

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580386

研究課題名(和文) 家禽の脚弱および破卵の防止に向けたビタミンD新規代謝の解明

研究課題名(英文) Novel Metabolism of Vitamin D in Poultry: Prevention of the Leg Weakness and Eggshell Broken

研究代表者

杉山 稔恵 (SUGIYAMA, Toshie)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10272858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：鶏では脚弱あるいは卵殻の薄化による破卵が頻発し、多大な経済的損失を被っている。これらの原因として、ビタミンD代謝が関与していると考えられる。

本研究では、25-ヒドロキシビタミンDより活性型ビタミンDを産生する1-水酸化酵素が、腎臓以外のビタミンD標的組織である腸管ならびに卵管に存在することを示した。また、この酵素の発現は、エストロゲンによって増加し、加齢に伴い減少することを示した。以上のことから、標的組織で局所的に活性型ビタミンDが産生され、カルシウム代謝を調節していることが考えられた。また、25-ヒドロキシビタミンD給与により、卵殻質が改善されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A large amount of economic loss is produced by several disorders related with calcium metabolism, the leg weakness and eggshell thinning, in the poultry industry. These disorders have been considered as a consequence of the disruption of vitamin D metabolism. In general, the biologically active form (1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$) is converted from vitamin D $_3$ via a two-step hydroxylation process catalyzed by 25-hydroxylase in the liver and 1 α -hydroxylase in the kidney.

In this research project, the mRNA expression of 1 α -hydroxylase was indicated in the extra-renal vitamin D-target tissues such as intestines and eggshell gland. The expression was also stimulated by estrogen, and inhibited with aging. These results suggested that 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ is locally synthesized from 25-hydroxycholecalciferol (25-(OH)D $_3$) in target-tissues, and directly regulates calcium metabolism. Here, we furthermore suggested that 25-(OH)D $_3$ supplement improves eggshell quality by modification of local vitamin D metabolism.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：家禽 脚弱 破卵 ビタミンD 代謝

1. 研究開始当初の背景

現在の養鶏産業において、ブロイラーでは起立不能となる脚弱、産卵鶏では卵殻の薄化による破卵が頻発し、多大な経済的損失を被っている。これらはビタミンD欠乏で引き起こされることから、ビタミンD代謝の関与が深く関わっていることが推察されるが、鶏における体内でのビタミンD代謝の詳細な調節機構は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、従来言われている腎臓での活性型ビタミンDへの代謝に加え、ビタミンD標的器官における1水酸化酵素による活性型ビタミンDの局所的産生とそれによるカルシウム代謝調節を新たに証明する。また、脚弱と卵殻薄化の発症と局所的代謝の関連を解明するとともに、標的器官での活性型ビタミンD産生を促進し、脚弱ならびに破卵発生の防止を試みる。

3. 研究の方法

(1) **鶏 1 水酸化酵素遺伝子 (cDNA) のクローニング** 1 水酸化酵素を発現し、活性型ビタミンDを産生していると推測される腎臓より全RNAを抽出し、RLM-RACE法により鶏 1 水酸化酵素遺伝子の配列を解析した。

(2) **産卵に伴う腎臓でのビタミンD代謝** 産卵前の未成熟鶏(6日齢)ならびに産卵鶏(300日齢)より腎臓を採取し、鶏 1 水酸化酵素遺伝子(mRNA)の発現量についてリアルタイムPCRで解析した。

(3) **標的器官におけるビタミンDの局所的代謝** 鶏のビタミンD標的器官である腎臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、直結腸、筋肉ならびに卵管卵殻腺部より全RNAを抽出し、各組織における1水酸化酵素遺伝子の相対発現量をリアルタイムPCRにより計測した。

(4) **老齢鶏におけるビタミンDの局所的代謝** 老齢鶏の腎臓ならびに十二指腸より全RNAを抽出し、半定量PCRにより1水酸化酵素ならびに24水酸化酵素遺伝子の相対発現量を産卵鶏のものと比較した。

(5) **ビタミンD局所的代謝の調節因子の解明** 未成熟な産卵鶏(1日齢)にエストロジェン(-エストラジオール 1mg)を5日間連続投与した後、ビタミンD標的器官である腎臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸および直結腸より全RNAを抽出し、1水酸化酵素ならびにビタミンD受容体(VDR)遺伝子の相対発現量をリアルタイムPCRにより計測した。

(6) **25-ヒドロキシビタミンD 給与による破**

卵の防止 老齢産卵鶏(560日齢)に25-ヒドロキシビタミンD(HyD 5.5ppm)を5週間給与し、卵殻質を解析するとともに、腸管および卵管でのカルシウム結合タンパク質の発現量をウェスタンブロット法により計測した。

4. 研究成果

(1) **鶏 1 水酸化酵素遺伝子 (cDNA) のクローニング** 鶏 1 水酸化酵素遺伝子は、2275bpの遺伝子からなり、537残基のアミノ酸配列が推測された。この配列は、哺乳類の1水酸化酵素遺伝子と約40%、両生類のものとの約40%の相同性を示し、鶏 1 水酸化酵素遺伝子と考えられた。

(2) **産卵に伴う腎臓でのビタミンD代謝** 産卵鶏の腎臓で、1水酸化酵素遺伝子の発現量が未成熟のものと比較して減少していた。しかしながら、腎臓での1水酸化酵素遺伝子の発現量は未成熟鶏にエストロジェンを投与すると増加したことから、産卵周期に伴って腎臓での1水酸化酵素遺伝子の発現量は変化し、産卵期の活性型ビタミンD産生が変動していることが推測された。

(3) **標的器官におけるビタミンDの局所的代謝** 筋肉を除く十二指腸、空腸、回腸、盲腸、直結腸ならびに卵管卵殻腺部に1水酸化酵素遺伝子が発現していた。このことは、腎臓以外での標的器官でも活性型ビタミンDが産生されていることを示唆している。また、相対発現量の相違から、これまでの報告の通り腎臓での活性型ビタミンDの産生が最も多いと考えられるが、次いで卵管卵殻腺部(腎臓に対して発現量0.63倍)、直結腸(0.45倍)、回腸(0.45倍)、盲腸(0.40倍)、空腸(0.33倍)、十二指腸(0.25倍)で活性型ビタミンDを産生していることが推測された(図1)。

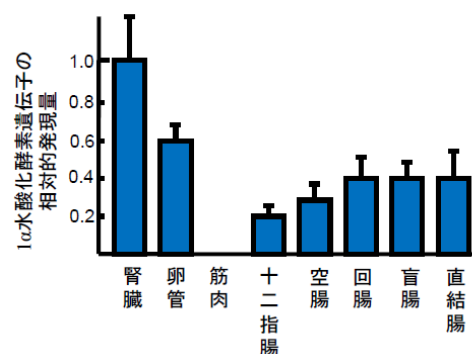


図1 各組織における1水酸化酵素遺伝子発現量

(4) **老齢鶏におけるビタミンDの局所的代謝** 腎臓ならびに十二指腸における1水酸化酵素遺伝子の発現量は老齢鶏において減少していた。また、活性型ビタミンDを不活性化する24水酸化酵素遺伝子の発現においては、老齢鶏の腎臓でその発現量は増加した。

これらのことは、加齢に伴い腎臓でのホルモンとして作用する活性型ビタミンD産生が減少するとともに、十二指腸などで産生される局所的な活性型ビタミンDの産生が減少しているものと考えられた。これらの活性型ビタミンD産生の減少が、加齢に伴う破卵発生の一要因になっているものと推測される。

(5) **ビタミンD局所的代謝の調節因子の解明**
エストロゲン投与により、腎臓（対照と比較して1.5倍）、盲腸（1.4倍）、直結腸（5.0倍）で1-水酸化酵素遺伝子の発現量が増加した。しかしながら、十二指腸（0.08倍）、空腸（0.1倍）、回腸（0.6倍）では発現量が減少した。また、エストロゲン投与により、十二指腸および盲腸でのVDR遺伝子発現量は増加した。これらのことから、ビタミンDの局所的代謝はエストロゲンにより調節されていることが示唆された。

(6) **25-ヒドロキシビタミンD 給与による破卵の防止** 25-ヒドロキシビタミンDを給与した老齢鶏では、卵殻質（卵殻強度、卵殻厚）ならびに大腿骨の骨密度が改善される傾向がみられるとともに、腸管、とりわけ空腸ならびに盲腸でカルシウム結合タンパク質の発現量が有意に増加していた（図2）。

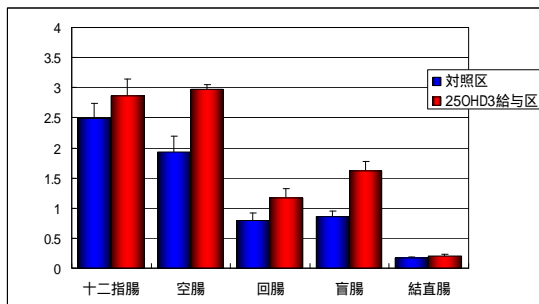


図2 カルシウム結合タンパク質の発現量

このことは、老齢鶏への25-ヒドロキシビタミンDの給与はカルシウム吸収を改善し、破卵の防止に有効であることが示された。これまでの結果から、給与した25-ヒドロキシビタミンDは腸管において活性型ビタミンDに局所的代謝され、その標的組織においてイントラクライン/パラクライン/オートクライン的に作用し、カルシウム結合タンパク質の発現を増加させたものと推測される（図3）。

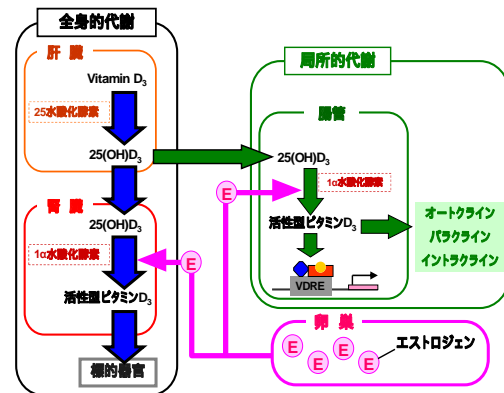


図3 産卵鶏におけるビタミンD代謝

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

T. Sugiyama, S. Kusuhara, T. H. Chung, H. Ynekawa, E. Azem, T. Hayakawa. Effects of 25-hydroxy-cholecalciferol on the development osteochondrosis in swine. *Animal Science Journal*, 84: 341-349. 2013. 査読有.

DOI: 10.1111/asj.12000

T. Sugiyama, Y. Akima, T. Hayatsu. Overview paper: Novel expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in egg-laying hens. *Bone*, 48: S61. 2011. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bone.2011.03.047

〔学会発表〕(計 5件)

Chiharu Miyakawa, Thau Kiong Chung, Toshie Sugiyama. Novel metabolism of vitamin D: mRNA expression of 1 α -hydroxylase in extra-renal tissue of the chicken and pig. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral. 2013年5月28日、神戸市

Toshie Sugiyama. Chicken calcium regulation and bone metabolism. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society of Bone and Mineral. 2013年5月28日、神戸市

宮川ちはる、Thau Kiong Chung、杉山稔恵、ニワトリならびにブタにおける25-ヒドロキシビタミンD3-1 α 水酸化酵素の発現、日本家禽学会2013年度春季大会、2013年3月29日、広島市

N. Bannai, Y. Akima, T. K. Chung, T. Hayatsu, T. Sugiyama. Effect of estrogen on novel expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in egg-laying hens. The 15th Asian

Australasian Animal Production Congress. 2012年11月27日、バンコク
T. Sugiyama, Y. Akima, T. Hayatsu.
Overview paper: Novel expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in egg-laying hens. 3rd Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society. 2011年5月7日、アテネ

〔図書〕(計 2件)

Chris Dacke, Toshie Sugiyama, Carol V. Gay. Academic Press. Sturkie's Avian Physiology, 6th edition (Colin S. Scanes edit), 2014

杉山稔恵(分担 水分・ミネラル) シリーズ家畜の化学 ニワトリの科学(古瀬充宏編) 朝倉書店、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 稔恵 (SUGIYAMA, Toshie)

新潟大学・農学部・准教授

研究者番号：10272858

(2) 研究分担者

山田 宜永 (YAMADA, Takahisa)

新潟大学・農学部・教授

研究者番号：40253207