

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850182

研究課題名(和文) 暑熱負荷時の鶏の代謝時系列変化およびその連動性の解明

研究課題名(英文) Interaction of mitochondrial reactive oxygen species production with protein degradation in skeletal muscle of birds exposed to heat stress

研究代表者

喜久里 基 (KIKUSATO, Motoi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90613042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では暑熱環境下におけるニワトリのミトコンドリア活性酸素(mtROS)産生および体タンパク質分解システムの関連性を調べた。暑熱感作後、早期段階においてmtROS産生およびユビキチン転移酵素(E3)のmRNA発現量が増加し、その後、血中3メチルヒスチジン含量が増加した。続いて、ニワトリ筋細胞を高温感作した結果、mtROS産生量・E3 mRNA発現量の同時上昇が認められた。高温感作時のmtROS産生をTempolで抑制した結果、E3のmRNA発現量は低下し、細胞タンパク質量も通常状態まで回復した。以上より、暑熱環境下ではmtROS産生がタンパク質分解亢進の引き金になっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the effect of mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) production on protein degradation in skeletal muscle of birds exposed to heat stress. Heat stress resulted in simultaneous increases in mtROS production and ubiquitin ligase (atrogen-1) mRNA levels in the skeletal muscle tissues, which suggests an involvement of mtROS production in a transcription of atrogen-1 in these tissues. In avian muscle cells incubated in heat-stressed conditions, the simultaneous increases in mtROS and the ubiquitin ligase mRNA level were observed, and following the addition of Tempol into these cells not only mtROS production but also atrogen-1 mRNA level were restored to near-normal values. We here shows that mtROS production may play an important role in inducing protein degradation probably via an up-regulation of protein ubiquitination in avian skeletal muscle under heat stress conditions.

研究分野：動物生産科学

 キーワード：暑熱ストレス ミトコンドリア 活性酸素 タンパク質分解 抗酸化酵素 atrogen-1 酸化ストレス
骨格筋

1. 研究開始当初の背景

暑熱環境下における肉用鶏の生産性低下は古くからの問題であり、近年激化の様相を示す夏季の暑熱環境によって肉用鶏産業が大きな損失を被ることは想像に難くない。空調などによる鶏舎温度の冷涼化といった対処策が考えられるものの、更なる設備コストが必要となり、海外飼料穀物の価格高騰により危機的経営状態に陥っている家禽生産者にとっては非現実的な策である。したがって、最も現実的な方法として、ニワトリに耐暑性を付与する生産技術特に飼養技術の開発が広く行われているが、現在にいたるまでこれは十分に実現できていない。

この飼養技術の開発に向けて、これまで暑熱下のニワトリの生体応答に関する研究が広く行われている。暑熱下では、熱放散促進のための浅速呼吸により呼吸性アルカロシスが発症すること (Teeter *et al.*, 1985)、コルチコステロン分泌増にとともに体タンパク質分解が亢進すること (Yunianto *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 2000)、またミトコンドリア活性酸素 (mtROS) の過剰産生によって酸化ストレス状態に陥ることが明らかになっており (Mujahid *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006)、これらはいずれも成長低下に大きく関与していると考えられている。研究代表者は、自身らが明らかにした、暑熱時の酸化ストレスレベルと成長の負の相関関係 (Azad *et al.*, 2011) に着目し、酸化ストレスが成長低下の主要因であると考え、暑熱時の mtROS 過剰産生機構の研究を行ってきた。その結果、「ミトコンドリア呼吸鎖活性の上昇」と「脱共役タンパク質 (UCP) の発現低下」とともに膜電位上昇によって mtROS 過剰産生が生じることを初めて明らかにした (Kikusato *et al.*, 2010; 2013)。さらに、酸化ストレス制御による暑熱時の成長改善も試み、抗酸化作用のある電解還元水あるいは mtROS 産生を抑制するオリーブオイル (Mujahid *et al.*, 2009) を給与し、暑熱時の成長を改善することに成功している。しかし、上記いずれの場合においても成長低下は完全には抑制できておらず、ビタミン類やポリフェノール類などの抗酸化物質や呼吸性アルカロシス抑制のための重炭酸ナトリウムの給与 (Sahin *et al.*, 2002; Balnave *et al.*, 1991) でも同様に、暑熱時の成長低下は完全に抑制できていないことから、現状において暑熱ストレス制御には閉塞感が広がっている。

呼吸性アルカロシスや酸化ストレス、mtROS 過剰産生を制御する物質を給与したにも関わらず、成長を完全に改善できなかったのは、給与物質の質・量が適切ではなかった可能性が考えられる。一方で、単一の代謝変化のみを制御する物質を暑熱期間を通じて与え続けたことで、その物質が他の代謝変化を悪化させ、結果的に成長を損なっていた可能性も考えられる。実際、重炭酸ナトリウムの過剰給与により、酸化ストレスが悪化する

ことが報告されている (Peng *et al.*, 2013)、つまり、暑熱時の生体変化の一つを制御することで成長低下を改善する方法には限界があると推察される。このことより、制御物質が他の代謝変化におよぼす影響を調べ、負の作用をもたらさない物質を新たに探索するとの考えが浮かぶが、これには多くの時間を要するだけでなくそのような物質が見つかる保証はない。したがって、申請者はむしろ有効性のある既知制御物質を用いて、それらを適切なタイミングで給与する「適時・適材の暑熱ストレス制御法」を開発する方がより効率的かつ有効的ではないかと考え、これを実現するため、暑熱時の代謝時系列変化・連動性を見極めることが重要であるとの本研究着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、まず、長期間暑熱感作したニワトリにおける「呼吸性アルカロシス (低酸素)」、「mtROS 過剰産生」、「酸化ストレス」、「体タンパク質分解亢進」の時系列変化を明らかにする。続いて、呼吸性アルカロシス (低酸素) によって生じる細胞内代謝産物量の変化が mtROS 過剰産生を、mtROS 過剰産生によるユビキチンプロテアソーム系の活性化が体タンパク質分解を誘導する、との連動プロセスを動物・鶏骨格筋培養細胞を用いて高度に検証した。さらに、上記試験より、暑熱下では mtROS 過剰産生が体タンパク質分解亢進の引き金になっているとの仮説メカニズムが考えられたため、mtROS 産生を効率的に制御するオレウロペイン (オリーブ特有フェノール化合物) を暑熱感作ニワトリに給与し、骨格筋分解・増体量におよぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

動物試験 1: 0 日齢オス肉用鶏 (Ross 系統、*Gallus gallus domesticus*) を供試し、肉用鶏用標準飼料 (粗蛋白質: 21%、代謝エネルギー: 3,100 kcal/kg) を基礎飼料として給与した。22 日齢より、対照区を 25 °C とし 33 °C で慢性暑熱感作し (相対湿度 55 ± 5%)、12、24、72 時間後に放血屠殺した。屠殺後、血液、骨格筋 (浅胸筋) を採取し、液体窒素を用いて凍結粉碎後、-80 °C で保存した。酸化ストレスマーカーとして過酸化脂質含量を TBARS 法で調べ、骨格筋中の ROS 産生量・体タンパク質分解関連因子の各遺伝子発現量はリアルタイム RT-PCR 法で解析した。体タンパク質分化の指標として血漿・骨格筋の 3 メチルヒスチジン (3M-His) 含量、ならびに乳酸・クエン酸含量は HPLC を用いてそれぞれ測定した。血漿中コルチコステロン含量は市販の ELISA キットを用いて測定した。また、骨格筋のミトコンドリアを分画遠心法によって単離し、その ROS 産生量を蛍光プローブ Amplex[®] Red を用いて定量した。

動物試験 2: 試験 1 と同様の条件で飼育した

14日齢ニワトリを供試し、上記基礎飼料にオレウロペインを10、50、250 ppm添加した飼料をそれぞれ給与した後、33 °Cで2週間の暑熱感作を行った（対照区：25 °C）。放血屠殺後、骨格筋、血漿を採取した。

ニワトリ筋細胞培養試験：0日齢オス肉用鶏（上に同じ）を供試し、浅胸筋より筋芽細胞を単離・培養した。Differential adhesion法を用いて筋芽細胞を濃縮した後、90φディッシュに播種し、10%（v/v）FBSを含むDMEM+M199（4:1）混合培地を用いて筋細胞を37°C・5%CO₂条件下で約48h培養した。増殖した筋芽細胞を回収後、遠心分離し、24ウェルプレートに45,000 cells/cm²となるよう播種し、80-90%サブコンフルエントに達するまで培養した。培養後、対照区を37°Cとして41°Cで1、3、6時間高温感作した。ミトコンドリアスーパーオキシド産生量は蛍光プローブMitoSOX™ Redを用いて測定し、タンパク質含量（micro BCA法）で補正した。

すべての実験において、初生鶏は松本鶏園（蔵王、宮城）より入手し、全ての実験動物取扱いは東北大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

動物試験1

ニワトリ骨格筋の過酸化脂質含量は、暑熱感作12h後に有意に増加し、それ以降の時間においても対照区より高い値を示した。この結果より、酸化ストレスは高温感作後、早期に生じていることが示された。ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）2のmRNA発現量は、いずれの暑熱時間においても変化は認められなかった。一方、mtROS産生は感作12h後において著しく増加していた。さらに同時帯では、mtROS産生制御因子であるUCPの発現量も著しく上昇しており、これは暑熱にともなうmtROS過剰産生を下方制御するための反応であると推察された。

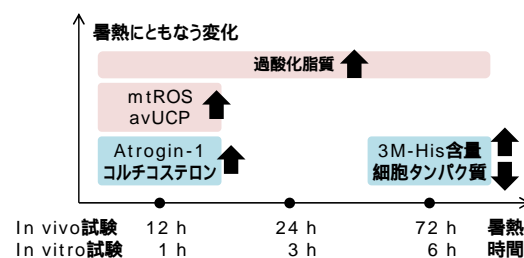
細胞内にはリソソーム系、カルパイン系およびユビキチンプロテアソーム系の3つのタンパク質分解システムが存在する。本研究では、まず前二者の構成因子であるcathepsin Bおよびμ-calpainのmRNA発現量を解析した結果、両遺伝子はいずれの暑熱感作時間においても増加は認められなかった。ユビキチンプロテアソーム系の構成因子であるproteasome C2 subunit（20Sプロテアソームサブユニット）のmRNA発現量も上記遺伝子と同様に変化は認められなかったが、ユビキチン転移酵素であるatrogen-1の発現量は暑熱12h後において有意な増加が認められた。血漿中コルチコステロン含量も暑熱感作12h後に有意に増加していた一方で、他方で、血漿中3M-His含量は、暑熱感作72h後に有意に増加した。以上の結果から、暑熱時の骨格筋では、感作後早期段階においてタン

パク質のユビキチン化が亢進した後、数日を経て分解が進むことが示され、さらにタンパク質のユビキチン化にはコルチコステロンあるいはmtROS産生が関与していることも示唆された。

暑熱感作12h後では、乳酸含量が増加した一方で、クエン酸含量がわずかに低下していたことから、解糖系が亢進していることが示唆された。また、同時帯では低酸素時に発現が誘導する低酸素誘導因子（HIF-1α）のmRNA発現量が増加する傾向が示された。この結果と代謝産物の結果を合わせて考えると、暑熱感作12h後では低酸素状態に陥っている可能性も示唆されたことから、これも体タンパク質分解をもたらす要因である可能性が推察された。

ニワトリ筋細胞培養試験

動物試験より、暑熱にともなう体タンパク質分解にはコルチコステロンあるいはmtROS産生の増加、低酸素応答が関与していることが示されたことから、本試験では培養筋細胞を用いて、mtROS産生が体タンパク質分解におよぼす影響を調べた。ニワトリ筋細胞を1、3、6h高温培養した結果、細胞タンパク質量は感作1h後では変化は認められなかったが、3・6h後では有意に低下した。mtROS産生はいずれの高温感作時間においても増加した。atrogen-1のmRNA発現量は高温感作1hでは有意に増加したが、感作時間の経過とともに徐々に減少し、72hでは対照区と同じレベルに戻った。また、cathepsin B、proteasome C2 subunit、μ-calpainのmRNA発現量はいずれの高温感作時間でも変化は認められなかった。これらの結果より、高温培養した細胞でも*in vivo*と同様に、mtROS産生量とatrogen-1発現量が同時期に増加していたことから、mtROS産生が同遺伝子の発現を誘導し、タンパク質分解を亢進している可能性が考えられた。



この点を明らかにするため、続いてミトコンドリア膜透過性抗酸化剤 Tempol を添加した際における atrogen-1 およびタンパク質分解におよぼす影響を調べた。その結果、mtROS産生に加え、上記遺伝子のmRNA発現量も抑制され、6hにおける細胞タンパク質量も回復した。なお、培養細胞ではHIF-1α発現や乳酸量の増加は認められなかったことから、これらは*in vivo*に特有の反応であることが示唆され、さらに培養筋細胞におけるタンパク質分解はこれら因子の影響を受けずに生じることが示された。以上の結果から、暑熱感

作時では mtROS 産生によってユビキチン化が活性化することでタンパク質分解が亢進することが明らかになった。

動物試験 2

上記 2 試験より、暑熱環境下では mtROS 産生が体タンパク質分解の引き金であることが示されたことから、本試験では暑熱時の mtROS 産生量を抑制する効果が認められているオレウロペインを給与し、タンパク質分解・増体量におよぼす影響を調べた。その結果、骨格筋における mtROS 産生の増加は完全に抑制されると同時に、atrogin-1 の発現量も抑制され、さらに増体量も回復することが示された。しかし、暑熱区の増体量は対照区のレベルまでは戻らず、mtROS 産生の制御のみでは暑熱時の体タンパク質分解・増体量は十分に回復しないことが示された。

まとめ

暑熱環境下では mtROS 産生の制御と同時にタンパク質分解の抑制も認められ、同環境下の増体量低下における両因子の連動作用が重要であることが示され、本研究の目標である暑熱時のニワトリの代謝反応の関連性が実証できた。他方で、タンパク質分解抑制・増体量の回復は一部にとどまったことを考えると、本研究では想定していなかった要素例えば炎症性サイトカイン放出などが暑熱ストレス亢進に大きく関与している可能性が推察された。

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)

1. Kikusato, M., Yoshida, H., Furukawa, K. and Toyomizu, M. (2015) "Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells" *The Journal of Thermal Biology* 52: 8-13. 査読有
DOI: 10.1016/j.jtherbio.2015.04.005
2. Furukawa, K. Kikusato, M., Kamizono, T. Yoshida, H. and Toyomizu, M. (2015) "Possible involvement of mitochondrial reactive oxygen species production in protein degradation induced by hyperthermia in avian muscle cells" *The Journal of Poultry Science*, in press.
Online advanced publication: May 25, 2015. 査読有
3. Kikusato, M., Sudo, S. and Toyomizu, M. (2015) "Methionine deficiency leads to hepatic fat accretion via impairment of fatty acid import by carnitine palmitoyltransferase 1" *British Poultry*

Science 56: 225-231. 査読有

DOI: 10.1080/00071668.2014.996529

4. Kikusato, M. and Toyomizu, M. (2013) "Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria" *PLoS ONE* 8: e64412. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0064412.
5. 喜久里基・吉田隼巳・古川恭平・神園巴美・豊水正昭 (2014) "培養骨格筋細胞を用いた家禽の暑熱ストレス発生機序の解明 - 活性酸素の過剰産生が体タンパク質分解亢進に及ぼす影響 -" *家畜栄養生理研究会報* 58: 53-63. 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. Furukawa, K., Kikusato, M., Yoshida, H. and Toyomizu, M. (2014) "Possible involvement of mitochondrial reactive oxygen species production in protein degradation induced by high-temperature treatment in primary cultured avian skeletal muscle cells" *The 10th Asian Pacific Poultry Conference*, Jeju, Korea, October 19-23. 査読有
2. Kikusato, M., Uwabe, Y. and Toyomizu, M. (2014) "Oleuropein, one of polyphenols in olive oil, attenuates heat stress-induced overproduction of mitochondrial ROS in skeletal muscle of birds" *14th European Poultry Conference (EPC2014)*, Stavanger, Norway, June 23-27. 査読有
3. Kikusato, M. and Toyomizu, M. (2013) "Mitochondrial ROS production in skeletal muscle is exquisitely sensitive to the membrane potential regardless of the myofiber type compositions" *International Symposium on Mitochondria* 2013, P-2-6, Tokyo, Japan, November 6-7. 査読有
4. Yoshida, H., Kikusato, M., Souma, K. and Toyomizu, M. (2013) "The heat-induced production of reactive oxygen species regulates protein content in cultured chick skeletal muscle cells" *The 4th International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP2013)*, Sacramento, California, USA, September 9-12. 査読有
5. 古川恭平・喜久里基・神園巴美・豊水正昭 「慢性暑熱曝露時のタンパク質分解関連遺伝子発現亢進におけるミトコンドリア活性酸素種 (ROS) の関与」日本家禽学会 2015 年春季大会 (宇都宮大) 2015 年 3 月 30 日 査読有
6. 古川恭平・喜久里基・神園巴美・吉田隼巳・豊水正昭 「高温処理時の鶏骨格筋細胞におけるミトコンドリア活性酸素種 (ROS) がタンパク質分解に及ぼす影響」日本畜産学会第 119 回大会 (宇都宮

大学) 2015年3月28日 査読有

〔図書〕(計1件)

豊水正昭・喜久里基他「動物の栄養 第2版」
(文永堂出版)印刷中

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：