

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06205

研究課題名(和文) 暑熱鶏において骨格筋タンパク質代謝破綻をもたらす他臓器間代謝ネットワークの解明

研究課題名(英文) Study on skeletal muscle proteolysis due to systemic metabolic dysfunction in broiler chickens exposed to heat stress

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) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：暑熱ニワトリにおいて、筋タンパク質分解を誘導する臓器間代謝ネットワーク機構を明らかにするため、コルチコステロン(CORT)、ミトコンドリア活性酸素産生(mitROS)、腸管バリア機能、炎症応答、アミノ酸動態の連関に着目し研究を行った。その結果、暑熱ニワトリにおける mitROS産生が筋タンパク質分解の誘導要因の一つであること、腸管バリア機能破綻にともなうLPS流入がCORT分泌や3メチルヒスチジン濃度上昇に関与、筋タンパク質由来のアルギニンが暑熱時の炎症反応に影響を与えている可能性が示された。以上より、暑熱時の筋タンパク質分解は全身性炎症の一環で生じることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの暑熱ストレス研究は非常に多彩ではあったものの、酸化ストレスなどの単一の代謝変化の追究に固執した研究が多かった。本研究では、暑熱諸反応を臓器間代謝ネットワークの観点から体系的・統合的に紡ぎ合わせ、筋タンパク質分解と腸管機能、炎症反応の連関を実証した。これにより、家禽科学に対してストレス反応ネットワークの視点を提供し、また新たな暑熱ストレス制御法として腸管における抗炎症の生理的重要性を提示した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to elucidate trans-organ metabolic network that induces muscle protein degradation in broiler chickens exposed to heat stress (HS). In the study, corticosterone (CORT), mitochondrial reactive oxygen species generation (mitROS), intestinal barrier function, inflammatory response, amino acid metabolism were evaluated. As a result, the study revealed that i) HS-induced muscle proteolysis could be attributed to mitROS rather than CORT, and that ii) LPS influx evoked by intestinal barrier dysfunction may stimulate 3-MH and CORT secretion, and iii) Arg generated by the muscle proteolysis might contribute to the amelioration of inflammation in HS-exposed broiler chickens. These findings suggest that HS-induced muscle proteolysis may occur in the systemic inflammation in broiler chickens.

研究分野：動物生産科学

キーワード：暑熱ストレス 筋タンパク質分解 全身性炎症 酸化ストレス 肉用鶏

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肉用鶏(ブロイラー)生産では夏季の暑熱環境により増体量や飼料摂取量、飼料効率が低下する現象、“暑熱ストレス”が発生する。これを抑止するため、生産現場では換気増やクーリングパットなどを用いた鶏舎内温度の物理的に下げるよう努める一方で、飼料中栄養素の強化といった飼養学的な対策も同時に行っている。しかし、現在においても暑熱ストレスは完全には克服できていない。

暑熱環境下においてニワトリの体内では様々な変化が生じるが、飼育成績の低下に直結する現象は筋タンパク質量の減少である。これまでの研究より、同減少は甲状腺ホルモンおよびコルチコステロン(CORT)の分泌バランスの不均衡が関与していることが報告される^[1]。また、筋タンパク質代謝以外の反応として、浅速呼吸(パンティング)促進にともなう呼吸性アルカローシス^[2]やミトコンドリア活性酸素(mitROS産生)の増大による酸化ストレスの亢進^[3,4]が生じることが広く知られている。最近では、腸管内腔からの微生物侵入を防ぐバリア機能が破綻することが明らかになっている^[5]。

現在、暑熱ストレス対策では、重曹や各種抗酸化物質の給与が広く行われている。しかし、重曹を多給し続けると飼育成績が低下し^[6]、また、数多くの抗酸化物が評価されたものの、暑熱ストレスの諸反応全般に対して十分かつ安定的な改善効果を示したものは見つかっていない。これらの事実は呼吸性アルカローシスや酸化ストレスは暑熱ストレスをもたらす本質的な要因ではないことを意味する。

2. 研究の目的

本課題では、ニワトリの暑熱ストレスが特定の生理、代謝、病理反応によって誘導されるのではなく、骨格筋・肝臓・腸管などで生じる各反応が“多臓器間代謝ネットワーク”の一要素として生じ、これが最終的に骨格筋タンパク質代謝を破綻させていると考えた。具体的に本課題では、骨格筋タンパク質代謝に影響を与えるmitROS産生、CORT分泌、腸管機能に関連するエンドトキシン・サイトカイン、ならびに胆汁酸濃度の各変化を調べ、その変化群の関連性を体系的・統合的に紡ぎ合わせた。

3. 研究の方法

試験 1: 民間の孵卵場より入手した 0 日齢雄ブロイラー (*Gallus gallus domesticus*, Ross 308 系統) を供試し、飼育マニュアルに従い、3 週齢まで飼育した。同齢時において、対照飼育条件を 24 °C として、暑熱感作を 0.5、1、3、7 日間行った (相対湿度 55 ± 10%)。暑熱感作にあたっては飼育室の温度を 24 °C から 1 時間に 1 °C ずつ 33-34 °C まで上昇させ、温度上昇開始後から上記日数の間、ニワトリを飼育した。それぞれの暑熱感作が終了後、ニワトリを放血屠殺し、浅胸筋および血漿を採取した。いずれの飼育期間中も動物は連続照明下で飼育し、水および飼料は自由摂取とした。飼料は粗タンパク質含量 (21%) や代謝エネルギー含量 (3.1 Mcal/kg) となるよう、トウモロコシおよび大豆粕、大豆油を自家配合した。血中の CORT、胆汁酸および LPS 濃度は市販測定キット、3-MH および各種アミノ酸濃度は HPLC で各々測定した。また、筋分解関連因子の遺伝子発現量はリアルタイム RT-PCR 法 (内部標準: 18s-rRNA) を用いて測定した。血中 FITC-d 濃度は蛍光強度計を用いて調べた。

試験 2: 0 日齢雄ブロイラー (上に同じ) の浅胸筋より、骨格筋細胞を調製した。0 あるいは 20 ng/ml の CORT を含む無血清基礎培地で 5% CO₂、41 °C の環境下で 1 あるいは 6 時間高温培養した (対照条件: 37 °C)。細胞タンパク質量は micro BCA 法で測定し、ミトコンドリア活性酸素は蛍光プローブ MitoSOX™ Red を用いて測定した。

試験 3: 0 日齢雄ブロイラー (上に同じ) を孵卵場より入手し、2 区に分け、ブリーダー推奨の栄養要求量を満たした飼料 (基礎飼料) および、同飼料にサングロビット® (*Macleaya cordata*) を 50 ppm 添加した飼料 (SAG 飼料) をそれぞれ給与した。15 日齢において、対照区および SAG 飼料区をさらに 2 区に分け、各々片方の区を暑熱環境下 (31.2-34.1 °C) で 42 日齢まで飼育し、屠殺・採材した。

試験 4: 0 日齢雄ブロイラー (上に同じ) を孵卵場より入手し、2 区に分け、ブリーダー推奨の栄養要求量を満たした飼料 (基礎飼料) および、同飼料に生菌剤 (イムノリッチ®、*Bacillus amyloliquefaciens* strain TOA5001) を 0.2% 添加した飼料 (BA 飼料) をそれぞれ給与した。15 日齢において、対照区および BA 飼料区をさらに 2 区に分け、各々片方の区を暑熱環境下 (30.9-35.6 °C) で 42 日齢まで飼育し、屠殺・採材した。本試験含め、全ての動物試験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

暑熱初期の骨格筋 mitROS の過剰産生が筋タンパク質分解におよぼす影響

暑熱時にニワトリ体内で生じる CORT 分泌増ならびに骨格筋 mitROS 産生が筋タンパク質分解におよぼす影響を調べた(試験 1)。暑熱感作 0.5 日後において、血中 CORT 濃度が上昇し、感作 3-7 日後において骨格筋タンパク質分解の指標である血中 3-メチルヒスチジン(3-MH)放出量が増加した($P < 0.05$)^[7]。また、暑熱 0.5 日後の骨格筋では mitROS 産生量が増加するとともに、コピキチンプロテアーム系タンパク質分解システムの構成要素(コピキチンリガーゼ)である *Atrogin-1* 発現量の増加も認められた($P < 0.05$)^[7]。また、特定の胆汁酸は筋タンパク質代謝や腸管絨毛に影響を与えることが知られているが、腸内容物、血中のいずれの濃度も暑熱による影響は認められなかった。

上記の結果より、暑熱下のニワトリでは CORT が mitROS 産生を誘導し、骨格筋タンパク質分解を亢進する可能性が考えられたため、続いて、高温培養筋細胞を用いてこの仮説を検証した(試験 2)。41 °C で高温培養したニワトリ筋細胞では通常培養(37 °C)細胞と比べ、*Atrogin-1* 発現量ならびに mitROS 産生量が増加すると同時に細胞タンパク質量が減少したが、これらの変化はいずれも抗酸化剤 TEMPO 添加によって抑制された($P < 0.05$)^[8]。一方、高温培養細胞に生理的濃度の CORT を同時添加しても mitROS 産生、*Atrogin-1* 発現量、細胞タンパク質量にさらなる影響は認められなかった。以上の結果より、暑熱ニワトリで生じる骨格筋タンパク質分解の要因は CORT 分泌増ではなく mitROS 過剰産生である可能性が示された。

暑熱時のコルチコステロン分泌と腸管バリア機能の関連性

上記の試験より、CORT は暑熱時の筋タンパク質分解に対して実質的な役割を担っていない可能性が示されたが、全身性の代謝破綻ネットワークの観点から内分泌因子である同ホルモンの役割を明らかにする必要がある。CORT は筋タンパク質分解含め糖新生などといった代謝機構に影響を与えるホルモンである一方で、炎症の抑制すなわち抗炎症作用を発揮するホルモンでもある。家禽生産において、腸管腔からの病原体侵入にともない発生する炎症は増体遅延の主要原因であると昨今考えられており^[9]、暑熱ストレス緩和においてもその着目点が抗酸化から抗炎症に変わりつつある。したがって、本試験では暑熱時のコルチコステロンの役割を明らかにするために、腸管バリア機能および炎症との関連性を調べた。

まず、暑熱ニワトリの腸管バリア機能を FITC 標識デキストラン(FITC-d、3-4 kDa)を用いて調べた(方法は試験 1 と同様)。ニワトリの体重に応じて一定量の FITC-d 溶液を経口投与し、その血中濃度を測定した結果、暑熱感作 7 日目において、血中 FITC-d 濃度が対照区に比べ有意に高いことが示された。さらに、同血中では 3-MH や CORT の増加のみならずグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド(LPS)の増加も認められた($P < 0.05$)。これらの結果より、暑熱ニワトリの腸管ではバリア機能破綻や炎症反応が生じていることが示された。

また、腸管バリア機能のみならず炎上状態も調べた結果、回腸(メッケル憩室付近)において、炎症関連因子 *Il6*、*Tll1a* (ニワトリにおける TNF α の代替因子)、*Infj* 発現量が有意に増加($P < 0.05$)あるいは増加傾向($P < 0.1$)を示すことが明らかになった。また、血中の NO 濃度を調べたところ、暑熱ニワトリで増加傾向を示し、またその生合成素材であるアルギニンの血中濃度が有意に増加することが示された^[7]。アルギニンはニワトリでは必須アミノ酸であり、摂食量が低下する暑熱下では血中濃度が本来低下すると考えられる。このため、暑熱ニワトリにおいて、炎症メディエーターであり血管拡張作用を有する NO や、抗炎症作用を有するスペルミジンの産生を増加させるため、筋タンパク質分解を亢進し、アルギニンを積極的に生成している可能性が推察された。

暑熱時のコルチコステロン分泌、腸管バリア機能、筋タンパク質分解の連関

前試験より、暑熱時の CORT 分泌は腸管バリアにおける機能破綻、炎症と同時に生じることが示された。本試験では、腸管機能と CORT 分泌の関連性をより詳細に明らかにするため、植物性化合物(SAG)(試験 3)および生菌剤(BA)(試験 4)を給与した暑熱ストレス軽減区を設けた。

上記 2 飼料を給与したニワトリでは、暑熱感作にともなう血中の CORT、FITC-d および LPS 濃度上昇が認められず、腸管における炎症性サイトカインの発現量も一部低下した($P < 0.05$)。また、SAG 飼料により、暑熱にともなう血中の 3-MH 濃度の上昇、総タンパク質およびアルブミン量の低下が抑制された($P < 0.1$)。さらに、暑熱によるアルギニン濃度の上昇は BA 給与によって抑制された(SAG 試験では未測定)。以上の結果から、暑熱ニワトリにおいて、腸管機能が回復することで、CORT 分泌が低下し、筋タンパク質代謝が改善することが示された。

まとめ

本課題より、次のことが示された

1. 暑熱初期の骨格筋の筋タンパク質分解は CORT 分泌より、mitROS 産生の過剰産生が関

- 係している可能性がある。
2. 暑熱時の腸管バリア機能破綻にともない体内に流入した LPS が CORT 分泌や 3-MH 濃度上昇に関係している。
 3. 筋タンパク質分解より得られたアルギニンが NO やスペルミジン産生を通じて、暑熱時の炎症反応に影響を与えている可能性がある。
- 骨格筋 mitROS 産生におよぼす LPS の影響や血中サイトカイン量の変化、アルギニンからの生成物量などは未だ不明であるが、本課題より、暑熱下のニワトリでは腸管および骨格筋の代謝ネットワークが示され、骨格筋量低下が全身性炎症応答の一環で生じている可能性が明らかになった。

引用・参考文献（原著論文のみ）

1. Yunianto VD, Hayashi K, Kaneda S, Ohtsuka A, Tomita Y. (1997) Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. *Br J Nutr.* 77: 897-909.
2. Teeter RG, Smith MO, Owens FN, Arp SC, Sangiah S, Breazile JE. (1985) Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks. *Poult Sci.* 64: 1060-1064.
3. Lin H, Decuypere E, Buyse J. (2006) Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 144: 11-17.
4. Kikusato M, Toyomizu M. (2019) Differential effects of heat stress on oxidative status of skeletal muscle with different muscle fibre compositions in broiler chicken. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 28: 78-83.
5. Varasteh S, Braber S, Akbari P, Garssen J, Fink-Gremmels J. (2015) Differences in Susceptibility to Heat Stress along the Chicken Intestine and the Protective Effects of Galacto-Oligosaccharides. *PLoS One.* 10: e0138975.
6. Peng Y, Wang Y, Ning D, Guo Y. (2013) Estimation of dietary sodium bicarbonate dose limit in broiler under high ambient temperatures. *J Poult Sci.* 50: 346-353.
7. Furukawa K, Kikusato M, Kamizono T, Toyomizu M. (2016) Time-course changes in muscle protein degradation in heat-stressed chickens: Possible involvement of corticosterone and mitochondrial reactive oxygen species generation in induction of the ubiquitin-proteasome system. *Gen Comp Endocrinol.* 228: 105-110.
8. Kikusato M, Yoshida H, Furukawa K, 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. *J Therm Biol.* 52: 8-13.
9. Lauridsen C (2019) From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poult Sci.* 98: 4240-4246.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kikusato M, Toyomizu M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Differential effects of heat stress on oxidative status of skeletal muscle with different muscle fibre compositions in broiler chicken	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Animal and Feed Sciences	6. 最初と最後の頁 78-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.22358/jafs/102830/2019	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 -
1. 著者名 Hakamata Y, Watanabe K, Amo T, Toyomizu M, Kikusato M.	4. 巻 55
2. 論文標題 Characterization of mitochondrial content and respiratory capacities of broiler chicken skeletal muscles with different muscle fiber compositions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 210-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2141/jpsa.0170141	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 -
1. 著者名 Hakamata Y, Toyomizu M, Kikusato M	4. 巻 -
2. 論文標題 Differences in breast muscle mitochondrial respiratory capacity, reactive oxygen species generation, and complex characteristics between 7-week-old meat- and laying-type chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2141/jpsa.0190133	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 -
1. 著者名 Kikusato M, Furukawa F, Kamizono T, Hakamata Y, Toyomizu M	4. 巻 60
2. 論文標題 Roles of mitochondrial oxidative phosphorylation and reactive oxygen species generation in the metabolic modification of avian skeletal muscle	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proceedings of Japan Society of Animal Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 57-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanto-Hara F, Kikusato M, Ohwada S, Toyomizu M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Heat stress directly affects intestinal integrity in broiler chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2141/jpsa.0190004	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 -

1. 著者名 Hirakawa R, Nurjanah S, Furukawa K, Murai A, Kikusato M, Nochi T, Toyomizu M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Heat stress causes immune abnormalities via massive damage to effect proliferation and differentiation of lymphocytes in broiler chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00046	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 -

1. 著者名 Shimao R, Muroi H, Furukawa K, Toyomizu M, Kikusato M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Effects of low-dose oleuropein diet supplementation on the oxidative status of skeletal muscles and plasma hormonal concentration of growing broiler chickens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Poultry Science	6. 最初と最後の頁 784-789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1662886	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 古川恭平・喜久里基・Wu Guoyao・豊水正昭
2. 発表標題 暑熱感作鶏の骨格筋タンパク質分解に対するグルタミン・グルタミン酸同時給与の抑制効果
3. 学会等名 日本家禽学会2019年春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古川恭平・喜久里基・豊水正昭
2. 発表標題 鶏における暑熱感作時の骨格筋タンパク質分解亢進の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本家禽学会2018年秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakamata Y, Amo T, Toyomizu M, Kikusato, M
2. 発表標題 Differences in mitochondrial fatty acid utilization and respiratory complex characteristics between meat-type and laying-type chickens
3. 学会等名 11th Asia Pacific Poultry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikusato M, Shimao R, Muroi H, Toyomizu, M
2. 発表標題 Oleuropein suppresses oxidative damage in avian skeletal muscle, possibly via SIRT1 up-regulation
3. 学会等名 21st European Symposium on Poultry Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Furukawa, K., Kikusato, M. and Toyomizu, M.
2. 発表標題 Roles of corticosterone and superoxide in the ubiquitin proteasome system in heat-stressed chickens
3. 学会等名 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Furukawa, K., Waki, N, Kikusato, M., Ashinara, A., Ishida, A., Nakashima, K. and Toyomizu, M.
2. 発表標題 Time-course of changes in muscle antioxidant peptide concentrations in heat-stressed broiler chickens
3. 学会等名 17th Animal Science Congress of Asian Australasian Animal Production (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 古川恭平・喜久里基・豊水正昭
2. 発表標題 生理的濃度のコルチコステロンはニワトリ高温培養筋細胞のタンパク質分解を増強しない
3. 学会等名 日本畜産学会第122回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toyomizu M, Mujahid A, Hirakawa R, Furukawa K, Taciak M, Kikusato M.
2. 発表標題 Nutritional regulation of mitochondrial ROS production of chickens exposed to acute and chronic heat stress
3. 学会等名 6th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikusato, M., Xue, G., Pastor, A. and Toyomizu, M.
2. 発表標題 Effects of feeding isoquinoline alkaloids on the grow performance of broiler chickens under heat-stressed conditions
3. 学会等名 22nd European Symposium on Poultry Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikusato, M., Xue, G., Pastor, A. and Toyomizu, M.
2. 発表標題 Evaluation of isoquinoline alkaloids as alternative to antimicrobial growth promoters in broiler chickens
3. 学会等名 22nd European Symposium on Poultry Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜久里基・福井和夫・豊水正昭
2. 発表標題 ブロイラーの環境ストレスにおよぼす <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain TOA5001の給与効果
3. 学会等名 日本家禽学会2020年春季大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐大樹・豊水正昭・喜久里基
2. 発表標題 慢性暑熱環境下におけるブロイラーの体内アミノ酸の変動
3. 学会等名 日本家禽学会2019年秋季大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

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
--	---------------------------	-----------------------	----