

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14839

研究課題名(和文)ルーメン絨毛組織の分化・増殖・成長に関わる分子機序の解析と応用戦略の確立

研究課題名(英文)The analysis of molecular mechanism and the application on the differentiation, proliferation and growth of rumen papillae

研究代表者

盧 尚建 (Roh, Sanggun)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90322130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、黒毛和種牛の離乳前後のルーメン絨毛組織における形態的および機能的発達に関連する因子を同定することを目的としている。Digital differential display を用いてウシルーメン絨毛の発達に関連する候補遺伝子として、HMGCS2、AKR1C1とFABP3を同定した。さらに、離乳前後のルーメン絨毛組織に関してRNA-Seqにより遺伝子発現の変動を解析し、871個の遺伝子が変化することを確認した。IPA解析によりケトン体生成に関与する遺伝子の発現が離乳後に上昇することと、PPARが離乳後に活性化するレギュレーターである可能性が示唆された。

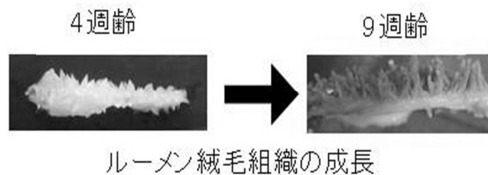
研究成果の概要(英文)：This study was aimed to identify the genes associated with the development of the rumen epithelium between suckling and weaned Japanese Black cattle. Digital differential display analysis in silico can be useful for screening candidate genes related to the rumen development, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2), aldo-keto reductase family 1, member C1-like (AKR1C1), and fatty acid binding protein 3 (FABP3) showed significant changes in the levels of gene expression in the rumen between suckling and weaned calves. In addition, RNA seq analysis that 871 genes in rumen papillae of suckling and weaned calves by RNA seq analysis were changed. IPA analysis showed that the production of ketone bodies were increased and PPAR was activated after weaning.

研究分野：動物生命科学

キーワード：ルーメン ルーメン絨毛組織 離乳

1. 研究開始当初の背景

子牛のルーメンを発達させることは非常に重要であり、丈夫なルーメンづくりとは、その容積とともに筋肉層と上皮層（第一胃乳頭・絨毛）の両方を発育させることである（図1、図2）。筋肉層は物性（硬めの粗飼料等の給与）、上皮層はVFA（揮発性脂肪酸（粗飼料と濃厚飼料等の給与））で発育すると知られている。絨毛は形も大きく数も密で、それだけ表面積が広く、結果としてVFAの吸収能力に優れている。しかし、現在、肉牛一貫経営や酪農経営など集約経営の場合、ミルクを数ヶ月与えた後に離乳する超早期母子分離による人工哺乳が増加し、主流となっている。黒毛和種牛の早期離乳は子牛には離乳によるストレス（栄養性ストレス）を与え、ルーメンの未成熟と未発達を引き起こし、哺乳期から育成期に移行が不完全となって、育成期と肥育期の成長に大きな被害と障害を生じる。しかしながら、哺乳期と離乳後にルーメン絨毛（上皮層）の分化・形成のプロセスに関する詳細な機構は明らかにされてな



い。
図1 . 4週齢と9週齢のルーメン絨毛組織

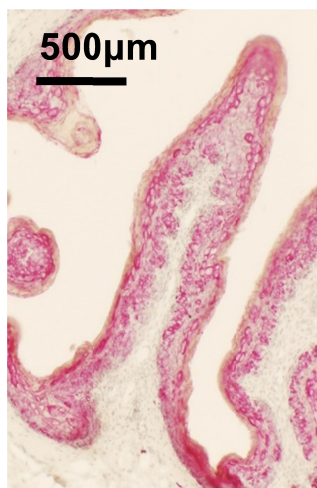


図2 . 9週齢のルーメン絨毛組織における免疫染色方法によるサイトケラチン染色（赤：サイトケラチン）

2. 研究の目的

黒毛和種牛ルーメンの離乳前後における絨毛組織の形態および機能的発達に関連する遺伝子を同定することを目的とした。

(1) Digital Differential Display (DDD) の in silico 手法を用いて第一胃上皮組織の発達に關与する候補遺伝子を同定した。

(2) 離乳前後の絨毛組織に関して次世代シー

クエンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、離乳前後のルーメン絨毛組織における遺伝子発現の変動を比較、IPAにより解析を行った。

3. 研究の方法

(1) NCBI内のUniGeneデータベースを用いてウシの第一胃、二胃、三胃、四胃およびその他組織における遺伝子のEST発現頻度を解析した。各組織のESTライブラリーより、第一胃において高い発現頻度を示す110の候補遺伝子が見つかった。黒毛和種牛（離乳前：5週齢 n=3、離乳後：15週齢 n=6）の第一、二、三、四胃の組織において、候補遺伝子中の11個（表1）の遺伝子発現をQ-RT-PCRにより解析した。

表1 . DDDにより選別された11個の遺伝子

| Gene name (Abbreviation) | GenBank No. |
|--|--------------|
| S100 calcium binding protein A12 (S100A12) | NM_174651 |
| BPI fold containing family A, member 2C (BPIFA2C) | NM_001076503 |
| Carbonic anhydrase 1-like (CA1) | XM_002692828 |
| Serpin peptidase inhibitor, clade B like (SERPINB) | NM_001105619 |
| Elongation factor 1-alpha 1-like (EEF1A1) | NM_174535 |
| Fatty acid binding protein 5 (FABP5) | NM_174315 |
| FXD domain containing ion transport regulator 3 (FXD3) | NM_001079646 |
| S100 calcium binding protein A8 (S100A8) | NM_001113725 |
| 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2) | NM_001045883 |
| Aldo-keto reductase family 1, member C1-like (AKR1C1) | NM_001206787 |
| Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (FABP3) | NM_174313 |

(2) 離乳前区（n=5、5週齢）および離乳後区（n=5、15週齢）の去勢黒毛和種牛より採取したルーメン絨毛組織からRNAを抽出し、RNA-Seqによりライブラリ作製およびシーケンス解析を行った。得られたシーケンス情報を用いて、解析ソフトのCLCにより離乳前後における遺伝子発現量の比較を行い、発現量に差があったものについてパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 11個の遺伝子の内、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGS2)、aldo-keto reductase family 1, member C1-like (AKR1C1)および fatty acid binding protein 3 (FABP3) の3つの遺伝子の発現量は、第一胃上皮組織において離乳前後で有意に異なった(図3)。以上の結果から、DDD解析は第一胃発達関連遺伝子の選別に対して有用であることが示され、第一胃上皮組織における3つの遺伝子の離乳前後での発現変動は離乳または加齢もしくはその両方を要因として引き起こされた可能性が示唆された。

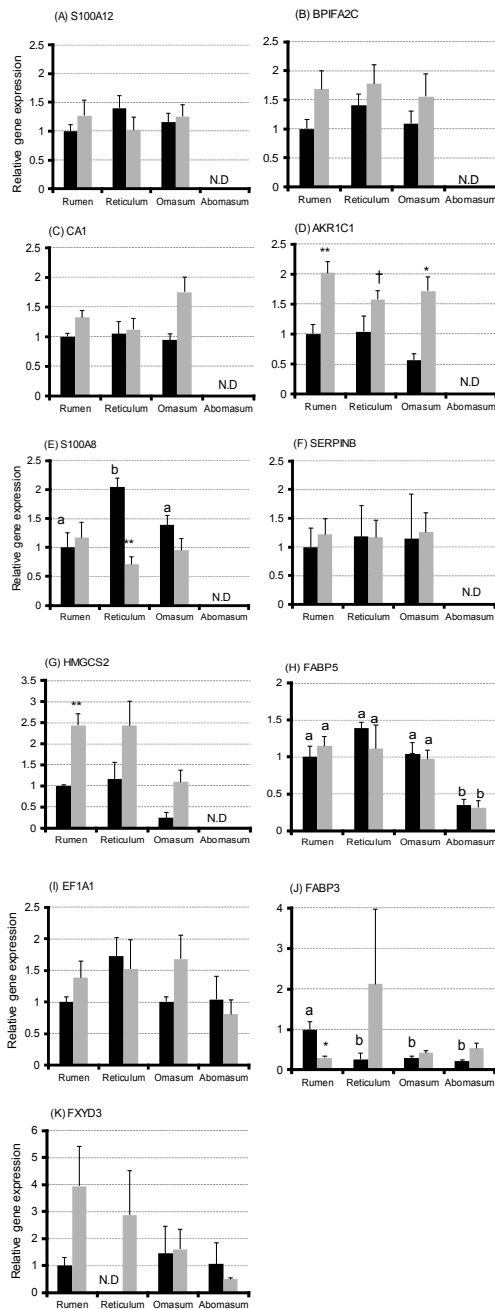


図3. 離乳前後のルーメン絨毛組織における

DDDで選別された11個の遺伝子の遺伝子発現量(: 離乳前、 : 離乳後)

(A) S100 calcium binding protein A12 (S100A12); (B) BPI fold containing family A, member 2C (BPIFA2C); (C) carbonic anhydrase 1-like (CA1); (D) aldo-keto reductase family 1, member C1-like (AKR1C1); (E) S100 calcium binding protein A8 (S100A8); (F) serpin peptidase inhibitor, clade B-like (SERPINB); (G) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGS2); (H) fatty acid binding protein 5 (FABP5); (I) eukaryotic translation elongation factor 1 (EEF1A1); (J) fatty acid binding protein 3; and (FABP3) (K) FXD domain-containing ion transport regulator 3 (FXDY3)

(2) 離乳前後で遺伝子発現に変化がみられたものは871個の遺伝子であり、その内466個の発現が離乳後に上昇、405個が減少していた(図4)。パスウェイ解析の結果、PPARが離乳後に活性化しているレギュレーターとして同定され、その標的遺伝子群の中に離乳前後におけるルーメン発達関連遺伝子が存在する可能性が示唆された。また、ケトン体生成に関与する遺伝子の発現が離乳後に上昇することから、ルーメン発達のマーカーとしてこれらの遺伝子は利用できる可能性が示唆された。

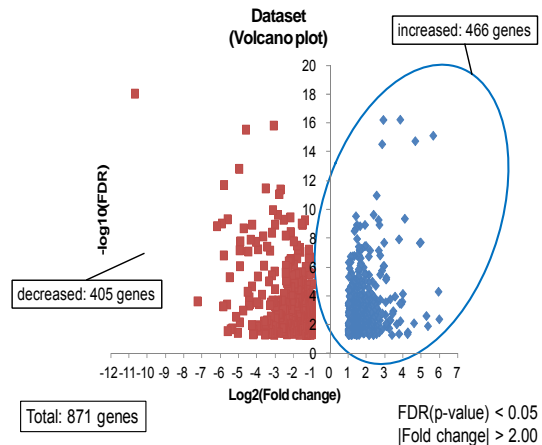


図4. 黒毛和種牛の離乳前後のルーメン絨毛組織における RNA-seq 解析の結果

< 引用文献 >

Roh SG, Kato D, Suzuki Y, Haga S, Comparison of the gene expression of rumen epithelium in pre- and post-weaning young cattle, 家畜栄養生理研究会会報, 査読有、60(2), 2016, 79-84

Kato D, Suzuki Y, Haga S, So KH, Yamauchi E, Nakano M, Ishizaki H, Choi KC, Katoh K, Roh SG, Utilization of digital differential display to

identify differentially expressed genes related to rumen development, Animal Science Journal, 査読有、87, 2016, 584-590

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5件)

Suzuki Y, Haga S, Nakano M, Ishizaki H, Nakano M, Song SH, Katoh K, Roh SG, Postweaning changes in the expression of chemerin and its receptors in calves are associated with the modification of glucose metabolism, Journal of Animal Science, 査読有、94, 2016, 4600-4610.

DOI: 10.2527/jas.2016-0677

Roh SG, Kato D, Suzuki Y, Haga S, Comparison of the gene expression of rumen epithelium in pre- and post-weaning young cattle, 家畜栄養生理研究会会報, 査読有、60, 2016, 79-84.

Kato D, Suzuki Y, Haga S, So KH, Yamauchi E, Nakano M, Ishizaki H, Choi KC, Katoh K, Roh SG, Utilization of digital differential display to identify differentially expressed genes related to rumen development, Animal Science Journal, 査読有、87, 2016, 584-590.

DOI: 10.1111/asj.12448

Roh SG, Suzuki Y, Gotoh T, Tatsumi R, Katoh K. 2016. Physiological roles of adipokines, hepatokines, and myokines in ruminants, Asian-Australian Journal of Animal Science, 査読有、29(1), 2016, 1-15.

DOI: 10.5713/ajas.16.0001R.

Suzuki Y, Haga S, Katoh D, So KH, Choi KC, Jung US, Lee HG, Kazuo K, Roh SG. 2015. Chemerin is a novel regulator of lactogenesis in bovine mammary epithelial cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、466, 2015, 283-288

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.105

[学会発表](計3件)

西原 昂来、鈴木 裕、金 多慧、中野美智、中野 美和、石崎 宏、芳賀 聡、盧 尚建. ウシルーメン絨毛上皮組織の発達における IGF-IGFBPs 軸の役割. 講演要旨集 P.109. 日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学、神戸、2017 年 3 月 27 日~29 日)

矢嶋 優、西原 昂来、金 多慧、芳賀 聡、中野 美和、石崎 宏、牛越 康一

郎、鈴木 武人、鈴木 啓一、加藤 和雄、盧 尚建. 哺乳仔ウシの内分泌、免疫機能および発育性に及ぼすリゾースキレン抽出物添加代用乳給餌の影響. 講演要旨集 P.178. 日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学、神戸、2017 年 3 月 27 日~29 日)

加藤 大地、鈴木 裕、芳賀 聡、蘇 敬夏、川原 玲香、河野 友宏、加藤 和雄、盧 尚建. 黒毛和種牛のルーメン発達関連因子の解析. 講演要旨集 P.243. 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 年 3 月 27 日~30 日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

盧 尚建 (ROH, Sanggun)

東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 90322130

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()