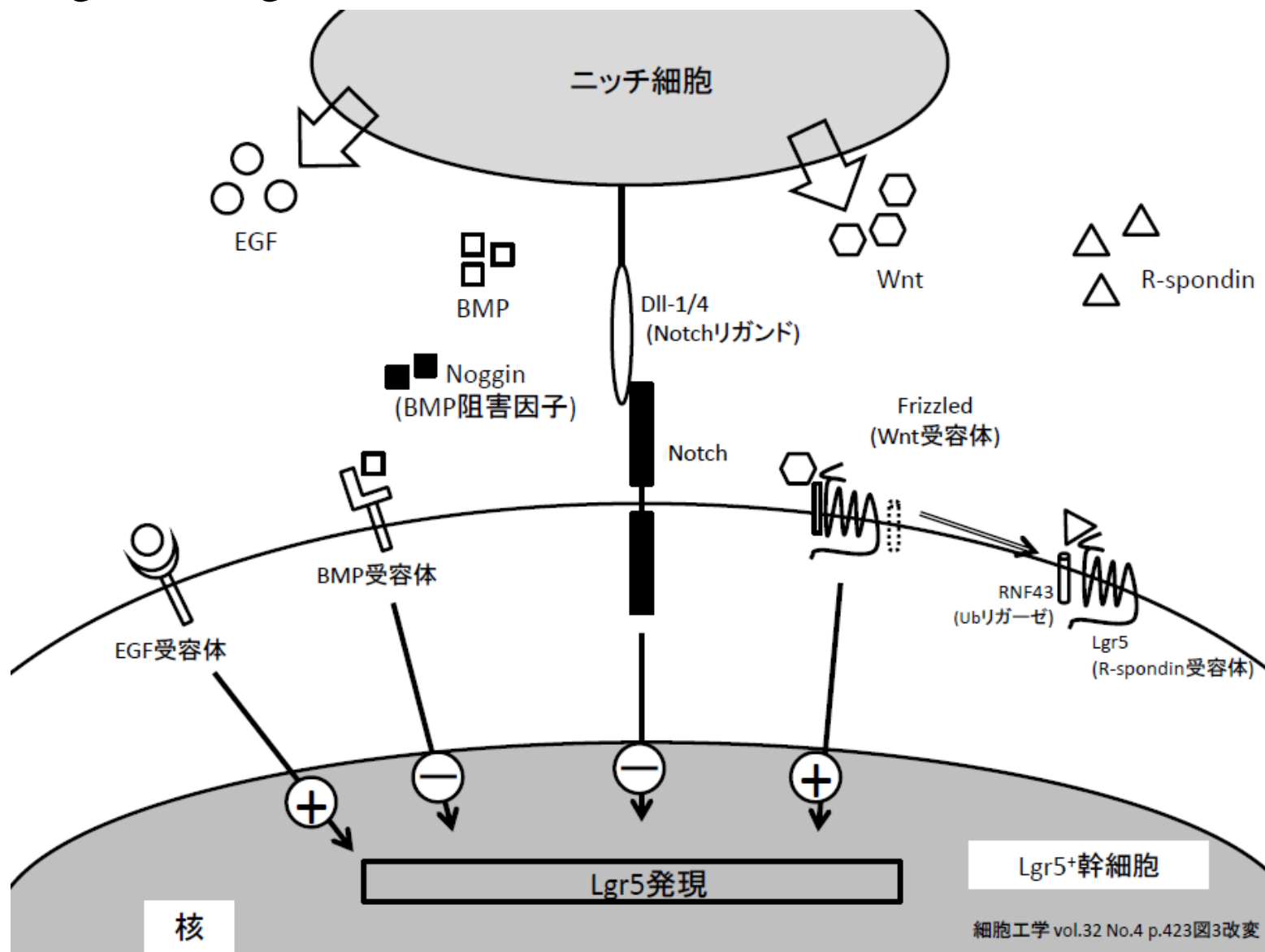
Modified Hartmann and Meisel [12].

Figure 1. タンパク質および高分子ペプチドの吸収様式



- ① タイトジャンクションの通過
- ② マクロピノサイトーシス
- ③ エンドサイトーシス

Figure 2. Lgr5陽性幹細胞の維持機構



第2章 ニワトリにおける腸管からのグルコースおよびアミノ酸吸収の経時的変化

第1節 目的

穀物タンパク質のトリプシン消化産物が小腸からのグルコースおよびアミノ酸吸収に及ぼす影響を調査するために、投与したグルコースやアミノ酸が小腸からどのように吸収されるのか知る必要がある。しかし、栄養素摂取後のニワトリにおける血中グルコース濃度および血中アミノ酸濃度の経時変化に関する報告は少なく、特に腸間膜静脈における血中グルコース濃度の変化に関する報告はない。したがって、本研究ではグルコースおよびアミノ酸を経口投与し、腸間膜静脈血におけるグルコースおよびアミノ酸濃度の経時的変化を調べることを目的とした。

第2節 材料と方法

1. グルコースとアミノ酸の混合溶液の調製

【材料】

- ・ L-Alanine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Arginine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Asparagine anhydrous (MP Biomedicals Japan)<輸入・販売 和光純薬工業株式会社>
- ・ L-Asparatic acid (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Cysteine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Glutamine (和光純薬工業株式会社、大阪)

- L-Glutamic acid (和光純薬工業株式会社、大阪)
- Glycine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Histidine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Isoleucine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Leucine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Lysine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Methionine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Phenylalanine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Proline (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Serine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Threonine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Tryptophan (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Tyrosine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Valine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- D-Glucose (和光純薬工業株式会社、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) (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 0.22 μm メンブレンフィルター (GV Durapore[®] Membrane, Millipore Corporation、Billerica、Massachusetts、USA)

【操作】

- (1) 20 種類のアミノ酸を 10 mM、グルコースを 1.25 M となるように DPBS に溶解した。
- (2) (1)をメンブレンフィルターに通した。

(3) (2)を 50 mL 遠沈管に分注し、凍結保存した。

2. 経口投与と採血

【材料】

- ・テルモシリンジ 2.5 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-02SZ (テルモ株式会社 東京)
- ・胃ゾンデ
- ・テルモ注射針 24G x 1” (0.55×25 mm) NN-2425R (テルモ株式会社 東京)
- ・単冠白色レグホン雄ヒナ 22 日齢 49 羽 (小岩井農牧株式会社、岩手)

【操作】

- (1) 胃ゾンデを用いてグルコース-アミノ酸混合溶液をヒナのそ嚢に強制給与した。
- (2) ヒナをジエチルエーテルで麻酔をし、腹部を切開して強制給与 0、20、40、60、80、100 および 120 分後に腸間膜静脈より採血を行なった。
- (3) 採血した血液は 1.5 mL サンプリングチューブに移し、氷上に置いた。
- (4) (3)のサンプルを 4°C下、10,000 x g で 20 分間遠心分離した。
- (5) 血清を採取し、1.5 mL サンプリングチューブに移した。
- (6) 血清サンプルを-20°Cで凍結保存した。

3. 血清中グルコース濃度測定

【材料】

- ・血中グルコース濃度測定キット グルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪)

- ・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) 凍結血清サンプルを融解させ、氷上に置いた。
- (2) 血中グルコース濃度測定キット グルコース CII-テストワコーの説明書に従ってサンプル処理を行った。

4. 血清中アミノ酸濃度測定

【材料】

- ・スルホサリチル酸 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・テルモシリンジ 1 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-01T(テルモ株式会社、東京)
- ・セルロースアセテート 0.45 μm フィルター(東洋濾紙株式会社、東京)
- ・遠心分離機 KUBOTA 1720 (株式会社久保田商事、東京)
- ・全自動アミノ酸分析装置 JLC500-V (日本電子株式会社、東京)

【操作】

- (1) 血清サンプルを融解した。
- (2) 除タンパク質を行うために、3%スルホサリチル酸溶液を調製し、(1)と 1:1 の割合で混合した。
- (3) (2)を 4°C下で 1 時間冷却した。
- (4) (3)を 4°C、10,000 x g で 10 分間遠心分離した。
- (5) (4)の上清をフィルターに通した。
- (6) (5)を 1 晩 4°Cで静置した。
- (7) (6)を(4)~(5)と同様の手順を繰り返した。

(8) (7)を全自動アミノ酸分析装置を用いアミノ酸濃度を測定した。

5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6、SAS Institute、Cary、NC、USA) を用いて統計処理を行った。一元配置分散分析を用いそれぞれのアミノ酸における投与後時間の効果を要因分析し、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

血清中グルコース濃度の経時的変化を Figure 3 に示した。強制給与 20 分後で血清中グルコース濃度は最大値を示し、120 分まで維持された。

血清中アミノ酸濃度の経時的変化を Table 2 に示した。採血時間の違いに有意差が認められたアミノ酸はアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリンの計 16 種類であった。16 種類のアミノ酸を経時的変化パターン毎に分けたところ、バリン、ロイシンおよびイソロイシンのパターンが似ていた。バリン、ロイシンおよびイソロイシンの血中濃度は、投与後 0 分から 20 分の間で変化せず、20 分から 40 分にかけてなだらかに下降し、60 分にかけて急激に減少した。その後、増加する傾向にあったが、0 分時の濃度より低い状態を 120 分まで維持した。アラニン、ヒスチジン、グリシン、スレオニンおよびプロリンの濃度変化は投与後 20 分で最大濃度に達した後に下降し、100 分まで一定の濃度を維持するが、120 分で再び上昇する傾向を示した。メチオニンとフ

エニルアラニンの濃度変化は 20 分に最大濃度に達した後に下降し、投与後 60 分には 0 分時の濃度とほぼ同じになった。

第 4 節 考察

Figure 3 に示したように、血清中グルコース濃度はグルコース-アミノ酸混合溶液の強制給与 20 分後に上昇した後、120 分まで下降せず高い濃度を維持していた。これは、ラットのグルコース耐糖能の試験において、グルコース投与開始後 60 分以降の肝門脈グルコース濃度が一定のレベルを示す結果[1]と一致していた。

Table 2 に示したように、3 種類の分岐鎖アミノ酸の経時的変化はほぼ同じパターンを示していた。これらのアミノ酸は中性アミノ酸であり、構造が類似している。その他にも等電点がロイシンで 5.98、バリンで 5.96、イソロイシンで 6.02 と近く、共通する特徴が多い。また、これらのアミノ酸には B⁰AT1(SLC6A19)、ATB^{0,+}(SLC6A14)など共通するアミノ酸トランスポーターが存在する[2]。これらのトランスポーターはすべての中性アミノ酸を輸送することが可能であり、メチオニンも輸送する。これらのトランスポーターは、小腸のすべての部位で発現が確認でき、その発現部位は刷子縁膜に限定される[3]。さらに、B⁰AT1 はニワトリでも遺伝子発現が確認されている[4]。以上のことから、血清中分岐鎖アミノ酸濃度の経時的変化パターンが似ている理由として、共通するトランスポーターが存在すると共に構造や等電点が似ていることが考えられた。また、血清中アラニン、グリシン、プロリン、ヒスチジンおよびスレオニンの濃度変化がほぼ似たパターンを示していた。これらのアミノ酸に共通するアミノ酸トランスポーターとして、PAT1 (proton amino acid transporter 1) が存在する[5]。PAT1 は 1 つのプロトンに対して 1 つのアミノ酸を輸送する

ロトン-アミノ酸共輸送トランスポーターである。グリシン、プロリンおよびアラニンはこのトランスポーターの基質であり、最大速度は3つの基質で似た値を示している。

以上より、アミノ酸の経時的変化パターンが酷似するのは単純に共通するアミノ酸トランスポーターの存在だけではなく、アミノ酸の構造や等電点等も影響している可能性が考えられた。

引用文献

- [1] Matsuura B, Kanno S, Minami H, Tsubouchi E, Iwai M, Matsui H, Horiike N and Onji M. Effects of antihyperlipidemic agents on hepatic insulin sensitivity in perfused Goto-Kakizaki rat liver. *Journal of Gastroenterology*, 39: 339-345. 2004.
- [2] Bröer S. Apical transporters for neutral amino acids: physiology and pathophysiology. *Physiology*, 23: 95-103. 2008.
- [3] Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews*, 88: 249-286. 2008.
- [4] Gilbert ER, Li H, Emmerson DA, Webb KE Jr and Wong EA. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poultry Science*, 86: 1739-1753. 2007.
- [5] Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G and Daniel H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 22966–22973. 2002.

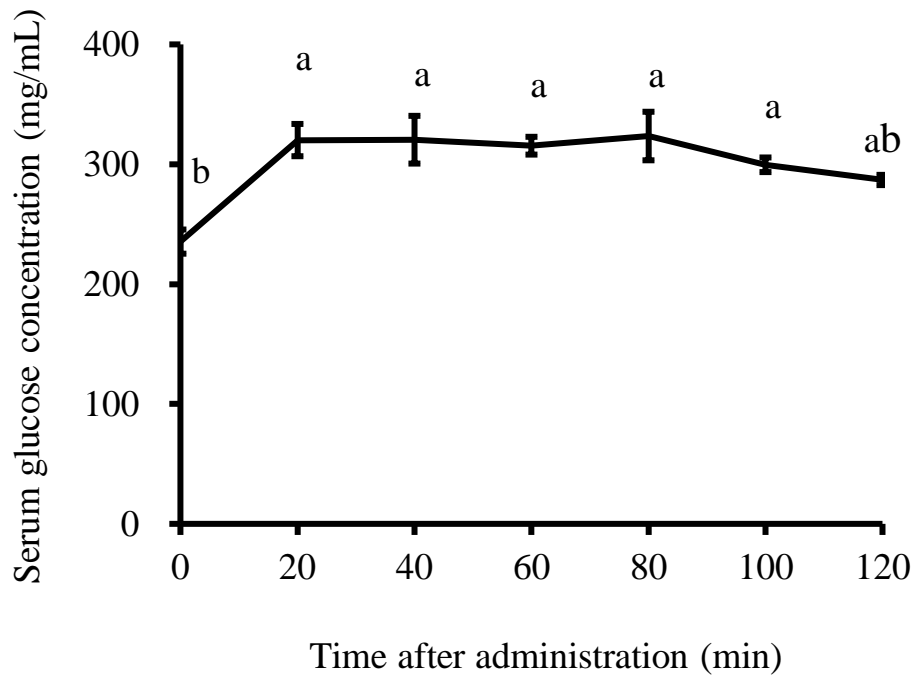


Figure 3. Time course change in serum glucose concentration in young chickens orally administrated with glucose-amino acid solution. Mixture solution of glucose and 20 amino acids was orally administrated to young chickens. At 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 min after administration, blood samples were taken from the mesenteric vein and glucose concentrations were determined using the mutarotase-GOD method. ^{a,b} Means with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Values were means \pm SE. Time 0:n=6, 20:n=6, 40:n=5, 60:n=7, 80:n=4, 100:n=6, 120:n=7.

Table 2. Time course change in amino acid concentrations (μM) in the serum of young chickens orally administrated with glucose-amino acid mixture

	Time (min)							Pooled SE
	0	20	40	60	80	100	120	
Ala	382 ^c	577 ^{ab}	518 ^{ab}	407 ^{bc}	420 ^{bc}	406 ^{bc}	510 ^{abc*}	29
Arg	271 ^{ab}	283 ^a	236 ^{abc*}	198 ^c	214 ^{bc}	225 ^{abc}	213 ^{bc}	14
Asn	165 [*]	174	195 [*]	116 ^{**}	125	125 [*]	148	29
Asp	67 ^{ab*}	86 ^a	72 ^{ab}	69 ^{ab}	64 ^{ab}	53 ^{b*}	64 ^{ab}	7
Cys	11 ^{ab}	12 ^{ab*}	14 ^a	11 ^{ab*}	12 ^{ab}	10 ^{ab}	8 ^{b**}	1
Gln	750	814	628	784	574	663	783	66
Glu	291	337	335	288	282	279	346	47
Gly	372 ^{abc}	438 ^{a*}	339 ^{ab}	345 ^{bc}	351 ^{bc}	318 ^{c*}	389 ^{abc}	18
His	97 ^b	132 ^a	118 ^{ab}	101 ^{ab}	104 ^{ab}	101 ^{ab}	115 ^{ab}	7
Ileu	166 ^{ab}	177 ^a	150 ^{abc}	101 ^d	129 ^{bcd}	108 ^{cd}	124 ^{bcd}	10
Leu	289 ^a	297 ^a	245 ^{ab}	157 ^c	215 ^{bc}	175 ^c	208 ^{bc}	15
Lys	1023	998	902	862	653	711	1052	145
Met	45 ^b	68 ^a	56 ^{ab}	43 ^b	48 ^b	43 ^b	51 ^b	4
Phe	82 ^{b*}	102 ^a	81 ^b	71 ^b	77 ^b	73 ^b	77 ^{b*}	3
Pro	233 ^{abc}	292 ^a	265 ^{ab}	207 ^c	212 ^c	187 ^c	227 ^{bc}	12
Ser	724	840	903	718	779	789	837	55
Thr	574 ^{ab}	687 ^a	653 ^{ab}	525 ^b	572 ^{ab}	526 ^b	589 ^{ab}	35
Trp	35 ^{b*}	103 ^a	115 ^{a*}	79 ^{ab*}	70 ^{ab}	73 ^{ab**}	85 ^{a*}	11
Tyr	145 ^{ab}	184 ^a	142 ^{bc}	104 ^c	109 ^{bc}	122 ^{bc}	128 ^{bc}	9
Val	278 ^{ab}	296 ^a	259 ^{ab}	185 ^c	218 ^{bc}	181 ^c	221 ^{bc}	16

The mixture of 1.25 M glucose-10 mM amino acid solution was orally administrated to chicks. At 0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 minutes after administration, blood samples were taken from the mesenteric vein and amino acid concentrations were determined using an automatic amino acid analyzer. ^{a-d}Means with difference superscript letters were significantly different between the times ($P < 0.05$). Values were means. Time 0: n=6, 20: n=6, 40: n=5, 60: n=7, 80: n=4, 100: n=6, 120: n=7. *One missing value.

第3章 穀物タンパク質のトリプシン消化産物が小腸からのグルコースおよびアミノ酸吸収に及ぼす影響

第1節 目的

トウモロコシツェイン、大豆抽出タンパク質および小麦グルテンをトリプシン消化し、得られた消化産物をニワトリヒナに強制給与後、腸間膜静脈から採血を行うことで腸管からのグルコースおよびアミノ酸の吸収に及ぼす影響を調査する。また、第2章の結果から、消化産物の経口投与20分後に腸間膜静脈から採血を行った。

第2節 材料と方法

1. グルコース-アミノ酸混合溶液の調製

【材料】

- ・ L-Alanine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Arginine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Asparagine anhydrous (MP Biomedicals Japan 東京)<輸入・販売 和光純薬工業株式会社、大阪>
- ・ L-Asparatic acid (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Cysteine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Glutamine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Glutamic acid (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ Glycine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ L-Histidine (和光純薬工業株式会社、大阪)

- L-Isoleucine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Leucine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Lysine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Methionine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Phenylalanine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Proline (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Serine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Threonine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Tryptophan (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Tyrosine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- L-Valine (和光純薬工業株式会社、大阪)
- D-Glucose (和光純薬工業株式会社、大阪)
- DPBS (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 0.22 μm メンブレンフィルター (GV Durapore[®] Membrane, Millipore Corporation、Massachusetts、USA)

【操作】

- (1) 20 種類のアミノ酸を 10 mM、グルコースを 1.25 M となるように DPBS に溶解した。
- (2) (1)をメンブレンフィルターに通した。
- (3) (4)を 50 mL 遠沈管に分注し、-20°Cで凍結保存した。

2. 穀物由来トリプシン消化産物の調製

【材料】

- 小麦グルテン(KRÖNER-STÄRKE、ドイツ)

- ・粉末状大豆抽出タンパク質(不二製油株式会社 HA、大阪、以後大豆タンパク質)
- ・トウモロコシツェイン(小林香料株式会社、東京)
- ・Gicbco[®] 2.5% Trypsin 10× 100 mL (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・DPBS (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・0.22 μm メンブレンフィルター (GV Durapore[®]、Millipore Corporation、Massachusetts、USA)

【操作】

- (1) 小麦グルテン、大豆タンパク質およびトウモロコシツェインをそれぞれ約 1 g を正確に計量し、0.5%トリプシンを 20 mL 加えた。
- (2) 振盪させつつ 37°Cで 20 時間消化した。
- (3) 沸騰させた湯で 20 分間加熱し、トリプシンを失活させた。
- (4) 冷水で 10 分間冷却した後、メンブレンフィルターに通した。
- (5) -20°C下で冷凍保存した。

3.投与試料の精製

【材料】

- ・グルコース-アミノ酸混合溶液
- ・穀物由来消化産物

【操作】

- (1) クリーンベンチ内で、グルコース-アミノ酸混合溶液と穀物由来消化産物を 1:1 の割合で混合した。

- (2) 対照として、グルコース-アミノ酸混合溶液と DPBS を 1:1 で混合した溶液を調製した。

4. 経口投与と採血

【材料】

- ・テルモシリンジ 2.5 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-02SZ (テルモ株式会社、東京)
- ・胃ゾンデ
- ・テルモ注射針 24G x 1" (0.55×25 mm) NN-2425R (テルモ株式会社、東京)
- ・1.5 mL サンプリングチューブ (株式会社イナ・オプティカ、大阪)
- ・単冠白色レグホン雄ヒナ 22 日齢 30 羽 (小岩井農牧株式会社、岩手)

【操作】

- (1) 小麦グルテン消化産物、大豆タンパク消化産物、トウモロコシツェイン消化産物、対照、time 0 の計 5 処理区 6 反復で実験を行なった。(time 0 は何も飲ませず採血を行なった。)
- (2) ヒナにそれぞれの試料を 1 mL 経口投与した。
- (3) 投与 20 分後、ジエチルエーテルで麻酔し、腹部を切開した後、腸間膜静脈から採血を行なった。
- (4) 採血したサンプルは 1.5 mL サンプリングチューブに移し、氷上に置いた。
- (5) (4)のサンプルを 4°C、10,000 x g で 20 分間遠心分離した。
- (6) 上清を採取し、1.5 mL サンプリングチューブに移した。
- (7) 血清サンプルを-20°Cで凍結保存した。

5. 血清中グルコース濃度測定

【材料】

- ・ 血中グルコース測定濃度キット グルコース CII-テストワコー（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ RIA TUBES 栄研チューブ 2 号（栄研器材株式会社、東京）
- ・ BIO-SHAKER BR-15（タイテック株式会社、埼玉）
- ・ 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) 血清サンプルを融解させ、氷上に置いた。
- (2) グルコース濃度測定キット グルコース CII-テストワコーの説明書に記載された通りにサンプル処理を行った。

6. 血清中アミノ酸濃度測定

【材料】

- ・ 3%スルホサリチル酸
- ・ テルモシリンジ 1 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-01T(テルモ株式会社、東京)
- ・ セルロースアセラートメンブレンフィルター 0.45 μm （東洋濾紙株式会社、東京）
- ・ 遠心分離機 KUBOTA 1720（株式会社久保田製作所、東京）
- ・ 全自動アミノ酸分析装置 JLC500-V（日本電子株式会社、東京）

【操作】

- (1) 血清サンプルを融解した。
- (2) 除タンパク質をするために、(1)と 3%スルホサリチル酸を 1:1 の割合で混合

した。

- (3) 1時間4°Cで静置した後、4°C、10,000 x gで10分間遠心分離した。
- (4) 上澄みをメンブレンフィルターに通し、4°Cで静置した。
- (5) (3)~(4)と同様の手順で処理した。
- (6) 全自動アミノ酸分析装置を用いてアミノ酸濃度を測定した。

7. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6、SAS Institute、Cary、NC、USA) を用いて統計処理を行なった。一元配置分散分析を用いてタンパク質源の違いによる効果を要因分析し、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

対照区および穀物タンパク質消化産物区の血清中グルコース濃度を Figure 4 に示した。対照区と穀物タンパク質消化産物区を比較したところ、血清中グルコース濃度には有意な差は認められなかった。

対照区および穀物タンパク質消化産物区における血清中アミノ酸濃度を Table 3 に示した。小麦グルテン消化産物区ではフェニルアラニンおよびプロリンの血清中濃度が対照区より有意に高かった。大豆タンパク質消化産物区ではトウモロコシツェイン消化産物区より血清中ヒスチジン濃度が有意に高かった。トウモロコシツェイン消化産物区では小麦グルテン消化産物区より血清中プロリン濃度が有意に低くなった。大豆タンパク質消化産物区が対照区に比べて血清中グリシン濃度が高い傾向を示した (P=0.0737)。また、対照区より小麦

グルテン消化産物区および大豆タンパク質消化産物区の方が高い血清中リジン濃度を示す傾向にあった (P=0.0543)。

第4節 考察

本研究において、対照区と小麦グルテン消化産物区を比較すると血清中のフェニルアラニンとプロリンの濃度が有意に高かった。Gilbert らは、穀物の違いがニワトリの成長に影響を及ぼすことを報告しており、トウモロコシと大豆をベースとした飼料を与えたニワトリ (以後 Line A) と、小麦をベースにした飼料を与えたニワトリ (以後 Line B) では Line B の PepT1 mRNA 量が Line A より高くなったことを報告している[1]。PepT1 はプロトン依存性のオリゴペプチドトランスポーターであり、食事性タンパク質を消化した際に生じる低分子のペプチドを輸送する[2]。また、マウスを 14%カゼイン群 (Normal)、10%カゼイン群(Control)、10%カゼイン+4%小麦グルテン加水分解物 (小麦プロテイン E、以後 WPE) 群の 3 処理区で 28 日間飼育したところ、WPE 区は Control 区と同等かまたはそれ以上の筋肉増加効果がみられたと報告されている[3]。この結果から、小麦グルテン消化産物にはアミノ酸吸収量を増加させ、筋肉増加を促す成分が含まれている可能性がある。

従って、次章において小麦グルテントリプシン消化産物由来のペプチドを分子量毎に分画し、得られたペプチドがグルコースやアミノ酸の吸収に及ぼす影響や、アミノ酸トランスポーターの遺伝子発現に及ぼす影響を調査する。

引用文献

- [1] Gilbert ER, Li H, Emmerson DA, Webb KE Jr and Wong EA. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *Journal of Nutrition*, 138: 262-271. 2008.
- [2] Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annual Review of Physiology*, 66: 361-384. 2004.
- [3] 新村由記、後藤一郎、八幡信弘. 小麦グルテン加水分解物（小麦プロテイン E）の老齡マウスの筋肉量に及ぼす効果. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会. 2010.

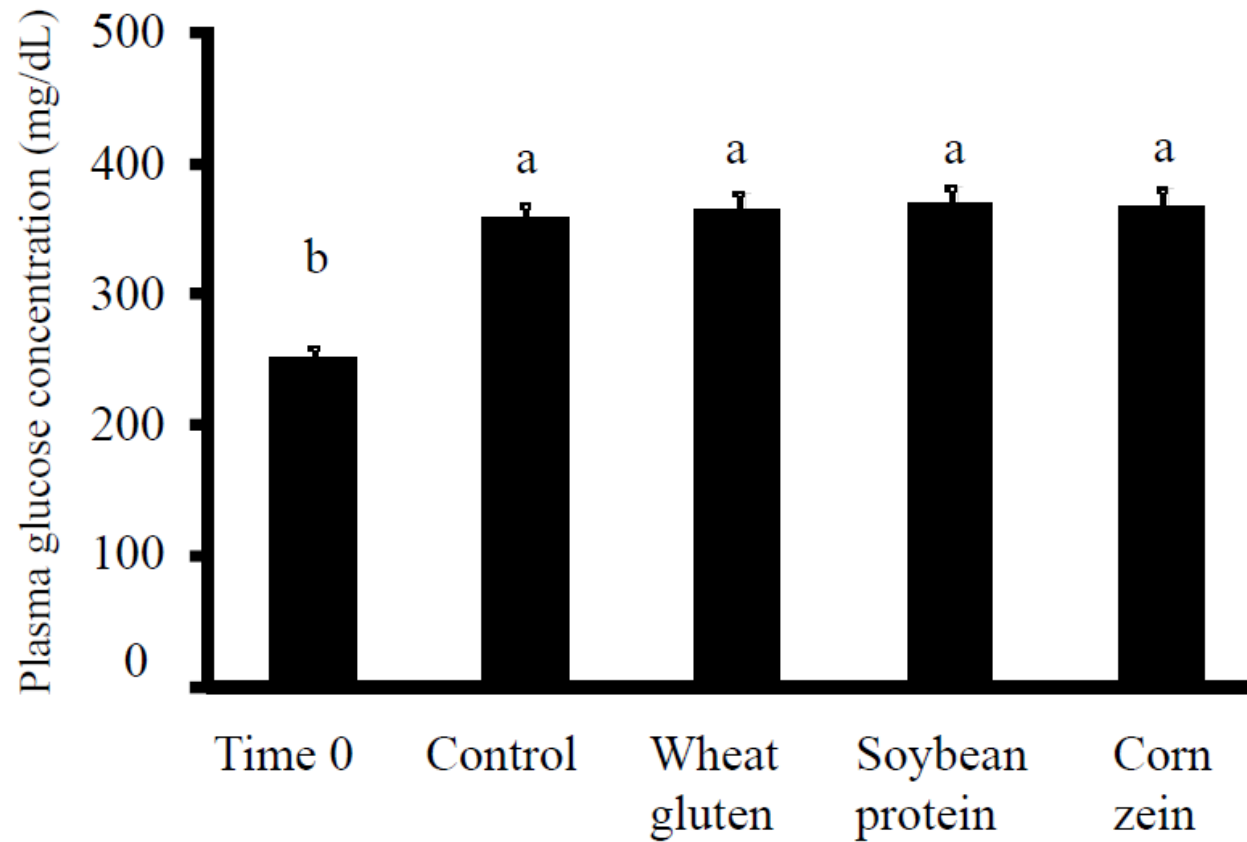


Figure 4. The mixture of 1.25 M glucose-10 mM amino acids solution and cereal protein digesta was orally administrated to young chickens. At 20 minutes after administration, blood samples were taken from the mesenteric vein and glucose concentrations were determined by mutarotase-GOD method.^{a,b}Means with difference superscript letters were significantly different ($P < 0.05$). Values were means \pm SE. $n=6$.

Table 3. Serum amino acid concentrations (μM) in young chickens orally administrated with the mixture of trypsin-digested grain protein and glucose-amino acid solution

	Control	Wheat gluten	Soybean proten	Corn zein	Pooled SE
Ala	281	259	294	258	12
Arg	103	112	111	121	10
Asp	48	37	43	43	4
Cys	12*	10	15	11	1
Gln	541	488	480	461	24
Glu	86	92	84	87	8
Gly	220	223	247	226	7
His	116 ^{ab}	106 ^{ab}	123 ^a	102 ^b	2
Ileu	48	57	52	55	4
Leu	83	103	88	96	6
Lys	334	489	513	435	56
Met	27	28	27	24*	1
Phe	81 ^{b*}	95 ^a	87 ^{ab}	92 ^{ab}	1
Pro	222 ^b	280 ^{a*}	258 ^{ab}	232 ^b	5
Ser	344	489	513	435	26
Thr	344	489	513	435	16
Trp	28	32	29	26*	3
Tyr	85	86	80	74	5
Val	344	489	513	435	7

At 20 min after oral administration, blood samples were taken from mesenteric vein. Amino acid concentrations were determined using an automatic amino acid analyzer. ^{a, b}Means with difference superscript letters are significantly different between groups ($P < 0.05$). $n = 6$. *One missing value.

第4章 限外ろ過膜分画による小麦グルテントリプシン消化産物画分が小腸からのアミノ酸吸収へ及ぼす影響

第1節 目的

第2章において、小麦グルテントリプシン消化産物が小腸からのプロリンおよびフェニルアラニン吸収を促進させることが示された。そこで、小腸からのプロリンおよびフェニルアラニンの吸収能力を上昇させる小麦グルテン消化産物由来ペプチドを探索するために、限外ろ過を用いて小麦グルテン消化産物を分子量毎に分画した。分画した小麦グルテン消化産物画分をグルコース-アミノ酸混合溶液と共にニワトリへ強制経口投与し、どの画分にアミノ酸吸収を促進するペプチドが存在するか調査することを目的とした。

第2節 材料と方法

1. 小麦グルテントリプシン消化産物画分の調製

【材料】

- ・小麦グルテントリプシン消化産物
- ・MW 10,000 カット用メンブレン Microcon[®] Ultracel YM-10 Regenerated Cellulose 10,000 MWCO (Millipore Co., Ltd., Darmstadt, Germany)
- ・MW 3,000 カット用メンブレン Amicon[®] Ultra-0.5, Ultracel[®]-3K Membrane, Regenerated Cellulose 3,000 MWCO (Millipore Co., Ltd., Darmstadt, Germany)

【操作】

- (1) マイクロチューブへMW 10,000 カット用メンブレンをセットし、

500 μ L の小麦グルテントリプシン消化産物を 4°C、14,000 x g で 30 分間遠心

分離した。

(2) メンブレンを上下逆にして新しいサンプルチューブにセットし、4°C、1,000 x g で 2 分間遠心分離した。

(3) (2)のサンプルを小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分とし、-30°C で凍結保存した。

(4) (1)でマイクロチューブへ移行したサンプルを MW 3,000 カット用メンブレンを用いて 4°C、14,000 x g で 30 分間遠心分離した。

(5) メンブレンを上下逆にして新しいチューブと交換し、4°C、1,000 x g で 2 分間遠心分離した。

(6) (5)のサンプルを小麦グルテン消化産物 MW 3,000~10,000 画分とし、-30°C で凍結保存した。

(7) (4)でマイクロチューブへ移行したサンプルを小麦グルテン消化産物 MW 3,000 以下画分とし、-30°C で凍結保存した。

2. 投与試料の調製

【材料】

- ・ 2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液
- ・ 小麦グルテン消化産物
- ・ 小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分
- ・ 小麦グルテン消化産物 MW 3,000~10,000 画分
- ・ 小麦グルテン消化産物 MW 3,000 以下画分
- ・ DPBS

【操作】

- (1) 2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液を小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分、MW 3,000~10,000 画分、MW 3,000 以下画分または小麦グルテン消化産物と 1:1 の割合で混合した。
- (2) 対照区として DPBS と 2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液を 1:1 の割合で混合した。

3. 経口投与と採血

【材料】

- ・テルモシリンジ 2.5 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-02SZ (テルモ株式会社、東京)
- ・胃ゾンデ
- ・テルモ注射針 24G x 1" (0.55x25 mm) NN-2425R (テルモ株式会社、東京)
- ・小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分+2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液
- ・小麦グルテン消化産物 MW 3,000~10,000 以上画分+2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液
- ・小麦グルテン消化産物 MW 3,000 以下画分+2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液
- ・DPBS+2.5 M グルコース-10 mM アミノ酸混合溶液
- ・単冠白色レグホン雄ヒナ 21 日齢 60 羽 (小岩井農牧株式会社、岩手)

【操作】

- (1) ヒナを 6 羽ずつ 5 群に分けた。
- (2) ヒナに試料をそれぞれ 1 mL 経口投与した。
- (3) 投与 20 分後、ジエチルエーテル麻酔し、腹部を切開後、腸間膜静脈から採

血を行なった。

- (4) 採血したサンプルは 1.5 mL サンプリングチューブに移し、氷上に置いた。
- (5) (4)のサンプルを 4°C、10,000 x g で 20 分間遠心分離した。
- (6) 上清を採取し、1.5 mL サンプリングチューブに移した。
- (7) 血清サンプルを-20°C 下で凍結保存した。

4. 血清中アミノ酸濃度測定

【材料】

- ・ 3%スルホサリチル酸
- ・ テルモシリンジ 1 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-01T(テルモ株式会社、東京)
- ・ セルロースアセラートメンブレンフィルター 0.45 μm (東洋濾紙株式会社、東京)
- ・ 全自動アミノ酸分析装置 JLC500-V (日本電子株式会社、東京)

【操作】

- (1) 血清サンプルを融解した。
- (2) 除タンパク質をするために、(1)と 3%スルホサリチル酸を 1:1 の割合で混合し、1 時間 4°C で静置した。
- (3) 4°C、10,000 x g で 10 分間遠心分離した後、上澄みをメンブレンフィルターに通した。
- (4) 4°C で静置した。
- (5) (3)~(4)と同様の手順を繰り返した。
- (6) 全自動アミノ酸分析装置を用いてアミノ酸濃度を測定した。

5. 統計処理

市販統計パッケージ SAS (SAS/STAT Version 6、 SAS Institute、 Cary、 NC、 USA) を用いて統計処理を行った。一元配置分散分析を用いて小麦グルテン消化産物画分の効果を要因分析し、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

小麦グルテン消化産物および小麦グルテン画分を投与した際に有意差の認められた腸間膜静脈血中のアミノ酸を Figure 5 に示した。小麦グルテン消化産物経口投与区で対照区に比べて腸間膜静脈血中のアスパラギン、グルタミン、フェニルアラニンおよびプロリン濃度が有意に上昇した。小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分経口投与区では腸間膜静脈血中のフェニルアラニンおよびプロリン濃度が対照区と比較して有意に上昇した。また、小麦グルテントリプシン消化産物 MW 3,000~10,000 画分経口投与区では腸間膜静脈血中のプロリン濃度が対照区と比較して有意に上昇した。これに対して、小麦グルテン消化産物 MW 3,000 以下画分経口投与区では対照区と比較して有意な差は認められなかった。腸間膜静脈血中のアスパラギンおよびグルタミンは、小麦グルテン消化産物経口投与区では対照区に対して有意に上昇したが、小麦グルテン消化産物画分を投与した処理区との間には有意な差は認められなかった。

第4節 考察

従来、食物由来ペプチドが小腸からのアミノ酸吸収を促進することを示した報告はない。本研究の結果から、小麦グルテン消化産物画分の投与は腸間膜静

脈血中のフェニルアラニンおよびプロリン濃度を上昇させることが明らかとなった。小麦グルテン消化産物 MW 10,000 以上画分の経口投与が腸間膜静脈血中のフェニルアラニンおよびプロリン吸収を促進させたことから、MW 10,000 以上の小麦グルテンペプチドは小腸からのプロリンおよびフェニルアラニン吸収を促進する能力があると考えられた。また、小麦グルテン消化産物 MW 3,000 ~10,000 画分の経口投与が腸間膜静脈血中のプロリン濃度を上昇させたことから、MW 3,000~10,000 の小麦グルテンペプチドは小腸からのプロリン吸収を促進する能力があると考えられた。腸間膜静脈血中のアラニンおよびグルタミン濃度は小麦グルテン消化産物の経口投与によって上昇したが、小麦グルテン消化産物の分子量別画分の投与では効果が認められなかった。従って、小麦グルテン消化産物の分画は小腸からのアラニンおよびグルタミンの吸収促進効果を消失させることが明らかとなった。

通常、膜タンパク質はゴルジ体で合成された後、エンドソームにより細胞膜上へと輸送される。しかし、グルコーストランスポーターの一つである GLUT4 はゴルジ体で合成され、エンドソームに送られた後、細胞内プール(GLUT4 小胞)内で蓄積される。細胞膜上に存在するインスリン受容体にインスリンが結合すると細胞内にシグナルが伝わり、蓄積されていた GLUT4 が細胞膜上へと移行することが明らかとなっている[1]。また、GLUT4 には N 型糖鎖が一か所付加されており、N 型糖鎖が欠損した場合は細胞内プールを形成せずにエンドソームによって直接細胞膜上へと移行することが明らかとなっている[2]。ここで、中性アミノ酸トランスポーターの一つである B⁰AT1 も N 型糖鎖が付加されており[3]、細胞内プールを形成することが予想される。B⁰AT1 は今回吸収促進が認められたアミノ酸であるアラニン、グルタミン、プロリンおよびフェニルアラニンを輸送する。このことから、小腸上皮細胞が小麦グルテンペプチド

を認識し、そのシグナルが細胞内へと伝達され、蓄積されていた中性アミノ酸トランスポーターを細胞膜上へと移行させることでアミノ酸吸収を促進した可能性が考えられた。

引用文献

- [1] Mueckler M. Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 107: 1211-1213. 2001.
- [2] Haga Y, Ishii K and Suzuki T. N-glycosylation is critical for the stability and intracellular trafficking of glucose transporter GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 31320-31327. 2011.
- [3] Romeo E, Dave MH, Bacic D, Ristic Z, Camargo SMLoffing J, Wagner CA and Verrey F. Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290: F376-383. 2006.

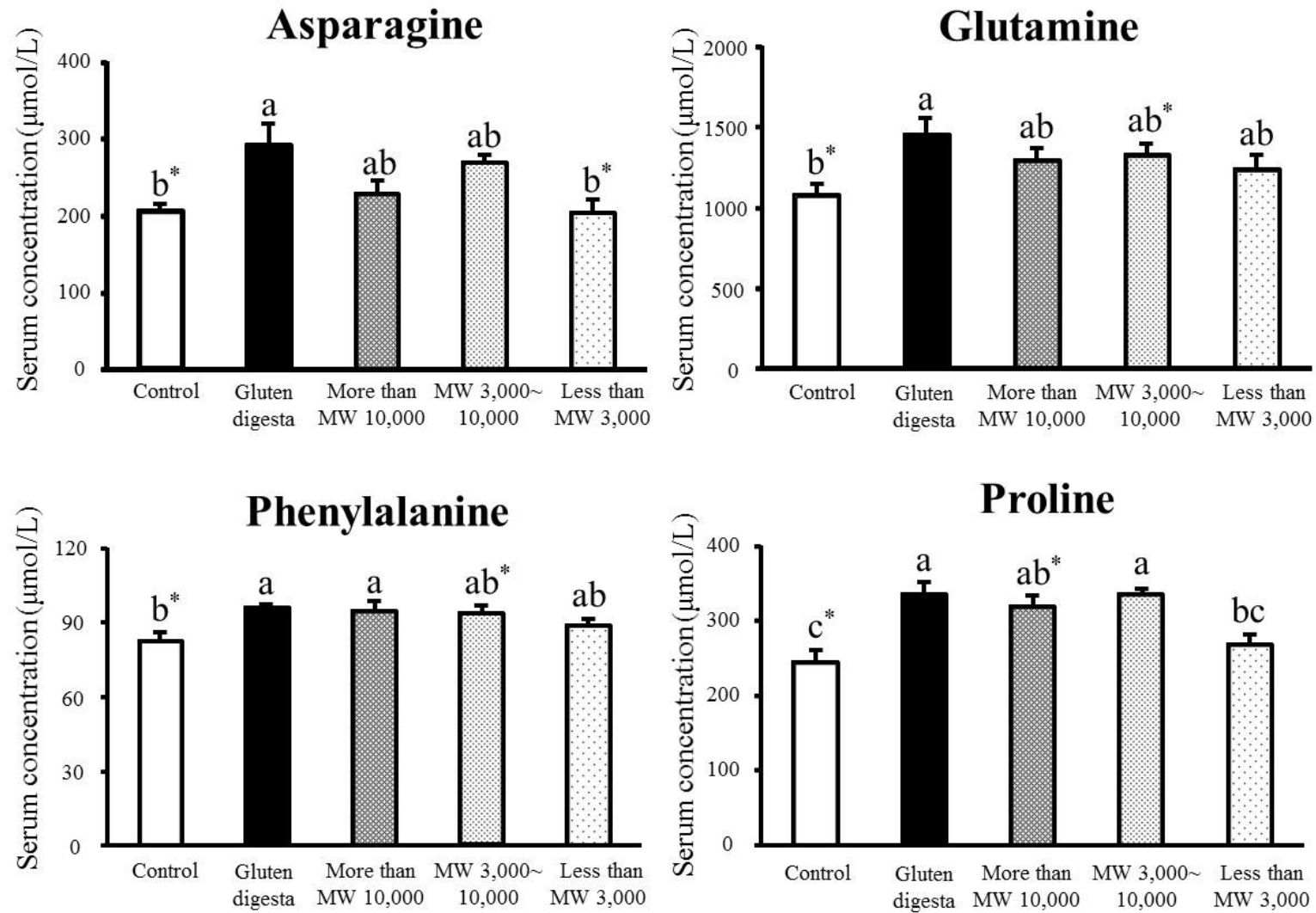


Figure 5. Amino acid concentrations in the serum of young chickens orally administrated glucose-amino acids mixture with wheat gluten digesta fraction. Chickens in the control were given only the mixture of 1.25 M glucose-5 mM amino acids solution. At 20 minutes after administration, blood samples were taken from the mesenteric vein. Amino acid concentrations were determined using an automatic amino acid analyzer. a,b Means with difference superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Values were means \pm SE. $n=5-7$. *One missing value.

第5章 反転腸管法を用いたニワトリ腸管から吸収される小麦グルテンペプチドの探索

第1節 目的

第4章では、分子量3,000以上の高分子ペプチドが腸管からのアミノ酸吸収を促進することを明らかにした。しかし、その作用機序については不明である。そこで本章では、高分子ペプチドが腸管の上皮細胞へ作用してアミノ酸吸収を促進したのか、または腸管から吸収された後に作用したのか判断するために、腸管から吸収された小麦グルテンペプチドの検出を行うことを目的とした。方法としては、反転腸管法とウェスタンブロット法を併用して吸収されたペプチドの検出を行い、オービトラップ質量分析計を用いてペプチドのアミノ酸配列を同定をする。

第2節 材料と方法

1. 小麦グルテン消化産物の調製

【材料】

- ・小麦グルテン（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・Gibco® 2.5% Trypsin 10×100 mL (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・DPBS（Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA）
- ・テルモシリンジ 20 mL 筒先 スリップチップタイプ SS-20ESZ（テルモ株式会社、東京）
- ・NewClassic 天びん ML モデル 4001 (メトラー・トレド株式会社、東京)
- ・ガーゼ（イワツキガーゼ 30 cm×10 m、イワツキ株式会社、東京）

- ・ BIO-SHAKER BR-15 (タイテック株式会社、埼玉)
- ・ 定量濾紙 No.5C (アドバンテック東洋株式会社、東京)

【操作】

- (1) 小麦グルテン約 50 g を量り取り、0.5%トリプシンを 500 mL 加えた。
- (2) BIO-SHAKER BR-15 で振盪させつつ 37°C で 20 時間消化した。
- (3) 沸騰させた湯で 20 分間加熱した後、冷水で 10 分間冷却した。
- (4) 濾紙に通し、-20°C 下で冷凍保存した。

2. Hank's balanced salt solution (HBSS) の調製

【材料】

- ・ NaCl (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ HEPES (SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., Missouri, USA)
- ・ KCl (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ NaHCO₃ (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ Na₂HPO₄ · 12H₂O (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ KH₂PO₄ (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 0.22 μm 滅菌フィルター Sartolab[®] RF (sartorius ., Ltd., Göttingen, Germany)

【操作】

- (1) 10X HBSS を以下の組成で調製した後、0.20 μm メンブレンフィルターで滅菌し、4°C で保存した。

NaCl	136.89 mmol	40.0 g
HEPES	10 mmol	11.91g
KCl	5.37 mmol	2.0 g

NaHCO ₃	4.17 mmol	1.75 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.34 mmol	0.61 g
KH ₂ PO ₄	0.44 mmol	0.30 g
Water		up to 500 mL
<hr/>		
Total		500 mL

(2) 試験当日に(1)を 10 倍希釈し、以下の試薬を添加した。

MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49 mmol	0.050 g
MgSO ₄	0.41 mmol	0.025 g
CaCl ₂	1.25 mmol	0.069 g
L-Glutamine	4 mmol	0.292 g
D-Glucose	5.6 mmol	0.504 g
1X HBSS		500 mL
<hr/>		
Total		500 mL

(3) (2)を培養緩衝溶液とし、使用直前まで 37°C で保温しつつ、30 分以上 95%O₂+5%CO₂ を吹き込んだ。

3. 反転腸管法を用いた小麦グルテン吸収

【材料】

- ・培養緩衝溶液 (2-(3)で調製したもの)
- ・小麦グルテントリプシン消化産物
- ・4 週齢単冠白色レグホン種雄ヒナ (小岩井農牧株式会社、岩手)

・イソフルラン（和光純薬工業株式会社、大阪）

・PBS(-)

【操作】

- (1) あらかじめ小麦グルテン溶液と 2X 培養緩衝溶液を 1:1 の割合で混合し、30 分以上 37°C で 95%O₂+5%CO₂ を吹き込んだ。1X 培養緩衝溶液も同様に 30 分以上 37°C で 95%O₂+5%CO₂ を吹き込んだ。
- (2) 12 羽の 4 週齢のニワトリヒナを体重毎に 6 羽選抜した(平均体重 421.7 ± 4.2 g)。
- (3) イソフルランで過麻酔後、断頭し放血した。
- (4) 腹部を切開し、小腸を採取した後、氷冷した PBS(-) で内容物を洗い出した。
- (5) 小腸を空腸と回腸に分けた後、それぞれを 5 cm 間隔で切り、十二指腸側から近位部、中間部、遠位部とした。
- (6) 切り出した腸管を反転させ、PBS(-) で腸管を洗浄した後、1X 培養緩衝溶液を注入しつつ両端を結紮した。この際、空腸には 400 μL、回腸には 300 μL の培養緩衝溶液を注入し、反転サックを作製した。
- (7) 小麦グルテン消化産物と培養緩衝溶液の混合溶液を 15 mL の遠沈管に 8 mL 入れておき、その中に反転サックを入れた。
- (8) 37°C で 30 分間インキュベーションした後、反転サックの内容物を 1.5 mL チューブに移し、3000 x g、4°C で 10 分間遠心した。
- (9) 上清を 150 μL 採取した後、-80°C で凍結した。
- (10) 凍結したサンプルを凍結乾燥した。

4. 抗小麦グルテン抗体の作製

【材料】

- ・小麦グルテン(和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 1 N NaOH
- ・ 20 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.4
- ・ A/G B-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪)

【操作】

- (1) 1N NaOH を用いて 20 mM リン酸緩衝溶液 50 mL の pH を 10 に調製した。
- (2) 小麦グルテン 1 g を加え、スターラーで攪拌した。
- (3) 1N NaOH を加えて pH 12 に調製し、小麦グルテンを溶解させた。
- (4) 6N HCl を加えて pH 7.4 に調製した後、A/G B-テストワコーを用いて総タンパク質濃度を測定した。
- (5) 18 mg/mL となるようにサンプルを希釈し、(株)紀和実験動物研究所へ抗体作製を委託した。免疫動物はウサギとし、2 週間ごとに計 4 回の免疫を行った。抗体力価は ELISA によって測定した。

5. SDS-PAGE による小麦グルテンペプチドの分離

【材料】

- ・ 2X サンプル処理液(0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)、10% 2-ME、4% SDS、10% glycerol、0.004% BPB)
- ・ 泳動バッファー (25mM Tris、192 mM Glycin、0.1% SDS)
- ・ SDS-PAGE 用ゲル(14%T、2.7%C)
- ・ マーカー Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad Laboratories., Inc.、California、USA)
- ・ Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories., Inc.、California、USA)

- Mini-PROTEAN Tetra Cells with PowerPac™ Power Supplies (Bio-Rad Laboratories., Inc., California, USA)

【操作】

- (1)凍結乾燥した反転腸管サック内容物に 1X サンプル処理液を 80 μ L 加えた。
- (2) 95°C、5 分間加熱した後、氷上に置いた。
- (3) サンプルを 1 ウェル当たり 10 μ L ずつアプライし、マーカーは 10 μ L アプライした。
- (4) ゲル 1 枚当たり 30 mA 定電流で 1 時間通電した。

6. ウェスタンプロット

【材料】

- 0.2 μ m PVDF 膜 9 cm x 7 cm、Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting (Bio-Rad Laboratories., Inc, California, USA)
- メタノール(和光純薬工業株式会社、大阪)
- Towbin バッファー (192 mM グリシン、25 mM トリス、20%メタノール)
- Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories., Inc, California, USA)
- Mini-PROTEAN Tetra Cells with PowerPac™ Power Supplies (Bio-Rad Laboratories., Inc, California, USA)
- 3% スキムミルク (和光純薬工業株式会社、大阪)
- 洗浄液 (TBS+ 0.01% Tween 20)
- HRP 用発光試薬 EzWestLumi Plus (アトー株式会社、東京)
- Ez-Capture MG/ST (アトー株式会社、東京)

【操作】

- (1) PVDF 膜をメタノールに 2 分以上浸し、親水化する。
- (2) 親水化した PVDF 膜を Towbin バッファーに移し、10 分以上振盪する。
- (3) PVDF 膜と泳動後のゲルを挟み込み、100 mA で 1 時間ブロッティングした。
- (4) さらに 300 mA で 1 時間ブロッティングを行った。
- (5) ブロッティング後の PVDF 膜を 3% スキムミルクで 1 時間振盪し、ブロッキングを行った。
- (6) ブロッキング後、洗浄液で 5 分間 x 3 回洗浄し、1/25,000 希釈した抗小麦グルテン抗体溶液中で 1 時間振盪した。
- (7) 洗浄液で 5 分間 x 3 回洗浄した後、1/25,000 希釈した二次抗体溶液中で 1 時間振盪した。
- (8) 洗浄液で 5 分間 x 3 回洗浄した後、EzWestLumi Plus 溶液に 3 分間浸し、余分な溶液を除去した後、Ez-Capture MG/ST を用いてバンドを検出した。

7. オービトラップ質量分析計を用いた小麦グルテンペプチドの検出

【材料】

- ・ CBB 染色液(0.25% CBB、5% メタノール、7.5% 酢酸)
- ・ 脱色液(25% メタノール、7.5% 酢酸)
- ・ 超純水 (Milli-Q Advantage、Merck Millipore Co., Ltd.、Darmstadt、Germany)

【操作】

- (1) 『5. SDS-PAGE による小麦グルテンペプチドの分離』と同様の条件で SDS-PAGE を行った。
- (2) 泳動後のゲルを超純水で 5 分間洗浄した後、CBB 染色液に 1 晩浸した。
- (3) 脱色液でゲルから余分な CBB を除去した。
- (4) 超純水で 5 分間洗浄後、バンドの切り出しを行った。

8. ゲル内消化法

【材料】

- ・ 切り出したゲル
- ・ ProteaseMAX™ Surfactant (Promega Co., Ltd., Wisconsin, USA)
- ・ Sequence Grade Trypsin (Promega Co., Ltd., Wisconsin, USA)
- ・ 50 mM NH₄HCO₃ (SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., Missouri, USA)
- ・ アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 25 mM Dithiothreitol (DTT) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ 55 mM ヨードアセトアミド (SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., Missouri, USA)
- ・ 5% Trifluoroacetic acid (TFA) (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- ・ 超純水 (Milli-Q Advantage, Merck Millipore Co., Ltd., Darmstadt, Germany)

【操作】

- (1) 切り出したゲルにアセトニトリル/50 mM NH₄CO₃ (1:1)を 400 μL 加え、5 分間ボルテックスした後上清を除去した。これを CBB が抜けるまで繰り返した。
- (2) 100%アセトニトリルを 200 μL 加え、1 分間室温でインキュベートした。
- (3) 上清を捨てた後、遠心エバポレーターで 10 分間遠心し、アセトニトリルを除去した。
- (4) 25 mM DTT を 100 μL 加え、56°C で 40 分間インキュベーションした。
- (5) 上清を除去し、55 mM ヨードアセトアミドを 100 μL 加え、アルミホイルで遮光した後、室温で 30 分間インキュベーションした。
- (6) 上清を捨て、超純水を 400 μL 加え 5 分間ボルテックスした。これを 2 回繰り返した。

- (7) アセトニトリル/50 mM NH₄CO₃(1:1)を 200 μL 加え、5 分間ボルテックスした。
- (8) 上清を除去した後、100%アセトニトリルを 200 μL 加えて 1 分間室温でインキュベーションした。
- (9) 上清を捨てた後、遠心エバポレーターで 10 分間遠心し、アセトニトリルを除去した。
- (10) 0.01% Protease MAX Surfactant に溶解させた 4 ng/μL トリプシンを 10 μL 加えて氷上で 10 分間インキュベートした。
- (11) さらに 0.01% Protease MAX Surfactant を 30 μL 加え、37°C で 2 時間インキュベートした。
- (12) 2% TFA を 50 μL 加え、10 分間ボルテックスした後、12,000 x g、15 分間 4°C で遠心分離した。
- (13) 上清を 20 μL 採取し、バイアルに移した。

9. アミノ酸配列の同定

【材料】

- ・ LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・ 0.1%ギ酸 - アセトニトリル (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ LC-MS 用超純水 (和光純薬工業株式会社、大阪)
- ・ Mascot Server (Matrix Science Inc、Massachusetts、USA)

【操作】

- (1) ペプチドを 0.1%ギ酸 アセトニトリル流速 500 nL/min、5%–45%のグラジエントで溶出し、LTQ Orbitrap XL にて分子量の同定を行った。
- (2) 検出されたアミノ酸配列は Mascot Server を用いて解析を行い、ペプチドの

同定を行った。

第3節 結果

反転腸管法にて回収したサンプルをウェスタンブロットで解析し、同定したタンパク質の結果を Figure 6 に示した。ウェスタンブロットでは3つのバンドが検出され、LTQ Orbitrap と Mascot によって同定されたタンパク質は、1つ目のバンドでは Hemoglobin subunit β 、2つ目のバンドでは Hemoglobin subunit α -A、Hemoglobin subunit α ϵ 、3つ目のバンドでは Hemoglobin subunit α -A、Hemoglobin subunit α -D、Apolipoprotein、Serum albumin が候補として挙げられた。

第4節 考察

Figure 6 に示したように、検出されたバンドは全てニワトリの血中由来タンパク質であり、小麦グルテン由来のペプチドは同定されなかった。本研究から、抗小麦グルテン抗体の特異性が低いことと、ニワトリの腸管から高分子の小麦グルテンペプチド吸収は困難であることが示唆された。経口摂取したタンパク質や高分子ペプチドが腸管から吸収されて血中へと移行する例として、アレルギー源であるオボアルブミンが挙げられる。オボアルブミンは腸管の遠位部から傍細胞輸送やレセプターを介したクラスリン依存のエンドサイトーシスおよび経細胞輸送によって吸収されることが示唆されている[1]。また、小麦グルテンも代表的なアレルギー源であり、特に γ -グリアジンがアレルギーの原因物質であることが示唆されている[2]。アレルギー源の他に細胞膜を通過するペプチドが多数報告されており、共通する特徴として、アルギニンやトリプトファンが豊富に含まれているペプチドであることが挙げられる[3]。塩基性アミノ酸であるアルギニンはグアニジン基を持ち、アミノ酸の中で最も強い塩基性を示す。その

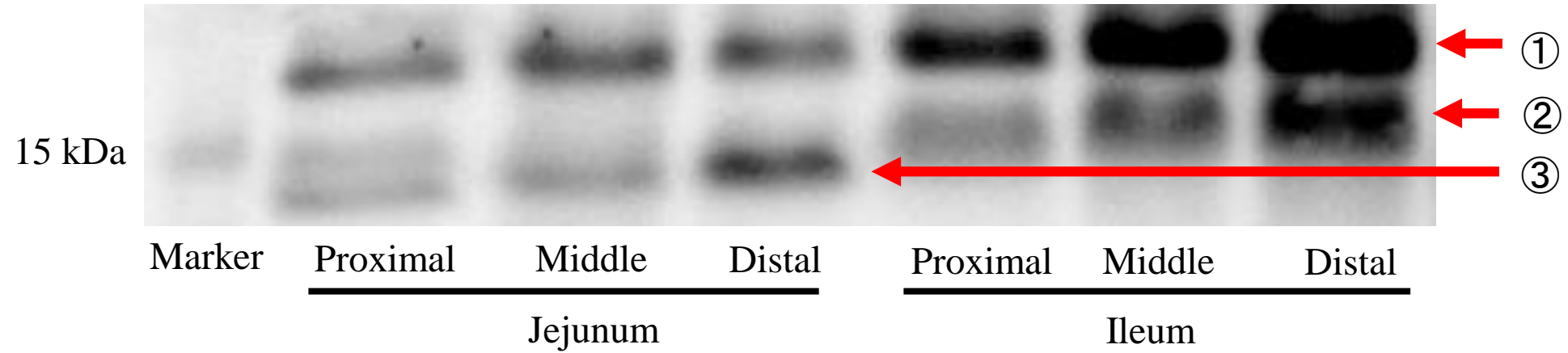
ため、付近の電荷が極端に陽性になりエレクトロポレーション法の様に細胞膜上の電位差が生じ、細胞内へのペプチドの透過性を高めている。リジンも塩基性アミノ酸であるが、リジンよりもアルギニンを含む配列の方が輸送されやすいことから、非常に強い電荷が必要であることが示唆されている。さらにトリプトファンは疎水性が高いアミノ酸であり、細胞膜との親和性を高めやすい。本研究で用いた小麦グルテン中には芳香族であるプロリンやフェニルアラニンを豊富に含んでおり、疎水性が高い[4]。しかし、ニワトリ腸管からの小麦グルテンペプチドの吸収は認められなかった。小腸上皮細胞におけるタンパク質や高分子のペプチドの吸収は小腸のパイエル盤のM細胞で行われることが示唆されている[5]。ニワトリでは、パイエル盤が回盲部に存在することが明らかとなっている[6]。本研究では空腸から回腸末端までの腸管を用いて小麦グルテンペプチドの吸収を調査したが、回腸末端以降の腸管を用いた実験を行う必要性が示唆された。

以上から、アルギニンやトリプトファンを豊富に含むタンパク質やペプチドを事前に絞り込み、盲腸付近も考慮に入れた反転腸管法を行う必要がある。具体的にはタンパク質をNCBIのProteinデータベースから絞り込み、絞り込んだタンパク質を人工消化した後に反転腸管法を行う。また、タンパク質の特定方法も再度検討する必要がある。タンパク質毎に抗体を調製し、検出を行う場合、抗体の特異性や検出感度等が問題となってくる。したがって、人工消化後のタンパク質や高分子ペプチドを¹²⁵Iで放射線ラベルし、反転腸管法を用いて放射線ラベルしたタンパク質やペプチドを吸収させ、得られたサンプルでウェスタンブロットを行う。その後、オートラジオグラフィーを用いて検出されたバンドから腸管から吸収されるタンパク質やペプチドを検出し、LTQ Orbitrap XLを用いてアミノ酸配列の決定とタンパク質やペプチドの種類の間定を行う。この手法であれ

ば、抗体を必要とせず、好感度で吸収されるタンパク質やペプチドの同定を行うことが可能であることが予想される。

引用文献

- [1] Tomoharu Y, Nouma H and Matsuo H. Characterization of ovalbumin absorption pathways in the rat intestine, including the effect of aspirin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37: 1359-1365. 2014.
- [2] Morita E, Yamamura Y, Mihara S, Kameyoshi Y and Yamamoto S. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: a report of two cases and determination of wheat- γ -gliadin as the presumptive allergen. *British Journal of Dermatology*, 143: 1059-1063. 2000.
- [3] Bechara C and Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587: 1693-1702. 2013.
- [4] Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24: 115-119. 2007.
- [5] Yun Y, Cho YW and Park K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 822-832. 2013.
- [6] Befus AD, Johnston N, Leslie GA and Bienenstock J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's Patches. *Journal of Immunology*, 125: 2626-2632. 1980.



Number of bands	Candidate of proteins
①	Hemoglobin subunit β
②	Hemoglobin subunit α -A, Hemoglobin subunit α ϵ
③	Hemoglobin subunit α -A, Hemoglobin subunit α -D, Apolipoprotein, Serum albumin

Figure 6. Bands of western blot and identified proteins.

第6章 ニワトリ腸管オルガノイド培養法の確立

第1節 目的

本章では、成体のニワトリの小腸からオルガノイドを培養できるか否か調査するとともに、培養したオルガノイドが分化するか否か調査することを目的とした。オルガノイド培養には Wnt3a、R-spondin、Noggin といったサイトカインが必要である[1]。R&D 社や Peprotech 社、Lifetechnology 社からそれぞれの遺伝子組換えタンパク質が市販されているが、少量かつ高価である。また、遺伝子組換えの Wnt は生理活性が低く、conditioned medium よりも多くの量を必要とする。そこで、マウス線維芽細胞株に Wnt3a、R-spondin3、Noggin の遺伝子を導入した L-WRN から conditioned Medium を作製し、ニワトリのオルガノイド培養に用いることが可能か否か調査した。

第2節 材料と方法

1. L-WRN conditioned medium の調製

【材料】

- L-WRN (ATCC® CRL-3276™, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA))
- DMEM/F12(Gibco® Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- 1mol/L HEPES (ナカライテスク株式会社、京都)
- Gentamycin (Gibco® Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Amphotericin B(Gibco® Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- 50 mg/mL Geneticin (Gibco® Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

- 50 mg/mL Hygromycin B (Gibco® Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- Fetal bovine serum (BIOLOGICAL INDUSTRIES Co., Ltd.、Haemek、Israel、以後 FBS)
- T25 フラスコ(住友ベークライト株式会社、東京)
- T75 フラスコ(住友ベークライト株式会社、東京)
- DPBS (Gibco® Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) (ナカライテスク株式会社、京都)
- 0.25% Trypsin-0.02% EDTA
- Recovery™ Cell Culture Freezing Medium (Gibco® Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)

【操作】

(1) 以下の組成で培地を調製した。

Geneticin and Hygromycin B Free 培地	
DMEM/F12 (powder)	6.0 g
FBS	50 mL (Final concentration 10%)
1 mol/L HEPES	12.5 mL (Final concentration 25 mmol/L)
Gentamycin (5 mg/mL)	2.5 mL (50 µg/mL)
Amphotericin B (250 µg/mL)	2.5 mL (2.5 µg/mL)
Water	add to 500 mL
Total	500 mL

(2) 凍結 L-WRN 細胞が入ったバイアルを 37°C に設定したウォーターバスで解凍し、5 mL の培地でピペティングした。

- (3) 細胞懸濁液を T25 フラスコに入れた後、4 mL の培地を加え軽くピペッティングした。
- (4) 5 mL の細胞懸濁液を取り、別の T25 フラスコに移した。
- (5) 2 つの T25 フラスコを 37°C、5% CO₂ 下で培養を開始した。
- (6) 翌日、細胞が接着したのを確認した後、フラスコ内の培地を除去し、新たに培地を 5 mL 添加した。
- (7) 50 μL の Geneticin と 50 μL の Hygromycin B を添加し、軽く攪拌した後、培養を再開した。
- (8) 80~90% コンフルエントになるまで培養し、継代を行った。
- (9) フラスコ内の培地を除去した後、Trypsin-EDTA 3 mL を加え、3 分間、37°C でインキュベーションした。
- (10) 培地を 12 mL 加え、ピペッティングした後、50 mL 遠沈管に回収し、1,200 x g、5 分間遠心した。
- (11) 上清を除去した後、培地を 12.5 mL 加えピペッティングし、T75 フラスコに移し、培養を開始した。
- (12) 再度 80~90% コンフルエントになるまで培養し、継代を行った。
- (13) 合計 6 個の T75 フラスコに継代し、そのうちの 1 つは凍結保存用として培養した。
- (14) 翌日、凍結保存用の T75 フラスコ内のみ 125 μL の Geneticin と 125 μL の Hygromycin B を加えた。
- (15) オーバーコンフルエントの状態まで培養する。培地は 2 日に 1 回交換した。
- (16) オーバーコンフルエントの状態が確認された翌日から毎日培地を回収した。初日に回収した conditioned medium を 2000 x g、5 分間遠心し上清を

回収し、4°C で保存した。これを 1st conditioned medium とした。

(17) 7th conditioned medium まで回収し、1st~7th conditioned medium を混合した後、0.20 μm のメンブレンフィルターに通し、分注して-80°C で凍結保存した。

2. オルガノイド培養用培地の調製

【材料】

- L-WRN conditioned medium (1st~7th)
- DMEM/F12 (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 1mol/L HEPES (ナカライテスク株式会社)
- Gentamycin (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- Amphotericin B (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 50X B27 Supplement (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 100X N2 Supplement (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- 100X GlutaMax TM-I (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- Advanced DMEM/F12 (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- EGF (500 μg/mL in 0.1%BSA) (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- A-83-01 (500 μmol/L in DMSO) (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- Y-27632 (10 mmol/L in DPBS) (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific)、Massachusetts、USA

【操作】

(1) 以下の組成で培地を調製した。

Stock solutions	Final concentration
1 mol/L HEPES	10 mmol/L
100X GlutaMax TM-I	1xGlutaMax TM-I
50X B27 Supplement	1X B27 Supplement
100X N2 Supplement	1X N2 Supplement
500 µg/mL EGF	50 ng/mL
WRN conditioned medium	add to half of final volume
5 mg/mL Gentamycin	50 µg/mL
125 µg/mL Amphotericin B	2.5 µg/mL
500 µmol/L A-83-01	500 nmol/L
10 mmol/L Y-27632	10 µmol/L
Advanced DMEM/F12	add to final volume

(2) 培地を作成後、4°C で保存した。

3. 成鶏からの腸管オルガノイド培養

【材料】

- ・ 6 カ月齢単冠白色レグホン種雌（小岩井農牧株式会社）
- ・ WRN conditioned medium 入り培地
- ・ イソフルラン（和光純薬工業株式会社、大阪）
- ・ DPBS (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific)
- ・ PBS(-)

- 0.75% スクロース - 0.5% グルシトール溶液
- Matrigel growth factor reduced (Corning Ltd., New York, USA)
- 500 mmol/L EDTA pH 8.0 (ナカライテスク株式会社、京都)
- 100 μ m セルストレイナー (Falcon[®], Corning Ltd., New York, USA)
- 8 well chamber slide[™] (Lab-Tek[®], Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

【操作】

- (1) 採卵鶏をイソフルランの過麻酔した後、断頭して放血した。
- (2) 腹部を中性洗剤でよく洗浄した後、切開し小腸を採取した。
- (3) 採取した小腸を 5 cm 程切り取り、氷冷した PBS(-) で内容物を洗浄した後、氷冷した PBS(-) 中に保存した。
- (4) 採取した腸管を 3 回ほど氷冷した PBS(-) で洗浄し、反転させた。
- (5) 反転させた腸管を腸管内容物が無くなるまで洗浄し、洗浄した反転腸管に氷冷した 25 mM EDTA 溶液を 1.5 mL 以上入れ、両端を結紮し、反転サックを調製した。
- (6) 反転サックを 20 mL の 25 mM EDTA 溶液を入れた 50mL 遠沈管の中に入れ、氷上で 40 分間インキュベーションした。
- (7) インキュベーション後に反転サックを 20 mL のスクロース-ソルビトール溶液の入った 50 mL 遠沈管に入れ、30 秒間軽く攪拌した。
- (8) 上清を捨て、再度 20 mL のスクロース-ソルビトール溶液を入れ、1 分間激して攪拌した。
- (9) 懸濁液を 100 μ m セルストレーナーに通し、5 mL DPBS を加えて 1500 x g、5 分間、4°C 下で遠心した。

- (10) 上清を捨て、培地とマトリゲルを 1:1 の割合で混合した溶液を用いてクリプトを懸濁する。
- (11) 15 $\mu\text{L}/\text{well}$ となるように 8 well chamber slide 上に撒き、37.8°C で 15 分間マトリゲルを固化した。
- (12) 培地を 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加え、37.8°C、5% CO_2 下でインキュベートを開始した。
- (13) 培地は 2 日に 1 回交換し、培養 3 日以降は毎日培地を交換した。

第 3 節 結果

Figure 7 にニワトリ腸管オルガノイド培養の結果を示した。マウスやラットと同様に EDTA 溶液を用いることで小腸からクリプトを採取することが可能となった (赤矢印)。さらに、Wnt3a、R-spondin3 および Noggin の含んだ培地で培養することでニワトリのオルガノイドを形成させ、7 日間の培養が可能となった。

第 4 節 考察

ニワトリのオルガノイド形成は胚由来の報告しかなく、成鶏を用いた報告はない。本研究では L-WRN conditioned medium を培地中に添加することで成鶏からもオルガノイド形成させることが可能となり、7 日間の培養を可能とした。さらに、培養 4 日目において Pierzchalska らの報告したニワトリ胚から形成させたオルガノイド[2]よりも細胞膜が厚くなり、細胞の分化が進んでいることから、未分化な状態のスフェロイドではなく、オルガノイドの培養が可能であることが示唆された。

本研究では、インキュベーターの温度を 37°C ではなく、37.8°C に設定して培養を行った。ニワトリは高温動物であり、成鶏における体温は $41.8 \pm 0.18^\circ\text{C}$ である[3]。ただし、細胞培養の際にはニワトリ細胞でも通常は 37°C で培養を行い、暑熱ストレスを与える際には 43°C で 2.5 時間培養を行っている[4]。また、孵卵の際には 37.8°C で 21 日間保温しつつ転卵する。そこで、本研究では保温度を 37.8°C に設定した培養を行った。データは記載していないが、37°C よりも 37.8°C の培養の方がオルガノイド形成効率が良かった。

マウスでは Lgr5+陽性細胞に隣接するパネート細胞が Wnt3a を産生し、パラクリンシグナルとして Lgr5+陽性細胞に作用するため[5]、培地中へ Wnt3a を添加する必要が無い。しかし、ニワトリではパネート細胞は存在しないとされており[6]、実際 Wnt3a 無しの培地ではオルガノイドの形成は認められなかった。腸管上皮細胞には Lgr5+幹細胞、パネート細胞、杯細胞、内分泌細胞、タフト細胞や吸収細胞が混在する[7]。今回調製したオルガノイド中にはどの細胞がどの程度含まれているかは不明である。今後は免疫染色および RT-PCR による細胞種の同定を行う必要があると考えられた。

引用文献

- [1] 細胞工学. Vol 32, No. 4, p. 423 Figure 3.学研メディカル秀潤社. 2013.
- [2] Pierzchalska M, Grabacka M, Michalik M, Zyla K and Pierzchalski P. Prostaglandin E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *Biotechniques*, 52: 307-315. 2012.
- [3] Bolzani R, Ruggeri F and Olivo OM. Average normal temperature of the chicken in the morning and after 1-2 days of fasting. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale*, 55: 1618-1622. 1979.

- [4] Sun L, Lamont SJ, Cooksey AM, McCarthy F, Tudor CO, Vijay-Shanker K, DeRita RM, Rothschild M, Ashwell C, Persia ME and Schmidt CJ. Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell Stress Chaperones*, 20: 939-950. 2015.
- [5] Medema JP, and Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474: 318-326. 2011.
- [6] 獣医組織学 第5版, 日本獣医学解剖会編, 2011.
- [7] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15: 19-33. 2014.

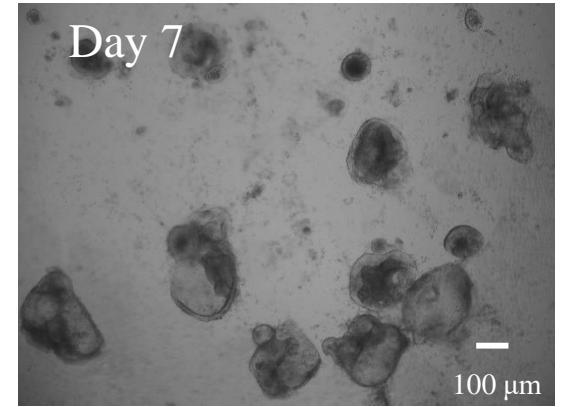
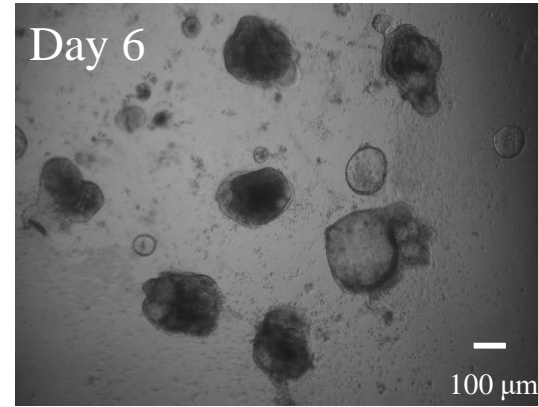
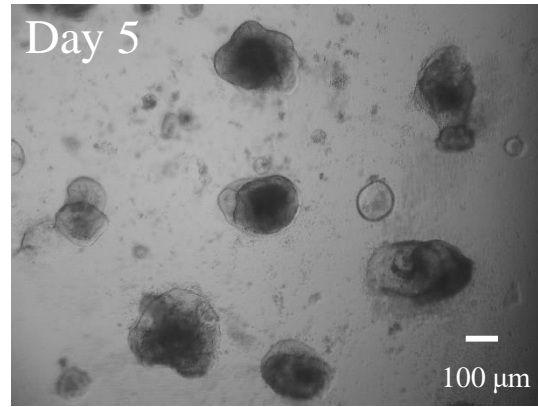
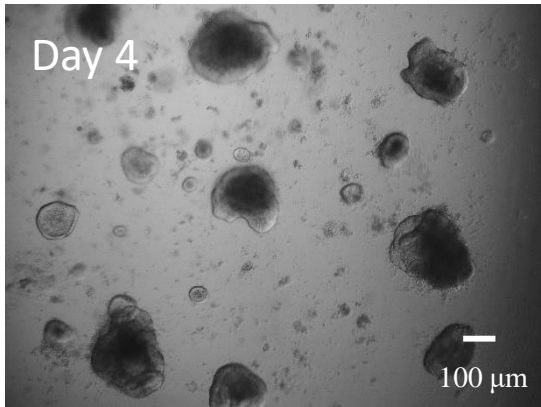
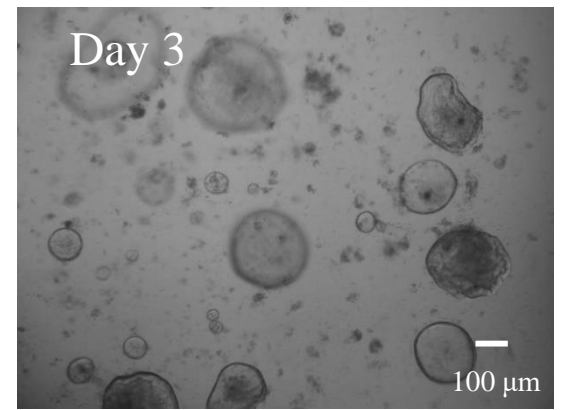
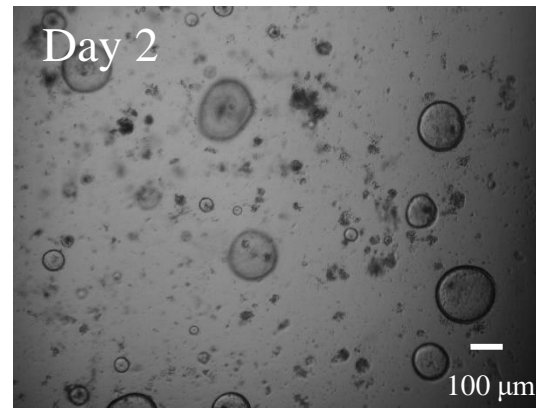
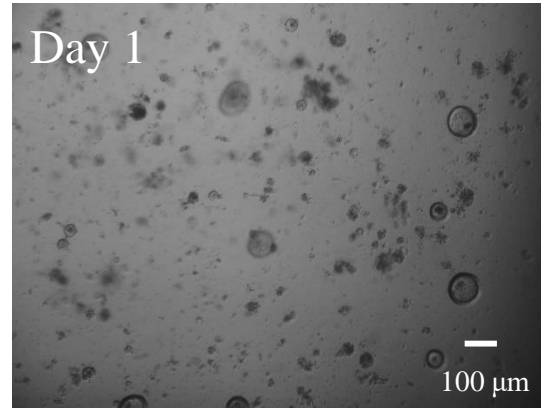
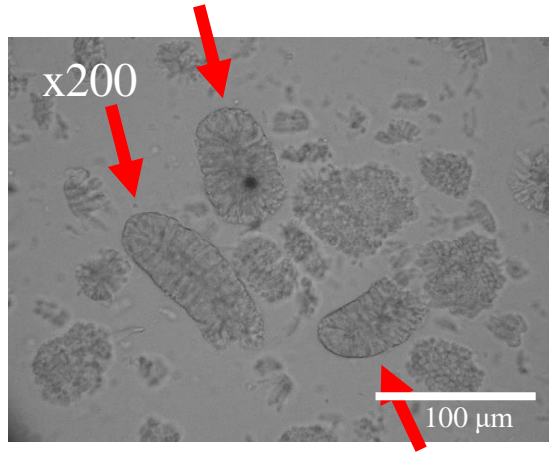


Figure 7. Chicken organoid cell culture with L-WNR conditioned medium. Red arrows indicate small intestinal crypts. Chicken intestinal organoids were cultured for 7 days.

第7章 マイクロマニピレーターを用いた腸管オルガノイドへの サンプルインジェクション法の確立

第1節 目的

第6章においてニワトリ腸管オルガノイドの培養が可能であることが示された。そこでニワトリのオルガノイドの管腔内にサンプルを注入できるか否か調査することを目的とした。注入するサンプルは蛍光を持つデキストランを用いて、オルガノイド注入後にデキストランがサンプル中に留まるか否か調査した。

第2節 材料と方法

1. ニワトリ腸管オルガノイドへのデキストラン注入

- ・培養4日目のニワトリ腸管オルガノイド
- ・Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・DPBS (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)
- ・マイクロマニピレーター (株式会社ニコン、東京)
- ・Dextran, Alexa Fluor® 555; 10,000 MW, Anionic (Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)

【操作】

- (1) マトリゲルに包埋されている培養7日目のオルガノイドに氷冷したDPBSを添加し、マトリゲルを溶解させた。
- (2) 実体顕微鏡下でオルガノイドを採取し、Advanced DMEM/F12中へ移動させ、氷上に置いた。
- (3) 採取したオルガノイドへマイクロマニピレーターを用いてデキストランを注入した。
- (4) 注入後、蛍光顕微鏡下で注入したデキストランがオルガノイド中に留まるか否か観察した。

第3節 結果

デキストランを注入した後のオルガノイドを Figure 8 に示した。マイクロマニピレーターを用いてオルガノイドへサンプルを注入することは可能であるが、培養中にサンプル（デキストラン）が漏れてしまうことが明らかとなった。

第4節 考察

オルガノイドへのサンプル注入は Wilson らが試みており、細菌をオルガノイド中へ注入し、腸管上皮細胞における免疫応答を調査している[1]。また、オルガノイドがマトリゲル中に包埋されているままマイクロインジェクションを行っている。本研究ではマトリゲルからオルガノイドを取り出してからマイクロインジェクションを行った。そのため、オルガノイドにインジェクターを差し込む際にオルガノイドが変形してしまうため、上手くインジェクターを差し込むことが困難であった。また、インジェクターを差し込んだ後にサンプルを注入すると、オルガノイドの隙間からデキストランが漏出してしまった。また、オルガノイドに注入したペプチドが細胞内を通過する様子を観察するためにはより分解能が高く、解像度の高い蛍光顕微鏡を用いる必要が明らかとなった。

オルガノイドは平面培養が試みられており、線維芽細胞をフィーダー細胞として使い、トランズウェル上にオルガノイドを培養した後にトランズウェルのインサート側の培地を除去することで分化した腸管上皮細胞を培養することが可能となっている[2]。この手法がニワトリでも可能となれば、初代培養系での腸管上皮細胞からの物質透過試験を調査することが可能となる。今後はトランズ

ウェル上でのオルガノイド培養を行い、腸管上皮細胞の平面培養が可能か否か調査する必要がある。

引用文献

- [1] Wilson SS, Tocchi A, Holly MK, Parks WC and Smith JG. A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen-epithelial cell interactions. *Mucosal Immunology*, 8: 325-361. 2015.
- [2] Wang X, Yamamoto Y, Wilson LH, Zhang T, Howitt BE, Farrow MA, Kern F, Ning G, Hong Y, Khor CC, Chevalier B, Bertrand D, Wu L, Nagarajan N, Sylvester FA, Hyams JS, Devers T, Bronson R, Lacy DB, Ho KY, Crum CP, McKeon F and Xian W. Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. *Nature*, 522: 173-178. 2015.

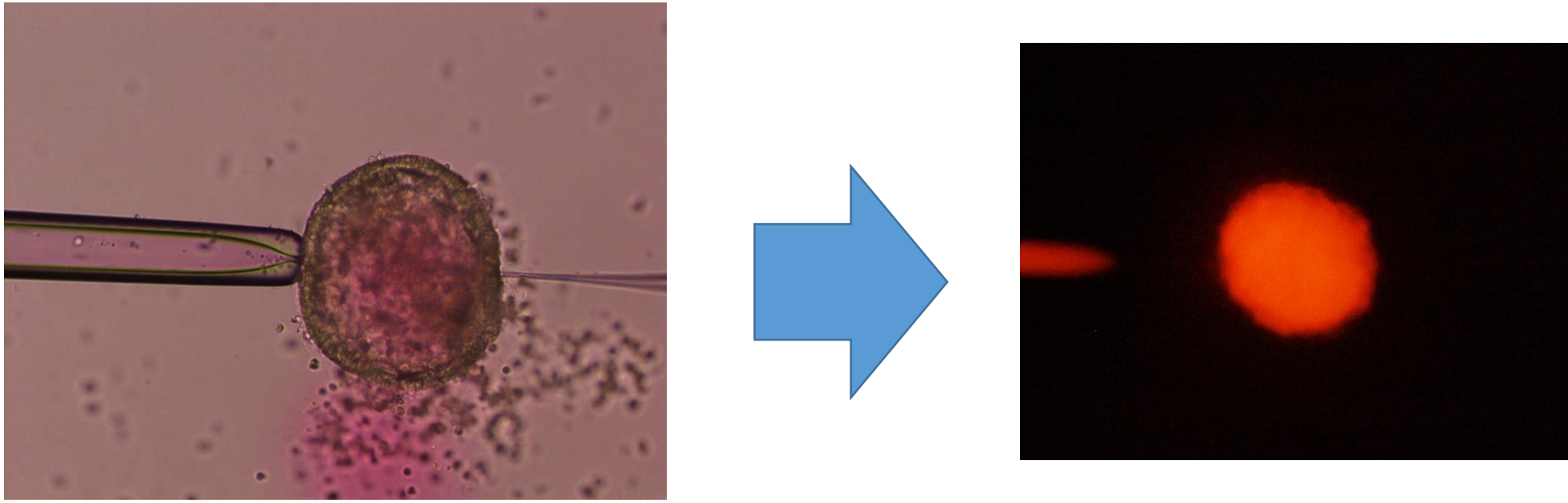


Figure 8. Dextran labeled with Alexa fluor[®]555 was injected into organoid with micro manipulator.

第8章 総括

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の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。その結果、穀物タンパク質の中でも特に小麦グルテンの消化産物が腸管からのアミノ酸吸収を促進することを示した。さらに、小麦グルテン消化産物中の分子量 3,000 以上の高分子ペプチドにアミノ酸吸収を促進する効果があることが明らかにした。

近年では高分子ペプチドが消化酵素の影響を受けずにそのまま血中へと移行することが報告されている。しかし、吸収されたペプチドの効果については不明であることが多い。そこで、ニワトリでも高分子ペプチドの吸収が認められるか否か調査した。その結果、本研究ではニワトリ小腸からの高分子小麦グルテンペプチドの吸収は認められなかった。タンパク質や高分子ペプチドの吸収はパイエル盤で行われるが、ニワトリではパイエル盤が小腸ではなく盲腸部に集中していることも本研究においてペプチドが認められなかった要因の一つであると考えられた。

腸管上皮細胞における物質吸収を調査するためには *ex vivo* における実験が必要不可欠となる。そこで、本研究では腸管上皮細胞の初代培養系である腸管オルガノイド培養が成鶏由来細胞でも可能か否か調査した。その結果、**L-WRN conditioned medium** を用いることで成鶏からでもニワトリオルガノイドの調製が可能となることを示した。また、調製したオルガノイドを用いて物質の透過試験が可能か否か調査するためにマイクロマニピレーターを用いてオルガノイド中へ蛍光標識されたデキストランを注入した。その結果、投与したデキストランがオルガノイド中から漏出してしまったため、物質の透過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、調製したオルガノイドを用いて腸管からの小麦グルテン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物質の吸収試験は困難であることが示され、別の手法を用いる必要性が示された。

今後はオートラジオグラフィーを用いて腸管から吸収されるペプチドの探索を行いつつ、トランズウェル上でニワトリ腸管オルガノイドの平面培養が可能

か否か調査する予定である。

主論文

- [1] Ken R Ito and Kazumi Kita. Grain proteins digested by trypsin modify plasma amino acid concentration in chickens. *Journal of Poultry Science*, 51: 340-345. 2013.
- [2] Ken R Ito and Kazumi Kita. Influence of trypsin-digested wheat gluten peptides with different molecular size on intestinal absorption of amino acids in chickens. *Journal of Poultry Science*, 53: 40-42. 2016

参考論文

- [1] Ito R K, Yokoyama J and Kita K. Suppression of intestinal glucose absorption by administrating iodine-enriched eggs to chickens as hyperglycemic experimental animals. *Anti-Aging Medicine*, 10: 135-141. 2014.
- [2] Ito RK, Kita K. Influence of dialyzed whey on the growth and nutrient absorption from small intestine of chickens. *Journal of Poultry Science*, 51:42-46. 2014.
- [3] 伊藤謙, 赤峰知奈美, 河田和, 志村洋一郎, 稲元民夫, 喜多一美. 飼料中へのプロポリス残渣の添加が横斑プリマスロックの盲腸内細菌叢へ及ぼす影響. *日本家禽学会誌*, 51: 1-5. 2014.
- [4] Kita K, Ito RK, Akamine C, Kawada W, Shimura Y, Inamoto T. Influence of propolis residue on the bacterial flora in the cecum of nanbukashiwa. *Journal of Poultry Science*, 51: 275-280. 2014.
- [5] Kita K, Ito RK, Sugahara M, Kobayashi M, Makino R, Takahashi N,

Nakahara H, Takahashi K and Nishimukai M. Effect of In Ovo administration of branched-chain amino acids on embryo growth and hatching time of chickens. Journal of Poultry Science, 52: 34-36. 2015.

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、ご校閲を賜りました岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻動物生産連合講座の喜多一美教授、西向めぐみ准教授、松崎正敏教授、堀口健一教授に厚くお礼を申し上げます。特に、腸管オルガノイド培養にご協力いただきました東京農業大学応用生物化学部食品安全健康学科の岩槻健准教授並びに熊木竣介君には心から感謝申し上げます。

また、反転腸管法を教えてくださいました北海道大学大学院農学研究院の石塚敏准教授、オービトラップ質量分析計の使用法と解析法をご教授承りました岩手大学農学部の山下哲郎准教授に深く感謝申し上げます。マイクロマニピレーターの使い方を教えてくれた岩手大学院連合農学研究科博士課程1年の高橋一生君にも感謝申し上げます。

本研究のために犠牲となりました多くのニワトリに感謝するとともに、心よりご冥福をお祈りいたします。