

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380157

研究課題名（和文） 「ラジカルフリー健康肉」設計のプロトール化とその基準化

研究課題名（英文） Standard Methods and Nutritional biochemistry for Production of Radical-free Healthy Meats

研究代表者

豊水 正昭（TOYOMIZU MASAOKI）

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80180199

研究成果の概要：

家畜・家禽は、外部刺激によるストレス条件下では生体構成成分の過酸化が生じ、生産性が低下する。本研究では、暑熱ストレス時においても「ラジカルフリーの健康肉」を設計するため栄養制御による飼養技術基盤を構築した。すなわち、暑熱ストレス下では $O_2^{\cdot-}$  産生の増加が、脱共役タンパク質低下ならびに基質酸化の上昇→膜電位の上昇→ $O_2^{\cdot-}$  産生増大との「カスケード」が存在するが、オリーブ油の給与によりこの流れを負に制御することに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	10,900,000	3,270,000	14,170,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：活性酵素,ミトコンドリア,プロイラー,暑熱,プロトンリーク,栄養制御,脱共役タンパク質,UCP

## 1. 研究開始当初の背景

家畜・家禽は、生まれてからと殺されるまで常にストレス環境下で飼育されている。哺乳動物における最近の研究から、骨格筋や肝臓における活性酸素は、過度の緊張、外部刺激による高血圧、栄養障害あるいは高温・低温環境刺激による酸化ストレスで著しく増大し、生体を構成するリン脂質やタンパク質の過酸化物が生成することが明らかにされている。その結果、家畜・家禽の生産物には、ストレス由来の過酸化物質が蓄積することになる。食卓肉の安全・安心の確保の実現化のためには、「ラジカルフリー健康肉」設計のプロト

コール化と基準化のための科学的実験データの集積が必要不可欠である。

ヒトや動物が過度なストレス状態に陥ると、酸素濃度の急激な上昇、電子伝達系の部分的阻害、脱共役タンパク質の不活化やADP供給の低下により、ミトコンドリアからのプロトンリークが低下し、その結果、ミトコンドリア内膜の電子伝達鎖から電子が漏出しやすくなり、酸素分子が一電子還元されて非常に多くの $O_2^{\cdot-}$ がミトコンドリアで生成されることがわかっている。

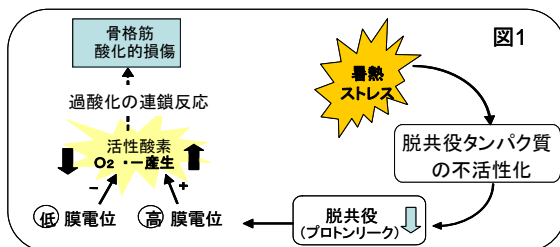
## 2. 研究の目的

本研究は、急性暑熱感作に伴う ROS 産生増大の発現機序とその栄養制御法について明らかにすることを目的とし、究極的には「ラジカルフリー健康肉」の作出のため、ストレス環境下におけるブロイラーの骨格筋ミトコンドリアからの過剰な  $O_2^{\cdot-}$  産生のメカニズムを解明し、これを踏まえた飼養管理開発のための研究基盤を構築することにある。すなわち、以下の小目的を設定して「ラジカルフリー健康肉」設計のプロトコールの具体例を示すことにある。

- (1) 暑熱→骨格筋ミトコンドリアの  $O_2^{\cdot-}$  の産生までのメカニズムを解明する。
- (2)  $O_2^{\cdot-}$  の産生→過酸化連鎖反応プロセスにおける生成物の骨格筋内蓄積量を分析定量し、「ラジカルフリー健康肉」と比較する。
- (3)  $O_2^{\cdot-}$  過剰生産を支配する「プロトンリークの低下」の原因を突き止め、プロトンリークの栄養制御法を検討する。

## 3. 研究の方法

これまで環境ストレスにより骨格筋のミトコンドリアの  $O_2^{\cdot-}$  産生が誘導されることを明らかにしている。また、ROS はミトコンドリア脱共役タンパク質プロトンリーク能を促進することや、脱共役タンパク質が活性化されればミトコンドリアにおける ROS 産生は低下するなどの知見を重ね合わせると、暑熱ストレスにともなう ROS 産生の過剰産生、さらには酸化損傷までの過程は、図 1 に示すようなスキームで説明できる。



そこで、本研究では、まず、(1)暑熱ストレスの負荷に伴う ROS 産生の変化を経時的に化学発光法あるいは蛍光法で調べ、ミトコンドリアにおける UCP タンパク質の遺伝子発現ならびにエネルギー代謝関連遺伝子の発現応答についても検討した。(2)さらに骨格筋やそのミトコンドリアにおける脂質とタンパク質の酸化損傷程度を、過酸化脂質の分解産物であるマロンジアルデヒド (MDA) と DNPH を用いた蛋白質カルボニルから実証した。なお、急性暑熱曝露に伴う急激な生理的基礎値についても調べた。さらに、(3)飼料による ROS

の過剰産生を制御するため、急性感作前鶏へのオリーブ油給与にともなう骨格筋ミトコンドリア ROS 産生、基質酸化や UCP タンパク質発現ならびに脂質過酸化について調査した。また、ミトコンドリアあるいは骨格筋における脂質過酸化の反応生成物の動態を明らかにした。

すなわち、初生オス雛 (肉用鶏: Cobb) を供試し、7 日齢まで幼雛用ケージにて飼育した。8 日齢以降は環境温度制御室内にて単飼し、22-24 日齢時に 24°C を対照区として、34°C、急性暑熱曝露を行った (暑熱区)。暑熱曝露期間を含む全飼育期間において、実験動物は連続照明下で飼育し、水ならびに飼料は自由摂取とした。曝露後、浅胸筋を採取し分析に供試した。骨格筋ミトコンドリアの単離は、分画遠心法にて単離した。すなわち浅胸筋を眼科用ハサミを用いて切り刻み、ペースト状にし、これに 4°C の buffer B を加え、Polytron にて 7,000 rpm、テフロンホモゲナイザーにて 600 rpm のホモゲナイザーをそれぞれ行い、ホモゲネートを 500 g、10 分間の遠心分離後の上清を回収した。この上清から骨格筋ミトコンドリアを単離した。なお全ての操作は氷上にて行った。avUCP ならびにミトコンドリアエネルギー代謝関連 mRNA 遺伝子発現は、RT-PCR 法にて定量的に測定した。avUCP のタンパク質発現量はウエスタンブロット法にて解析し、画像解析により定量化した。酸化による脂質とタンパク質の修飾について、過酸化脂質の分解産物であるマロンジアルデヒド (MDA) と酸化変性蛋白である蛋白質カルボニルを指標として調べた。なお、ミトコンドリア膜電位および酸素消費速度の測定は、TPMP<sup>+</sup>感受性電極ならびにクラーク型酸素電極を用いて PowerLab にて同時に測定した。

## 4. 研究成果

暑熱ストレス下での骨格筋  $O_2^{\cdot-}$  産生増加のメカニズムを解明するため、ミトコンドリアにおける  $O_2^{\cdot-}$  産生部位ならびにこれにともなう過酸化過程を定性的・定量的に確認した (Fig. 1, 3; Poultry Science 85:1259-1265, 2006)。

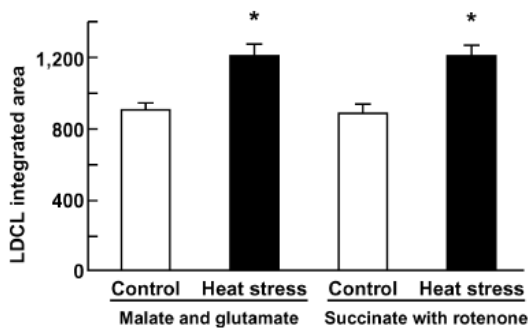


Figure 1. Lucigenin-derived chemiluminescence (LDCL) analysis of subsarcolemmal mitochondria isolated from skeletal muscle (pectoralis superficialis) of control and heat-stressed (34°C for 18 h) broilers. The LDCL was monitored continuously for 5 min after incubation of mitochondria with lucigenin (20 μM) for 5 min. The nicotinamide adenine dinucleotide- or flavin adenine dinucleotide-linked substrates were used to monitor LDCL as described in the Materials and Methods. The integrated areas under the curves are expressed as a ratio of mitochondrial protein. Values represent the mean ± SE of data from 4 broilers each. \**P* < 0.05 for heat-exposed group vs. control group.

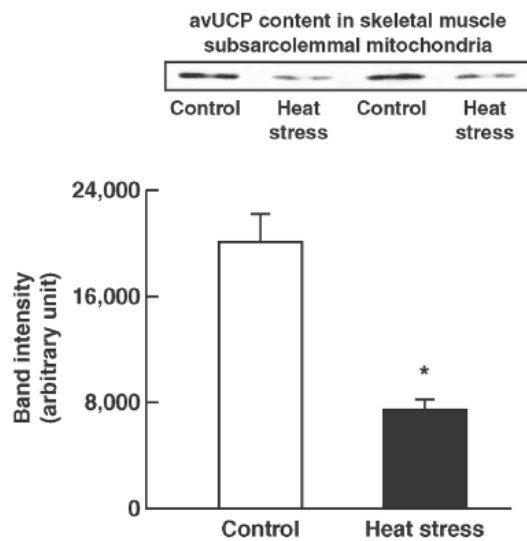


Figure 3. Immunodetection of avian uncoupling protein (avUCP) in the mitochondria of control and heat-exposed (34°C for 18 h) broilers. Mitochondria were isolated from skeletal muscles as described in the Materials and Methods, and 75 μg of mitochondrial protein was loaded onto a SDS-14% polyacrylamide gel. Western blot analysis was performed using anti-avUCP antibody. Values are the mean ± SE for 7 broilers in each group. \**P* < 0.05 for heat-exposed group vs. control group.

(Poultry Science 85:1259–1265, 2006 より)

暑熱ストレスが著しい18時間後においてROS産生は著しく上昇し、この産生制御能を有する鶏骨格筋UCPタンパク質の発現は低下した。このことから、この感作に伴うROS産生の増加にはUCPの発現低下が関与している可能性が示された。さらに、暑熱曝露後のROS産生とその産生制御タンパク質UCPの推移を調べた。

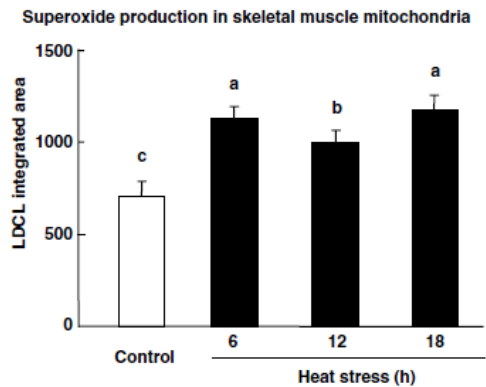


Fig. 2. Progressive changes in superoxide production in skeletal muscle mitochondria of chickens exposed to different durations of heat stress. LDCL was monitored continuously for 5 min after incubation of mitochondria with lucigenin (20 μM) for 5 min. Malate and glutamate were used as substrates to monitor LDCL (see Section

avUCP protein content in skeletal muscle mitochondria

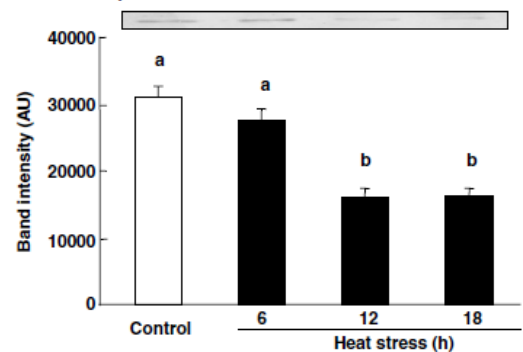


Fig. 4. Progressive changes in avUCP protein content of muscle SS mitochondria of chickens exposed to different durations of heat stress. Western blot analyses of mitochondrial protein (75 μg) were performed as described in Section 2. Values are means ± S.E. of 8 chickens. <sup>a,b</sup>*P* < 0.05 compared among groups for different durations of heat

stress

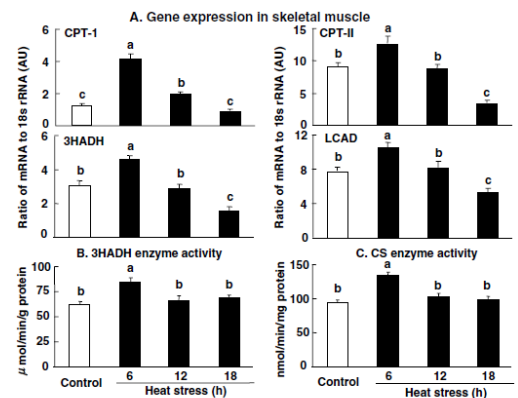


Fig. 5. Progressive changes in the expression of CPT-I, CPT-II, 3HADH and LCAD transcripts (A) in skeletal muscle of chickens exposed to different durations of heat stress. Values are means ± S.E. of 8 chickens. Results of real-time RT-PCR were normalized to 18s rRNA. <sup>a,b</sup>*P* < 0.05 compared among groups for different durations of heat stress. Progressive changes in the 3HADH (B) and CS (C) enzyme activities in skeletal muscle of chickens exposed to different durations of heat stress. Values are means ± S.E. of 8 chickens. <sup>a,b</sup>*P* < 0.05 compared among groups for different durations of heat stress. 3HADH: 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, CPT-I: carnitine-palmitoyl-transferase-I, CPT-II: carnitine-palmitoyl-transferase-II, CS: citrate synthase, LCAD: long-chain acyl CoA dehydrogenase.

(FEBS letters 581:3461–3467, 2007 より)

その結果、(1)暑熱感作初期(6時間後)のROS産生の増加はミトコンドリアにおける脂肪酸の急激なβ酸化の亢進により誘導されていること、(2)それ以降(12時間後)のROS産生の増加は脱共役タンパク質UCPのタンパク質レベルの発現の低下にもとづくことが示

唆された。このことから、暑熱曝露後いずれの時間においても骨格筋ミトコンドリアのROS産生は継続的に増大するが、その作用メカニズムは曝露時間に依存していることが分かった (Fig. 2, 4, 5; FEBS Letters 581:3461-3467, 2007)。

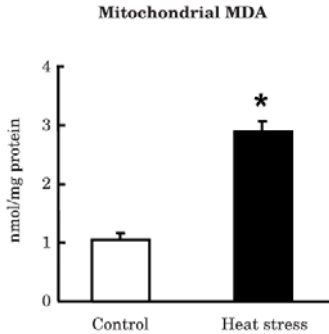


Fig. 1. Malondialdehyde (MDA) levels in pectoralis muscle mitochondria from control and heat-stressed chickens. Values represent the mean  $\pm$  SE of data from 4 chickens. \* $p < 0.05$  for heat-stressed group vs. control group.

なお、過酸化脂質の分解産物であるマロンジアルデヒド (MDA) と酸化変性蛋白である蛋白質カルボニルを指標として、急性暑熱ストレス下における鶏骨格筋のミトコンドリア脂質とタンパク質の酸化的損傷を調べたところ、暑熱曝露区でMDAの増加ならびにタンパク質のカルボニル化が進行していることが実証された。本実験により暑熱感作に伴う肉質の低下の一要因が明らかとなった (Fig. 1, 3; J. Poult. Sci. 44:439-445, 2007)。

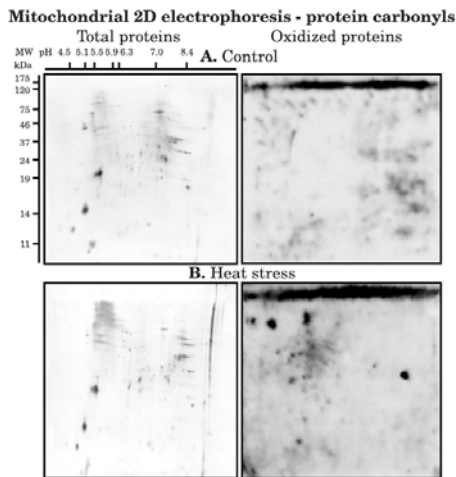


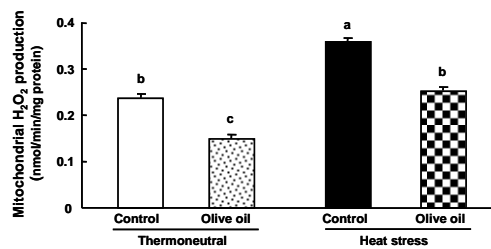
Fig. 3. Oxidatively modified mitochondrial proteins visualized by two-dimensional (2D) electrophoresis in control (A) and heat-stressed chickens (B). Mitochondrial protein was subjected to isoelectric focusing (7-cm IPG strips, pH 3-10NL) and proteins were subsequently separated by SDS-PAGE. 2D electrophoresis of mitochondria isolated from pectoralis superficialis muscles of control and heat-stressed chickens were silver stained or immunostained to visualize normal and oxidized proteins, respectively (samples were pooled from four birds).

(Fig. 1, 3; J. Poult. Sci. 44:439-445, 2007 より)

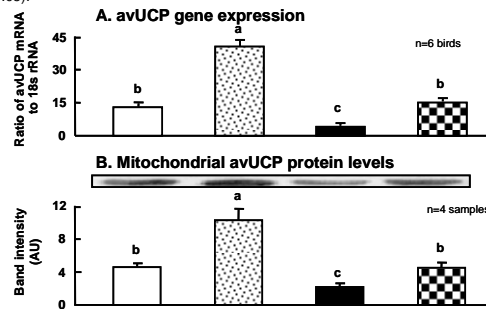
したがって、栄養素給与によるROS過剰産生ならびに肉質低下の制御には、曝露直後には基質酸化を抑制させるか、あるいはあらかじめUCP過剰発現を増強させることが有効で、また数時間後にUCPの発現を維持することが合理的であると考えられた。

そこで、飼料によるROSの過剰産生を制御するため、急性感作前鶏へオリーブ油を給与した。

その結果、急性暑熱感作による骨格筋ミトコンドリアROS産生や脂質過酸化の亢進作用は抑制された。この時、UCPタンパク質発現が誘導されていることが示された (下図参照)。



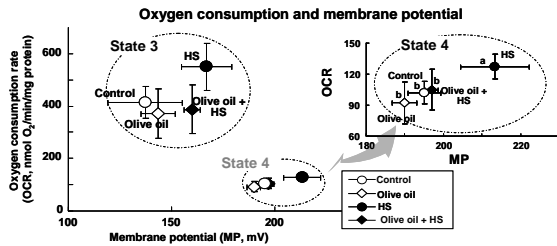
Hydrogen peroxide production in mitochondria isolated from chicken pectoralis superficialis muscle. Birds were fed a control or olive oil-supplemented (6.7%) diet for 8 days and then exposed to either thermoneutral (25° C) or heat stress (34° C) conditions for 12 h. Values are means  $\pm$  SE of 4 birds. a-c For each treatment, values with different letters are statistically different ( $p < 0.05$ ).



Changes in expression of avUCP in the pectoralis superficialis muscle. (A) avUCP gene expression and (B) Immunodetection of mitochondrial avUCP protein content in the pectoralis superficialis muscle.

(Fig. 2, 3; Am. J. Physiol. 2009 in press より)

さらに、この暑熱ストレスにともなうミトコンドリアROS産生増大やオリーブ油による抑制の分子生理学的メカニズムを明らかにするため、各実験区からの単離ミトコンドリア酸素消費速度ならびに膜電位を同時測定した結果、暑熱曝露やオリーブ油による活性酸素産生増大・抑制機構に、暑熱感作にともなうミトコンドリアの膜電位の上昇やこれを抑える作用が関与することが示された (次頁図参照)。



Oxygen consumption and membrane potential in state 3 (in the presence of ADP) and state 4 (in the absence of ADP), of mitochondria isolated from pectoralis superficialis muscle of the thermoneutral control- (○) and olive- (◇) fed groups and the heat-stressed groups fed control- (●) and olive- (◆) diets. Birds were fed experimental diets for 8 days and then exposed to either thermoneutral (25° C) or heat stress (34° C) conditions for 12 h.

(Fig. 4; Am. J. Physiol. 2009 in press より)

すなわち、暑熱ストレス下での $O_2^{\cdot-}$ 産生の増加の「仮説カスケード」、すなわち脱共役タンパク質低下→電位の上昇 →  $O_2^{\cdot-}$ 産生増大との流れのみならず、基質酸化→膜電位の上昇 →  $O_2^{\cdot-}$ 産生増大との流れが重なりあっていることが確認された。このように、暑熱ストレスにともなう細胞傷害には、脱共役タンパク質の低下や基質酸化の増大が、プロトンリークを低下させることに関与している可能性が考えられた。

また、急性感作前鶏へのCoQ10の給与によっても、UCPのタンパク質の発現にも変化が認められないものの、急性暑熱感作による骨格筋ミトコンドリアROS産生や脂質過酸化の亢進作用は抑制され、暑熱による生産性の低下も改善されることが実証された。

なお、急性暑熱暴露に伴う急激な生理的变化についても調べるために血液ガス分析を行ったところ、血中の $HCO_3^-$ や $pCO_2$ は低下したが、pHに変化は認められず、呼吸性アルカローシスとROS産生との間に直接的な大きな関係があるとは考えられなかった。

本研究により、急性暑熱感作により鶏骨格筋UCP活性が低下し、その結果酸化ストレスが誘導されるが、脱共役タンパク質UCPの発現や活性を栄養制御すると酸化ストレスが緩和され、暑熱による生産性低下の改善につながることを初めて検証した。急性暑熱感作に伴う鶏骨格筋ミトコンドリアROSの増大の発現機序とその栄養制御法を明示した本研究成果は、肉用鶏ブロイラー代謝特性の一端を実証しただけではなく、酸化ストレスの制御を基盤とする畜産物生産システムの確立に重要な情報を提供するものである。

## 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 7件)

- ① Mujahid A., Y. Akiba and M. Toyomizu/ Olive oil-supplemented diet alleviates acute heat stress-induced mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle/ American Journal of Physiology/ 査読有 /2009 /in press
- ② Mujahid A., Y. Akiba, M. Toyomizu / Progressive Changes in the physiological responses of heat-stressed broiler chickens. /J. Poult. Sci. /査読有 /46/2009/ 163-167
- ③ Phumon SOOKWONG, Kiyotaka NAKAGAWA Shin-ichi NAKAJIMA, Yoshikazu AMANO, Masaaki TOYOMIZU, and Teruo MIYAZAWA/ Tocotrienol Contents in Hen Eggs: its Fortification by Supplementing Rice Bran Scum Oil into Feeds. /Biosci. Biotechnol. Biochem. /査読有 /72(11)/2008/3044-3047
- ④ Mujahid A., Y. Akiba, Warden CH, M. Toyomizu / Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens. / FEBS Letters/査読有 /581/2007/3461-3467
- ⑤ MUJAHID A., N. R. Pumford, W. Bottje, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Y. Akiba, M. Toyomizu/ Mitochondrial Oxidative Damage in Chicken Skeletal Muscle Induced by Acute Heat Stress/ J. Poult. Sci. / 査読有 /44(4)/2007/439-445
- ⑥ Mujahid A, K. Sato, Y. Akiba, M. Toyomizu/ Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. /Poult sci. /査読有 /86/2007/364-371
- ⑦ Mujahid A., K. Sato, Y. Akiba, M. Toyomizu/ Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via down-regulation of uncoupling protein content. /Poult Sci. /査読有 /85/2006 /1259-1265

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU MASAOKI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80180199

(2) 研究分担者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20157639

(3) 連携研究者

なし