

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450398

研究課題名(和文) 成長ホルモン関連ペプチドによるニワトリヒナ独自の脳内摂食調節機構の解明

研究課題名(英文) Role of growth hormone-related peptides on feeding regulatory mechanism in chicks

研究代表者

橘 哲也 (Tachibana, Tetsuya)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：80346832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では成長ホルモンの分泌を促す成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)がニワトリヒナの摂食を抑制することを明らかにした。ニワトリGHRHはいくつかの断片が存在することが示唆されているが、それらの中でも全長ペプチドが最も強い摂食抑制作用を示すことを明らかにした。加えて、GHRHの摂食抑制作用が異常行動の誘発やストレス反応によって引き起こされるものではないことを明らかにした。さらに、成長ホルモンの分泌を抑えるプロラクチン放出ペプチドがヒナの摂食を促進することを明らかにした。これらの作用が哺乳類とは正反対であったことから、これらのペプチドがニワトリ独自の摂食調節機構に関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that growth hormone-releasing hormone, which stimulates growth hormone release, inhibits feeding behavior in chicks. Although it is suggested that there would be several fragments of growth hormone-releasing hormone in chickens, the full-length of growth hormone-releasing hormone showed the strongest anorexigenic effect in chicks when administered centrally and peripherally. Growth hormone-releasing hormone did not induced behavioral changes and corticosterone release, suggesting that the anorexigenic effect would not be related to abnormal behavior and stress-related behavior. In addition, prolactin-releasing peptide, which inhibits growth hormone release, stimulated feeding behavior in chicks. These effects were completely different from the results of mammals. The present study revealed that growth hormone-releasing hormone and prolactin-releasing peptide are related to unique feeding regulatory mechanism of chicks.

研究分野：家畜行動学、家畜生理学、家畜栄養学

キーワード：ニワトリ 摂食行動 成長ホルモン 脳 行動学 生理学 栄養学

1. 研究開始当初の背景

ニワトリの成長は摂食量の影響を受ける。この観点から、効率的な家禽生産を目標としてニワトリヒナの摂食調節機構の解明が進められてきた。1990年代には動物の摂食行動が脳に作用する生理活性ペプチド、すなわち摂食調節ペプチドによって調節されているという概念が導入されたことから、ヒナでも摂食調節ペプチドの研究が盛んに進められてきた。

ヒナを対象とした摂食調節ペプチドの研究は哺乳類に追従する形で進められてきた。ところが、研究が進むにつれてヒナにおける摂食調節ペプチドの作用が哺乳類とは明らかに異なるものが発見され始めたのである。この事実は、ヒナの摂食調節機構は哺乳類とは異なることを示している。したがって、ヒナの脳内摂食調節機構の解明は、哺乳類の研究に追従するだけでは不十分であり、ヒナ独自の摂食調節機構を解明することが不可欠と言えよう。

ヒナの摂食調節ペプチドの中には、哺乳類とは全く逆の作用を示すものもある。興味深いことに、それらの摂食調節ペプチドは全て成長ホルモンの分泌に関わっている。例えば、グレリンや成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)は成長ホルモンの分泌を促すことが知られているが、これらは哺乳類の摂食行動を促すが、ヒナに脳内投与すると摂食量が減少する。これは、成長ホルモンを分泌させることで成長を促すはずのペプチドが、ヒナの摂食を抑制するという一見矛盾した作用を持っていることも示している。一方、成長ホルモンの分泌を抑えるソマトスタチンやプロラクチン放出ペプチド(PrRP)は哺乳類の摂食を抑えるが、ヒナでは一貫して摂食を促進する。これらの事実から、ヒナ独自の摂食調節機構は成長ホルモン関連ペプチドと何らかの関係があると考えられ、さらにはヒナの成長制御機構も独自の機構を有している可能性を示唆している。

近年、これまでに発見されていた GHRH と PrRP とは全く別の、新しい GHRH と PrRP がニワトリで発見された(以下、新 GHRH と新 PrRP と記述する)。新 GHRH と新 PrRP のいずれも既知のもの(便宜的に、旧 GHRH および旧 PrRP と記述する)とは別の染色体に由来している。その後の研究で、様々な脊椎動物には GHRH と PrRP が新旧 2 種類ずつ存在していることが明らかにされたが、哺乳類では片方しかない。したがって、脊椎動物の進化の過程で GHRH や PrRP による摂食調節機構、ひいてはこれらによる成長調節機構が、鳥類と哺乳類で変化してきた可能性がある。ただし、新 GHRH や新 PrRP を用いた研究は *in vitro* のものしかなく、新 GHRH や新 PrRP がヒナの摂食行動と成長にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、新 GHRH と新 PrRP をはじめとする成長ホルモン関連ペプチドの生理作用を調べてヒナ独自の脳内摂食制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では卵用種オスヒナを供試した。

(1) ヒナに新 GHRH を脳室内投与した後の摂食量を測定した。脳室内投与には Davis の方法(1979年)を使用した。なお、新 GHRH には新 GHRH(1-27)、新 GHRH(1-27)NH₂ および全長ペプチドである新 GHRH(1-47)の3種類が存在する可能性があるため、それらの作用について調べた。また、旧 GHRH である旧 GHRH(1-46)を脳室内投与および腹腔内投与した実験も実施した。

(2) 過去の研究により、GHRH は下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の受容体に若干の親和性を示すことが報告されている。PACAP はヒナの摂食を抑制するため、GHRH は PACAP 受容体に作用して摂食を抑制した可能性がある。そこで、PACAP 受容体アンタゴニストである PACAP(6-38)を同時脳室内投与した場合の新旧 GHRH の摂食抑制作用を調べた。

(3) 新旧 GHRH の摂食抑制作用が、睡眠や行動の活性化などの異常行動によって生じたものかを明らかにするため、行動学的解析を実施した。新旧 GHRH を脳室内投与した後のヒナの自発運動量を、赤外線センサーを利用した自発運動量測定装置にて測定した。また、ビデオカメラにてヒナを撮影し、録画した映像を基に、ヒナの立位および座位時間を測定するとともに、ジャンプや羽ばたき、毛繕いなどの回数を計数した。

(4) 新旧 GHRH の摂食抑制作用が、ストレスに関わるものかを明らかにするため、新旧 GHRH を脳室内投与した後の血漿中コルチコステロン濃度を酵素免疫測定法にて測定した。さらに、間脳における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。これらに加え、CRH 受容体アンタゴニストであるアストレシンを新旧 GHRH と同時投与した後の摂食量の変化を調べた。

(5) 内因性の新旧 GHRH が摂食調節に関わっているかを明らかにするため、絶食条件におけるヒナ間脳における新旧 GHRH の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて調べた。また、より詳細に調べるために、視床下部漏斗部における新 GHRH の遺伝子発現量についても調べた。

(6) 新旧 GHRH の遺伝子発現は様々な末梢組織でも見られることが報告されている。末梢における GHRH の作用を調べるため、ヒナに新 GHRH および旧 GHRH を腹腔内投与した後の摂食量を測定した。また、予備実験的な段階ではあるが、新 GHRH を3日間わたって連続投与した後の摂食量の変化についても調べた。

(7) 新 GHRH の腹腔内投与により血漿中成長ホルモン濃度が増加することが報告されている。成長ホルモンが新 GHRH の摂食抑制作用に関わっている可能性を検討するため、ヒナに哺乳類由来の成長ホルモンを腹腔内投与した後の摂食量を測定した。

(8) ヒナに新 PrRP を脳室内投与した後の摂食量の変化を調べた。なお、新 PrRP には、新 PrRP (1-20)、新 PrRP (1-30) および新 PrRP (1-31) の 3 つの断片があると推定されているので、それらを脳室内投与した後の摂食量の変化を調べた。また、腹腔内投与した場合の摂食量の変化も調べた。

4. 研究成果

(1) 新 GHRH (1-27)、新 GHRH (1-27) NH₂ および全長ペプチドである新 GHRH (1-47) の脳室内投与によりヒナの摂食量が有意に減少した(図1)。ただし、これらの中では新 GHRH (1-47) の作用が最も強かった。旧 GHRH (1-46) の脳室内投与でも同様の作用が見られたことから、ヒナ脳内の GHRH は摂食抑制に関わっている可能性を見出した。また、新 GHRH の摂食抑制作用にはその N 末端側のアミノ酸配列が必要であるが、作用を増強させるためには C 末端側のアミノ酸も必要であることが明らかとなった。

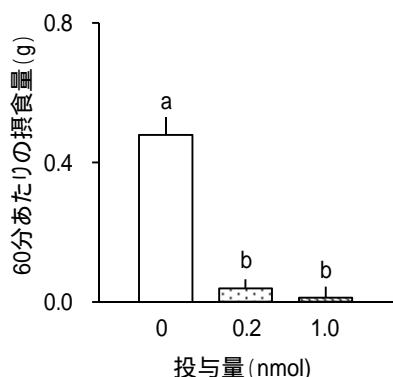


図1 新GHRH(1-47)の脳室内投与による摂食量の変化

値は平均値 ± 標準誤差を示す (各群7-10羽)。異符号間に有意差あり (P<0.05)。

(2) PACAP 受容体アンタゴニストは新旧 GHRH の摂食抑制作用に影響を与えなかった。したがって、新旧 GHRH の摂食抑制作用には PACAP 受容体が関与していないことが明らかとなった。

(3) 新旧 GHRH の脳室内投与は、ヒナの自発運動量、姿勢および各行動回数にほとんど影響を与えなかった。したがって、新旧 GHRH は睡眠様行動や異常行動を引き起こすことで摂食を抑制していないことが明らかとなった。

(4) 新旧 GHRH の脳室内投与は血漿中コルチコステロン濃度および間脳 CRH の mRNA 発現量に影響を与えなかった。以上のことから、新旧 GHRH はストレス反応の内分泌系に影響

を与えないことが明らかとなった。さらに、CRH 受容体アンタゴニストが新旧 GHRH の摂食抑制作用に影響を与えなかった。これらの結果から、新旧 GHRH の摂食抑制作用には CRH が関与していないこと、さらにストレス反応と関係がないことが示唆された。

(5) 絶食により間脳内新 GHRH の遺伝子発現量が有意に増加し(図2)、旧 GHRH の遺伝子も増加傾向を示した。摂食抑制作用を有する新旧 GHRH の遺伝子発現量が絶食時に増加するという結果は、絶食時には食欲が増加するという事実と矛盾することになった。そこで、GHRH の発現量が多い視床下部漏斗部における新 GHRH の遺伝子発現量を調べたところ絶食により有意に減少した。これらの結果は新 GHRH の遺伝子発現量が絶食時には部位特異的に変わることを示している。また、内因性新旧 GHRH がヒナの摂食に関わっている可能性も示唆している。

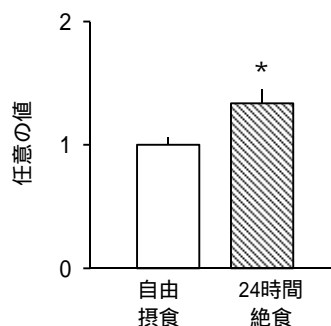


図2 絶食による間脳新GHRHのmRNA発現量の変化

数値はRP1 mRNA量で補正している。値は平均値 ± 標準誤差を示す (各群7-8羽)。* 自由摂食と比較して有意差あり (P<0.05)。

(6) GHRH を腹腔内投与した実験では、新 GHRH (1-47) を投与した場合にのみ摂食抑制作用が見られた(図3)。したがって、末梢の GHRH も摂食抑制に関わるが、新 GHRH のみに限られていることが明らかとなった。さらに、3日間連続で新 GHRH を腹腔内投与した実験では、1日あたりの摂食量に変化は見られず、

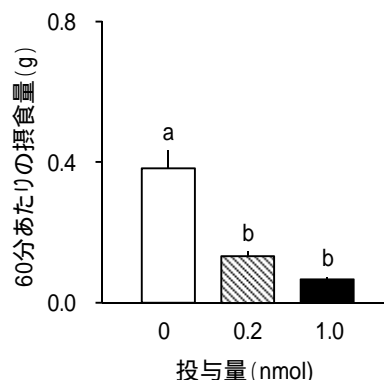


図3 新GHRH(1-47)の腹腔内投与による摂食量の変化

値は平均値 ± 標準誤差を示す (各群7-10羽)。異符号間に有意差あり (P<0.05)。

体重にも変化が見られなかった。

(7) 成長ホルモンの腹腔内投与がヒナの摂食量に影響を与えなかったことから、新 GHRH の摂食抑制作用には成長ホルモンが関わっていないことが明らかとなった。

(8) いずれの新 PrRP を脳室内投与した場合でも摂食量が増加した(図 4)。一方、腹腔内投与では摂食量の変化が見られなかったことから、新 PrRP は中枢においてのみ摂食を促進することが明らかとなった。

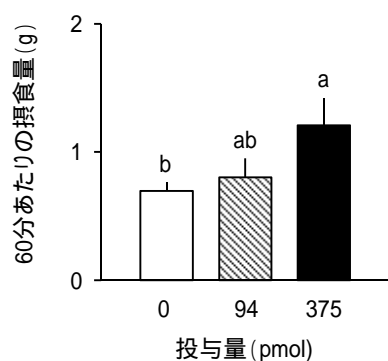


図4 新PrRP(1-20)の脳室内投与による摂食量の変化

値は平均値±標準誤差を示す(各群7-10羽)。異符号間に有意差あり(P<0.05)。

(9) まとめ

本研究では新 GHRH がヒナの摂食を抑制すること、新 PrRP が摂食を促進することを見出した。これらの結果は哺乳類の物とは正反対であったことから、成長ホルモンの分泌に関わる摂食調節因子が、ニワトリヒナ独自の脳内摂食調節機構に関わっていることがより明らかとなった。なお、予備実験的な段階ではあるが、新 GHRH を連続腹腔内投与した場合には、ヒナの1日の摂食量や体重に変化が見られなかった。これは、新 GHRH の摂食抑制作用が短期的なものであること、そして体重には影響を与えないものであることを示唆している。したがって、これらの成長ホルモン関連ペプチドは、成長と連動して摂食に影響を及ぼしたというよりもむしろ、成長とは別の作用として摂食に影響を及ぼした可能性がある。本研究はヒナ独自の摂食調節機構の一端を明らかにするものであり、さらにニワトリの脳内摂食促進機構の解明に寄与するものである。

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 3件)

1. 橘 哲也. ニワトリヒナの脳内摂食調節機構における成長ホルモン関連ホルモンの役割. 栄養生理研究会報. (2016) 60:25-33. 査読有り

2. Tachibana T, Kubo S, Khan MSI, Masuda K, Ukena K, Wang YJ. Peripheral injection of chicken growth hormone-releasing hormone inhibits feeding behavior in chicks. J Poult Sci. (2016) 53:29-33. 査読有り

3. Tachibana T, Sugimoto I, Ogino M, Khan MS, Masuda K, Ukena K, Wang Y. Central administration of chicken growth hormone-releasing hormone decreases food intake in chicks. Physiol Behav. (2015) 139:195-201. 査読有り

[学会発表](計 4件)

1. 橘 哲也. ニワトリヒナの脳内摂食調節機構における成長ホルモン関連ホルモンの役割. 2016年度家畜栄養生理研究会春季集談会、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)、2016年3月26日.

2. Kubo S, Masuda K, Ukena K, Wang YJ, Khan MSI, Tachibana T, Intracerebroventricular injection of growth hormone-releasing hormone decreases food intake in neonatal chicks. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)、2014年11月8日.

3. Tachibana T, Tsukada A, Moriyama S, Sakamoto T, Central injections of two distinct "prolactin-releasing peptides" stimulate feeding behavior in chicks. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)、2014年11月8日.

4. 杉本 郁恵、増成 一矢、モハメド シャキル イスラム カーン、Wang Yajun、橘 哲也. 成長ホルモン放出ホルモンはニワトリヒナの摂食行動を抑制する. 第38回日本比較内分泌学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)、2013年10月25日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 哲也 (TACHIBANA Tetsuya)

愛媛大学農学部・准教授

研究者番号: 80346832