

平成23年5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380149

研究課題名（和文） 網羅的遺伝子解析によるウシ体脂肪蓄積の分子機構の解明

研究課題名（英文） Characterization of molecular mechanisms of bovine fat accumulation by global gene expression analysis

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

研究成果の概要（和文）：本研究はウシの体脂肪蓄積の分子機構を解明するために、10と24ヶ月齢の黒毛和種牛から各脂肪組織を採取し、DNAチップを用いて網羅的解析を行い、脂肪蓄積により発現量が上昇する多数の候補遺伝子を分離・同定した。その候補遺伝子群から Adipogenin、Chemerin と mPARM-1 の遺伝子について詳細な機能解析を行った結果、これらの遺伝子は脂肪細胞分化形成により遺伝子発現が上昇し、脂質蓄積に関係していることが確認された。以上の結果から、ウシ脂肪細胞の分化形成と脂質蓄積過程には複数の因子の協同作用により制御されていることが証明された。

研究成果の概要（英文）：This study was to investigate the molecular mechanism of fat accumulation and adipogenesis by DNA chip using adipose tissues from 10- and 24-month-old Japanese Black Cattle. Several candidate genes were separated and identified from global gene expression analysis. Adipogenin, chemerin and mPARM-1 genes were confirmed to relate to lipid metabolism and adipocyte differentiation in bovine adipocytes. These results suggested that several genes were involved with adipogenesis and fat accumulation in bovine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産学・草地学

キーワード：ウシ、脂肪細胞、遺伝子解析、Chemerin、Adipogenin

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は、エネルギーの貯蔵庫として、また、アディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌する内分泌器官として、エネルギーバランスや摂食の調節など、生体にお

いて非常に重要な役割を演じていることが知られている。現在では、脂肪組織における脂肪細胞の過剰蓄積、肥大化により生じる肥満は、2型糖尿病など様々な生活習慣病の危険因子として注目されている。さらに、畜産

学的には、脂肪組織は枝肉の嗜好性を決定する上で重要な要素であると考えられている。しかしながら、脂肪蓄積の分子機構は未だ多くの不明な点を残しており、その解明は畜産分野のみならず、様々な分野における研究標的として重要視されている。

研究開始時は黒毛和種牛における各脂肪組織への脂肪蓄積過程に関する遺伝子プロファイルの比較検討し、各脂肪蓄積部位における脂肪蓄積メカニズムを分子機構で調べた。平成20年度は黒毛和種牛の成長期に合わせ、各月例別に黒毛和種牛の脂肪組織部位に特異的に発現している候補遺伝子を分離し、その発現量を調べる予定であった。平成21と22年度は各遺伝子の生理的な機能を調査するために、濃厚飼料多給と放牧の異なる飼養環境で飼育した黒毛和種牛の各脂肪組織をサンプリングし、候補遺伝子群の解析する予定である。また、脂肪前駆細胞の分化過程における各遺伝子の発現パターンを調べ、細胞内の分化制御機構を検討する予定であった。

2. 研究の目的

黒毛和種牛の肥育システムは現在濃厚飼料中心であり、結果的に環境汚染やBSEの流入などの問題を引き起こしている。良質の牛肉生産の肥育システムを構築するためには、各脂肪組織間への脂肪蓄積の調節による黒毛和種牛の肥育体質の改善が最も重要されている。そこで、本研究は良質の牛肉生産の肥育システムを構築するために、脂肪蓄積の部位局在化 (FAT DEPOT) に関わる候補遺伝子を調べ、黒毛和種牛の肥育体質への影響を調査するものである。さらに、ウシ体脂肪蓄積の分子機構はまだ不明なところが多く、良質の牛肉生産の肥育システムを構築するためには脂肪蓄積メカニズムを明確することは重要であると考えられる。

したがって、黒毛和種牛における成長に伴い、皮下、内臓および筋肉内脂肪組織の増殖・分化機構は現在不明なところが多い。

3. 研究の方法

- (1) DNA microarray により脂肪組織で特異的に発現している遺伝子の分離と同定を行った。
- (2) ウシ分化脂肪細胞での Adipogenin、Chemerin と mPARM-1 遺伝子の発現量の解析を行った。
- (3) 黒毛和種牛 (10ヶ月齢) の皮下脂肪組織から定法に従い前駆脂肪細胞を含む脈間間質細胞 (SV 細胞) を分離し、培養した。SV 細胞をコンフルエントにさせた後、脂肪細胞分化培地により 12~20 日まで分化誘導を行った。
- (4) 分化した脂肪細胞に TNF- α 、アディポ

ネクチン、レプチンなどのアディポカインを添加し、脂質分解能およびウシケメリンとその受容体の遺伝子発現の動態を調査した。

- (5) ヒト肝ガン由来細胞株 (HepG2) を培養しコンフルエントにさせた後、各種脂肪酸処理 (0.5mM、24 時間) およびグルコース (30mM、6 時間) を添加しそれぞれ Chemerin および Chemerin 受容体の遺伝子発現の動態を調査した。
- (6) ヒツジの肝臓組織から定法に従い単離したヒツジ肝臓初代培養細胞を用いて HepG2 と同様の脂肪酸処理を行い Chemerin の遺伝子発現の動態を調査した。
- (7) 培養 C2C12 骨芽細胞に Adipogenin の発現ベクターを導入し、同細胞株に脂肪分化誘導培地にて 5 日間培養し、オイルレット染色により脂肪蓄積を調べた。また、細胞から RNA を抽出し、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を調査した。
- (8) Adipogenin と Chemerin SiRNA 導入による脂質蓄積能の調査した。

4. 研究成果

(1) 網羅的な遺伝子解析

黒毛和種牛 (6 頭) の成長期に合わせ、10 と 24 ヶ月齢の黒毛和種牛から皮下、筋肉内、腸管膜、腎周囲脂肪、生殖周囲脂肪組織を採取し、DNA チップと Differential Display RT-PCR を用いて、遺伝子発現プロファイルを検討した。皮下、筋肉内、腸管膜、腎周囲脂肪、生殖周囲脂肪組織から RNA の抽出し、DNA チップと DDRT-PCR により既知の遺伝子 37 個と未知遺伝子 16 個の候補遺伝子を得ている。さらに、発現差を確認するために、皮下、筋肉内、腸管膜、腎周囲脂肪、生殖周囲脂肪組織において Real time PCR により解析を行った結果、既知の遺伝子 19 個と未知遺伝子 4 個の遺伝子が最終的に選別された。また、ウシ分化脂肪細胞においてその発現量を調査した結果、既知遺伝子 4 個と未知遺伝子 3 は、脂肪細胞分化に伴い、上昇する結果を得た。この遺伝子群から Chemerin, Adipogenin と mPARM-1 (Prostatic Androgen-Repressed Message-1) を同定し、解析を行い、次のような結果を得た。

(2) Chemerin

① 脂肪細胞における Chemerin の発現と調節機構

本実験に用いた SV 細胞は分化誘導後、脂肪細胞へ分化し、脂肪蓄積が確認された (図 1)。Chemerin と Chemerin 受容体は脂肪細胞分化過程で上昇した (図 1)。分化脂肪細胞に TNF- α (10ng/ml) を 24 時間添加

した結果、脂質分解を引き起こし、PPAR γ 2などの脂肪細胞分化関連遺伝子の発現が抑制された(図2)。さらにTNF- α 添加によりケメリンとその受容体の遺伝子発現量は上昇した。以上の結果から、ウシ脂肪細胞において脂質分解の刺激によりケメリンとその受容体の遺伝子発現が調節されることが確認された。

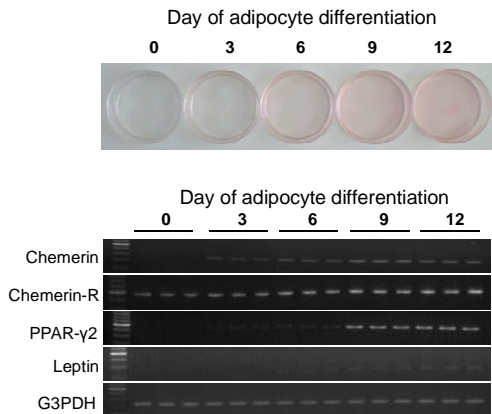


図1. ウシ脂肪細胞分化過程におけるChemerinとChemerin受容体の発現量

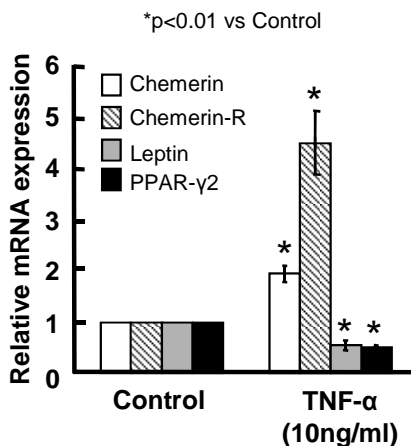


図2. ウシ分化脂肪細胞におけるTNF- α 添加による脂肪細胞分化関連遺伝子の発現量

② 肝細胞におけるChemerinの発現・分泌調節機構

本実験では肝細胞におけるHepatokineとしてのChemerinの発現と分泌に影響を与える因子について調査した。24時間の脂肪酸処理によりHepG2では脂肪の蓄積が確認され、HepG2とヒツジ肝臓初代培養細胞共にChemerinの発現上昇が確認された。6時間グルコース処理によりHepG2ではChemerinの発現低下が確認された(図3)。

以上の結果からChemerinは脂肪酸処理時には発現が上昇し脂肪酸の取り込み、脂質の合成を促進していること、グルコース

処理時には脂肪細胞とは異なる発現動態を示していることが確認された。

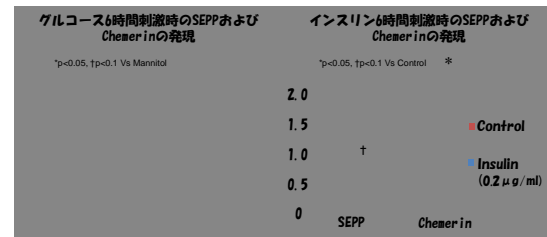


図3. 肝細胞におけるグルコースとインスリン処理によるChemerinの発現量

(3) Adipogenin

Adipogeninは脂肪細胞で特異的に発現する遺伝子として、脂肪蓄積や脂肪細胞分化過程において遺伝子発現量が上昇することが知られている。しかし、Adipogeninが脂肪細胞分化の初期段階にどのような役割をしているかは不明である。そこで、本研究では、Adipogenin遺伝子の機能解析のために、C2C12骨芽細胞にAdipogenin遺伝子を導入し、筋芽細胞の脂肪蓄積と脂肪細胞分化能について調査した。Adipogenin遺伝子を導入した細胞を脂肪分化誘導培地で培養したところ、2日目から中性脂肪の蓄積が確認され、5日目になると脂肪滴が大きくなることが観察された(図4)(図5)。

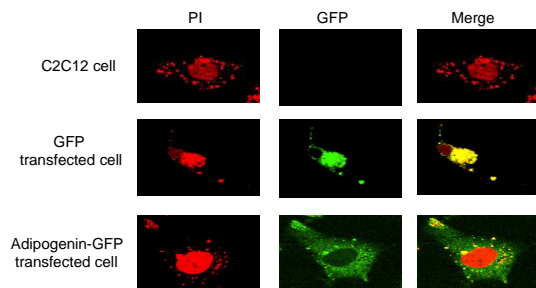


図4. C2C12細胞へのAdipogenin導入による細胞内の局在化

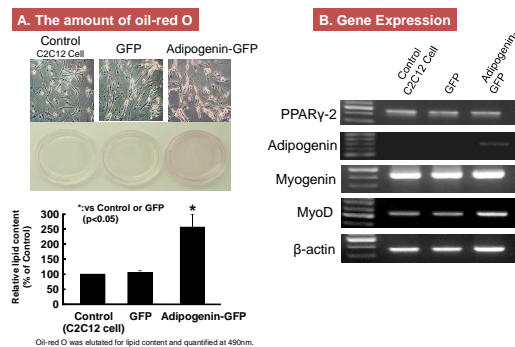


図5. C2C12細胞へのAdipogenin導入による脂質蓄積と遺伝子発現

しかし、今回使用した分化誘導培地では PPAR- γ 2、CEBP- α および Leptin などの脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現誘導は確認されなかった。以上の結果から、Adipogenin 遺伝子導入により細胞内の脂肪蓄積は行われるが、脂肪細胞分化関連の遺伝子発現は確認されなかった。

(4) mPARM-1

本研究は脂肪細胞分化・形成過程における PARM-1 のマウスホモログ遺伝子 (mPARM-1) の遺伝子発現パターンを調べ、その機能解析を行った。mPARM-1 遺伝子は、マウス 5 番染色体に位置し、タンパク質をコードする ORF は 891bp であった。そのタンパク質は、296 のアミノ酸と分子量 33,000 で合成されている。mPARM-1 遺伝子は脂肪組織の中で S-V 細胞より脂肪細胞において高く発現した。また、高脂肪食給餌マウス群および普通食給餌マウス群の 3 つの部位 (皮下、腸間膜、生殖器周囲) の脂肪組織における mPARM-1 の遺伝子発現量は、高脂肪食誘導により有意に増加した (図 6)。

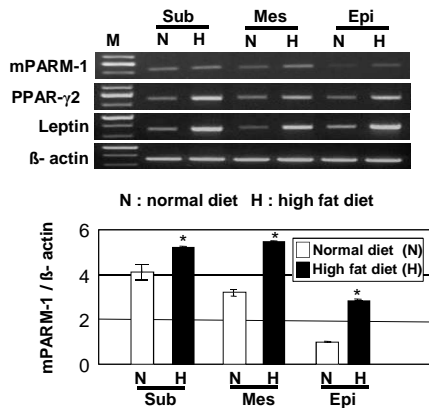


図 6. 高脂肪食給餌マウスにおける mPARM-1 の遺伝子発現量

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化過程中的 PARM-1 の発現パターンを調べた結果、mPARM-1 の発現が PPAR γ 2 の発現に先行し、脂肪細胞分化初期において急速に増加したことが確認された。siRNA を用いて mPARM-1 をノックダウンさせた 3T3-L1 前駆脂肪細胞では、PPAR γ 2 や aP2 の発現量とともに、前駆脂肪細胞分化能の減少が確認された。また、分化した 3T3-L1 脂肪細胞に脂肪分化を抑制する TNF- α を処理した結果では、PPAR- γ 2、Leptin、Adipogenin とともに mPARM-1 遺伝子の発現量も減少した (図 7)。これらの結果により、mPARM-1 が脂肪細胞の分化・形成過程中的の遺伝子発現に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

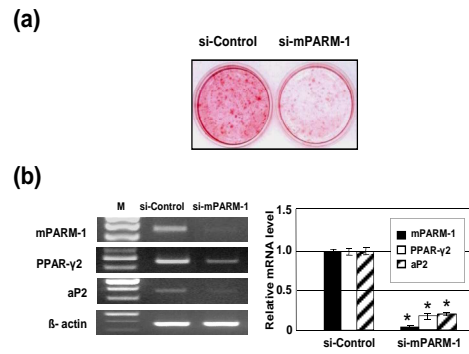


図 7. mPARM-1 遺伝子導入による脂質蓄積と脂肪細胞分化関連遺伝子の発現量

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 17 件)

- Albrecht, E., T. Gotoh, F. Ebara, J. X. Xu, T. Viergutz, G. Nuernberg, S. Maak, J. Wegner. Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. 査読有. Meat Science, 2011. in press.
- Ohtani Y, Yonezawa T, Song SH, Takahashi T, Ardiyanti A, Sato K, Hagino A, Roh SG and Katoh K. Gene expression and hormonal regulation of adiponectin and its receptors in bovine mammary gland and mammary epithelial cells. 査読有. Animal Science Journal. 2011. 82:99-106.
- Tachibana T, Cline MA, Khan MSI, Ueda H and Hiramatsu K (2011) Feeding responses to central administration of several somatostatin analogs in chicks. 査読有. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 158: 47-51.
- Sithyphone K., M. Yabe, H. Horita, K. Hayashi, F. Tomiko, Y. Shiotsuka, T. Etoh, F. Ebara, O. Samadmanivong, J. Wegner and T. Gotoh. Comparison of feeding systems: feed cost, palatability and environmental impact among hay fattened beef, consistent grass-only fed beef and conventional marbled beef in Wagyu (Japanese Black cattle). 査読有. Animal Science Journal. 2010. 82: 352-359.
- Nagao K, Hiramatsu K, Tsukada A and Kita K. Effects of insufficient levels of dietary protein on IGF-1 and IGF1BPs in young chickens. 査読有. The Journal

- of Poultry Science 2010. 47: 236-239.
6. Song SH, Fukui K, Nakajima K, Kozakai T, Sasaki S, Roh SG (Corresponding Author), Katoh K. Cloning, expression analysis, and regulatory mechanisms of bovine chemerin and chemerin receptor. 査読有. Domestic Animal Endocrinology 2010. 39(2):97-105.
 7. Inada S., F. Ebara, S. Asaoka, K. Asada, Y. Isozaki, A. Saito and T. Gotoh Intensified nursing dramatically accelerates growth performance and the size of the body frame in Japanese Black and Holstein crossbred steers. 査読有. J. Anim. Vet. Adv. 2010. 9(6):1037-1047.
 8. Ebara F., S. Inada, S. Asaoka, Y. Isozaki, A. Saito, T. Etoh, Y. Shiotsuka, and T. Gotoh (2010) Intensive nursing and feeding during the early growth period altered intramuscular adipogenesis in crossbred steers (Japanese Black male × Holstein female). 査読有. J. Anim. Vet. Adv. 2010. 9(6):982-989.
 9. Gotoh, T., E. Albrecht, F. Teuscher, K. Kawabata, K. Sakashita, H. Iwamoto, J. Wegner. Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle. 査読有. Meat Science, 2009. 82:300-308.
 10. Song SH, Hong YH, Sasaki S, Roh SG (Corresponding Author), Katoh K. Prostatic Androgen-Repressed Message-1 as a Regulator of Adipocyte Differentiation in the mouse. 査読有. Tohoku J. of Exp. Med. 2009. 219:311-317.
 11. Iga T, Satoh T, Yamamoto S, Fukui K, Song SH, Choi KC, Roh SG, Sasaki S. Differential action of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on adipocyte differentiation of ovine and 3T3-L1 preadipocytes. (査読有) Asian-Australian Journal of Animal Science. 2009. 22(11):1566-1573.
 12. Hiramatsu K and Yamasaki A (2009) Immunohistochemical study on the innervation of the chicken pancreas by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAPs)-containing nerves. 査読有. The Journal of Poultry Science 2009. 46: 234-239.
 13. Tachibana T, Cline MA, Sugahara K, Ueda H and Hiramatsu K Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. 査読有. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 2009. 161: 354-359.
 14. 渡辺 純、平松浩二. ニワトリ視床下部における神経ペプチド Y(NPY) 含有ニューロンの投射経路に関する組織学的研究. 査読有. 北信越畜産学会報 2009. 98:23-28.
 15. Atsumi Y, Yazawa S, Usui F, Nakamura Y, Yamamoto Y, Tagami T, Hiramatsu K, Kagami H and Ono T. Depletion of primordial germ cells (PGCs) by X-irradiation to extraembryonic region of chicken embryos and expression of xenotransplanted quail PGCs. 査読有. The Journal of Poultry Science 2009. 46: 136-143.
 16. Fujiwara A, Ono T, Hiramatsu K and Kagami H. Complete regeneration of muscular dystrophy chickens by mating of male and female offspring derived from germline chimeras. 査読有. The Journal of Poultry Science 2009. 46: 123-126.
 17. Tachibana T, Mori M, Khan MdSI, Ueda H, Sugahara K and Hiramatsu K. Central administration of galanin stimulates feeding behavior in chicks. 査読有. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 2008. 151: 637-640.
- [学会発表] (計 13 件)
1. 盧 尚建、宋 相憲、鈴木裕、Ardiyanti Astrid、加藤和雄、ヒト肝がん細胞 (HepG2) における Chemerin 分泌調節. BMB2010. 神戸ポートアイランド、神戸、2010 年 12 月 8 日、1P-0029.
 2. 宋 相憲、鈴木裕、盧 尚建、加藤和雄. 筋芽細胞および脂肪細胞の脂肪蓄積能における Adipogenin の機能解析. Adiposcience 研究会、大阪、2010 年 8 月 21 日、p. 36
 3. 鈴木裕、宋 相憲、盧 尚建、加藤和雄. 脂肪細胞と肝細胞における Chemerin と Chemerin 受容体の発現動態. 講演要旨集 Adiposcience 研究会、大阪、2010 年 8 月 21 日、p. 33
 4. 鈴木裕、宋 相憲、盧 尚建、加藤和雄. ウシ脂肪細胞におけるケメリン (Chemerin) とその受容体の発現調節機構. 日本畜産学会第 112 回大会、東京、2010 年 3 月 28 日、P. 98.
 5. 大谷喜永、宋 相憲、萩野頭彦、盧 尚建、加藤和雄. ウシ乳腺上皮細胞におけるアディポネクチンのシグナル伝達と

- エネルギー代謝及び増殖、生存関連遺伝子発現に及ぼす影響. 日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28日、P.98.
6. 佐藤勝祥、高橋辰行、小岩幸太、萩野顕彦、盧 尚建、加藤和雄. ヒツジとヤギの血中 ACTH および GH 濃度に及ぼす頸静脈内 Apelin 投与の影響、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28日、P.99.
 7. 千田はるか、加藤伸一、佐藤勝祥、高橋辰行、星野由美、盧 尚建、加藤和雄、幼動物へのミルク摂取時に見られる血中 GH とインスリン濃度の増加機構、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28日、P.100.
 8. 杉田春奈、Astrid Ardiyanti、横田祥子、為岡奈々恵、阿部剛、庄司則章、小林栄治、鈴木啓一、盧 尚建、加藤和雄. 黒毛和種肥育牛の枝肉成績・筋肉内脂肪酸組成と FASN および SCD 遺伝子多型との関連、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28日、P.109.
 9. 盧 尚建、宋 相憲、鈴木裕、佐々木晋一、加藤和雄、脂肪細胞由来遺伝子、Adipogenin の発現調節について、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28日、P.110.
 10. Song, S.H., Roh, S.G. and Katoh K. Overexpression of adipogenin enhances the fat accumulation of C2C12 myoblasts. Experimental Biology 2009、(Anaheim, CA, USA) 2009年4月19日
 11. Roh, S.G., Song, S.H., Fukui, K, Satoh, T., Katoh, K. and Sasaki, S. Cloning and expression of bovine chemerin and chemerin receptor. 6th International Congress on Farm Animal Endocrinology (The Hotel Roanoke & Conference Center, Roanoke, USA)、2008年11月15日
 12. Song, S.H., Fukui, K., Hamano, K., Sasaki, S., Roh, S.G. and Katoh, K. Chemerin, highly expressed in adipose tissues, stimulates the glycerol release in bovine differentiated adipocytes in vitro. Proceeding of XIth International Symposium on Ruminant Physiology、(Clermont-Ferrand, France) 2008年9月7日、p.662-663
 13. Roh, S.G., and Katoh K. Up-regulation of chemerin and chemerin receptor by TNF- α in bovine differentiated adipocytes in vitro. Proceeding of XXXVI International Congress of Physiological Science. 京都、2008年7月29日、P4AM-8-4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盧 尚建 (ROH SANGGUN)

東北大学・大学院農学研究所・准教授

研究者番号：90322130

(2) 研究分担者

後藤 貴文 (GOTOH TAKFUMI)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70294907

千国 幸一 (CHIKUNI KOICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・研究チーム長

研究者番号：40355061

平松 浩二 (HIRAMATSU KOHZI)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：80238386