

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850187

研究課題名(和文) 鶏の骨格筋および脂肪の組織形成に対するアドレナリンの作用とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Role of the beta2 adrenergic receptor in skeletal muscle and adipose tissue of chicken.

研究代表者

井尻 大地 (Ijiri, Daichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：50551090

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、孵化直後のニワトリ初生ヒナに対する β_2 アドレナリン受容体作動薬(クレンブテロール)の単回投与による骨格筋重量増加と腹腔内脂肪組織重量減少の作用機序を明らかにすることを目的とした。初生ヒナ腹腔内へのクレンブテロールの単回投与は、骨格筋中のタンパク質分解を減少させ、縫工筋重量が有意に増加させることを明らかにした。一方、脂肪組織では、クレンブテロールが脂肪細胞の分化に関わる転写因子の発現を抑制することで脂肪組織の発達を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of clenbuterol on the skeletal muscle and the adipose tissue in neonatal chicks. In the skeletal muscle, we found that clenbuterol decreased expression of mRNAs for muscle-specific ubiquitin ligases (atrogen-1/MAFbx and MuRF1) accompanied by decreased plasma 3-methylhistidine concentration, an index of muscle protein degradation, at 3 h after injection. These results suggested that, in the skeletal muscle of the chicks, clenbuterol decreased protein degradation via suppressing the expression of genes encoding muscle-specific ubiquitin ligases. In the adipose tissue, we found that a single injection with clenbuterol into newly hatched chicks reduces their abdominal fat pad mass possibly via disrupting adipocyte development during later growth stages.

研究分野：栄養生理学

キーワード：骨格筋 タンパク質分解 脂肪組織 増殖・分化

1. 研究開始当初の背景

長期的な飼料穀物の需給のひっ迫が懸念される状況下で、肉用鶏の産肉性や飼料要求率の更なる改善によって経済性を高めることが求められている。飼料要求率がよく短期間の飼育で出荷できるように育種改良されてきたブロイラーは、生後約 50 日で出荷体重に達し、その飼料要求率も 2.0 以下となっている。一方、短期間での生育を目的としたブロイラー用の飼料は、エネルギー含量が高いため、腹腔内脂肪の過剰蓄積による正肉歩留まりの低下が問題となっている。したがって、今後、ブロイラーの産肉性を改良するためには、栄養・飼料管理によって腹腔内脂肪の減少を伴った正肉歩留まりの向上を実現することが重要である。

近年、初期栄養管理によってブロイラーの生育成績、飼料効率、骨格筋の発達等を改善できることが注目されている。すなわち、初期成長期における骨格筋の発達を促進させることで効率的なブロイラー生産の実現が期待されるが、ニワトリの初期成長期における骨格筋や腹腔内脂肪の組織形成や発達を調節する機構については、未だ不明な部分が多い。

アドレナリンは、G タンパク質共役型受容体であるアドレナリン受容体を介して様々な組織において機能する。哺乳類や鳥類では、 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 -AR) 作動薬による β_2 -AR の活性化が骨格筋量の増大と脂肪組織量の減少を誘導することがよく知られている。しかしながら、ニワトリの骨格筋または脂肪組織における β_2 -AR とその下流シグナルに関する研究報告は少ないため、それぞれの組織における作用機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ニワトリの初期成長期における骨格筋や腹腔内脂肪の組織形成に対する β_2 -AR の作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋に対する β_2 -AR シグナルの作用

哺乳類の骨格筋において β_2 -AR の選択的作動薬(クレンブテロール)による β_2 -AR の活性化は、タンパク質の合成を促進し、一方で、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解を抑制する。さらに、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解に対しては、クレンブテロールが骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである atrogen-1/MAFbx (Muscle Atrophy F-Box) および MuRF1 (Muscle RING-Finger Protein-1) の発現を抑制する。ニワトリにおいても、哺乳類と同様にクレンブテロールが骨格筋量を増大させるが、ニワトリ骨格筋の β_2 -AR とその下流シグナルに関する研究報告は少ないため、その作用機序は不明である。そこで、ニワトリ

骨格筋における β_2 -AR とその下流シグナルの作用機序を明らかにすることを目的として、ニワトリ初生ヒナへのクレンブテロールの投与条件の検討を行い、初生ヒナの骨格筋に対するクレンブテロールの作用を検討した。

ブロイラー初生ヒナに対するクレンブテロールの投与条件の検討

本実験では、ブロイラー初生ヒナの骨格筋量を増大させるクレンブテロールの投与濃度の条件検討を行った。24羽の1日齢ブロイラー雄ヒナ (ROSS308) を 6羽ずつ 4群に分けた。クレンブテロールは、体重 1 kg あたり 0.01、0.1、1 mg となるように投与した (0.01 mg 区、0.1 mg 区および 1 mg 区)。対照区には、PBS を投与した。飼料と水は自由摂取とし、クレンブテロール投与の 24 時間後に解体を行った。哺乳類において、骨格筋に対するクレンブテロールの作用は、骨格筋に含まれる筋線維型の割合によって異なることが報告されているので、本実験では足部の骨格筋である縫工筋 (速筋型筋線維と遅筋型筋線維を含む) と胸部の骨格筋である浅胸筋 (速筋型筋線維のみを含む) を用いた。

クレンブテロール投与が初生ヒナの骨格筋タンパク質分解に及ぼす影響

先ず、クレンブテロール投与が初生ヒナの骨格筋タンパク質分解に及ぼす影響を調べることを目的とし、10羽の1日齢ブロイラー雄ヒナ (ROSS308) を 5羽ずつ 2群に分けた。クレンブテロール投与区には、体重 1 kg あたり 0.1 mg となるようにクレンブテロールを投与した (投与区)。対照区には、PBS を投与した。飼料と水は自由摂取とし、クレンブテロール投与の 24 時間後に解体を行った。タンパク質分解の指標として、血漿中および骨格筋中の 3-メチルヒスチジンを測定した。

続いて、クレンブテロールが初生ヒナの縫工筋および浅胸筋における myostatin、IGF-1、および atrogen-1/MAFbx の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。36羽の1日齢ブロイラー雄ヒナ (ROSS308) を 18羽ずつ投与区と対照区の 2群に分けた。投与区には、クレンブテロールを体重 1 kg あたり 0.1 mg となるように投与し、対照区には PBS を投与した。投与の 1、4、24 時間後に解体を行った。骨格筋における atrogen-1/MAFbx、MuRF1、myostatin、および insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の mRNA 発現量を調べた。

β_2 -AR シグナルが初生ヒナの骨格筋タンパク質分解を抑制する作用機序

本実験では、クレンブテロールにより活性化される β_2 -AR の細胞内シグナル伝達カスケードを明らかにすることを目的とした。18羽の1日齢ブロイラー雄ヒナ (ROSS308) を 6羽ずつ 3群に分けた。クレンブテロールを体重 1 kg あたり 0.1 mg となるように投与した。

投与前に解体を行った群を対照区とし、投与の 1 および 3 時間後に解体を行った。atrogin-1/MAFbx および MuRF1 の転写は、転写因子 FOXO1 によって調節されるので、本実験では転写因子 FOXO1 および FOXO1 のリン酸化に関わる Akt のリン酸化状態を調べた。縫工筋から核タンパク質と細胞質タンパク質をそれぞれ抽出し、FOXO1 の局在を調べた。

(2) 脂肪組織に対する β_2 -AR シグナルの作用

哺乳類や鳥類において、過剰なエネルギーは、トリアシルグリセロールとして白色脂肪組織に貯蔵される。ブロイラーに対する高エネルギー飼料の給与は、過剰な脂肪組織の蓄積をもたらす。この腹腔内脂肪の過剰蓄積は、飼料要求率の悪化や正肉歩留まりの低下をもたらすため、肉用鶏生産における深刻な問題である。鳥類の初期成長期における脂肪組織の発達には、脂肪細胞の数の増加 (hyperplasia) と脂肪細胞のサイズの増大 (hypertrophy) の両方に起因する。ブロイラーの過剰な脂肪組織の蓄積を防ぐためには、初期成長期における脂肪組織の発達調節メカニズムを解明することが重要である。

本実験では、クレンプテロールを単回投与した初生ヒナを用いて、クレンプテロールによる腹腔内脂肪重量減少の作用機序を明らかにすることを目的とした。

33 羽の 1 日齢ブロイラー雄ヒナ (ROSS308) を 2 群に分けた。クレンプテロール投与区には、体重 1 kg あたり 0.1 mg となるように投与した (投与区)。対照区には、PBS を投与した。飼料には育雛用飼料 (パワーチキン P、日和産業、神戸、日本、CP; 22.0% 以上、ME; 3000 kcal/kg 以上) を自由に採食させた。クレンプテロール投与 14 日後に解体を行った。

4. 研究成果

(1) 骨格筋に対する β_2 -AR シグナルの作用

ブロイラー初生ヒナに対するクレンプテロールの投与条件の検討

投与 24 時間後の体重にクレンプテロール投与による影響は認められなかった。縫工筋の重量は、0.01 mg 区および 0.1 mg 区において対照区に対して有意な増加を示したが、1 mg 区では対照区との差は認められなかった。一方、浅胸筋の重量には、クレンプテロール投与による影響は認められなかった。これらの結果より、初生ヒナの骨格筋に対するクレンプテロールの投与条件は、体重 1 kg あたり 0.01 または 0.1 mg が適切であると判断した。

クレンプテロール投与が初生ヒナの骨格筋タンパク質分解に及ぼす影響

と同様に、体重にはクレンプテロール投与の影響は認められなかったが、クレンプテ

ロール投与区の縫工筋の重量は、対照区と比較して有意に増加した。一方、浅胸筋の重量には、クレンプテロール投与の影響は認められなかった。血漿中の 3-メチルヒスチジン濃度は、クレンプテロール投与により減少がみられたが、その差は有意ではなかった。縫工筋の 3-メチルヒスチジン量は、クレンプテロール投与により対照区と比較して有意な減少が認められた。一方、浅胸筋の 3-メチルヒスチジン量には、クレンプテロール投与の影響は認められなかった。これらの結果より、クレンプテロール投与による縫工筋重量の増加は、骨格筋中のタンパク質分解の抑制を介して誘導されることが示唆された。

縫工筋における myostatin mRNA 発現量は、クレンプテロール投与の 4 および 24 時間後に対照区に対する有意な減少が認められた。一方で、縫工筋における IGF-1 mRNA の発現量はクレンプテロール投与の 24 時間後まで変化が認められなかった。atrogin-1/MAFbx mRNA の発現量は、クレンプテロール投与の 1 および 4 時間後に一過性に発現が減少し、投与の 24 時間後にはコントロールと同等の発現レベルとなった。これらの結果より、初生ヒナの縫工筋において、クレンプテロールが myostatin および atrogin-1/MAFbx mRNA の発現減少を介してタンパク質分解を抑制する可能性が示唆された。

β_2 -AR シグナルが初生ヒナの骨格筋タンパク質分解を抑制する作用機序

クレンプテロール投与 1 時間後に縫工筋における Akt のリン酸化割合が増加し、投与 3 時間後に FOXO1 のリン酸化割合の増加が確認された。加えて、細胞質タンパク質中におけるリン酸化 FOXO1 の発現量が増加し、一方で、核タンパク質中における FOXO1 の発現量が減少した。これらの結果より、クレンプテロールにより β_2 -AR が活性化されると Akt のリン酸化を介して FOXO1 がリン酸化される、FOXO1 の局在が細胞質側へ変化することが明らかとなった。その結果、核内における FOXO1 のタンパク質発現量が減少し、FOXO1 の標的遺伝子である atrogin-1/MAFbx および MuRF1 の mRNA 発現量が減少すると考えられる。

(2) 脂肪組織に対する β_2 -AR シグナルの作用

投与 14 日後の体重に差は認められなかったが、クレンプテロールを投与したヒナの腹腔内脂肪重量は、対照区と比較して有意に減少した。加えて、腹腔内脂肪組織における細胞の断面積を計測した結果、クレンプテロールを投与したヒナで断面積の減少が認められた。これらの結果から、1 日齢初生ヒナに対するクレンプテロール投与が脂肪組織の発達に抑制的に作用することが示唆された。

続いて、クレンプテロールによる脂肪組織の発達抑制メカニズムを明らかにするために、脂肪組織における遺伝子発現分析を行っ

た。その結果、クレンプテロールを投与したヒナの脂肪細胞において、転写因子である Krüppel-like zinc finger transcription factor 15 (KLF-15) および zinc finger protein 423 (ZNF423) の mRNA 発現量の減少が認められた。ニワトリの脂肪細胞において、これらの転写因子が脂肪細胞の分化に関わることが報告されている。加えて、クレンプテロールを投与したヒナの脂肪組織において脂肪酸合成酵素 (FAS) およびアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の mRNA 発現量の減少が確認された。FAS および ACC は、脂肪前駆細胞では発現せず、成熟脂肪細胞のみに発現が確認される。これらの結果より、初生ヒナへのクレンプテロール投与は、脂肪細胞の分化に関わる転写因子の発現を抑制することで脂肪組織の発達を抑制する可能性が示唆された。

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)

Saki Shimamoto, Daichi Ijiri, Kazuki Nakashima, Mana Kawaguchi, Yoshitaka Ishimaru, Airi Furukawa, Akira Ohtsuka. Clenbuterol Changes Phosphorylated FOXO1 Localization and Decreases Protein Degradation in the Skeletal Muscle of Neonatal Chicks. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、in press.

Daichi Ijiri, Kanae Ishitani, Mahmoud Mohamed Hanza El-Deep, Mana Kawaguchi, Saki Shimamoto, Yoshitaka Ishimaru, Akira Ohtsuka. Single injection of clenbuterol into newly hatched chicks decreases abdominal fat pad weight in growing broiler chickens. *Animal Science Journal*, 査読有、in press.

井尻大地, 石丸善貴, 島元紗希, 石谷佳苗, 大塚 彰. 鶏の骨格筋と脂肪の組織形成に対する α_2 アドレナリン受容体シグナルの作用機序の解明. *栄養生理研究会報*, 査読有、59 巻、2015、89-96.

Yoshitaka Ishimaru, Daichi Ijiri, Saki Shimamoto, Kanae Ishitani, Tsutomu Nojima, Akira Ohtsuka. Single injection of the α_2 -adrenergic receptor agonist, clenbuterol, into newly hatched chicks alters abdominal fat pad mass in growing birds. *General and Comparative Endocrinology*, 査読有、211 巻、2015、9-13.

Daichi Ijiri, Kanae Ishitani, Saki Shimamoto, Yoshitaka Ishimaru, Akira Ohtsuka. The effects of intraperitoneal clenbuterol injection on protein degradation and myostatin expression differ between the sartorius and pectoral muscles of neonatal chicks. *General and Comparative Endocrinology*, 査読有、206 巻、2014、111-117.

[学会発表](計5件)

島元紗希, 井尻大地, 川口真奈, 中島一喜, 大塚彰. プロイラー初生ヒナの骨格筋における FOXO1 タンパク質のリン酸化割合と骨格筋重量との関連. 日本家禽学会、日本獣医生命科学大学、東京都武蔵野市、3月、2016.

島元紗希, 井尻大地, 中島一喜, 大塚彰. 初生ヒナ骨格筋においてクレンプテロールは Akt-FOXO1 シグナルを介してユビキチンリガーゼの発現を抑制する. 日本畜産学会、酪農学園大学、北海道江別市、9月、2015.

島元紗希, 石丸善貴, 井尻大地, 大塚彰. 初生ヒナへの α_2 アドレナリン受容体作動薬の持続投与が骨格筋の発達に及ぼす影響. 日本畜産学会、宇都宮大学、栃木県宇都宮市、3月、2015.

島元紗希, 石谷佳苗, 石丸善貴, 川口真奈, 井尻大地, 大塚彰. ニワトリ初生ヒナの骨格筋に対する α_2 アドレナリン受容体作動薬投与および遮断薬投与の影響. 日本家禽学会、鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市、9月、2014.

石丸善貴, 石谷佳苗, 井尻大地, 大塚彰. 初生ヒナへの α_2 アドレナリン受容体作動薬の投与が脂肪組織発達へ及ぼす影響. 日本畜産学会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、3月、2014.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

鹿児島大学農学部農業生産科学科栄養生化学・飼料化学研究室ホームページ

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0035/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井尻 大地 (IJIRI Daichi)

鹿児島大学・学術研究院・農水産獣医学域

農学系・准教授

研究者番号：50551090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし