

メタボリックシンドロームモデルマウスの腸内代謝物の メタボローム解析法の確立と食事因子の評価

Establishment of metabolome analytical methods in intestinal metabolites
and evaluation of dietary factors in metabolic syndrome model mice

青江 誠一郎

Seiichiro Aoe

大妻女子大学家政学部

Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

キーワード : メタボローム解析, 腸内代謝, メタボリックシンドローム

Key words : Metabolome analysis, Intestinal metabolism, Metabolic syndrome

1. 研究目的

過食と運動不足などによる脂肪細胞への中性脂肪の蓄積が種々の病気を発症させるというメタボリックシンドロームの概念は広く知られるようになってきた。著者らは、メタボリックシンドロームを予防する食事因子の研究を長年実施しており、大麦由来のβ-グルカン、乳清たんぱく質ペプチドに初期炎症を抑制する効果があることを見いだした。しかし、なぜこれら食事因子が有効なのか不明な点もあり、メカニズム研究が残された課題である。これまでのメカニズム研究は、血液生化学値や臓器の遺伝子発現を調べることにより行われてきた。近年になって、細胞の働きを包括的に理解するため、DNAの塩基配列の網羅的解析(ゲノム解析)、mRNAの網羅的解析(トランスクリプトーム解析)、タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)が開発された。しかし生体には、DNA、RNA、タンパク質といった高分子物質の他にも、比較的分子量が低く、アミノ酸、有機酸、脂肪酸といった物質が多く含まれる。栄養成分は、吸収され生体内を輸送される際には、まさに低分子の状態である。食事因子の影響や腸内細菌代謝産物が生体に及ぼす影響を理解するためには、こうした低分子の物質を解析することが必要である。こうした低分子の代謝産物を解析するための方法として、メタボローム解析が発達した。この生体内に存在する全代謝産物を網羅的に解析することを「メタボローム解析」と呼ぶ。本研究は、これまで明らかにした食事因子のメタボリックシンドローム予防効果のメカニズム解析手法として、メタボローム解析システムを導入し、活用することを目的に行った。また、メタボローム解析は、生物

の代謝産物を解析する以外にも、様々な分野への応用も可能である。食品中の成分を調べることでより良い機能性食品の開発、血漿等の体液を調べることで有効成分の探索など、様々な分野でメタボローム解析が利用できる。

2. 研究内容及び成果

【測定条件】

GC/MSを用いたメタボローム解析の測定条件を以下に示す。
装置: 7890 GC/5975C MSD with 7693 自動前処理機能付きオートサンブラ
カラム: DB-5ms + Duragurd (10m) 30m, 0.25mm, 0.25μm
注入量: 1μL
注入法: スプリット, 10:1
注入口温度: 250°C
オープン: 60°C(7min)-10°C/min-325°C(10min) カラム流量: 1.1ml/min (定流量モード)
インターフェース温度: 290°C
イオン源温度: 250°C
測定モード: スキャン測定, 質量範囲, m/z 50-600

【誘導体化】

血清の誘導体化は、血清を10μL採取し、窒素気流下で乾固した後、内部標準はd24 ミリスチン酸を2μL添加した。
盲腸内要物の誘導体化は、盲腸内容物を測りとり、100μM クロトン酸および濃塩酸、ジエチルエーテル加えホモジナイズして有機酸を抽出した。遠心分離後(3000rpm, 10min)後、上層(エーテル層)を採取し、オキシム化、誘導体化した。

オキシム化, 誘導体化条件は以下の通り.

オキシム化: メトキシアミン塩酸塩 40 mg/mL

10 μ L 添加, 30°C 90 分間反応

トリメチルシリル化: MSTFA + 1% TMCS を 90 μ L 添加, 37°C 30 分間反応

動物実験 1 大麦を摂取したマウスの盲腸内解析

β -グルカン含量の異なる大麦を脂肪エネルギー比 50% の高脂肪食に配合し, 5 週齢の C57BL/6J マウスに 12 週間給餌した. 飼育後, イソフルラン/炭酸ガスにて安楽死させ, 盲腸を摘出した. 前述の方法により, 有機酸を抽出し解析を行った. その結果, 10 種類の有機酸が分離定量できた. 検出された有機酸は以下の通りである.

ギ酸, 酢酸, プロピオン酸, イソ酪酸, 酪酸, イソ吉草酸, 吉草酸, 乳酸, コハク酸.

その中でも, プロピオン酸, 酢酸が多く, プロピオン酸は大麦群で有意に高値を示した (図 1). 本結果は, 腸内細菌による代謝の違いを示すものである.

動物実験 2 乳成分を摂取したラットの門脈メタボローム解析

乳清由来の成分を脂肪エネルギー比 50% の高脂肪食に配合し, 5 週齢の SD ラットに 2 週間給餌した. 飼育後, イソフルラン/炭酸ガスにて安楽死させ, 門脈採血を行った. 前述の方法により, 前処理を行い, メタボローム解析を行った. 図 2 に乳成分摂取群の代表的クロマトチャートのアミノ酸ピーク部分を示す. 本解析から, 乳成分摂取により, 分枝アミノ酸 (バリン, ロイシン, イソロイシン) が多く吸収されていることが示された.

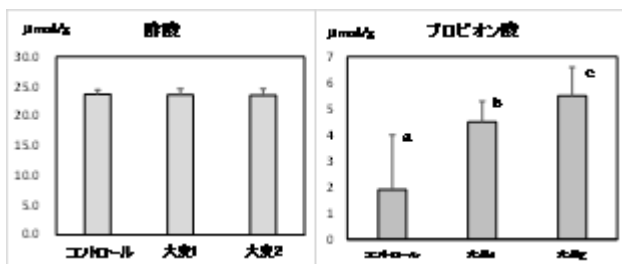


図 1. 盲腸内要物の短鎖脂肪酸解析結果
エラーバーは標準偏差を表す.

異なるアルファベット間で有意差あり
($p < 0.05$).

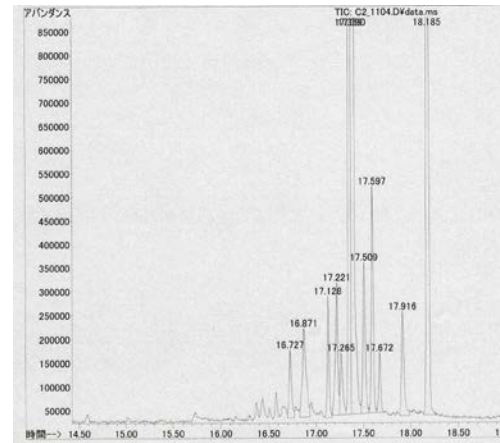


図 2. ラット門脈のメタボローム解析クロマトチャート

3. まとめと今後の課題

食事因子により変化する腸内代謝産物および血中移行物質を網羅的に解析するメタボローム解析システムを導入し, メカニズム研究に応用することを目的として検討を行った.

1. 有機酸をはじめとした盲腸内発酵代謝産物を網羅的に解析できることが確認された.
2. 消化管で吸収された水溶性栄養素が通過する門脈の栄養成分を調べることができた.

以上の結果, 腸内代謝産物および血中移行物質を網羅的に解析するメタボローム解析システムがほぼ構築できた. 今後は, 各食品の摂食実験に応用していく予定である.

4. この助成による発表論文等

学会発表

[1] 青江誠一郎: 大麦中の β -グルカンの有無ならびに搗精処理が食餌性肥満モデルマウスのメタボリックシンドローム関連指標に及ぼす影響. 日本食物繊維学会第 20 回学術集会, 平成 27 年 11 月 28 日, 伊那食品工業株式会社 (長野県伊那)

(2016 年 3 月 31 日現在)