

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19271

研究課題名(和文)化石燃料非依存的な新規暑熱ストレス軽減法のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of a new fossil fuel-independent thermal stress reduction process

研究代表者

スルチョードリ ビシュワジット(SurChowdhury, Vishwajit)

九州大学・基幹教育院・准教授

研究者番号：00535453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ロイシンとシトルリンによるニワトリの暑熱致死軽減効果について以下のことを明らかとした。(1)有精卵へのロイシンにより孵化後のニワトリは耐暑性が向上し、体重増加も改善する。(2)シトルリンを多量に含むプロバイオティクスや農副産物のスイカ皮ジュースは、ニワトリにおいて体温効果作用を示す。(3)ロイシン処理は幼齢期の脂質代謝を改変する。(4)ロイシン処理は、暑熱下ヒナの中樞GABA濃度を高く維持する。(5)シトルリン処理はアミノ酸代謝のみならず代謝関連ホルモンの分泌にも影響する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深刻化する地球温暖化によって食料生産は危機に直面している。本調査結果は、ニワトリの耐暑性向上によって持続可能な食糧生産の実現に寄与するものと考えられる。調査対象のアミノ酸は、身近なものであることから、環境・人体への悪影響なく、シトルリンのように農副産物に多く含有するものを利用することで循環型の持続可能な食料生産につながるものと考えられる。また、これらアミノ酸による暑熱ストレス軽減効果の他家畜への利用、さらにはヒトへの適用なども含めてその端緒となりうるものである。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have found that L-leucine (L-Leu) and L-citrulline (L-Cit) have novel function to survive chickens to heat stress. L-Leu was injected in fertile broiler eggs and the obtained broilers were thermotolerant and their body weight gain was higher than the control group. On the other hand, not only synthetic L-Cit but also L-Cit enriched probiotics and watermelon rind juice, which is a natural source of L-Cit, efficiently reduced body temperature. In these studies, we have also explored the metabolic changes and possible mechanisms of L-Leu and L-Cit induced thermoregulation. L-Leu caused lipid metabolism imprinting until the neonatal period of broiler chicks. In terms of amino acid metabolism, among different changes brain GABA concentration was higher in L-Leu treated heat-exposed broilers compared to the control. L-Cit caused to change metabolic hormones and amino acid metabolism.

研究分野：家畜生理学

キーワード：ニワトリ 耐暑性 ロイシン シトルリン ストレス軽減

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人類にとって、温暖化に伴う夏季暑熱の深化は、直接的な健康被害だけでなく、食糧生産という点においても対処すべき喫緊の課題となっている。暑熱ストレスに関する研究はこれまでも多くなされてきているものの、未だ現場利用につながる革新的な対応策は構築されていない。その理由として、これまでの研究は局所的な変化のみに着目した対処療法であり、抜本的な解決に着手していなかったことが原因と考えられる。そもそも暑ければ、涼しくしてやることで暑熱ストレスは生じないが、そのためには大型換気扇やエアコンをフル稼働させなければならない。結果として消費される電力は膨大なものとなる。温暖化に伴う防暑対策に電力を消費して二酸化炭素排出量を増大させることは悪循環である。したがって、温度上昇に伴う過度の体温上昇を緩和できれば、局所的弊害は軽減できる上、電力消費量の抑制も図れる。これまでに、暑熱ストレスバイオマーカーであるアミノ酸の同定とその利用による体温上昇の緩和を見出してきた。このメカニズムを明らかにすることで画期的な「暑熱ストレス軽減法」として現場利用につながるものと考えた。

2. 研究の目的

目的は、電力(化石燃料消費)に頼らない暑熱ストレス軽減法、すなわち成長初期代謝制御法を開発することにある。この目標を達成するために、暑熱ストレスバイオマーカーのアミノ酸を利用して成長初期の代謝改変を試み、それによって“抗暑熱ストレス能(耐暑性)”を獲得させる。さらには、その能力を長期的に(成長後も)維持させることを目指す。これまで暑熱ストレスについて様々な栄養素との関係を検証するなかで、暑熱ストレスバイオマーカーであるアミノ酸を見出した(種卵へのL-ロイシン投与によってニワトリヒナの脂質代謝が変化し、耐暑性が向上する。初生ヒナへのL-シトルリン経口投与によって、耐暑性が向上する)。しかしながら、これらはヒナで認められた現象であり、生産現場での利用を考えると、(1) 成長後も耐暑性は持続しているのか？(2) L-ロイシンの *in ovo* 投与は、なぜ雌では効果がないのか？について解明しなければならない。さらに、(3) 上記アミノ酸処理は、どのような機構で代謝を変化させ、耐暑性を向上させるのか？について明らかにすることで、より効果的で現場利用に即した方法が構築されるであろう。

3. 研究の方法

<試験1> 耐暑性および成長に及ぼすL-ロイシン *in ovo* 投与の影響: 孵卵7日目にL-ロイシンを投与した。孵化後、ヒナの直腸温、体重及び甲状腺ホルモン濃度を測定するとともに初生時での暑熱暴露試験(35±1°C, 120 min)を行った。

<試験2> 急性あるいは慢性暑熱暴露時の成長及び血液性状等に及ぼすL-ロイシン *in ovo* 投与の影響: 同様に孵卵7日目にL-ロイシンを投与し孵化したニワトリ29-30日齢時に急性暑熱暴露試験(30±1°C, 120 min)を行った。試験終了後、血液を採取して測定に供した。慢性暑熱試験は、開放傾斜を想定し15-44日齢に環境温度30度以上6時間程度暴露した。その間の摂食量・体重を測定するとともに、試験終了後には血液および肝臓を採取して測定に供した。

<試験3> ニワトリヒナ中枢における遺伝子発現に及ぼすL-ロイシン *in ovo* 投与の影響: 同様に孵卵7日目にL-ロイシンを投与し孵化したニワトリ脳組織を摘出冷凍保存し遺伝子発現解析用のサンプルとした。RNAは、Trizol試薬によってホモジェナイズ、シリカカラム法によって抽出後、Low input Quick Amp Labeling Kitによって蛍光ラベル反応を行い、DNAマイクロアレイ(Agilent社)によって遺伝子発現プロファイルを収集した。

<試験4> ニワトリヒナの体温調節に及ぼすアデノシン受容体作動薬の影響: 7日齢時にヒナの腹腔内にAMPを対照区ヒナには生理食塩水を投与してその後の直腸温および酸素消費量の測定、脳組織および肝臓を採取して遺伝子発現の解析を行った。また、同様にAMP腹腔投与ヒナ側脳室内にアデノシンA1受容体拮抗剤を投与し、直腸温を測定するとともに間脳における遺伝子発現量の解析を行った。

<試験5> L-シトルリン経口投与後のニワトリ肝臓における代謝産物メタボローム解析: 8日齢時にL-シトルリン経口投与ヒナと溶媒のみを投与したヒナを用いて60分後の直腸温を測定するとともに肝臓を採取してメタボーム解析(Human Metabolome Technologies, Inc.)を行った。なお、メタボローム解析はCEおよびLC-TOFMSの二つの解析法を行った。

4. 研究成果

<試験1> 孵化直後のヒナの直腸温及びT4濃度はL-ロイシン *in ovo* 投与によって用量依存的に減少した。しかし、高濃度L-ロイシン投与群の初生雛では増体には影響しないものの直腸温が高いことが示された。また、暑熱暴露試験ではロイシン投与区のヒナは対照区よりも体温の上昇が緩和されることが認められた。

以上の結果から、L-ロイシン *in ovo* 投与は、熱的中性圏での初生ヒナ直腸温を高くするものの、暑

熱環境下では体温上昇緩和して耐暑性をもたらすものと考えられた。

<試験2> 急性暑熱暴露では、in ovo投与群のニワトリは暑熱による体温上昇が抑制された。しかし、摂食量、血漿遊離脂肪酸や乳酸濃度といった血液性状には違いは認められなかった。慢性暑熱暴露では、in ovo投与群のニワトリの方が直腸温は高く推移したものの増体量が大きいことが示された。さらに、in ovo投与区では肝臓中のロイシンやイソロイシンといった必須アミノ酸含量が増加するとともに血漿中のロイシン濃度の低下が認められた。

以上の結果から、L-ロイシンin ovo投与は、成長後のニワトリにおいても耐暑性を示すこと、その効果はアミノ酸代謝の変化によって生じたものと考えられた。

<試験3> L-ロイシン処理群と無処理群それぞれから雄3羽および雌3羽を用いて脳組織サンプリングを行い、遺伝子発現プロファイルの収集を行なった。得られた発現プロファイルデータに正規化など統計処理を施し、L-ロイシン処理の影響を解析したところ、L-ロイシン処理によって脳組織内の遺伝子発現が変化することが判明した。しかし、その変化量はわずかなものであり、今後、遺伝子機能の着目した解析が必要と考えられた。

以上の結果から、L-ロイシン処理したニワトリの脳組織内遺伝子発現プロファイルを収集した。今後、L-ロイシン処理の遺伝子への影響を解析する基盤が確立できた。

<試験4> ヒナの直腸温はAMP投与後に低下した。酸素消費量は、投与5分後に低下していることが確認された。遺伝子発現量については、間脳ではアグーチ関連ペプチドの発現量が高い傾向にあった。肝臓においては、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体、カルニチンパルミトイル・トランスフェラーゼ1およびアセチルCoAカルボキシラーゼの発現が対照区よりも低値を示し、脂肪酸合成酵素の発現量も低い傾向にあった。一方、熱産生に関連する脱共役タンパク質の発現量が高い傾向であった。拮抗剤の中枢投与は、AMPの体温降下作用を緩和した。間脳遺伝子発現解析では、拮抗剤がAgRPの発現を抑制するとともに、プロオピオメラノコルチンの発現量を増加させることが示された。

以上の結果から、アデノシンA1受容体の活性が体温降下作用を有することが明らかとなった。また、そのメカニズムには、中枢アグーチ関連ペプチドが関与していることが示唆された。また、AMPによる体温降下作用には中枢アグーチ関連ペプチドとともに肝臓での代謝抑制が関係することも明らかとなった。なお、肝臓脱共役タンパク質発現量の増加については、代謝抑制に拮抗する反応と推察された。

<試験5> L-シトルリン経口投与によってヒナの直腸温は低下することが示された。メタボローム解析の結果、CE-TOFMSにおいて246の代謝産物、LC-TOFMSでは115の代謝産物に違いが認められた。とりわけ、尿素サイクルに関連するシトルリン、アルギノコハク酸およびアルギニンの濃度がL-シトルリン経口投与区において高いことが示された。さらに、GABA濃度の増加とTCA回路に関連するコハク酸やフマル酸などの増加をもたらすこと、ATP産生を増加させる傾向が認められた。

以上のことから、L-シトルリン投与は、短時間のうちに代謝経路に影響して直腸温の低下をもたらすことが考えられた。

<総合考察>

試験1の結果から、初生期に体重増加は観察されなかったものの直腸温が高かったことは代謝が亢進していたことが考えられる。一方、高温環境下では反対に体温上昇が抑制されており、体温調節機構に変化がもたらされたことが考えられる。このことは孵化直後に甲状腺ホルモンが低値であったこともそれを支持する。

試験2の結果から、初生期に認められた耐暑性や代謝亢進は出荷日齢までも維持されており、体温調節機構につながるアミノ酸代謝機構の変化がもたらされたものと考えられる。

試験3の結果、L-ロイシン処理によって脳組織内の遺伝子発現が変化しており、中枢性体温調節機構の改変が考えられた。

試験4の結果から、ニワトリヒナの体温調節機構においてアデノシン A1 受容体の活性が影響することが明らかとなった。しかしながら、その効果は哺乳類におけるものよりも弱いことから、体温調節機構におけるアデノシン A1 受容体の重要性は鳥類と哺乳類で異なることが示唆された。

試験5の結果、L-シトルリンは、エネルギー代謝(同化)経路に作用することでニワトリヒナの低体温を誘発するものと考えられる。

本試験の結果から、いずれのアミノ酸の効果も中枢性体温調節機構の改変よりも肝臓における代謝機構の変化が暑熱時の体温上昇緩和機構に重要であることが示唆されるとともに、これらの処理が生産現場において暑熱対策の一つとして効果を上げるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Han G., Ouchi Y., Hirota T., Haraguchi S., Miyazaki T., Arakawa T., Masuhara N., Mizunoya W., Tatsumi R., Tashiro K., Bungo T., Furuse M., Chowdhury V. S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of l-leucine in ovo feeding on thermotolerance, growth and amino acid metabolism under heat stress in broilers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 animal	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1751731120000464	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 Han Guofeng, Yang Hui, Wang Yunhao, Haraguchi Shogo, Miyazaki Takuro, Bungo Takashi, Tashiro Kosuke, Furuse Mitsuhiro, Chowdhury Vishwajit S.	4. 巻 32
2. 論文標題 L-Leucine increases the daily body temperature and affords thermotolerance in broiler chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian-Australasian Journal of Animal Sciences	6. 最初と最後の頁 842~848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5713/ajas.18.0677	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 Yang Hui, Chowdhury Vishwajit S., Han Guofeng, Zhang Rong, Furuse Mitsuhiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Flavangenol regulates gene expression of HSPs, anti-apoptotic and anti-oxidative factors to protect primary chick brain cells exposed to high temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thermal Biology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtherbio.2019.02.010	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 Tran Phuong V., Do Phong H., Han Guofeng, Bahry Mohammad A., Yang Hui, Chowdhury Vishwajit S., Furuse Mitsuhiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Oral Administration of a Medium Containing L-Citrulline-producing Live Bacteria Reduces Body Temperature in Chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 285~289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0180136	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 Nguyen Linh T.N., Eltahan Hatem M., Pham Cuong V., Han Guofeng, Chowdhury Vishwajit S., Furuse Mitsuhiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Oral Administration of Watermelon Rind Extract to Induce Hypothermia in Chicks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 37 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190054	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 Han, G., Yang, H., Ikeda, H., Wang, Y., Zhang, R., Tashiro, K., Bungo, T., Furuse, M., Chowdhury, V.S.	4. 巻 98
2. 論文標題 Effects of in ovo feeding of L-leucine on amino acids metabolism and heat-shock protein-70, and -90 mRNA expression in heat-exposed chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 1243-1253.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3382/ps/pey444	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 該当する

1. 著者名 Han, G., Yang, H., Tashiro, K., Bungo, T., Furuse, M., Chowdhury, V.S.	4. 巻 63
2. 論文標題 In ovo administration of L-leucine: a novel approach to affording thermotolerance in broiler chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reviews on Animal Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1-14.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Vishwajit S. Chowdhury ¹ , Kosuke Tashiro ¹ , Mitsuhiro Furuse ¹ and Takashi Bungo
2. 発表標題 Metabolome profiles of L-citrulline treated broiler liver.
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chowdhury, V.S., Han, G., Shirashi, J., Sugino, T., Furuse, M., Bungo, T.
2. 発表標題 Oral Administration of L-Citrulline Affords Thermotolerance in Heat-Exposed Broilers
3. 学会等名 Asian Australasian Animal Production Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 韓 国鋒・楊 輝・田代康介・豊後貴嗣・古瀬充宏・スルチョードリ ビシュワジット
2. 発表標題 卵内へのロイシン投与はブロイラーのアミノ酸代謝及び熱ショックタンパク質遺伝子発現量に影響する
3. 学会等名 日本家禽学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 韓国鋒・楊輝・田代浩介・豊後貴嗣・古瀬充宏・スルチョードリ ビシュワジット
2. 発表標題 In ovo administration of L-leucine: a novel approach to affording thermotolerance in broiler chicks
3. 学会等名 家畜栄養生理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内義光・大和珠子・廣田高至・スルチョードリ ビシュワジット・豊後貴嗣
2. 発表標題 ニワトリヒナの体温調節に及ぼすアデノシン受容体作動薬の影響
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chowdhury, V.S., Han, G., Bungo, T., Tashiro, K., Furuse, M.
2. 発表標題 L-Leucine stimulates growth in heat-exposed broilers
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 スルチードリ ピンシュワジット・田代康介・古瀬充宏・豊後貴嗣
2. 発表標題 Metabolome profiles of L-citrulline treated broiler liver.
3. 学会等名 日本家禽学会秋季大会
4. 発表年 2019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	田代 康介 (Tashiro Kosuke) (00192170)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究 分担者	豊後 貴嗣 (Bungo Takashi) (40325361)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	

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
---------	---------