

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05021

研究課題名(和文) 乳牛の乾乳期栄養管理によるエピジェネティクス調節を介した代謝ホルモンの作用制御

研究課題名(英文) The relationship between the feed management of dry period and liver function in dairy cows

研究代表者

杉野 利久 (Sugino, Toshihisa)

広島大学・統合生命科学研究所(生)・准教授

研究者番号：90363035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛の乾乳期栄養水準は代謝エネルギー要求量に基づき充足90%および110%の2群に設け、乾乳期1期45日間として飼養管理した結果、分娩前の乾物摂取量は、90%群で低値を示し、分娩後3週間の乾物摂取量は110%群と比較し高値を示した。乳量は両群で差は認められず、飼料効率は90%群で高値を示した。乾乳期栄養水準による影響を受けつる肝臓脂質代謝関連遺伝子のうち分娩後に発現が低下する遺伝子はPigKのみであり、90%群の分娩後のみで低下していた。また、Acaa1、Acaa2およびSod1の発現は110%群で90%群と比較し分娩前に低く、分娩後に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、乳牛の育種改良に伴う高泌乳化によって、周産期を中心に代謝障害などの事故が多発している。その原因として乾乳期の栄養状態が挙げられている。乾乳期の栄養状態が分娩後の栄養代謝や乳生産に及ぼす影響は明らかにならなかつたが、その作用機序解明には至っておらず、本研究は学術的な意義を有する。乳生産に関して肝臓脂質代謝の重要時期は、泌乳初期であるが、最近では泌乳中期から後期にかけて過肥になる個体が酪農現場で多い。また、乾乳期の高栄養管理は泌乳中後期の乳量を減少させることから、長期的に脂質代謝への影響を明らかにする必要がある。本研究は、乾乳期の栄養水準の見直しに直結する課題である。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to evaluate the milk production and liver functions of multiparous high producing dairy cows fed two diets of differing energy levels (110 or 90% of ME requirements) in a one-phase dry period of 6 weeks. The prepartum dry matter intake was greater in the high than in the low ME group but the low ME group surpassed the high ME one in the DMI from the 1st to 3rd week postpartum. Milk yield did not differ between the high and the low ME diets from the 1st to the 8th week postpartum. The feed efficiency ratio tended to be lower in the low ME group from the 1st to 3rd week postpartum with no change thereafter. In liver function, PigK gene expression was increased after parturition in liver of low ME group. And Acaa1, Acaa2 and Sod1 gene expression before parturition were higher in low ME compared with high ME group. In conclusion, prepartum limited energy feeding in a one-phase dry period for 6 weeks could improve the postpartum DMI and energy balance.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：乳牛 周産期 乾乳期栄養水準 肝臓 脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳牛は、分娩に伴い GH やインスリンの肝臓、骨格筋や脂肪組織での脂質・糖代謝調節作用を変化させ、エネルギー源を遊離脂肪酸 (NEFA) やケトン体で代替して、糖の体内利用を抑制し、優先的に栄養を乳生産に向ける代謝にシフトする。また、乳牛の乾乳期飼養管理は、分娩後の飼養条件とは関係なく、体内栄養代謝や乳生産に影響することが知られている。乾乳期の高栄養管理は、分娩に伴う体脂肪動員により多量の NEFA が放出され、肝臓で処理できずケトン体の放出増加と脂肪合成が亢進し脂肪肝を引き起こす。これらの知見は、乾乳期の栄養状態が、分娩後の GH およびインスリンの作用を介した肝臓脂質代謝に影響していることを示しているが、関連性は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓脂質代謝に焦点を絞り、乾乳期の栄養状態と分娩後の肝臓脂質代謝との関連性をエピジェネティクス調節機構から明らかにすることを目的とし、

(1) 乾乳期栄養水準によるウシ肝臓脂質代謝関連メチル化/脱メチル化遺伝子の同定

(2) 分娩後のこれら遺伝子の発現変化

(3) 乾乳期栄養水準が肝臓および血中脂質代謝物と乳生産に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ウシ肝臓脂質代謝関連メチル化/脱メチル化遺伝子の候補化

(1) -1 動物種間比較 (マルチプルアライメント) によるウシ脂質代謝関連遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの *in silico* 解析

ウシ肝臓マイクロアレイ解析データを遺伝子データベース DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて脂質代謝に関連するものを選抜した。次いで、メチル化/脱メチル化の可能性のある遺伝子の候補化を行うにあたって、データベース上におけるウシの遺伝子発現情報は不十分であるため、十分な遺伝子発現情報があるマウス卵巣でのメチル化スコア検索データを用いた *in silico* 解析の動物種間比較によりメチル化/脱メチル化の可能性のあるターゲット遺伝子の候補化を行った。

(1) -2 ターゲット遺伝子のマウス肝臓における発現の検証

雄マウス (C57BL/6J) から肝臓組織を採取し、RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成、PCR 後、発現の有無を確認した。

(1) -3 マウス周産期の肝臓におけるターゲット遺伝子の発現変化

6 週齢雌マウス (C57BL/6J) を 15 匹供試し、交配後、妊娠 15 日目、出産日、出産後 5 日、出産後 10 日の個体および未発情の個体を対照区としてそれぞれ 3 匹ずつ配置した。未発情の個体を除く 12 匹は 1 週間の馴致後に雄マウスと交配し、上記の各ステージにおいて、屠殺後、肝臓を採取し、ターゲット遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。

(2) 乾乳期栄養水準が肝臓および血中脂質代謝物と乳生産に及ぼす影響

305 日乳量 10,000 kg を見込む、ボディコンディションスコア (BCS) が乾乳時に正常 (3.0 - 3.5) 範囲の高泌乳経産牛 20 頭を供試した。乾乳期栄養水準を NRC 飼養標準に基づき代謝エネルギー要求量の 90% にする低栄養群 (n=10)、110% の対照群 (n=10) の 2 群にランダムに配置した。分娩後の栄養水準は 2 群とも同一の飼養管理とした。乾物摂取量、日乳量、体重、BCS を定期的に測定し、採血は、乾乳期は 2 週間隔、分娩後 6 週までは 2 週間隔で行った。採血後、血漿生化学成分を測定した。また栄養状態指標として GH、インスリン、グルカゴンと IGF-1 を TR-FIA を用いて測定した。また、肝臓組織片の採取 (分娩予定-3 週、分娩後 2 週および 6 週) を実施し、マイクロアレイ解析およびメタボローム解析に用いた。

(3) 乾乳期栄養水準によるウシ肝臓脂質代謝関連メチル化/脱メチル化遺伝子の同定と周産期発現変化

(2) で得られた肝臓組織片を用いてマイクロアレイ解析を実施し、(1) で候補化した遺伝子の発現の有無、およびその周産期での発現変化を検討し、また (2) との関連性を解析した。

4. 研究成果

(1) ウシ肝臓脂質代謝関連メチル化/脱メチル化遺伝子の候補化

動物種間比較によるウシ脂質代謝関連遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの *in silico* 解析により、ウシ肝臓遺伝子データからメチレーションしうる遺伝子を 51 遺伝子、候補化した。これら遺伝子をマウス肝臓にて発現解析し、38 遺伝子が肝臓で発現していることを確認した。

マウス肝臓を採材し、38 遺伝子のマウス周産期における発現変化を検討した結果、12 遺伝子が分娩後に発現が低下すること、26 遺伝子が変化しないことを明らかにした (表 1)。

(2) 乾乳期栄養水準が肝臓および血中脂質代謝物と乳生産に及ぼす影響

(2) -1 乳生産に及ぼす影響

分娩前の乾物摂取量は、90%群で低値を示した一方で、分娩後3週間の乾物摂取量は22kg/日と110%群と比較し4kg程度高値を示した(P=0.002)。BCSは両群とも分娩後低下したが差は認められなかった。乳量は両群で差は認められなかったが、乳タンパクは高値を、乳脂率は低値を90%群で示した。飼料効率率は乾物摂取量と乳量の結果を受けて、90%群で高値を示し、このことから乾乳期の低栄養水準は分娩後の負のエネルギーバランスを改善する可能性が示された(図1)。

(2) -2 血中代謝産物に及ぼす影響

血液性状に関して、血漿ホルモン濃度および生化学成分値には両群で差はほとんど認められなかったが、血漿アルブミン濃度が90%群で高値を示した。

(2) -3 肝臓代謝産物に及ぼす影響

307(カチオン160,アニオン147)ピークが検出された。得られた代謝産物データによる主成分解析の結果、分娩前後で変化することのみ明らかとなり、乾乳期栄養水準による違いはほとんど認められなかった。しかし、アセチルCoAに関しては、90%群では分娩前後を通して高値で推移したが、110%群では分娩前に低値を示し分娩後に増加した。

(3) 乾乳期栄養水準によるウシ肝臓脂質代謝関連メチル化/脱メチル化遺伝子の同定と周産期発現変化

マイクロアレイ解析により6523遺伝子の発現が検出された。動物種間比較によるウシ脂質代謝関連遺伝子プロモーター領域CpGアイランドのin silico解析により、ウシ肝臓遺伝子データからメチレーションしうる遺伝子を51遺伝子のうち、本マイクロアレイ解析で検出された脂質代謝関連遺伝子は31遺伝子であった。また、マウス肝臓で発現する遺伝子と29遺伝子が同じであった。しかしながら妊娠前後のマウス肝臓の結果とは異なり、分娩後に発現が低下する遺伝子はPigKのみであり、90%群の分娩後のみで低下していた。乾乳期栄養水準にかかわらず分娩後に発現が増加した遺伝子は6遺伝子であった。一方で、分娩前3週においてAcaa1, Acaa2およびSod1の発現は分娩後週数と処理による交互作用が認められ、110%群で90%群と比較し分娩前に低く、分娩後に増加したが、90%群では分娩前後での変化認められず、アセチルCoAに関しては、(2)-3におけるメタボローム解析と同様の結果となった。

表1: 候補(ターゲット)遺伝子

番号	遺伝子	
2	Parg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)
3	Col4a3bp	collagen type IV alpha 3 binding protein (COL4A3BP)
6	Sacm11	SAC1 suppressor of actin mutations 1-like yeast (SACM11)
9	Pknox1	phosphotyrosyl phosphatase anchor biosynthesis class K (PKOX1)
10	Irf1d20	IRF1 domain family member 20 (IRF1D20)
11	Acaa2	acetyl-CoA acyltransferase 2 (ACAA2)
12	Sod1	superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)
15	Jund	jun D proto-oncogene (JUND)
17	Vpkl1	lysophospholipase (LYPLA1)
18	Hmgb2	high mobility group box 2 (HMG2)
20	Ppara	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
22	Apat1	1-Acetyl-CoA:3-phospho-D-Acetyltransferase 1
23	Acp6	acid phosphatase 6, lysosomal (ACP6)
24	Mgat1	monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1)
25	Gnat1	glycerophosphate O-acyltransferase (GNAT1)
26	Atp5b	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit (ATP5B)
27	Srsf2	serine like 2 (SRSF2)
28	Em120b	transmembrane protein 120B (EM120B)
29	Creb1	cAMP response element binding protein 1 (CREB1)
31	Pigk	phosphoglycerate kinase D (PIGK)
33	Ppc	phosphatidylcholine anchor biosynthesis class C (PPC)
34	Adh5	alcohol dehydrogenase 5, class IIb, cytoplasmic (ADH5)
35	Acaa1	acetyl-CoA synthetase long-chain family member 1
36	Kif2	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 (KIF2)
37	Eva1	evovase ribase subunit alpha (EVA1)
38	Dds2	CDP-diacylglycerol synthase 2 (DDS2)
40	Erfp2	ERF1 raft associated 2 (ERF1R2)
42	Nrl1	nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (NRL1)
43	Apoa1	apolipoprotein A1
44	Cbr4	carbonyl reductase 4 (CBR4)
46	Lipe	lipone-sensitive lipase
48	Srk4	serine/threonine kinase 4 (SRK4)
49	Lpl	lipoprotein lipase (LPL)
50	Grb2	transforming growth factor beta 2 (GFB2)
51	B2ta2	Solute Carrier Family 27 Member 2
32	Srb2	somatomedin receptor 2 (SRB2)
39	Irf3	interferon inducible protein 3 (IRF3)
8	B2ta4	Solute Carrier Family 27 Member 4

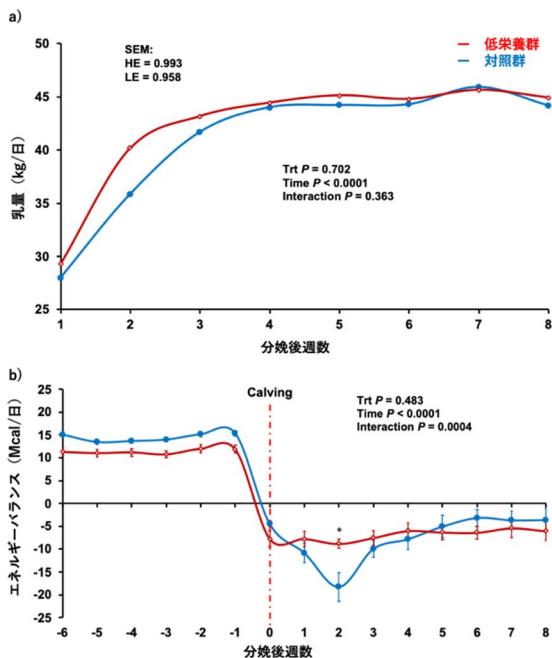


図1: 乳量(a)およびエネルギーバランス(b)に及ぼす乾乳期栄養水準の影響

以上のことから、乾乳期栄養水準は、肝臓での脂肪酸酸化活性に関連する遺伝子発現に影響する可能性が考えられ、これが分娩後の乾物摂取量、乳生産に影響する一因であるかもしれない。

< 引用文献 >

Hirabayashi H et al., Effect of nutrient levels during the far-off period on postpartum productivity in dairy cows. Anim. Sci. J., 89, 267-269, 2018.
 Jiang L et al., Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra mammary with lipopolysaccharide. BMC Genomics 9, 1741-2664, 2008.
 Morey SD et al., Effects of encapsulated niacin on metabolism and production of periparturient dairy cows. J. Dairy Sci., 94, 5090-5104, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchiya Yoshiyuki, Chiba Ena, Sugino Toshihisa, Kawashima Kenji, Hasunuma Toshiya, Kushibiki Shiro, Kim Yo-Han, Sato Shigeru	4. 巻 103
2. 論文標題 Changes in rumen fermentation, bacterial community, and predicted functional pathway in Holstein cows with and without subacute ruminal acidosis during the periparturient period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 4702 ~ 4716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3168/jds.2019-17546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 眞鍋 秀・河合 智子・鳥田 昌之・矢中 則之・小櫃 剛人・杉野 利久
2. 発表標題 プロモーター領域にCpG配列を有する脂質代謝関連遺伝子のマウス周産期における発現変化
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉恵樹, Yohan Kim, 杉野利久, 川嶋賢二, 蓮沼俊哉, 櫛引史郎, 佐藤繁
2. 発表標題 亜急性性第一胃アシドーシス牛の分娩前後における第一胃液pH, VFAおよび細菌叢構成
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小材怜子, 杉野利久, 川嶋賢二, 蓮沼俊哉, 櫛引史郎, 一條俊浩, 佐藤繁
2. 発表標題 亜急性性第一胃アシドーシス牛の分娩前後における肝組織中の抗酸化関連遺伝子発現
3. 学会等名 162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小材怜子, 杉野利久, 川嶋賢二, 沖村朋子, 櫛引史郎, 一條俊浩, 佐藤繁
2. 発表標題 乳牛の分娩後における負のエネルギーバランスと血中MDA, GPxおよびPAO値の変化
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉恵樹, Yohan Kim, 杉野利久, 川嶋賢二, 沖村朋子, 櫛引史郎, 木崎景一郎, 佐藤繁
2. 発表標題 亜急性第一胃アシドーシス牛の分娩前後における肝組織中遺伝子発現の変化
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉野利久
2. 発表標題 移行期の飼養管理
3. 学会等名 日本畜産学会・日本家畜臨床学会共催公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Elsabagh, T. Hasunuma, K. Kawashima, S. Sato, S. Kushibiki, T. Obitsu, T. Sugino
2. 発表標題 Effect of energy restriction during a one-phase dry period on the productive, metabolic and endocrine status of dairy cows.
3. 学会等名 17th International Conference on Production Diseases in Farm Animals(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	島田 昌之 (Shimada Masayuki)		
研究協力者	沖田 美紀 (Okita Miki)		
研究協力者	小櫃 剛人 (Obitsu Taketo)		
研究協力者	佐藤 繁 (Sato Shigeru)		
研究協力者	櫛引 史郎 (Kushibiki Shiro)		
研究協力者	川嶋 賢二 (Kawashima Kenji)		
研究協力者	沖村 朋子 (Okimura Tomoko)		