

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450402

研究課題名(和文) 肥育牛の産肉形質を反映する遺伝子の解明とこれらを活用した肉用牛肥育技術の開発

研究課題名(英文) Elucidation of genes involved in meat production in fattening steers and development of beef cattle production using their expressions.

研究代表者

柴田 昌宏 (shibata, masahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター畜産・鳥獣害研究領域・上級研究員

研究者番号：60370631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肥育牛の様々な飼育環境における筋肉内遺伝子発現が牛肉生産と関係があることを明らかにした。筋肉内の遺伝子発現モニタリングは、肉用牛の肥育期間における筋肉内の蛋白質蓄積、脂肪蓄積等の生体反応を示唆することができ、肥育システムの改良のための有意義な情報となる。本研究では4グループの限られた遺伝子についての測定であったが、さらに多くのグループの遺伝子発現を測定することは、生体における多くの情報を得ることができる。遺伝子発現に基づく肥育システムの改良のためには、肥育・枝肉成績や筋肉内栄養成分等の牛肉生産と遺伝子発現との相関について、明らかにする研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that gene expression in skeletal muscle is related to beef productivity in various feeding environment of fattening steers. Monitoring gene expression in the skeletal muscle can be indicative of biological reactions, such as the protein and fat accumulation in the skeletal muscle, during fattening period of beef cattle, which may be able to provide useful information to improve fattening systems. Although the present study measured the expression of limited genes belonging to four groups, expression analysis of more gene in several groups may be able to obtain a large amount of information about the living body. To improve fattening systems based on gene expression, further studies are needed to elucidate the relationship between gene expression and beef production, including the growth and carcass performance and nutrient contents in the skeletal muscle.

研究分野：産肉生理

キーワード：肉用牛 肥育 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の形成機構の解明は、畜産分野のみならず医療分野においても重要である。この分野においてブレークスルーを引き起こしたのは、ミオスタチンの発見である (McPherron, 1997)。これは骨格筋の成長を抑制的に調節する因子として同定され、この機能欠損が起こったウシでは筋肉で特異的な肥大が起こる (Grobet, 1997)。また、筋細胞では、その増殖、分化の抑制作用が認められる (Thomas, 2000; Langley, 2002)。さらに、骨格筋の増殖、筋疾患の治療および運動機能の維持・強化を目的にミオスタチンを制御する物質が探索されている。この物質として拮抗作用を持つフォリスタチン (Amthor, 2004)、Zn イオン存在下でミオスタチンと結合し、筋細胞の増殖、分化を調節する細胞外マトリクス、デコリン (Kishioka, 2007)、高濃度で、ミオスタチンの発現を刺激し、筋細胞を休止期に誘導する HGF (Yamada, 2010) などが報告されている。このようにミオスタチンを制御する物質の存在が徐々に明らかになり、骨格筋形成機構の解明と共に、これらを活用した生体での応用研究が期待されている。

一方、こうした遺伝子情報を家畜生産へ応用するための基盤的研究として、胎子期から肥育終了時まで、肉用牛骨格筋におけるミオスタチンの発現解析から、胎子期および肥育中期に発現が上昇することを報告した (Shibata, 2006)。また、肉用牛の骨格筋損傷モデルにおいて、ミオスタチンおよび筋転写因子の発現解析を行い、再生過程におけるこれら遺伝子の発現変動を明らかにした (Shibata, 2006)。さらに、肥育中期に濃厚飼料多給から牧草多給に切替えた肉用牛では、切替え後に筋成長が抑制を受け、その後回復し、肥育終了時にその成長が亢進状態にあることをミオスタチンおよびミオシン重鎖の発現解析から明らかにした (Shibata, 2011 & 2012)。以上のことから、肥育過程において、骨格筋の成長に係わる遺伝子の発現プロファイルを解明することは、科学的根拠にもとづき、家畜の生産性を向上させるために重要と考える。また、給与飼料の違いがミオスタチンの発現に影響を及ぼすことから、飼料由来の何らかの物質、または飼料成分によって発現が誘導された生体内物質が、この発現を制御している可能性を示唆し、これは骨格筋形成機構の一部を担うものと考えられる。この物質の探索は、骨格筋形成のメカニズムを解明する上でも重要と考える。また、放牧牛の骨格筋で発現している蛋白質の網羅的解析 (プロテオーム解析) から、ストレスの指標となる蛋白質を同定した (Shibata, 2009)。このことから蛋白質または遺伝子の網羅的解析は、標的遺伝子のスクリーニングに有効な手段と考える。

以上から、肥育過程の肉用牛において、飼料条件の違いを反映してミオスタチンの発

現変動が起こり、この現象は、肥育成績および細胞レベルでの考察と合致するものであった。これらの事から、遺伝子の発現プロファイルを介して、肥育過程で肥育・枝肉成績、肉質等を推定できる可能性、ならびに、ミオスタチンの発現を制御する物質を解明することの必要性を認識し、本研究の着手に至った。

2. 研究の目的

通常肉用牛肥育は、濃厚飼料多給であるが、本研究では、この一部を飼料イネ WCS 等の粗飼料で代替、あるいはこれに放牧を組み合わせさせた飼養環境下で肉用牛を肥育する。この肉用牛の肥育過程で、肥育・枝肉成績、肉質等を反映する遺伝子の探索と同定、ならびに、その発現プロファイルを解明する。これらの達成は、肥育牛の屠畜前または肥育途中で肥育・枝肉成績、肉質等の推定、さらに、これらに対する給与飼料の影響も推定が可能となる。このためのキー遺伝子として、骨格筋成長の調節因子、ミオスタチンを取り上げる。給与飼料の違い等、飼養条件が異なる肉用牛骨格筋において、この遺伝子を含む骨格筋形成にかかわる遺伝子の発現プロファイルを示すと共に、給与飼料が骨格筋形成に及ぼす影響を生体レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 飼料イネ WCS 多給肥育における肥育過程での筋肉内遺伝子発現及びその肥育・枝肉成績の測定

黒毛和種去勢牛を対象に肥育中期から屠畜までの約 1 年間、濃厚飼料から代替した飼料イネ WCS を多給した。肥育期間において、筋肉内遺伝子発現の測定のため、骨格筋組織を経時的にバイオプシーにより採取し、28 ヶ月齢で屠畜後、枝肉成績の測定を行った。採取した筋肉組織は、凍結粉碎し、TRIZOL 試薬で RNA を抽出、cDNA を合成後、これをプレートにリアルタイム PCR により骨格筋形成にかかわる遺伝子の測定を行った。また、屠畜時に筋肉組織を採取し、脂質、タンパク質等の栄養成分の分析に供試した。

(2) 放牧仕上げ肥育時における筋肉内遺伝子発現及びその筋肉性状の測定

黒毛和種去勢牛を対象に肥育中期まで濃厚飼料多給とし、その後、肥育後期の約 5 ヶ月間、イタリアンライグラス優占草地に放牧し、28 ヶ月齢で屠畜後、筋肉試料を採取した。採取した筋肉組織は前述と同様、遺伝子発現測定のための試料として調製し、その測定を行った。また、せん断力価、筋肉内栄養成分等の筋肉性状の分析に供試した。

(3) 放牧後の飼料イネ WCS 多給肥育における肥育過程での筋肉内遺伝子発現及びその

肥育・枝肉成績の測定

黒毛和種去勢牛を対象に肥育前期にイタリアンライグラス優占草地で放牧し、その後、肥育中期以降、飼料イネ WCS を多給し、28 カ月齢で屠畜した。肥育期間において、筋肉内遺伝子発現の測定のため、骨格筋組織を経時的にバイオプシーにより採取し、屠畜時には脂質、タンパク質等の筋肉性状測定のための組織を採取し、分析に供試した。遺伝子発現測定のための試料は、前述と同様に調製し、その分析に供試した。

4. 研究成果

(1) 飼料イネ WCS 多給肥育における肥育過程での筋肉内遺伝子発現及びその肥育・枝肉成績の測定

供試牛は、16 カ月齢で濃厚飼料から飼料イネ WCS に切換え、その後、飼料イネ WCS を多給した。切換え直後の 19 カ月齢では、慣行区と比較して WCS 区でミオスタチン (MSTN) の発現増加とミオシン重鎖 (MyHC) の発現減少がみられ (図 1) また、この期間の日増体重 (DG) と飼料効率の減少が WCS 区で見られたため (表 1)、この時期に骨格筋の成長が抑制状態にあることを示唆している。25 カ月齢の WCS 区では試験期間において MSTN の発現減少と MyHC の発現増加 (図 1) および飼料効率の増加がみられたことから (表 1)、骨格筋成長が亢進状態にあることを示唆している。また、脂肪前駆細胞で発現している Pref-1 は、この月齢で慣行区と比較して WCS 区で増加がみられ (図 1) 脂肪合成が抑制状態であることを示唆している。肥育終了時の体重は、両区間で差がなかったものの、約 10% の差があったが (表 1)、28 カ月齢の MSTN 及び MyHC の発現状況から (図 1)、骨格筋成長は亢進状態を維持していると推測されるため、同条件での継続飼養により、さらなる増体が期待できるものと考えられる。

表 1 黒毛和種去勢牛の肥育・枝肉成績

	WCS	慣行
体重, kg		
10 カ月齢	300	299
16 カ月齢	503	512
28 カ月齢	707	770
日増体重 (DG), kg/d		
10-16 カ月齢	1.04	1.08
16-22 カ月齢	0.69*	0.96
22-28 カ月齢	0.50	0.48
飼料効率, 増体重/TDN 摂取量		
10-16 カ月齢	0.164	0.166
16-22 カ月齢	0.123*	0.142
22-28 カ月齢	0.101	0.082
枝肉成績		
枝肉重量, kg	439	485
コース芯面積, cm ²	44.7	52.7
ばら厚, cm	6.05	7.37
皮下脂肪厚, cm	2.55	3.78
牛脂肪交雑基準	4.7	5.2

* P<0.05

筋肉内栄養成分の分析では、半腱様筋にお

いて脂肪含量の減少が WCS 区で見られ (表 2)、これを支持する筋肉内 Pref-1 の発現増加が認められた。一方、腰最長筋ではその差はなく、また、牛脂肪交雑基準についても試験区間で差は認められなかった (表 1)。28 カ月齢時の WCS 区の Pref-1 発現は、慣行区のレベルまで低下していないものの、試験区内では減少傾向がみられるため (図 1)、同条件での継続飼養により筋肉内の脂肪蓄積が増加する可能性が考えられる。

表 2 黒毛和種筋肉内の栄養成分と理化学成分

	LL		ST	
	WCS	慣行	WCS	慣行
蛋白質, %	17.1	16.2	20.2	20.1
脂肪, %	25.0	30.3	8.15*	11.5
水分, %	56.7	52.3	70.1*	66.8
ビタミン類				
レチノール, µg/100g	26.8	21.8	8.75	8.50
βカロテン, µg/100g	19.0	ND	10.3	ND
αトコフェロール, mg/kg	15.6*	3.65	12.2*	2.88
理化学成分				
ドリップ 収, %	2.50	3.54	5.39*	6.86
クッキング 収, %	35.5	35.5	40.9	39.0
せん断力価, kg	1.17	1.19	2.83	2.48

LL: 腰最長筋, ST: 半腱様筋 * P<0.05

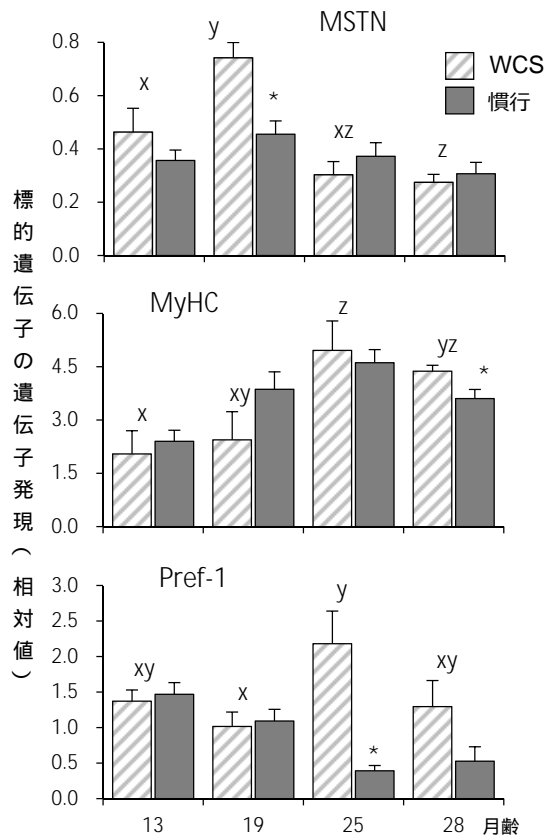


図 1 黒毛和種腰最長筋における遺伝子発現の推移 (試験区内同一文字間で有意差なし P>0.05、同一月齢において、* P<0.05)

遺伝子発現は、内部標準に GAPDH 遺伝子を用い、その相対値として表した。

(2) 放牧仕上げ肥育時における筋肉内遺伝子発現及びその筋肉性状の測定

供試牛は、肥育中期まで濃厚飼料多給とし、その後、肥育後期の約5ヵ月間、イタリアンライグラス優占草地に放牧し、28ヵ月齢で屠畜した。肥育終了時のMSTN発現は慣行区と比較して放牧区で発現減少がみられ、MyHCは一部の筋肉で発現増加がみられたが、MSTNと拮抗関係にあるフォリスタチン(FLST)は試験区間で差は認められなかった(表3)。また、筋肉内タンパク質含量は、放牧区の腰最長筋で増加がみられ(表4)、これは遺伝子発現の結果と矛盾しないものであった。これらは肥育末期においても筋肉の成長が活性化されていることを示唆している。脂肪合成の主要調節因子であるPPAR γ 2及びC/EBP α の発現は放牧区で減少がみられ(表3)、また、筋肉内脂肪含量の減少が放牧区でみられ(表4)、これらは放牧仕上げ肥育の末期において筋肉内脂肪合成が抑制状態であることを示唆している。

これらの遺伝子発現から、この条件での継続肥育では、骨格筋の成長は促進される可能性はあるが、筋肉内脂肪の蓄積は増加が見込めないと考えられる。

表3 肥育終了時における黒毛和種骨格筋での遺伝子発現

	LL		ST	
	放牧	慣行	放牧	慣行
MSTN	0.20*	0.33	0.30*	0.50
MyHC	15.8*	8.22	8.97	6.80
FLST	19.4	15.7	10.2	12.7
PPAR γ 2	0.64*	2.23	0.72*	1.85
C/EBP α	1.08*	1.96	1.79	2.85
HSP27	0.63*	1.06	0.16	0.56
HSP40	0.91*	1.65	0.44	0.66

LL: 腰最長筋、ST: 半腱様筋 * P<0.05

遺伝子発現は、内部標準にGAPDH遺伝子を用い、その相対値として表した。

熱ショック蛋白質(HSP)は、その分子種により様々な作用があり、HSP27はストレスマーカーとして、HSP40は肉の柔らかさと関係があると報告されている。放牧区ではHSP27の発現が慣行区よりも減少していたことから(表3)、放牧はストレス軽減効果があることが推測された。また、HSP27の放牧時のストレス応答について、既知ストレスマーカーIgGとN/L比を指標とした放牧試験において、これらの発現とHSP27の発現が一致した変動となることを報告し(データ未掲載)、HSP27の放牧時のストレスマーカーとしての有効性を示唆した(Shibata, 2014a)。

HSP40の発現は、放牧区の腰最長筋で減少、半腱様筋でその傾向がみられ(表3)、放牧牛肉で柔らかくなることが推察されたが、せん断力価では影響が認められなかった(表4)。

本研究では、遺伝子発現と肉質の関係について明確な関係が認められなかったが、肉質に影響を及ぼす遺伝子が幾つか報告されて

いる中、遺伝子発現と肉質の関係を明らかにし、これを活用した肉質判別のためには、さらなる研究が必要と考えられる。

表4 黒毛和種筋肉内の栄養成分と理化学成分

	LL		ST	
	放牧	慣行	放牧	慣行
蛋白質, %	19.7*	17.0	19.9	19.7
脂肪, %	11.3*	24.0	4.4*	9.5
水分, %	67.9*	57.8	74.2*	69.3
理化学成分				
クッキング収, %	-	-	41.8	37.6
せん断力価, kg	-	-	3.2	2.6

LL: 腰最長筋、ST: 半腱様筋 * P<0.05

(3) 放牧後の飼料イネWCS多給肥育における肥育過程での筋肉内遺伝子発現及びその肥育・枝肉成績の測定

供試牛は、10ヵ月齢から濃厚飼料多給で肥育し、その後、16-17ヵ月齢でイタリアンライグラス優占草地に約6ヵ月間放牧、22-23ヵ月齢から飼料イネWCS多給で舎飼いした後、28ヵ月齢で屠畜した。放牧直後は体重の著しい減少が観察され(図2)、放牧後の19ヵ月齢での遺伝子発現は、MSTNの発現増加、MyHCの発現減少がみられ(データ未掲載)、DGの減少がみられたことから、骨格筋成長が抑制状態にあると考えられた。その後、放牧末期では、MSTNの発現減少、MyHCの発現増加が認められ、さらに、舎飼いでの飼料イネWCS多給時は、慣行区と比較して放牧+WCS区でDGの増加がみられ、MSTN及びMyHCの遺伝子も骨格筋成長の活性化を示す発現が認められたことから、この時期に代償性成長が起こっている可能性を示唆している。

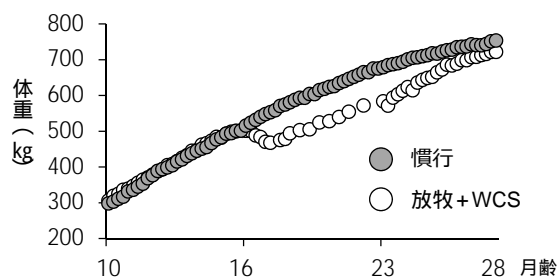


図2 黒毛和種去勢牛の放牧ならびに飼料イネWCS多給時の体重の推移

これら遺伝子発現及び肥育成績から、放牧肥育時は放牧導入時に生体の損耗を抑えることが課題である一方、放牧末期ではDGの改善と共に、生産性にポジティブな遺伝子発現が認められたことから、一定の条件が整った放牧であれば、黒毛和種でも放牧肥育が可能であることを示唆している。

筋肉内栄養成分は、放牧+WCS区で脂肪蓄積の減少及びタンパク質蓄積の増加が認められ、これらを支持する筋肉内遺伝子発現が認められた。

本研究では、肉用牛の肥育過程において肥育・枝肉成績、肉質等を反映する候補遺伝子について、多様な肥育条件下での詳細な発現プロファイルを作成し、生産性、産肉性との関係を解析した。この結果、肥育牛の骨格筋成長、脂肪蓄積等の生産性と関連のある幾つかの遺伝子を明らかにすることができた。また、放牧においては、この時のストレスマーカーについて、明らかにすることができ、放牧時以外でのこのマーカーの評価について、今後の展開が期待される場所である。以上から、これらの遺伝子の一部は給与飼料の違い等、飼養条件の違いにおいてもその発現量が変化することが明らかとなり、飼養環境の評価にも遺伝子の発現モニタリングが有効であることを示唆した。

一方、肉質、特に理化学特性と関係する遺伝子の特定及びその発現プロファイルの解析では、課題を残し、さらなる研究の余地があると考えられる。また、本研究では筋肉内遺伝子発現を評価ツールとしたが、生産現場において簡便に採取できる試料を使っての評価は、今後の課題と考える。

<引用文献>

McPherron A.C., Lawler A.M., & Lee S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 387, 83-90.

Grobet L., 他 11 名 & Georges M. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71-74.

Thomas M., 他 5 名 & Kambadur R. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 40235-40243.

Langley B., 他 4 名 & Kambadur R. (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 49831-49840.

Anthor H., 他 5 名 & Patel K. (2004). Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Developmental Biology*, 270, 19-30.

Kishioka Y., 他 5 名 & Nishimura T. (2008) Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity.

Journal of Cellular Physiology, 215, 856-867.

Yamada M., 他 8 名 & Allen R.E. (2010) High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo. *American Journal of Cell Physiology*, 298, C465-C476.

Shibata M., 他 4 名 & Kadowaki M. (2006) Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Science*, 84, 2983-2989.

Shibata M., 他 6 名 & Chikuni K. (2011) Influence of different feeding systems on the growth performance and muscle development of Japanese Black steers. *Meat Science* 89, 451-456.

Shibata M., 他 7 名 & Yamamoto N. (2012) Effect of Grass Hay Feeding on Meat Production, Carcass Characteristics, and Meat Quality in Japanese Black Steers. *Bulletin of NARO Western Region Agricultural Research Center* 11, 15-25.

Shibata M., 他 6 名 & Chikuni K. (2009) Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle. *Journal of Animal Science*, 87, 2700-2708.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Shibata M., Hikino Y., Imanari M., Matsumoto K., Yamamoto N. (2016) Influence of a rice whole-crop silage diet on growth performance, carcass and meat characteristics and muscle-related gene expression in Japanese Black steers. *Animal Science Journal*. 87: 929-937.(査読有)

Shibata M., Hikino Y., Imanari M., Matsumoto K., Yamamoto N. (2016) Effect of a rice whole crop silage diet on carcass characteristics and expression of gene involved in muscle growth in Japanese black steers. *62nd International Congress of Meat Science and Technology Proceedings*. P07-07.(査読有)

Shibata M., Hikino Y., Imanari M.,

Matsumoto K., Yamamoto N. (2015) Influence of feeding a rice whole crop silage after grazing on growth performance and meat quality in Japanese Black steers. 61st International Congress of Meat Science and Technology Proceedings. 5-33. (査読有)

Shibata M., Hikino Y., Matsumoto K., Yamamoto N. (2014a) Influence of housing density and grazing on heat shock protein 27 expression in skeletal muscle of beef cattle. Journal of Fisheries and Livestock Production 2: 21000117. (査読有)

Shibata M., Matsumoto K., Hikino Y., Yamamoto N. (2014b) Effect of indoor concentrate feeding vs. outdoor grazing on the expression of genes involved in muscle growth and nutrient content in Japanese Black steer muscle. Open Journal of Animal Sciences. 4: 297-304. (査読有)

Shibata M., Matsumoto K., Hikino Y., Yamamoto N. (2014c) Rice whole crop silage feeding and grazing: growth performance, carcass characteristics and meat quality in Japanese Black steers. 60th International Congress of Meat Science and Technology Proceedings. S-II-09. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

柴田昌宏. 地域自給飼料を活用した黒毛和牛肥育. 日本産肉研究会第18回学術集会. 2016.11.3 ビッグハート出雲(島根県・出雲市)

柴田昌宏, 曳野泰子, 松本和典, 山本直幸. 暑熱期の飼料イネ WCS 給与が黒毛和種去勢牛の生産性に及ぼす影響. 日本畜産学会第120回大会. 2015.9.12 酪農学園大学(北海道・江別市)

柴田昌宏, 曳野泰子, 今成麻衣, 松本和典, 室谷進, 中島郁世, 山本直幸. 黒毛和種去勢牛の放牧ならびに飼料イネ WCS 給与が肥育・枝肉成績、肉質に及ぼす影響. 日本畜産学会第119回大会. 2015.3.29 宇都宮大学(栃木県・宇都宮市).

柴田昌宏, 松本和典, 曳野泰子, 室谷進, 大江美香, 大谷一郎, 山本直幸. 飼料イネ WCS 給与が黒毛和種去勢牛の肥育成績、筋肉内遺伝子発現に及ぼす影響. 日本畜産学会第117回大会. 2013.9.10 新潟大学(新潟市・西区)

(1)研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA, Masahiro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・西日本農業研究センター 畜
産・鳥獣害研究領域・上級研究員
研究者番号：60370631