

## ニワトリにおいて視床下部漏斗部に特異的発現を示す新規遺伝子の同定

岩越栄子<sup>1</sup>・橘 哲也<sup>2</sup>・谷内秀輔<sup>1</sup>・古満芽久美<sup>1</sup>・益田恵子<sup>1</sup>・浮穴和義<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 広島大学大学院総合科学研究科, 広島県東広島市鏡山 1-7-1 739-8521

<sup>2</sup> 愛媛大学農学部, 愛媛県松山市樽味 3-5-7 790-8566

我々は、ニワトリの摂食調節に関わる新規脳内因子を発見する目的で、cDNA サブトラクション法を用いて、摂食調節中枢の一つである漏斗核を含む視床下部漏斗部に高発現する遺伝子を探索した。その結果、神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードしていると推定される遺伝子の部分配列を見出した。その塩基配列は、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子としてニワトリのゲノムデータベースに登録されている配列と一致した。そこで、ニワトリ品種間での多型の存在を明らかにするために、卵用鶏と肉用鶏の脳組織から、本遺伝子の翻訳領域の全長をコードする cDNA を単離し、ゲノムデータベース上の cDNA 配列と比較した。その結果、卵用鶏では 1 アミノ酸残基の置換に相当する非同義置換が認められた。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列から、前駆体タンパク質は、シグナル配列、神経ペプチド、C 末端アミド化シグナル、プロセッシング配列、および、C 末端付加配列の構造を有することが推定された。次に、脳内での本遺伝子の mRNA 発現分布を解析したところ、視床下部漏斗部にのみ特異的に発現していることが明らかになった。初生ヒナでの視床下部漏斗部における mRNA 発現量は、卵用鶏での発現量が肉用鶏に比べ約 6 倍多かった。さらに、推定される 83 アミノ酸残基からなる神経ペプチドを大腸菌の組換えタンパク質発現系を利用して産出し、その脳室内投与がニワトリヒナの摂食行動に及ぼす影響を調べた。その結果、本神経ペプチドは卵用鶏の摂食行動を抑制するが、肉用鶏の摂食行動には有意な影響を及ぼさないことが明らかになった。本研究から、新規遺伝子の翻訳産物と推定される神経ペプチドは、家禽の摂食行動を調節する新たな脳内因子である可能性が示された。

キーワード: 摂食行動, 神経ペプチド, 卵用鶏, 肉用鶏, 視床下部

### 諸 言

肉用鶏は早期の市場提供の目的から顕著な摂食亢進・成長を示す品種として改良がなされてきた (Barbato, 1994)。しかしながら、肉用鶏における摂食亢進の機構については不明な点が多い。これまでに、哺乳動物の摂食行動は、摂食行動を調節する生理活性物質 (摂食調節因子) によって制御されている (Schwartz *et al.*, 2000) ことから、ニワトリにおいても、哺乳動物で発見された摂食調節因子を中心に多くの研究が行われてきた。その結果、いくつかの摂食調節因子は、ニワトリにおいては哺乳動物とは異なる作用を示すことが報告されている。例えば、哺乳動物で摂食促進効果を示す神経ペプチドのうち、メラニン凝集ホルモンやオレキシンはニワトリにおいては摂食を促進せず、グレリンは逆に摂食を抑制させる (Furuse *et al.*, 1999, 2001; Ando *et al.*, 2000; Kaiya *et al.*, 2009)。一方、哺乳動物で摂食抑制効果を示す神経ペプチドであるプロラクチン放出ペプチドは、ニワトリでは摂食促進効果

を示す (Tachibana *et al.*, 2004, 2005b, 2011)。また、哺乳動物では末梢から分泌されるレプチン、インスリン、グレリンなどによる摂食制御機構の存在が知られているが、ニワトリのゲノムデータベース上にレプチンの塩基配列が存在しないことから、ニワトリは進化の過程でレプチン遺伝子を失った可能性が示されている (Pitel *et al.*, 2010)。これらのことから、鳥類の摂食調節機構の一部は哺乳類のそれとは異なる可能性が高く、鳥類特異的な摂食調節機構が存在する可能性も否定できない。

最近、著者らは、ウズラで最初に発見された視床下部ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) を卵用鶏ヒナの脳室内に投与すると摂食促進効果が見られることを見出した (Tachibana *et al.*, 2005a, 2008)。さらに最近、GnIH の C 末端 RFamide 構造と同様の配列を示す神経ペプチド 26RFa をウズラおよびニワトリの視床下部で同定し、その脳室内投与が、肉用鶏ヒナでは摂食促進効果を示すが、卵用鶏では同様の効果を示さないことを見出した (Ukena *et al.*, 2010)。これらのことから、哺乳類においては報告されていない、種々の神経ペプチドが関与する鳥類特異的な摂食調節機構の存在が示唆される。

鳥類においては、外側視床下部や視床下部漏斗核が摂食調節中枢であると考えられている (Boswell *et al.*, 1998; Kuenzel *et al.*, 1999; Phillips-Singh *et al.*, 2003)。その中でも視床下部漏斗核は、哺乳類の摂食調節中枢である弓状核に相当し、摂食調節因子であるニューロペプチド Y (NPY)、アグチ関連ペプチド (AgRP)、お

2012 年 11 月 26 日受付, 2012 年 12 月 19 日受理

連絡者: 浮穴和義

〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1

広島大学大学院総合科学研究科

Tel: 082-424-6571

Fax: 082-424-0759

E-mail: ukena@hiroshima-u.ac.jp

よび、メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) の前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン (POMC) を産生する神経細胞群を含むことから、鳥類の摂食調節において重要な中枢の一つであるとされている (Boswell *et al.*, 1998; Kuenzel *et al.*, 1999; Phillips-Singh *et al.*, 2003)。

本研究では、ニワトリの摂食調節機構を明らかにするための一環として、鳥類特異的な新規の摂食調節機構を明らかにする目的で、視床下部漏斗部における未知の脳内摂食調節因子の探索を行った。

## 材料と方法

### 1. 供試動物

本研究で用いた動物の取り扱い等については、広島大学動物実験指針に従った。供試動物として肉用鶏 (白色ブリマスロックと白色コーニッシュの交配種; チャンキー, 福田種鶏場および森野卵場) と卵用鶏 (白色レグホーン; ジュリア, ゲン・コーポレーションおよび新延孵化場) の雄ヒナ (生後1日から1週間) を用いた。

### 2. cDNA サブトラクション法による遺伝子の同定

摂食調節中枢を含む脳領域である視床下部漏斗部に高い発現を示す遺伝子を同定する目的で、小脳を対照組織に用いた cDNA サブトラクション法を行った。孵化後1日齢の肉用鶏のヒナ 80羽から視床下部漏斗部を、2羽から小脳を取り出し、RNA later (アンピオン) 中に保存した。総 RNA は TRIzol 試薬 (インビトロジェン) により抽出し、Oligotex-dT30 (Super) mRNA purification Kit (タカラバイオ) を用いて mRNA を精製した。その後、PCR-Select cDNA Subtraction Kit (クロンテック) のマニュアルに従って視床下部漏斗部に高い発現を示す cDNA をサブトラクション PCR 法により濃縮した。濃縮した PCR 産物を pGEM-T Easy ベクターに挿入し、大腸菌でのサブクローニングを行った。1,000 個のコロニー PCR 産物について PCR-Select Differential Screening Kit (クロンテック) を用いてスクリーニングを行い、596 個のクローンについてその塩基配列を解析した。得られた cDNA の塩基配列を National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA (NCBI) における Genbank 配列データベースに対するニワトリの Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を用いて解析した。これにより、機能既知のタンパク質をコードする遺伝子を除外した 20 遺伝子を選出した。この機能未知遺伝子 20 種類についてニワトリの視床下部漏斗部にのみ特異的に発現している遺伝子を同定するために、リアルタイム PCR 解析による二次スクリーニングを行った。前述の視床下部漏斗部と小脳と同様に、大脳、間脳および中脳から総 RNA を抽出し、ReverTra Ace (東洋紡) を用いて逆転写し、cDNA を得た。20 種類の遺伝子に特異的なプライマーを設計し、Fast SYBR Green Master Mix (アプライドバイオシステムズ) を用いてリアルタイム PCR 装置 (Step One Real-Time PCR System; アプライドバイオシステムズ) により PCR 増幅を行った。ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -アクチンを内在性コントロール遺伝子とした  $\Delta\Delta Ct$  法による相対定量法で各 mRNA 発現量の解析を行い、視床下部漏斗部に特異的な発現を示す遺伝子を同定した。

### 3. 肉用鶏と卵用鶏における塩基配列の決定と発現解析

2で同定した遺伝子について、ニワトリのデータベース登録の配列情報からプライマーを設計し、肉用鶏と卵用鶏の視床下部漏斗部の cDNA を用いて翻訳領域の全長をコードする cDNA を PCR 法により増幅し、増幅産物の塩基配列を解析した。さらに、大脳、間脳、中脳、小脳並びに視床下部漏斗部での発現量および肉用鶏と卵用鶏の視床下部漏斗部での発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。リアルタイム PCR は上記 2 と同様に行った。

### 4. 大腸菌による神経ペプチドの調製

3で決定した塩基配列から、2で同定された cDNA は神経ペプチドの前駆体タンパク質をコードしていることが予測されたため、その生理機能を解析するために大腸菌の発現系を用いて神経ペプチドを調製した。

まず、視床下部漏斗部から調製した cDNA を鋳型とし、3で推定された神経ペプチドをコードしている領域を PCR 法により増幅した。得られた増幅産物を精製用のヒスチジン (His) タグと可溶性促進のためのトリガーファクター (TF) をコードする pCold TF DNA 発現ベクター (タカラバイオ) へ挿入し、プラスミド DNA を得た。得られたプラスミド DNA を組換えタンパク質発現用の大腸菌である BL21 Star (DE3) pLysS 株 (インビトロジェン) に導入し、15°C で 24 時間培養後、回収した大腸菌ペレットから BugBuster Reagent (ノバジェン) と Benzonase (ノバジェン) を用い、タンパク質を抽出した。TALON レジン (クロンテック) を用いて His タグを含む融合タンパク質を金属アフィニティー精製後、Factor Xa プロテアーゼ (NEB) を用いて TF を切断し、80% 冷アセトンにより余分なタンパク質を沈殿除去した。上清を濃縮し、逆相 HPLC カラム (CN-80Ts, 東ソー) により神経ペプチドを純化した。

次に、Cys 残基の架橋を行うために、フェリシアン化カリウム溶液中での酸化を行った。また、目的の神経ペプチドの C 末端はアミド化されていると予測されるが、大腸菌中ではアミド化反応が起こらないため、ペプチジルグリシン  $\alpha$ -アミド化酵素 (和光純薬工業) を用いて C 末端のアミド化を行った。即ち、神経ペプチド発現の際、本酵素反応に必要なアミド化ドナーである Gly 残基を C 末端に予め付加しておき、アミド化酵素を用いて 37°C で一晚、アミド化反応を行った。この C 末端の Gly 残基は、発現ベクターへ塩基配列を付加することにより行った。本酵素反応による Gly 残基除去とアミド化に基づく分子量変化は、質量分析により確認した。最終的に逆相 HPLC カラム (CN-80Ts) にて神経ペプチドを純化し、凍結乾燥品を得た。

### 5. ニワトリヒナの摂食行動解析

初生ヒナを購入後、室温 30°C、24 時間照明下で市販試料 (豊橋飼料株式会社, 愛知, 粗蛋白質含量 24%, 代謝エネルギー 3,050 kcal/kg) および水を不断給与して飼育した。投与前日にヒナを個別ケージに 1 羽ずつ分けて実験環境に馴化させた。また、投与直前にヒナの体重を測定し、各処理間の平均体重が等しくなるように群分けした。Davis *et al.* (1979) の方法に従い、脳定位固定装置にてヒナの頭部を保持し、100  $\mu$ l マイクロシリンジを用いて脳室内投与を行った。実験群には 4 にて調製した神経ペプチドを、

コントロール群には溶媒である 10% Dimethyl sulfoxide を含んだリン酸緩衝食塩水を 10 $\mu$ l 投与した。投与後, 30, 60 および 90 分後に摂食量を測定した。なお, 脳室内投与時に投与液に青色の色素であるエバンスブルーを混ぜておき, 実験終了後に脳室内の色素の有無を確認し, 色素が注入されていない個体はデータから排除した。

### 6. 統計処理

摂食量に関するデータは, 各時間で t 検定を用いて統計処理した。有意水準を 5% として有意差を求めた。なお, 本研究の数値データは全て平均値±標準誤差で示した。

## 結 果

### 1. 視床下部漏斗部に特異的発現を示す遺伝子の同定

cDNA サブトラクション法により, 視床下部漏斗部に特異的に発現している遺伝子を同定した。この遺伝子は, アクセション番号 XM\_429770 として GenBank に登録されている機能未知タンパク質をコードする遺伝子であることが明らかとなった。同定した遺伝子の翻訳領域は 408 塩基であり, 135 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードすることが推定された (図 1A)。また, このタンパク質は, シグナル配列 (24 アミノ酸残基), 神経ペプチド (83 アミノ酸残基), C 末端アミド化シグナル (Gly 残基), プロセッシング配列 (Arg-Arg 残基), および, C 末端付加配列 (25 アミノ酸残基) の構造を有する神経ペプチドの前駆体タンパク質であることが推定された (図 1B)。

### 2. 同定した遺伝子の発現解析

同定した遺伝子の cDNA 配列を増幅し, その塩基配列の解析を行い, ニワトリのゲノムデータベース (セキショクヤケイ), 肉用鶏, および卵用鶏の間で多型の存在を解析した結果, 肉用鶏とセキショクヤケイの塩基配列は完全に一致したが, 卵用鶏では 288 番目の塩基が C→T へ, 337 番目の塩基が G→A へ, 366 番目の塩基が C→A へ置換していた。この 337 番目の塩基の違いにより, 前駆体タンパク質中の 113 番目のアミノ酸残基が Val から Ile へ置換していた。このアミノ酸は C 末端付加配列部分に存在するものであることから, 神経ペプチドのアミノ酸配列はセキショクヤケイ, 肉用鶏, および卵用鶏の間で一致することが示された。

脳内での本遺伝子 mRNA 発現部位の解析結果から, 肉用鶏および卵用鶏共に, 視床下部漏斗部で特異的に本遺伝子の mRNA が発現していることが明らかになった (図 2)。また, 孵化後 1 日齢で給餌していない状態における肉用鶏と卵用鶏の視床下部漏斗部での mRNA 発現量を比較した結果, 肉用鶏に比べ, 卵用鶏において, 約 5.7 倍多く発現していることが明らかとなった (肉用鶏 1 $\pm$ 0.2, 卵用鶏 5.7 $\pm$ 1.8,  $P < 0.05$ )。

### 3. 生理機能解析用の神経ペプチドの調製

大腸菌の発現系を用いて, C 末端がアミド化し, 内部にジスルフィド結合を形成した神経ペプチドを調製し, 逆相 HPLC により 95% 以上に純化した。大腸菌の培養液 1 リットル当たり, 約 2 mg の神経ペプチドを得た。

### 4. ニワトリヒナの摂食行動への神経ペプチドの影響

本神経ペプチドの脳室内投与は, 卵用鶏では, コントロール群



図 1. 視床下部漏斗部で特異的に発現する遺伝子がコードするアミノ酸配列および前駆体タンパク質の構造  
135 アミノ酸残基からなる前駆体タンパク質のアミノ酸配列を一文字表記で示す (A)。1-24 番目がシグナル配列 (波線), 25-107 番目が神経ペプチド (下線), アミド化シグナルである Gly 残基, プロセッシング配列である塩基性アミノ酸対, および, C 末側付加配列となっている。B は前駆体タンパク質の模式図を示している。113 番目のアミノ酸残基は肉用鶏では Val (二重下線) であったが, 卵用鶏では Ile をコードする塩基に置換していた。

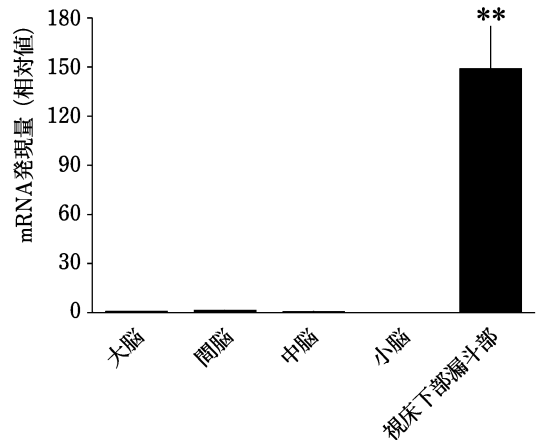


図 2. 肉用鶏の各脳領域における mRNA 発現量の解析  
大脳, 間脳, 中脳, 小脳, および, 視床下部漏斗部から調製した cDNA を鋳型とし, リアルタイム PCR 解析を行った。大脳の発現量を 1 とした相対値として示した。n=5, \*\* $P < 0.01$

と比較し, 投与後 60 分および 90 分の累積摂食量を有意に減少させた (図 3A)。一方, 肉用鶏では, 本神経ペプチド投与による有意な変化は認められなかった (図 3B)。

## 考 察

離巢性を示す家禽のヒナは, 生存のために孵化後速やかに摂食行動を開始する。特に肉用鶏は急成長を示す品種として改良されており, 顕著な摂食行動の亢進を示す。家禽の摂食調節機構を解



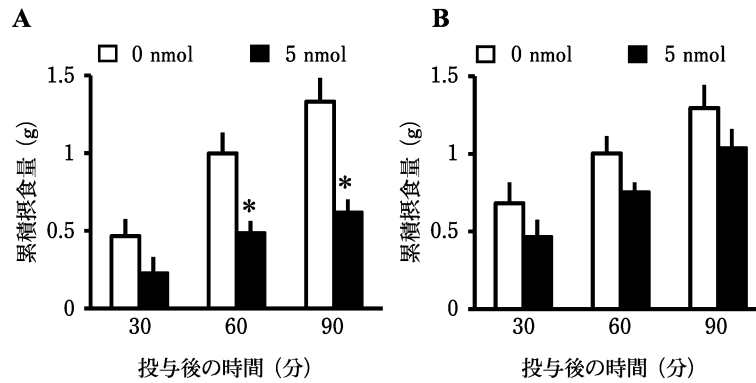


図 3. 卵用鶏および肉用鶏における神経ペプチドの脳室内投与が摂食行動に及ぼす影響  
 神経ペプチドの卵用鶏への脳室内投与は、投与後 60 および 90 分の累積摂食量を有意に減少させた (A)。一方、神経ペプチドの肉用鶏への脳室内投与は、有意な変化を示さなかった (B)。n=7~11, \*P<0.05

析する研究は数多く報告されている (Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007; Yuan *et al.*, 2009) が、その詳細は未だ明らかにされていない。効率的な家禽育種の観点からも摂食行動の分子メカニズムの理解は必要である。そこで、著者らは、新規の摂食調節因子を発見し、それに基づき家禽の摂食調節機構を解明すべく、本研究を行った。まず、鳥類の摂食中枢の一つである視床下部漏斗部に特異的に発現する遺伝子を同定するために、cDNA サブトラクション法を用い、機能未知の遺伝子を見出した。さらに、本遺伝子の翻訳産物である前駆体タンパク質について、シグナル配列の有無を推定する解析ソフト (SignalP 3.0) で調べた結果、シグナル配列が 24 アミノ酸残基からなることが推定され、細胞外に分泌されるタンパク質であることが示唆された。109 と 110 番目の連続した塩基性アミノ酸対 (Arg-Arg) は、プロホルモン変換酵素による切断部位であり、その 1 つ前の 108 番目の Gly 残基は 107 番目の Met 残基をアミド化するシグナルと推定された。また、43 番目と 99 番目の Cys 残基間でジスルフィド結合が形成されると推定された。これらのことから、本遺伝子は、ジスルフィド結合を形成し、C 末端がアミド化された 83 アミノ酸残基の神経ペプチドをコードすることが示唆された。

本遺伝子の翻訳産物である神経ペプチドの生理機能を解明するため、神経ペプチドを大腸菌発現系により調製し、内部の Cys 残基の架橋と C 末端アミド化処理を行った。このジスルフィド結合の架橋時に、2 本のペプチド鎖が連結したダイマーは検出されなかったことから、生体内でも分子内の架橋のみが生じている可能性が高い。今後、視床下部漏斗部で合成されている神経ペプチドを抽出し、その構造解析を行う必要がある。

肉用鶏および卵用鶏のヒナの脳室内に神経ペプチドを投与し、摂食量の変化を調べた結果、卵用鶏においてのみ、摂食量の有意な減少が見られた。また、卵用鶏よりも肉用鶏の視床下部漏斗部において本遺伝子の mRNA 発現量が少なかったことから、肉用鶏における摂食行動の亢進に、本遺伝子の発現量の低下が関与する可能性が示された。今後は、今回用いた肉用鶏の白色ロック・コーニッシュや卵用鶏の白色レグホーン以外の品種でも解析を進めることによって、品種毎における神経ペプチドの効果の違いを

明らかにする必要がある。また、本神経ペプチドの受容体を同定し、今回用いた肉用鶏と卵用鶏におけるその受容体の発現量やリガンドとの結合活性の違い等について明らかにすることによって、本研究において認められた摂食抑制効果の違いの原因を明らかにできる可能性もある。

今回の研究と同様に、肉用鶏と卵用鶏で摂食調節効果が異なるペプチドが幾つか報告されている (Tachibana *et al.*, 2001a, 2001b; Ukena *et al.*, 2010)。例えば、哺乳動物において摂食亢進ペプチドとして知られている 26RFa は、肉用鶏の摂食量を増加させるが、卵用鶏では同様の効果は認められない (Ukena *et al.*, 2010)。また、摂食抑制効果を示す副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンおよびグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、肉用鶏では卵用鶏に比べ、その効果が弱いことが報告されている (Tachibana *et al.*, 2006)。さらに、アンタゴニスト投与と実験の結果から、肉用鶏と卵用鶏で内因性のペプチドの働きに相違があることが推察されるペプチドも幾つか報告されている。例えば、GLP-1 の受容体アンタゴニストであるエクセンジン (5-39) は肉用鶏では効果がないが、卵用鶏では摂食促進効果を示すことから、肉用鶏では、内因性の GLP-1 は摂食調節に重要な役割を果たしていない可能性が示唆されている (Tachibana *et al.*, 2001b)。同様に、摂食抑制効果を示す  $\alpha$ -MSH の受容体の内因性アンタゴニストである AgRP も、卵用鶏においてのみ摂食行動を促進することから、 $\alpha$ -MSH も肉用鶏の摂食調節に重要な役割を果たしていない可能性が示唆されている (Tachibana *et al.*, 2001a)。今回同定された新規ペプチドについても、肉用鶏と卵用鶏の摂食行動の相違に着目し、ペプチドの効果の相違に関与する作用機序について明らかにする必要がある。

哺乳類において鳥類の視床下部漏斗核と相同な部位である視床下部弓状核は、末梢からのレプチンの情報を受け取り、室傍核や外側視床下部へ出力することから、視床下部摂食調節機構の最上流に位置するとされている (Schwartz *et al.*, 2000)。今後は、ニワトリにおいて、視床下部漏斗部内での本神経ペプチド産生細胞の同定や、その産生ニューロンの投射する標的神経核或いは領域を明らかにすることにより、本神経ペプチドが関与する摂食調節機

構の全体像を明らかにする必要がある。

結論として、本研究では、ニワトリの視床下部漏斗部に特異的に発現する遺伝子を同定した。その翻訳産物の神経ペプチドの中核投与は、卵用鶏の摂食行動を抑制した。これらの結果から、本神経ペプチドは、家禽の摂食行動を調節する新たな脳内因子である可能性が示された。

## 謝 辞

本研究は、農業・食品産業技術総合研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター（略称 生研センター）イノベーション創出基礎的研究推進事業 若手研究者育成枠の助成により行われた。

## 引用文献

- Ando R, Bungo T, Kawakami S, Shimojo M, Masuda Y and Furuse M. Intracerebroventricular injection of mammalian motilin, melanin-concentrating hormone or galanin does not stimulate food intake in neonatal chicks. *British Poultry Science*, 41 : 508-511. 2000.
- Barbato GF. Genetic control of food intake in chickens. *Journal of Nutrition*, 124 : 1341S-1348S. 1994.
- Boswell T, Millam JR, Li Q and Dunn IC. Cellular localization of neuropeptide Y mRNA and peptide in the brain of the Japanese quail and domestic chicken. *Cell and Tissue Research*, 293 : 31-38. 1998.
- Davis JL, Masuoka DT, Gerbrandt LK, Cherkin A. Autoradiographic distribution of L-proline in chicks after intracerebral injection. *Physiology & Behavior*, 22 : 693-695. 1979.
- Furuse M, Ando R, Bungo T, Ao R, Shimojo M and Masuda Y. Intracerebroventricular injection of orexins does not stimulate food intake in neonatal chicks. *British Poultry Science*, 40 : 698-700. 1999.
- Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T and Denbow DM. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neuroscience Letters*, 301 : 123-126. 2001.
- Kaiya H, Furuse M, Miyazato M and Kangawa K. Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. *General and Comparative Endocrinology*, 163 : 33-38. 2009.
- Kuenzel WJ, Beck MM and Teruyama R. Neural sites and pathways regulating food intake in birds : a comparative analysis to mammalian systems. *Journal of Experimental Zoology*. 283 : 348-364. 1999.
- Phillips-Singh D, Li Q, Takeuchi S, Ohkubo T, Sharp PJ and Boswell T. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell and Tissue Research*, 313 : 217-225. 2003.
- Pitel F, Faraut T, Bruneau G and Monget P. Is there a leptin gene in the chicken genome? Lessons from phylogenetics, bioinformatics and genomics. *General and Comparative Endocrinology*, 167 : 1-5. 2010.
- Richards MP and Proszkowiec-Weglarz M. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poultry Science*, 86 : 1478-1490. 2007.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404 : 661-671. 2000.
- Tachibana T, Sugahara K, Ohgushi A, Ando R, Kawakami S, Yoshimatsu T and Furuse M. Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neuroscience Letters*, 305 : 131-134. 2001a.
- Tachibana T, Sugahara K, Ohgushi A, Ando R, Sashihara K, Yoshimatsu T and Furuse M. Intracerebroventricular injection of exendin (5-39) increases food intake of layer-type chicks but not broiler chicks. *Brain Research*, 915 : 234-237. 2001b.
- Tachibana T, Saito S, Tomonaga S, Takagi T, Saito ES, Nakanishi T, Koutoku T, Tsukada A, Ohkubo T, Boswell T and Furuse M. Effect of central administration of prolactin-releasing peptide on feeding in chicks. *Physiology & Behavior*, 80 : 713-719. 2004.
- Tachibana T, Sato M, Takahashi H, Ukena K, Tsutsui K and Furuse M. Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Research*, 1050 : 94-100. 2005a.
- Tachibana T, Tsukada A, Fujimoto M, Takahashi H, Ohkubo T, Boswell T and Furuse M. Comparison of mammalian prolactin-releasing peptide and Carassius RFamide for feeding behavior and prolactin secretion in chicks. *General and Comparative Endocrinology*, 144 : 264-269. 2005b.
- Tachibana T, Sato M, Oikawa D and Furuse M. Involvement of CRF on the anorexic effect of GLP-1 in layer chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 143 : 112-117. 2006.
- Tachibana T, Masuda N, Tsutsui K, Ukena K and Ueda H. The orexigenic effect of GnIH is mediated by central opioid receptors in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 150 : 21-25. 2008.
- Tachibana T, Moriyama S, Takahashi A, Tsukada A, Oda A, Takeuchi S and Sakamoto T. Isolation and characterisation of prolactin-releasing peptide in chicks and its effect on prolactin release and feeding behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 23 : 74-81. 2011.
- Ukena K, Tachibana T, Iwakoshi-Ukena E, Saito Y, Minakata H, Kawaguchi R, Osugi T, Tobari Y, Leprince J, Vaudry H and Tsutsui K. Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G protein-coupled receptor-103. *Endocrinology*, 151 : 2255-2264. 2010.
- Yuan L, Ni Y, Barth S, Wang Y, Grossmann R and Zhao R. Layer and broiler chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Research*, 1273 : 18-28. 2009.

## Identification of a Novel Gene Differentially Expressed in the Chicken Hypothalamic Infundibulum

Eiko Iwakoshi<sup>1</sup>, Tetsuya Tachibana<sup>2</sup>, Shusuke Taniuchi<sup>1</sup>, Megumi Furumitsu<sup>1</sup>,  
Keiko Masuda<sup>1</sup> and Kazuyoshi Ukena<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, 739-8521

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Ehime University, Ehime, 790-8566

In the present study, we identified a novel cDNA encoding a food intake-regulating neuropeptide in chickens. cDNA subtraction was used to identify highly expressed cDNAs in the hypothalamic infundibulum, and a cDNA was found that is listed in the genome database of the Red Junglefowl, *Gallus gallus*. Quantitative PCR analysis demonstrated specific expression of the mRNA in the hypothalamic infundibulum in the brain. The level of mRNA in layer chicks was approximately six-fold higher than that in broilers. The amino acid sequence derived from the cDNA comprised 135 amino acids, including one neuropeptide of 83 amino acids followed by a glycine amidation signal and a dibasic amino acid cleavage site. We prepared the predicted neuropeptide as a recombinant peptide by *E. coli* expression system. Intracerebroventricular injection of the neuropeptide in layer chicks suppressed feeding behavior. In contrast, food intake in broiler chicks was not affected by injection of the neuropeptide. These data provide the first evidence for the presence of the novel neuropeptide in the chicken hypothalamic infundibulum and that this neuropeptide exerts an anorexigenic activity.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, **50** : J10-J15, 2013)

**Key words** : feeding behavior, neuropeptide, layer, broiler, hypothalamus