

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18772

研究課題名(和文)オートファジーは黒毛和種の産肉成績に影響を与えるのか?

研究課題名(英文)Effect of autophagy on meat productivity and quality of Japanese Black cattle

研究代表者

仲西 友紀(Nakanishi, Tomonori)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20717889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内タンパク質のバルク分解機構である。近年の研究で、骨格筋の成長や機能にオートファジーが深く関与することが明らかとなったが、一方で、これらの知見を食肉生産に応用させた研究例は少ない。本研究では、黒毛和種の骨格筋におけるオートファジー関連遺伝子の発現を調査し、LC3等がウシの成長に伴って高発現することが明らかになった。本研究により、オートファジーが肉用牛の産肉成績に影響を与える可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is the bulk degradation process for intracellular components in eukaryotic cells, and is reported to be important in maintaining muscle homeostasis. However, there is little information concerning the involvement of autophagy on meat productivity and quality. In this study, we investigated the expression levels of autophagy-related genes in skeletal muscle of Japanese Black cattle. Results indicated that several autophagy-related genes such as LC3 were upregulated during the fattening period. This finding implies that autophagy is a potential mediator of meat productivity and meat quality.

研究分野：畜産食品科学

キーワード：オートファジー 黒毛和種 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内タンパク質のバルク分解機構であり、オートファゴソームに取り込んだ物質をリソソームに運び込むことで非特異的に分解する。近年の研究でオートファジーの分子機構や生理的意義に関する理解が飛躍的に進み、医学・生理学の分野では、神経性疾患、免疫・炎症疾患などに関する応用研究も進展している。

骨格筋においても、オートファジーが担う役割の重要性が明らかになっている。オートファジーは不要タンパク質を分解する側面と、分解物(アミノ酸)を新たなタンパク質合成に供給する側面を併せ持つ。そのため、過剰なオートファジーのみならず、オートファジーの欠陥もまた、筋肉量や筋力の低下をもたらすことが、マウス等を用いた研究で示されている。即ち、オートファジーによる、筋タンパク質の合成と分解のバランス制御は、骨格筋を維持・成長させる上で極めて重要と考えられる。一方、食肉の大部分は家畜骨格筋であるにも関わらず、オートファジーの知見を動物生産科学に応用させた研究は進んでおらず、オートファジーが家畜の成長や産肉成績に影響を与えるのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は黒毛和種の成長や産肉成績に与えるオートファジーの影響を明らかにするための基礎研究である。研究の具体的な目的は以下の通りである。

- 1) 肥育期間中の黒毛和種去勢牛を対象に試験を実施する。骨格筋サンプルをバイオプシーで定期的に採取し、オートファジー関連遺伝子の発現変動を mRNA レベルで明らかにする。
- 2) 骨格筋量に関する一指標として、筋分化関連遺伝子の発現変動を解析し、オートファジーとの関連性を調査する。
- 3) オートファジー以外のタンパク質分解機構としてユビキチン・プロテアソーム系に着目し、同系に関連する遺伝子の発現変動を調査する。
- 4) 供試牛を出荷後に、部分肉を購入し、肉質評価として、保水性、剪断力価、遊離アミノ酸含量の測定を実施する。
- 5) 上記の結果を牛別に比較し、肥育期間中に生じるオートファジーが、黒毛和種の成長や産肉成績に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、宮崎大学農学部住吉フィールドで肥育中の黒毛和種去勢牛を対象に実施した。平成 28 年度までに出荷する 6 頭を対象として、肥育中期にあたる 15 ヶ月齢から調査を開始した。調査期間中の飼養管理は、同フィールドで通常用いている条件に従った。即ち、試験開始から 17 ヶ月齢の間に濃厚飼

料(粗タンパク質 13%、可消化養分総量 73%)の給餌量を 10 kg/日・頭まで増加させた。24 ヶ月齢以降は、濃厚飼料の 1.5 kg を皮付き圧べん大麦に置き換えることでデンプン質の組成比を高め、仕上げを行った。ニードルバイオプシーを用いて、胸最長筋(ロース)、中殿筋(ランプ)および半膜様筋(モモ)から骨格筋サンプルを継時的(15 ヶ月齢から 27 ヶ月齢までの間に各牛 3 回もしくは 4 回)に採取した。

- 1) オートファジー関連遺伝子、筋分化関連遺伝子およびユビキチン・プロテアソーム系関連遺伝子の発現解析

バイオプシーで取得した骨格筋サンプルから total RNA を抽出した。total RNA を cDNA に逆転写した後に、オートファジー関連遺伝子(LC3, GABARAP, ATG7, Beclin-1)の発現解析を定量的 PCR 法で実施した。また、筋分化関連遺伝子(myogenin, MyoD, Myf5, myostatin)やユビキチン・プロテアソーム系関連遺伝子(MuRF-1, Atrogin-1)の発現解析も同様の手法で行った。なお、内在性コントロール遺伝子として 18S rRNA の発現量も調査した。発現解析には AriaMx リアルタイム PCR システム(アジレント・テクノロジー株式会社製)を用いた。

- 2) 肉質に関する評価

試験対象牛を出荷後、ロースおよびモモを購入し、肉質に関する評価を実施した。保水性は遠心保水性を評価することでを行い、牛肉サンプルを 4、4,600 rpm で 30 分間遠心分離し、遠心分離前後の重量差として算出した。肉の硬さはレオメーター(YAMADEN 社製)で剪断力価を評価した。更に、呈味成分として、遊離アミノ酸の量を測定した。即ち、牛肉サンプルを 5.4% トリクロロ酢酸中でホモジナイズし、トリクロロ酢酸をジエチルエーテルで除去することで遊離アミノ酸の抽出を行い、これを LC/MS 高速アミノ酸分析システム(島津製作所社製)を用いて分析した。

4. 研究成果

- 1) オートファジー関連遺伝子の発現変動

オートファジー関連遺伝子について、Beclin-1 や GABARAP の遺伝子発現量に日齢に伴う変動は認められなかった。一方で、図 1 に示すように、LC3 は全ての骨格筋部位で、日齢に伴い発現量が増加することが明らかになった(ロース: $r=0.5628$ $P<0.01$, ランプ: $r=0.4943$ $P<0.05$, モモ: $r=0.4738$ $P<0.05$)。また、図 2 に示す通り、ATG7 遺伝子の発現量についても日齢に伴

う増加が認められた (ロース : $r=0.5382$ $P<0.05$, ランプ : $r=0.5009$ $P<0.05$, モモ : $r=0.3115$ $P=0.1943$)

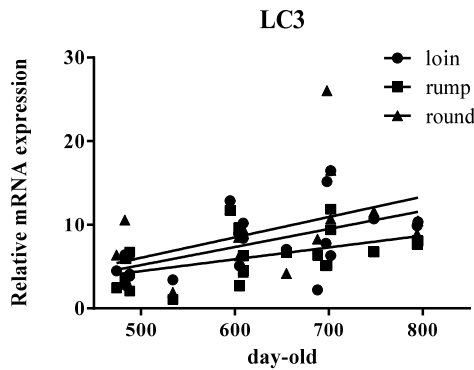


図 1 : 黒毛和種の骨格筋における LC3 遺伝子の発現変動

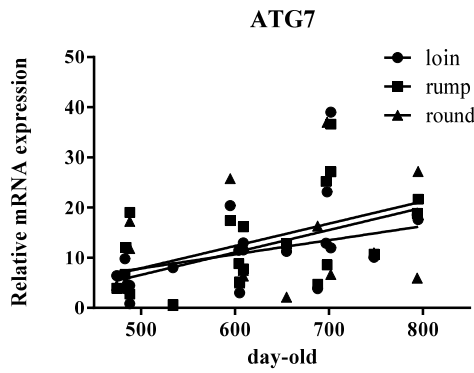


図 2 : 黒毛和種の骨格筋における ATG7 遺伝子の発現変動

2) 筋分化関連遺伝子の発現変動

骨格筋の分化・成長を正に制御する遺伝子について、図 3 に示す通り、ランプにおける myogenin の発現量が日齢に応じて増加していた (ロース : $r=0.2160$ $P=0.3603$, ランプ : $r=0.5680$ $P<0.01$, モモ : $r=0.2714$ $P=0.2610$)

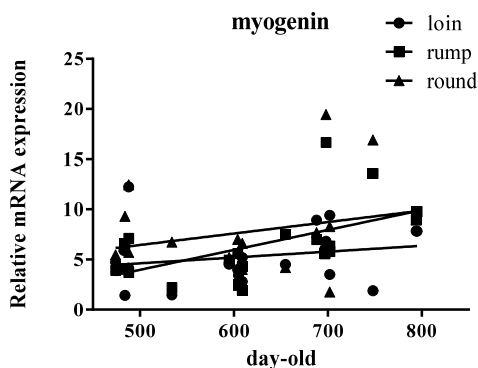


図 3 : 黒毛和種の骨格筋における myogenin 遺伝子の発現変動

また、図 4 の通り、Myf5 の発現量についても同様の変動が認められた (ロース : $r=0.1749$ $P=0.4609$, ランプ :

$r=0.5517$ $P<0.05$, モモ : $r=0.09675$ $P=0.6936$)

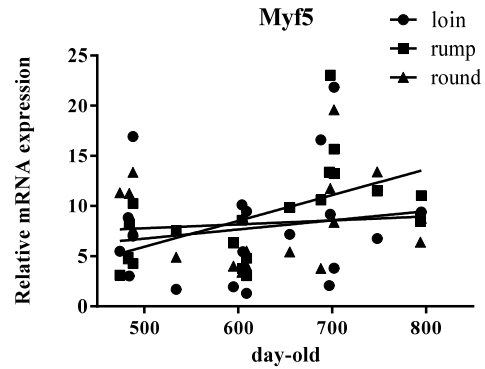


図 4 : 黒毛和種の骨格筋における Myf5 遺伝子の発現変動

一方で、MyoD や筋分化を負に制御する myostatin の発現量に関しては特徴的な変動は見られなかった。

3) ユビキチン・プロテアソーム系遺伝子の発現変動

図 1 や図 2 に示す変動がオートファジー遺伝子に特異的なのかを確認するために、他のタンパク質分解機構としてユビキチン・プロテアソーム系の遺伝子群に関する調査も実施した。結果として、MuRF-1 や Atrogin-1 の発現量には日齢に応じた変動は認められなかった。

4) 肉質評価

ロースとモモの肉質を比較した。遠心保水性についてはロースがモモより高い傾向を示した。一方で、ロイシン量、チロシン量および遊離アミノ酸総量はロースと比較してモモが有意に高く、破断強度もロースよりモモが高い値を示した。

以上のことから、オートファジーが黒毛和種の骨格筋の成長に影響を与える可能性が示された。一方で、オートファジー遺伝子の発現に関して、骨格筋部位特異的な変動は認められなかった。骨格筋部位による肉質の差にオートファジーが関与しているのか否かを明らかにするためには、今後更なる検討・解析が必要であると考えられた。

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 2 件)

- (1) Nakanishi T., Tokunaga Y., Yamasaki M., Erickson L., Kawahara S. Orally administered conjugated linoleic acid ameliorates allergic dermatitis induced by repeated applications of

- oxazolone in mice. Animal Science Journal, 2016, 87, 1554-1561. 査読有
DOI: 10.1111/asj.12603
- (2) Nakanishi T., Anraku M., Suzuki R., Kono T., Erickson L., Kawahara S. Novel immunomodulatory effects of phytanic acid and its related substances in mice. Journal of Functional Foods, 2016, 21, 283-289. 査読有
DOI: 10.1016/j.jff.2015.12.028

〔学会発表〕(計4件)

Yamashita M., Kawahara S., Morita T., Kaminaka S., Sakakibara Y., Nakanishi T. Protein degradation by autophagy during postmortem storage of mouse skeletal muscle. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, August 23th 2016, Kyushu Sangyo University, Fukuoka.

Suzuki R., Nakanishi T., Matsushita Y., Kawahara S. Phytanic acid and pristanic acid contents in milk and dairy products originated from Japan and European countries. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, August 25th 2016, Kyushu Sangyo University, Fukuoka.

安樂真悠子、鈴木遼司、河野智哉、河原聡、仲西友紀、フィタン酸およびその関連物質の新規免疫調節作用、日本畜産学会第121回大会、2016年3月29日、日本獣医生命科学大学、武蔵野市

鈴木遼司、仲西友紀、河原聡、反芻動物由来の分岐鎖脂肪酸フィタン酸及びプリスタン酸の定量法、日本畜産学会第120回大会、2015年9月11日、酪農学園大学、江別市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲西 友紀 (NAKANISHI TOMONORI)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20717889

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし