

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19177

研究課題名（和文）ニワトリの卵はゆでるとなぜ硫黄臭いのか？ 胚発生における硫黄呼吸の実体解明

研究課題名（英文）The investigation on mitochondrial sulfur respiration in the development of chicken embryo

研究代表者

喜久里 基（Kikusato, Motoi）

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90613042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、鶏胚の発生時において、メチオニンやシステイン等の含硫アミノ酸を用いた硫黄呼吸が生じているか否かを検証した。鶏胚より単離・調製した繊維芽細胞（CEF）を孵卵中の鶏卵環境を模した低酸素環境（約14-15%）で培養した。その結果、アミノ酸不含培地での培養によってCEF細胞数は著しく減少したが、ここに含硫アミノ酸を添加することで細胞数が大きく増加した。また、この増加は他のアミノ酸添加では生じなかった。以上の結果より、CEF細胞は、マイルドな低酸素環境下において含硫アミノ酸をエネルギー基質として補助的に利用している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硫黄呼吸は細菌類で見出された生体現象であり、これまでに高等動物では哺乳動物のみで見つかっている。本研究より、孵卵中の鶏胚では補助的ではあるものの含硫アミノ酸を用いて生体エネルギーを得ていることが示され、鳥類でも硫黄呼吸が生じている可能性が示唆された。このことは、鶏胚に多くの含硫アミノ酸が含まれる生理的意義の一つとして説明できる可能性がある。産業動物であるニワトリは孵化後の成長が重要であり、孵化直後は残存卵黄から栄養素を供給する。鶏胚を高酸素状態で孵卵し、含硫アミノ酸の消費を減らすことができれば、残存卵黄に含硫アミノ酸を多く含むことが可能になり、孵化後成長の増大が見込めるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to verify whether chicken embryos may acquire energy from mitochondrial sulfur respiration during the development. Chicken embryo fibroblast isolated from the fertilized eggs were incubated at normal atmospheric oxygen level (approximately 20%) or mild hypoxia (approx. 14-15%), which occurs during the chicken embryo development, in the absence of amino acids in the cultured medium. In the hypoxia conditions, the number of CEF in the amino acid-depleted medium was markedly reduced, while it was increased by the additions of sulfur amino acids, methionine and cysteine. This increase did not occur the additions of other amino acids. These results suggest that CEF could obtain the energy from the oxidation of methionine and cysteine in hypoxic conditions, while it is limited or supportive.

研究分野：動物生産科学

キーワード：硫黄呼吸 含硫アミノ酸 ミトコンドリア 鶏胚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鶏卵には、メチオニンやシステイン等の含硫アミノ酸が多く含まれている。マウスを用いた研究より、高等動物において含硫アミノ酸を用いた「硫黄呼吸」と呼ばれる新たなミトコンドリア呼吸様式が発見された (Akaike et al., 2017)。ミトコンドリアでは通常、酸素を電子受容体として用いて ATP を産生するが、硫黄呼吸では低酸素環境において酸素の代わりに硫黄代謝物 (システインパースルフィド Cys-SSH) を電子受容体として用い、ATP を産生する (図 1 参照; 西村ら、2021)。鶏胚では循環器系が形成されるまでの間 (~ 約 4 日卵齢) 酸素は単純拡散によって浸透するため、鶏卵の内部は表面部 (卵殻側) に比べ酸素濃度が低い。また、胚発生後期 (約 14 日卵齢以降) では、胚内の酸素の消費量が外界からの供給量を上回るため、酸素濃度が低くなる (van Golde et al., 1998 他) ため、鶏胚は発生中に低酸素状態になりやすい。したがって、低酸素状態になる鶏胚では、酸素以外にも含硫アミノ酸を利用して、ミトコンドリアで ATP 産生を行っている可能性が考えられる。

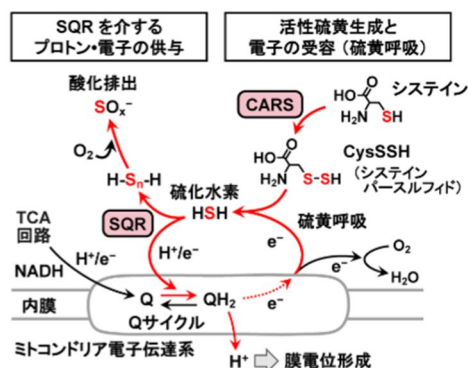


図 1 硫黄呼吸のモデル

2. 研究の目的

本研究は、鶏卵に多く含まれる含硫アミノ酸が低酸素環境でもミトコンドリアで十分量の ATP を産生させるための基質であることを検証し、家禽における硫黄呼吸の実体を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 鶏卵の胚発生中のアミノ酸濃度の変動: 0 日卵齢の種卵を民間の孵卵場より入手し、胚発生を停止・同期化するため、10 で 5 日間保存後、孵卵器内で 37.8、60-70% 相対湿度の条件で孵卵を行った。0 日齢から、循環器系が鶏卵全体に形成され始める直前の 6 日卵齢にいたるまで、経時的に種卵を採取し、目視で発生中の鶏胚を除いた後、卵中の遊離アミノ酸含量、有機酸濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で調べた。また、酸素発生装置を用いて、約 30% の高酸素条件で鶏卵を孵卵し、孵化直後のヒナ血漿中のアミノ酸濃度を同様の方法で調べた。
- (2) 低酸素培養時のニワトリ繊維芽細胞の細胞数変動: 発生中～後期の鶏胚より、ニワトリ繊維芽細胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) を OnlineBiologyNotes (August 9, 2020; <https://www.onlinebiologynotes.com/primary-cell-culture-preparation-of-primary-chick-embryo-fibroblast-cef-culture/>) の方法を参考にして単離・調製した。PHCbi 社製マルチガスインキュベーターを用いて、通常大気 (酸素: 約 20%) ならびに鶏胚環境を模したマイルドな低酸素環境 (約 14-15%) で CEF を各々培養した。CEF はアミノ酸を含まない培地を基礎培地として用い、含硫アミノ酸 (メチオニンおよびシスチン) を適宜添加し、細胞数におよぼす影響を調べた。細胞数は Cell Counting kit-8 を用いて測定した。

4. 研究成果

- (1) 孵卵開始後 6 日間で認められた鶏卵中の全アミノ酸濃度 (各アミノ酸の合計量) は孵卵日数に従い、徐々に減ったが、各アミノ酸の割合 (総アミノ酸量に対する割合%) は、孵卵開始前の種卵のそれに比べ、ほとんど変化が認められなかった。また、乳酸濃度は孵卵開始時に比べ微かに増加した。また、孵化直後のヒナの血中アミノ酸濃度においても、孵卵開始時に比べ、含硫アミノ酸割合の顕著な増加、減少は認められなかった。30% の高酸素条件で孵卵した結果、通常孵卵時に比べ平均約 -0.5 日の孵卵日数の短縮が認められたが、孵卵率はともに約 92% であり、違いは認められなかった。同ヒナの血漿ではアミノ酸濃度の違いは認められなかった。また、含硫アミノ酸濃度がわずかに高い値を示したが、有意差は認められなかった。これらの結果から、胚発生期において含硫アミノ酸が他のアミノ酸に比べ優先的に基質利用されていない可能性が示された。
- (2) 低酸素培養時の CEF 細胞数はアミノ酸フリー培地で培養することによって著しく低下した一方で、含硫アミノ酸を通常の培地と同等レベル (100% 量) で添加した場合には、細胞数 (細胞生存率) の劇的な改善が認められた。CEF 細胞数は含硫アミノ酸およびアミノ酸カクテルを共添加した場合でも、含硫アミノ酸単独添加時のそれと同等レベルであった (図 2 参照)。また、アミノ酸含有培地に含硫アミノ酸を 50% 量、200% 添加した場合の CEF 細胞数は、含硫アミノ酸 100% 量添加時のそれとほぼ同等であった。なお、有機物を一切含まな

い Hank ' s
Balanced Salt
Solution (HBSS) 培
地を用いて培養し
た結果、含硫アミノ
酸による低酸素環
境下での CEF 細胞数
の増加は認められ
なかった。

培地に電子伝達
鎖複合体 II および
III の阻害剤 (マロ
ン酸、アンチマイチ
ン A) を各々添加し、
CEF を低酸素培養し
た結果、含硫アミノ

酸添加時の CEF 細胞数は大きく低下した。しかし、複合体 I の阻害剤 (ロテノン) 添加時の CEF 細胞数の低下は複合体 II/III 添加時のそれに比べ、軽微であった。CEF より単離したミトコンドリアを脱気した反応溶液に懸濁し、唯一の呼吸基質として含硫アミノ酸を添加しても酸素消費は生じなかった。また、非脱気の反応溶液に懸濁した単離ミトコンドリアに対して、コハク酸やグルタミン酸+リンゴ酸を添加し、ここに含硫アミノ酸を添加しても、酸素消費量には何ら影響をおよぼさなかった。上記の結果から、CEF における低酸素時の含硫アミノ酸の利用は複合体 II への電子供与が関与している可能性、ならびに同供与体の前駆物は細胞質側で産生されていることが推察された。

(考察・結論) 本研究より、鶏胚では含硫アミノ酸をエネルギー基質として利用している可能性が示唆されたが、エネルギー産生全体における寄与度は大きくなく、その役割は補助的であると推察される。卵殻・卵殻膜は外界と卵内を隔て、鶏胚環境特に温度・湿度を一定に保つ機能があるが、同殻・膜を除去し高酸素透過性のポリメチルペンテン膜で覆う卵殻外培養時でも正常孵卵が可能であることが示されている (田原ら、2021)。この報告を考慮すると、鶏卵では卵内の酸素環境 (濃度) に応じて、エネルギー基質を自在に変えて、エネルギー産生を継続的に行っていると推察される。この見解は培養細胞で得たものであるが、個体レベルで検証するためには、低酸素孵卵の実施が必要である。しかし、保有装置ではそれが実現できなかったため、鶏胚における硫黄呼吸の実体を詳細に検証するためには低酸素室の構築など更なる設備が必要であると考えられる。

参考資料

- ・ Akaike et al., "CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics", Nature Communications, 27: 1177, 2017.
- ・ van Golde J et al., "The effect of hyperoxia on embryonic and organ mass in the developing chick embryo", Respiration Physiology, 113:75-82, 1998.
- ・ 西村明「寿命・老化における超硫黄分子の役割」, 生化学, Vol. 93, Page 717-722, 2021.
- ・ 田原豊・小原勝也「鳥類胚卵殻外培養とその応用」, 日本家禽学会誌, Vol. 58, Page J29-J32, 2021.

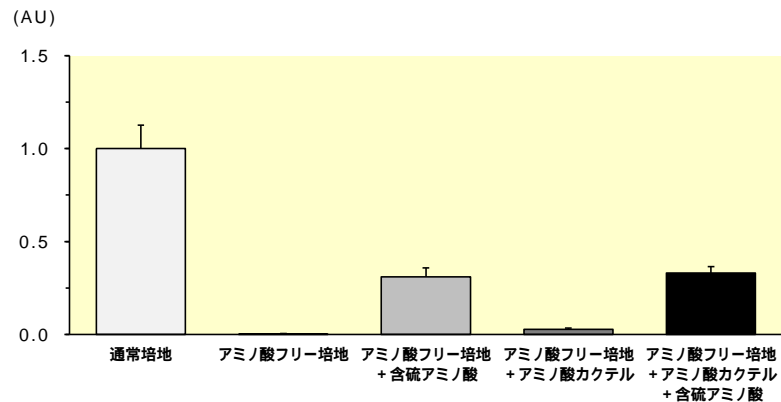


図2 低酸素培養時のCEF細胞数 平均値+標準誤差, n=8
値は通常培地を1とした際の相対値として表記。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	徳武 優佳子 (Tokutake Yukako) (90824657)	信州大学・学術研究院農学系・助教 (13601)	

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