

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380165

研究課題名（和文） 暑熱ストレス下における環境適応型「肉養鶏」の創出：適応プロセスの改善プラン

研究課題名（英文） What dietary supplementation can acclimate broiler chickens to heat stress?

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（和文）：慢性暑熱ストレスにともなう生産性の低下を改善するため、暑熱時の ROS 過剰産生の制御法の開発を試みた。1）暑熱曝露後の肉用鶏の ROS（ H_2O_2 ）産生の経時的変化は曝露後 5-9d に過剰産生が見られた。2）0-1 日齢ブロイラー雄の浅胸筋より予定筋芽細胞を抽出し通常培養(37 °C)と高温培養(41°C)条件下で培養後、細胞内 ROS 産生量を調べた。高温区で ROS 産生量が増加したが、抗酸化剤(Tempol)を培地に添加すると、ROS 産生量の増加ならびにタンパク質量の減少が抑制された。3）暑熱感作により著しく低下した増体量および飼料摂取量は、グルタミンおよびグルタミン酸の給与で一部緩和された。また腸粘膜における「絨毛/陰窩」の割合は暑熱により低くなったが、アミノ酸給与により軽微ながら抑えられた。今後、下部消化管も含めた分子生物学的アプローチによる機能解析により、慢性暑熱ストレスの発現機序の解明と制御が可能となる

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to find a possible method to improve growth performance of broiler chickens exposed to chronic heat stress. 1) Mitochondrial ROS production for control group showed little changes during the experimental periods, whereas that for the heat-stressed group (34 °C) was increased after 3, 5 and 9 d of heat exposure and returned to original levels at 14d. 2) Myoblasts isolated from the pectoralissuperficialis muscles of 0-1 day old chicks were cultured and exposed to 41 °C for 6 h, resulting in increased ROS production and reduced protein content of the cells. These changes were attenuated by pretreatment of an antioxidant, Tempol for 1 h. 3) Supplementation of glutamine and glutamate to basal diets slightly but definitely alleviated decreases in body weight gain, food intake and, and ratio of the duodenal villus height to crypt depth of heat-stressed broiler chickens. Further biochemical studies including modifications of intestinal function are required to establish a method for alleviation of the stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：暑熱ストレス，地球温暖化対策，ミトコンドリア，抗酸化飼料，ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

地球レベルでの人口増加に対応して、安全な畜産食資源を、安定的に、かつ持続的に供給することは、新たな「畜産学・応用動物科学」の重大な使命である。今後、先端バイオ技術による生産力の飛躍的な向上に加え、「生産現場における負の変動」を統合的に極小化できれば、将来の動物生産にブレークスルーがもたらされる。現在、暑熱ストレスにともなう家畜・家禽生産の負の変動、すなわち生産性（量的・質的）の低下を改善した生産技術体系の確立が要請されている。この要請に応じて、動物（本研究では鳥類）の特異的酸化ストレス応答を分子栄養生化学的に解明し、家畜の環境適応力を賦活化させた食肉生産科学基盤の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、慢性暑熱ストレスにともなう生産性の低下を改善するため、暑熱時の ROS 過剰産生を支配するスイッチ群の機能発現に着目し、体温変化と飼料摂取と関連させてそのメカニズムを解明する。このため、系全体を栄養調節して環境適応の最適化のための基礎研究と応用研究を組み合わせ、食肉生産を根幹から制御できる実用的手法の開発に結びつける。

3. 研究の方法

(1) 慢性暑熱ストレス曝露時における ROS 過剰産生を制御するスイッチ群と体温の解析ため、すでに確立している慢性暑熱曝露モデルのブロイラー（2週齢時に6時間で25℃より32℃まで上昇させる）から曝露後0, 6, 12, 24hr, 3d, 5d, 10d, 14dにおけるROS産生ならびにミトコンドリアエネルギー代謝関連酵素の活性ならびに遺伝子発現を経時的に調査し、合わせてmtDNAコピー数（mtDNAにコードされるATPase遺伝子と核DNA(=18sRNA)の各部分配列の存在比率）の存在量、さらに活性酸素消去能を有するGPx, SOD活性を実測し、ROS産生機序を追及する。

(2) 筋細胞を用いた ROS 過剰産生の抗酸化・抗炎症物質による最適制御法の探索においては、培養温度の上昇により筋細胞

ROS 過剰産生を誘導し、系全体を抗酸化・抗炎症物質および栄養素で ROS 産生を調節する手法の開発を試みた。具体的には、0日齢肉用鶏雄浅胸筋より骨格筋細胞を抽出し、前培養後、45,000 cells/cm²の濃度で播種し、10%のFBSを含む混合培地でサブコンフルエントになるまで培養した。まず、試験開始時には培地を無血清のものに交換し、対照区は37℃、高温区は41℃の温度条件でそれぞれ6時間培養した。試験培養終了後、蛍光試薬のCM-H₂DCFDAを用いた細胞内ROSの産生量、BCA法によるタンパク質量、リアルタイムPCR法による遺伝子発現量実測した。

次いで、抗酸化物質による抗酸化ストレス効果を検証するため、高温曝露の前に、Tempolを添加培地で1時間の前培養を行い、その後、次の予備実験と同様に、高温区では41℃の温度条件で6時間培養し、細胞内ROS産生量、タンパク質量を測定した。

(3) 最後に、暑熱ストレスより酸化ストレスを軽減できる飼料素材を各種給与して、暑熱にともなう飼料摂取量の低下の軽減策、ならびに過酸化の制御について調べた。実験は、いずれも慢性暑熱曝露モデルのブロイラー（2週齢時に6時間で25℃より33℃まで上昇）に33℃6-7d暑熱感作を行ない、試験区には抗酸化物質やアミノ酸をあらかじめ給与し暑熱ストレス時のROS過剰産生、飼料摂取を統合的に制御する手法の開発を試みた。

4. 研究成果

暑熱曝露にともなう肉用鶏のROS (H₂O₂) 産生は、曝露後5-9dにROSが過剰に産生され (Fig. 1)、この産生にはミトコンドリア膜電位上昇が関与しており、この上昇にはミトコンドリアにおける基質酸化速度の上昇ならびにANT発現低下によるプロトンリークの低下が関与していることを明らかにした。またROS産生は14dには暑熱区と対照区の間には差は認められず (Fig. 1)、過酸化状態が続けば代謝活性がフィードバック制御されていることがCSや3HADH活性の低下 (Fig. 1) から推察され、また慢性暑熱時の過酸化の程度は、急性暑

熱時と比較して予想に反して低いことも示された。

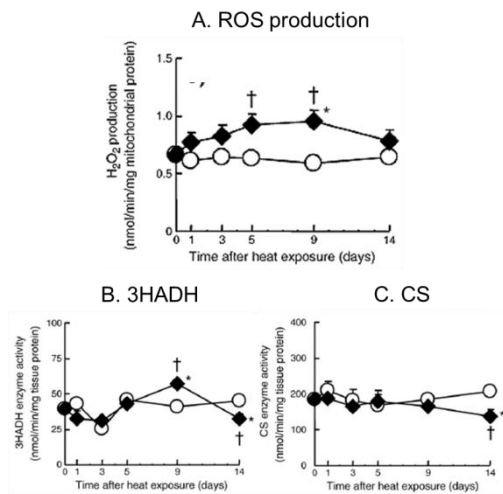


Fig. 1 Time course of changes in mitochondrial ROS (H_2O_2) production (A) and activities of 3HADH (B) and CS (C) for control (○) and heat-stressed (●) broiler chickens. Readings were after 0, 1, 3, 5, 9, and 14 days of constant exposure to 34 °C. Values are means \pm SE from 4 chickens per treatment and for 8 chickens at the time=0 baseline. * $P < 0.05$ compared with chickens at the time 0 baseline. † $P < 0.05$ compared with chickens of the same age, kept at thermo-neutral temperature (24 °C) for each time period.

多数の資材候補の評価には *in vivo* 試験では膨大な労力と時間を要する。このため、*in vitro* 試験モデルの開発の必要がある。筋細胞における ROS 過剰産生の抗酸化・抗炎症物質による最適制御法を開発するため、0-1 日齢ブロイラーオスの浅胸筋より予定筋芽細胞を抽出し、80~90%コンフルエントになるまで培養後、通常培養 (37 °C) と高温培養 (41 °C) 条件下で細胞内 ROS 産生量を調べた。その結果、高温区で ROS 産生量が増加することが示され、筋細胞 ROS 過剰産生誘導-暑熱モデルが作成できた (Fig. 2)。

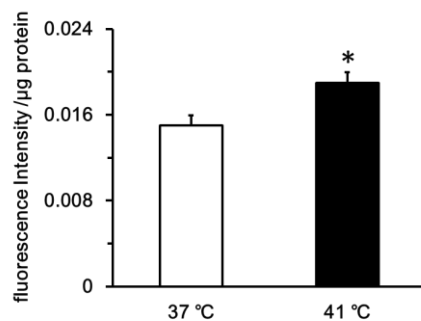


Figure 2. Effect of heat stress on cellular ROS production in chick skeletal muscle cells. The cells were incubated at 37 or 41 °C for 6 h. Values are the means \pm SE for three replicates. * $P < 0.05$ for 41 °C vs. 37 °C.

さらなる追加実験においても、41 °C 区で ROS 産生量の増加が認められ、その時の細

胞のタンパク質量の減少、また、これまでの急性暑熱 *in vivo* 試験と同様に avUCP の mRNA 発現量の減少が認められた (Fig. 3)。

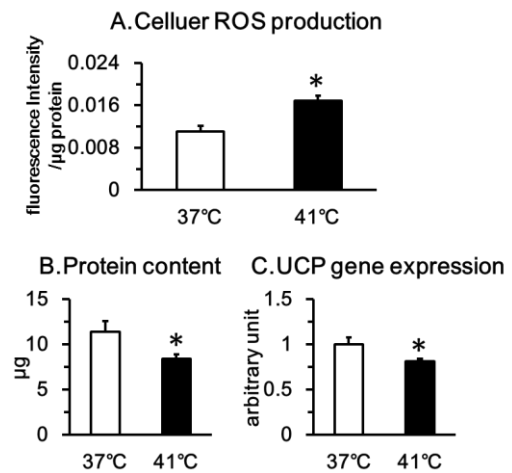


Figure 3. Effect of heat stress on (A) cellular ROS production, (B) protein content and (C) UCP gene expression in chick skeletal muscle cells. The cells were incubated at 37 or 41 °C for 6 h. Values are the means \pm SE for eight replicates. * $P < 0.05$ for 41 °C vs. 37 °C.

そこで、機能性資材による ROS 産生制御の可能性を検討するため、抗酸化剤 (Tempol) を培地に添加し、1 h の前培養を行った後、同様に高温曝露した。その結果、高温時における ROS 産生量の増加ならびにタンパク質量の減少が Tempol 添加により抑制された (Fig. 4)。このように、*in vitro* 試験においても *in vivo* 急性暑熱条件下と同様の生体応答が認められ、さらに抗酸化剤添加により ROS 過剰産生が抑制されたことから、本モデルは機能性資材のスクリーニングモデルとして有用であることが示された。

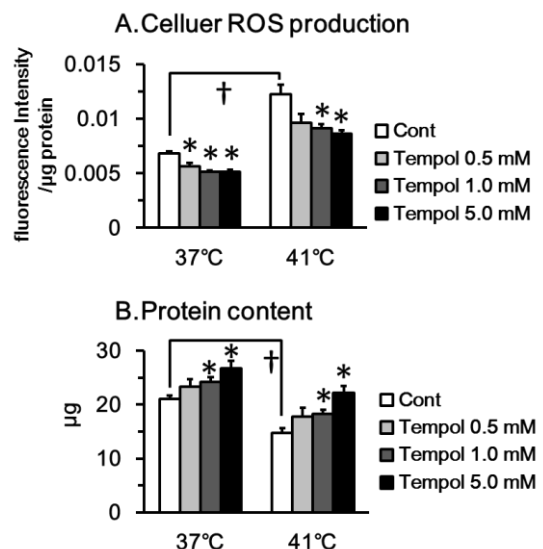


Figure 4. Effect of heat stress on (A) cellular ROS production and (B) protein content in chick skeletal muscle cells. The cells were pretreated with the indicated concentrations of Tempol for 1 h. Later, the cells were incubated at 37 or 41 °C for 6 h. Values are the means \pm SE for four replicates. * $P < 0.05$ vs. Cont.

さらに、暑熱にともなう飼料摂取量の低下や過剰な酸化の軽減策を見出すため、各種飼料素材を給与した。具体的には、慢性暑熱時における骨格筋に加え肝臓ならびに栄養素吸収の場である小腸粘膜の各ミトコンドリア機能を調査するとともに、グルタミンおよびグルタミン酸の同時給与によって暑熱ストレスを緩和できるか否かを検証した。実験は肉用鶏を用い、まず、23日齢より33°C、6 d慢性暑熱感作(対照区:24°C)し、骨格筋、肝臓、小腸粘膜における各ミトコンドリアのエネルギー代謝応答を調べた。次に12日齢からグルタミンおよびグルタミン酸を給与した区(アミノ酸区)を新たに設け、先の試験とほぼ同様の条件下(20日齢、33.0°C、7 d)で慢性暑熱感作した。その結果、暑熱感作によって増体量および飼料摂取量が著しく低下するとともに、飼料効率も有意に低下した。浅胸筋ミトコンドリアでは、これまでの結果と異なり暑熱によってROS(H₂O₂)産生量は増加しなかったが、ATP合成速度が低下し、肝臓ミトコンドリアではROS産生量・ATP合成速度とも低下した。これに対し、小腸粘膜ミトコンドリアではこれらの低下は認められずむしろやや増加することが示された。また、暑熱によって、腸粘膜における陰窩に対する絨毛の長さの割合(絨毛/陰窩)が低くなった。続く試験では、グルタミンおよびグルタミン酸の給与により、暑熱にともなう増体量・飼料効率の低下が一部緩和された。さらに、暑熱時の小腸粘膜ミトコンドリアROS産生量の増加ならびに絨毛/陰窩の低下もこれらのアミノ酸給与により軽微ながら抑えられた(Fig. 5)。

このように、慢性暑熱感作にともなう増体量の低下には、小腸粘膜におけるミトコンドリアROS産生量の増加や形態変化が関与し、さらにグルタミン+グルタミン酸はこれらの変化を抑制し、暑熱時の増体を改善する可能性が示された。

なお、ニワトリにおける摂食亢進因子である性腺刺激ホルモン抑制ホルモン(GnIH)の視床下部におけるmRNAの発現動態の暑熱感作に伴う変化などについても検討したが、間脳におけるGnIH前駆体mRNAの発現は、摂食量が有意に抑制された24および48時間のヒナで有意に増加しており、この変化が暑熱感作による直接の影響というよ

りも暑熱感作による摂食抑制による影響と考えられた。さらに暑熱と摂取量の低下との関係を明らかにする必要があることが示唆された。

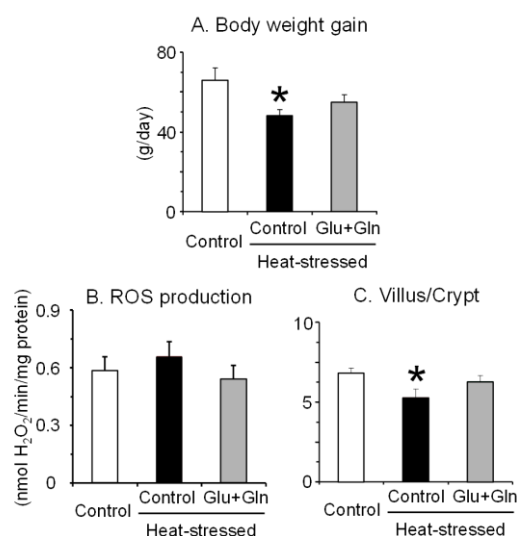


Figure 5 Results of body weight gain (A), and mucosa mitochondrial ROS (H₂O₂) production (B) and the ratio of villus height to crypt depth (C) in duodenum from thermoneutral birds fed control diet (control), and heat-stressed birds fed either control diet (control) or amino acid-supplemented diet (Glu+Gln). Values are means ± SE. *P < 0.05 vs thermoneutral control group.

今後、新たな食肉生産向上技術の実用化へ向けて、下部消化管機能解析も含めた分子生物学的アプローチにより、慢性暑熱ストレスの発現機序の解明と制御の研究はさらに進展し、「新たな食肉生産向上のシステム」の構築が可能になるものと考えられる。

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8件)

① Vishwajit S. Chowdhury, ShozoTomonaga, Shotaro Nishimura, Shoji Tabata and Mitsuhiro Furuse/ Physiological and Behavioral Responses of Young Chicks to High Ambient Temperature / J. Poult. Sci. / 査読有/in press/2012

② Vishwajit S. Chowdhury, ShozoTomonaga, Shotaro Nishimura, Shoji Tabata, John F. Cockrem, Kazuyoshi Tsutsui, Mitsuhiro Furuse/ Hypothalamic gonadotropin-inhibitory hormone precursor mRNA is increased during depressed food intake in heat-exposed chicks / Comparative Biochemistry and Physiology, PartA/査読

有/162:227-233/2012

- ③ Masaaki Toyomizu, Motoi Kikusato, Yusuke Kawabata, Md. AbulKalam Azad, Eriko Inui, TakuAmo / Meat-type chickens have a higher efficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation than laying-type chickens / Comparative Biochemistry and Physiology, PartA/査読有/159: 75-81/2011
- ④ Motoi Kikusato, Jon J. Ramsey, TakuAmo, Masaaki Toyomizu /Application of modular kinetic analysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of birds exposed to acute heat stress / FEBS Lett. /査読有/584: 3143-3148/2010
- ⑤ 喜久里 基、豊水正昭/急性暑熱にともなう鶏骨格筋における ROS 過剰産生機構の解明/家畜栄養生理研究会報/査読有/54:57-66/2010
- ⑥ Md. AbulKalam Azad, Motoi Kikusato, Azharul M. Hoque, Masaaki Toyomizu/Effect of Chronic Heat Stress on Performance and Oxidative Damage in Different Strains of Chickens /J. Poult. Sci./査読有/47:333-337/2010
- ⑦ Md. AbulKalam Azad, Motoi Kikusato, Takahiko Maekawa, Hitoshi Shirakawa, Masaaki Toyomizu / Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress /Comparative Biochemistry and Physiology, Part A/査読有/155: 401-406/2010
- ⑧ Md. AbulKalam Azad, Motoi Kikusato, Shota Sudo, TakuAmo, Masaaki Toyomizu /Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken /Comparative Biochemistry and Physiology, Part A/査読有/157:266-271/2010

[学会発表] (計4件)

- ① 吉田隼巳/鶏骨格筋細胞を用いた暑熱ストレスモデルの構築/日本畜産学会第115回大会/2012.3.28/名古屋大学(名古屋市)
- ② 中山泰史/慢性暑熱下における鶏小腸粘膜のミトコンドリア代謝応答の組織特異性ならびにグルタミンおよびグルタミン酸同時給与による暑熱ストレス緩和作用の検証/日本家禽学会2012年春季大会/2012.3.30/名古屋大学(名古屋市)
- ③ 豊水 正昭/Mitochondrial energetics and ROS production in chicken skeletal muscle: application of modular kinetic

analysis/3rd EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition Parma (招待講演)/2010.9.6/パルマ(イタリア)

- ④ 喜久里 基/Mechanistic analysis of mitochondrial ROS production in chicken skeletal muscle under acute heat stress conditions/3rd EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition Parma/2010.9.6/パルマ(イタリア)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ

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

なし

(3) 連携研究者

古瀬 充宏 (HURUSE MITSUHIRO)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 30209176

高橋 和昭 (TAKAHASHI KAZUAKI)
山形県立米沢女子短期大学・健康栄養学
科・教授
研究者番号: 80183440