

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880003

研究課題名（和文）鶏の暑熱適応における脱共役タンパク質の生理的役割および
発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on the role of avian uncoupling protein in heat stress-induced
overproduction of mitochondrial reactive oxygen species and the
regulation mechanism of the expression in birds

研究代表者

喜久里 基 (KIKUSATO MOTOI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：90613042

研究成果の概要（和文）：これまでに研究代表者らは、急性暑熱感作にともなう肉用鶏の骨格筋ミトコンドリアにおける活性酸素種（reactive oxygen species、ROS）の過剰産生は、膜電位上昇によってもたらされること、さらにこの上昇には鶏特異的脱共役タンパク質（avian uncoupling protein、avUCP）の発現低下にともなうプロトンリーク反応の低下が関与していることを明らかにしている。本研究では、先天的に avUCP 発現が高い産卵鶏ならびにオリーブオイル+オレウロペイン給与によって avUCP 発現を上昇させた肉用鶏を急性暑熱感作しても、これら鶏の骨格筋ではミトコンドリア ROS 過剰産生が抑制されることを実証し、avUCP が暑熱時の酸化ストレス発症抑制に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：On exposure of meat-type chickens to heat stress, avian uncoupling protein (avUCP) expression in the skeletal muscle was decreased, which was involved in the overproduction of mitochondrial reactive oxygen species production (ROS) probably via an increase in the mitochondrial membrane potential. This study demonstrates that the heat stress-induced overproduction of mitochondrial ROS did not occur in the muscle mitochondria of laying-type chickens, whose avUCP expression is relatively higher than that of meat-type ones, and in mitochondria of meat-type chickens whose avUCP expression was up-regulated with dietary intake of olive oil and oleuropein. From these results, it is conceivable that avUCP expression may play an important role in suppressing the overproduction of mitochondrial ROS and oxidative damage caused by heat exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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、酸化ストレス、脱共役タンパク質、活性酸素、ミトコンドリア、プロトンリーク、膜電位

1. 研究開始当初の背景

家禽は、哺乳類とは異なり、汗腺がない、全身が羽毛に包まれているなどといった生物学的特性により、効率的な熱放散ができない。さらに、現在日本国内で生産されている家禽は最適環境下での生産性向上を目指して選抜されているため、外部環境に対する適応能が低い。このため、夏季などの高温環境下ではその環境適応能が破綻し、熱死や成長・肉質の低下が生じる。山崎らの報告では、現在進行中の地球温暖化によって、夏季の鶏肉生産性は早くとも 2020 年には日本全土において最大 15%低下することが予測されている（日本畜産学会報 2006）。2010 年に日本全土を襲った酷暑が記憶に新しいように、近年激化の様相を示す夏季の高温環境下においても鶏肉生産を維持・確保することは農学に課せられた大きな課題である。

2. 研究の目的

暑熱環境下における鶏肉の量的・質的低下すなわち暑熱ストレスを防ぐために、古くから生産現場では飼料や給餌方法を工夫するなどの対処策を講じてきたが、依然として暑熱ストレスを完全に制御できる飼養技術は確立されていない。これまでに、研究代表者らのグループは暑熱下の肉用鶏は酸化ストレスを発症し（Mujahid et al., 2007）、さらにこの発症度が高いほど増体量が低いことも見出している（Azad et al., 2011）。したがって、増体量低下を防ぐために酸化ストレスの制御が重要であると考えられ、実際、電解還元水の給与によって酸化ストレス発症を抑えると、増体量が一部回復することを実証している（Azad et al., 2013）。

酸化ストレスは細胞における抗酸化防御力を上回る量の活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）が産生されることで生じる。これまでに、急性暑熱感作時の鶏骨格筋の酸化ストレス発症はミトコンドリアにおける ROS（mitROS）の過剰産生によって生じること（Mujahid et al., 2005）、さらに、この過剰産生にはミトコンドリア膜電位の上昇が大きく関与していること（Mujahid et al., 2009; Kikusato et al., 2010）、また、膜電位上昇は、鶏特異的脱共役タンパク質（avUCP）の発現低下にともなうプロトンリーク反応の低下によってもたらされることが明らかになっている（Kikusato et al., 2013）。つまり、急性暑熱感作時には、avUCP 発現量の低下→プロトンリーク反応の低下→膜電位の上昇→mitROS 過剰産生のプロセスによって酸化損傷が引き起こされる。したがって、暑熱時の酸化ストレスを制御するためには、avUCP 発現低下を抑制し、mitROS 過剰産生を制御することが重要であると考

えられる。

そこで本研究では、まず i) avUCP 発現が急性暑熱感作時の mitROS 過剰産生の制御において重要な役割を担っているか否かを avUCP 発現が先天的に高い産卵鶏を用いて検証し、つづいて ii) オリーブオイルおよびその特有ポリフェノール成分オレウロペインの給与によって avUCP 発現を上昇させた肉用鶏を急性暑熱感作し、その骨格筋 mitROS 産生応答を詳細に調べた。

3. 研究の方法

(1) 孵卵場より 0 日齢のオス肉用鶏（Ross strain）ならびにオス産卵鶏（White leg horn, WLH）を導入し、各々に適した市販飼料（主成分：トウモロコシ・大豆粕）を給与し肉用鶏は 3 週齢、産卵鶏は 9 週齢まで飼育した。両鶏はその後 24 °C・湿度 55±10%の環境温度制御室に移した後、市販飼料（粗タンパク質含量 19%、代謝エネルギー含量 2,900 kcal/kg）をそれぞれ 1 週間給餌した。両鶏をそれぞれ 2 区に分け、片方の区を通常環境下（24 °C）で、残りの区を急性暑熱環境下（34 °C、12 h）で同時に飼育した。いずれの実験期間においても、水および飼料は自由摂取とし、24 時間照明下で飼育した。

暑熱感作後直ちに放血屠殺した後、浅胸筋を採取し、分画遠心法によって骨格筋ミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアはカリウム主体の反応溶液（pH7.2、脂肪酸不含 BSA 0.3%）中に 0.5 mg mitochondrial protein/ml となるよう懸濁した後、呼吸基質としてコハク酸、グリセロール 3 リン酸（G3P）を添加した。ミトコンドリア ROS 産生は蛍光プローブ amplex red（Ex./Em. = 544/590 nm）を用いて定量し、プロトンリーク反応はポーラログラフ式酸素電極・TPMP⁺膜電位感受性電極を用いた溶存酸素濃度・膜電位の同時測定によって解析した。プロトンリーク反応の解析は、基礎状態（basal）および UCP 活性を増大させるアラキドン酸（Lombardi et al., 2009）を添加した状態（avUCP activated）のそれを各々測定した。また、浅胸筋の一部は液体窒素中において凍結粉碎し、過酸化脂質およびタンパク質カルボニル化含量の測定に供試するまで -80 °C で保存した。なお、過酸化脂質含量は TBARS 法によって、カルボニル化タンパク質含量は DNPH を用いて定量した。

(2) 孵卵場より 0 日齢のオス肉用鶏（Ross strain）を導入し、トウモロコシ・大豆粕からなる肉用鶏用市販飼料（粗タンパク質含量 23%、代謝エネルギー含量 3,050 kcal/kg）を 11 日間給餌した。つづいて、鶏は（1）と同様に環境温度制御室に移し、大豆油あるいはオリーブオイルを 12.7%含む高油脂飼料（粗タンパク質含量 23%、代謝エネルギー含量

3,300 kcal/kg) ならびにオリーブオイルに加えオリーブオイルの特異的ポリフェノールであるオレウロペインを 10 ppm 添加した飼料を 10 日間給餌した。各飼料区を 2 区分け、片方の区を通常環境下 (24 °C) で、残りの区を急性暑熱環境下 (34 °C、12 h) で同時に飼育した。いずれの実験期間においても、水および飼料は自由摂取とし、24 時間照明下で飼育した。放血屠殺後におけるミトコンドリア単離・機能解析および生化学分析は (1) と同様に行った。

4. 研究成果

(1) ①急性暑熱感作によって、肉用鶏、産卵鶏ともに体重は有意に減少したが、その減少度は肉用鶏に比べ産卵鶏では有意に小さかった。飼料摂取量は両鶏ともに暑熱感作によって減少し、鶏系統間における差異はほとんど認められなかった。また、体温は肉用鶏では暑熱感作によって約 2.5 °C 上昇した一方で、産卵鶏ではほとんど変化が認められなかった。

②両鶏における暑熱時の骨格筋ミトコンドリアプロトンリーク反応の違いを評価した。単離浅胸筋ミトコンドリアにおけるプロトンリーク反応を測定した結果、肉用鶏ではまず基礎プロトンリーク反応 (basal) において、同一膜電位における酸素消費速度は通常環境 (24°C) 区と暑熱 (34°C) 区の違いが認められなかった (Fig. 1A)。この結果より、肉用鶏骨格筋ミトコンドリアにおける基礎プロトンリーク反応は暑熱感作時でも変化しないことがわかり、これはこれまでの報告 (Kikusato et al., 2010) と一致する。つづいて、avUCP を活性化した状態 (avUCP activated) でプロトンリーク反応を測定した結果、いずれの区の酸素消費速度も著しく増加したが、その増加は 24°C 区に比べ 34°C 区では明らかに低かった。本試験では、ミトコンドリア内膜に存在し脱共役活性を有する ANT (adenine nucleotide translocator) を阻害する cAtr (carboxyatractyoside) を添加しているため、Fig. 1A で示される暑熱感作時の avUCP activated プロトンリークの低下は avUCP 発現低下によると考えられる。

一方、産卵鶏におけるプロトンリーク反応は、basal・avUCP activated いずれの状態においても、24°C 区と 34°C 区にほとんど違いが認められなかった (Fig. 1B)。この結果より、産卵鶏では暑熱時でも avUCP 活性が維持されていることが示唆された。

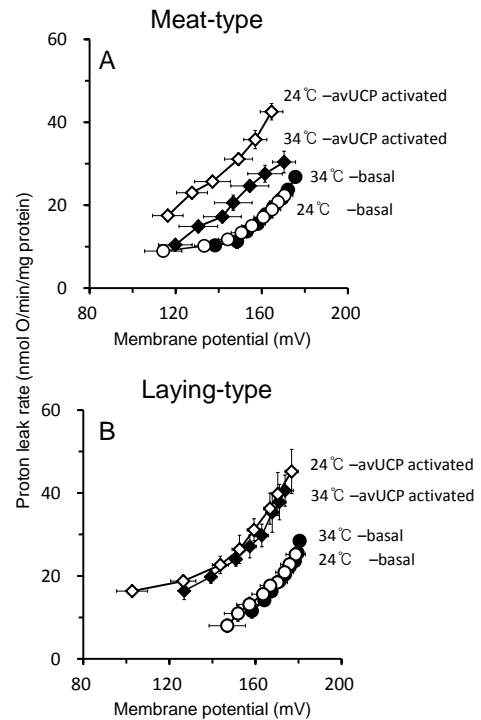


Fig. 1 肉用鶏 (A)・産卵鶏 (B) における急性暑熱曝露時の骨格筋ミトコンドリアにおける基礎 (basal) および avUCP 介在性 (avUCP activated) プロトンリーク反応。(○/◇: 24°C、●/◆: 34°C)。Means ± SE, n=4.

③プロトンリーク反応の結果より、産卵鶏では暑熱時でも avUCP 活性が維持されていることが示され、mitROS 過剰産生が抑制されていると予想される。つづいて、この点を検証するため、avUCP 活性化時の mitROS 産生量を調べた。FADH₂ を生成するコハク酸およびグルセロール 3リン酸をミトコンドリアに添加すると、これまでの報告と同様に肉用鶏では暑熱感作によって添加時の mitROS 産生量は約 1.5-2.0 倍に増加した (Fig. 2)。一方、産卵鶏では暑熱によってわずかに mitROS 産生量が増加したものの、これは統計的に有意ではなかった。なお、NADH を供給するグルタミン酸、リンゴ酸、ピルビン酸を添加した場合は、肉用鶏および産卵鶏ともに 24°C 区と 34°C 区の mitROS 産生にほとんど違いが認められなかった (data not shown)。肉用鶏では、avUCP activated プロトンリークの低下とともに state 4 (プロトンリーク反応曲線の右端の点) 膜電位が上昇していることから、mitROS 過剰産生には膜電位上昇が関与していると考えられる。以上の結果より、肉用鶏においては avUCP activated プロトンリークが低下することによって膜電位が上昇し、mitROS 産生を誘導するが、産卵鶏では avUCP 発現が維持されること

でこれらのプロセスが抑制されると考えられる。

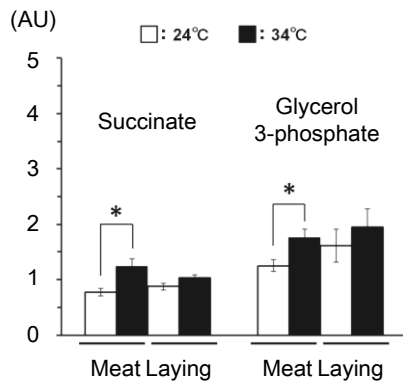


Fig. 2 肉用鶏および産卵鶏における急性暑熱曝露時におけるavUCP活性化時のミトコンドリアROS産生応答。Means±SE, n=4.

最後に、両鶏の暑熱感作にともなう酸化ストレス応答を調べた結果、浅胸筋の過酸化脂質含量は肉用鶏では暑熱によって有意に増加したが、産卵鶏ではほとんど変化が認められなかった。さらに、カルボニル化タンパク質含量も肉用鶏では有意に増加したものの、産卵鶏ではほとんど変化が認められなかった。以上の結果より、産卵鶏の骨格筋では暑熱時においても酸化ストレスが発症せず、これにはmitROS過剰産生の抑制が大きく関与していると考えられる。

(考察) 一般に産卵鶏は暑熱適応能が比較的高いことが知られている。さらに近年の報告では、肉用鶏で生じる暑熱時の骨格筋mitROS過剰産生は産卵鶏ではそれほど認められないこと (Mujahid et al., 2006)、さらに、産卵鶏の骨格筋avUCP発現量は肉用鶏のそれに比べ非常に高いことが報告されている (Toyomizu et al., 2005)。これらの報告より、産卵鶏ではavUCP発現が暑熱時でも高く維持されることでmitROS過剰産生が抑制されると考えられていた。しかし、これまでの研究では暑熱感作時の肉用鶏・産卵鶏の体重が大きく異なっていたため、両鶏に対する暑熱感作の影響が同一でなかった可能性がある。これに対し、本研究では日齢は異なるものの同程度の体重 (約1.2 kg) の鶏を用いているため、暑熱時の生体応答の両鶏の差異を正確に評価できていると考えられる。本試験結果をまとめると、avUCP発現が高い産卵鶏では暑熱時でもこの発現は維持され、mitROS過剰産生・酸化ストレス発症が抑制されることが示され、avUCP発現は暑熱時のmitROS過剰産生・酸化ストレス制御において重要な役割を担っていると推察される。

(2) (1) より avUCP 発現が先天的に高い産卵鶏は暑熱時の mitROS 過剰産生を制御できることが示されたが、肉用鶏でも avUCP 発現を上昇させると産卵鶏と同様に mitROS 過剰産生が抑制できるか否かを検証した。

本試験において、UCP 発現を上昇させることが知られているオリーブオイル (Rodríguez et al., 2002; Oi-Kano et al., 2007; Mujahid et al., 2009) ならびにオレウロペイン (Oi-Kano et al., 2008) を含む飼料を肉用鶏に給与し、急性暑熱感作した。その結果、対照区 (大豆油 12.7% 含) に比べ、精製オリーブオイルを給与した区では急性暑熱感作にともなう mitROS 産生量の増加が一部抑制された。さらにオリーブオイルに加えオレウロペインを 10 ppm 添加した区では、24°C 対照区のレベルまでは制御できなかったものの、mitROS 過剰産生が大きく抑えられた (Fig. 3)。

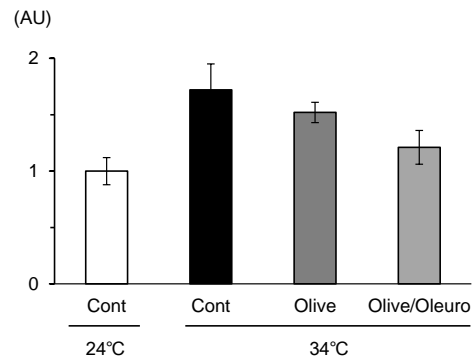


Fig. 3 オリーブオイル (Olive) およびオレウロペイン (Oleuro) を給与した肉用鶏におけるコハク酸添加時の骨格筋ミトコンドリアROS産生量。Means±SE, n=4.

さらに過酸化脂質含量 (TBARS/g lipid) を測定した結果、対照区では 24°C 区に比べ有意に上昇したが、mitROS 産生の結果と同様にこの上昇はオリーブオイル区ではやや抑制され、オリーブオイル+オレウロペイン添加区では大きく抑制された。なお、試験区間において脂質含量にほとんど違いは認められなかった (data not shown)。したがって、オリーブオイルならびにオレウロペイン給与によって、暑熱感作時の mitROS 過剰産生を抑制でき、さらに酸化ストレスの発症も抑制できることが示された。

つづいて、両物質の mitROS 過剰産生抑制作用に avUCP 発現上昇が関係しているか否かを検証した。骨格筋における avUCP mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法によって測定した結果、これまでの報告と同様に対照区では avUCP 発現量は有意に低下していたが、オリーブオイル給与区では対照区に比べ上昇

する傾向が認められ、オリーブオイル+オレウロペイン添加区では有意に上昇していた (Fig. 4)。

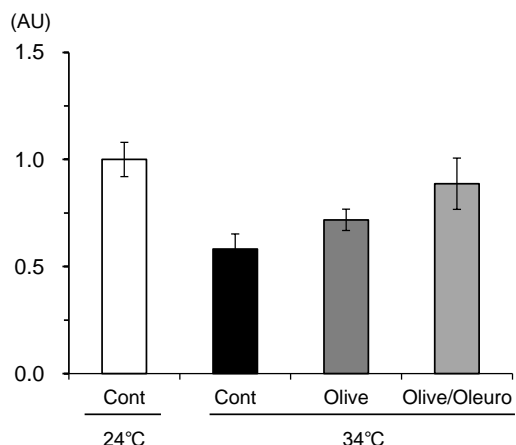


Fig. 4 オリーブオイル (Olive) およびオレウロペイン (Oleuro) を給与した肉用鶏の骨格筋におけるavUCP mRNA発現量。内部標準は18s-rRNAを用いた。Means \pm SE、n=8。

Fig. 3 および Fig. 4 より、avUCP mRNA 発現量が高くなるほど、ミトコンドリア ROS 産生量が低下していることが見て取れ、肉用鶏においても、avUCP 発現を上昇させることで急性暑熱感作時にもなる mitROS 過剰産生を抑制できることが示された。

(総合考察)

UCP は非ふるえ熱産生におけるサーモゲニンとして重要なタンパク質であると理解されているが、本研究より、avUCP は急性暑熱時の mitROS 過剰産生に抑制において重要な役割を担っていることが明らかになったことから、UCP は環境適応の第一線を担う重要なタンパク質である可能性が示唆される。

AvUCP の発現制御は、転写活性補因子 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) が必要であり、さらにこの活性調節においては AMPK (AMP-activated protein kinase) によるリン酸化および SIRT1 (sirtuin 1) による脱アセチル化が関与することが知られている。しかし、急性暑熱感作時における肉用鶏の骨格筋におけるこれら UCP 発現制御関連因子の変化については全く明らかにされていない。

本研究において暑熱時の mitROS 過剰産生抑制における avUCP 発現の重要性は示されたが、今後は①暑熱時の avUCP 発現低下メカニズム、および②産卵鶏およびオリーブオイルおよびオレウロペイン給与時の avUCP 発現上昇メカニズムの差異を検証することで、UCP の暑熱適応において真に有効な代謝因子が見出されると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①喜久里基・豊水正昭 (東北大院農)

「産卵鶏は急性暑熱曝露時においても酸化ストレスは亢進しない」

日本家禽学会秋季大会 (香川県高松市生涯学習センター)

2012 年 9 月 13-14 日 (口頭発表)

②Kikusato, M., Uwabe, Y. and Toyomizu, M.

“Olive oil (refined)-enriched diet upregulates avian uncoupling protein expression and proton leak in the skeletal muscle mitochondria”

10th Congress of the international Society for the Study Fatty Acids and Lipids, Vancouver, Canada, May 26-30.

(2012) Poster presentation

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜久里 基 (KIKUSATO MOTOI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：90613042

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし