

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580368

研究課題名(和文)褐色脂肪細胞制御による新たなウシ肥育技術開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文)Basic study for development of a novel beef-fattening through control of brown adipocyte activity

研究代表者

舟場 正幸 (FUNABA, Masayuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40238655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：成牛の脂肪組織中でも褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子であるUcp1が発現していた。Ucp1発現レベルは、濃厚飼料を多給されたウシの皮下脂肪において高かった。褐色脂肪前駆細胞(HB2)の分化に対して、インスリンが第一義的に必要な因子であった。褐色脂肪前駆細胞の分化は、TGF- β 1ならびにアクチビンAによって抑制された。白色脂肪前駆細胞株である3T3-L1細胞を定法の脂肪細胞分化プロトコールに加えてサイロキシン、ロシグリタゾン、イソブチルメチルキサンチンを長期処理することにより、Ucp1陽性脂肪細胞に分化した。

研究成果の概要(英文)：Uncoupling protein 1 (Ucp1), a gene specifically expressed in brown/beige adipocytes, was expressed in white adipose tissue of Japanese Black fattening steers. Expression level of Ucp1 was higher in subcutaneous fat depots of steers fed high concentrate diet than in those fed high roughage diet. In contrast, no significant differences were observed in Ucp1 expression in the mesenteric fat depots between the high concentrate diet group and the high roughage diet group. The cell culture studies revealed that insulin is essential for differentiation of brown preadipocytes to brown adipocytes, possibly through inducing Srebp1c, a transcription factor. Differentiation of brown preadipocytes was potently inhibited by the presence of TGF- β 1 or activin A. Chronic treatment with thyroxine, rosiglitazone and isobutylmethylxanthine induced differentiation toward Ucp1-expressing adipocytes in 3T3-L1 preadipocytes, a white preadipocyte line.

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：褐色脂肪細胞 ウシ 脂肪組織 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国では長年にわたり高品質な牛肉生産を目指した飼養技術開発が行われてきた。その結果、高品質牛肉は海外をもマーケットとし得る状況になっている。効率的な高級牛肉生産を考える上で問題となるものの一つに、肥育後期における肥育効率の低下が挙げられる。

(2) この期間の肥育効率の改善により、肥育期間の短縮が可能になり、高級牛肉は真に国際競争力のある品目なり得る。したがって、この肥育効率低下の原因を解明することは、肥育効率の根本的な改善を可能にする飼養法の確立に繋がる。

(3) 脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞とがある。白色脂肪細胞は体中に分布し、細胞内に多量のトリグリセリドを蓄えエネルギー貯蔵機能を示すのに対して、褐色脂肪細胞は褐色脂肪組織を構成する細胞であり、熱産生に重要である。

(4) 従来、ヒトやウシの褐色脂肪組織は成長に伴い消失することから、起源、分化調節、ならびに、機能制御に関して研究は進められてこなかった。最近、健康な成人でも褐色脂肪組織を有していることが明確になり、注目を集めるようになった。

(5) また、白色脂肪細胞が褐色脂肪細胞に分化転換し得ること、ならびに筋細胞系の細胞（筋芽細胞）も褐色脂肪細胞になり得ること、いくつかの動物種において白色脂肪細胞から褐色脂肪細胞への分化転換の程度は、動物の生理条件や環境要因によって可変的であることが明らかになった。

(6) 「肥育に伴って、褐色脂肪細胞による熱産生が増加し、肥育効率が低下するのではないか？」との作業仮説を立てた。

(7) 事実、肥育牛の皮下脂肪において、褐色脂肪細胞に特異的に発現し、その機能の本質である脱共役による熱産生を行い、褐色脂肪細胞のマーカーである *Ucp-1* 遺伝子発現を RT-PCR 法により調べたところ、有意な発現が確認できた。この結果は、ウシの白色脂肪組織中に褐色脂肪細胞が混在することを意味している。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、a) 白色脂肪組織において褐色脂肪細胞が出現することの検証、ならびに、b) 褐色脂肪細胞の分化・成熟および機能に及ぼす要因の解明筋線維型調節機構を明らかにすることである。

(2) 目的達成のため、以下の項目を検証する。
肥育牛の各白色脂肪組織（皮下脂肪、内

臓脂肪、腎周囲脂肪、筋間脂肪、ならびに、最長筋内脂肪）における褐色脂肪細胞の存否を組織学的手法ならびに分子生物学的手法により明らかにする。

肥育牛の白色脂肪組織中に出現する褐色脂肪細胞に飼養条件が影響を及ぼすか否かについて検討する。具体的に検討する飼養条件として、粗飼料：濃厚飼料比、ならびに、ビタミン A の栄養状態とする。マウスでは、カロテンやビタミン A 誘導体であるレチノイン酸に褐色脂肪細胞分化促進活性があることが知られている。褐色脂肪細胞の存否を組織学的手法ならびに分子生物学的手法により明らかにする。

培養細胞を用いて、褐色脂肪前駆細胞の分化・成熟、ならびに白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞間への分化転換の制御を分子生物学的手法により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ホルマリン固定した肥育牛の白色脂肪組織からパラフィン切片を作成し、H-E 染色ならびに、*Ucp1* タンパク質に対する抗体を用いて、免疫組織化学的手法により白色脂肪組織における褐色脂肪細胞の存否を検討する。

(2) 10 ヶ月齢の黒毛和種去勢牛 8 頭を供試する。4 頭ずつ 2 区 - 粗飼料多給区（粗：濃 = 35：65）および濃厚飼料多給区（粗：濃 = 10：90）に分け、20 ヶ月間給餌し、30 ヶ月齢で屠殺する。屠殺時に各白色脂肪組織（皮下脂肪、内臓脂肪、腎周囲脂肪、筋間脂肪、ならびに、ロース筋肉内脂肪）を採取し、RNA を単離し、リアルタイム RT-PCR 法により *Ucp1* 発現を定量する。

(3) 上記の肥育試験と同様の方法でビタミン A 充足飼料あるいは欠乏飼料を給与し、ビタミン A の影響を検討する。

(4) 褐色脂肪前駆細胞 (HB2) ならびに白色脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を用いて、褐色脂肪細胞分化に及ぼす要因を検討する。

4. 研究成果

(1) 成牛の脂肪組織中で褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子である *Ucp1* の発現がタンパク質レベルでも mRNA レベルでも検出され、成人のみならず成牛においても褐色脂肪細胞が存在することが示唆された。

(2) 肥育期間中に粗飼料：濃厚飼料比の異なる飼料を給与したウシの脂肪組織中の *Ucp1* ならびに褐色脂肪細胞で選択的に発現する遺伝子群の発現を RT-qPCR 法により定量したところ、濃厚飼料多給群のウシの皮下脂肪においてこれらの遺伝子群は高発現し、内臓脂肪における発現は給与飼料の影響が見られなかった。

(3) -トコフェロール含量ならびに -カロテン含量の高いTMR飼料を給与した肥育牛の白色脂肪組織中の褐色脂肪細胞関連遺伝子の発現を検討したところ、Ucp1発現レベルはいずれの部位においても給与飼料間で有意な違いは認められなかったが、腸間膜脂肪におけるCIDEA, PRDM16およびTfamといった褐色脂肪組織において高発現する遺伝子の発現はTMR区の方が有意に低く、COX7a1やCOX8bもTMR区の方が低い傾向を示した。

(4) ホールクroppサイレージ飼料給与の影響を検討したところ、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子であるUCP1発現ならびにミトコンドリア生成を促進するPGC-1発現に関して給与飼料の影響はなかった。一方、褐色脂肪細胞分化を誘導する転写因子PRDM16、ならびに褐色脂肪細胞で高発現するCIDEAの腎周囲脂肪における発現はホールクroppサイレージ飼料給与により増加あるいは増加傾向を示した。

(5) 褐色脂肪前駆細胞の分化に対して、インスリンが第一義的に必要な因子であること、ならびに転写因子であるSrebp1cの発現誘導を介して分化を推進していた。

(6) 褐色脂肪前駆細胞の分化に関して、TGF- α ならびにアクチビンAは抑制活性を有していた。

(7) 白色脂肪前駆細胞株である3T3-L1細胞を定法の脂肪細胞分化プロトコールに加えてサイロキシン、ロシグリタゾン、イソブチルメチルキサンチンの長期処理により、Ucp1陽性脂肪細胞に分化することが示され、白色脂肪前駆細胞は条件次第で褐色脂肪細胞になり得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kanamori Y, Yamada T, Asano H, Kida R, Qiao Y, Abd Eldaim MA, Tomonaga S, Matsui T, Funaba M. Effects of vitamin A status on expression of Ucp1 and brown/beige adipocyte-related genes in white adipose tissues of beef cattle. (査読有) J Vet Med Sci. accepted.

Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, Nara T, Kato K, Matsui T, Funaba M. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. (査読有) J Vet Med Sci. 2014 76:57-64.

Yoshida H, Kanamori Y, Asano H, Hashimoto O, Murakami M, Kawada T, Matsui T, Funaba M. Regulation of brown adipogenesis by the Tgf- β family: involvement of Srebp1c in Tgf- β and

Activin-induced inhibition of adipogenesis. (査読有) Biochim Biophys Acta. 2013 1830:5027-35. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.036.

Asano H, Yamada T, Hashimoto O, Umemoto T, Sato R, Ohwatari S, Kanamori Y, Terachi T, Funaba M, Matsui T. Diet-induced changes in Ucp1 expression in bovine adipose tissues. (査読有) Gen Comp Endocrinol. 2013 184:87-92. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.01.006.

〔学会発表〕(計5件)

金森耀平・山田知哉・浅野宏輝・木田龍祐・喬宇航・友永省三・舟場正幸・松井徹. ウシ白色脂肪組織中における褐色脂肪細胞関連遺伝子の発現: ホールクroppサイレージ給与の影響. 第117回日本畜産学会大会. 2013.9.10 新潟大学.

浅野宏輝、日暮聡志、奈良貴幸、加藤健、舟場正幸、松井徹. 褐色脂肪細胞分化: 3T3-L1 白色脂肪前駆細胞を用いた試み. 第35回日本分子生物学会年会. 2012.12.13 マリンメッセ福岡.

浅野宏輝、日暮聡志、奈良貴幸、加藤健、舟場正幸、松井徹. 3T3-L1 白色脂肪前駆細胞を褐色脂肪細胞化する条件. 第51回日本栄養・食糧学会近畿支部大会. 2012.10.13 甲子園大学.

浅野宏輝、山田知哉、橋本統、佐藤龍、大渡しおり、金森耀平、寺地智弘、舟場正幸、松井徹. ウシ白色脂肪組織中における褐色脂肪細胞: TMR飼料給与の影響. 第62回関西畜産学会大会. 2012.9.14 ホテルアバローム紀の国.

梅本岳尚、浅野宏輝、山田知哉、舟場正幸、松井徹. ウシ白色脂肪組織中における褐色脂肪細胞関連遺伝子の発現. 第61回関西畜産学会大会. 2011.9.13 岡山大学.

〔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

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

(2) 研究分担者

山田 知哉 (YAMADA, Tomoya)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・研究員
研究者番号：80343987