

培養骨格筋細胞を用いた家禽の暑熱ストレス発生機序の解明

活性酸素の過剰産生が体タンパク質分解亢進に及ぼす影響

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者名	喜久里,基 吉田,隼巳 古川,恭平 神園,巴美 豊水,正昭
発行元	家畜栄養生理研究会
巻/号	58巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 53-63
発行年月	2014年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



培養骨格筋細胞を用いた家禽の暑熱ストレス発生機序の解明 — 活性酸素の過剰産生が体タンパク質分解亢進に及ぼす影響 —

喜久里基・吉田隼巳・古川恭平・神園巴美・豊水正昭

(東北大学大学院 農学研究科 動物栄養生化学分野)

1. 結 論

暑熱環境下における肉用鶏の生産性低下は古くからの問題であり、近年激化の様相を示す夏季の暑熱によって肉用鶏産業が大きな損失を被ることは想像に難くない。それゆえに、暑熱時に発生する肉用鶏生産の量的・質的な低下を改善する生産技術体系の確立は重要な課題である。

暑熱ストレスによる生産性の低下を真に改善するためには、肉用鶏が暑熱下でどのような生理反応・生体応答を示しているのか、その全貌を明らかにすることが肝要である。これまでの研究において、暑熱環境下では熱放散促進のための浅速呼吸にともなう呼吸性アルカローシスの発症¹⁾、甲状腺ホルモンの低下・コルチコステロンの増加にともなう体タンパク質分解亢進^{2,3)}、腸管微絨毛の損傷・免疫応答の変化^{4,5)}ならびにミトコンドリア活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) の過剰産生による酸化ストレス^{6,7)}が生じることが明らかにされている。このため、呼吸性アルカローシス発症を抑制するための重曹 (重炭酸ナトリウム) の給与¹⁾や、酸化ストレス発生抑制のためのビタミンCやビタミンE、ポリフェノール類、電解還元水といった抗酸化物質の給与⁸⁻¹⁰⁾による暑熱ストレス緩和の有効性が調べられてきている。しかしながら、これらはいずれも暑熱時の生産性を真に改善するまでには至っておらず、暑熱時の生体応答の一部改善を目的とした対策としては十分ではない。

上述したとおり暑熱ストレスによって誘導

される生体反応は様々であるが、これら反応の相互関連や機序に着目した研究は少ない。単独の反応と捉えていた暑熱ストレス時の各応答にも関連性があるとするならば、その中枢因子を見極め、これを制御することで暑熱ストレスのより完全な低減が実現できると考えられる。最近のライフサイエンス研究の進展より、ROSは細胞内シグナル伝達におけるセカンドメッセンジャーとして機能し、細胞内レドックス応答などの様々な細胞応答を惹起することが明らかにされている¹¹⁾。ROSは過剰に発生するとその高い反応性ゆえに脂質、タンパク質、核酸といった生体分子を無差別に傷害するが、その一方でシグナル分子中のCysなどの特定のアミノ酸を修飾しその後の細胞内シグナル伝達を活性化することで、酸化ストレスのフィードバック制御や酸化損傷分子の除去などの細胞内自浄作用を誘導する働きもあると考えられている。

本研究では、暑熱感作にともなう「ROSの過剰産生」と「体タンパク質分解」の関連性に着目した (図1)。暑熱下において過剰産生されるROSがタンパク質分解システムの亢進に関与することを実証できれば、抗酸化物質などの投与による酸化ストレス抑制が暑熱ストレスの低減に有効であることを科学的に再確認でき、タンパク質分解抑制作用がある機能性資材の投与が不必要であるとの提言ができる。こうした相互に関連する生体応答を鶏まるごとの個体を用いた *in vivo* 実験で検証していくことは極めて難しいが、培養細胞を用いて生体条件を

模した *in vitro* 実験モデルを構築できれば、組織・細胞レベルでの暑熱時の生体応答の相互関連性を追究することが可能となる。すでに、ガンや腫瘍細胞における研究では培養細胞を用いた実験が盛んに行われており、その知見とモデル動物のそれをクロストークさせることでその代謝メカニズムの全貌を解き明かしている。すでに、暑熱ストレス研究においても、鶏初代培養骨格筋細胞を高温培養した Nakashima ら (2004) の報告をはじめ、鶏以外にも敗血症や過剰炎症応答時の体温上昇を模した高温培養などの研究例が多数報告されている^{3, 12, 13)}。

本研究では暑熱ストレス時に生じる ROS の過剰産生ならびに体タンパク質分解の亢進の関連性について鶏初代骨格筋培養細胞を用いて検証した。すなわち、まず高温培養時の骨格筋細胞における ROS 産生応答ならびにタンパク質量の変化を調べた後、続いて抗酸化剤添加時におけるタンパク質量の回復効果ならびにタンパク質分解システムの一つであるユビキチンプロテアソーム系システム関連遺伝子発現応答を詳細に調べた。本稿では、高温培養した鶏骨格筋培養細胞では、ミトコンドリア ROS (スーパーオキシド産生) が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亢進し、細胞タンパク質量の低下をもたらすことを報告する。

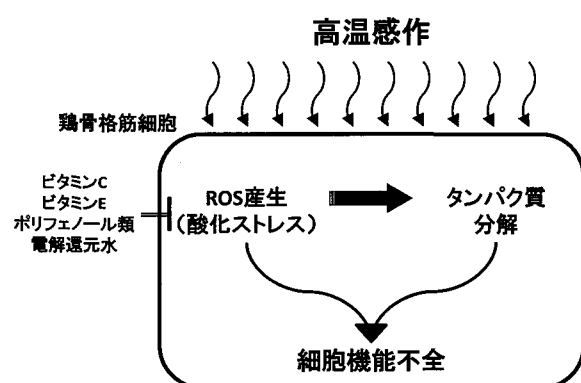


図 1. 酸化ストレスと細胞タンパク質量の低下

2. 材料と方法

2-1) ニワトリ初代骨格筋培養細胞の調製および高温培養手順

0 日齢肉用鶏 (♂、Ross) の浅胸筋より抽出した筋芽細胞を培養し、各試験に供試した。まず、断頭屠殺した鶏より採取した浅胸筋を 10% ペニシリン+ストレプトマイシン (PS) 溶液に浸した後、眼科用ハサミを用いてペースト状になるまでミンシングした。これをコラゲナーゼ・ディスパーゼからなる酵素溶液内で 15-20 分間攪拌・消化し細胞浮遊液を得た。浮遊液を遠心分離 (1,300 rpm、5 min) し、得られた細胞ペレットに 1.5%PS、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM+M199 (4:1、v/v) 培養培地を適量添加した後、Differential adhesion 法を用いて筋芽細胞を濃縮した。トリパンプルーによる細胞数の計測後、Type-1 コラーゲンでコーティングされた 90 φディッシュに播種し、上記培地を用いて筋細胞を 37°C・5%CO₂ 条件下で約 48 h 培養した (前培養)。増殖した筋芽細胞に 2.5%トリプシン溶液を添加して細胞を剥離した後、遠心分離 (1,300 rpm、5 min) を行い、再度細胞ペレットを得た。この細胞を試験に応じて 35 φ・60 φディッシュ、あるいは 24 ウェル・6 ウェルプレートに 45,000 cells/cm² となるよう播種し、前培養と同様の環境下で 80-90% サブコンフルエントに達するまで培養した。初生鶏は松本鶏園 (蔵王、宮城) より入手し、全ての実験動物取扱いには東北大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

上記操作により得られた骨格筋培養細胞は無血清培地に置換した後、41°C・5%CO₂ となるよう設定したインキュベーターで 1-6 h 培養し、細胞内 ROS 産生量、カルボニル化タンパク質量、遺伝子発現量の測定に供試した (詳細は後述)。また、各試験において脱共役剤 2,4-dinitrophenol (DNP、50 μM) および NADPH オキシダーゼ (NOX4) 阻害剤 diphenyleneiodonium (DPI、1 μM) を細胞内 ROS 産生量測定の際のハンス平衡塩溶液 (HBSS) に添加し、スーパーオキシド特異的捕

拮抗剤 4-hydroxy-TEMPO (Tnp, 5 mM) は高温培養 1 h 前に添加した。また、プロテアソーム特異的阻害剤 Proteasome Inhibitor I (20 μ M, Merck, #539160) は無血清培地に添加し 6 h 高温培養した。

2-2) 細胞内 ROS 産生量およびミトコンドリアスーパーオキシド産生量の測定

細胞内 ROS 産生量は 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Life Technologies, C6827)、ミトコンドリアスーパーオキシド ($O_2^{\cdot -}$) 産生量は MitoSOXTM Red reagent (Life Technologies, M36008) を用いた蛍光強度測定により、それぞれ定量した。CM-H₂DCFDA はスーパーオキシドを除いた、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、ヒドロペルオキシラジカル ($HO_2\cdot$)、ペルオキシナイトライト ($ONOO\cdot$) といった細胞内で発生する主要な ROS と反応し、細胞内エステラーゼによりアセチル基が切断され蛍光を発する。本試験においては、培養培地を 5 μ M CM-H₂DCFDA を含むハンクス平衡塩溶液 (HBSS) に置換した後、対照区は 37°C、高温培養区は 41°C に設定した蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、30 min のインキュベーションの間における $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 485 nm/535 nm の蛍光強度を測定した。また、細胞内ミトコンドリアスーパーオキシド産生量を測定するため、MitoSOXTM Red reagent を HBSS に 5 μ M となるよう添加し、 $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 510 nm/580 nm の蛍光強度を同様に測定した。いずれの測定においても、測定後の各ウェルのタンパク質量を bicinchoninic acid (micro BCA) 法で測定し、細胞タンパク質 μ g 当たりの値に補正した。

2-3) カルボニル化タンパク質量の測定

細胞カルボニル化タンパク質含量は Dalle-Donne ら (2003) の方法に基づき、dinitrophenylhydrazine (DNPH) を用いたウェスタンブロット法により定量した¹⁴⁾。DNPH がカルボニル基に特異的に結合する性質を利用し、本試験では抗 DNPH 抗体を用いて DNPH 結合

タンパク質を特異的に検出した。高温感作後の培養細胞を 50 mM ジチオスレイトールを含む SDS サンプルバッファーで回収した後、超音波破碎・沸騰湯浴内における SDS 化を行い SDS-PAGE を行った。Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写後、抗 DNPH 抗体 (Sigma-Aldrich, D9656) を添加し検出した。検出後、PVDF 膜は Coomassie G-250 染色液 (GelCode Blue Stain Reagent, Thermo Fisher Scientific #24590) で染色した後、可視画像を撮影し、各レーンの総バンド強度の値からバックグラウンドの値を差し引き、アプライしたサンプルの正味総タンパク質量 (相対値) を求めた。この値を用いて、抗 DNPH 抗体で検出された各レーンの総バンド強度を補正した。

2-4) リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析

高温培養時の骨格筋培養細胞の遺伝子発現応答を解析するため、培養細胞の RNA を抽出した後 cDNA を合成し、リアルタイム RT-PCR を行った。細胞中の RNA は TRIzol/クロロホルムを用いて抽出した後、逆転写酵素 (M-MLV) および Oligo (dT) プライマー+ランダムプライマー (99:1) を用いて cDNA を合成した。リアルタイム RT-PCR 法では、目的遺伝子として avian uncoupling protein (avUCP: センス 5'-ACT CTG TGA AGC AGC TCT ACA CC-3'、アンチセンス 5'-ATG TAC CGC GTC TTC ACC ACA TC-3'、GenBank accession No. NM_204107.1)、heme oxygenase-1 (HO1: センス 5'-GGT CCC GAA TGA ATG CCC TTG-3'、アンチセンス 5'-ACC GTT CTC CTG GCT CTT GG-3'、NM_205344.1)、NADPH oxidase (NOX4: センス 5'-GCT CTG GCA AGA GAA TCG AC-3'、アンチセンス 5'-TGC TTG GTC CAC AAC AGA AA-3'、NM_001101829.1)、Atrogin-1 (センス 5'-CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT-3'、アンチセンス 5'-GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA-3'、NM_001030956.1)、MuRF1 (センス 5'-TGT CTA CGG GCT GCA GAG GAA-3'、アンチセンス 5'-ATG TAC CGC GTC TTC ACC ACA TC-3'、NM_204107.1) ならびに内部標準遺伝子として 18s ribosomal

RNA (18s rRNA : センス 5' -TAG ATA ACC TCG AGC CGA TCG-3'、アンチセンス 5' -GGT GCT CCC CCT TCT TGA GT-3'、XM_424369.2) の発現量を測定した。

2-5) 統計解析

いずれの試験においても測定結果は means ± SE (平均値 ± 標準誤差) で表し、対照区ならびに高温培養区の 2 区間の比較では Student' s t-test を、DNP などの添加試験では Tukey-Kramer test を用いて統計解析を行った。また、いずれの統計解析においても有意差の閾値は 0.05 以下とした。

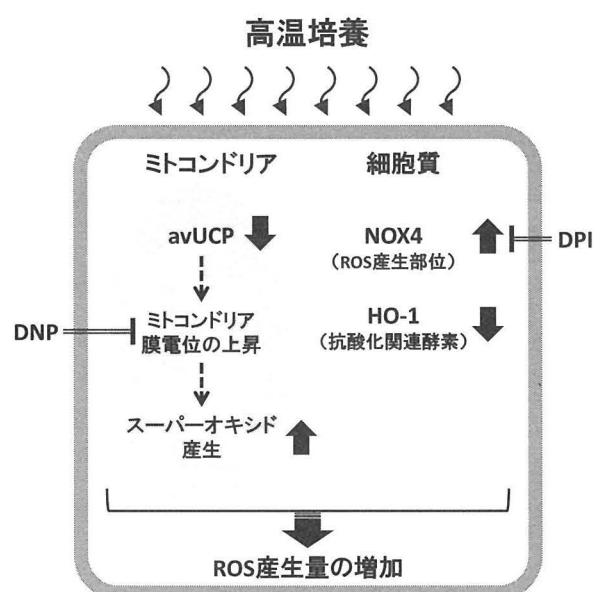


図2. 高温培養時におけるROS産生とこれに対する各阻害剤効果

3. 結果

3-1) 高温感作時における鶏骨格筋培養細胞のROS産生量とタンパク質量の変化

本試験では、まず高温感作が鶏骨格筋培養細胞のROS産生量、タンパク質量、カルボニル化タンパク質量に及ぼす影響を調べた。細胞内で発生する主要なROS (H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 $HOO\cdot$ 、 $ONOO\cdot$) を検出する蛍光プローブ CM- H_2DCADA を用いて細胞内ROS産生量を調べた結果、41℃で6h高温培養した細胞内のROS産生量は37℃培養区の

それに比べ有意に増加した一方で、タンパク質量は有意に低下することが示された。また、高温培養にともないカルボニル化タンパク質量も有意に増加したことから、培養細胞においても高温環境はROS産生量を増加させ酸化ストレスを誘導することが示された。

次に、高温感作時における細胞内ROS産生増加メカニズムを明らかにするため、ROS産生に関与する遺伝子発現応答を解析した。これまでの *in vivo* 試験で報告されている avUCP mRNA 発現の低下¹⁵⁾ が本試験の高温培養細胞においても認められた ($P < 0.05$)。この結果より、暑熱感作鶏と同様に培養細胞においても、avUCP発現量の低下がミトコンドリア膜電位上昇をもたらした結果ROS産生量を誘導した可能性が考えられた (図2)。さらに、細胞質におけるROS発生源であるNOX4の発現応答の解析結果から、そのmRNA発現も有意に増加しており、ミトコンドリアのみならず細胞質におけるROS産生量も増加している可能性が示唆された。また、抗酸化活性を有するビリベルジン（ヘム分解産物）生成に関与する酵素HO-1のmRNA発現が有意に低下していたことから、高温培養細胞では抗酸化防御機構が低下し、これもROS産生量の上昇に関係している可能性が示された (図2)。

ここで想定されたメカニズムを検証するため、ミトコンドリア膜電位を低下させROS産生を低下させる脱共役剤DNPならびにNOX4の阻害剤DPIをそれぞれ培養細胞に添加した結果、高温培養にともなうROS産生量の増加はDPI添加によりわずかに抑制され、DNP添加により有意に抑制された (図2)。このように高温培養時の細胞内ROS産生量はミトコンドリア由来である可能性が推察されたことから、MitoSOX™を用いてミトコンドリアで主に産生されるスーパーオキシドの検出 (2-2 を参照) を試みた結果、ミトコンドリアスーパーオキシド産生量は高温培養にともない有意に増加していることが示された。以上の結果より、高温感作にともなう細胞内ROS産生量の増加にはミトコンドリア

ROS 産生量の増加が大きく関与していることが示された (図 2)。

3-2) スーパーオキシド捕捉剤は高温培養にともなう ROS 産生量増加のみならずタンパク質量低下も抑制する

3-1) より高温培養時では ROS 産生量が増加すると同時にタンパク質量も低下していたことから、本試験ではタンパク質量の低下が ROS 産生抑制によって緩和できるか否かを検討した。ミトコンドリアにおける ROS 産生は主に電子伝達鎖複合体 I (NADH: ユビキノンレダクターゼ) および複合体 III (ユビキノール: シトクロム *c* レダクターゼ) で発生するスーパーオキシドに端を発している。それゆえに、ミトコンドリア ROS 産生を効率的に抑制するためにはスーパーオキシドを特異的に捕捉する抗酸化剤の添加が有効である。そこで、同作用を有する Tmp を添加した結果、6 h の 41°C 高温培養にともなう ROS 産生量の増加が有意に抑制されると同時に、タンパク質量の低下も有意に抑制された。したがって、高温培養にともなう骨格筋培養細胞の ROS 産生増加はタンパク質量低下において重要な役割を担っている可能性が示された。

また、高温培養時に mRNA 発現量が変化した avUCP、HO-1 および NOX4 に対する Tmp の影響も調べた結果、高温培養時にともなう avUCP の低下は抑制されなかったが、HO-1 の低下ならびに NOX4 の上昇は Tmp によって有意に抑制された。これらの結果は、高温培養時において増加したスーパーオキシドが HO-1 と NOX4 の両遺伝子の負の変化を誘導していることを示唆する。

3-3) 高温培養時の細胞タンパク質量低下におけるユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムの関与

細胞内にはいくつかのタンパク質分解システムがあり、オートファゴソームなどを形成した後に標的タンパク質をカテプシンなどによって分解するリソソーム系、また標的タンパク質をユビキチン化して酵素複合体であるプロテアソームで ATP 依存的に分解するユビキチンプロテアソーム系が挙げられる。これまでの *in*

vitro 研究において、高温培養した鶏骨格筋細胞ではプロテアソーム活性が増加することが報告されている¹⁶⁾。このため、まず本試験では高温培養時の細胞タンパク質量低下におけるユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムの関与を検証した。41°C 高温培養開始と同時にプロテアソーム特異的阻害剤 Proteasome Inhibitor I を添加した結果、培養 6 h 後の細胞タンパク質量の低下が有意に抑制され、その量は 37°C 培養区と同じレベルにまで回復した。これらの結果より、本試験における高温培養でもユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムの亢進がタンパク質量の低下に深く関わっていることが示された。

Nakashima ら (2004) は、高温培養 6 h 後に比べ 24 h 後における細胞タンパク質量はさらに低下し、タンパク質量が高温培養時間依存的に低下していることを報告している¹⁶⁾。そこで本試験では、タンパク質量ならびにユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子の経時的変化を調べた。41°C の高温培養 1 h 後において、細胞タンパク質量は低下しなかったが、培養 3 h 後では有意に低下し、この低下は高温培養 6 h 時の低下と同程度であった。さらに、ユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子のうち、標的タンパク質のユビキチン化を担うユビキチン転移酵素 (E3) である Atrogin-1 および MuRF-1 の mRNA 発現変化を調べた結果、Atrogin-1 はすでに高温培養 1 h 後において著しい発現上昇が認められた一方で、その発現量は培養時間経過とともに徐々に低下し、培養 3 h 後では 37°C 培養区と同様のレベル、さらに培養 6 h 後では 37°C 培養区より有意に低い値を示した (図 3A)。また、MuRF-1 の mRNA 発現量も Atrogin-1 と同様に 37°C 培養区と比較して、高温培養 1 h 後では有意に上昇していた一方で、培養 3 h 後ではやや高いレベル、さらに培養 6 h 後では同じ発現レベルまで戻ることが示された。これに対して、細胞内タンパク質分解系の一つであるカルパイン系の遺伝子 (μ -カルパイン) の経時的発現を調べた結果、培養 1, 3, 6 h いずれの時間

においても高温培養にともなう変化は認められなかった (図 3A)。これらの結果より、ユビキチンプロテアソーム系の亢進は高温培養の早期段階に生じている可能性が示された。

3-4) ミトコンドリアスーパーオキシド産生は高温培養時のユビキチンプロテアソーム系システムを亢進させる

高温培養にともなうタンパク質分解に ROS 特にスーパーオキシドの産生が関与しているならば、高温培養時におけるユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子とスーパーオキシド産生量にもパラレルな時系列変化があると推測される。まず、本試験では CM-H₂DCADA を用いて細胞内 ROS 産生量の経時的変化をまず調べた結果、Atrogin-1 および MuRF-1 遺伝子発現の上昇が認められた高温培養 1 h 後では細胞内 ROS 産生量は増加しておらず、培養 3 h 後以降に有意な上昇が認められた (図 3B)。そこで、ミトコンドリアスーパーオキシド特異的プローブ MitoSOX™ を用いて高温培養 1 h のスーパーオキシド産生量を調べた結果、37°C 培養区と比較してミトコンドリアスーパーオキシド産生量が有意に上昇していることが示された (図 3B)。したがって、ユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子の上昇には過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ヒドロペルオキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどではなく、ミトコンドリアスーパーオキシドが重要な役割を担っていることが示唆された。

3-5) スーパーオキシド捕捉により高温培養時のユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子の発現は抑えられる

ミトコンドリアスーパーオキシドがユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子の発現亢進に影響を及ぼしているとするれば、Tmp によるスーパーオキシド捕捉によりこれら遺伝子発現は低下すると考えられる。Tmp を骨格筋細胞に添加した結果、1 h の 41°C 高温培養にともなうミトコンドリアスーパーオキシド産生量の増加は有意に抑制され、さらに同高温培養時で認められていた Atrogin-1 および MuRF1 の mRNA

発現量の上昇も有意に抑制された。また、Tmp を添加した細胞を引き続き 6 h 高温培養した結果、高温培養により低下傾向が認められたタンパク質量は Tmp 添加により有意に抑制されることが確認された。以上の結果より、高温培養時において発生したスーパーオキシドを捕捉することでユビキチンプロテアソーム系関連遺伝子の発現が抑制され、タンパク質量の低下も抑制されることが明確に示された。

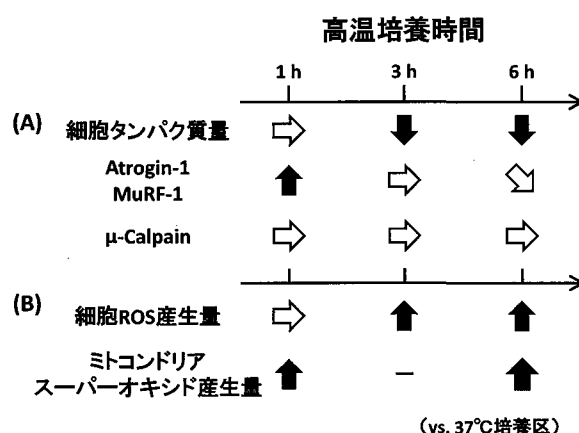


図 3. 高温培養にともなうタンパク質分解系関連遺伝子発現と ROS 産生応答

4. 考 察

本研究より、高温培養した骨格筋細胞では標的タンパク質をユビキチン化する筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 や MuRF-1 の mRNA 発現量が上昇することが示された。本研究ではプロテアソームの遺伝子発現あるいは活性の変化について直接的には検討していないが、高温培養時のタンパク質量低下はプロテアソーム特異的阻害剤によって完全に抑制されたことから、この低下にユビキチンプロテアソーム系分解システムが関与していると考えられる。本研究と同様の報告が哺乳動物細胞を用いた Luo ら (2000) の研究でも示されており、高温時におけるユビキチンプロテアソーム系分解システムの亢進は鳥類に特異的なものではないと考えられる³⁾。近年、ROS がタンパ

ク質代謝に及ぼす影響については広く研究されており、その多くは ROS の一種である過酸化水素を培養細胞に添加しているが¹⁷⁻¹⁹⁾、本研究では細胞内で産生した内在性の ROS (特にスーパーオキシドアニオン) 過剰産生がタンパク質分解システムに影響を与えていることを明確に示した。さらに Medicherla and Goldberg (2008) の報告では、*Saccharomyces cerevisiae* を高温培養、パラコート処理ならびにスーパーオキシドジスムターゼ 1 ノックダウン (後二者ではスーパーオキシドが外因的および内在的に発生) により、新規合成タンパク質が選択的にユビキチン依存的分解を受けることが示されている²⁰⁾。したがって、高温培養時におけるユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムの亢進には ROS (スーパーオキシドアニオン) が重要な役割を担っていることは間違いないであろう。

ユビキチンプロテアソーム系において酵素分解を実質的に担う 26S プロテアソームは、プロテアソーム活性を持つ 20S プロテアソームとその両端に 2 つの 19S 複合体が結合した構造を持ち、ATP・ユビキチン依存的に標的タンパク質を分解する。最近の研究によると、これとは別に、立体構造を保っていない酸化タンパク質を ATP・ユビキチン非依存的に分解する 20S プロテアソームの存在が明らかになっている^{21, 22)}。これは機能不全に陥った酸化タンパク質を分解することで機能性タンパク質の品質管理を行い、細胞内ホメオスタシスを正常に保つ機能があると考えられている²³⁾。Nakashima ら (2004) も高温培養時における鶏骨格筋培養細胞のプロテアソーム活性の上昇は酸化タンパク質の分解に関係している可能性を示唆している¹⁶⁾。本研究では、20S プロテアソーム内のキモトリプシン活性阻害剤を使用したので、高温培養にともなうタンパク質分解の亢進に、26S プロテアソームによるユビキチン依存的分解、あるいは 20S プロテアソームによる酸化タンパク質の分解のどちらが主要な役割を果たしたのかは判別できない。20S プロテアソーム

による酸化タンパク質の分解が主体的に行われているのであれば、Tmp 添加によるタンパク質量の回復は酸化タンパク質の低減によるものであると考えられる。しかし、Tmp 添加時においてはユビキチンプロテアソーム系分解システム関連遺伝子の発現抑制も認められていることから、スーパーオキシドがその転写制御シグナルとして働いていることは間違いないであろう。

近年の研究より、細胞代謝において ROS はシグナル伝達物質すなわちセカンドメッセンジャーの役割を担っていることは多方面で明らかにされており、タンパク質分解システムにおける ROS の関与についても多くの知見が得らつつある。例えば、プロテアソームの転写は、哺乳類では Nrf (nuclear factor erythroid 2-related factor) 1 あるいは Nrf2 によって制御されており、ストレス条件下において Nrf2 は ROS などの刺激による Keap1 の脱抑制を介してプロテアソームサブユニットの転写を促進することが明らかにされている²⁴⁾。一方、Atrogin-1 および MuRF-1 などのユビキチン転移酵素 (E3) の転写制御に関しては、高温培養時のみならず絶食によりタンパク質分解が誘導されるストレス刺激時においてその発現量が上昇することが報告されているが^{25, 26)}、これら E3 に対する ROS の関与に関しては、抗ガン剤ドキシソルビシン添加時のミトコンドリア ROS 産生にともなう Atrogin-1 および MuRF-1 の遺伝子発現上昇についての報告²⁷⁾ がある。Atrogin-1 の転写は FoxO (forkhead transcriptional factor) によって制御され、さらに FoxO の活性は Akt によって阻害されることを考え合わせると、本研究においては、これらの転写活性因子やシグナル伝達分子がスーパーオキシド産生による影響を受けていると推察できる。

本研究では、Atrogin-1・MuRF1 の発現制御にミトコンドリアスーパーオキシドの関与が示唆されたが、その作用点についてはさらなる検討が必要である。暑熱感作鶏の骨格筋ミトコン

分解システムに及ぼす影響について追究した結果、図4に示す仮説“ミトコンドリアスーパーオキシド産生を誘導因子とする細胞内タンパク質分解亢進メカニズム”を提唱できよう。しかし、実際の暑熱負荷鶏の体内ではコルチコステロンなどに代表される内分泌変化²⁾に加え、炎症応答時に放出されるTNF α (tumor necrosis factor α)などのサイトカイン分泌増加などの変化も誘導されていることは明らかである。したがって、鶏の暑熱ストレスの全貌を解明するためには、これら全身性代謝の変化も考慮した上で、ミトコンドリアROS (スーパーオキシド)産生ならびにユビキチンプロテアソーム系タンパク質分解システムの連関を総合的に解明する必要がある。すでに、*in vivo*試験において暑熱感作した鶏の骨格筋ではAtrogin-1の発現が感作後早期段階で増加しており、その後通常レベルまで回帰するとこの本*in vitro*研究と同様の変化が認められている。今後、本研究のような*in vitro*と*in vivo*の各研究情報をさらに統合・連結させることで、暑熱ストレスの本質を合理的に解き明かすことができると考えている。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金・基盤B「動物のストレス耐性向上のための包括的研究：酸化ストレス・代謝・免疫系の統合的制御」(研究課題番号：24380147、代表：豊水正昭)、ならびに日本学術振興会科学研究費補助金・若手B「暑熱負荷時の鶏の代謝時系列変化およびその連動性の解明」(研究課題番号：25850182、代表：喜久里基)の助成を受け実施した。本研究遂行にあたり、貴重なご意見・ご助言をいただいた東北大学大学院農学研究科動物栄養生化学分野の室員の皆様に深く感謝いたします。

【引用文献】

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Luo GJ, Sun X, Hasselgren PO. 2000. Hyperthermia stimulates energy-proteasome-dependent protein degradation in cultured myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278: R749-R756.
- 4) Thaxton P, Sadler CR, Glick B. 1968. Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poult. Sci.*, 47: 264-266.
- 5) Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sakai M, Sá LR, Ferreira AJ, Palermo-Neto J. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 89: 1905-1914.
- 6) Mujahid A, Yoshiki Y, Akiba Y, Toyomizu M. 2005. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poult. Sci.*, 84: 307-314.
- 7) Lin H, Decuyper E, Buyse J. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 144: 11-17.
- 8) Imik H, Ozlu H, Gumus R, Atasever MA, Urcar S, Atasever M. 2012. Effects of ascorbic acid and α -lipoic acid on performance and meat quality of broilers subjected to heat stress. *Br. Poult. Sci.*,
- 1) Teeter RG, Smith MO, Owens FN, Arp SC, Sangiah S, Breazile JE. 1985. Chronic

- 53: 800-808.
- 9) Habibian M, Ghazi S, Moeini MM, Abdolmohammadi A. 2014. Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. *Int. J. Biometeorol.*, 58: 741-752.
 - 10) Azad MAK, Kikusato M, Zulkifli I, Toyomizu M. 2013. Electrolysed reduced water decreases reactive oxygen species-induced oxidative damage to skeletal muscle and improves performance in broiler chickens exposed to medium-term chronic heat stress. *Br. Poult. Sci.*, 54: 503-509.
 - 11) Schieber M, Chandel NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, 24: R453-R462.
 - 12) Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. 2010. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 298: C140-C148.
 - 13) Grasso S, Scifo C, Cardile V, Gulino R, Renis M. 2003. Adaptive responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Exp. Biol. Med (Maywood).*, 228: 491-498.
 - 14) Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329: 23-38.
 - 15) Abe T, Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M. 2006. Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Lett.*, 580: 4815-4822.
 - 16) Nakashima K, Nonaka I, Masaki S. 2004. Myofibrillar proteolysis in chick myotubes during oxidative stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo).*, 50: 45-49.
 - 17) McClung JM, Judge AR, Talbert EE, Powers SK. 2009. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 296: C363-C371.
 - 18) Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB. 2003. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 285: C806-C812.
 - 19) Gomes-Marcondes MC, Tisdale MJ. 2002. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer. Lett.*, 180: 69-74.
 - 20) Medicherla B, Goldberg AL. 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J. Cell. Biol.*, 182: 663-673.
 - 21) Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305: 709-718.
 - 22) Davies KJ, Goldberg AL. 1987. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 262: 8227-8234.
 - 23) Höhn A, König J, Grune T. 2013. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J. Proteomics.*, 92: 132-159.
 - 24) Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. 2004.

- Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.*, 36: 1208-1213.
- 25) P akashima K, Yakabe Y, Yamazaki M, Abe H. 2006. Effects of fasting and refeeding on expression of atrogen-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2775-2778.
- 26) Ohtsuka A, Kwatomi N, Nakashima K, Araki T, Hayashi K. 2011. Gene expression of muscle-specific ubiquitin ligase, atrogen-1/MAFbx, positively correlates with skeletal muscle proteolysis in food-deprived broiler chickens. *J. Poult. Sci.*, 48: 92-96.
- 27) Gilliam LA, Moylan JS, Patterson EW, Smith JD, Wilson AS, Rabbani Z, Reid MB. 2012. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 302: C195-C202.
- 28) Kikusato M, Toyomizu M. 2013. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One*, 8: e64412.
- 29) St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, 277: 44784-44790.
- 30) Orr AL, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Brand MD. 2012. A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 287: 42921-42935.
- 31) Mráček T, Drahota Z, Houštěk J. 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827: 401-410.