

ニワトリのふ化直後における血漿中の成長関連低分子代謝物質の探索

塩田 駿介, 友永 省三
 (京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻*)
 (受付 2018年8月31日, 受理 2018年10月4日)

**Searching for growth-related metabolites of plasma
 immediately after hatching in chickens**

Shunsuke SHIOTA, Shozo TOMONAGA
*Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture**

Summary

Improving productivity of chicken has been important for the poultry industry. In general, meat-type chickens grow up faster than egg-type chickens. We focused on this phenotype and speculated that this difference could be caused by the difference of growth-related metabolites of plasma immediately after hatching. If such metabolites are identified, it may contribute to the improvement of growth performance of chickens. Therefore, we compared plasma metabolites in meat-type (MT) and egg-type (ET) chicks immediately after hatching by GC/MS un-targeted metabolomic analysis. 53 metabolites were identified and of which 18 metabolites were significantly different between MT and ET. Among them, it seemed important that pantothenic acid, one of important micronutrients, were larger in MT than in ET. These results suggest that some metabolites, especially pantothenic acid, might contribute to growth of chickens.

ニワトリから得られる鶏肉や鶏卵は、栄養価が高く消化に優れた食品として古くからヒトの食生活と密接に関わってきた。近年は消費者の健康志向を反映して、日本における鶏肉の生産・消費量は年々増加しており、鶏卵の生産・消費量も安定した推移をみせている¹⁾。こうした消費者のニーズに応えるために、鶏肉・鶏卵の安定した生産基盤を構築することや生産性向上を図ることは、家禽産業における重要な課題であるといえる。

家禽としてのニワトリは肉用鶏と卵用鶏に大別される。肉用鶏は成長速度と肉収量の向上を、卵用鶏は鶏卵の生産性向上を目的として遺伝的な選抜が行われてきた²⁾。その結果、卵用鶏と比較すると肉用鶏は摂食量が2倍程度多く³⁾、運動量が少ない⁴⁾などの差異が認められる。これら鶏種間の差異を考慮し、最適な飼養成績を得るために肉用鶏および卵用鶏それぞれに栄養素要求量が設定されている⁵⁾。

産業上起こりうるストレス条件下において、必須栄養素以外の低分子代謝物質の摂取が成長や健康への負の影響を緩和することが多くの研究から示唆されている。例えば、ベタインの混餌投与が暑熱ストレス条件下における摂食量の低下抑制や脂質代謝の改善に働くこと⁶⁾や、タウリンの

混餌投与が過密飼育条件下における肝臓の酸化ストレス軽減や脂質吸収能改善に働くこと⁷⁾などである。

ニワトリの初期栄養の制御を介した生産性向上も試みられてきた。ニワトリの生産現場では、しばしばヒナのふ化時期のばらつきや性鑑別、輸送およびワクチン接種などの理由で数日間の絶食条件下に置かれることが、飼養学分野における問題となりうる。その中でも、我々は、ふ化直後から24時間以上の絶食はその後の成長に負の影響を及ぼすこと⁸⁾に着目している。この問題の解決のために、ニワトリのふ化直後の栄養(初期栄養)の改善の試みは幾つか存在するが⁹⁾、これまでに注目されていなかった低分子代謝物質群にも着目することで、ニワトリの生産性向上に更に貢献するのかが検討の余地があると考えた。

以上より、肉用鶏と卵用鶏の成長速度の差異に、ふ化直後の低分子代謝物質が関係すると仮説を立てて、両鶏種におけるふ化直後の血漿における低分子代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)が有用であると考えた。今回は、その中でも、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いた親水性低分子代謝物質のアンターゲットかつ網羅的な半定量分析を行い、比較することによる探索を試みた。

*所在地：京都市左京区北白川追分町(〒606-8502)

実験方法

動物試験

もみじ（卵用鶏）の種卵（後藤孵卵場，岐阜）ならびにチャンキー（肉用鶏）の種卵（福田種鶏場，岡山）を温度37.0℃，湿度60%の条件下でふ化させた。各群の初期卵重が同一条件となるように配慮した。

試料採取

ふ化直後にイソフルラン（マイラン製薬，大阪）麻酔下で血液を耳介静脈より採取し，ヘパリン（富士フィルム和光純薬，大阪）を加えておいたチューブに入れ（両鶏種の雌雄を考慮して4群で各n=6），3,000 g，4℃で15分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿は-80℃下で冷凍保存した。本実験は「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成25年環境省告示第84号）を遵守し，京都大学における動物実験の実施に関する規程（京都大学動物実験委員会）に基づき行った（承認番号：29-88）。

低分子代謝物質の網羅的半定量分析

血漿（50 µL）に対して Shigematsu¹⁰⁾ の方法に準じて前処理を行った。内部標準物質として，2-イソプロピルリンゴ酸（Sigma-Aldrich，Missouri，USA），誘導体化試薬として，メトキシアミン塩酸塩（MP Biomedicals，California，USA）（オキシム化）およびN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（フナコシ，東京）（トリメチルシリル化）を用いた。これらのサンプルをGC/MS（GCMS-QP2010 Ultra，島津製作所）による分析に供した。電子イオン化法によるSCANモードを用いた。カラムはInertCap 5MS/NP（30 m × 0.25 mm × 0.25 µm，ジーエルサイエンス，東京）を用いた。機器の分析条件は，Imura¹¹⁾ の方法に準じた。ピークの検出ならびにアライメント，ピークの同定には，保持時間ならびにマススペクトルを基準として半自動同定を行うMS-DIAL ver. 2.76を用いた¹²⁾。対応する化合物データベース（GL-Science DB InertCap 5MS-NP，Kovats RI，494 records）は，PRIME（<http://prime.psc.riken.jp/>）から入手した。また，アルカン（C9～C40）を用いた保持時間の補正を行った。類似度は70%以上，保持指標は±10以内を基準とした。各物質の濃度は，各物質のイオンピークの高さを内部標準物質のイオンピークの高さで除算し，卵用鶏のオスの平均値を100とした相対値として求めた。

統計解析

低分子代謝物質の解析には二元配置分散分析を用いた。交互作用に有意な影響が認められた場合はTukey法による多重比較検定を行った。分析ソフトウェアとして，JMP 13.0.0（SAS）を用いた。鶏種差に関連する代謝経路の推定のために，鶏種の影響が有意で交互作用は有意差無し，

あるいは交互作用が有意で多重比較でいずれかの性において鶏種間で有意な影響が認められた成分を用いたエンリッチメント解析（MetaboAnalyst 4.0）を行った¹³⁾。性差に関連する代謝経路の推定では，性の影響が有意で交互作用は有意差無し，あるいは交互作用が有意で多重比較でいずれかの鶏種において性で有意な影響が認められた成分を用いた同解析を用いた。全解析において，P<0.05を有意差ありとした。

結果

53成分を同定・半定量することができた（Table 1）。これらのうち，二元配置分散分析において，鶏種，性あるいは交互作用で有意な影響が認められた成分を図表としてまとめた（Figs. 1-3, Table 2）。鶏種の影響が認められた成分は18成分（1,5-アンヒドログルシトール，アラビトール，アスパラギン酸，β-アラニン，カダベリン，クレアチニン，グルクロン酸，ヒポタウリン，イノシトール，イソロイシン，リンゴ酸，マンニトール，オルニチン，パントテン酸，プロリン，トレイトール，トレオニン，キシリトール），性の影響が認められた成分は3成分（β-アラニン，ヒポタウリン，トレイトール），鶏種と性の交互作用が認められた成分は3成分（β-アラニン，クレアチニン，ヒポタウリン）であった。更に，エンリッチメント解

Table 1 Identified metabolites in chick plasma.

1,5-Anhydro glucitol	Leucine
2-Aminobutyric acid	Lysine
2-Hydroxybutyrate	Malic acid
5-Oxoproline	Mannitol
α-Ketoglutaric acid	Mannose
Alanine	Methionine
Arabitol	N-Acetyl aspartic acid
Asparagine	Ornithine
Aspartic acid	Oxalacetic acid + Pyruvate
β-Alanine	Pantothenic acid
Cadaverine	Phenylalanine
Creatinine	Phosphate
Fucose	Proline
Fumaric acid	Psicose + Tagatose
Galactose + Glucose	Sarcosine
Glucuronate	Serine
Glutamic acid	Serotonin
Glycerol	Succinic acid
Glycine	Threitol
Hydroxyproline	Threonic acid
Hypotaurine	Threonine
Inosine	Tyrosine
Inositol	Urea
Isocitric acid + Citric acid	Uric acid
Isoleucine	Valine
Lactic acid	Xylitol
	Xylonic acid

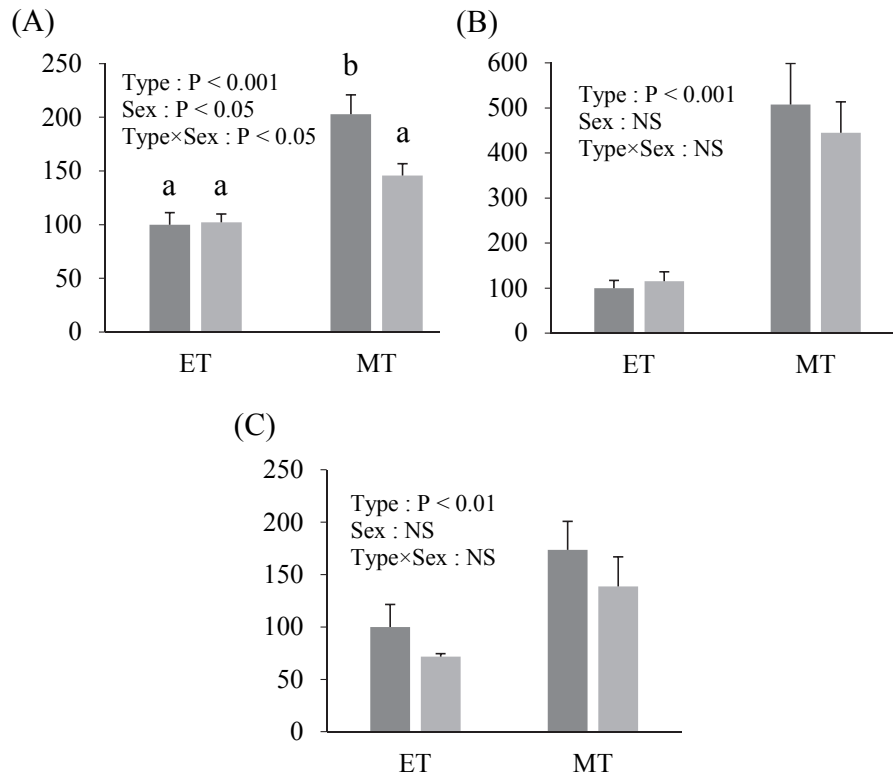


Fig. 1 Levels of metabolites in β -alanine metabolism suggested by the enrichment analysis in chick plasma. (A) β -alanine, (B) pantothenic acid, (C) aspartic acid. Values are means with their standard errors (n = 6). ET: egg-type chickens, MT: meat-type chickens, (■): male, (□): female, NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

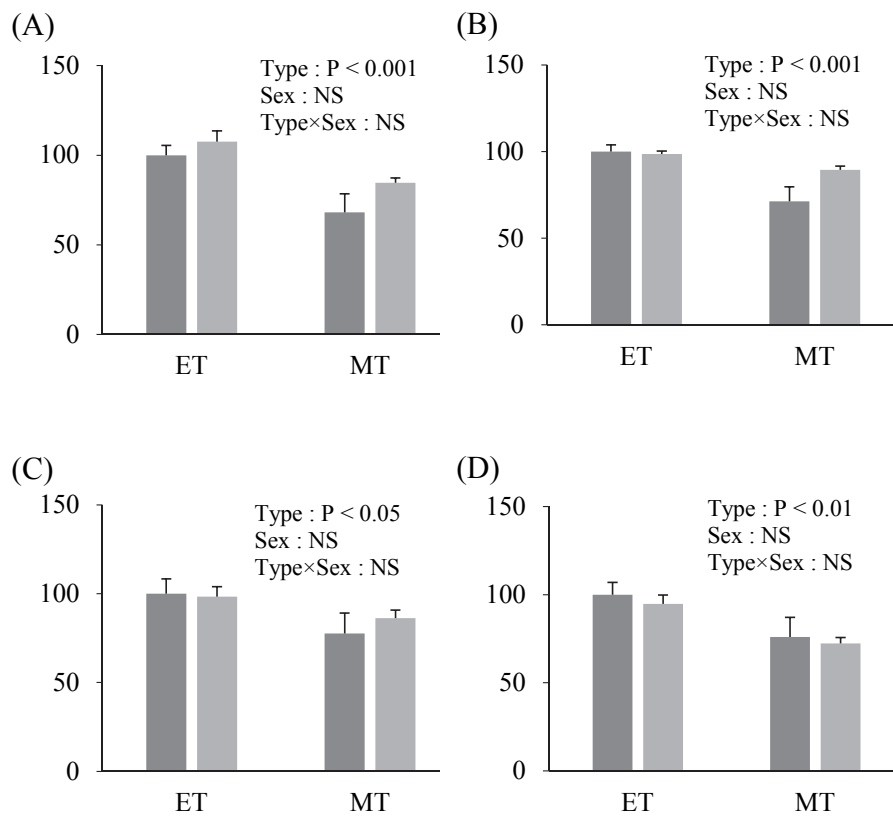


Fig. 2 Levels of some amino acids in chick plasma. (A) ornithine, (B) proline, (C) isoleucine, (D) threonine. Values are means with their standard errors (n = 6). ET: egg-type chickens, MT: meat-type chickens, (■): male, (□): female, NS: not significant ($P \geq 0.05$).

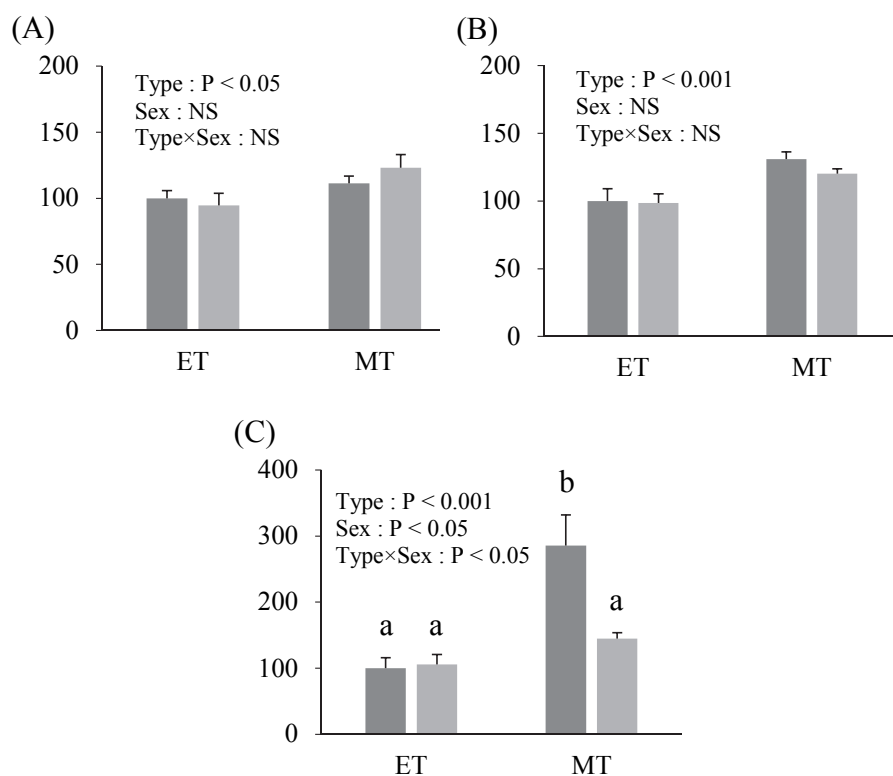


Fig. 3 Levels of bioactive substances in chick plasma. (A) cadaverine, (B) inositol, (C) hypotaurine. Values are means with their standard errors ($n = 6$). ET: egg-type chickens, MT: meat-type chickens, (■): male, (□): female, NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

Table 2 Other metabolites in which significant effects were observed.

Type	ET		MT		P-value			
	Sex	Male	Female	Male	Female	Type	Sex	Interaction
1,5-Anhydro glucitol		100 ± 9	86 ± 4	118 ± 8	108 ± 3	< 0.01	NS	NS
Arabitol		100 ± 7	82 ± 4	121 ± 7	110 ± 9	< 0.01	NS	NS
Creatinine		100 ± 18 ^a	118 ± 21 ^a	190 ± 11 ^b	129 ± 16 ^{ab}	< 0.01	NS	< 0.05
Glucuronate		100 ± 6	92 ± 6	131 ± 13	129 ± 7	< 0.01	NS	NS
Malic acid		100 ± 3	109 ± 8	197 ± 53	161 ± 13	< 0.05	NS	NS
Mannitol		100 ± 8	86 ± 4	128 ± 13	122 ± 9	< 0.01	NS	NS
Threitol		100 ± 5	81 ± 5	139 ± 12	116 ± 6	< 0.001	< 0.05	NS
Xylitol		100 ± 5	99 ± 8	156 ± 19	136 ± 3	< 0.001	NS	NS

Values are means with their standard errors ($n = 6$). ET: egg-type chickens, MT: meat-type chickens, NS: not significant ($P \geq 0.05$). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test ($P < 0.05$).

析を用いた鶏種差に関連する代謝経路の推定では、リンゴ酸・アスパラギン酸シャトルと β -アラニン代謝が検出された。リンゴ酸・アスパラギン酸シャトルに関わる物質のうち、今回同定されたものはリンゴ酸とアスパラギン酸で、いずれも肉用鶏に多く含まれていた。 β -アラニン代謝に関わる物質のうち今回同定されたものは β -アラニン、アスパラギン酸およびパントテン酸で、いずれも肉用鶏に多く含まれていた。同様に性差に関連する代謝経路を推定したところ、タウリン・ヒポタウリン代謝が検出された。タウリン・ヒポタウリン代謝に関わる物質のうち今回同定された物質はヒポタウリンで、肉用鶏のオスに多く含まれていた。

考 察

パントテン酸は水溶性ビタミンの一種で、かつてはビタミン B_5 とも呼ばれていた。補酵素 A (CoA) およびアシルキャリアータンパク質 (ACP) の構成分子であり、糖、脂肪酸の代謝における酵素反応に広く関与している。CoA のアセチル化によって合成されるアセチル CoA は、三大栄養素 (糖、脂質およびタンパク質) の代謝すべてに関わる非常に重要な物質である。また、ACP は脂肪酸の合成に中心的な役割を果たしている。パントテン酸は様々な食物に豊富に存在しているためヒトでの欠乏症はほとんど報告されていないが、家禽においては欠乏による神経系、副

腎皮質および皮膚への悪影響が示唆されている。具体的な影響として、ふ化率の低下、成長遅滞、浮腫および皮下出血などが挙げられる。また、ふ卵後期におけるパントテン酸欠乏では胚発生が停止するケースが報告されており、ふ化に成功してもその後の死亡率が高い¹⁴⁾。このように、パントテン酸はニワトリ胚の成長とふ化およびその後の成長に重要な役割を果たしていることが分かる。しかし、パントテン酸カルシウムの卵黄内投与によってニワトリ胚の体重が増加する¹⁵⁾ 報告はあるものの、ふ化直後におけるパントテン酸とニワトリの成長の関係を詳細に調べた研究は我々が知る限り無い。本研究では、血漿中のパントテン酸は卵用鶏より肉用鶏に多く含まれることが示唆された。このことは、パントテン酸が肉用鶏の高い成長能力に貢献していることによるのかもしれない。エンリッチメント解析において、パントテン酸は、 β -アラニン代謝の中の1成分として検出されている。これは、パントテン酸の構成成分として β -アラニンが存在するためであるが、ニワトリには、 β -アラニンからパントテン酸を合成する酵素や、パントテン酸を分解して β -アラニンを産生する酵素の存在は確認されていないようである。従って、パントテン酸のニワトリ組織内における合成・分解能ではなく、ふ卵期の主な栄養源である卵黄などからのパントテン酸の供給との関連を今後調べる必要がある。

β -アラニンは、基本アミノ酸である α -アラニンとは異なりアミノ基が β 位の炭素に結合している非タンパク質構成アミノ酸の一種であり、食肉中に多く含まれるイミダゾールジペプチドであるカルノシンやアンセリンの構成分子でもある。肉用鶏に β -アラニンを混餌投与することにより、成長能力の向上、筋肉中カルノシン濃度の増加、カルノシン合成酵素の発現の上昇¹⁶⁾が報告されている。また、 β -アラニンはアスパラギン酸-1-デカルボキシラーゼを介してアスパラギン酸から生合成される¹⁷⁾。血漿中の β -アラニンおよびアスパラギン酸は卵用鶏より肉用鶏に多く含まれていたことから、両物質は肉用鶏の高い成長能力に、下流の代謝物であるカルノシンの増加を介して貢献するのか今後詳細に調べる価値がある。

ニワトリにおけるプロリンは、幼雛期では準必須アミノ酸として扱われる。そのためプロリンは卵用鶏では要求量が明記されていないが、成長速度が速い肉用鶏では微量ではあるが要求量が明記されている⁵⁾。このことから、プロリンは肉用鶏のように速い成長が求められる場合に重要なアミノ酸であると考えられる。また、プロリンはオルニチン-オキソ酸アミノトランスフェラーゼとピロリン-5-カルボン酸レダクターゼを介してオルニチンからも合成される¹⁸⁾。血漿中のプロリンおよびオルニチンは卵用鶏より肉用鶏で少ないことから、ふ化後の成長に貢献しているのか今後検討する余地がある。

イソロイシンおよびトレオニンは必須アミノ酸であるが、これらの濃度が卵用鶏よりも肉用鶏で少ないことは、これらのアミノ酸の利用性の差異と関連している可能性がある。

これらの必須アミノ酸に着目した更なる研究が求められる。

カダベリンはポリアミンの一種で、リシンの脱炭酸反応によって生成される。しかしながら、この反応を触媒する酵素は、ニワトリでは認められていない。リシンはニワトリの必須アミノ酸のひとつであり、ニワトリの有効リシン要求量は卵用鶏より肉用鶏の方が多いたことが報告されている^{19, 20)}。一方で、カダベリンは、オスの肉用鶏への混餌投与により前胃や砂嚢の損傷スコアが増加する²¹⁾など、生体へ悪影響を及ぼしうることが報告されている。本研究で血漿中のカダベリンは卵用鶏より肉用鶏に多く含まれていることが示唆されたが、血漿中のカダベリン濃度とニワトリの成長との関係については不明な点が多く、更なる研究が必要であると考えられる。

イノシトールはビタミン様物質として知られ、グルコースから合成することが可能である。9種の異性体が存在するが、そのうち栄養学的に重要なのはmyo-イノシトールである²²⁾。myo-イノシトールを慢性投与したマウスは、インスリン感受性が改善し、脂肪の蓄積が減少することが報告されている²³⁾。さらに、イノシトールは欠乏すると脱毛や脂肪肝を引き起こすことが報告されている²²⁾。これらのことから、イノシトールはニワトリが健康を維持して成長する上で重要な物質なのではないかと考えられる。更なる研究のためには、今回の分析条件では異性体を区別できていない可能性があることから、myo-イノシトールに特化した定量分析系による確認が必要である。

ヒポタウリンはタウリン生合成における中間体として知られている。*in vivo*においてはタウリンよりもヒポタウリンの方が抗酸化能が大きいことが示唆されている²⁴⁾。また、成長遅滞を伴う暑熱ストレス負荷条件における卵用鶏において、血漿中のヒポタウリン濃度が通常飼育の対照区と比べ少ないことが報告されている²⁵⁾。これらより、成長遅滞を誘導するストレス条件下や、成長速度の速い肉用鶏におけるヒポタウリンの役割に関して更なる研究が求められる。

本研究では鶏種と成長との関連に着目したが、性の影響が認められる成分が検出されたことは興味深い。性も成長と関連することは知られており、例えば、肉用鶏においてオスがメスよりも成長速度に優れる²⁶⁾。従って、今後、鶏種差に着目した研究を行う場合は、たとえ今回のように性成熟前の幼雛期に着目する場合であっても、性差を考慮すべきかもしれない。

以上より、ふ化直後のニワトリの血漿GC/MSメタボローム解析から、幾つかの成長関連低分子代謝物質の候補が見出された。その中でも、微量栄養素としてはパントテン酸が抽出された。パントテン酸に着目して研究を進めることは、ニワトリの生産性向上のための有用な手がかりになると考えられることから、更なる研究が求められる。

謝 辞

本研究の立案および遂行においてご協力いただいた京都大学大学院農学研究科の松井徹教授および舟場正幸准教授に感謝する。

本研究は JSPS 科研費 JP16K07989 の助成を受けた。

参考文献

- 1) 農林水産省 食肉鶏卵をめぐる情勢 (平成 30 年 8 月)
<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/>
(平成 30 年 8 月閲覧)
- 2) Zheng Q, Zhang Y, Chen Y, Yang N, Wang XJ, Zhu D (2009) Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC genomics* 10: 87.
- 3) Hocking PM, Hughes BO, Keer-Keer S (1997) Comparison of food intake, rate of consumption, pecking activity and behaviour in layer and broiler breeder males. *Br Poult Sci* 37: 237-240.
- 4) Saito S, Takagi T, Koutoku T, Saito ES, Hirakawa H, Tomonaga S, Tachibana T, Denbow DM, Furuse M (2004) Differences in catecholamine metabolism and behaviour in neonatal broiler and layer chicks. *Br Poult Sci* 45: 158-162.
- 5) 農業・食品産業技術総合研究機構 (2011) 日本飼養標準・家禽, 中央畜産会, 東京
- 6) He S, Zhao S, Dai S, Liu D, Bokhari SG (2015) Effects of dietary betaine on growth performance, fat deposition and serum lipids in broilers subjected to chronic heat stress. *Anim Sci J* 86: 897-903.
- 7) Ma Z, Zhang J, Ma H, Dai B, Zheng L, Miao J, Zhang Y (2014) The influence of dietary taurine and reduced housing density on hepatic functions in laying hens. *Poult Sci* 93: 1724-1736.
- 8) Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z (2004) Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn* 231: 489-502.
- 9) Govinthasamy P, Selvaraj P, Subramaniyan S, Arumugam K and Nandan M (2016) Early Nutrition and Its Importance in Poultry: A Review. *Indian J Anim Nutr* 33: 245-252.
- 10) Shigematsu M, Nakagawa R, Tomonaga S, Funaba MI, Matsui T (2016) Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *Br J Nutr* 116: 1694-1699.
- 11) Imura M, Iwakiri R, Bamba T, Fukusaki E (2018) Metabolomics approach to reduce the Crabtree effect in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 126: 183-188.
- 12) Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, Mehta S, Mueller M, Zheng Y, Ogiwara A, Meissen J, Showalter M, Takeuchi K, Kind T, Beal P, Arita M, Fiehn O (2018) Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods* 15: 53-56.
- 13) Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J (2018) MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 46: W486-W494.
- 14) L. R. McDowell (1989) VITAMINS IN ANIMAL NUTRITION, ACADEMIC PRESS, INC.
- 15) Vacca C, Pelagalli GV, Schiavo A (1961) Effects of pantothenic acid (Calcium pantothenate) and of thyroxine on the development of chicken embryos. *Nature* 189: 66-67.
- 16) Qi B, Wang J, Ma YB, Wu SG, Qi GH, Zhang HJ (2018) Effect of dietary β -alanine supplementation on growth performance, meat quality, carnosine content, and gene expression of carnosine-related enzymes in broilers. *Poult Sci* 0: 1-9.
- 17) Shen Y, Zhao L, Li Y, Zhang L, Shi G (2014) Synthesis of β -alanine from L-aspartate using L-aspartate- α -decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Lett* 36: 1681-1686.
- 18) Ginguay A, Cynober L, Curis E, Nicolis I (2017) Ornithine Aminotransferase, an Important Glutamate-Metabolizing Enzyme at the Crossroads of Multiple Metabolic Pathways. *Biology* 6, 18.
- 19) 土黒定信・安藤幹男・山崎昌良 (1991) 産卵鶏の有効リジン要求量. *家禽会誌* 28 : 95-100.
- 20) 土黒定信・安藤幹男・山崎昌良 (1990) プロイラーの有効リジン要求量. *家禽会誌* 27 : 419-425.
- 21) Barnes DM, Kirby YK, Oliver KG (2001) Effects of Biogenic Amines on Growth and the Incidence of Proventricular Lesions in Broiler Chickens. *Poult Sci* 80: 906-911.
- 22) 日本ビタミン学会 (2010) ビタミン総合事典, 朝倉書店, 東京
- 23) Croze ML, Vella RE, Pillon NJ, Soula HA, Hadji L, Guichardant M, Soulage CO (2013) Chronic treatment with myo-inositol reduces white adipose tissue accretion and improves insulin sensitivity in female mice. *J Nutr Biochem* 24: 457-466.
- 24) Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1988)

- The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256: 251-255.
- 25) Tomonaga S, Okuyama H, Tachibana T, Makino R (2018) Effects of high ambient temperature on plasma metabolomic profiles in chicks. *Anim Sci J* 89: 448-455.
- 26) Shim MY, Tahir M, Karnuah AB, Miller M, Pringle TD, Aggrey SE, Pesti GM (2012) Strain and sex effects on growth performance and carcass traits of contemporary commercial broiler crosses. *Poult Sci* 91: 2942-2948.