

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07694

研究課題名(和文) Mechanisms and functions of neuropeptides and amino acids to adapt heat-stress

研究課題名(英文) Mechanisms and functions of neuropeptides and amino acids to adapt heat-stress

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリを用いて温熱環境への適応と暑熱ストレスの緩和における神経ペプチドとアミノ酸の役割について調査した。その結果、ニューロペプチドYは、暑熱ストレスの緩和や耐暑性において重要な因子であることが明らかとなった。一方、アミノ酸に関しては、暑熱ストレスが様々な組織において濃度低下を誘起することが示された。これらをもとに、濃度低下したアミノ酸を給与したところ、シトルリンがその経口投与により体温を低下させること、さらに耐暑性を向上させる可能性を見出した。また、ロイシンでは孵卵期に投与することで同様にニワトリの耐暑性が向上した。これらの結果は、夏季暑熱対策の開発に向け有用な情報となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the project was to understand the mechanisms and functions of neuropeptides and amino acids to adapt heat stress. It was revealed that neuropeptide Y (NPY) was increased in chick brain under heat stress. Subsequently, we revealed that central injection of NPY reduced body temperature and afforded thermotolerance in fasted chicks. Central NPY also reduced stress hormone, corticosterone, in fasted chicks. It was further found that heat stress caused to reduce plasma citrulline (Cit). Oral administration of L-Cit reduced body temperature and afforded thermotolerance in chicks. Thermal manipulation during embryogenesis caused to reduce leucine (Leu) concentrations in the brain and liver of embryos. We injected L-Leu into the fertilized eggs and found that in ovo L-Leu afforded thermotolerance in broiler chicks. Therefore, this project developed some novel ideas to utilize amino acids and neuropeptides to control heat stress problems.

研究分野：農学

キーワード：暑熱ストレス ニワトリ アミノ酸 ニューロペプチド

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化に伴う暑熱ストレスの被害は世界規模で年間およそ 10 億ドルの経済損失を生じている。畜産分野の場合、アメリカだけでもその損失は、年間豚肉で 2.99~3.16 千万ドル、牛肉では 3.7 千万ドル、家禽では 1.28~1.65 千万ドルにものぼる。このような暑熱ストレスによる経済損失は日本の畜産業においても大問題である。

温熱環境に対する適応は、このような暑熱ストレスに対抗する策の一つであり、暑熱ストレス下で生理学的機能がどのように適応調節されるのかを理解することが重要となってくる。当該分野においては、温熱環境下での神経ペプチドあるいはアミノ酸などの動態について多くの調査はなされているが、温熱環境への適応という観点からの研究は少ない。そこで、本課題では、これらの点について、とりわけ暑熱ストレスあるいは体温上昇の緩和に焦点をあて調査を行った。

2. 研究の目的

本課題の目的は、ニワトリを用いて温熱環境への適応と暑熱ストレスの緩和について、神経ペプチドとアミノ酸の役割を理解することとした。すなわち、(1) 暑熱ストレス条件に適応するために作用する神経ペプチドの動態とその機能的意義を明らかにすること。(2) 暑熱ストレスのバイオマーカーであるアミノ酸の供給が温熱環境への適応においてどのように役立つのか、を見出すことにある。

3. 研究の方法

<試験 1> 暑熱暴露時のニワトリ中枢における神経ペプチド遺伝子発現：14 日齢のニワトリヒナを高温 (HT: 40 ± 1) あるいは適温 (CT: 30 ± 1) に 2 時間または 5 時間暴露した。なお、不断給餌・給水とした。直腸温および採食量を 2 または 5 時間後に測定するとともに、試験終了後に採取した血液および間脳から血漿コルチコステロンおよび遊離アミノ酸濃度ならびに中枢の神経ペプチド遺伝子発現を分析した。

<試験 2> 温熱環境下の生理機構に及ぼすニューロペプチド Y (NPY) 中枢投与の影響：ニワトリヒナ中枢に NPY を投与し、HT (35 ± 1) あるいは CT (30 ± 1) で 3 時間飼育した。暑熱負荷後、採取した血液および間脳からモノアミンや血中成分の濃度を測定した。なお、これらは、自由摂食条件と絶食条件での比較も行った。

<試験 3> 体温調節に及ぼす NPY 中枢投与の影響：試験 2 の条件で、1 時間の直腸温を測定するとともに、同様に血液および脳組織の分析を行った。ただし、脳組織は、HSP-70 および -90、ならびに NPY サブ受容体 (NPYSR) 発現の分析も行った。さらに、NPY

と NPYSR-Y5 拮抗剤を同時投与し、その反応も調査した。

<試験 4> ニワトリ直腸温に及ぼすアミノ酸の中枢あるいは経口投与の影響：L-シトルリン、L-アルギニンあるいは L-オルニチンを中枢あるいは経口投与して、その後の直腸温の変化を調査した。

<試験 5> シトルリンの体温低下作用：L-シトルリン経口投与による体温低下の作用機序を明らかにするため、一酸化窒素合成阻害剤の末梢投与を同時に行い、その後の直腸温、摂食量、血漿代謝産物濃度およびミトコンドリア関連遺伝子の発現について解析した。また、温熱環境でのシトルリンの体温低下作用についても調査した。

<試験 6> 孵化後の体温調節機構に及ぼす孵卵期処理の影響：実験 1 では、孵卵後 10~18 日の間 6 時間、孵卵器の温度を 1 度上昇させ、孵化後ヒナの直腸温に及ぼす影響を調査した。実験 2 では、孵卵中の卵に各種分岐鎖アミノ酸あるいはそれらの混合液を投与し、孵化後ヒナの直腸温に及ぼす影響を調査した。実験 3 では、孵卵中の胚に L-ロイシンを投与し、孵化したヒナを高温 (HT: 35 ± 1) あるいは適温 (CT: 28 ± 1) に 3 時間暴露した。測定項目は、暴露後 0、60、120 および 180 分の直腸温とした。

4. 研究成果

<試験 1> HT 区のヒナは、直腸温度および血漿コルチコステロンレベルが有意に上昇し、摂食量は低下した。さらに、NPY およびアグーチシグナリングタンパク質 (ASIP) 前駆体の遺伝子発現量が増加したが、プロオピオメラノコルチン、コレシストキニン、グレリン、およびコルチコトロピン放出ホルモンでは変化は見られなかった。さらに、HT 区ヒナの中枢遊離アミノ酸含量は、トリプトファン、ロイシン、イソロイシン、バリンおよびセリンが血漿アミノ酸の変化に伴って有意に高くなることが示された。

以上の結果から、暑熱ストレスによる摂食抑制は、これら中枢の神経ペプチドおよび遊離アミノ酸の変化が関連する可能性を示すもので、これらが暑熱ストレスに伴う生理的变化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

<試験 2> NPY 中枢投与は、注入は、CT 区のヒナの直腸温を低下させたが、HT では影響しなかった。また、自由摂食条件では、NPY 中枢投与は、脳のセロトニンおよびノルエピネフリン濃度を減少させたが、ドーパミンおよびその代謝産物濃度は給餌条件に関わらず増加した (Fig. 1)。一方、血漿エピネフリン濃度は、自由摂食条件下で NPY によって減少したが、絶食条件の HT 区では NPY によ

って血漿ノルエピネフリンおよびエピネフリン濃度が増加し、血漿コルチコステロン濃度が低下した。血漿グルコースおよびトリアシルグリセロール濃度は、自由摂食条件下では NPY によってともに増加したが、トリアシルグリセロールについては、絶食条件下で減少した。

以上の結果から、中枢 NPY は、暑熱ストレス時においては摂食量の減少をもたらし、温熱環境下におけるストレス反応（モノアミンおよびコルチコステロン）の潜在的な調節因子であることが示唆された。

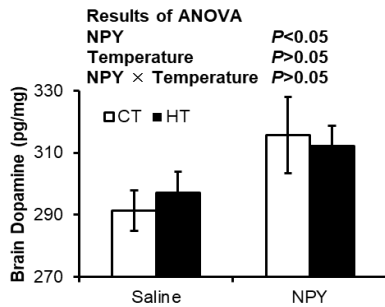


Fig. 1. NPY 中枢投与後の絶食ニワトリの間脳内ドーパミン濃度。

<試験 3> NPY は環境温度に関わらずヒナの直腸温を低下させるとともに (Fig. 2)、中枢における HSP-70 および-90 並びに NPYSR-Y5、-Y6、および-Y7 の遺伝子発現を増強した。しかし、NPY-Y1、-Y2 および-Y4 の遺伝子発現は、環境温度に関わらず NPY によって変化しなかった。NPYSR-Y5 拮抗剤と NPY との同時投与では、拮抗剤が NPY 誘発性の低体温効果を減弱させた。また、中枢性 NPY は、環境温度に関わらず血漿グルコースおよびトリアシルグリセロール濃度を減少させるとともに、血漿タウリンおよびアンセリン濃度を増加させた。

以上の結果から、中枢 NPYSR-Y5 を介したシグナルが、絶食ヒナの耐暑性のある程度増強させること、その際血漿グルコースおよびストレスホルモンレベルの低下および血漿遊離アミノ酸の増加が、潜在的に役割を果たしていることが示唆された。

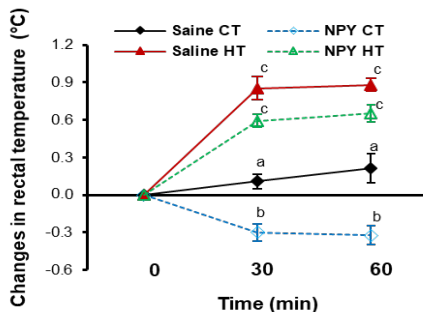


Fig. 2. 絶食ヒナの直腸温。

<試験 4> シトルリン、アルギニンおよびオルニチンの中枢投与はいずれもヒナの体温

に影響しなかったが、シトルリンの経口投与では体温が低下することを見出した。

以上の結果から、シトルリンが夏季暑熱のストレスによる家禽の高体温を最小限に抑えるための新たな候補でことが示唆された。

<試験 5> シトルリン投与によって体温は低下したが、L-NAME 投与はさらなる低下を示した。シトルリンの単回経口投与は、摂食量に影響はなかったものの、5 時間の間低体温を持続させた。さらに、シトルリン処理は血漿グルコース濃度を低下させることも明らかとなった。シトルリンを 2 回投与した場合は、血漿 NO_x 濃度に影響することなく耐暑性を向上させることが明らかとなった (Fig. 3)。以上の結果から、シトルリンによる体温効果作用には NO 産生が無関係であることが示され、シトルリンが夏季暑熱への対策として有効な栄養素となることが示唆された。

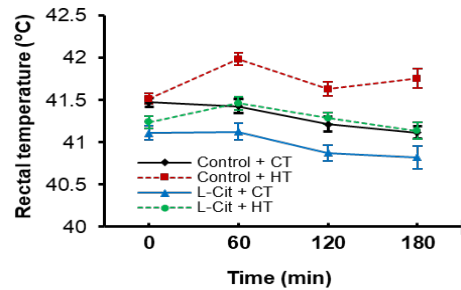


Fig. 3. 異なる環境温度下におけるヒナの直腸温に及ぼすシトルリン投与の効果

<試験 6> 孵卵中の温熱処理は、孵化後ヒナの直腸温に影響しなかった。一方、卵へのアミノ酸投与については、イソロイシンおよびバリンでは効果はなかったものの、ロイシン投与によって孵化後ヒナの直腸温が低くなること、また摂食量および体重の増加も確認された。さらに、ロイシン投与ヒナでは温熱環境における体温の増加が少なくなることが示された (Fig. 4)。

以上の結果から、孵化前のロイシン投与は、孵化後の耐暑性獲得をもたらすだけでなく、ロイシンが胚発生期においてその後の体温調節に關与する重要な代謝因子の 1 つであることが示唆された。

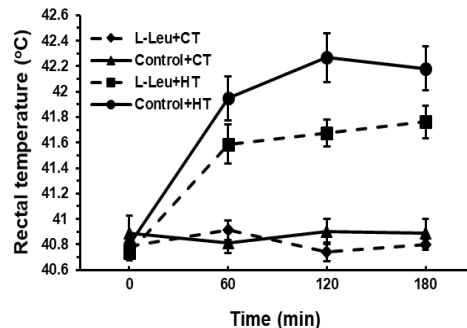


Fig. 4. 異なる環境温度下におけるヒナの直腸温に及ぼすロイシン投与の効果

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 10 件)

1. Han G, Yang H, Bungo T, Ikeda H, Wang Y, Nguyen LTN, Elthan HM, Furuse M and Chowdhury VS. *In ovo* L-leucine administration stimulates lipid metabolisms in heat-exposed male, but not female, chicks to afford thermotolerance. *Journal of Thermal Biology*, 71, 2018, 74–82. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.10.020. 査読有

2. Eltahan HM, Bahry MA, Yang H, Han G, Nguyen LTN, Ikeda H, Ali MN, Amber KA, Furuse M and Chowdhury VS. Central NPY-Y5 sub-receptor partially functions as a mediator of NPY-induced hypothermia and affords thermotolerance in heat-exposed fasted chicks. *Physiological Reports*, 5, 2017, e13511. doi: 10.14814/phy2.13511. 査読有

3. Chowdhury VS, Han G, Bahry MA, Tran PV, Do PH, Yang H and Furuse M. L-Citrulline acts as potential hypothermic agent to afford thermotolerance in chicks. *Journal of Thermal Biology*, 69, 2017, 163–170. doi: 10.1016/j.jtherbio.2017.07.007. 査読有

4. Do PH, Tran PV, Bahry MA, Yang H, Han G, Tsuchiya A, Asami Y, Furuse M and Chowdhury VS. Oral administration of a medium containing both D-aspartate-producing live bacteria and D-aspartate reduces rectal temperature in chicks. *British Poultry Science*, 58, 2017, 569–577. doi: 10.1080/00071668.2017.1335858. 査読有

5. Bahry MA, Chowdhury VS, Yang H, Tran PV, Do PH, Han G, Ikeda H, Cockrem JF and Furuse M. Central administration of neuropeptide Y differentially regulates monoamines and corticosterone in heat-exposed fed and fasted chicks. *Neuropeptides*, 62, 2017, 93–100. doi: 10.1016/j.npep.2016.11.008. 査読有

6. Han G, Yang H, Bahry MA, Tran PV, Do PH, Ikeda H, Furuse M and Chowdhury VS. L-Leucine acts as a potential agent in reducing body temperature at hatching and affords thermotolerance in broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 204, 2017, 48–56. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.10.013. 査読有

7. Yang H, Chowdhury VS, Bahry MA, Tran PV, Do PH, Han G, Zhang R, Tagashira H, Tsubata M and Furuse M. Chronic oral administration of pine bark extract (flavangenol) attenuates brain and liver mRNA expressions of HSPs in heat-exposed chicks. *Journal of Thermal Biology*, 60, 2016, 140–148. doi: 10.1016/j.jtherbio.2016.06.014. 査読有

8. Phuong TV, Chowdhury VS, Do PH, Bahry MA, Yang H and Furuse M. L-Ornithine is a

potential acute satiety signal in the brain of neonatal chicks. *Physiology and Behavior*, 155, 2016, 141–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.12.007. 査読有

9. Chowdhury VS, Shigemura A, Erwan E, Ito K, Bahry MA, Phuong TV and Furuse M. Oral administration of L-citrulline, but not L-arginine or L-ornithine, acts as a hypothermic agent in chicks. *Journal of Poultry Science*, 52, 2015, 331–335. doi: https://doi.org/10.2141/jpsa.0150014. 査読有

10. Ito K, Bahry MA, Yang Y, Furuse M and Chowdhury VS. Acute heat stress up-regulates neuropeptide Y precursor mRNA expression and alters brain and plasma concentrations of free amino acids in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 178, 2015, 13–19. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.04.010. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 韓国鋒 楊 輝 池田裕美 豊後貴嗣 古瀬充宏, スルチードリ ビシユワジット. Different modes of L-leucine *in ovo* feeding on embryonic growth and rectal temperature in chicks. Japanese Society of Animal Science. 2018. March 28–30.

2. Eltahan HM, Han G, Yang H, Nguyen LTN, Ikeda H, Furuse M and Chowdhury VS. Central effects of sucralose and not oral injection induce thermoregulation and alteration in dopamine metabolites in the brain of chicks. Japan Poultry Science Association. 2018. March 30.

3. 韓国鋒 楊 輝 池田裕美 豊後貴嗣 古瀬充宏, スルチードリ ビシユワジット. L-Leucine *in ovo* injection stimulates lipid metabolisms and affords thermotolerance in male broiler chicks. Japanese Society of Animal Science. 2017. September 6–7.

4. Chowdhury VS. Regulation of food intake and body temperature in heat-exposed chicks. Japan Poultry Science Association (Conference Award Talk). 2017. September 5.

5. Chowdhury VS, Han G, Yang H, Ikeda H, Bungo T, and Furuse M. L-Citrulline and L-leucine-mediated thermoregulation affords thermotolerance. Japanese Society for Animal Nutrition and Metabolism. 2017. September 8.

6. Chowdhury VS, Shimizu K, Han G, Nguyen LTN, Yang H, Furuse M, and Bungo T. L-Citrulline acts as a potential hypothermic agent in broilers. Japan Poultry Science Association. 2017. March 30.

7. Bahry MA, Chowdhury VS, Yang H, Tran PV, Do PH, Han G and Furuse M. Central administration of neuropeptide Y acts as an anti-stress factor in heat exposed chicks. 17th AAAP Animal Science Congress, 2016. August 23.

8. Chowdhury VS and Furuse M. Acute heat-stress induces diencephalic neuropeptide Y mRNA expression and alters brain concentrations of free amino acids in chicks. The 9th Int'l Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2015. August 25.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

豊後 貴嗣 (BUNGO TAKASHI)
広島大学・生物圏科学研究科・教授
研究者番号：40325361