

ウシのルーメン よもやま話

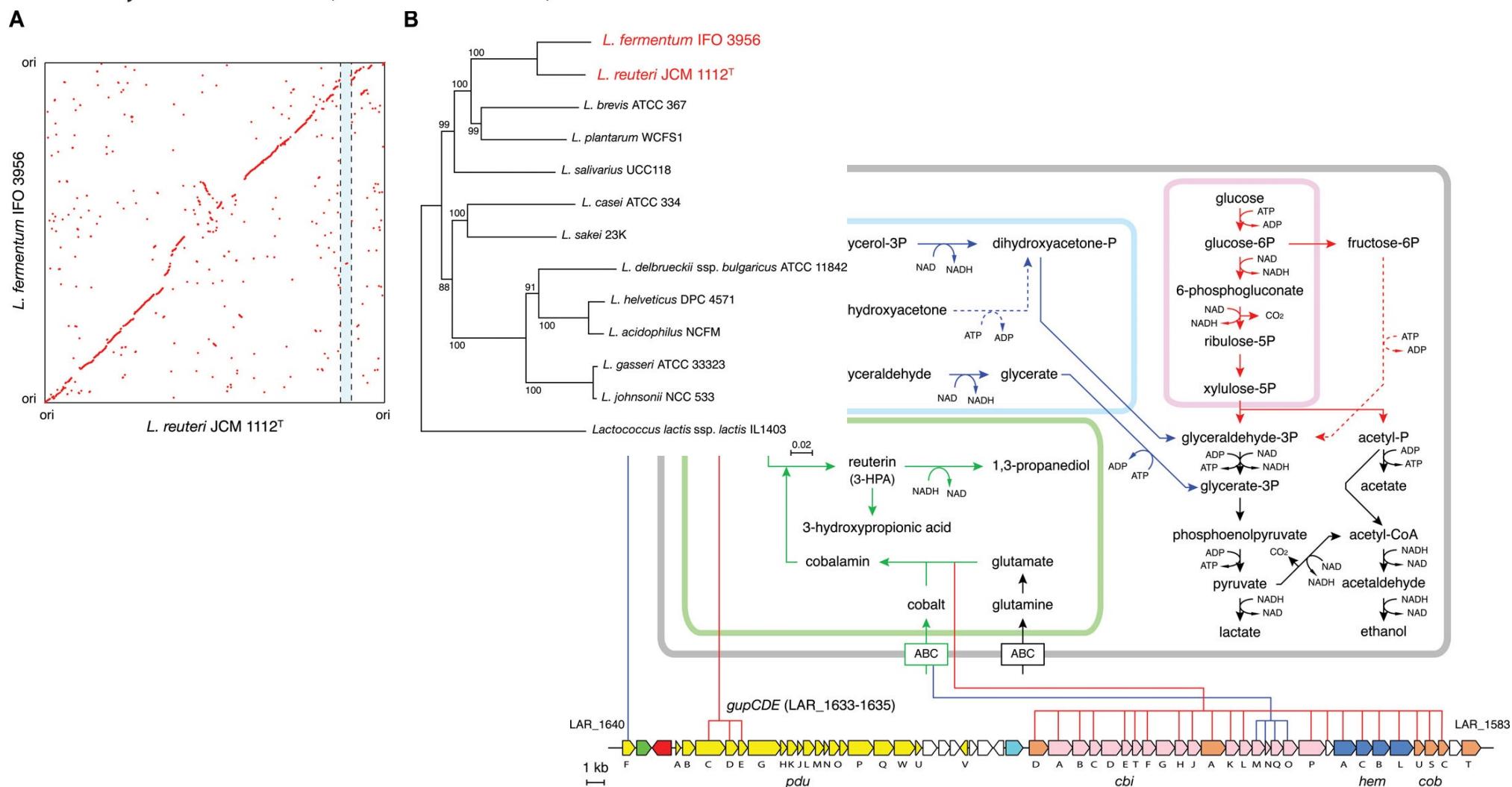
麻布大学獣医学部栄養学研究室
鈴木武人

本日のトピックス

- ・ウシの栄養と揮発性脂肪酸（VFA）
GCによる第一胃液中のVFA測定
- ・VFAの微量分析の必要性
GC-MSによる血中、糞便中VFA測定
- ・短鎖脂肪酸と体内時計

Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production

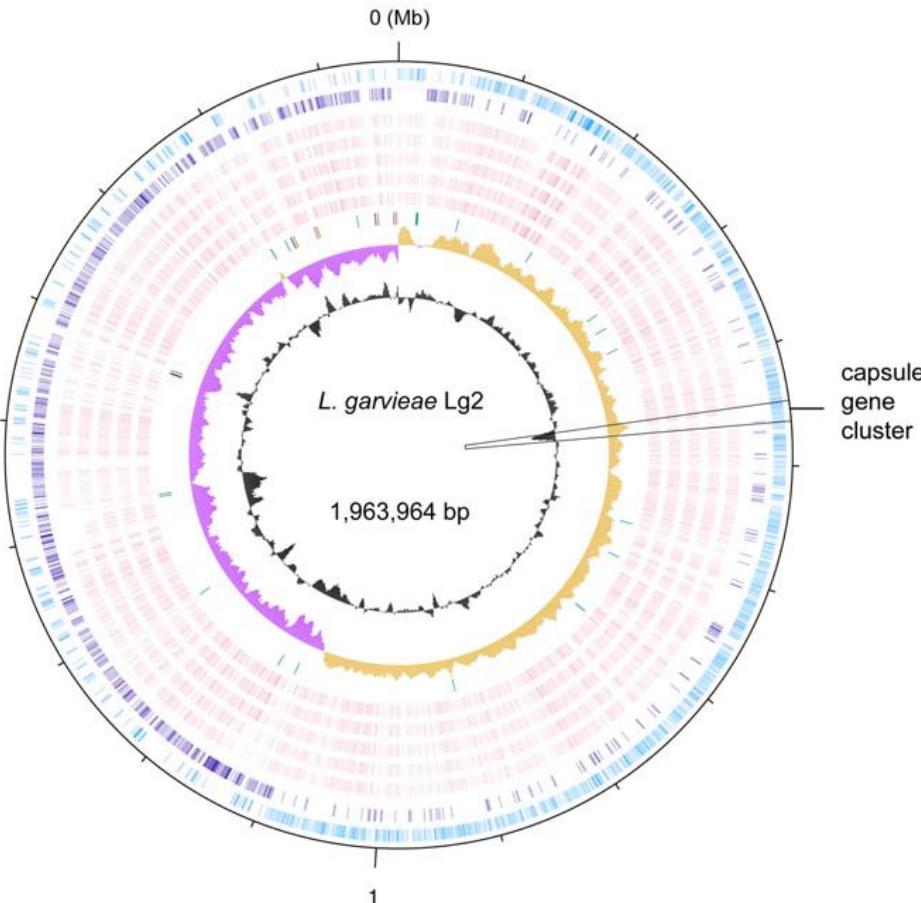
Hidetoshi MORITA^{1,*}, Hidehiro TOH^{2,3}, Shinji FUKUDA^{4,5}, Hiroshi HORIKAWA¹, Kenshiro OSHIMA³, Takehito SUZUKI¹, Masaru MURAKAMI¹, Shin HISAMATSU⁶, Yukio KATO¹, Tatsuya TAKIZAWA¹, Hideo FUKUOKA¹, Tetsuhiko YOSHIMURA⁷, Kikuji ITOH⁸, Daniel J. O'SULLIVAN⁹, Larry L. MCKAY⁹, Hiroshi OHNO^{4,5}, Jun KIKUCHI^{5,10,11}, Toshio MASAOKA¹, and Masahira HATTORI^{2,12}



Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae*

Hidetoshi Morita¹*, Hidehiro Toh²†, Kenshiro Oshima³, Mariko Yoshizaki³, Michiko Kawanishi⁴, Kohei Nakaya¹, Takehito Suzuki¹, Eiji Miyauchi⁵, Yasuo Ishii¹, Soichi Tanabe⁵, Masaru Murakami¹, Masahira Hattori^{3*}

1 School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa, Japan, **2** Planning Office for the Center for Computational and Quantitative Life Science, RIKEN, Yokohama, Kanagawa, Japan, **3** Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashiwa, Chiba, Japan, **4** National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kokubunji, Tokyo, Japan, **5** Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima, Japan

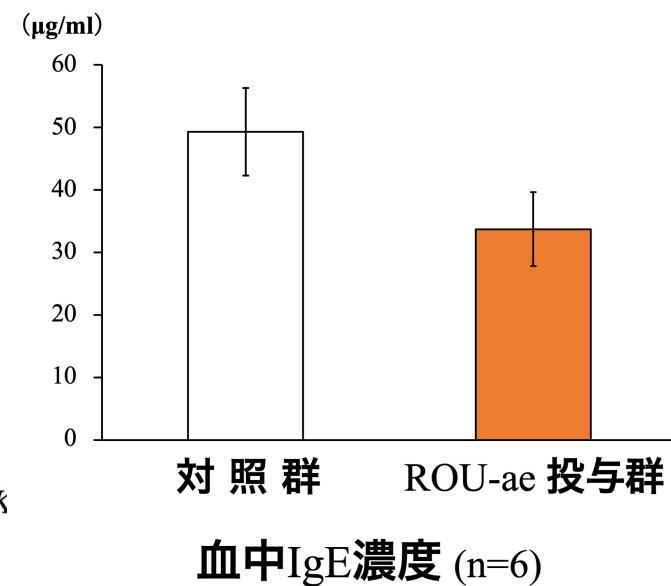


Original Paper

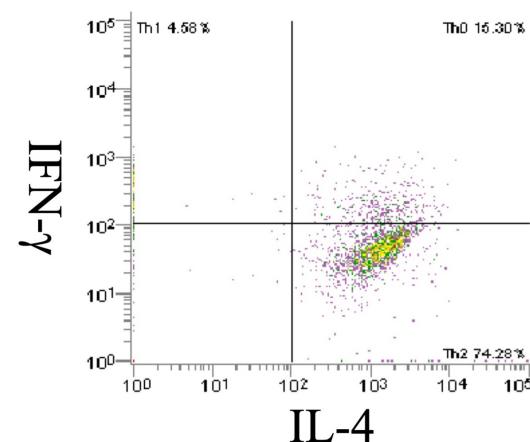
Protective effects of aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* on atopic dermatitis in NC/Nga mice

Takehito SUZUKI*, Yukiko KATO, Arisa KOBAYASHI, and Kurumi SUZUKI

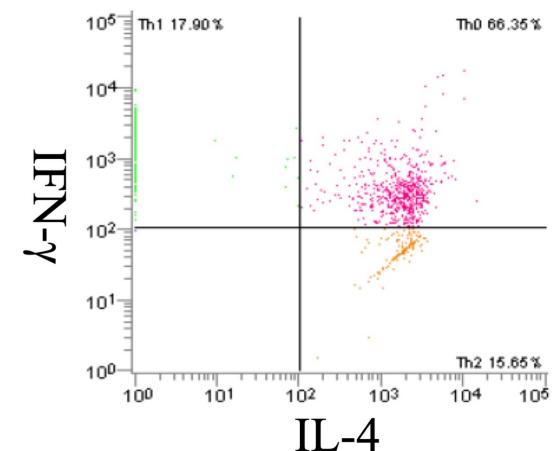
School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71, Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, K



ヘルパーT細胞サブセット解析



対照群



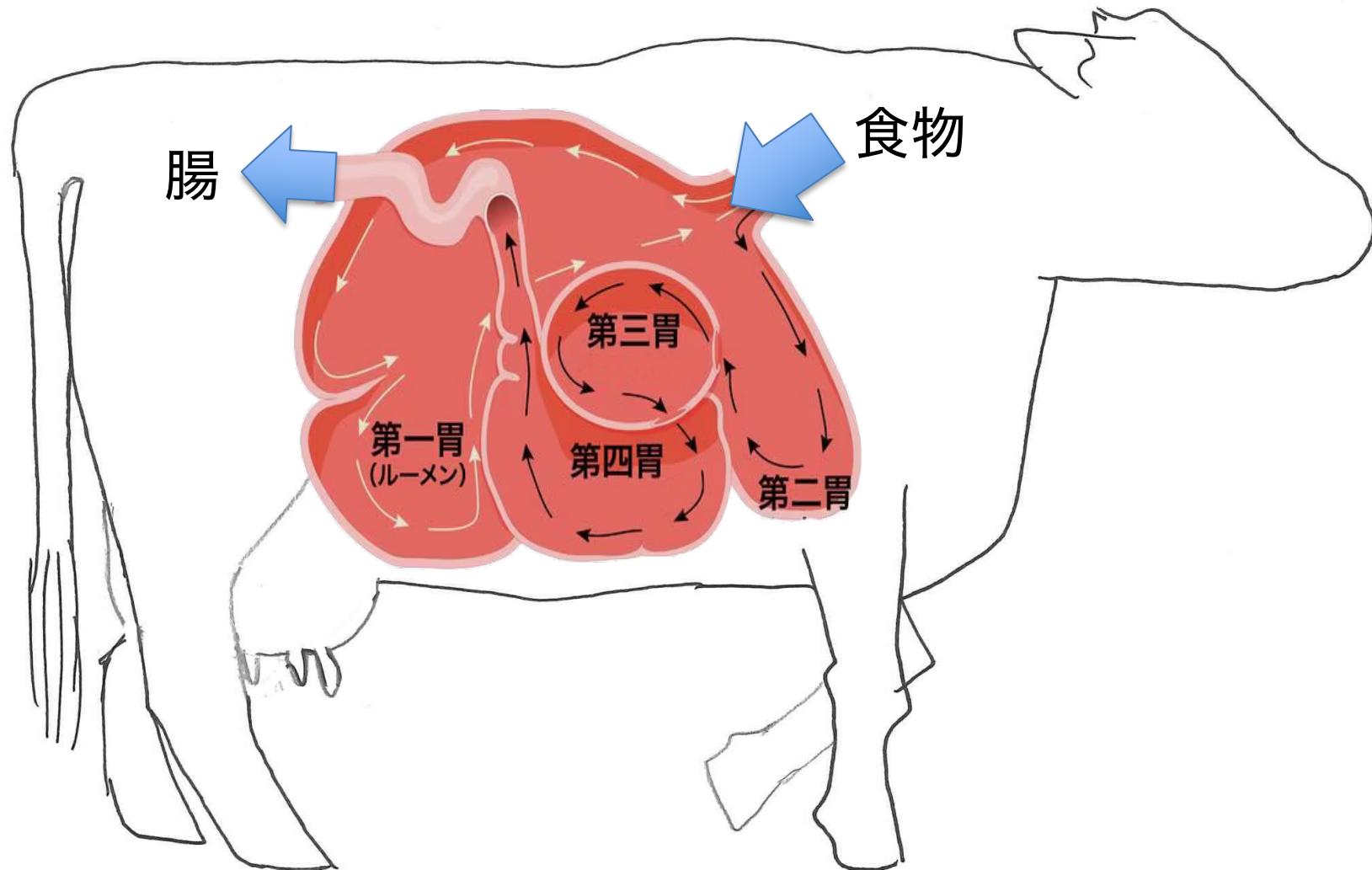
ROU-ae 投与群

ウシの栄養と揮発性脂肪酸

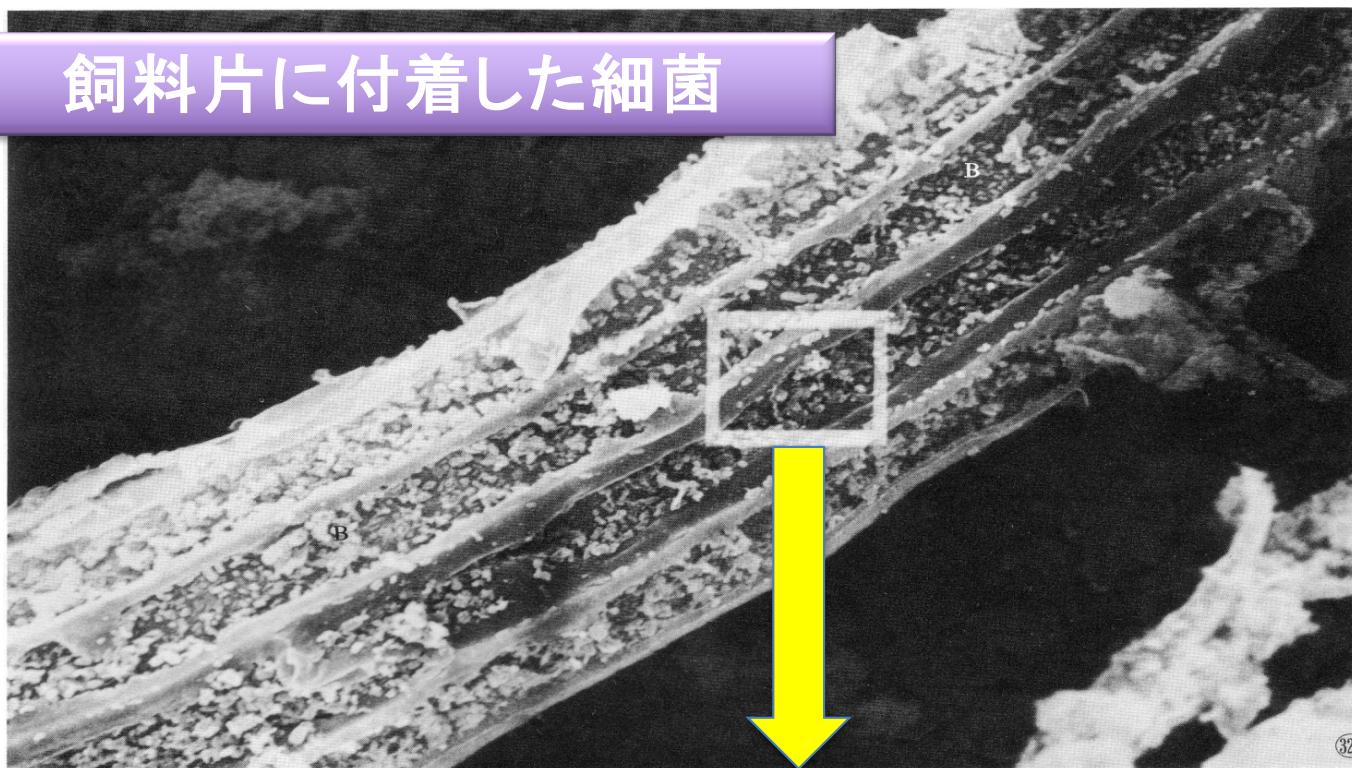
なぜウシの栄養では揮発性脂肪酸が重要なのか？

揮発性脂肪酸：volatile fatty acid
ウシの第一胃（ルーメン）で
微生物によって產生される
酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸
などの短鎖脂肪酸

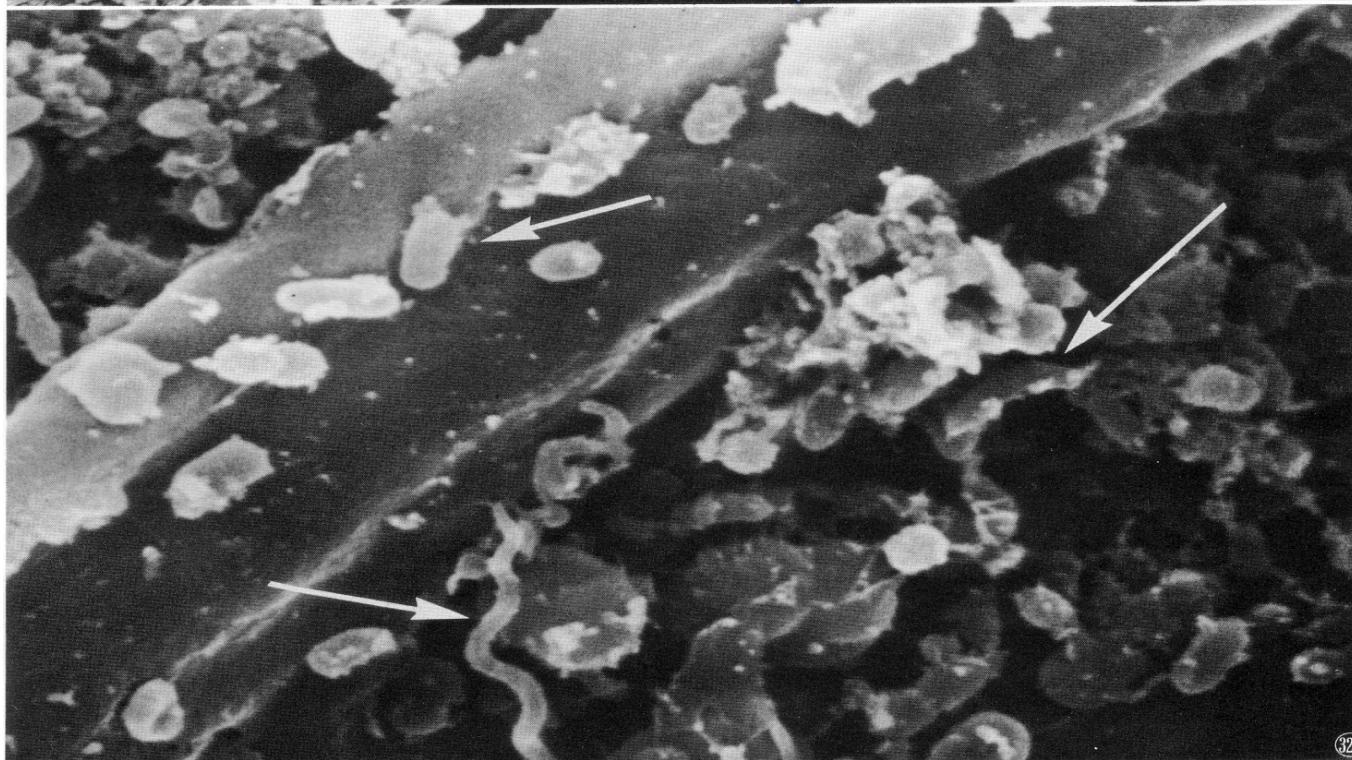




飼料片に付着した細菌

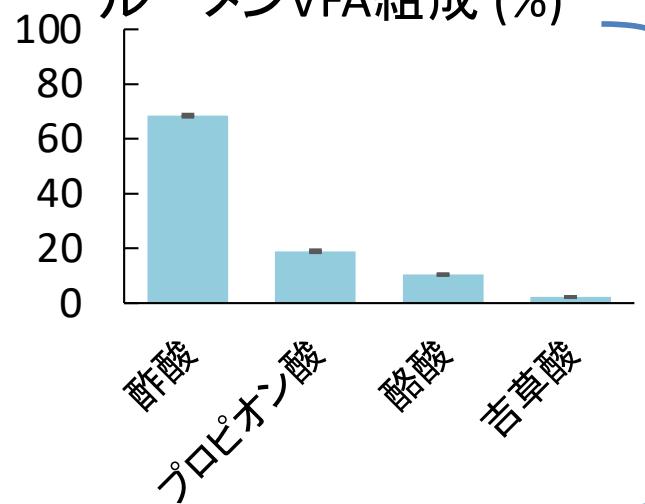
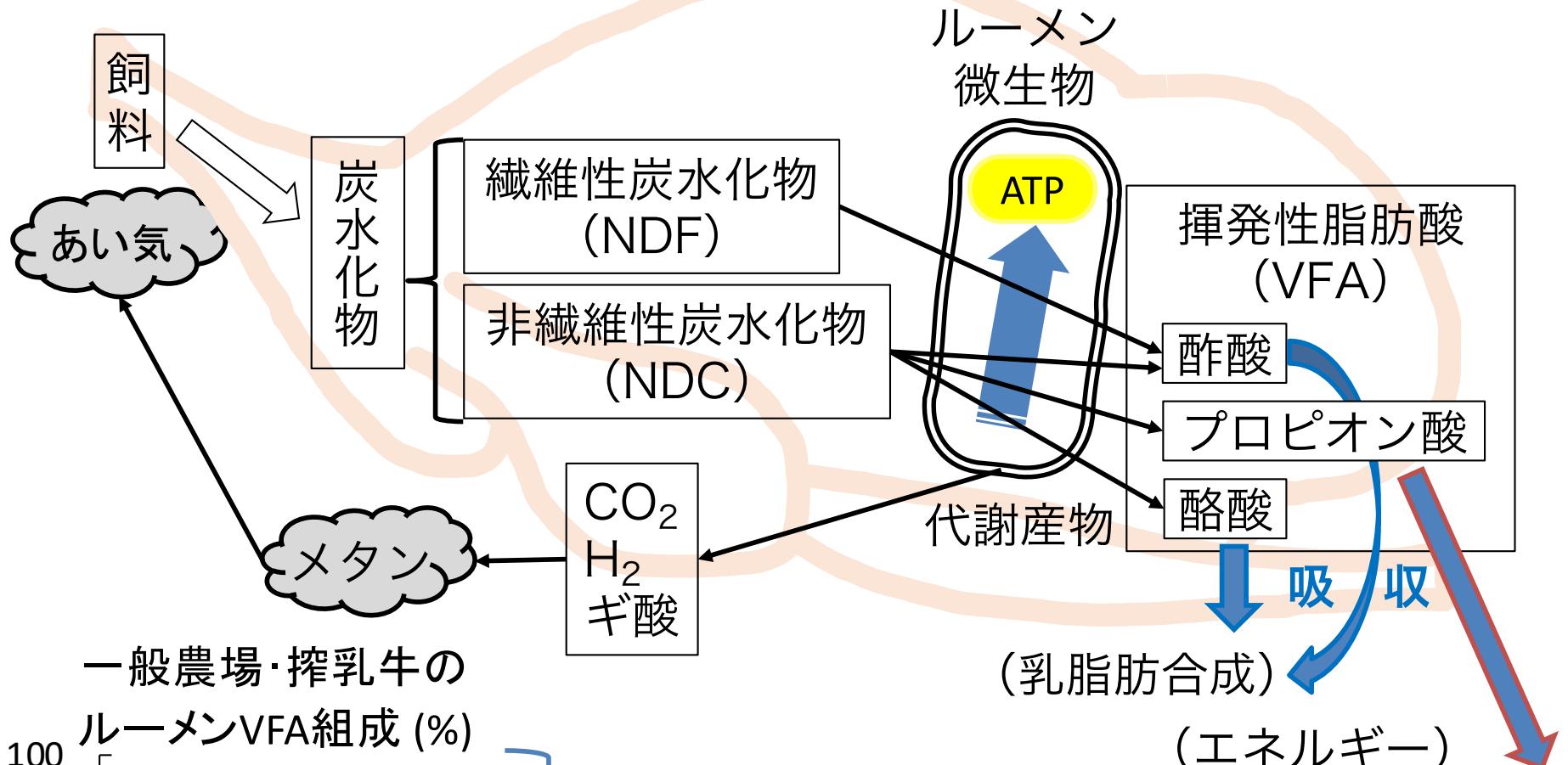


× 1,500



× 15,000

ルーメンでの炭水化物の代謝



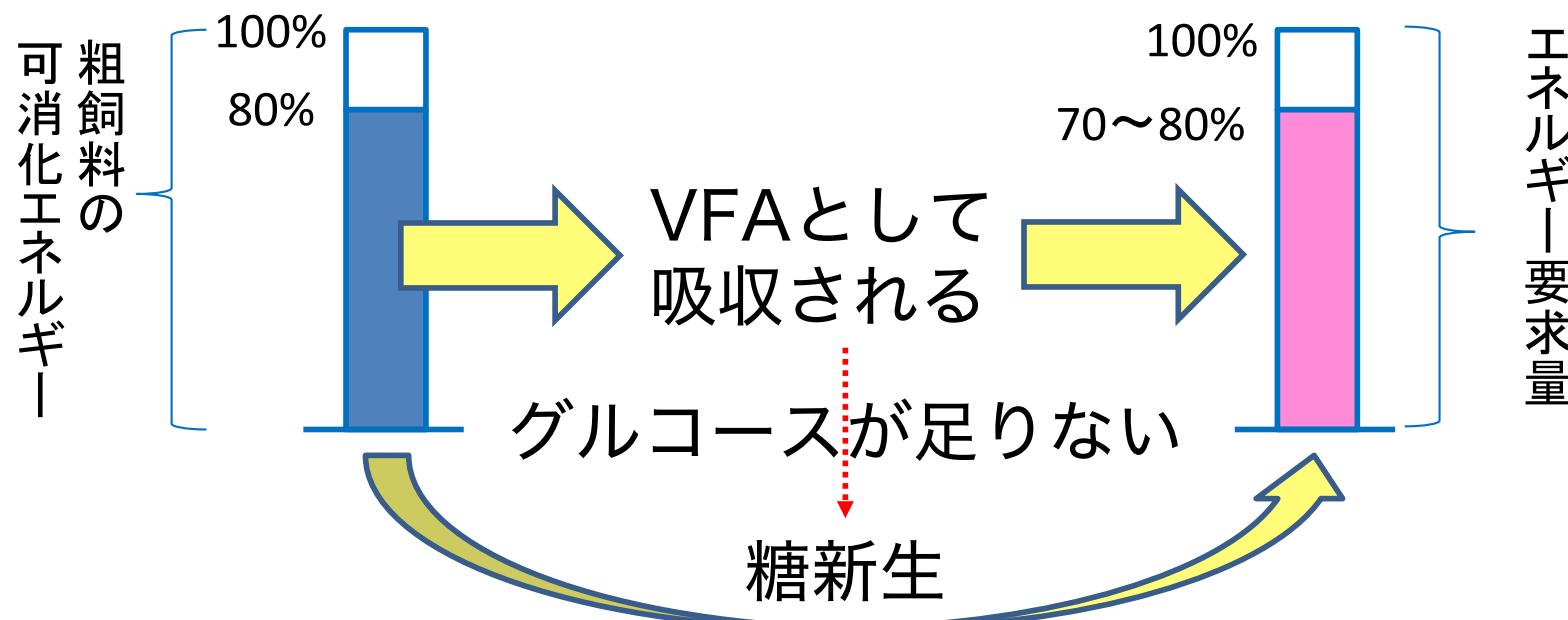
粗飼料多い
・・・酢酸の比率↑

濃厚飼料多い
・・・プロピオン酸↑
(炭水化物)
酪酸↑
(タンパク質)

VFAはウシにとって
重要な栄養素

ウシの栄養学的特徴
草食という食性に合わせた
特異な消化システム
(ルーメンでの難消化性
炭水化物の微生物発酵)

主要なエネルギー源はVFA



HPLCによる有機酸分析を応用したVFA測定

【陽イオン交換樹脂カラムによるイオン排除モード】

固定相の負電荷により、

強酸(pK_a 小さい) → 大きな静電的排除を受けて早期に溶出

弱酸(pK_a 大きい・有機酸) → 溶出は遅くなる

【疎水性相互作用モード】

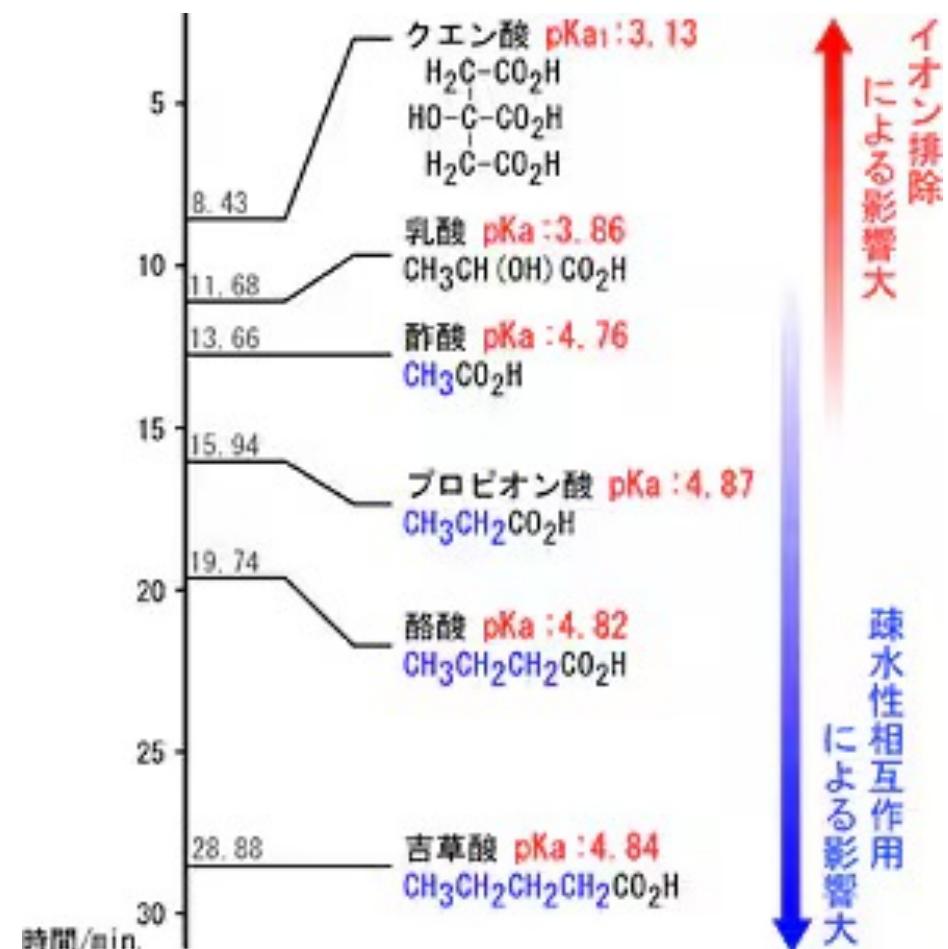
疎水性の高い有機酸

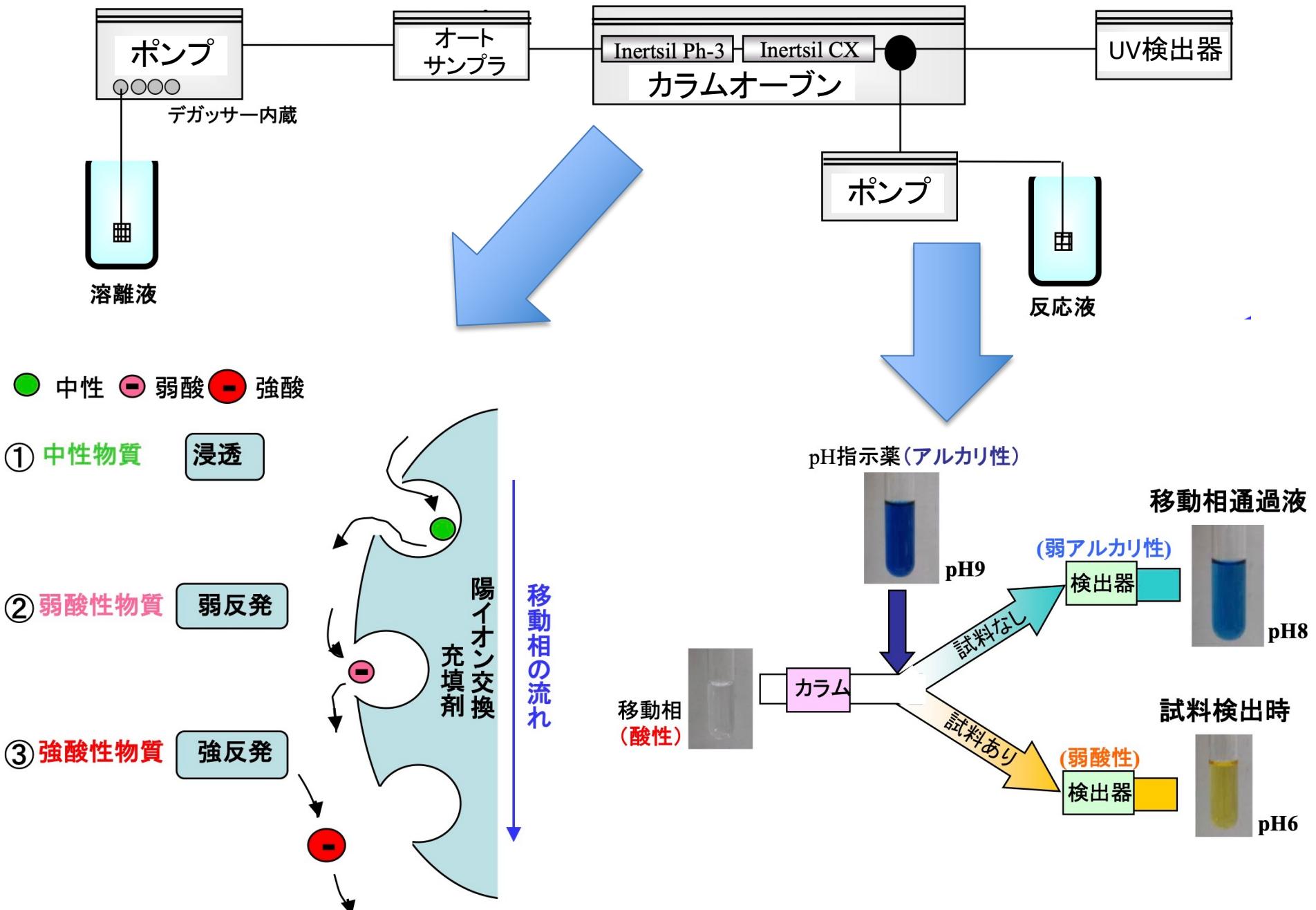
(酪酸、吉草酸)

→ 疎水性相互作用でより強く

保持、

溶出は遅くなる





GCで誘導体化なしに手軽にVFAを測定できないか？

・・・酸修飾WAXカラム (DB-FFAP) によるVFA測定

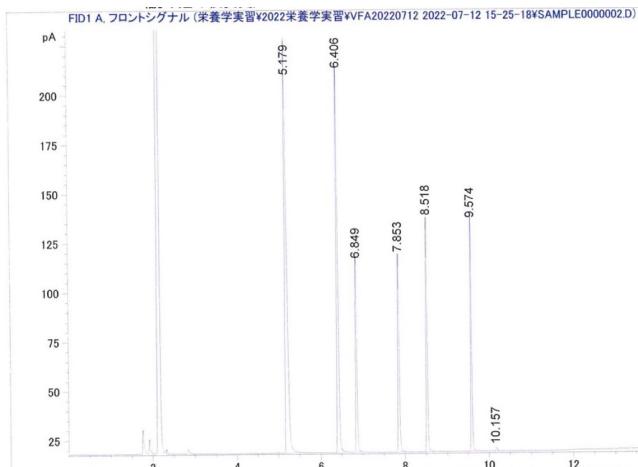
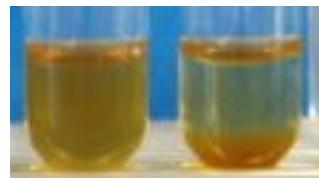
ルーメン液遠心上清 1 ml

↓ ←リン酸 20μl
混和

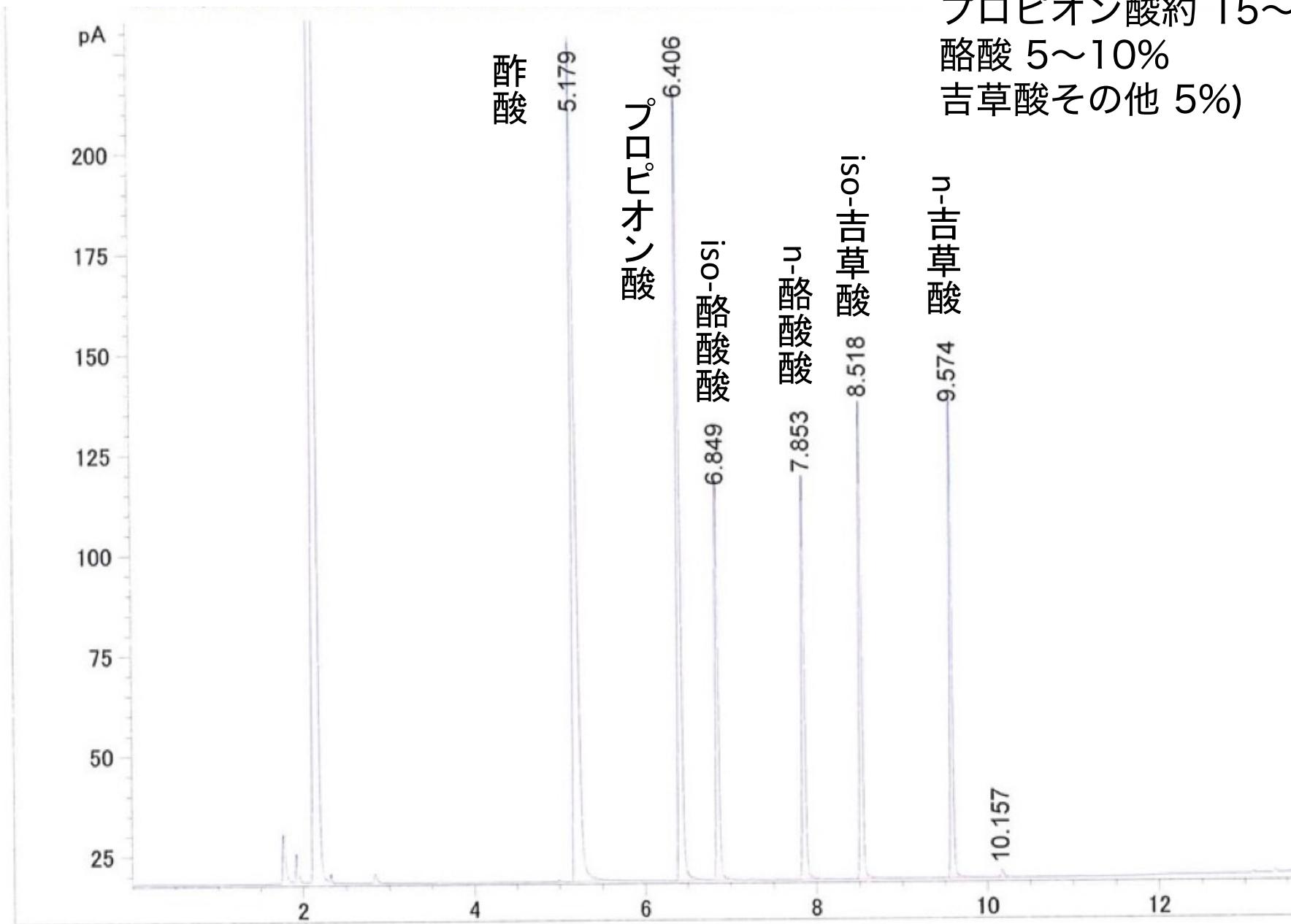
↓ 4°Cで一晩静置
↓

12,000 rpm、5min 遠心
↓

メンブレンフィルターでろ過



カラム DB-FFAP(30m*0.25mm*0.25 μm)
注入量 0.2 μl
split比 1:35
注入口温度 230°C
オーブン 80°C→10°C/min→116°C(1min)
→5°C/min→132°C→10°C/min
→165°C→15°C/min→240°C(4min)
検出器(温度) FID / 240°C
Flow 1.2ml/min (He)



総VFA濃度 60~120 mmol/L
酢酸約 65~75%
プロピオン酸約 15~20%
酪酸 5~10%
吉草酸その他 5%)

VFAの微量分析の必要性

ウシ第一胃（ルーメン）で產生されたVFA
→ 体内に吸收・・・エネルギー源

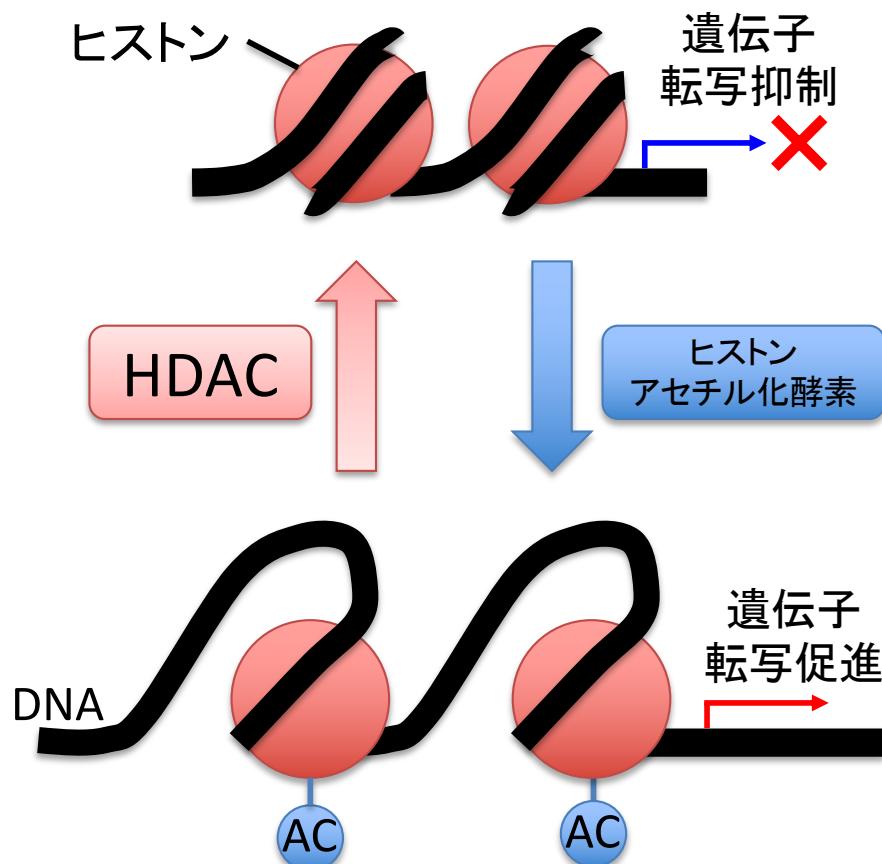
これ以外に・・・

⇒ VFA（特に酪酸）の機能性に注目
この解析には血中や培養液での
VFA測定が必要($\text{mM} \rightarrow \mu\text{M}$)

背景

- ・ 乳牛
周産期(特に乾乳期)の栄養管理の不備
 - 肝障害を引き起こしやすい
 - これが要因となって繁殖障害を引き起こすことがある
- ・ ウシはルーメン発酵により、揮発性脂肪酸(VFA; 酢酸、プロピオン酸、**酪酸**)を產生する
- ・ 酪酸
 - ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害し、**遺伝子発現を調節する機能**がある
(エピジェネティックな遺伝子発現調節)

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)



ヒストンアセチル化：転写の促進
ヒストン脱アセチル化：転写の抑制

酪酸＝HDACの阻害作用
→遺伝子の転写を活性化

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)

→遺伝子発現調節作用

- ・肝臓のエネルギー代謝

- ・卵巣顆粒膜細胞の性ホルモン産生

生産性向上
に関係

(ルーメン発酵で酪酸を産生できる)ウシでは、

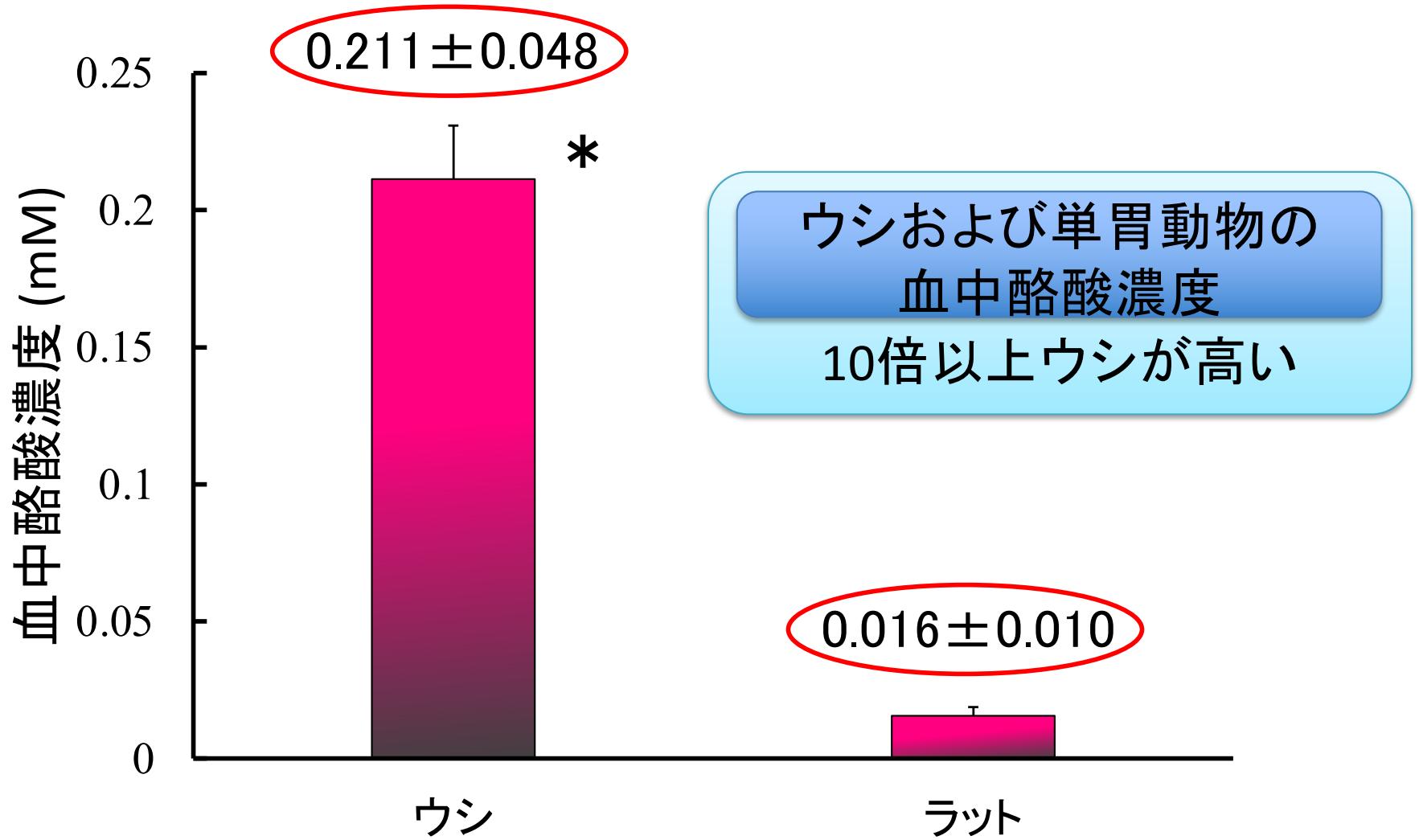
- ・酪酸によるHDAC活性の調節

- ・HDACを介した代謝調節

→単胃動物と異なる可能性

酪酸→HDAC→代謝調節

特徴をあきらかにしたい！！



ウシとラットにおける血中酪酸濃度

ウシ: n=6, ラット: n=10, * : ラットに対して有意差あり ($P < 0.05$)

GC-MSによるVFA測定

VFAの誘導体化法

多くの誘導体化プロトコル→**非水性条件が要求される**
…誘導体化反応前に生体サンプルを脱水する必要あり
一方で、**酢酸などの低沸点のVFAが損失しやすい**
結果の正確？

- ・ ブチルジメチルシリル化
ジエチルエーテルによる液液抽出
ジエチルエーテル中の誘導体化
- ・ クロロギ酸イソブチル/イソブタノール
によるエステル化
クロロギ酸によるエステル化
→ 水溶液中で可能



- ・ブチルジメチルシリル化
- ・クロロギ酸イソブチル/イソブタノールによるエステル化

標準溶液による検量線両誘導体化法とも
両誘導体化法とも直線性に問題なし ($r^2 > 0.995$)

添加回収試験の変動係数
エステル化 > ブチルジメチルシリル化



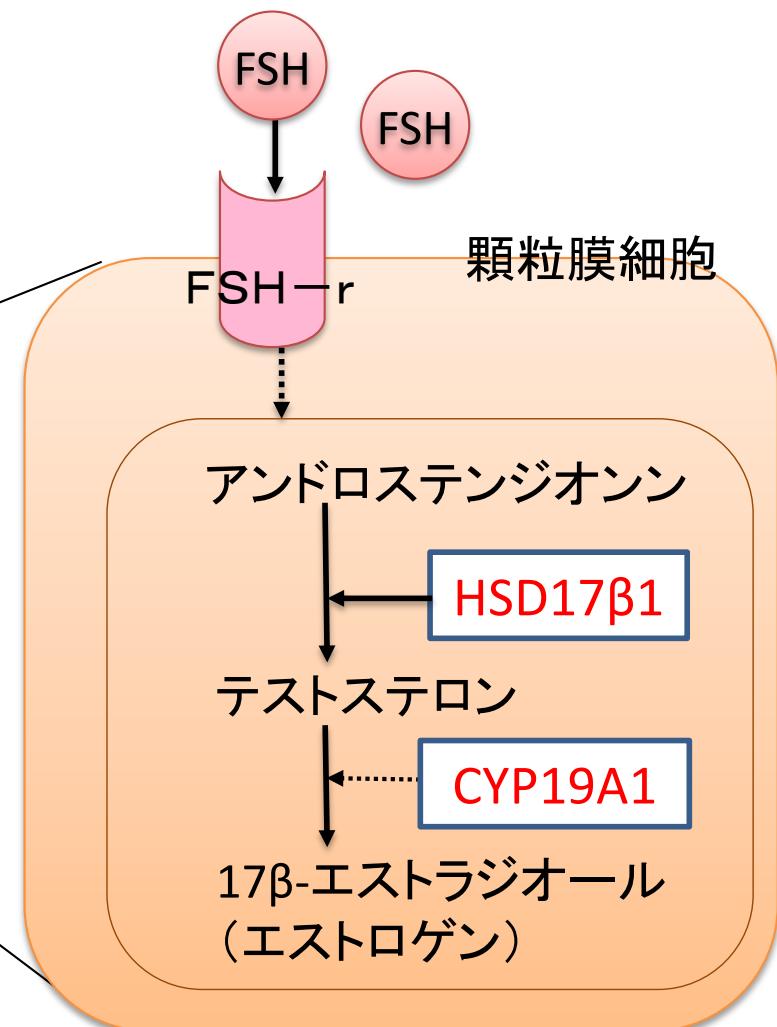
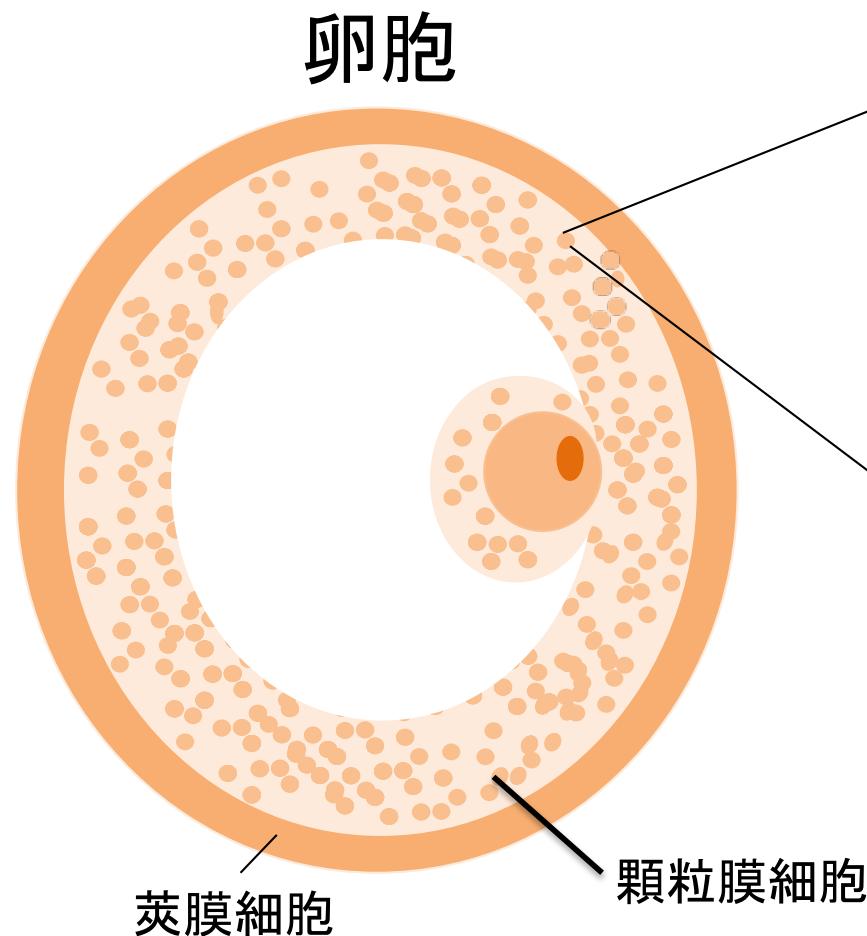
- ・VFAのみの測定 → ブチルジメチルシリル化
- ・VFA + 3-ヒドロキシ酪酸 → エステル化
(酪酸の代謝物)

卵巣顆粒膜細胞から分泌されるホルモン



KGN細胞(ヒト)

JTC-35細胞(ウシ)

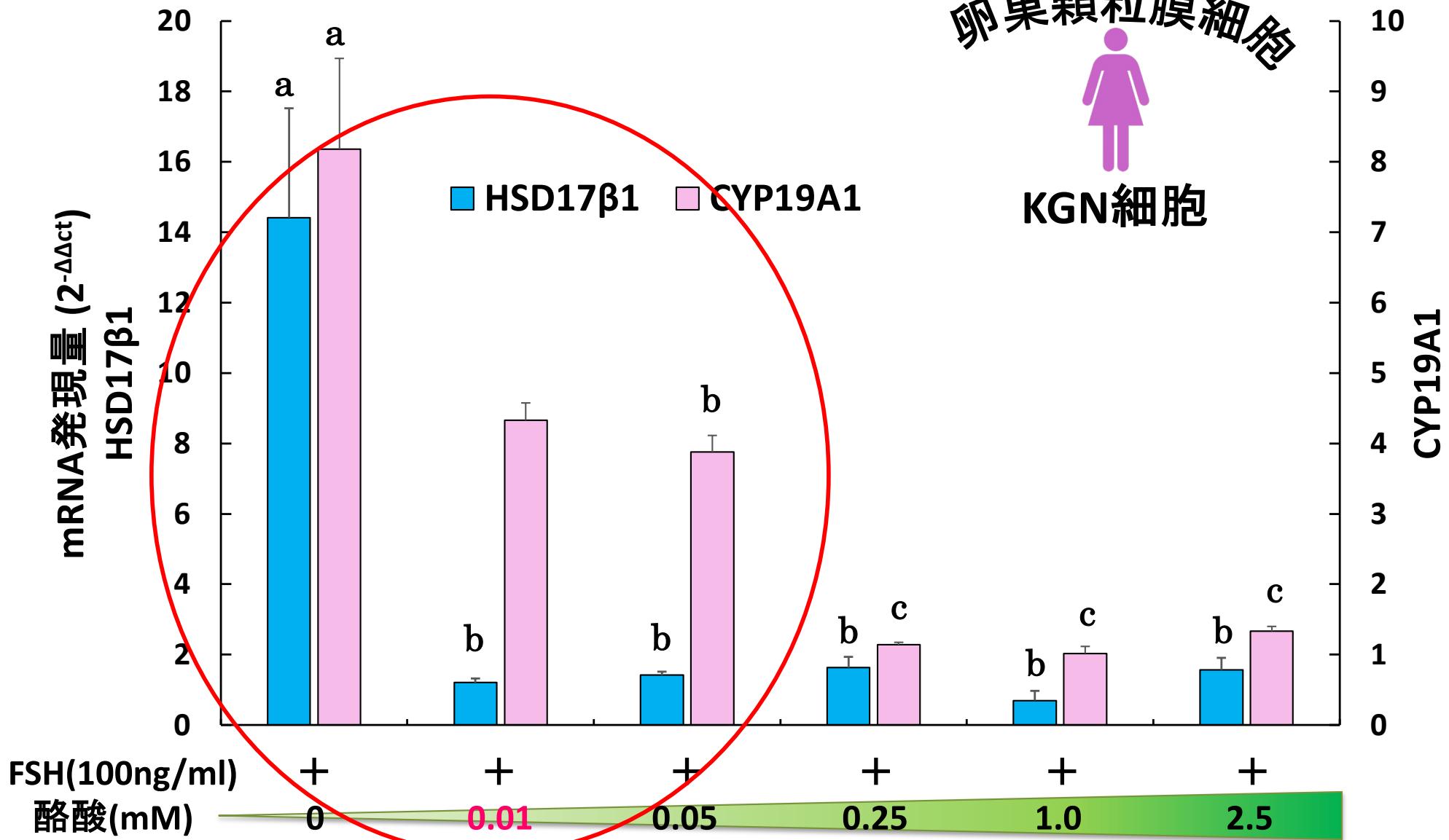


※エストラジオール(E2)は、卵胞が成熟すると分泌されるエストロゲンの一種
エストロゲンの中で最も活性が強い

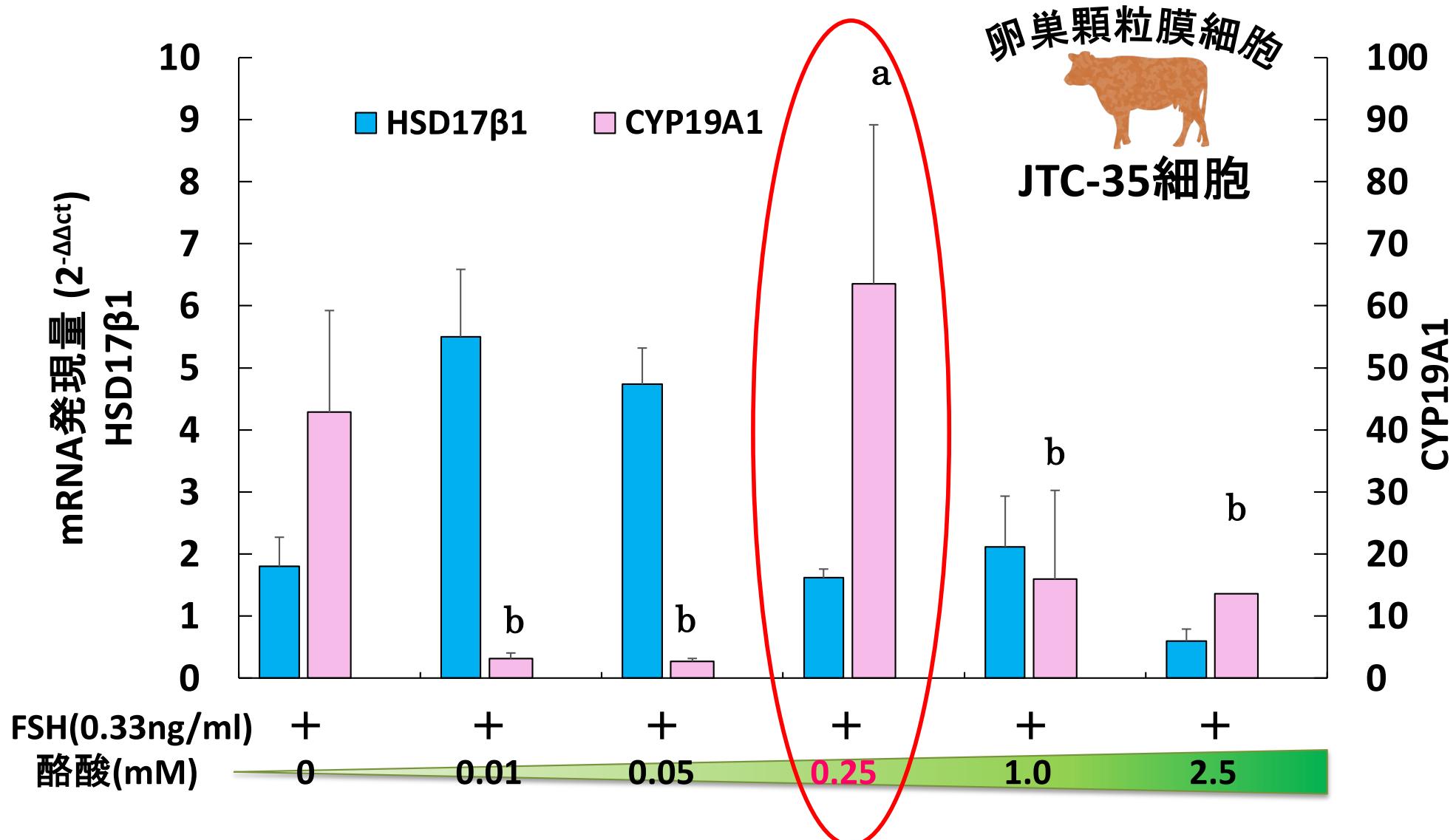
卵巢顆粒膜細胞



KGN細胞



酪酸の添加がE2産生経路の各遺伝子発現量に及ぼす影響
(n=4; p<0.05)



酪酸の添加がE2産生経路の各遺伝子発現量に及ぼす影響
(n=4; p<0.05)

ウシ、ヒトとともに血中酪酸濃度の測定結果に
近い酪酸添加量(ウシ:0.25mM、ヒト:0.01mM)で
HSD17 β 1, CYP19A1の各遺伝子発現が維持、
もしくは増強される傾向。

➡ 動物種(血中酪酸濃度)の違いによらない
性ホルモン産生のしくみが存在?

VFAの微量分析の必要性

ウシ第一胃（ルーメン）で產生されたVFA
→ 体内に吸収・・・エネルギー源



ウイルス感染時の生産性低下との関係
牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV)
→ 感染しても大多数のウシは無症状
数%のウシでは全身に腫瘍ができ、
死亡する

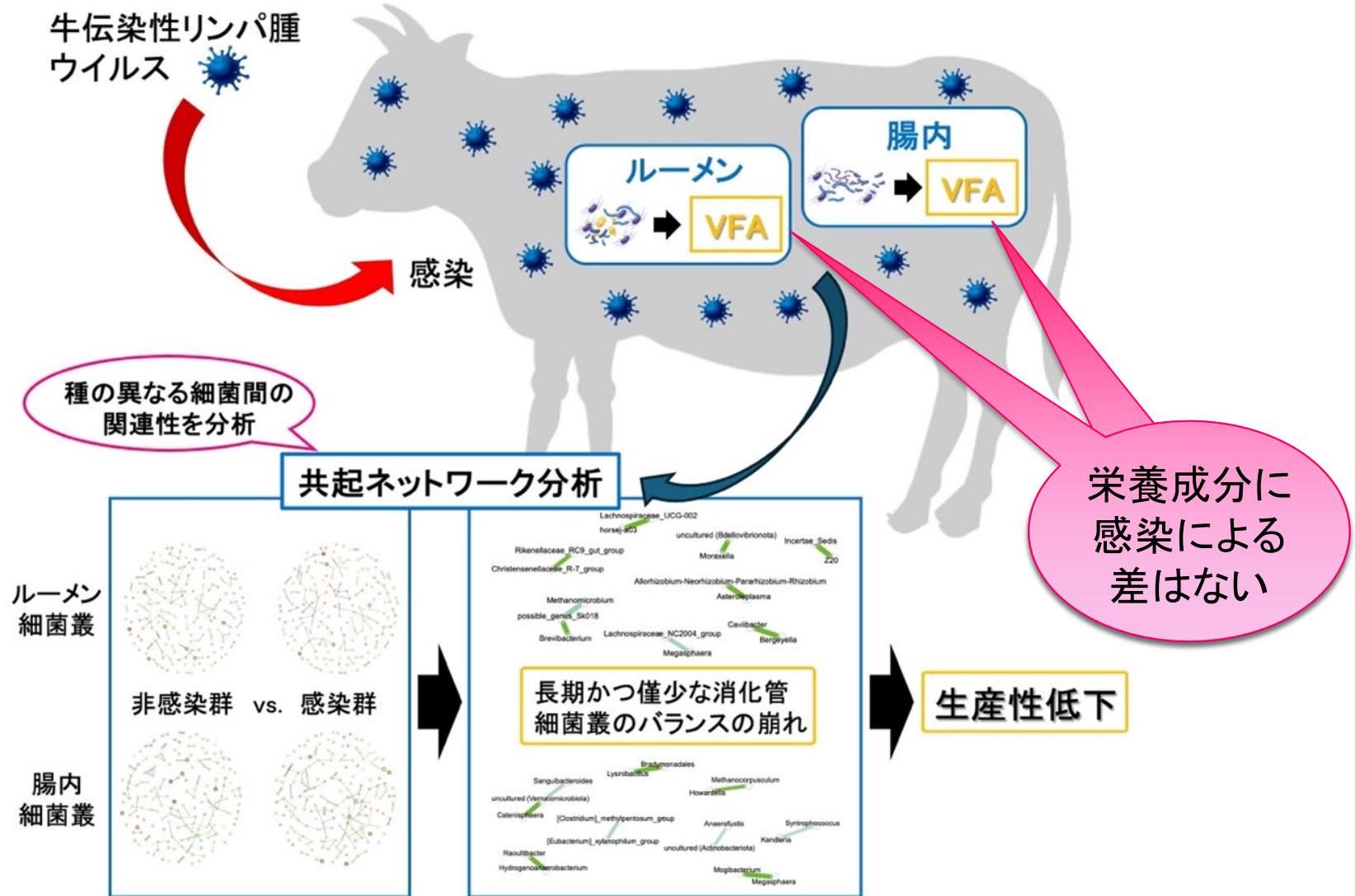
無症状キャリアでも、
牛乳の生産量や繁殖成績の低下が
指摘されるも、詳細は？



Exploratory study of volatile fatty acids and the rumen-and-gut microbiota of dairy cows in a single farm, with respect to subclinical infection with bovine leukemia virus

Takehito Suzuki^{1†}, Hironobu Murakami^{1†}, Jumpei Uchiyama^{2*†}, Reiichiro Sato³, Iyo Takemura-Uchiyama², Masaya Ogata¹, Kazuyuki Sogawa¹, Hiroho Ishida¹, Apichart Atipairin⁴, Osamu Matsushita² and Makoto Nagai¹

牛伝染性リンパ腫ウイルス感染による消化管細菌叢の変化



- ・この変化は小さく、BLV感染してもすぐに症状が出ないことと一致
- ・長期間に渡る小さな変化が、長期的に牛の健康に影響を与える
- ・BLV感染して生涯無症状の牛でも健康に悪影響の可能性

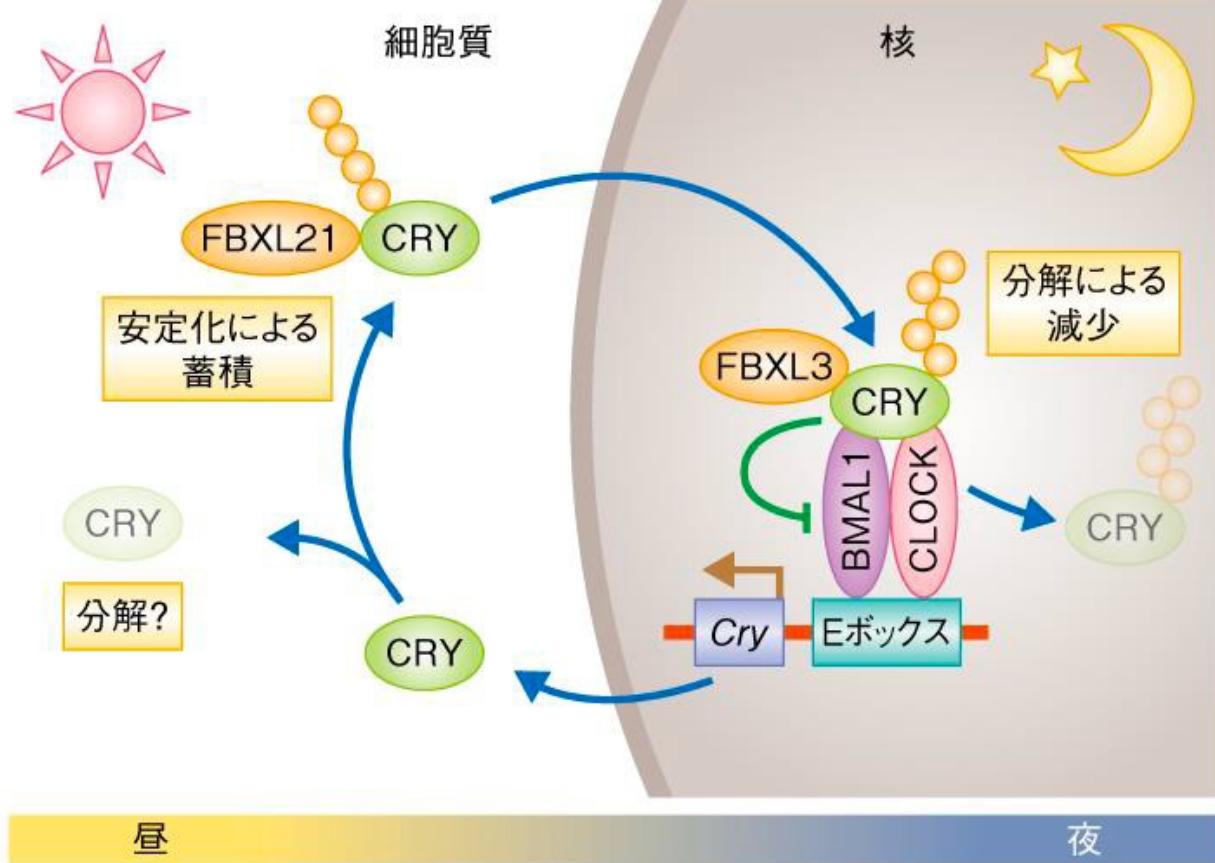
短鎖脂肪酸と体内時計

消化管で微生物によって產生される
短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸など）

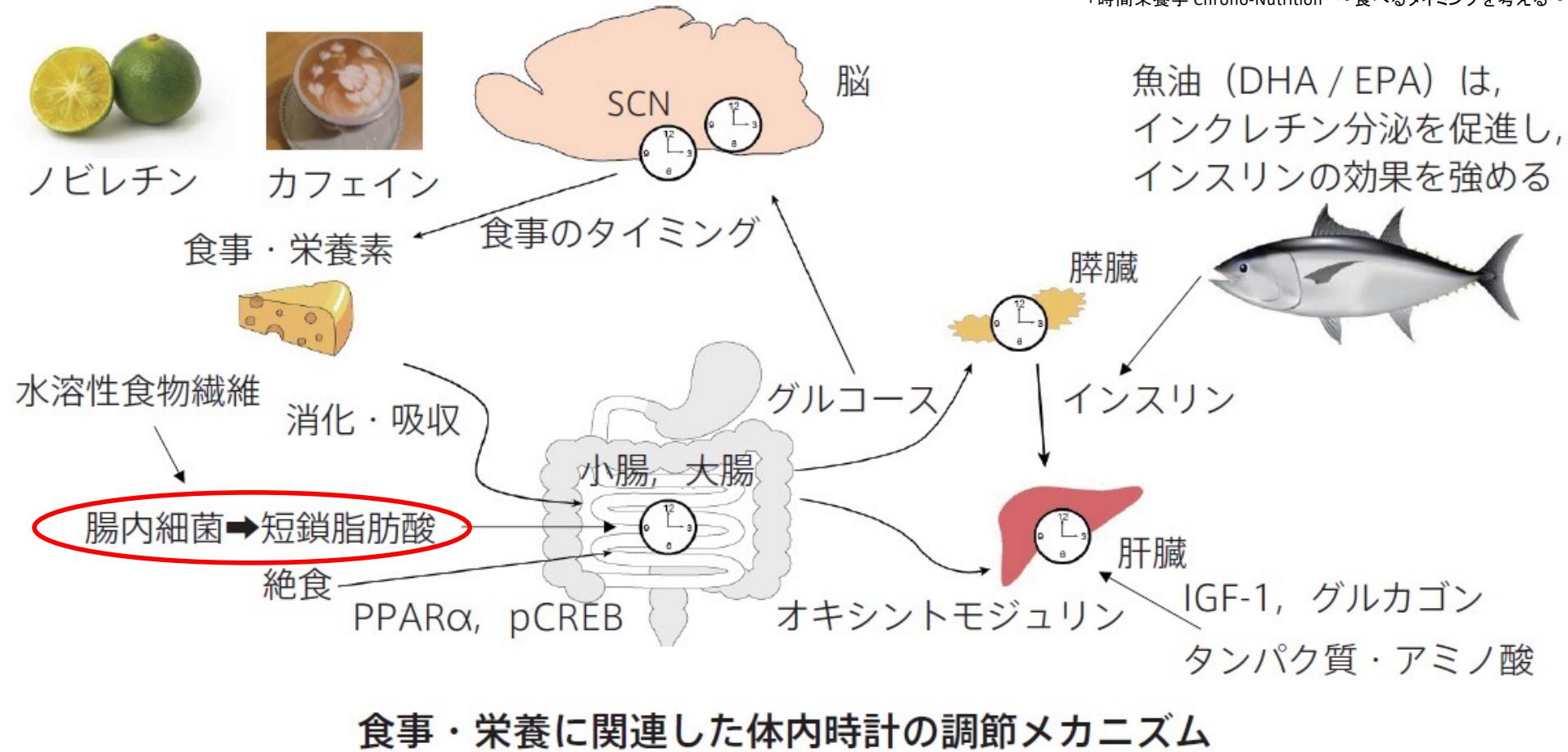
体内時計とは？

時計遺伝子の転写レベル調節により、
睡眠覚醒サイクル、自律神経活動、免疫機能、
ホルモン代謝など様々な生理機構に
日内リズム作り出している。

シフトワークなど体内時計が乱れる環境にあると
気分障害、生活習慣病、悪性腫瘍、心疾患などの
リスクが高まると指摘。



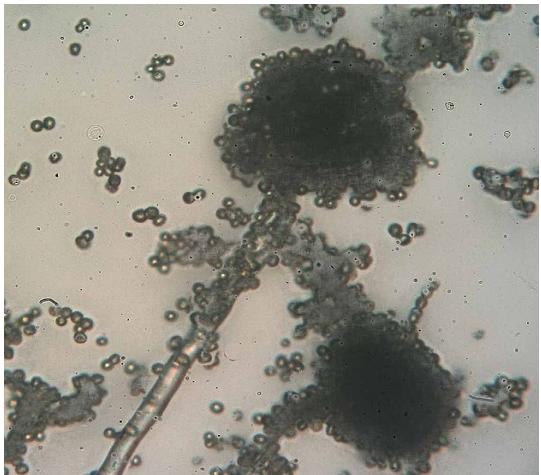
- ・体内時計とは？
分子レベルでは複数の転写因子からなる
フィードバックループを形成
脳内の視交叉上核に中枢時計があり、
その他の臓器には末梢時計がある



食事・栄養に関連した体内時計の調節メカニズム

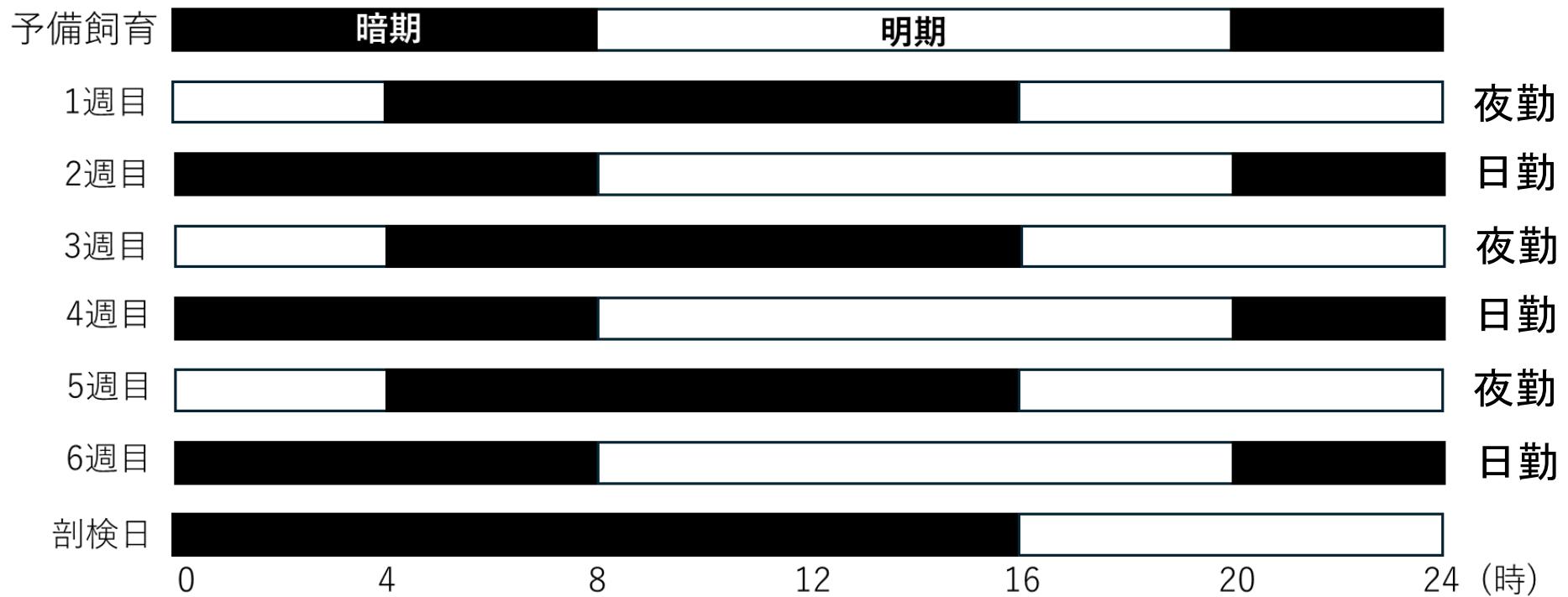
体内時計と食物は密接に関係
→ いつ何を食べるのかが重要に・・・時間栄養学

消化管内で產生される**短鎖脂肪酸**は
末梢時計の**調節因子**の一つ



Rhizopus oryzae 麴抽出物

- ・サルモネラ感染の抑制
- ・アトピー性皮膚炎の抑制
- ・肝障害の低減
- ・体内時計の乱れを軽減？



シフトワーク（交代勤務）を模した
照明条件でマウスを飼育



Rhizopus oryzae 麴抽出物の給与で
乱れた体内時計は戻るのか？