

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14981

研究課題名（和文）小胞体ストレス軽減鶏の耐暑熱メカニズム解明と有用資源探索

研究課題名（英文）Elucidation of Heat Tolerance Mechanisms and Exploration of Useful Resources in Endoplasmic Reticulum Stress-alleviation Chickens

研究代表者

徳武 優佳子（Tokutake, Yukako）

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90824657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では暑熱下のブロイラーにおける小胞体ストレス抑制効果を明らかにする他、熱誘導性の小胞体ストレスを軽減する資源の探索を目指した。急性暑熱曝露により組織・臓器における小胞体ストレスは増加した一方、タウロウルソデオキシコール酸（TUDCA）を給与したブロイラーでは体温抑制は起こらなかった。また、天然化合物ライブラリを用いて小胞体ストレス誘導遺伝子の転写抑制に寄与する化合物を探索したところ、植物由来フェニルプロパノイドが熱誘導性ストレスを緩和する可能性が示唆された。したがって、小胞体ストレスと熱ストレスとの関連性の一端が明らかになった他、小胞体ストレス減弱化に働く天然化合物の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

暑熱研究の中でも、家畜の熱射病自体の軽減を目的とする研究は少ない。昨今、温暖化による異常気象も相まって、地球規模で暑熱問題の解決が必要とされている。本研究は、家畜の健康を害し、死に至る危険のある熱射病のメカニズムの一端を解明した点で意義がある。また、小胞体ストレスは飼料の内容によって低減可能である。小胞体ストレス軽減効果のある資源を用いれば、ストレスの低減が可能であると考えられるが、小胞体ストレス軽減効果を持つ天然資源の利用はニワトリでは行われていなかった。本研究で同定された植物由来成分は、ニワトリで小胞体ストレスの軽減に関わる可能性があり、学術的・産業的に意義のある知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to determine the effects of ER stress suppression in broilers exposed to acute heat and to screen for resources to reduce heat-induced ER stress. Acute heat exposure increased endoplasmic reticulum stress in tissues, while broilers fed tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), which act as ER stress alleviator did not experience suppression of body temperature. Screening for compounds that contribute to transcriptional repression of endoplasmic reticulum stress-induced genes using a natural compound library suggested that one plant-derived phenylpropanoids may alleviate heat-induced stress. Therefore, we have clarified the relationship between endoplasmic reticulum stress and heat stress, and have also succeeded in screening natural compounds that act to attenuate endoplasmic reticulum stress.

研究分野：動物栄養生理学

キーワード：小胞体ストレス 暑熱 ブロイラー タウロウルソデオキシコール酸 肉用鶏

1. 研究開始当初の背景

ブロイラー経営では、夏季の熱射病発生が大きな経済的損失となっている。鳥類は汗腺がなく羽毛に覆われた、暑熱に不利な身体的特徴を持つ。加えてブロイラーでは、育種改良による大型化、高密度での飼育や輸送、鶏舎のウインドウレス化が暑熱への脆弱性に拍車をかけており、各地で猛暑・酷暑が原因の熱射病が多発している。この解決策として、冷却・送風設備の設置が積極的に進められる一方、高額な設備投資は生産現場に与える負担が著しい。その点、生産プロセスに取り入れやすい飼料組成の最適化は、安価かつ短時間で効果を得られ、世界的規模で応用可能である。

極度の暑熱下にあるニワトリでは、視床下部が起点となり、あえぎ呼吸による気化冷却・心拍数増加によって放熱を図る。他方で、腸管からのエンドトキシンの流入に伴う中枢・末梢での炎症の誘発(1)、骨格筋における Ca^{2+} イオンバランスの不均衡に伴う収縮異常(2)などが生じると、体温調節を制御できなくなる。細胞レベルでは、熱刺激によってタンパク質構造に変性が生じ、これを是正する“熱ショック応答”が起こる。熱刺激下における細胞内恒常性の維持は生存において不可欠であるが、タンパク質フォールディングの場として重要な役割を果たす小胞体の恒常性にはほとんど注目されてこなかった。我々はごく最近、暑熱状態にあるブロイラーの組織・臓器で“小胞体ストレス応答”が起きていることを発見した。すなわち、熱刺激は小胞体でも、変性タンパク質の蓄積、 Ca^{2+} イオン代謝異常などが原因のストレス状態(=小胞体ストレス)を引き起こし、細胞生存を脅かしていると考えられた。そこで、小胞体ストレスの影響を調べるため、小胞体ストレス緩和剤として知られる4-フェニル酪酸(4-Phenylbutyric acid: 4-PBA)を暑熱感作前のブロイラーに与えたところ、暑熱感作に伴う体温上昇が抑制された。これは熱射病軽減に関わる重要な発見である一方、なぜ体温上昇の軽減されたのか、小胞体機能の関与を考慮しても全く不明であった。

2. 研究の目的

なぜ小胞体ストレスの軽減が体温上昇の抑制に働いたのか、小胞体ストレスと暑熱下における体温調節との関連性を明らかにし、熱射病発生を低減可能な飼料管理を実現するため、暑熱下のどの組織で、小胞体ストレスがどのように体温調節に影響したか精査し、ブロイラーに対し小胞体ストレス軽減効果のある、飼料添加可能な資源を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

試験1. ブロイラー(ROSS)のオスを供試し、36 湿度 60%、2時間の暑熱区を設けた。4-PBAを10日間給与したのち急性暑熱感作を行い、産熱・放熱に関わる摂食量、飲水量、排泄量への影響を調査した。続いて、体温調節に関わる間脳、骨格筋、腸管において、4-PBAよりも安価かつ、小胞体ストレス軽減効果のある胆汁酸(TUDCA)を給与した際に小胞体ストレス軽減が起きているかどうか遺伝子発現を調べた。

試験2. 熱刺激下における小胞体ストレスの軽減効果を効率的に探索可能な*in vitro*系として、小胞体ストレスマーカー: GRP78遺伝子のプロモーター活性を利用したスク

リーニングモデルを作成し、ニワトリ胚線維芽細胞に導入した。細胞は暑熱下のプロイラーの体温と同様の温度（44-45℃）で2時間程度培養し、ルシフェラーゼアッセイによって活性を測定した。続いて、100種類の既知の化合物からなる天然化合物ライブラリを培地中に添加した際、GRP78プロモーター活性に生じる影響を定量した。

4. 研究成果

試験1. 4-PBAを10日間給与した区では、急性暑熱に曝露した後の摂食量、飲水量、排泄量に、対照暑熱区と比較して有意な差は得られなかった。また、急性暑熱区では、間脳、骨格筋、腸管いずれの組織でも小胞体ストレス関連遺伝子であるGRP78の発現が3~4倍程度増加していた。一方、TUDCA給与によって有意なGRP78の発現抑制が確認されたのは間脳だけであった。また、TUDCA給与では体温上昇の抑制効果は見られなかった。したがって、間脳での小胞体ストレス軽減は体温抑制に寄与しないことが明らかとなった。4-PBAは暑熱下にあるニワトリの摂食、飲水、排泄量に影響を及ぼさないことから、代謝熱などの異なる機構に影響していた可能性が考えられる。また、TUDCAは4-PBAと同様に小胞体ストレスの緩和効果を持つことが知られる化合物であるが、今回の試験結果で体温抑制効果が得られなかった原因として、生体にとっての適正量でなかったことが考えられる。

試験2. ニワトリGRP78遺伝子の転写開始部位より-1,000bp領域をクローニングし、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、37℃と比較して44℃では発光が減弱化した。この原因に、熱変性によるルシフェラーゼの失活が考えられたため、熱に強いトゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼを用いたスクリーニング系を確立した。

上記の系を用いて、天然化合物ライブラリよりGRP78プロモーター活性を低減する化合物を探索したところ、18種類の化合物がこれに該当し、さらに14種類の化合物が細胞毒性を示さないことが明らかとなった。

中でも、ローズマリー (*Salvia rosmarinus*) 由来フェニルプロパノイドの一種である化合物では、その添加によって小胞体ストレス応答経路の一つであるIRE1の活性が増強し、熱誘導性GRP78の転写活性が抑制されている可能性があることが明らかとなった。IRE1の活性化ターゲットである転写因子、XBP1は小胞体ストレス緩和のために働いており、様々な遺伝子の転写促進をすることによって小胞体恒常性を維持している。熱誘導性GRP78の転写活性や遺伝子発現が減少した背景には、XBP1の活性化に伴い何らかの小胞体ストレス緩和機構が代償的に作用した可能性が考えられる。

本研究によって、体温調節に関わる組織と小胞体ストレスとの関連性の一端が明らかになった他、小胞体ストレス減弱化に働く可能性のある天然化合物の同定に成功した。

<引用文献>

- (1) Leon and Bouchama, Heat stroke. *Compr Physiol.* 5(2):611-47, 2015.
- (2) Yamazawa *et al.*, *Nat commun*, 13;12(1):4293, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yukako Tokutake, Ryo Takanashi, Motoi Kikusato, Masaaki Toyomizu, Kan Sato	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Dietary 4-Phenylbutyric Acid Supplementation on Acute Heat-Stress-Induced Hyperthermia in Broiler Chickens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 2056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani12162056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳武 優佳子, 河野 涼香, 喜久里 基, 佐藤 幹
2. 発表標題 暑熱環境下における肉用鶏ブロイラーの脂質代謝特性の変化
3. 学会等名 日本家禽学会 2022 年度秋季オンライン大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎傑, 阿部知夏, 河野涼香, 佐藤幹, 徳武優佳子
2. 発表標題 慢性暑熱ブロイラーの脂肪組織・細胞における脂質代謝関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本畜産学会第131回年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------