

平成30年 5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04582

研究課題名(和文) 動物の暑熱ストレス耐性向上のための包括的研究：生体と腸内細菌叢の統合制御

研究課題名(英文) Improving the tolerance to heat stress in animals through integrating control of host and gut microbiota with improved feed ingredients

研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU, Masaaki)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80180199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、暑熱下の肉用鶏の生産性低下の機序を明らかにし、生産性改善のための飼料資材を提案する。暑熱感作した鶏では、骨格筋で発生する活性酸素により骨格筋タンパク質分解は亢進し、脾臓ではT細胞数の低下が観察され、代謝と免疫システムの恒常性のためエネルギー要求が高まった。なお、暑熱感作後期で回腸ではStreptococcus属が減少、Natronincola属が増加傾向を示した。カシューナッツ殻油CNSL給与による生産性改善を検討したところ、暑熱CNSL給与で改善傾向にあった。暑熱感作による腸管の免疫関連遺伝子発現の上昇がCNSL給与で緩和されており、CNSLの生産性改善効果の一部が説明された。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this research are to clarify the mechanism underlying decreasing body weight and feed efficiency in broiler chickens exposed to heat stress, and to develop feed ingredients to improve the reduced performance. Heat exposure to chickens was found to induce increased proteolysis of skeletal muscles via more mitochondrial ROS generation and decreased CD3-positive cell in the spleen so that metabolic and immune systems remarkably enhance energy requirement to maintain homeostasis. Streptococcus appears to be the less dominant genus in the ileum of heat-stressed chickens. Feeding diets supplemented with cashew nut shell liquid (CNSL) causes broiler chicken to alleviate reductions of body weight and feed intake when exposed to heat, partially via control of intestinal immune-related gene expression.

研究分野：動物栄養生化学

キーワード：ストレス制御 タンパク質分解制御 免疫能制御 腸内細菌叢制御

1. 研究開始当初の背景

近年の畜産は、家畜の健康や福祉を重視した低ストレス環境下での生産形態を構築するとの目標があるものの、現行の施設管理方式では抗ストレスや抗病性を担保することができない現実に直面している。そうしたなかで、ストレス緩和をスローガンに掲げた理想的家畜飼養、すなわち酸化ストレスや免疫過剰応答を低減させた上で、代謝系を正常に維持するには、現行の抗酸化や免疫関連飼料資材よりも効果のある新規プロバイティクスなどの幅広い検索や組み合わせの工夫が必須で、効果を著しく高める方法の確立が急務である。

2. 研究の目的

家禽生産現場において「暑熱ストレス」は代表的最重要課題で、生産性が著しく低下する。本研究は、これを改善するため暑熱ストレスに対する生体（酸化ストレス・タンパク質分解・免疫）と腸内細菌叢の時系列応答解析より生産低下機序を包括的に解明した上で、実践的飼料資材を合理的に設計し、理想的な飼養体系を整備することを目的とする。

そのため、1) まず高温環境時のニワトリの酸化ストレス、タンパク質分解、免疫の各生体内応答ならびに腸内細菌叢における生体外応答を、時間経過の中で観察し、暑熱ストレスで誘導される反応メカニズムを包括的に解明した上で、以下の作業仮説を設定・検証し候補資材のあるべき特性を明らかにする。

- a: 反応性の高い ROS は筋肉のタンパク質分解を促進する
- b: 前炎症性サイトカイン(TRL1, IFN- γ , IL-6, IL-1)が細胞傷害を誘導する
- c: 腸内細菌叢が、免疫・タンパク質分解・酸化ストレスの応答を誘導する

さらに、2) メカニズム解析に基づき実践的飼料資材候補を提案し、また高温ストレスに対する効果が期待できるものについては暑熱試験を実施してストレス軽減を可能とする新たな家禽飼育法の確立を目指す。

3. 研究の方法

暑熱ストレスモデルでは、4 週齢肉用鶏ブロイラーに 33-34 (湿度 60%) を 16 日間暑熱曝露し、経時的に 0, 0.5, 1, 3, 2, 4, 8, 12, 16 日目などで、採血後、骨格筋、肝臓、脾臓、小腸、消化管内容物(空・回腸、盲腸)などを迅速に摘出・凍結保存する。以下の各応答を明らかにするため、各組織ならびに消化管内容物は、各種実験に供試し、増体・以下ストレス応答との関連性を徹底的に追及し、データベース化を行う。

1) 暑熱ストレス時における酸化ストレス応答を明らかにするため、骨格筋単離ミトコンドリアから活性酸素種 ROS を蛍光色素 Amplex red で高感度(業績 48: FEBS Lett. 584, 3143, 2010)に調べた。

2) 暑熱ストレス時におけるタンパク質分解応答を明らかにするため、タンパク質分解量は HPLC 分析による排泄物中・血中 3-メチルヒスチジン量から算出した (Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 92, 2010)。なお、骨格筋タンパク質の分解過程(筋原線維の断片化→タンパク質断片のユビキチン化→プロテアソームによる分解)は、ユビキチン化に正に働く FoxO 遺伝子とアトロジン 1 の遺伝子の発現様式でそれぞれ評価し、ユビキチン・プロテアソーム系への ROS の関与について調べた。

3) 暑熱ストレス時における胸腺・脾臓・小腸の免疫系の動態を明らかにするため、各組織の炎症関連遺伝子の発現を RT-PCR 法で、脾臓の免疫担当細胞の数を FACS 法でそれぞれ測定した。免疫関連の遺伝子発現の評価は、LPS (Lipopoly-saccharide) が INF- γ 産生ならびに TNF- α が (鳥類では TL1A) (J. Immunol. 180, 8327, 2008) を誘導して相乗的に ROS 産生を促進し、これに伴う NF- κ B の活性化により細胞傷害が誘導されるとのスキームを考え合わせて、本試験では TL1A, IFN- γ , IL-6, IL-1 の前炎症性さらに IL-10, TGF- β などの抗炎症性の各サイトカイン遺伝子発現の変化についても検討した。

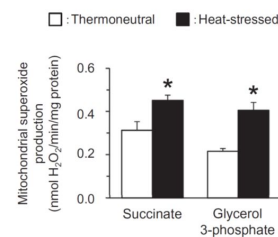
4) 暑熱ストレス時における腸内細菌叢応答は、次世代シーケンサー (NGS: Illumina MiSeq2000) を用いた 16SrRNA 遺伝子解析により、暑熱ストレス時における腸内細菌叢変化を網羅的かつ詳細に調査した。腸管内容物からゲノム DNA を抽出し、16SrRNA のユニバーサルプライマーを用いて可変領域 V1-3 を増幅し、増幅産物にインデックスを付け個体識別したのち、シーケンス反応を行なった。

このように、暑熱曝露に伴う生産性低下の作用機序を明らかにするため、「酸化ストレス」、「タンパク質分解」、「免疫」、「腸内細菌叢」の 4 つの応答を横断的・統合的に捉え、作業仮説を検証した。

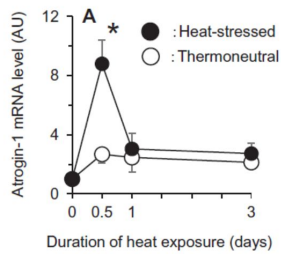
4. 研究成果

暑熱環境下における肉用鶏の骨格筋では、ミトコンドリア活性酸素が過剰産生されるが、これがタンパク質分解にどう関わるか特にユビキチン・プロテアソーム系との関連を調べた。その結果、暑熱下の肉用鶏では、0.5 日後に骨格筋の Atrogin-1 の遺伝子発現量が、対照区と比べて有意に増加し、そして、暑熱

3 日後において、血中 3-メチルヒスチジン含量は有意に増加し、暑熱感作により、ユビキチン・プロテアソーム系のタンパ



暑熱感作0.5時間後における骨格筋ミトコンドリアROS産生



暑熱感作後のAtrogin-1の mRNA発現の推移

質分解が亢進することが確認された。さらに Atrogin-1 の発現が観察された暑熱 0.5 日後において、ミトコンドリアスーパーオキシド産生量は有意に増加し、暑熱ニワトリにおいても骨格筋ミトコンドリア活性酸素は筋タンパク質分解の誘導因子となる可能性が示された。

すでに、暑熱下に鶏を曝露すると、腸管の形態損傷ならびに内毒素（エンドトキシン）の血中流入が観察されること、また飼料摂取量の低下では誘導されないことを曝露 1 日以内に認められることをペアフィード試験から明らかにしている。そこで、暑熱感作に対する自然免疫応答ならびに腸内細菌叢変化を明らかにするため、主たる免疫臓器の一つである胸腺における暑熱感作の経時的变化、ならびに暑熱後期における回腸細菌叢を解析した。33 の慢性暑熱感作期間中において、ニワトリの胸腺では感作 1 日後において IL（インターロイキン）-1 β の遺伝子発現量が低下し、7 日後においては IFN- γ と TLR2 発現量が上昇した一方で IL6 の発現量が低下した。回腸では、暑熱感作によって菌叢が単一化する傾向が認められた。先の研究において、内毒素の流入は暑熱感作 1 日後に起きていることから、暑熱感作 7 日後の IFN- γ と TLR2 の発現上昇はその流入に起因していると考えられた。また、暑熱 1 日後の胸腺では、脂肪酸酸化関連酵素 LCAD の遺伝子発現が上昇した一方で、同酵素 3HADH ならびに avUCP の発現量は低下し、暑熱 7 日後では GLUT2 の発現量が著しく増加していた。これらの結果から、ミトコンドリアエネルギー代謝異常およびこれにともなう細胞内代謝変動が生じていると推察された。

なお、骨格筋では、早期段階において抗酸化ペプチド・構成アミノ酸量が暑熱感作初期段階（～1 日）において低下した一方で、免疫賦活化をもたらすグリシンの含量が暑熱感作 7 日後に低下した。以上の結果より、暑熱感作時に早期段階においてニワトリ体内でグローバルな代謝変動が起きる一方で、後期段階ではこれに適應するため、骨格筋・免疫担当組織の代謝応答が生じていることが示された。さらに、抹消リンパ組織である脾臓における暑熱感作の経時的变化についても調べた。その結果、33 の慢性暑熱感作期間中において、ニワトリの脾臓では感作 1 日後に TGF- β の遺伝子発現量が上昇し、それに伴い感作 3 日目で IL-6 が低下し、CD3,CD4,CD8 陽性細胞の T 細胞の細胞数が著しく低下した。一方、感作 7 日後において

は TGF- β と IL10 の抗炎症性サイトカインの遺伝子発現量が低下し、同組織の Bu1 陽性細胞の数が対照区と比べ低下した。

暑熱初期の脾臓での T 細胞の低下後の回復期（暑熱 3～5 日目）においては、糖の取り込みを代償的に担っていると考えられる GLUT 2 の発現は高く維持され、それにもかかわらず解糖系の律速酵素の一つであるフォスホフルクトキナーゼ活性は低下していることから、ペントースリン酸化回路が賦活化されいると予想された。

さらに、暑熱ストレス緩和の飼料資材検討のため、まず候補である黒麹の有用性について、特に肉用鶏への黒麹菌給与の腸管の形態やその組織の酸化ストレスに対する影響を調べた。その結果、消化吸収能の指標と考えられる絨毛高：陰窩深比は、十二指腸および回腸いずれにおいても対照区と比べて黒麹菌給与区で有意に増加した。また、カルボニル化タンパク質含量は十二指腸では対照区と比べて黒麹区で低下傾向を示し、回腸では黒麹区で有意に低下した。なお、浅胸筋重量は黒麹区で有意に増加した。これより、黒麹菌には、腸管の酸化ストレス軽減、さらにそれに伴う腸管の組織状態の改善による消化吸収能の向上効果が認められ、暑熱対策資料資材としての利用が期待できる。

さらに、これまでの研究より暑熱ストレス緩和の飼料資材候補であるアナカルド酸を含有するカシューナッツ殻油(CNSL) ならびに加熱 CNSL 給与时におけるアナカルド酸とその誘導体の動態と、腸内細菌叢および腸内炎症応答を調べた。その結果、アナカルド酸やカルダノールやそれらの存在量は、摂取量に対して排泄物では 0.9～4.7%、肝臓では 0～0.2%と低値であった。菌叢解析において、CNSL 区では *S. oligofermentans* の占有率が低下する一方で、*Lactobacillus* 属ではいずれの菌種においても占有率の著明な変化は認められなかった。また、腸管の TL1A、TLR2 発現は CNSL 給与により抑制された。なお、CNSL により低下した TL1A の発現量は *Streptococcus* 属の占有率との間に正の相関が示されたが、さらなる多面的な解析を要すると判断された。次に、暑熱時での CNSL 給与による生産性改善効果に、腸内細菌叢と腸内炎症応答がどのように関連づけうるかを調べた。その結果、増体量、飼料摂取量は暑熱対照区で対照区に比べ低下したが、暑熱 CNSL 区では改善傾向にあった。また、暑熱対照区では対照区と比べ、腸管の TLR4、IL-6、TGF- β 、TLR2 の発現量が増加したが、暑熱 CNSL 区ではその増加は減少した。以上より、アナカルド酸とその誘導体のほとんどが消化管で作用し腸内細菌叢変化を介して免疫応答に影響を与えること、また CNSL は暑熱ストレス緩和の飼料資材候補として有用で、その生産性改善効果には免疫関連遺伝子が関係している可能性が示された。

以上より、暑熱感作した肉用鶏では、骨格筋で発生する活性酸素により骨格筋タンパク質分解は亢進し、脾臓ではT細胞数の著しい低下が観察され、代謝と免疫システムの恒常性のためエネルギー要求が高まっていた。なお、暑熱感作後期で回腸では *Streptococcus* 属が減少、*Natronincola* 属が増加傾向を示した。カシューナッツ殻油 CNSL 給与による生産性改善を検討したところ、暑熱感作で増体量や飼料摂取量は対照区に比べ低下したが、暑熱 CNSL 給与で改善傾向にあった。暑熱感作による腸管の免疫関連遺伝子発現の上昇が CNSL 給与で緩和されており、CNSL の生産性改善効果の一部を説明していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

Hakamata, Y., Watanabe, K., Amo, T., Toyomizu, M. and Kikusato, M. (2018) "Characterization of Mitochondrial Content and Respiratory Capacities of Broiler Chicken Skeletal Muscles with Different Muscle Fiber Compositions" *The Journal of Poultry Science*, 55 DOI: 10.2141/jpsa.0170141(査読有)

Kikusato, M., Nanto, F., Mukai, K. and Toyomizu, M. (2016) "The effects of trehalose supplementation on the growth performance and intestinal innate immunity of juvenile chicks" *British Poultry Science*, 57:375-80. DOI:10.1080/00071668.2016.1166475. (査読有)

Kikusato, M., Nakamura, K., Mikami, Y., Mujahid, A. and Toyomizu, M. (2016) "The suppressive effect of dietary coenzyme Q10 on mitochondrial ROS production and oxidative stress in chickens exposed to heat stress" *Animal Science Journal*, 87:1244-1251. DOI: 10.1111/asj.12543 (査読有)

Furukawa, K., Kikusato, M., Kamizono, T. and Toyomizu, M. (2016) "Time-course changes in muscle protein degradation in heat-stressed chickens: Possible involvement of corticosterone and mitochondrial reactive oxygen species generation in induction of the ubiquitin-proteasome system" *General and Comparative Endocrinology*, 228: 105-110. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.02.007. (査読有)

Nanto, F., Ito, C., Kikusato, M. and Toyomizu, M. (2016) "Effect of feeding diets combining whole-grain paddy rice and high levels of fat on broiler chicken growth" *The Journal of Poultry Science*, 53: 34-39. DOI: 10.2141/jpsa.0150070 (査読有)

(学会発表)(計 22 件)

Hakamata, Y., Amo, T., Toyomizu, M., Kikusato, M. (2018) "Differences in mitochondrial fatty acid utilization and respiratory complex characteristics between meat-type and laying-type chickens" 11th Asia Pacific Poultry Conference (APPC2018), Thailand

松橋花菜子・渡邊康一・豊水正昭・喜久里基(2018)「飼料中トウモロコシ粒度が肉用鶏の成長・消化管におよぼす影響」日本家禽学会 2018 年春季大会(東京大学)若手優秀発表賞受賞

永津健太郎・Md.Abul Kalam Azad・南都文香・古川恭平・平川良太・喜久里基・豊水正昭(2018)「鶏へのアナカルド酸給与と時におけるその動態と腸内細菌叢の解析」日本家禽学会 2018 年春季大会(東京大学)

平川良太、野地智法、喜久里基、古川恭平、村井篤嗣、豊水正昭(2018)「暑熱環境が肉用鶏のリンパ組織に及ぼす影響」日本畜産学会第 124 回大会(東京大学)

Kikusato, M., Shima, R., Muroi, H. and Toyomizu, M. (2017) "Oleuropein suppresses oxidative damage in avian skeletal muscle, possibly via SIRT1 up-regulation" 21st European Symposium on Poultry Nutrition, Spain

室井ひかる・嶋尾里紗・神園巴美・豊水正昭・喜久里基(2017)「オリーブ特有フェノール化合物オレウロペインがニワトリ骨格筋の活性酸素産生におよぼす影響」日本家禽学会 2017 年春季大会(神戸大学)

近藤あずさ・南都文香・喜久里基・豊水正昭(2017)「飼料用米給与は暑熱感作時の肉用鶏の生産性に影響するか」日本家禽学会 2017 年春季大会(神戸大学)

古川恭平・喜久里基・豊水正昭 (2017)「生理的濃度のコルチコステロンはニワトリ高温培養筋細胞のタンパク質分解を増強しない」日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学)

五月女里梨・喜久里基・南都文香・平澤明・豊水正昭(2017)「寒冷曝露および甲状腺ホルモン給与はニワトリ脂肪組織のベージュ化を誘導するか」日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学)

Nurjanah Siti・野地智法・南都文香・古川恭平・阿部汐里・福田菜・喜久里基・豊水正昭(2017)「Decreased glycolysis relates to immune response in heat-stressed chicken」日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学)

Toyomizu, M.(2016) "Mitochondrial Function and chicken performance" 中国畜牧獸医学会武漢轻工大学(招待講演)

Kamizono, T., Kikusato, M., Hayashi, K. and Toyomizu, M. (2016) "Possible mechanism of down-regulation of atrogin-1 mRNA level in butoxybutyl alcohol-fed

chicken” 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Poland

Kikusato, M. and Toyomizu, M. (2016) “Comparisons of ROS homeostasis in avian skeletal muscle with different myofiber compositions” 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Poland

Furukawa, K., Kikusato, M. and Toyomizu, M. (2016) “Roles of corticosterone and superoxide in the ubiquitin proteasome system in heat-stressed chickens” 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Poland

Hakamata, Y., Kikusato, M., Watanabe, K., Amo T. and Toyomizu, M. (2016) “Defining the mitochondrial histochemical characteristics of avian skeletal muscles with different muscle fiber type compositions” 17th Animal Science Congress of Asian Australasian Animal Production, Japan

Furukawa, K., Waki, N., Kikusato, M., Ashinara, A., Ishida, A., Nakashima, K. and Toyomizu, M. (2016) “Time-course of changes in muscle antioxidant peptide concentrations in heat-stressed broiler chickens” 17th Animal Science Congress of Asian Australasian Animal Production, Fukuoka, Japan

Kikusato, M., Nanto, F., Ishikawa, T., Ashida, N., Imabayashi, T. and Toyomizu, M. (2016) “Effects of bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102) in spore form on the growth performance and intestinal immunity of heat-stressed broiler” 17th Animal Science Congress of Asian Australasian Animal Production, Fukuoka, Japan

喜久里基・豊水正昭(2016)「暑熱負荷鶏の浅胸筋および腓腹筋におけるミトコンドリア活性酸素産生制御の比較解析」日本家禽学会 2016 年春季大会(日本獣医生命科学大)

南都文香・近藤あずさ・喜久里基・松木悠・陶山佳久・森田英利・豊水正昭(2016)「飼料用米給与時における鶏の暑熱感作応答」日本畜産学会第 121 回大会(日本獣医生命科学大)

三上由紀子・喜久里基・豊水正昭(2016)「段階的暑熱環境下における肉用鶏の酸化ストレスに対する CoQ10 (CoQ10) の抑制作用」日本畜産学会第 121 回大会(日本獣医生命科学大)

④ 近藤あずさ・南都文香・喜久里基・豊水正昭(2015)「エネルギー源の異なる高代謝エネルギー (ME) 飼料が肉用鶏の飼養成績および肉質におよぼす影響」日本家禽学会 2015 年秋季大会(酪農学園大学)

② 室井ひかる・喜久里基・上部雄一郎・古川恭平・豊水正昭(2015)「ニワトリ筋細胞におけるオレウロペインの PGC-1 発現誘導作用がミトコンドリア生合成・活性酸素産生におよぼす影響」日本畜産学会第 120 回大会(酪農学園大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU Masaaki)
東北大学・農学研究科・教授
研究者番号: 80180199

(2) 研究分担者

大塚 彰 (OOTUKA Akira)
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授
研究者番号: 10233172

陶山 佳久 (SUYAMA Yosihisa)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 60282315

喜久里 基 (KIKUSATO Motoi)
東北大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 90613042

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし