

ふるかわ きょうへい

氏名（本籍地） 古川 恭平
学位の種類 博士（農学）
学位記番号 農博第1220号
学位授与年月日 平成31年3月27日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項
研究科，専攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻
論文題目 暑熱環境下における肉用鶏のタンパク質分解誘導因子の探索とその制御
博士論文審査委員 （主査）准教授 喜久里 基
教授 麻生 久
准教授 白川 仁
教授 豊水 正昭

博士論文内容要旨

暑熱環境下における肉用鶏の
タンパク質分解誘導因子の探索とその制御

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

古川 恭平

指導教員

豊水 正昭 教授

博士論文構成

第一章 序論

第二章 暑熱時の骨格筋タンパク質分解におけるコルチコステロンおよび活性酸素の関与

第一節 ニワトリ生体を用いた筋タンパク質分解の時系列解析およびコルチコステロンと活性酸素の関与の調査

第二節 ニワトリ培養筋細胞を用いた高温培養時の活性酸素産生が筋タンパク質分解におよぼす影響の検証

第三節 ニワトリ培養筋細胞を用いた高温培養時における筋タンパク質分解におよぼすコルチコステロンの影響の検証

第三章 エネルギー代謝状態やインスリン、IGF-I、内毒素が暑熱時の骨格筋タンパク質分解におよぼす影響の検討

第四章 暑熱時のグルタミン・グルタミン酸給与によるタンパク質分解への抑制効果

第五章 総合考察

第一章 序論

夏季の暑熱環境における肉用鶏の産肉量低下は家禽産業における大きな問題である。近年の地球温暖化によって、2100年には気温が約1~3.7℃上昇することが予想されており（IPCC、第五次評価報告書、2014）、我が国の家禽産業では2060年には産肉量が15%以上低下する地域が拡大することが予想されている（山崎ら、2006年、図1）。このような暑熱による鶏肉生産

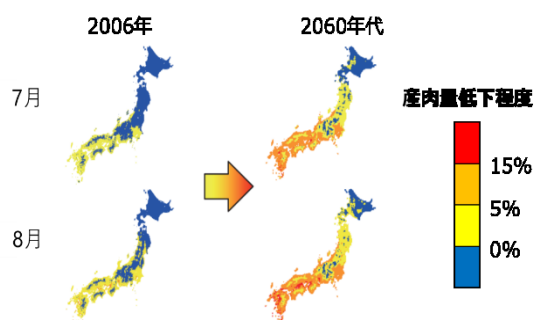


図1. わが国における夏場の鶏肉産肉量の予測
（山崎ら、2006年、一部改変）

性の低下、すなわち暑熱ストレスを制御する研究が広く行われている。暑熱時に発生する典型的な生体反応として、呼吸性アルカローシス、酸化ストレスや筋タンパク質分解亢進が挙げられる。このうち、酸化ストレスは産肉量や肉質を低下させる主要因の一つと多くの研究者が関心を寄せている。実際、夏季の家禽生産現場ではビタミンEやビタミンCなどの抗酸化物質を飼料に多く添加し、酸化ストレスの発生を抑えようとしている。しかし、その効果は暑熱ストレスを完全に抑止できるまでには至っていない。このことより、酸化ストレス以外の要素が暑熱ストレスの発生に大きく関わっていることが考えられるが、現行の研究ではこの点を深く追究できていない。したがって、暑熱ストレスに対するより効果的な飼料制御法を確立するためには、暑熱時において産肉量低下が引き起こされる分子メカニズムの解明が必要である。

本研究では、上記の暑熱時の生体反応のうち、筋タンパク質分解亢進に着目し、その発生機序を多角的に追究した。筋タンパク質分解は加齢医学分野においては筋ジストロフィー等のように筋量低下を招く代謝反応とされており、暑熱時の分解亢進も家禽の骨格筋量に影響を与える大きな要因であると考えられる。したがって、骨格筋量に対して直接的な影響を与える骨格筋タンパク質分解の誘導メカニズムを明らかにすることは、家禽の暑熱ストレスの全貌解明に向けて非常に重要である。暑熱時の肉用鶏における筋タンパク質分解の誘導因子に関して、これまでに暑熱時のニワトリでは副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン（CORT）の血中濃度が増加し、筋タンパク質分解を促進することが報告されている（Yunianto et al., 1997）。同ホルモンが筋タンパク質分解を誘導するという哺乳類の知見（Menconi et al., 2008）を背景に、現在の家禽科学では暑熱時のニワトリの筋タンパク質分解もCORTの分泌増加によると広く理解されている。しかしながら、この理解はあくまで暑熱時においてCORT分泌増と筋タンパク質分解亢進が同時に起きているとの現象論からの解釈によるものであり、両者の関係性を詳細に明らかにした研究は皆無である。近年の研究の進捗より筋タンパク質分解は、CORTや他の糖質コルチコイド以外にも、骨格筋の活性酸素（ROS）（Li et al., 2003）や細胞内エネルギー代謝の変化

(Baskin and Taegtmeier, 2011)、成長促進因子 (Insulin-like growth factor I; IGF-I) (Latres et al., 2005) やインスリンの血中濃度変化 (Tesseraud et al., 2007)、腸管から血中への内毒素流入 (Doyle et al., 2011) などによって制御されている可能性が実験動物をはじめとする哺乳動物で示されている。暑熱ニワトリにおいても、骨格筋ミトコンドリア ROS (mitROS) 産生量が増加すること (Kikusato and Toyomizu, 2013)、血中内毒素濃度が増加すること (南都ら、2016)、肝臓の IGF-I 発現が低下すること (Okuyama et al., 2017) が報告されているが、これらが筋タンパク分解におよぼす影響はほとんど検証されていない。

したがって、本研究では暑熱環境下のニワトリ骨格筋におけるタンパク質分解の誘導因子の探索とその制御法の確立を目的として、まず、暑熱時の筋タンパク質分解への mitROS およびコルチコステロンの関与についてニワトリ生体 (第二章第一節) および培養筋細胞 (第二節および第三節) を用いて詳細に調べた。次に、上記二因子以外の筋タンパク質分解候補因子、すなわちインスリン、IGF-I、エネルギー代謝および内毒素が暑熱時の筋タンパク質分解に関与するか否かを調べた (第三章)。その結果、暑熱時の筋タンパク質分解は血中のインスリン濃度低下、ならびに筋 mitROS の過剰産生によって引き起こされる可能性が示された。最後に、それら因子を有効的に制御しうると考えられたグルタミンおよびグルタミン酸 (Gln/Glu) の飼料への同時添加が暑熱時の筋タンパク質分解に対する抑制効果を調べた (第四章)。

第二章 暑熱時の骨格筋タンパク質分解におけるコルチコステロンおよび活性酸素の関与

第一節 ニワトリ生体を用いた筋タンパク質分解の時系列解析およびコルチコステロンと活性酸素の関与の調査

【背景および目的】

細胞内における主なタンパク質分解経路として、標的タンパク質をユビキチン化（標識）し分解するユビキチンプロテアソーム系、標的タンパク質を特異的部位で直接切断するカルパイン系、ならびに主に巨大タンパク質や細胞小器官を分解するリソソーム系の3つが存在する。哺乳動物を用いた研究において、CORT および ROS は筋特異的ユビキチン転移酵素である Atrogin-1 の発現を増加させることでユビキチンプロテアソーム系を活性化させ、筋タンパク質を分解することが示されている（Menconi et al., 2008、Li et al., 2003 他多数）。したがって、暑熱ニワトリの筋タンパク質分解においても、CORT および mitROS は筋 Atrogin-1 発現誘導およびユビキチンプロテアソーム系活性化に関与していることが考えられた。そこで、本節では暑熱ニワトリにおける血中 CORT 濃度、筋タンパク質分解関連因子を経時的に測定し、さらに同分解因子が増加したタイミングにおける骨格筋 mitROS 産生量を測定した。

【材料と方法】

市販孵卵場（松本鶏園）より入手した 0 日齢の雄肉用鶏（*Gallus gallus domesticus*, ROSS 系統）を供試し、幼雛用バッテリーで 14 日間飼育した。その後、環境温度制御室内において約 10 日間飼育後、25 日齢時において、室内温度を一時間に 1 °C ずつ上昇させ、33 °C で暑熱感作した（対照条件：24 °C）。温度上昇開始から、0、0.5、1 および 3 日後において、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、水ならびに飼料は自由摂取とした。飼料はトウモロコシおよび大豆粕を主体とし、各栄養素成分が日本家畜飼養標準を満たす自家製飼料（代謝エネルギー（ME）含量：3,100 kcal/kg、粗タンパク質（CP）含量：21%）を給餌した。

分析において、筋タンパク質分解を評価するため、血中 3-メチルヒスチジン（ N^T -メチルヒスチジン）濃度および骨格筋タンパク質分解関連因子の遺伝子発現量をそれぞれ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）およびリアルタイム RT-PCR を用いて測定した。各標的遺伝子の発現量は 18s の発現量で補正した。血中 CORT 濃度は市販 ELISA キット（Enzo Life Sciences）を用いて測定した。また、骨格筋の mitROS 産生量を評価するため、同組織より遠心分離法でミトコンドリアを単離し、呼吸基質（コハク酸、グリセロール 3 リン酸）を添加した際に発生したスーパーオキシド（ $O_2^{\cdot-}$ ）産生量を蛍光プローブ Amplex® Red（ $\lambda_{ex} = 544 \text{ nm}/\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ ）を用いて測定した。統計解析は各タイムポイント

トにおける対照区と暑熱区の値を Student's *t*-test を用いて実施した。

【結果および考察】

まず、筋タンパク質分解関連因子の時系列変化を解析した結果、暑熱感作したニワトリでは、血中 3-メチルヒスチジン濃度が感作 3 日後において対照区と比較して有意に増加した (図 2A)。また、筋 Atrogin-1 の遺伝子発現量は暑熱 0.5 日後に有意に増加した (図 2B)。その一方で、他のユビキチンプロテアソーム系関連因子である MurF-1 および ProC2 には有意な変化は認められなかった (図 2C および D)。また、カルパイン系およびリソソーム系の分解酵素である μ -Calpain および Cathepsin B の遺伝子発現量にも、暑熱感作による増加は認められなかった (図 2E および F)。これらの結果より、暑熱時の骨格筋ではまず Atrogin-1 発現が増加し、その後ユビキチンプロテアソーム系のタンパク質分解が亢進することが考えられた。さらに、Atrogin-1 発現が増加した暑熱 0.5 日後において、Atrogin-1 の転写に関与すると考えられる forkhead box O (FoxO) 3 の遺伝子発現量が増加傾向を示し ($P=0.09$ 、図 3A)、また、血中 CORT 濃度 (図 3B) および筋 mitROS 産生量 (図 4) も増加した。以上の結果より、暑熱時のニワトリでは CORT の分泌増加および筋 mitROS の過剰産生が FoxO3 の発現増加を介して Atrogin-1 発現を誘導し、ユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムが活性化することで、筋タンパク質分解が亢進する可能性が考えられた。

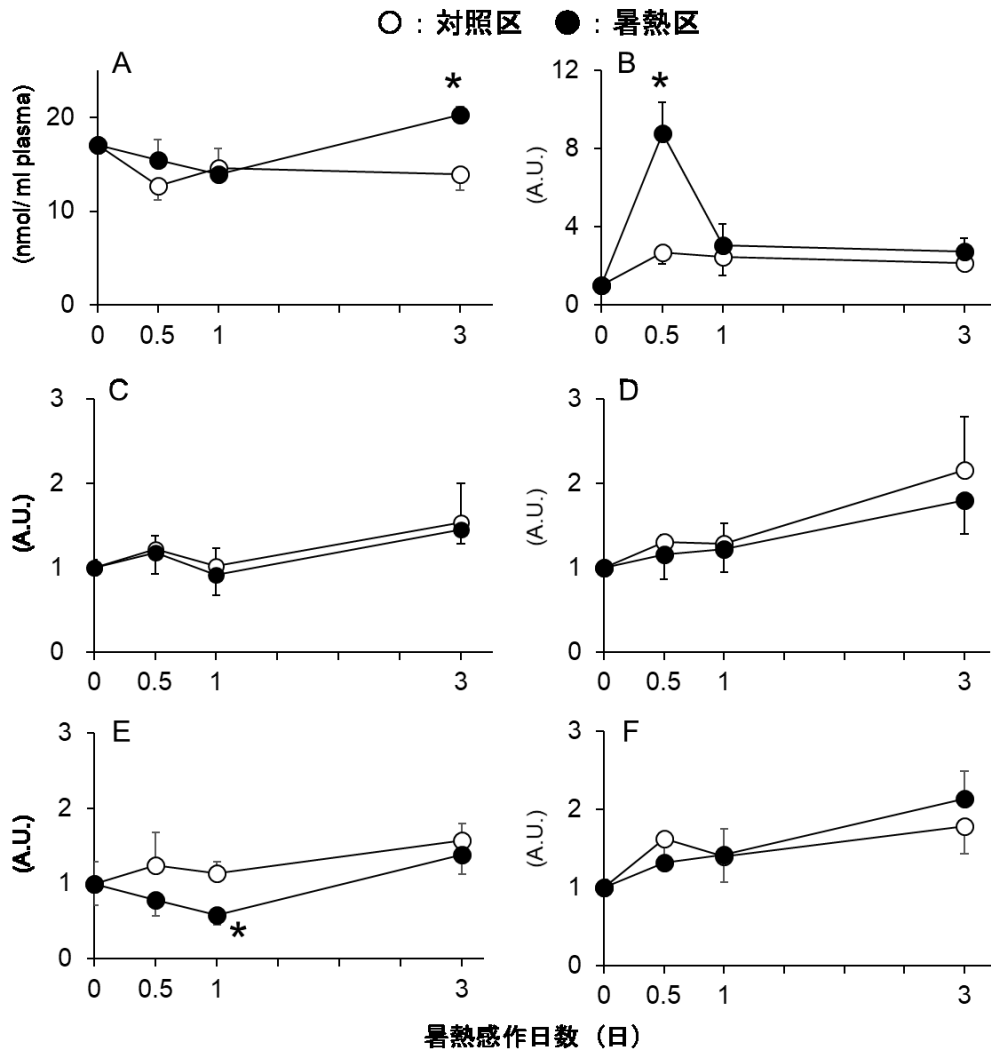


図 2. 暑熱環境下の肉用鶏における各種筋タンパク質分解関連パラメータの経時的変化

A) 血中 3-メチルヒスチジン濃度、B) 浅胸筋 Atrogin-1 遺伝子発現量、

C) 浅胸筋 MuRF1 遺伝子発現量、D) 浅胸筋 ProC2 遺伝子発現量、

E) 浅胸筋 μ -Calpain 遺伝子発現量、F) 浅胸筋 Cathepsin B 遺伝子発現量

Means \pm SE, n = 5-8, * $P < 0.05$ compared to the control values at each time point.

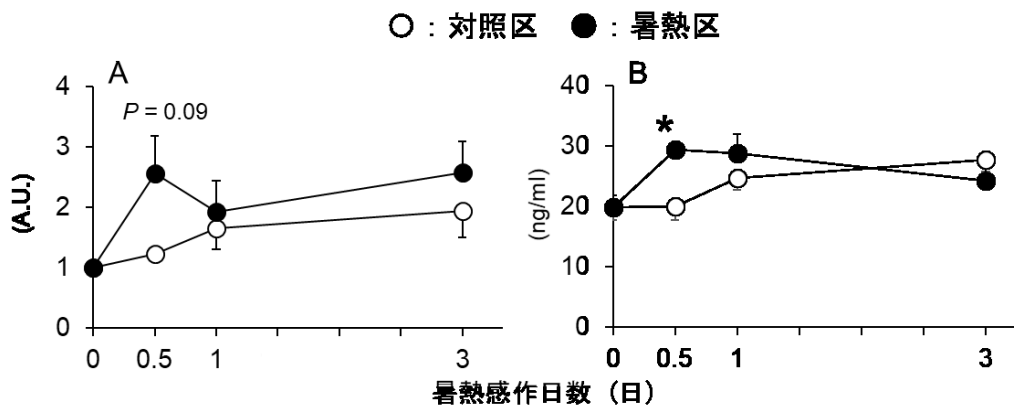


図 3. 暑熱環境下の浅胸筋 FoxO3 発現および
血中コルチコステロン濃度の経時的変化

A) 浅胸筋 FoxO3 遺伝子発現量、B) 血中 CORT 濃度

Means \pm SE, n = 5-8, * P < 0.05 compared to the control values at each time point.

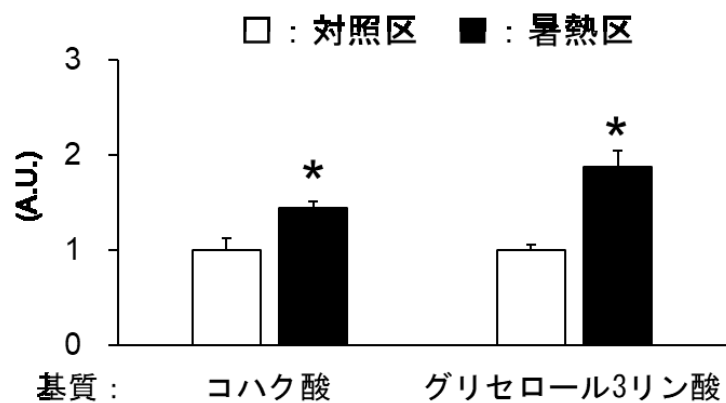


図 4. 暑熱 0.5 日後におけるニワトリ骨格筋 mitROS 産生量

Means \pm SE, n = 6, * P < 0.05 compared to the control

第二節 ニワトリ培養筋細胞を用いた高温培養時の活性酸素産生が筋タンパク質分解におよぼす影響の検証

【背景および目的】

前節で行った *in vivo* 試験より、暑熱時のニワトリ骨格筋におけるタンパク質分解亢進には Atrogin-1 発現誘導によるユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解の活性化が関与し、さらに Atrogin-1 の発現誘導には CORT の分泌増加および筋 mitROS の過剰産生の片方あるいは両方が関与している可能性が示された。過去の研究において、ニワトリ培養筋細胞を高温培養すると細胞タンパク質量が低下し (Nakashima et al., 2004)、これには酸化ストレスあるいは mitROS 産生の増加が関与する可能性が報告されている (Nakashima et al., 2004; Kikusato et al., 2015)。そこで、本節ではニワトリ培養筋細胞を高温培養した際に過剰産生される mitROS が Atrogin-1 発現およびタンパク質分解を誘導し、筋タンパク質量が低下するとの仮説を立て、その検証を行った。

【材料と方法】

0 日齢肉用鶏雄の浅胸筋より筋芽細胞を単離・調製し、10%仔ウシ血清 (FBS) を含む DMEM/M199 (4:1) 混合培地で約 48 時間培養した。80-90%のサブコンフルエント状態になったことを確認した後、無血清培地 (試験培地) に切り替え、1、3、6 時間、41 °C で高温培養した (対照条件: 37 °C)。高温培養終了後、HBSS 培地条件下において細胞中のミトコンドリア特異的 $O_2^{\cdot-}$ 産生量を蛍光プローブ MitoSOX Red™ ($\lambda_{ex} = 510 \text{ nm}/\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$) を用いて測定し、細胞タンパク質量当たり補正した。Atrogin-1 発現量はリアルタイム RT-PCR で、細胞タンパク質量は microBCA 法で各々測定した。また、筋タンパク質分解におけるユビキチンプロテアソーム系の関与を検証するため、プロテアソーム阻害剤 (Proteasome Inhibitor I, Merck Millipore) を、また、mitROS 産生量の関与を検証するため、 $O_2^{\cdot-}$ 捕捉剤である 4-Hydroxy Tempo (Tmp) を用いた。プロテアソーム阻害剤は試験培地に常時添加し、Tmp はこれを含む無血清培地で高温培養前の 1 時間前培養を行った。統計解析において、対照 (通常培養) 区および高温区の 2 区間の解析では Student's *t*-test を、対照、高温および上記阻害剤あるいは捕捉剤添加区の 3 区間の解析では Tukey-Kramer multi-comparison's test を用いた。

【結果および考察】

まず、高温時の筋タンパク質分解におけるユビキチンプロテアソーム系の関与を調べた。その結果、6 時間の高温培養によって対照区に比べ有意に低下した細胞タンパク質量は、プロテアソーム阻害剤の添加により、対照区レベルに維持されることが明らかになった (図 5A)。この結果より、高温培養による細胞タンパク質量の低下はユビキチンプロテアソーム系の活性化によって引き起こされていたことが実証された。

続いて、高温培養時の Atrogin-1 発現の時系列変化およびその発現亢進が認められた際の mitROS 産生の変化を調べた。高温培養 1 時間後において、Atrogin-1 遺伝子発現量は有意に増加し、これ以降、その発現量は徐々に低下した (図 5B)。高温培養 1 時間後では、ミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ 産生量も有意に増加することが認められた (図 5C)。これらの結果より、高温培養筋細胞においてもミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ の過剰産生が Atrogin-1 発現を誘導し、ユビキチンプロテアソーム系のタンパク質分解を活性化し、筋タンパク質分解を亢進させた可能性が考えられた。

そこでこの可能性を実証するため、 $O_2^{\cdot-}$ 捕捉剤である Tmp を高温培養細胞に添加し、高温培養時の Atrogin-1 発現および細胞タンパク質量におよぼす mitROS の影響を調べた。その結果、Tmp 添加により、高温培養 1 時間後におけるミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ 産生量および Atrogin-1 発現の増加が抑制され (図 6A、図 6B)、さらに、高温 6 時間後における細胞タンパク量の低下も抑制された (図 6C)。以上の結果より、ニワトリ筋細胞における高温時の筋タンパク質分解は Atrogin-1 発現増加にともなうユビキチンプロテアソーム系の活性化によることが実証され、さらに Atrogin-1 発現増加には mitROS 過剰産生が一つの誘導要因であることが実証された。

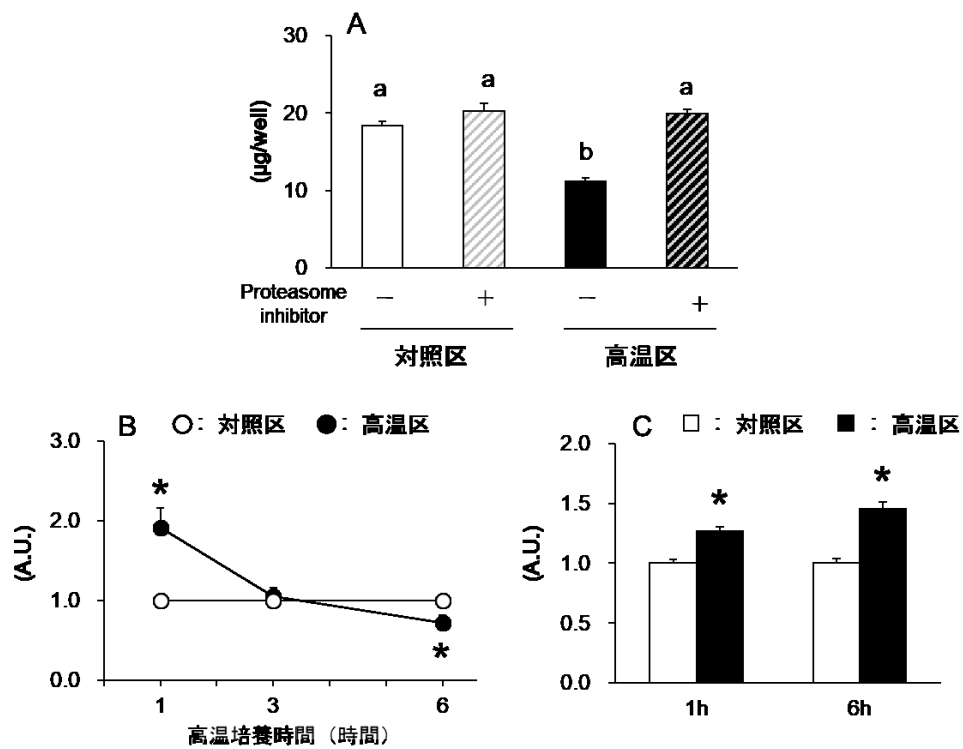


図5. ニワトリ培養筋細胞を高温培養した場合における
ミトコンドリア活性酸素およびタンパク質分解の変化

A) 細胞タンパク質量、B) Atrogin-1 遺伝子発現量、C) ミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ 産生量

Means \pm SE, n = 4-9, * P < 0.05 compared to the control values,

^{ab} P < 0.05; different letters are statistically different.

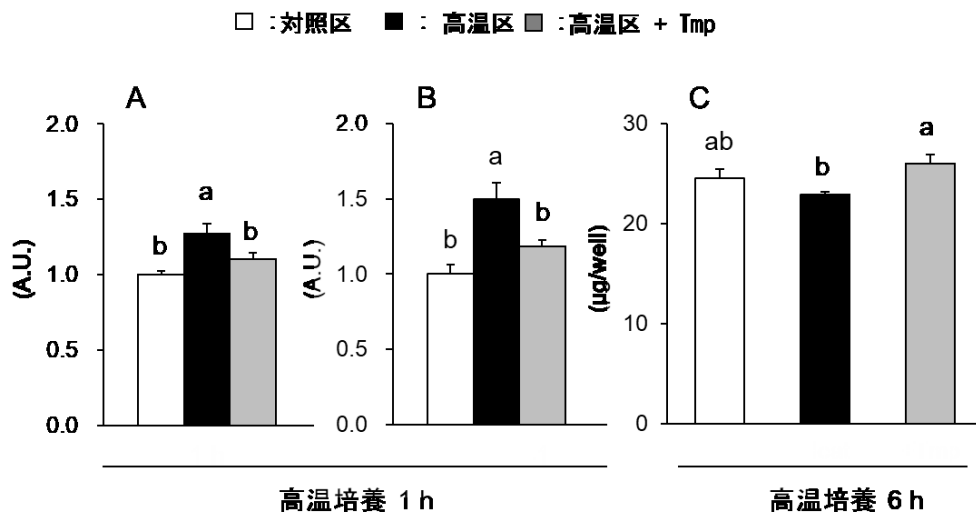


図6. $O_2^{\cdot-}$ 捕捉剤 Tmp を添加したニワトリ培養筋細胞を高温培養した場合における
ミトコンドリア $O_2^{\cdot-}$ 産生量 (A)、Atrogin-1 遺伝子発現量 (B)、細胞タンパク質量 (C)

Means \pm SE, n = 4-9, ^{ab} P < 0.05; different letters are statistically different.

第三節 ニワトリ培養筋細胞を用いた高温培養時における筋タンパク質分解におよぼすコルチコステロンの影響の検証

【背景および目的】

前節において、ニワトリ筋細胞における高温時の筋タンパク質分解は Atrogin-1 発現増加にともなうユビキチンプロテアソーム系の活性化によることが示され、さらに Atrogin-1 発現増加には mitROS 過剰産生が一つの誘導要因として関係していることが実証された。暑熱時のニワトリでは mitROS 産生および Atrogin-1 発現に加え、CORT の分泌量も同時期帯に増加することが明らかになっている（第二章第一節）。CORT を含む糖質コルチコイド類は、哺乳類ではタンパク質分解亢進やグルコース酸化の低下といった代謝制御を行うホルモンであることが知られている（Qi and Rodrigues, 2007; Menconi et al., 2008）。ニワトリにおいても CORT や合成糖質コルチコイドであるデキサメタゾンを用いた研究は多数あり、その多くが同ホルモンの筋タンパク質分解亢進因子としての作用を報告している。しかし、CORT を生理的なレベルで考えた場合、ニワトリの血中 CORT 濃度はげっ歯類のそれと比べると非常に少ない。ニワトリの血中 CORT 濃度は本章第一節で示したように通常条件下では約 20 ng/ml である。しかしながら、これまでの家禽に対する糖質グルココルチコイドの多くの研究ではこれらを大きく超えた濃度を投与している。また、同節において CORT 濃度は暑熱時でも約 30 ng/ml すなわち通常時の 1.5 倍程度の上昇であることを考えると、暑熱時において CORT が筋タンパク質分解を引き起こす主要な因子であるか否かは疑問の余地が残る。そこで、本節では暑熱ニワトリの血中で検出される程度の CORT でも筋タンパク質分解を誘導するかを前節と同様に高温培養筋を用いて検証した。すなわち、高温時の鶏培養筋細胞に低濃度の CORT (20 ng/ml) を添加した際における、筋タンパク質分解におよぼす影響を調べた。

【材料と方法】

前節と同様にニワトリ筋芽細胞を単離・調製した。サブコンフルエント状態を確認した後、0 あるいは 20 ng/ml の CORT (Wako) を含む無血清 DMEM/M199 混合培地で 1 あるいは 6 時間、41 °C で高温培養した (対照条件 : 37 °C)。その後、Atrogin-1 および FoxO3 の遺伝子発現量ならびに細胞タンパク質量を測定した。統計解析には Tukey-Kramer multiple comparison's test を用いた。

【結果および考察】

前節の結果を基に、まず 6 時間の高温培養時における細胞タンパク質量におよぼす CORT 添加の影響を調べた。その結果、高温区で認められた細胞タンパク質量の低下に対して、20 ng/ml の CORT 添加は何ら影響を与えなかった (図 7A)。さらに、高温培養 1 時間における Atrogin-1 遺伝子発現量を調べた結果、高温区における同因子の有意な上昇が

確認されたが、これに対しても CORT 添加は何ら影響を与えなかった (図 7B)。なお、Atrogin-1 の転写因子である FoxO3 の発現量は 1 時間の高温培養では変化が認められなかったが、CORT 添加により有意に増加することが認められた (図 7C)。以上の結果から、暑熱時の肉用鶏で見られた血中 CORT 濃度の増加は、FoxO3 の遺伝子発現量を増加させるものの、筋タンパク質分解の引き金である Atrogin-1 発現誘導に影響をあたえておらず、タンパク質分解には関与していない可能性が強く示された。

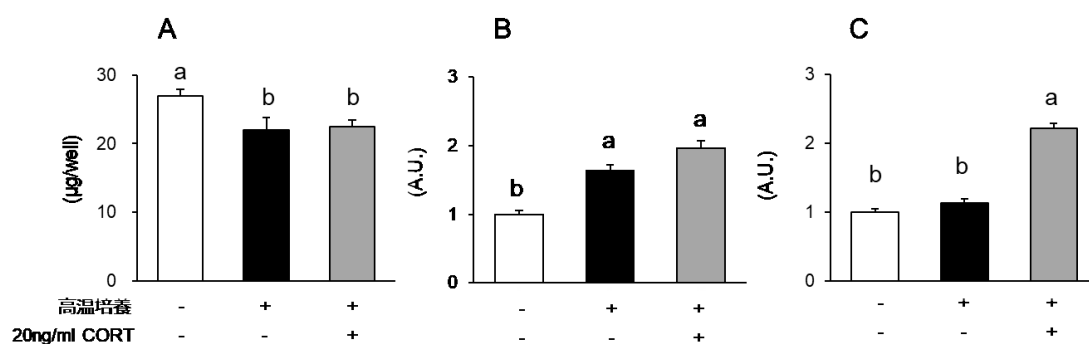


図 7. 高温培養時のニワトリ筋細胞におよぼす CORT 添加の影響

A) 細胞タンパク質量、B) Atrogin-1 遺伝子発現量、C) FoxO3 遺伝子発現量

Means \pm SE, n = 6-9, ^{ab}P < 0.05; different letters are statistically different.

第三章 エネルギー代謝状態やインスリン、IGF-I、内毒素が暑熱時の骨格筋タンパク質分解におよぼす影響の検討

【背景および目的】

前章では、暑熱時の筋タンパク質分解における CORT および mitROS に着目し、両因子の作用を検証した。序論で述べたように、筋タンパク質分解には CORT や mitROS の他にも内毒素やエネルギー代謝状態やインスリン、IGF-I、の変化も関与していることから、暑熱ニワトリにおけるこれらの変化の有無を明らかにすることにより筋タンパク質分解亢進メカニズムをより深く理解することが可能となる。図 8 にこれらの因子が暑熱時の筋タンパク質分解の中核因子である Atrogin-1 発現誘導におよぼす影響を概説する。これまでの研究より、骨格筋のタンパク質代謝において、内毒素は Atrogin-1 発現を正に制御し (Doyle et al., 2011)、また、細胞内のエネルギー (代謝) 状態が変動し ATP 量が低下すると AMPK がリン酸化されると同様に Atrogin-1 発現が誘導される (Baskin and Taegtmeier, 2011)。また、インスリンと IGF-I は Akt/FoxO1 のリン酸化を介して Atrogin-1 発現を負に制御することが明らかにされている (Latres et al., 2005, Tesseraud et al., 2007)。暑熱時の筋タンパク質分解の中核因子である Atrogin-1 発現誘導におよぼす上記因子の変動の影響を作業仮説としてまとめると図 8 のように示される。すなわち、血中における内毒素量の上昇、インスリンおよび IGF1 の濃度低下、ATP 量の低下が生じていれば、Atrogin-1 発現誘導に関与している可能性がある。そこで、本章では暑熱時の筋タンパク質分解の誘導因子をより深く追究することを目的として、Atrogin-1 発現増加が認められた暑熱 0.5 日後におけるエネルギー代謝状態やインスリン、IGF-I、内毒素の変動を調べた。

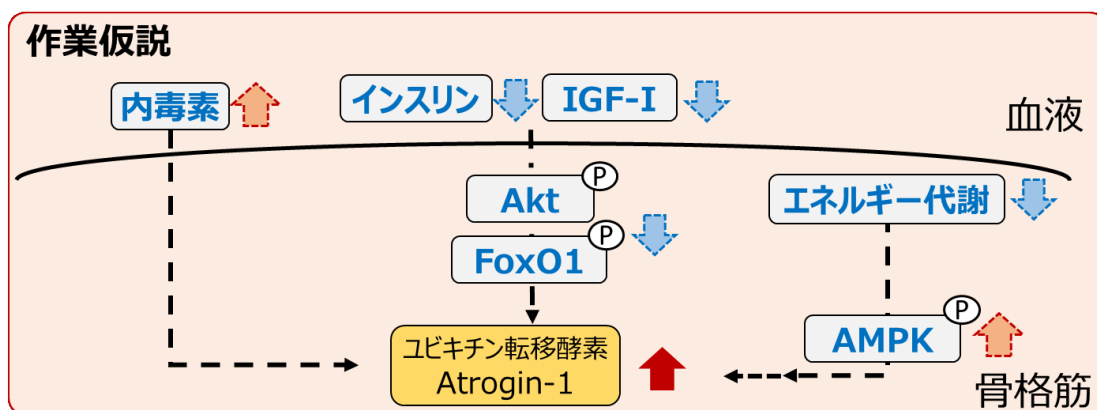


図 8. 暑熱時の筋 Atrogin-1 発現増加メカニズムの作業仮説

【材料と方法】

第二章第一節と同様にニワトリを飼育・暑熱感作し、温度上昇開始 0.5 日間後において、浅胸筋および血漿を採取した。血漿中の内毒素、インスリン、IGF-I 濃度は市販 ELISA キット (LONZA、My BioSource) を用いてそれぞれ測定し、筋 Atrogin-1 発現は前節と同様にリアルタイム RT-PCR 法を用いて調べた。骨格筋内の Atrogin-1 発現に関わると考えられた転写調節因子 Akt、FoxO1 および AMPK の発現量および各リン酸化タンパク質量はウエスタンブロット法を用いて調べた。Student's *t*-test を用いて統計解析を行った。

【結果および考察】

第二章第一節と同様に、筋 Atrogin-1 の遺伝子発現量は暑熱 0.5 日後において、対照区と比較して有意に増加したが (図 9A)、同ニワトリの血中内毒素濃度に変化は認められなかった (図 9B)。これらの結果より、暑熱時の Atrogin-1 発現に血中の内毒素流入は関与しないことがまず示された。

続いて、細胞内エネルギー代謝状態の関与を検証するため、暑熱 0.5 日後の骨格筋の AMPK のリン酸化割合を調べた。その結果、その割合に変化は認められなかったことから (図 9C)、暑熱感作 0.5 日後のニワトリ骨格筋ではエネルギー代謝の変動は Atrogin-1 発現に影響をおよぼさないことが考えられた。

血中 IGF-I 濃度は暑熱 0.5 日で変化は認められなかった一方で (図 10A)、インスリン濃度は有意に低下することが認められた (図 10B)。この結果より、暑熱時の骨格筋における Akt および FoxO1 のリン酸化割合を調べた結果、これらシグナル伝達因子はインスリンの低下と同調して、そのリン酸化割合が共に低下していることが認められた ($P < 0.05$) (図 10C および D)。これらの結果より、暑熱 0.5 日に認められた骨格筋の Atrogin-1 発現誘導には、mitROS 産生以外にも、インスリンの分泌低下による Akt/FoxO1 のリン酸化割合の低下が関与している可能性が示された。

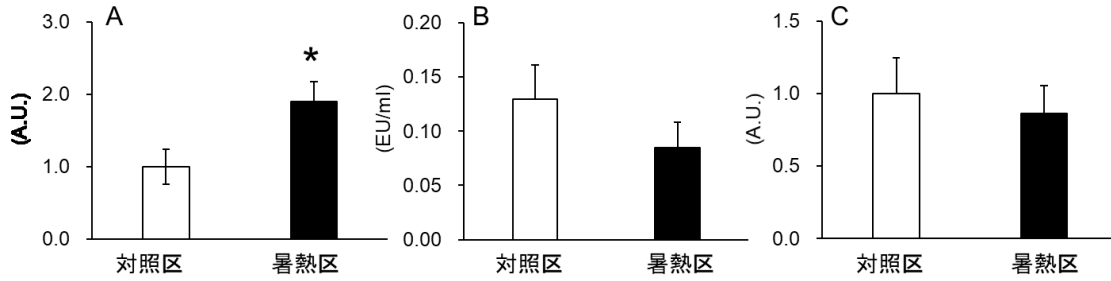


図9. 暑熱0.5日後における筋 Atrogin-1 の発現誘導メカニズムの調査

A) 筋 Atrogin-1 遺伝子発現量、B) 血中内毒素濃度、C) 筋 AMPK のリン酸化割合

Means \pm SE, n = 6, * $P < 0.05$ compared to the control values.

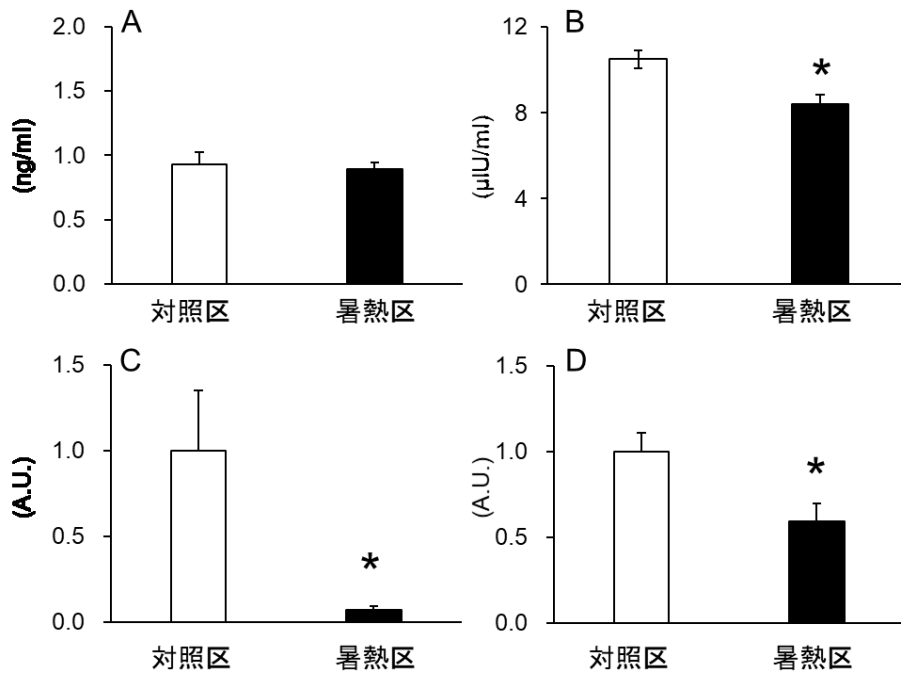


図10. 暑熱0.5日後におけるインスリン・IGF-I シグナリングの変化

A) 血中 IGF-I 濃度、B) 血中インスリン濃度、C) 筋 Akt、D) 筋 FoxO1 のリン酸化割合

Means \pm SE, n = 6, * $P < 0.05$ compared to the control values.

第四章 暑熱時のグルタミン・グルタミン酸給与によるタンパク質分解への抑制効果

【背景および目的】

第二章の結果より、暑熱下のニワトリにおける Atrogin-1 発現およびこれにともなう筋タンパク質分解には、CORT コルチコステロンの分泌増加ではなく、むしろ筋ミトコンドリア活性酸素 mitROS の増加により Atrogin-1 発現およびタンパク質分解が引き起こされる可能性が関与していることが示された。さらに、第三章の結果より、暑熱時の Atrogin-1 発現の誘導には、血中インスリン濃度の低下による Akt/FoxO1 の脱リン酸化も関与する可能性が示された。これらのことを考え合わせると、暑熱時の筋タンパク質分解亢進を制御するためには、インスリンの分泌低下による筋 Akt/FoxO1 の脱リン酸化、および mitROS の過剰産生を同時に抑制することが重要であることが考えられた。

本章では、上記の制御点の双方に作用する可能性のある、グルタミン (Gln) およびその加水分解物であるグルタミン酸 (Glu) に着目した。Gln は Akt シグナルを活性化し (Zhai et al., 2015)、暑熱時のインスリン分泌低下による骨格筋 Akt/FoxO1 脱リン酸化をインスリン非依存的に改善できる可能性がある。また、Glu は細胞内において強力な抗酸化ペプチドであるグルタチオン (GSH) の構成アミノ酸として利用される。骨格筋の GSH 量は同組織内で合成される分のみならず、主に肝臓などで合成され血液を介して骨格筋へ輸送された分にも影響を受ける。鳥類の肝臓には、Gln から Glu を生成するグルタミナーゼがほとんど存在しないため (Wu et al., 1998)、肝臓における GSH 合成を促進するためには Glu の同時給与が必要であり、これにより肝臓 GSH の骨格筋への輸送促進が期待でき、同組織内での抗酸化能が向上する可能性がある。本試験では、Gln および Glu の同時給与が骨格筋の酸化ストレス (mitROS 産生) および Akt/FoxO1 のリン酸化割合におよぼす影響を調べ、暑熱時の筋タンパク質分解亢進メカニズムをより高度に検証した。

【材料と方法】

これまでと同様に、3 週齢肉用鶏を暑熱感作した。基礎飼料 (CP:21%、ME:3100 kcal/kg) に Glu および Gln (AJINOMOTO) を各々1%添加したアミノ酸強化 (Glu/Gln) 飼料を作製し、また、同飼料と等 N 量になるよう 1.825% アラニン (Ala) を添加した対照飼料 (is-nitrogenous control) を作製した。暑熱感作開始と同時に対照飼料あるいは Glu/Gln 飼料をニワトリに給与し、また適温区のニワトリへは対照飼料を給与した。暑熱感作後 0.5 および 3 日後において、浅胸筋および血漿を採取した。その後、筋 Atrogin-1 遺伝子発現量、Akt および FoxO1 のリン酸化割合、マロンジアルデヒド (MDA) 含量、ならびに血中インスリン濃度および 3-メチルヒスチジン濃度を調べた。筋 GSH 含量は ELISA キット (Cayman) を用いて測定した。統計解析は Tukey-Kramer multi-comparison's test を用いて行った。

【結果および考察】

対照飼料を給与したニワトリにおいて、暑熱 0.5 日後における筋 Atrogin-1 遺伝子発現量および暑熱 3 日後における血中 3-メチルヒスチジン濃度はいずれも、第二章第一節と同様に適温区のそれと比べて有意に増加した (図 11A および B)。一方、Glu/Gln 添加区では、これらの増加は認められなかったことから、Gln/Glu 給与によって暑熱時のタンパク質分解亢進が抑制されることが示された。

また、Gln/Glu の作用点を調べるため、Atrogin-1 発現増加抑制が確認された暑熱 0.5 日後における、酸化ストレスおよびインスリンシグナルに関連する因子を調べた。まず、酸化ストレスマーカーとして脂質過酸化の指標である MDA 含量を調べた結果、暑熱感作により浅胸筋の MDA 含量が有意に増加した一方で、この増加は Glu/Gln 添加区で認められなかった (図 12A)。還元型 GSH、酸化型 GSH (GSSG)、およびこれらの総量 (総 GSH 含量) を調べた結果、総 GSH 含量および酸化型 GSH 含量に対して暑熱感作および Glu/Gln 給与による影響は認められなかった。一方、GSSG 含量は暑熱感作により有意に増加したが、この増加が Glu/Gln 添加区では認められなかった。これらの結果より、Glu/Gln 添加は当初見込んでいた GSH の生合成には影響を与えないが、GSH の酸化還元状態の改善効果がある可能性が考えられた。

つづいて、インスリンおよびそのシグナル伝達因子である Akt および FoxO1 のリン酸化割合を調べた。まず、暑熱感作により有意に低下した血中インスリン濃度は、Glu/Gln 添加による影響は認められなかった (図 13A)。一方、暑熱感作による Akt のリン酸化割合の低下 ($P < 0.05$) は Glu/Gln 添加により一部回復することが認められた (図 12B)。また、FoxO1 のリン酸化割合は暑熱感作でわずかに低下し、Glu/Gln 添加により回復することが認められた (図 12C)。

以上の結果より、Gln/Glu の添加により、暑熱時の筋タンパク質分解亢進が抑制されることが実証された。さらに、骨格筋内の酸化ストレス状態の改善やインスリンシグナルの維持も同アミノ酸給与によって認められたことから、暑熱時の筋タンパク質分解亢進にはこれらが重要な役割を担っていることが示された。

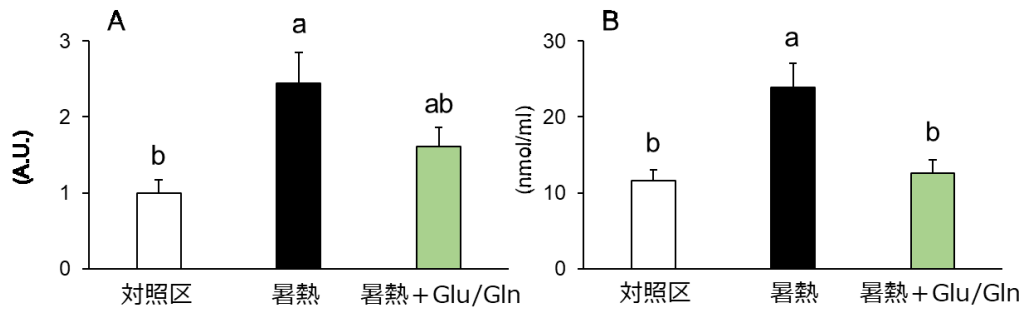


図 11. グルタミンおよびグルタミン酸同時給与による暑熱時の筋タンパク質分解抑制効果

A) 筋 Atrogin-1 遺伝子発現量、B) 血中 3-メチルヒスチジン濃度

Means \pm SE, n = 7-9. $^{ab}P < 0.05$; different letters are statically different.

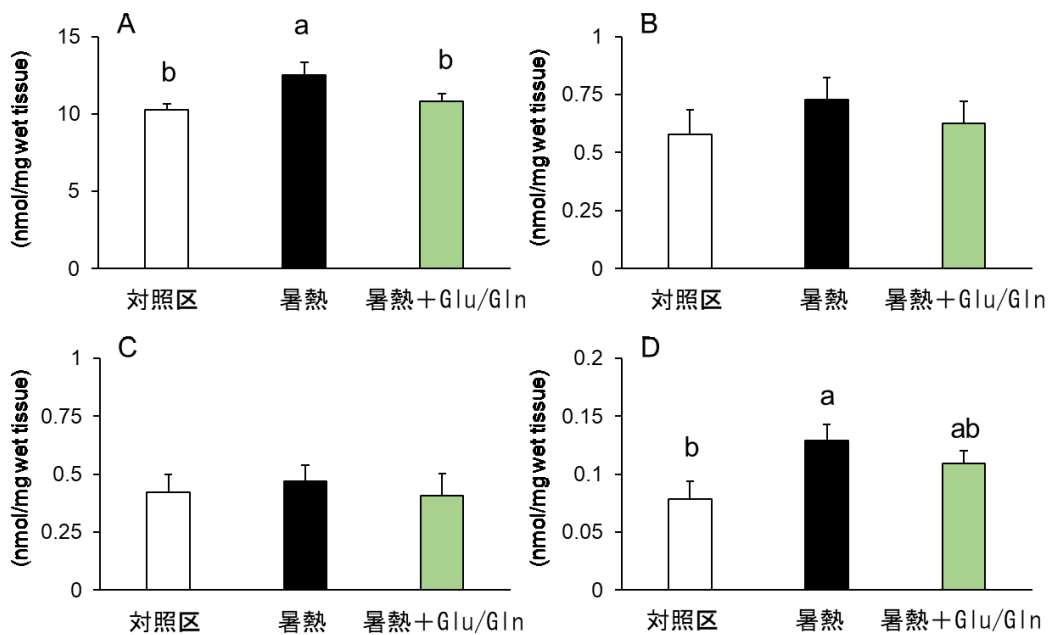


図 12. 暑熱時のグルタミン・グルタミン酸給与による酸化ストレス抑制作用

A) 筋 MDA 含量、B) 筋総 GSH 含量、C) 筋 GSH 含量、D) 筋 GSSG 含量

Means \pm SE, n = 7-9. $^{ab}P < 0.05$; different letters are statistically different.

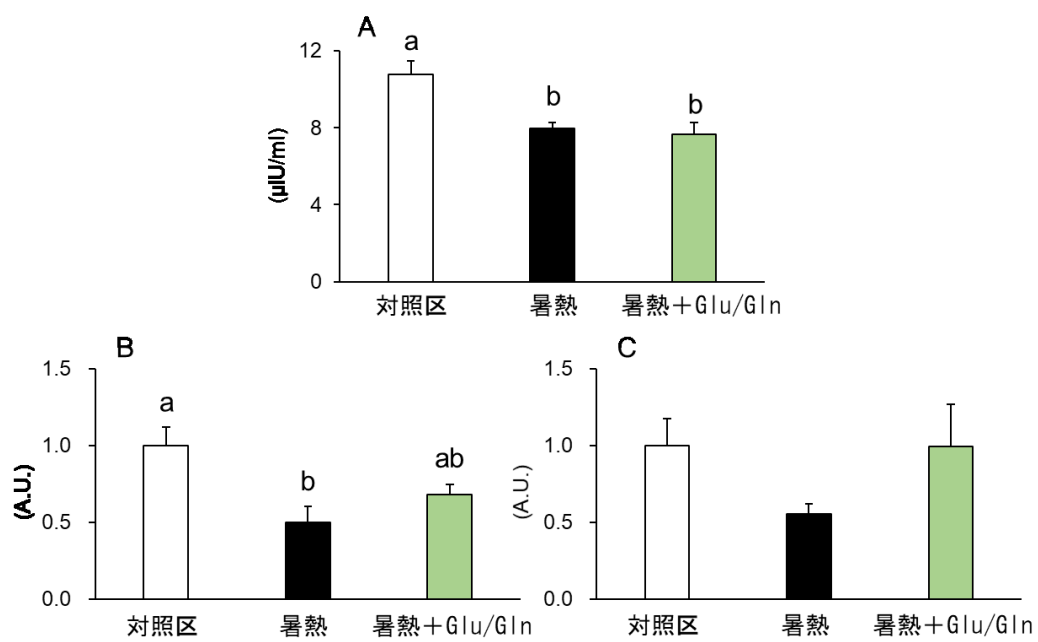


図 13. 暑熱時のグルタミン・グルタミン酸給与によるインスリンシグナル伝達への影響

A) 血中インスリン濃度、B) 筋 Akt リン酸化割合、C) 筋 FoxO1 リン酸化割合

Means \pm SE, n = 7-9. ^{ab}P < 0.05; different letters are statistically different.

第五章 総合考察

本研究は、暑熱時の産肉量低下をもたらす一因と考えられた筋タンパク質分解亢進の誘導因子を探索し、さらにアミノ酸による同因子の制御を検証した。前者に関して、本研究で明らかになったことは、暑熱時の肉用鶏では、骨格筋において血中インスリン濃度の低下にともなう Akt/FoxO1 脱リン酸化ならびに mitROS 過剰産生が Atrogin-1 の発現を増加することでユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムを活性化することによりタンパク質分解亢進が引き起こされることである（第二章および第三章）。続いて後者に関して、暑熱時の Atrogin-1 発現誘導にともなう筋タンパク質分解は、Gln および Glu の給与による GSH 酸化還元状態改善による抗酸化能の向上ならびに Akt シグナルの脱リン酸化の抑制が有効であることが実証された（第四章）。

これまで暑熱時の筋タンパク質分解は CORT の分泌増加によって引き起こされると広く認識されていた。本研究では CORT の関与を再精査した結果、暑熱時の筋タンパク質分解は CORT ではなく、むしろ mitROS 産生量増大およびインスリン分泌低下にともなう Akt/FoxO1 の脱リン酸化によって引き起こされることが明らかになった。近年、ROS は細胞内でシグナル伝達物質として働く物質であることが示されている（Finkel, 2012）。多くの研究は外来性の ROS (H_2O_2) 添加により、そのシグナル伝達能を検証しているが、これに対し、本研究は温熱刺激にともなう内在性の ROS 発生、特にミトコンドリアの $\text{O}_2^{\cdot-}$ が暑熱時の Atrogin-1 発現ならびに筋タンパク質分解を引き起こすシグナル伝達因子として働く可能性を示した。さらに、本研究では、ミトコンドリア $\text{O}_2^{\cdot-}$ 産生量増加による Atrogin-1 発現誘導において、転写因子 FoxO3 が関与するかを検討した。その結果、暑熱時のニワトリ生体では、Atrogin-1 発現と同時に FoxO3 の遺伝子発現量は増加傾向を示したが、高温時のニワトリ培養筋細胞ではその増加は認められず、その細胞への CORT 添加により FoxO3 の遺伝子発現量が増加した。これらのことから、ミトコンドリア $\text{O}_2^{\cdot-}$ による Atrogin-1 発現誘導は、FoxO3 の遺伝子発現量の変化とは関連性がないことは示されたが、Atrogin-1 発現の詳細な誘導メカニズム解明にまで至っていない。近年の研究では、Atrogin-1 に関与する転写関連因子として、c-Jun-N-terminal kinase (JNK) や Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 等が報告されているため（Storz, 2011, Bonetto et al., 2009）、これら因子が $\text{O}_2^{\cdot-}$ と Atrogin-1 発現の間に介在する可能性が示唆される。

また、筋タンパク質分解の誘導に Akt/FoxO1 の脱リン酸化も関与することが示されたことより、暑熱対策には抗酸化物質の給与だけでなく、インスリンシグナルもターゲットにした栄養制御戦略が必要であることが示唆された。本研究では、同シグナルに加え酸化ストレスの双方に効果を持つと考えられた Gln および Glu を暑熱ニワトリへ給与し、筋タンパク質分解の抑制効果を実証した。同試験における飼養成績において、Gln および Glu 添加区の骨格筋量の低下は対照飼料給与区のそれに比べ一部抑制されたものの、体重や増体量の改善には至らなかった（図表なし）。この改善策として、Gln および Glu の添加期間の延長や

添加濃度の工夫や他アミノ酸を含めたアミノ酸バランスの改善といった検討が今後の実用研究として必要であると考えられる。また、本研究ではニワトリの骨格筋の中で最も重量比が高い浅胸筋に焦点を絞ったが、浅胸筋とは筋線維型存在比が異なる脚部の筋肉への Gln および Glu の影響の解明も意義のあるものと考えられる。

本研究が明らかにした、暑熱時の肉用鶏骨格筋のタンパク質分解亢進メカニズムに関する知見は、家禽のタンパク質代謝に対する理解を深めるだけでなく、今後の地球温暖化にともなう家禽産肉量低下を極小化する畜産物生産システムを構築する上での基盤となることも期待される。