

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380158

研究課題名(和文)筋線維型調節を可能にする未利用飼料資源の発掘

研究課題名(英文)Exploration of unutilized feed resource to regulate muscle fiber type

研究代表者

松井 徹 (MATSUI, Tohru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40181680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円、(間接経費) 3,330,000円

研究成果の概要(和文)：Pgc1 の転写上流域を用いたレポーター遺伝子を構築し、33種の未利用飼料資源・飼料のエクストラクト抽出物がレポーター遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、茶殻サイレージにPgc1 遺伝子転写抑制活性が認められた。初代培養筋衛星細胞が筋管細胞に分化する際に茶殻サイレージ抽出物を添加したところ、Pgc1 mRNA 発現は減少した。黒毛和種去勢肥育牛に茶殻サイレージを給与しても筋組織におけるPGC-1 mRNAレベルは低減しなかったが、赤筋型ミオシン重鎖mRNA発現が増加し、筋中PGC-1 とミオシン重鎖発現間に明確な関係は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：A luciferase-based Pgc-1 alpha reporter construct (Pgc-1 alpha(-2553)-luc) that contains the mouse Pgc-1 alpha promoter was prepared. A screen of ethanol extracts from 33 feedstuffs indicated that oolong tea and roasted green tea extracts decreased Pgc-1 alpha(-2553)-luc expression in C2C12 myoblasts. We further examined the effects of the ethanol extracts of tea waste and its silage on Pgc-1 alpha transcription; the tea waste silage extract inhibited Pgc-1 alpha transcription. Treatment with the extracts of raw tea leaves, tea waste and tea waste silage effectively decreased Pgc-1 alpha mRNA levels during myogenesis of myosatellite cells. However, feeding tea waste silage for 2 months before slaughter did not decrease muscular Pgc1 alpha mRNA level in Japanese Black fattening steers, but increased mRNA expression of Myh7, the red-fiber type myosin heavy chain, and thus no clear relationship was detected among expression of Pgc1 alpha and the myosin heavy chain in the muscle.

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：筋線維型 Pgc1 飼料 肉色 肥育牛

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 市場での牛肉の質は、最長筋の脂肪交雑、肉色、肉のキメ・シマリ、脂肪の光沢と色から求める肉質等級により決定される。脂肪交雑改善に関する基礎ならびに応用研究の進展は著しく、肥育牛に対してビタミン A 欠乏飼料を給与する技術は既に実用化されている。一方、牛肉色は市場での枝肉の「格落ち」の大きな要因であり、価格に大きな影響を及ぼすが、その制御技術開発はほとんど行われていない。屠畜後に牛肉の pH の低下が不十分な場合は、牛肉は暗赤色化するが、このような現象は国内では希である。また、屠畜前にビタミン E を補給すると肉色の保存性が高まることが知られている。しかし、これは本質的な牛肉色制御ではない。

(2) 筋肉を構成する筋線維は、赤筋と白筋に分けられる。赤筋はミオグロビンが多いため鉄含量が高く、より赤色を示す。食肉として重要な最長筋や大腰筋の筋線維は赤筋と白筋からなり、肥育牛では 30-50% が赤筋線維である (*Anim Sci J*, 74: 339. 2003)。一般に、筋肉の筋線維は白筋が優性であり成長に伴い赤筋化する。

(3) この筋線維型の変化は環境要因によっても左右される。例えば、ニワトリでは短期間の低温暴露で容易に赤筋化が生じる (*Endocrinology*, 146: 399. 2005)。筋線維の赤筋化過程に、転写調節因子である Pgc1 が中心的な役割を果たしており、Pgc1 の発現増により赤筋化が起こる (*Nature*, 418: 797. 2002)。したがって、Pgc1 発現ならびに機能を制御する技術の開発により、筋線維型の調節を介した牛肉色の調節市場が好む鮮紅色の創出が可能となる。また、白筋が多い牛肉は脂肪交雑が多く、調理損失が少ないとされている (*Meat Sci*, 54: 65. 2000)。

(4) 飼料自給向上を目指した未利用飼料資源の開発研究が行われている。新規飼料の普及には、生産者にとってのメリットが必要条件となる。しかし、多くの場合、この点がネックとなり、新規飼料の普及は困難なのが現状である。一方、未利用飼料資源に「機能性」があるならば、その普及は容易となる。事実、豚肉の脂肪交雑を高めるパンくずは供給が不足している。

(5) 本学附属牧場では、肥育牛に茶葉を給与すると、赤筋化の指標である鉄含量 (*J Anim Sci*, 73: 3069. 1995) は低下し、筋肉の赤色度も減少することを見いだしている (*Meat Sci*, 53: 221. 1999)。この結果は、給与飼料によって筋線維型を調節し得ることを示唆している。本研究は、未利用飼料資源などに含まれ、筋線維型を調節する「機能性」因子の単離、ならびに、筋線維型制御による牛肉色の改善法の開発を目的とする。なお、牛

肉色の淡色化に鉄不足によるミオグロビン減少が関連する可能性が示唆されているが (*肉用牛研究会報*, 67: 22. 1999)、貧血を伴う著しい鉄欠乏時にのみミオグロビン合成不全は生じるので、このような状況は健康な肥育牛ではあり得ない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、筋線維型調節機構を明らかにすること、未利用な資源を含む飼料から筋線維型を調節し得る活性を有するものを探索すること、ならびに肥育牛における筋線維型調節を実証することである。

(2) 目的達成のため、研究を以下の 4 段階に分け、検証する。

筋線維型を制御する Pgc1 のプロモーター活性を指標とした Pgc1 遺伝子の転写活性を簡便かつ鋭敏に検出する系を確立する。

この系を用いて、Pgc1 のプロモーター活性を抑制する未利用飼料資源抽出物をスクリーニングする。

培養筋管細胞において、Pgc1 遺伝子の転写活性調節能を有する飼料抽出物が、Pgc1 mRNA レベルに及ぼす影響を確認する。

候補となり得る飼料を肥育牛に給与し、Pgc1 遺伝子発現ならびに筋線維型の変化を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 筋肉における Pgc1 の主要な転写調節部位とルシフェラーゼをコードする配列を連結させたレポーター遺伝子 (Pgc1 (-2553)-luc) を構築し、Pgc1 転写をルシフェラーゼレポーターアッセイによりモニターする。

(2) 茶葉・茶殻抽出物をはじめとした未利用飼料資源抽出物をスクリーニングする。水溶性成分の吸収には特異的な輸送体が必要であり、培養系で見いだされた成分が動物体内で機能する可能性は低い。したがって、特別な輸送体を必要としない脂溶性成分を対象とする。様々な未利用飼料資源のエタノール抽出画分を得てスクリーニングする。

(3) Pgc1 転写抑制機能を有する飼料資源抽出物を培養筋系細胞の培地に添加し、Pgc1 mRNA レベルでの変化を RT-qPCR 法により検討する。

(4) 黒毛和種去勢肥育牛の肥育最終 2 か月間に、Pgc1 転写抑制機能を有する茶殻サイレージを給与し、筋中 Pgc1 ならびにミオシン重鎖 mRNA レベルを RT-qPCR 法により検討する。

#### 4. 研究成果

(1) Mouse Pgc1 の転写開始点の上流 2553塩基から転写開始点の下流 78 塩基までの領域を luciferase のコード領域の上流に挿入した mPgc1 (-2553)-luc を構築した。

(2) Pgc1 は forskolin で転写が活性化されること、ならびに MyoD 依存的な転写促進が報告されているので、Pgc1 -luc を使った系を利用できる細胞を検討した。COS7 細胞は forskolin に対する応答性も MyoD 依存性も見られなかったのに対して、HepG2 細胞では forskolin 応答性が確認された。また、この細胞では MyoD を発現させることなく Pgc1 の転写を調べることができた。

(3) mPgc1 (-2553)-luc を筋芽細胞株である C2C12 細胞に導入し、33 種類の飼料のエタノール抽出物の影響を検討したところ、中国茶とほうじ茶葉抽出物中にレポーター遺伝子の発現量を抑制する活性があることが判明した。

(4) 茶葉よりもむしろ茶殻、ならびに茶殻サイレージの方がウシの飼料源として現実味がある。そこで、これらの茶葉副産物のエタノール抽出物の効果を調べたところ、とくに茶殻サイレージに Pgc1 遺伝子転写抑制活性があることが判明した。

(5) Pgc1 mRNA 発現に及ぼす影響を検討するため、ラット足底筋より筋衛星細胞を単離し、筋管細胞への誘導時に茶葉副産物抽出物を添加したところ、転写活性の変化と同様、茶殻サイレージ抽出物に Pgc1 mRNA 発現抑制活性があること、また、茶殻にも同様の活性があることが明らかになった。

(6) 黒毛和種去勢肥育牛を用いて、茶殻サイレージ給与が筋組織における PGC-1 ならびにミオシン重鎖 mRNA レベルに及ぼす影響を 2ヶ所の肥育牧場(実験 1, 2) で検討したところ、筋中 PGC-1 mRNA レベルは低減しなかった。

(7) また、速筋を構成するミオシン重鎖(Myh1)発現は増加することもなければ遅筋を構成するミオシン重鎖(Myh7)発現は減少することもなかった。

(8) むしろ、実験 2 では Myh7 発現レベルは茶殻サイレージ給与によって増加した。

(9) 筋中 PGC-1 mRNA レベルと Myh1 ならびに Myh7 mRNA レベルの間には明確な関係は認められなかった。

(10) 以上の結果、ウシでは茶殻サイレージには筋中 PGC-1 発現に影響を及ぼさないこ

と、筋線維型はむしろ遅筋型優勢にシフトする可能性、筋線維型は PGC-1 発現によって制御されているわけではないことが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shibuya E, Murakami M, Kondo M, Kamei Y, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Downregulation of Pgc-1 expression by tea leaves and their by-products. (査読有) Cell Biochem Funct. 2014 32:236-40. doi: 10.1002/cbf.3006.

〔学会発表〕(計 3 件)

丸山 新・武田賢治・舟場正幸・松井 徹. 緑茶粕サイレージ給与による牛肉色の制御技術の開発. 第 118 回日本畜産学会大会. 2014 年 3 月 28 日. つくば国際会議場.

渋谷枝里香・村上 賢・近藤 誠・亀井康富・舟場正幸・松井 徹. 茶殻抽出物が Pgc1 転写に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会大会. 2013 年 3 月 30 日. 安田女子大学.

渋谷枝里香・村上 賢・亀井康富・舟場正幸・松井 徹. Pgc1 転写に影響を及ぼす飼料要因. 第 35 回日本分子生物学会年会. 2012 年 12 月 11 日. マリンメッセ福岡.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 徹 (MATSUI, Tohru)  
京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：40181680

(2)研究分担者

舟場 正幸 (FUNABA, Masayuki)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40238655

熊谷 元 (KUMAGAI, Hajime)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：50221940