

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850188

研究課題名(和文) 初期成長に及ぼす脳内制御因子の探索

研究課題名(英文) Screening of initial growth factor in chicken brain chimeras.

## 研究代表者

白石 純一 (SHIRAIISHI, JUN-ICHI)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：50632345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳原基移植技術を用いて初期発育における脳と末梢器官の代謝情報ネットワークの関連性について調査することを目的とした。具体的には初期の成長速度および代謝制御機構が大きく異なる商用鶏(BroilerおよびLayer)を用いて、本来の脳と末梢器官の組み合わせと異なる脳キメラ鶏を作出し、その代償的代謝制御因子の抽出を試みた。誕生した脳キメラ鶏は、脳と末梢器官の組み合わせによって幼雛期の摂食量、増体量、代謝器官重量および代謝調節因子がそれぞれで異なることが明らかとなった。さらに、視床下部においては、糖代謝、アミノ酸代謝、免疫応答に関連する因子などが代償的に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of present study was to investigate the functional crosstalk energy homeostasis between brain and peripheral tissues in neonatal chicks. Specifically, we attempted to create brain chimera chickens using two type of commercial chicken (broiler and layer) which varied in early growth rate and energy metabolism. Brain graft technique revealed that the brain chimera chick exhibited reciprocal growth index, such as feed intake, body weight gain and tissue weight. Furthermore, expression of genes involved in hypothalamic carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and immune response were also counter-regulated by brain grafting. These data suggest that brain graft technique is suitable for analysis of crosstalk between brain and peripheral energy metabolism in neonatal chicks.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ニワトリ 初期成長 摂食行動 エネルギー代謝 脳 移植

### 1. 研究開始当初の背景

動物において摂食・エネルギー代謝の調節は、液性および神経性情報によって脳と末梢とがクロストークすることにより行なわれている。とりわけインスリンは、末梢から中枢への液性情報として重要な役割を担っていることが知られており、鳥類においても、その重要性が示唆されている (Shiraishi et al., 2011)。すなわち、成長速度が顕著に異なる鶏種間でその中枢あるいは末梢の局所的なインスリン介在性代謝調節機構の詳細が異なることは、各部位のシグナリング機構とそれらの関係が、脳と末梢のクロストークにおいて重要であることを示すものであり、動物の摂食・エネルギー代謝調節の総体を理解する上では重要な情報システムネットワークである。

### 2. 研究の目的

本研究では初期成長期における脳と末梢の代謝調節ネットワークシステムについて、成長速度が顕著に異なる鶏同士の脳と末梢の組み合わせが異なる脳キメラ鶏を作出し、成長指標 (摂食量、増体量、代謝器官重量) の比較、代償的脳機能についてオミクス解析を用いて検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

肉用鶏 (Broiler: チャンキー) および産卵鶏 (Layer: もみじ、さくら) を本研究で供試した。孵化場から入手したそれぞれの授精卵を温度 38℃、湿度 70% に設定された孵卵器にセットし、Stage 10 (Hamburger and Hamilton, 1951) まで発生を進めた。実体顕微鏡下で観察しながら胚を可視化し、双方の脳原基 (前脳) を取り出し、相同位置に入れ替えて移植した。施術後、卵殻にあけた穴にテープを張り、孵卵器に戻し、発生を再開させた。同鶏種間においても同様の処置を施したものをコントロール区とした。

孵化に成功した脳キメラ鶏は環境温度 32.1℃、24 時間照明、自由摂食 (CP21%、ME2, 950Kcal/kg) 条件下で孵化後 11 日 (Post hatch 11: P11) まで飼養した。試験期間中のヒナの体重、摂食量を計測し、飼料効率も算出した。試験終了時はヒナを断頭屠殺した後、主要代謝器官 (全脳、心臓、肝臓、脾臓、大腿筋、浅胸筋) を採取し、それぞれの重量を測定した。

採取した終脳および浅胸筋から DNA を抽出した後、chromobox-helicase-DNA-binding (CHD) の性特異的 DNA 領域を PCR で増幅し、誕生した脳キメラ鶏の脳と末梢の性判別を行った。そして、脳と末梢がともに雄を示す脳キメラ鶏を選別し、それらのサンプルの視床下部から Total RNA 抽出を行い、RNA 濃度および純度を確認した後、アジレントテクノロジー社製の Chicken DNA マイクロアレイ (Chicken V2) を用いて各脳キメラ鶏の視床下部に発現する遺伝子を網羅的に半定量した。さらに、採取した浅胸筋および大腿筋における熱産生関連因子 (avUCP: avian uncoupling protein、TFAM: mitochondrial transcription factor A) および筋タンパク質制御因子 (Atrogin-1) の mRNA 発現量を quantitative PCR 法によって相対定量し、比較した。

### 4. 研究成果

本試験で脳原基移植を施した 1152 個の移植卵のうち孵化した脳キメラ鶏は、41 羽であった (移植成功率 = 3.5%)。誕生した 4 種の脳キメラ鶏 BB (脳 Broiler × 末梢 Broiler)、LB (脳 Layer × 末梢 Broiler)、BL (脳 Broiler × 末梢 Layer)、LL (脳 Layer × 末梢 Layer) の成長指標については、脳の違い (BB-LB 間および LL-BL 間) によって比較した。その結果、孵化後 11 日間の LL 増体重は BL のものより低く ( $P < 0.05$ )、BB のものは LB のものより高かった ( $P <$

0.01)。摂食量については、LL-BL間で有意な差は示さなかった( $P>0.1$ )ものの、BB-LB間ではBBのものが有意に高かった( $P<0.01$ )。代謝器官重量についてみると、LL-BL間では肝臓が、BB-BL間では浅胸筋、心臓、腓臓、大腿筋重量に差が認められた( $P<0.05$ )。

骨格筋における代謝関連因子の mRNA 発現状態について検討したところ、LL-BLの大腿筋においては、avUCP および Atrogin-1 の発現量は、LLのものに比べてBLのものが低くなる傾向( $P=0.1$ )であった。

次に、マイクロアレイ解析を用いて脳キメラ鶏の視床下部領域に発現する遺伝子群の推定を試みた。その結果、LLに比べてBBで遺伝子発現シグナルが2倍以上あったものは321遺伝子であったのに対し、1/2以上のものは295遺伝子であった。遺伝子オントロジー解析の結果、それらの遺伝子は

腸管免疫機構における応答因子、ヒスチジン、チロシン、トリプトファンなど中枢神経においても重要なアミノ酸代謝経路、フルクトース、マンノースなどの糖類に關与する代謝経路に關連する遺伝子群であった。これら遺伝子群のなかには、BLあるいはLB脳キメラで特徴的な遺伝子発現パターンを示すものもあった。

## まとめ

脳原基移植技術を用いた幼雛期における代謝調節機構の解析は移植成功率の低さが課題となるものの、誕生した脳キメラ鶏の初期成長は本来の脳と体の組み合わせが異なることによって代償的に制御され、視床下部における発現遺伝子群が深く關与している可能性が示唆された。

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 7件)

1. Maekawa F, Sakurai M, Yamashita Y, Tanaka K, Haraguchi S, Yamamoto K, Tsutsui K, Yoshioka H, Murakami S, Tadano R, Goto T, Shiraishi J, Tomonari K, Oka T, Ohara K, Maeda T, Bungo T, Tsudzuki M, Ohki-Hamazaki H. (2013) A genetically female brain is required for a regular reproductive cycle in chicken brain chimeras. Nature Communications, 4: article number: 1372, doi: 10.1038/ncomms2372.
2. Takawaki M, Tanizawa H, Nakasai E, Shiraishi J, Kawakami S, Oka T, Tsudzuki M and Bungo T. (2013) Comparison of Plasma Amino Acid Levels of Two Breeds of Japanese Native Chicken and a Commercial Layer Line. International Journal of Poultry Science 12 (2): 90-93, , doi: 10.3923/ijps.2013.90.93
3. Tanizawa H, Shiraishi J, Kawakami S, Tsudzuki M and Bungo T. (2014) Effect of Short, Early Thermal Conditioning on Physiological and Behavioral Responses to Acute Heat Exposure in Chicks. The Journal of Poultry Science. 51(1) 80-86 doi: <http://doi.org/10.2141/jpsa.0130040>
4. Oka T, Tadano R, Goto T, Shiraishi J, Osman S.A.M, Nagasaka N, Bungo T, Maeda T, Nishibori M, Umino T, Tsudzuki M. (2014) Time-Dependent Changes in the Genetic Diversity and Structure of the Onagadori Breed of Chickens Based on Microsatellite DNA Polymorphisms. The Journal of Poultry Science. 51(3): 262-269, doi:

<http://doi.org/10.2141/jpsa.0130199>

5. Goto T, **Shiraishi J**, Bungo T, Tsudzuki M. (2015) Characteristics of Egg-related Traits in the Onagadori (Japanese Extremely Long Tail) Breed of Chickens. The Journal of Poultry Science. 52(2): 81-87, doi:  
<http://doi.org/10.2141/jpsa.0140109>
6. **白石純一**. 幼雛期のインスリンシグナルとエネルギー代謝調節に関する研究. (2014). 栄養生理研究会報. 58: 1-8,
7. **白石純一**. 幼雛期における節食行動調節と中枢インスリンシグナル. (2012) *Société Franco-Japonaise de Biologie*. 52:103-113,

〔学会発表〕(計 26 件)

1. **白石純一**, 杉野利久, 豊後貴嗣, 太田能之, 浜崎浩子. 幼雛期の摂食・エネルギー代謝調節におけるグルコース感受性に関する研究. 第 37 回日本鳥類内分泌研究会. 熊本アソシエート. (熊本県阿蘇郡南阿蘇村) (2013.11.22.)
2. 太田能之・長谷川悦子・**白石純一**. 草食性ハタネズミのアミノ酸要求量の推定. 日本畜産学会第 117 回大会. 新潟大学. (新潟県新潟市) (2013.9.9.)
3. 長谷川悦子・**白石純一**・太田能之. 肉食性鳥類のための排泄クレアチニンを指標としたアミノ酸要求量推定法の検討. 日本畜産学会第 117 回大会. 新潟大学. (新潟県新潟市) (2013.9.9.)
4. 太田能之・**白石純一**・早川岳彦. 餌付け飼料への炭水化物分解酵素剤添加がニワトリ初生ヒナの成

長に及ぼす影響. 家禽学会 2014 年度秋季大会. 新潟大学. (新潟県新潟市) (2013.9.9.)

5. 友永省三, 太田能之, **白石純一**. ニワトリヒナの鶏種と性に関連する血漿中低分子代謝物質の探索. 日本畜産学会第 118 回大会. つくば国際会議場 (茨城県つくば市) (2014.3.28.)
6. 石井春加, 井上直俊, 君塚万里恵, **白石純一**, 太田能之. In ovo アミノ酸投与がプロイラーの成長およびインスリン様成長因子受容体遺伝子発現に及ぼす影響. 日本家禽学会 2014 年度春季大会. つくば国際会議場 (茨城県つくば市) (2014.3.28.)
7. 君塚万里恵, 石井春加, **白石純一**, 太田能之. アミノ酸投与がプロイラー胚の血糖調節機構に及ぼす影響. 日本家禽学会 2014 年度春季大会. 筑波大学. (茨城県つくば市) (2014.3.29.)
8. 太田能之, 石井春加, 君塚万里恵, **白石純一**. グルコースの添加が in ovo 分枝アミノ酸投与時のプロイラーの成長に及ぼす影響. 日本家禽学会 2014 年度春季大会. 日本家禽学会 2014 年度春季大会. 筑波大学. (茨城県つくば市) (2014.3.29.)
9. 西川薫, **白石純一**, 巽俊彰, 市川隆久, 太田能之. 「みえ特産鶏」への in ovo アミノ酸投与がその後の発育に及ぼす影響. 日本家禽学会 2014 年度春季大会. 筑波大学. (茨城県つくば市) (2014.3.29.)
10. **白石純一**. 坂田啓晃. 友永省三. 太田能之. もみじ種とチャンキー種

- における初期発育ならびにインスリン感受性の比較. 日本家禽学会 2014 年度春季大会 .筑波大学.(茨城県つくば市)(2014.3.29.)
11. **白石純一**. 幼雛期のインスリンシグナルとエネルギー代謝調節に関する研究. 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) (2014.5.17.)
12. **白石純一**. 森脇唯之. 太田能之. 幼雛期の成長に伴うグリコーゲン代謝特性に関する研究. 日仏生物学会第 180 回例会. 日仏会館.(東京都目黒区)(2014.6.7.)
13. 松尾康平. 矢野純司. 太田能之. **白石純一**. 友永省三. もみじ種とチャンキー種における初期発育と血漿中遊離アミノ酸濃度の経日変化. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
14. 西川薫. **白石純一**. 巽俊彰. 市川隆久. 太田能之. 初期栄養操作が「みえ特産鶏」の免疫形成ならびに生産能に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市)(2015.3.30.)
15. 太田能之. 内田栞. **白石純一**. *In ovo* アミノ酸投与がニワトリ初生ヒナの盲腸内細菌定着に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
16. 石井春加. 江口晴基. 西川 薫. 市川隆久. **白石純一**. 太田能之. *in ovo* アミノ酸投与鶏の成長および胸筋 IGF-1 レセプター mRNA 発現量に影響する要因の検討. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
17. 友永省三. 松尾康平. 太田能之. **白石純一**. もみじとチャンキーにおける幼雛期の鶏種差に関連する血漿中低分子代謝物質の探索. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
18. **白石純一**. 三上拓海. 友永省三. 浜崎浩子. 太田能之. 脳原基移植操作が「もみじ」と「チャンキー」の器官重量に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
19. 太田能之. 石井春加. 曾根直弥. **白石純一**. ロイシンおよびグルコースの *in ovo* 投与時がブロイラーの成長と胚の筋肉タンパク質分解に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度春季大会. 宇都宮大学. (栃木県宇都宮市) (2015.3.30.)
20. **白石純一**. 嶋田陽花里. 中尾駿介. 塚原克己. 太田能之. 第 3 脳室へのガイドカニューレ処置が幼雛期の成長指標に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度秋季大会. 酪農学園大学. (北海道江別市) (2015.9.10.)
21. 太田能之. 石井春加. 桜井詩万. **白石純一**. ロイシンおよびグルコースの *in ovo* 投与がブロイラーの消化管成長とアミノ酸有効率に及ぼす影響. 日本家禽学会 2015 年度秋季大会. 酪農学園大学. (北海道江別市) (2015.9.10.)
22. 嶋田陽花里. 太田能之. **白石純一**. 第 3 脳室への 2-deoxy-glucose 投

- 与がニワトリヒナの神経活動マーカー遺伝子発現および摂食行動に及ぼす影響. 日本家禽学会 2016 年度春季大会. 日本獣医生命科学大学. (東京都武蔵野市) 2016.3.30.)
23. 長谷川悦子, 白石純一, 太田能之. 飼料中アルギニンもしくはタンパク質含量がブロイラーヒナの排泄クレアチニン量に及ぼす影響. 日本家禽学会 2016 年度春季大会. 日本獣医生命科学大学. (東京都武蔵野市)(2016.3.30.)
24. 太田能之, 桜井詩万, 白石純一. ニワトリの *in ovo* 投与栄養素の卵黄嚢機能に関連した動態. 日本家禽学会 2016 年度春季大会. 日本獣医生命科学大学. (東京都武蔵野市)(2016.3.30.)
25. 白石純一. 幼雛期における『脳』と『末梢』の代謝情報ネットワーク. 日本畜産学会第 121 回大会企画 分野別シンポジウム(栄養・飼養分野)『動物栄養と機能 - ニュートリゲノミクスとニュートリジェネティクスの応用 - 』日本畜産学会第 121 回大会. 日本獣医生命科学大学. (東京都武蔵野市) (2016.3.28.)
26. Shozo Tomonaga, Kohei Matsuo, Jun-ichi Shiraishi. Plasma levels of tryptophan and quinolinic acid in chicks. 2015 International society for Tryptophan research conference. September 16-18, 2015, at Van Andel Research Institute in Grand Rapids, Michigan (USA)

〔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  
<http://researchmap.jp/jshira>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
白石 純一 (SHIRAISHI, Jun-ichi) 日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・助教  
研究者番号: 50632345

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号:

〔図書〕(計 0 件)