

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03126

研究課題名（和文）乳腺の小胞体ストレス応答機構に着眼した泌乳制御機序解明と泌乳平準化研究への新展開

研究課題名（英文）Elucidation of lactation control mechanisms focusing on the Endoplasmic Reticulum stress response in the mammary gland and new approaches to the study of lactation regulation

研究代表者

米倉 真一（Yonekura, Shinichi）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：40443113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000 円

研究成果の概要（和文）：乳腺上皮細胞の泌乳能力に関与する細胞内機構として小胞体ストレス応答(UPR)に着目し検討を行った。その結果、乳量上昇に関与する小胞体拡張は、肝臓から分泌されるIGF-1がUPRの1経路であるIRE1-XBP1を活性化することで小胞体生合成を促進していることを明らかにした。一方、乳量減少に関与する細胞死は、飽和脂肪酸がUPRの1経路であるPERK-CHOPを活性化することでアポトーシスを誘導していることを明らかにした。エネルギー不足に陥ると乳牛の肝臓で重篤な小胞体ストレスが発生していることも明らかにし、ヘムの構成要素である5-アミノレブリン産給与により、小胞体ストレスが低減することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳量増減に関与する細胞内機構と内因性因子を明らかにしたことから、今後、泌乳平準化する技術開発する上で有用な基礎的知見となることが期待される。さらに、本研究で同定した小胞体ストレスを低減する効果を有する5アミノレブリン酸やウルソデオキシコール酸の給与は、泌乳初期の負のエネルギーバランス時に有効である可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：We focused on the endoplasmic reticulum stress response (UPR) as an intracellular mechanism involved in the lactation ability of mammary epithelial cells. We found that IGF-1 secreted from the liver activates IRE1-XBP1, a pathway of the UPR, to promote endoplasmic reticulum biosynthesis, which is responsible for the expansion of the endoplasmic reticulum (ER) that is associated with increased milk production. On the other hand, cell death, which is responsible for decreased milk production, was found to be induced by saturated fatty acids inducing apoptosis by activating PERK-CHOP, one pathway of the UPR. We also found that severe endoplasmic reticulum stress occurs in the liver of dairy cows when they suffer from energy deficiency, and that 5-aminolevulinic acid feeding, a component of heme, reduces endoplasmic reticulum stress.

研究分野：家畜生理学

キーワード：乳腺上皮細胞 小胞体ストレス応答 小胞体生合成 細胞死 乳牛



## 1. 研究開始当初の背景

これまでの高泌乳牛は、分娩後に泌乳量が急激に増加し代謝負担やエネルギー不足から疾病が増え、治療コストや若齢淘汰損失が大きいことが酪農経営上の問題であった。問題解決の切り札は、泌乳初期の急激なピークを抑制しつつ後期の泌乳量を落とさずにキープする、泌乳期全体の乳量変化が少ない「泌乳平準化」技術の開発である。現在、国内外で重要視される、高泌乳牛の「泌乳平準化と持続化」に関する研究は、育種による乳牛の体質改良法か、乾乳期から周産期の飼養管理法の改良がメインとなっている。しかし、泌乳持続性の遺伝率はたったの約 0.13 程度であり、改良にはかなりの時間がかかる。また、飼養管理法の改良研究においては現場応用研究が主体で、乳牛の体内で起きているメカニズムの解明という点では知見は相当不足し、真の技術として確立する上での基礎研究が足りていない。泌乳平準化とはすなわち、泌乳曲線をコントロールする技術＝乳量制御であるにも関わらず、そもそも乳量増減がどのように起こるのか、その生理メカニズムの全貌は未解明のままである。

小胞体は分泌タンパク質を合成・修飾するオルガネラであるが、大量のタンパク質合成により小胞体機能が疲弊すると変性タンパク質が蓄積する(＝小胞体ストレス状態)。小胞体ストレスは、3つの特異センサータンパク質(小胞体膜に局在する PERK、IRE1、ATF6)によって感知され、小胞体の恒常性を維持するために UPR (unfolded protein response) を発動する。我々は、乳腺上皮細胞の UPR が、(1) 小胞体拡張や (2) カゼイン合成に寄与すること、(3) 高泌乳牛を用いた研究で、小胞体ストレスが過多になることで乳腺上皮細胞死が起き、乳量が減少することを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

乳牛の健全性と生涯生産性の向上を図る「泌乳平準化」技術開発を加速させる新たな基盤知見を得るために、本研究では細胞生理学的観点から、ミルク合成の現場であるウシ乳腺上皮細胞の機能と細胞数および小胞体機能に着目し、1) ウシ乳腺上皮細胞の泌乳能力に関わる「小胞体拡張」と「細胞死」を調節する分子経路の解明、2) 細胞死や小胞体拡張を誘導する内因性因子の特定、3) 乳牛のエネルギー不足と小胞体ストレスとの関連性および小胞体ストレスを緩和する資料素材の特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

具体的には、以下の項目について検討した。

### (1) 細胞死を惹起する内因性因子の特定とその分子経路の解明

泌乳初期の乳牛では、負のエネルギーバランスに陥り、体脂肪が動員され、血中の飽和脂肪酸濃度が上昇する。よって脂肪酸に着目し、ウシ乳腺上皮細胞株である MAC-T 細胞を用いて、細胞死を誘導する脂肪酸種を明らかにするとともに、小胞体ストレス応答機構の活性化度合いを qPCR およびウエスタンブロット法により評価することで、細胞内機構を検証した。

### (2) 小胞体拡張を誘導する内因性因子の特定とその分子経路の解明

乳腺発達に関与するホルモンである IGF-1 と脂肪酸に着目して検討を行った。MAC-T 細胞を用いて、小胞体を ER-tracker で染色し、その蛍光強度を FACS で測定し、小胞体拡張の度合いを評価した。



### (3) 乳牛のエネルギー不足と小胞体ストレスとの関連性および小胞体ストレスを緩和する資料素材の特定

乾乳牛を用いて、2日間の絶食によって負のエネルギーバランスを誘導し、エネルギー代謝において要の器官である肝臓の小胞体ストレス状態を qPCR 法で検討した。小胞体ストレスを緩和する物質としてヘムの構成要素である 5-アミノレブリン酸に着目した。MAC-T 細胞の培養培地に添加することで、41 の熱刺激や飽和脂肪酸による小胞体ストレス惹起と細胞死が抑制されるのか検証した。さらに、乳牛個体を用いた試験より、5-アミノレブリン酸や胆汁酸の一種であるウルソデオキシコール酸を飼料に添加することで、2日間の絶食によって発生する肝臓での小胞体ストレスが緩和されるのか検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞死を惹起する内因性因子の特定とその分子経路の解明

脂肪酸に着目し、短鎖脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸を MAC-T 細胞に処理して検討した結果、飽和脂肪酸処理によって MAC-T 細胞死が生じることが明らかとなった。またその際、UPR 経路の 1 つである PERK-CHOP 経路が活性化していることが明らかとなった(図1)。よって、泌乳牛ではエネルギー不足によって増加する血中の飽和脂肪酸が、乳腺上皮細胞の小胞体ストレスを惹起することが考えられた。

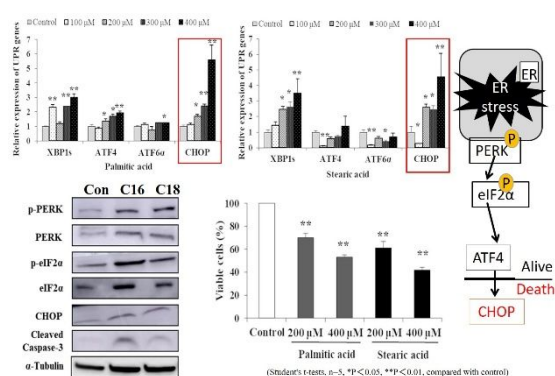


図1 飽和脂肪酸は乳腺上皮細胞の小胞体ストレスを惹起

### (2) 小胞体拡張を誘導する内因性因子の特定とその分子経路の解明

XBP1 が小胞体生合成に関与する遺伝子発現を上昇させていることを見出した。さらに IGF-1 が mTOR シグナルを介して IRE1-XBP1 経路を活性化させ、小胞体の生合成を高めていることを明らかにした(図2)。

脂肪酸種によって活性化する UPR 経路は異なり、酢酸、酪酸、プロピオン酸といった短鎖脂肪酸は PERK-CHOP 経路は活性化せず、IRE1-XBP1 経路を活性化させることを明らかにした。さらに短鎖脂肪酸は小胞体の生合成を高める働きも有することを見出した(図3)。この結果は脂肪酸種によって惹起される小胞体ストレスレベルが異なり、乳腺上細胞の生理機能も大きく異なることが示唆された。

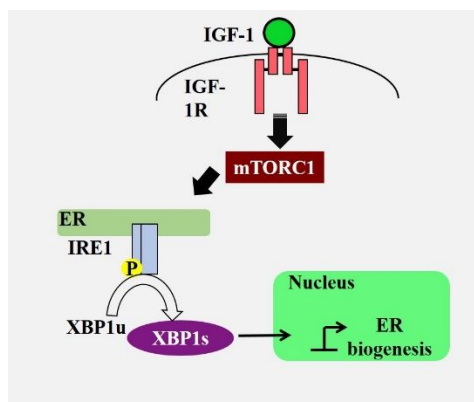


図2 IGF-1はIRE1-XBP1経路を活性化させ、小胞体の生合成を高める

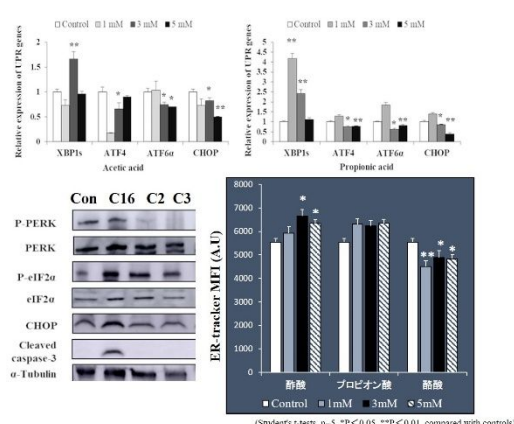


図3 短鎖脂肪酸は乳腺上皮細胞の小胞体生合成を促進



(3) 乳牛のエネルギー不足と小胞体ストレスとの関連性および小胞体ストレスを緩和する資料素材の特定

41 の熱刺激や飽和脂肪酸により MAC-T 細胞 の PERK-CHOP 経路が活性化し細胞死が生じる。ヘムの構成要素である 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) に着目し、41 の熱刺激や飽和脂肪酸による小胞体ストレス惹起と細胞死が抑制されるのか検証した。その結果、5-ALA の処理により 41 の熱刺激や飽和脂肪酸処理による小胞体ストレスと細胞死の発生が抑制されることを明らかにした (図 4)。

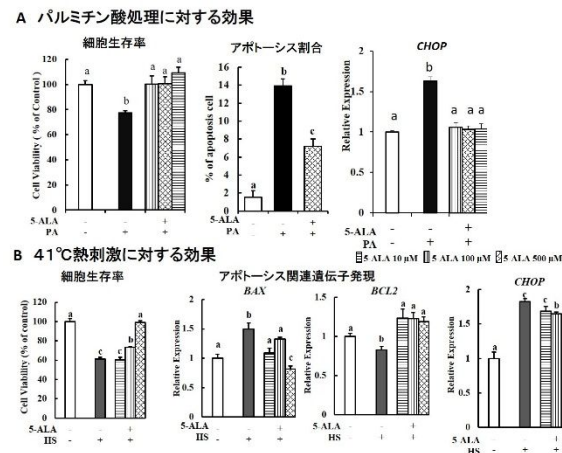


図4 5-ALAに小胞体ストレスを低減する作用

乳牛生体内の小胞体ストレス発生の要因を検証するため、乾乳牛を用いて、2 日間の絶食によって負のエネルギーバランスを誘導し、エネルギー代謝において要の器官である肝臓の小胞体ストレス状態を検討した。その結果、2 日間の絶食により IRE1-XBP1 経路が活性化していることを見出した。また CHOP 遺伝子発現の上昇も確認された。よって、エネルギー不足に陥ること

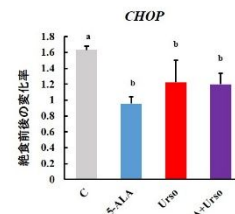
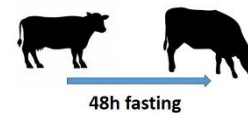


図5 5-ALA、ウルソ給与により小胞体ストレスが低減

で、肝臓で重篤な小胞体ストレスが発生することが明らかとなった。続いて *in vitro* 実験で小胞体ストレス軽減作用が認められた 5-ALA や、胆汁酸の一種であるウルソデオキシコール酸を飼料に添加することで、2 日間の絶食によって発生する肝臓での小胞体ストレスが緩和されるのか検証した。その結果、5-ALA やウルソデオキシコール酸を絶食前に給餌することで、絶食後の肝臓の小胞体ストレスが低減することを明らかにした (図 5)。

これら結果から、泌乳初期の負のエネルギーバランス時においても、5-ALA やウルソデオキシコール酸の給餌が有効である可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sharmin Mst Mamuna, Islam Md Aminul, Yamamoto Itsuki, Taniguchi Shin, Yonekura Shinichi	4. 巻 26
2. 論文標題 5-ALA Attenuates the Palmitic Acid-Induced ER Stress and Apoptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26041183	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 Islam Md Aminul, Noguchi Yoko, Taniguchi Shin, Yonekura Shinichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Protective effects of 5-aminolevulinic acid on heat stress in bovine mammary epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Bioscience	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5713/ajas.20.0349	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 Sharmin Mst Mamuna, Hayashi Satoko, Miyaji Makoto, Ishizaki Hiroshi, Matsuyama Hiroki, Haga Satoshi, Yonekura Shinichi	4. 巻 104
2. 論文標題 Insulin-like growth factor-1 induces IRE1-XBP1 dependent endoplasmic reticulum biogenesis in bovine mammary epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 12094 ~ 12104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3168/jds.2021-20268	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 Islam Md Aminul, Adachi Shuya, Shiiba Yuichiroh, Takeda Ken-ichi, Haga Satoshi, Yonekura Shinichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of starvation-induced negative energy balance on endoplasmic reticulum stress in the liver of cows	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Bioscience	6. 最初と最後の頁 22 ~ 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5713/ab.21.0140	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 Sharmin Mst Mamuna、Mizusawa Moeko、Hayashi Satoko、Arai Wataru、Sakata Shotaro、Yonekura Shinichi	4. 巻 103
2. 論文標題 Effects of fatty acids on inducing endoplasmic reticulum stress in bovine mammary epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 8643～8654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3168/jds.2019-18080	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 Yonekura Shinichi、Sharmin Mst Mamuna	4. 巻 -
2. 論文標題 Sustainable Milk Production from a Lactation Biology Perspective	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advances in Biological Sciences Research	6. 最初と最後の頁 3～7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2991/978-94-6463-116-6_2	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 米倉 真一、安達 柊也、Islam Md Aminul、谷口 慎、椎葉 湧一郎、竹田 謙一、芳賀 聡
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸およびウルソデオキシコール酸の乾乳牛への給与が48時間絶食後の肝機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第129回日本畜産学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安達 柊也、坂田 章太郎、林 聡子、米倉 真一
2. 発表標題 ウシ乳腺上皮細胞においてIGF-1はIRE1-XBP1経路を介しER生合成を誘導する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Sharmin Mst Mamuna、林 聡子、芳賀 聡、米倉 真一
2. 発表標題 IGFI-induced UPR component gene XBP1s regulates the endoplasmic reticulum biogenesis of bovine mammary epithelial cell
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Islam Md Aminul、安達 柊也、椎葉 湧一郎、竹田 謙一、芳賀 聡、米倉 真一
2. 発表標題 Effects of starvation-induced negative energy balance (NEB) on endoplasmic reticulum (ER) stress in the liver of dry cows
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichi Yonekura, Sharmin Mst Mamuna
2. 発表標題 0.2991/978-94-6463-116-6_2
3. 学会等名 3rd International Conference on Environmentally Sustainable Animal Industry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安達 柊也、Islam Md Aminul、Huricha、椎葉 湧一郎、竹田 謙一、米倉 真一
2. 発表標題 ウルソデオキシコール酸の飼料添加が絶食時ウシ肝臓機能に及ぼす影響
3. 学会等名 ウルソデオキシコール酸の飼料添加が絶食時ウシ肝臓機能に及ぼす影響
4. 発表年 2022年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	芳賀 聡  (Haga Satoshi)  (90442748)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員   (82111)	
研究 分担者	渡邉 敬文  (Watanabe Takafumi)  (50598216)	酪農学園大学・獣医学群・准教授   (30109)	
研究 分担者	徳武 優佳子  (Tokutake Yukako)  (90824657)	東北大学・農学研究科・助教   (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------