

## ラットにおけるマグネシウム欠乏および反復拘束ストレスが尿中低分子代謝物質排泄に及ぼす影響

遠藤 日菜子, 井原 翼, 二見 崇史, 友永 省三<sup>†</sup>

(京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻\*)

(受付 2021年9月13日, 受理 2021年10月11日)

### Effect of magnesium deficiency and repeated-restraint stress on excretion of urinary metabolites in rats

Hinako ENDO, Tsubasa IHARA, Takashi FUTAMI, Shozo TOMONAGA

*Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture*

#### Summary

Magnesium deficiency (MgD) and psychological stress are suggested to be common risk factors for some diseases such as hypertension, type 2 diabetes, and depression. However, effects of the combination have remained unclear. In the present study, we investigated effects of the combination of MgD and repeated-restraint stress, as a psychological stressor, on excretion of urinary metabolites by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry-based metabolomic analysis. Sixty-six excreted urinary metabolites were affected by MgD and/or repeated-restraint stress. The combination of MgD and repeated-restraint stress affects the excretion of pantothenic acid, kynurenic acid, 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid and so on. These metabolites could reflect on nutritional and/or physiological conditions and thus may be useful to understand effects of the combination on the body. These results suggest that more detailed studies focusing on the metabolites observed in the present study will be required to clarify the relationship among Mg deficiency, psychological stress, and related diseases.

マグネシウム (Mg) は必須ミネラルであり, 人体で4番目に多いミネラルである<sup>1)</sup>。Mgの欠乏は様々な疾患の危険因子であることが報告されている<sup>2)</sup>。日本国内の大規模な疫学研究において, Mg摂取が少ない集団では2型糖尿病の発症リスクが高いことが示されていることから<sup>3)</sup>, Mg欠乏は国内においても重要な問題であると考えられる。Mg欠乏と心理的ストレスが共通して危険因子となる疾患として, 高血圧<sup>4,5)</sup>, 2型糖尿病<sup>6,7)</sup>およびうつ病<sup>8,9)</sup>などが報告されている。また, Mg欠乏はストレス内分泌反応系である視床下部-脳下垂体-大脳皮質軸 (HPA軸) に影響を及ぼすことが示唆されている<sup>10)</sup>。具体的には, Mg欠乏マウスでは, HPA軸における視床下部の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの転写が亢進する結果, 副腎皮質刺激ホルモンの分泌が増加する<sup>10)</sup>。一方, 慢性ストレスをラットに与えた際, HPA軸が活性化され, ストレスホルモンである糖質コルチコイドの放出が促進される<sup>11)</sup>という報告もある。こうしたHPA軸の活動亢進は, 鬱病の動物モデルおよび鬱病患者においても観察されている<sup>12)</sup>。

HPA軸を介して生成される糖質コルチコイドは, 脂質代謝や糖代謝など様々な栄養素の代謝に関与することから<sup>13)</sup>, Mg欠乏と心理的ストレスの組み合わせが, HPA軸を介して各単独よりも強い影響を代謝に及ぼし得ると考えた。しかしながら, この組み合わせが及ぼす影響について, 包括的な理解には至っていない<sup>14)</sup>。低分子代謝物質の網羅的解析 (メタボローム解析) は, 栄養素やその代謝下流にある生理活性物質などを網羅的に把握するために有用な手法であるが, 本研究室では, ラット肝臓におけるメタボローム解析から, Mg欠乏は幾つかの栄養素代謝に影響を及ぼすことを確認している<sup>15)</sup>。一方で, Mg欠乏と心理的ストレスの組み合わせにおいて, メタボローム解析を用いた研究は我々が知る限り認められない。従って, メタボローム解析を用いて, Mg欠乏と心理的ストレスにおける組み合わせが及ぼす影響を検討する必要があると考えた。

以上より, 本研究では, Mg欠乏と心理的ストレスの組み合わせが及ぼす影響の解明に向けて, Mg欠乏飼料給与および心理的ストレスである反復拘束<sup>16)</sup>を負荷した

\*所在地: 京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

<sup>†</sup>連絡先: (Corresponding author), Tel: 075-753-6333, E-mail: tomonaga.shozo.4n@kyoto-u.ac.jp

ラットにおける尿のメタボローム解析を行った。本研究で尿に着目した理由として、尿中代謝物質は全身の代謝を反映しうだけでなく、反復採取を非侵襲かつ容易に行うことができることから、両処理が及ぼす影響を経時的に把握する上で有用であると考えたからである。

## 実験方法

### 供試飼料

対照飼料は AIN-93G に準拠した。Mg 欠乏飼料では、AIN-93G-MX から Mg を除いたミネラル混合物を含む AIN-93G に準じた飼料を用いた。対照飼料および Mg 欠乏飼料中の Mg 含量は、それぞれ 447 mg/kg および 33 mg/kg であった。

### 動物試験

24 匹の 3 週齢 Sprague Dawley 雄ラットを室温 24 ± 1 °C、明期サイクルを 5:00~19:00 の条件下で、代謝ケージにて単飼し、蒸留水は自由に摂取させた。馴化期間として、7 日間対照飼料を給与した後に、平均体重が等しくなるように 6 頭ずつ、対照群、Mg 欠乏群、反復拘束ストレス群、Mg 欠乏かつ反復拘束ストレス群の 4 群に割り当て、対照飼料あるいは Mg 欠乏飼料を 7 日間給与した。Mg 欠乏群の摂食量に合わせて、他の群ではペアフエッドを行った。

1, 3, 5 および 7 日目における 1 日尿を採取した。また、毎日体重測定を行った。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定(京都大学動物実験委員会)に基づき行った(承認番号:29-99)。

### 反復拘束ストレス

負荷する心理的ストレスとして、反復拘束ストレス<sup>16)</sup>を用いた。7 日間連続して 8:00-11:00 の間に、ホームケージ内で、頭部以外を包帯で巻いて毎日 2 時間拘束した。

### 皮膚炎症の評価

皮膚における炎症は、Kotani らの方法<sup>17)</sup>で炎症スコアを用いて評価した。0 点:炎症なし、1 点:腫れを伴う片耳の充血、2 点:腫れを伴う両耳の充血、3 点:片耳の炎症、4 点:両耳の炎症、5 点:両耳と尾の炎症とし、毎日評価を行った。

### 血漿中 Mg 濃度および大腿骨中 Mg 含量測定

イソフルラン麻酔下で腹部大動脈からの採血によりラットを屠殺し、大腿骨を採取した。採取した血液にはヘパリンナトリウムを添加し、4 °C、10,000×g で 15 分間遠心分離を行い、血漿を得た。血漿および大腿骨のサンプルは分析まで -80 °C で保存した。血漿は 10% トリクロロ酢酸を

用いて除タンパク質処理し、大腿骨は硝酸を用いて湿式灰化したのち、原子吸光光度計(AA-6600 F, 島津製作所, 京都)を用いて Mg 濃度を測定した。

### 低分子代謝物質の網羅的半定量分析

蒸留水で 10 倍に希釈した尿 50 μL に対し、Goto らの方法<sup>18)</sup>に基づき以下に述べる前処理および誘導体化を行った。内部標準物質として 2-イソプロピルリンゴ酸 5 μL (5 mg/ml) を加えた。次に前処理液(メタノール:水:クロロホルム = 2.5:1:1) 250 μL を加えた後、1,200 rpm、37 °C で 30 分間振盪した(暗所)。次に 4 °C、16,000×g で 5 分間遠心分離を行った。得られた上澄み 225 μL を蒸留水 200 μL と混合し、再度 4 °C、16,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄みを得た。得られた上澄みを真空下、室温で 20 分間遠心濃縮した。その後、-80 °C で凍結させ、減圧乾燥を行った。その後、メトキシアミン塩酸塩のピリジン溶液(オキシム化液)を加えた後、1,200 rpm、30 °C で 90 分間振盪した(暗所)。その後 *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を加え(トリメチルシリル化)、1,200 rpm、37 °C で 45 分間振盪した(暗所)。これらのサンプルを GC-MS/MS (GCMS-TQ-8050, 島津製作所)の電子イオン化法による MRM および SCAN モードで分析を行った。カラムは BPX5 (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, Trajan Scientific and Medical)を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い、圧力を 68.4 kPa、全流量を 40.4 mL/min とした。パージ流量は 5.0 mL として、スプリットで注入した。カラムオープン温度は 60 °C で 2 分間保持したのち 330 °C まで 15 °C/min で上昇させ、気化室およびイオン源の温度はそれぞれ 250 °C、200 °C とした。取得データのピークの検出、ライメントおよびピークの同定には、データベースソフトウェアである Smart Metabolites Database (島津製作所) およびデータ解析ツールである MRMPROBS ver. 2.50<sup>19)</sup>を用いた。保持指標が ±10 以内、類似度が 50% 以上あるいは確認イオンの有無を同定の基準とした。対照群の平均値を 100 とした相対値で示した。

### クエン酸の定量分析

低分子代謝物質の網羅的半定量分析において、クエン酸は同定されていたもののピークが飽和していたため、相対値を算出することができなかった。そこで、クエン酸は定量分析した。

尿 5 μL を PBS で 10 倍希釈したもの、およびクエン酸を標準物質として含む標準溶液 50 μL に対し、半定量分析と同様に前処理および誘導体化を行った。内部標準物質として 2-イソプロピルリンゴ酸 5 μL (5 mg/ml) を用いた。これらのサンプルを GC-MS/MS (GCMS-TQ-8050, 島津製作所)の電子イオン化法による MRM モードで分析を行った。カラムは HP-5MS (30 m × 0.25 mm, Agilent Technologies)を用いた。キャリアガスはヘリウムを用い、圧

力を 120.0 kPa, 全流量を 50.0 mL/min とした。パーズ流量は 3.0 mL として, スプリットで注入した。カラムオープン温度は 80 °C で 1 分間保持したのち 280 °C まで 12.5 °C /min で上昇させ, 気化室およびイオン源の温度はそれぞれ 240 °C, 200 °C とした。

### 統計処理

Mg 欠乏および反復拘束ストレスが及ぼす影響の解析に二元配置分散分析を用いた。交互作用に有意差が認められた場合は, Tukey 法による多重比較検定を行った。炎症スコアは対照群と Mg 欠乏飼料を給与した群の 2 群間についてノンパラメトリック多重検定である Steel-Dwass 法を用いて比較検討した。P < 0.05 を有意差ありとした。統計解析用ソフトウェアとして, JMP 13.0.0 (SAS) を用いた。さらに, 低分子代謝物質群の分析結果に基づき, Mg 欠乏の効果が有意あるいは交互作用が認められかつ多重比較で対照群と Mg 欠乏群 間で有意差が認められた場合を Mg 欠乏の影響がある, 反復拘束ストレスの効果が有意あるいは交互作用が認められかつ多重比較で対照群と反復拘束ストレス群間で有意差が認められた場合を反復拘束ストレスの影響がある, 両処理の影響がともに有意な場合あるいは交互作用が有意な場合には組み合わせも影響があるとし, MetaboAnalyst 5.0<sup>20)</sup> によるパスウェイ解析を行った。

## 結果

### 体重増加および血漿と骨中 Mg 濃度

Mg 欠乏飼料および反復拘束ストレスが, 体重増加および生体のマグネシウム濃度に及ぼす影響を Table 1 に示した。ペアフェッドを行った結果, 摂食量には全ての処理の影響が認められなかった。また, 増体重にも全ての処理の影響が認められなかった。Mg 欠乏飼料給与により血漿および大腿骨中 Mg 濃度が低下したが, 反復拘束ストレスの影響は認められなかった。

### 皮膚の炎症

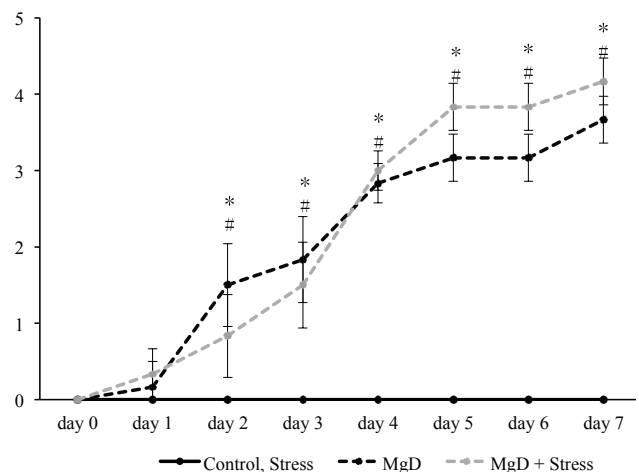
Mg 欠乏飼料給与が炎症に及ぼす影響を Figure 1 に示した。対照群では炎症が認められなかった。Mg 欠乏飼料

を給与した 2 群では, 試験開始 2 日目以降動物試験終了時までにおいて, 炎症が認められた。一方, 反復拘束ストレス単独では炎症を生じず, Mg 欠乏による炎症の発生に影響は及ぼさなかった。

### 低分子代謝物質の網羅的半定量分析およびクエン酸の定量分析

1 日目の尿において, 網羅的半定量分析により 77 成分の代謝物質が同定された。その中で, Mg 欠乏による減少が認められた代謝物質は 14 成分, Mg 欠乏による増加が認められた代謝物質は 1 成分, 反復拘束ストレスによる減少が認められた代謝物質は 3 成分であった。Mg 欠乏および反復拘束ストレスの組み合わせの影響を受けた代謝物質は 3 成分認められた。また, Mg 欠乏によりクエン酸の減少が認められた (Table 2)。

3 日目の尿において, 網羅的半定量分析により 99 成分の代謝物質が同定された。その中で, Mg 欠乏による減少が認められた代謝物質は 21 成分, Mg 欠乏による増加が認められた代謝物質は 7 成分であった。反復拘束ストレスによる減少が認められた代謝物質は 3 成分であった。Mg 欠乏および反復拘束ストレスの組み合わせの影響を受けた



**Figure 1** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on inflammation score in rats

Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. Inflammatory skin lesions were evaluated by the inflammatory score reported by Kotani et al<sup>17)</sup>. \*P < 0.05 for Control vs. MgD and for Control vs. MgD + Stress. No significant difference was detected in all time points for "MgD vs MgD + Stress" or "Control vs. Stress".

**Table 1** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on growth parameters and Mg concentrations of plasma and femur in rats.

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
Initial body weight (g)	119.7 ± 1.9	111.0 ± 3.9	123.2 ± 2.2	111.2 ± 2.9	NS	NS	NS
Body weight gain (g/d)	36.8 ± 1.9	38.2 ± 1.5	30. ± 0.9	37.5 ± 2.2	NS	NS	NS
Food intake (g/d)	19.2 ± 0.6	19.6 ± 0.6	19.6 ± 0.6	19.7 ± 0.4	NS	NS	NS
Plasma Mg (mg/L)	14.8 ± 0.3	2.9 ± 0.2	16.1 ± 0.4	2.3 ± 0.1	<0.01	NS	NS
Femur Mg (g/kg)	1.71 ± 0.06	0.80 ± 0.05	1.75 ± 0.05	0.77 ± 0.03	<0.01	NS	NS

Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restrained stress, NS: not significant (P ≥ 0.05).

**Table 2** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on excretion of urinary metabolites on day 1 in rats

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
Adipic acid	100 ± 28	65 ± 7	76 ± 13	49 ± 5	<0.05	NS	NS
Cytosine	100 ± 55	45 ± 14	130 ± 62	2 ± 1	<0.05	NS	NS
Citric acid*	279 ± 24	184 ± 28	257 ± 35	167 ± 63	<0.01	NS	NS
Fumaric acid	100 ± 36	37 ± 12	55 ± 9	24 ± 4	<0.05	NS	NS
Glutaric acid	100 ± 23	50 ± 9	79 ± 13	41 ± 7	<0.01	NS	NS
3-Hydroxyisovaleric acid	100 ± 21	29 ± 5	76 ± 9	20 ± 8	<0.01	NS	NS
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	100 ± 28	37 ± 13	68 ± 9	0 ± 0	<0.01	<0.05	NS
2-Ketoglutaric acid	100 ± 26	33 ± 11	72 ± 15	25 ± 7	<0.01	NS	NS
Malic acid	100 ± 34	44 ± 10	57 ± 9	27 ± 3	<0.05	NS	NS
2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	100 ± 27	46 ± 4	68 ± 9	36 ± 4	<0.01	NS	NS
Methylmalonic acid	100 ± 26	46 ± 5	76 ± 14	30 ± 5	<0.01	NS	NS
Mevalonic lactone	100 ± 29	64 ± 5	73 ± 9	34 ± 10	<0.05	NS	NS
N-Acetylserine	100 ± 36	57 ± 7	80 ± 12	36 ± 7	<0.05	NS	NS
Oxalic acid	100 ± 52	158 ± 27	67 ± 9	262 ± 87	<0.05	NS	NS
5-Oxoproline	100 ± 17 <sup>a</sup>	99 ± 11 <sup>a</sup>	103 ± 14 <sup>a</sup>	47 ± 9 <sup>b</sup>	<0.05	NS	<0.05
Uracil	100 ± 18	52 ± 10	63 ± 9	39 ± 9	<0.01	NS	NS
Uric acid	100 ± 39	104 ± 53	50 ± 16	7 ± 5	NS	<0.05	NS

Values except for citric acid are relative value as means of control is 100. \*The unit for citric acid is mmol. Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. NS: not significant (P ≥ 0.05). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test (P < 0.05)

**Table 3** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on excretion of urinary metabolites on day 3 in rats

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
Aconitic acid	100 ± 8	77 ± 7	87 ± 5	63 ± 7	<0.01	NS	NS
Allantoin	100 ± 7	60 ± 6	84 ± 10	55 ± 6	<0.01	NS	NS
Azelaic acid	100 ± 4	133 ± 11	94 ± 5	111 ± 15	<0.05	NS	NS
Citric acid*	299 ± 54	144 ± 23	318 ± 30	107 ± 21	<0.01	NS	NS
Dimethylglycine	100 ± 10	85 ± 9	143 ± 28	83 ± 15	<0.05	NS	NS
Fumaric acid	100 ± 5	57 ± 13	92 ± 12	40 ± 9	<0.01	NS	NS
Glutamic acid	100 ± 21	41 ± 12	58 ± 15	21 ± 6	<0.01	<0.05	NS
Glutaric acid	100 ± 8	66 ± 14	114 ± 16	43 ± 5	<0.01	NS	NS
Glycerol 3-phosphate	100 ± 5	112 ± 8	95 ± 11	130 ± 5	<0.01	NS	NS
Homogentisic acid	100 ± 9	243 ± 26	93 ± 13	234 ± 26	<0.01	NS	NS
Homovanillic acid	100 ± 9	124 ± 4	92 ± 6	104 ± 11	<0.05	NS	NS
3-Hydroxyanthranilic acid	100 ± 10	145 ± 11	92 ± 14	174 ± 8	<0.01	NS	NS
4-Hydroxybenzoic acid	100 ± 10	136 ± 5	85 ± 6	117 ± 13	<0.01	NS	NS
2-Hydroxyisobutyric acid	100 ± 13	77 ± 11	87 ± 12	62 ± 5	<0.05	NS	NS
3-Hydroxyisobutyric acid	100 ± 9	71 ± 10	84 ± 11	57 ± 5	<0.01	NS	NS
3-Hydroxyisovaleric acid	100 ± 13	71 ± 14	88 ± 11	47 ± 3	<0.01	NS	NS
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	100 ± 8	66 ± 14	83 ± 8	43 ± 7	<0.01	<0.05	NS
Isovalerylglycine	100 ± 10	76 ± 7	105 ± 8	77 ± 10	<0.01	NS	NS
2-Ketoglutaric acid	100 ± 14	30 ± 7	106 ± 17	18 ± 7	<0.01	NS	NS
Malic acid	100 ± 4	54 ± 11	90 ± 12	38 ± 8	<0.01	NS	NS
2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	100 ± 12	63 ± 10	84 ± 10	47 ± 5	<0.01	NS	NS
Methylsuccinic acid	100 ± 13	80 ± 6	88 ± 9	70 ± 6	<0.05	NS	NS
Mevalonic lactone	100 ± 16	66 ± 5	72 ± 11	38 ± 7	<0.01	<0.05	NS
N-Acetylaspartic acid	100 ± 9	60 ± 9	80 ± 11	49 ± 6	<0.01	NS	NS
N-Acetylserine	100 ± 10	66 ± 8	100 ± 20	43 ± 4	<0.01	NS	NS
Quinolinic acid	100 ± 11	145 ± 16	81 ± 19	125 ± 8	<0.01	NS	NS
Succinic acid	100 ± 17	44 ± 12	85 ± 20	46 ± 7	<0.01	NS	NS
Threonic acid	100 ± 10	85 ± 8	91 ± 7	69 ± 5	<0.05	NS	NS

Values except for citric acid are relative value as means of control is 100. \*The unit for citric acid is mmol. Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. NS: not significant (P ≥ 0.05).

代謝物質は3成分認められた。また、Mg欠乏によりクエン酸の減少が認められた (Table 3)。

5日目の尿において、網羅的半定量分析により77成分の代謝物質が同定された。その中で、Mg欠乏による減少が認められた代謝物質は27成分、Mg欠乏による増加が認められた代謝物質は2成分、反復拘束ストレスによる減少が認められた代謝物質は7成分であった。Mg欠乏および反復拘束ストレスの組み合わせの影響を受けた代謝物質は12成分認められた。また、Mg欠乏によりクエン酸の減少が認められた (Table 4)。

7日目の尿において、網羅的半定量分析により90成分の代謝物質が同定された。その中で、Mg欠乏による減少が認められた代謝物質は15成分、反復拘束ストレスによ

る減少が認められた代謝物質は14成分であった。Mg欠乏および反復拘束ストレスの組み合わせの影響を受けた代謝物質は4成分認められた。また、Mg欠乏によりクエン酸の減少が認められた (Table 5)。

#### 組み合わせの影響を受けた代謝物質のグループ分け

Mg欠乏と反復拘束ストレスの組み合わせの影響を受けた代謝物質の幾つかにおいて、受けた影響のパターンに基づき以下の3グループに分けた。

1) Mg欠乏と反復拘束ストレスの両方で減少するが組み合わせによる相乗的な減少は無し

1日目は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸が認められた。3日目は、グルタミン酸、3-ヒドロキシ-3-メチルグル

**Table 4** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on excretion of urinary metabolites on day 5 in rats.

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
Aconitic acid	100 ± 4 <sup>a</sup>	99 ± 10 <sup>a</sup>	108 ± 7 <sup>a</sup>	62 ± 10 <sup>b</sup>	<0.05	NS	<0.05
Adipic acid	100 ± 12	76 ± 8	108 ± 21	58 ± 8	<0.05	NS	NS
Allantoin	100 ± 29	14 ± 3	58 ± 25	6 ± 3	<0.01	NS	NS
Aspartic acid	100 ± 3 <sup>a</sup>	98 ± 12 <sup>a</sup>	99 ± 5 <sup>a</sup>	58 ± 12 <sup>b</sup>	<0.05	<0.05	<0.05
Citric acid*	326 ± 13	159 ± 20	360 ± 47	123 ± 20	<0.01	NS	NS
Fumaric acid	100 ± 7	65 ± 13	107 ± 15	40 ± 10	<0.01	NS	NS
Glucono-1,4-lactone	100 ± 5 <sup>ab</sup>	113 ± 13 <sup>a</sup>	99 ± 10 <sup>ab</sup>	70 ± 13 <sup>b</sup>	NS	<0.05	<0.05
Glutaric acid	100 ± 12	64 ± 8	132 ± 18	45 ± 8	<0.01	NS	NS
Glyceric acid	100 ± 11	85 ± 7	109 ± 12	74 ± 7	<0.05	NS	NS
Glycerol 3-phosphate	100 ± 6 <sup>b</sup>	161 ± 19 <sup>a</sup>	102 ± 11 <sup>b</sup>	109 ± 19 <sup>b</sup>	<0.05	NS	<0.05
Hippuric acid	100 ± 21 <sup>ab</sup>	133 ± 12 <sup>a</sup>	90 ± 12 <sup>b</sup>	74 ± 13 <sup>b</sup>	NS	<0.01	<0.01
3-Hydroxybutyric acid	100 ± 15	66 ± 9	104 ± 14	47 ± 10	<0.01	NS	NS
2-Hydroxyisobutyric acid	100 ± 6	76 ± 10	95 ± 8	59 ± 10	<0.01	NS	NS
2-Hydroxyisovaleric acid	100 ± 9	34 ± 10	96 ± 6	24 ± 10	<0.01	NS	NS
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	100 ± 9	88 ± 16	99 ± 11	45 ± 9	<0.01	NS	NS
Indol-3-acetic acid	100 ± 22 <sup>ab</sup>	98 ± 8 <sup>ab</sup>	142 ± 35 <sup>a</sup>	52 ± 8 <sup>b</sup>	<0.05	NS	<0.05
Inositol	100 ± 6 <sup>ab</sup>	112 ± 14 <sup>a</sup>	104 ± 3 <sup>a</sup>	64 ± 14 <sup>b</sup>	NS	<0.05	<0.05
Isovalerylglycine	100 ± 3 <sup>ab</sup>	94 ± 10 <sup>ab</sup>	127 ± 18 <sup>a</sup>	52 ± 10 <sup>b</sup>	<0.01	NS	<0.01
2-Ketoglutaric acid	100 ± 12	33 ± 10	120 ± 22	25 ± 10	<0.01	NS	NS
Kynurenic acid	100 ± 9	69 ± 12	82 ± 5	38 ± 12	<0.01	<0.05	NS
Malic acid	100 ± 7	65 ± 14	103 ± 15	39 ± 10	<0.01	NS	NS
Mesaconic acid	100 ± 6	89 ± 10	114 ± 11	69 ± 14	<0.05	NS	NS
<i>meso</i> -Erythritol	100 ± 7 <sup>ab</sup>	116 ± 11 <sup>a</sup>	88 ± 7 <sup>ab</sup>	64 ± 11 <sup>b</sup>	NS	<0.01	<0.05
2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	100 ± 7	52 ± 9	85 ± 5	34 ± 7	<0.01	NS	NS
Methylmalonic acid	100 ± 11 <sup>a</sup>	75 ± 11 <sup>ab</sup>	116 ± 15 <sup>a</sup>	39 ± 9 <sup>b</sup>	<0.01	NS	<0.05
Methylsuccinic acid	100 ± 13	72 ± 3	101 ± 19	57 ± 9	<0.01	NS	NS
Mevalonic lactone	100 ± 11	84 ± 16	94 ± 7	50 ± 7	<0.05	NS	NS
<i>N</i> -Acetylaspartic acid	100 ± 5	82 ± 10	93 ± 8	56 ± 10	<0.01	NS	NS
Oxalic acid	100 ± 18	418 ± 55	77 ± 17	393 ± 55	<0.01	NS	NS
5-Oxoproline	100 ± 11	78 ± 12	101 ± 9	40 ± 11	<0.01	NS	NS
Pantothenic acid	100 ± 10 <sup>a</sup>	92 ± 7 <sup>ab</sup>	108 ± 6 <sup>a</sup>	60 ± 10 <sup>b</sup>	<0.01	NS	<0.05
Ribose 5-phosphate	100 ± 7	122 ± 14	93 ± 7	78 ± 15	NS	<0.05	NS
Succinic acid	100 ± 15	51 ± 6	98 ± 14	42 ± 6	<0.01	NS	NS
Threonic acid	100 ± 6	98 ± 8	101 ± 5	65 ± 8	<0.01	NS	NS
Thymidine	100 ± 40	35 ± 5	55 ± 8	26 ± 9	<0.05	NS	NS

Values except for citric acid are relative value as means of control is 100. \*The unit for citric acid is mmol. Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. NS: not significant (P ≥ 0.05). Mean values with different letters in the same line were significantly different by Tukey test (P < 0.05).

**Table 5** Effect of Mg deficiency and repeated restraint stress on excretion of urinary metabolites on day 7 in rats

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
<i>N</i> <sup>6</sup> -Acetyllysine	100 ± 12	65 ± 14	74 ± 15	28 ± 5	<0.01	<0.05	NS
<i>N</i> -Acetylglutamine	100 ± 11	64 ± 14	77 ± 16	28 ± 4	<0.01	<0.05	NS
<i>N</i> -Acetylserine	100 ± 15	60 ± 14	80 ± 18	24 ± 6	<0.01	NS	NS
Aconitic acid	100 ± 14	76 ± 12	85 ± 16	42 ± 8	<0.05	NS	NS
Adenosine	100 ± 12	115 ± 23	85 ± 15	59 ± 13	NS	<0.05	NS
Adipic acid	100 ± 19	50 ± 8	81 ± 24	31 ± 6	<0.01	NS	NS
Alanine	100 ± 33	49 ± 17	29 ± 9	26 ± 8	NS	<0.05	NS
Ascorbic acid	100 ± 10	68 ± 13	101 ± 20	37 ± 5	<0.01	NS	NS
Aspartic acid	100 ± 17	71 ± 13	66 ± 13	40 ± 10	NS	<0.05	NS
Azelaic acid	100 ± 17	55 ± 9	71 ± 15	30 ± 7	NS	<0.05	NS
Citramalic acid	100 ± 14	80 ± 13	75 ± 13	51 ± 12	NS	<0.05	NS
Citric acid*	340 ± 19	204 ± 11	285 ± 26	167 ± 21	<0.01	NS	NS
Fumaric acid	100 ± 19	63 ± 12	90 ± 24	32 ± 7	<0.05	NS	NS
Gluconic acid	100 ± 13	67 ± 15	78 ± 17	30 ± 5	<0.01	<0.05	NS
Glutaric acid	100 ± 16	64 ± 16	120 ± 40	28 ± 6	<0.05	NS	NS
Glycerol 2-phosphate	100 ± 13	136 ± 29	86 ± 16	65 ± 13	NS	<0.05	NS
Glycerol 3-phosphate	100 ± 11	161 ± 28	89 ± 16	88 ± 16	NS	<0.05	NS
Glycine	100 ± 16	27 ± 11	47 ± 16	10 ± 3	<0.01	<0.05	NS
Hippuric acid	100 ± 17	93 ± 16	77 ± 15	49 ± 11	NS	<0.05	NS
3-Hydroxyisobutyric acid	100 ± 17	62 ± 12	70 ± 12	30 ± 7	NS	<0.05	NS
3-Hydroxyisovaleric acid	100 ± 20	48 ± 17	74 ± 12	17 ± 6	<0.01	NS	NS
3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	100 ± 16	69 ± 16	85 ± 23	36 ± 10	<0.05	NS	NS
Inositol	100 ± 16	82 ± 15	83 ± 16	41 ± 8	<0.05	NS	NS
Isobutyrylglycine	100 ± 14	85 ± 17	67 ± 10	43 ± 11	NS	<0.05	NS
Isovalerylglycine	100 ± 14	81 ± 15	115 ± 26	49 ± 12	<0.05	NS	NS
Malic acid	100 ± 18	62 ± 12	89 ± 25	33 ± 8	<0.05	NS	NS

Values except for citric acid are relative value as means of control is 100. \*The unit for citric acid is mmol. Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. NS: not significant (P ≥ 0.05).

Table 5 (continued)

	Control	MgD	Stress	MgD + Stress	P value		
					MgD	Stress	MgD × Stress
<i>meso</i> -Erythritol	100 ± 14	90 ± 17	72 ± 13	43 ± 11	NS	<0.05	NS
3-Methyladipic acid	100 ± 17	57 ± 11	71 ± 15	37 ± 6	<0.01	<0.05	NS
3-Methylglutaric acid	100 ± 15	64 ± 11	76 ± 14	33 ± 6	<0.01	<0.05	NS
7-Methylguanaine	100 ± 17	73 ± 14	65 ± 12	37 ± 9	NS	<0.05	NS
2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	100 ± 17	39 ± 6	57 ± 9	21 ± 7	<0.01	NS	NS
Methylmalonic acid	100 ± 18	83 ± 22	82 ± 14	26 ± 9	<0.05	<0.05	NS
Methylsuccinic acid	100 ± 16	57 ± 10	84 ± 20	35 ± 8	<0.01	NS	NS
Mevalonic lactone	100 ± 23	74 ± 15	68 ± 12	40 ± 10	NS	<0.05	NS
Oxalic acid	100 ± 22	75 ± 22	82 ± 15	16 ± 8	<0.05	<0.05	NS
5-Oxoproline	100 ± 16	91 ± 21	78 ± 17	36 ± 8	NS	<0.05	NS
Pantothenic acid	100 ± 16	62 ± 12	96 ± 20	36 ± 6	<0.01	NS	NS
3-Phenyllactic acid	100 ± 24	193 ± 57	78 ± 16	45 ± 7	NS	<0.05	NS
Pimelic acid	100 ± 15	51 ± 8	70 ± 13	31 ± 7	<0.01	<0.05	NS
Suberic acid	100 ± 16	42 ± 6	70 ± 14	23 ± 4	NS	<0.05	NS
Succinic acid	100 ± 19	62 ± 15	66 ± 14	31 ± 7	<0.05	<0.05	NS
Threonic acid	100 ± 14	79 ± 13	76 ± 13	47 ± 10	NS	<0.05	NS
Xanthine	100 ± 22	50 ± 10	49 ± 13	28 ± 10	<0.05	<0.05	NS

Values are relative value as means of control is 100. Values are means with their standard errors (n = 6). MgD: magnesium deficiency, Stress: repeated restraint stress. NS: not significant (P ≥ 0.05).

タル酸およびメバロン酸ラクトンが認められた。5日目は認められなかった。7日目は、N6-アセチルリジン、N-アセチルグルタミン、グルコン酸、グリシン、3-メチルアジピン酸、3-メチルグルタル酸、メチルマロン酸、シュウ酸、ピメリン酸、コハク酸およびキサントニンが認められた。

2) Mg 欠乏と反復拘束ストレスの各単独では影響が認められないが組み合わせた場合に減少

1日目は、5-オキソプロリンが認められた。3日目は認められなかった。5日目は、アコニット酸、アスパラギン酸、メチルマロン酸およびパントテン酸が認められた。7日目は認められなかった。

3) Mg 欠乏による増加を反復拘束ストレスが打ち消す

5日目に、グリセロール3リン酸が認められたのみであった。

### パスウェイ解析

Mg 欠乏の影響が推定された代謝経路は、1日目は4経路（クエン酸回路、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝、アルギニン生合成、D-グルタミンおよびD-グルタミン酸代謝）、3日目は7経路（アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝、クエン酸回路、アルギニン生合成、ブタン酸代謝、D-グルタミンおよびD-グルタミン酸代謝、グリオキシル酸およびジカルボン酸代謝、チロシン代謝）、5日目は5経路（アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝、クエン酸回路、アルギニン生合成、ブタン酸代謝、グリセロ脂質代謝）、7日目は2経路（クエン酸回路、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝）であり、全てに共通してクエン酸回路が推定された。そこで、クエン酸回路を推定した代謝物質を各時期で確認したところ、各時期共通でクエン酸およびフマル酸の減少が認められた（1日目：クエン酸、フマル酸および2-ケトグルタル酸、3日目：クエン酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、コハク酸、アコニット酸、5日目：クエン酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、コハク酸、7日目：クエン酸、フマル酸、コハク酸、アコニット酸）。

反復拘束ストレスの影響が認められた代謝物質を用いたパスウェイ解析から推定された代謝経路は、7日目の2経路（アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝、アミノアシル tRNA 生合成）のみであった。アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝における推定の根拠物質は、アスパラギン酸、アラニンおよびコハク酸であった。

Mg 欠乏および反復拘束ストレスの組み合わせの影響が認められた代謝物質を用いたパスウェイ解析から推定された代謝経路は、5日目において1経路（パントテン酸およびCoA 生合成）のみであった。

### 考 察

Mg 欠乏は、パスウェイ解析において様々な代謝経路に

影響を及ぼしたことが推定された。その中でも、クエン酸回路は各時期に共通して推定された。推定に用いられた代謝物質を確認したところ、各時期共通でクエン酸およびフマル酸の減少が認められた。これらの減少は、Mg 欠乏飼料給与期間やサンプルの種類が異なるものの、ラットにMg 欠乏食を8週間給餌したときの肝臓メタボローム解析においてクエン酸およびフマル酸の減少が認められたことと一致する<sup>15)</sup>。Mg は、様々な酵素の補酵素として働くが、クエン酸回路にある酵素の補酵素となる知見は認められていない。クエン酸回路の上流にある解糖系のMg 要求性の酵素の活性低下が、クエン酸の生成量の減少をもたらし、結果としてクエン酸回路の中間代謝産物であるフマル酸をも減少させた可能性は考えられる。先行研究で示された肝臓<sup>15)</sup>以外にも関与する組織があるのか、また欠乏の程度や期間との関係はあるのかも含めて、今後の検討課題である。

Mg 欠乏誘導性の炎症は、先行研究<sup>17)</sup>と同様に経時的な増加が認められた。本研究では、この増加と類似した変動、具体的には経時的に対照群との差が増大するような代謝物質は認められなかったため、Mg 欠乏誘導性の炎症と直接関連する代謝物質は認められなかったことが示唆された。

反復拘束ストレスが影響を及ぼす代謝経路として、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝が推定された。その推定根拠は、アラニンおよびアスパラギン酸およびコハク酸の減少であった。一方、ラットにおける異なるストレスモデル（運動強制、過密、拘束および騒音）の尿メタボローム解析のパスウェイ解析において、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝がストレスの影響を受けた代謝経路であると推定されたが、その推定根拠は、2-ケトグルタル酸の減少とフマル酸の増加であった<sup>21)</sup>。すなわち、両研究において、共通の代謝経路が推定されている一方で、推定根拠となる物質の変化が異なることを示唆している。様々なストレスと本代謝経路の研究の関係は、著者が知る限り詳細な研究は行われていないことから、更なる研究を行う価値があるかもしれない。

Mg 欠乏と反復拘束ストレスの組み合わせは、結果に示した通り、次の3グループに分けた。1) Mg 欠乏と反復拘束ストレスの両方で減少するが組み合わせによる相乗的な減少は無し、2) Mg 欠乏と反復拘束ストレスの各単独では影響が認められないが組み合わせた場合に減少、3) Mg 欠乏による増加を反復拘束ストレスが打ち消す、以上である。これら代謝物質の中には、幾つかの栄養素やそれらの代謝物質が認められた。たとえば、ビタミンであるパントテン酸（5日目、グループ2）、必須アミノ酸であるトリプトファン代謝物質のキヌレン酸（5日目、グループ1）、必須アミノ酸であるロイシンの代謝物質である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸（1および3日目、グループ1）などが挙げられる。したがって、Mg 欠乏と反復拘束ストレスの組み合わせはこれら栄養素代謝に関与すること

を示唆しているかもしれない。一方で、Mg 欠乏で認められたクエン酸やフマル酸とは異なり、全期間に共通して変動を示す代謝物質が認められなかったことは、今回の組み合わせは安定した代謝変化を誘導しなかったことが推測される。

Mg 欠乏が HPA 軸を活性化させたことと関連するの  
か、慢性拘束ストレスによる HPA 軸の活性化と相加効果  
や相乗効果があるのか確認することは今後の研究課題である。HPA 軸にある糖質コルチコイドは、脂質代謝や糖代謝など様々な栄養素の代謝に関与することから<sup>19)</sup>、糖質コルチコイドの投与が及ぼす代謝変化との詳細な比較は有用かもしれない。糖質コルチコイドの投与が尿メタボロームに及ぼす影響は、今回著者らが用いた夾雑物との分離や感度に優れる GC-MS/MS の MRM モードを用いたメタボロミクスのシステムでは報告されていないことから、今後検討する予定である。

以上より、尿のメタボローム解析から Mg 欠乏、反復拘束ストレスおよびこれらの組み合わせが及ぼす影響の探索を行い、各処理と関連した幾つかの代謝物質を抽出することができた。今後、特に組み合わせについて更なる研究を行う意義があることが示唆された。

## 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。

## 参考文献

- 1) Kolte D, Vijayaraghavan K, Khera S, Sica DA, Frishman WH (2014) Role of magnesium in cardiovascular diseases. *Cardiol Rev.* 22: 182-192.
- 2) Gröber U, Schmidt J, Kisters K (2015) Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients.* 7(9): 8199-8226.
- 3) Hata A, Doi Y, Ninomiya T, Mukai N, Hirakawa Y, Hata J, Ozawa M, Uchida K, Shirota T, Kitazono T, Kiyohara Y (2013) Magnesium intake decreases type 2 diabetes risk through the improvement of insulin resistance and inflammation: the Hisayama study. *Diabet Med.* 30(12): 1487-1494.
- 4) Kostov K, Halacheva L. *Int J Mol Sci* (2018) Role of magnesium deficiency in promoting atherosclerosis, endothelial dysfunction, and arterial stiffening as risk factors for hypertension. *Int J Mol Sci.* 19(6): 1724.
- 5) Liu MY, Li N, Li WA, Khan H (2017) Association between psychosocial stress and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Res.* 39(6): 573-580.
- 6) Fang X, Han H, Li M, Liang C, Fan Z, Aaseth J,

- He J, Montgomery S, Cao Y. (2016) Dose-response relationship between dietary magnesium intake and risk of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-regression analysis of prospective cohort studies. *Nutrients.* 8(11): 739.
- 7) Hackett RA, Steptoe A (2017) Type 2 diabetes mellitus and psychological stress—a modifiable risk factor. *Nat Rev Endocrinol.* 13(9): 547-560.
- 8) Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, Mao MA, Srivali N, Ungprasert P, Varothai N, Sanguankee A, Kittanamongkolchai W, Erickson SB (2015) Hypomagnesaemia linked to depression: a systematic review and meta-analysis. *Intern Med J.* 45(4): 436-440.
- 9) Hammen C (2018) Risk factors for depression: An autobiographical review. *Annu Rev Clin Psychol.* 14: 1-28.
- 10) Sartori SB, Whittle N, Hetzenauer A, Singewald N (2012) Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology.* 62(1): 304-312.
- 11) Yang XH, Song SQ, and Xu Y (2017) Resveratrol ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior: involvement of the HPA axis, inflammatory markers, BDNF, and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 13: 2727-2736.
- 12) Zhao J, Niu C, Wang J, Yang H, Du Y, Wei L, and Li C (2018) The depressive-like behaviors of chronic unpredictable mild stress-treated mice, ameliorated by Tibetan medicine Zuotai: involvement in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis pathway. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 14: 129-141.
- 13) Guia RM, Rose AJ, Herzig S (2014) Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 19(2): 117-128.
- 14) Cuciureanu MD, Vink R. In: Vink R, Nechifor M (2011) Magnesium and stress. *Magnesium in the Central Nervous System* [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press.
- 15) Shigematsu M, Nakagawa R, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T (2016) Fluctuations in metabolite content in the liver of magnesium-deficient rats. *Br J Nutr.* 116: 1694-1699.
- 16) Servatius RJ, Salameh G, Coyle KM, Paré WP (2007) Restraint Stress. *Encyclopedia of Stress.* 389-390.
- 17) Kotani M, Kim KH, Ishizaki N, Funaba M, Matsui T (2013) Magnesium and calcium deficiencies additively increase zinc concentrations and metallothionein expression in the rat liver. *Br J Nutr.* 109(3): 425-432.



- 18) Goto T, Mori H, Shiota S, Tomonaga S (2019) Metabolomics Approach Reveals the Effects of Breed and Feed on the Composition of Chicken Eggs. *Metabolites*. 9(10): 224.
- 19) Tsugawa H, Kanazawa M, Ogiwara A, Arita M (2014) MRMPROBS suite for metabolomics using large-scale MRM assays. *Bioinformatics*. 30(16): 2379-2380.
- 20) Pang Z, Chong J, Zhou G, Anderson D de Morais L, Chang L, Barrette M, Gauthier C, Jacques PE, Li S, Xia J (2021) MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*. 49(1): 388-396.
- 21) Shao C, Ren Y, Wang Z, Kang C, Jiang H, Chi A (2017) Detection of urine metabolites in a rat model of chronic fatigue syndrome before and after exercise. *Biomed Res Int*. 2017: 1-12.