

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03903

研究課題名(和文)肥育牛骨格筋におけるエネルギー浪費の新奇メカニズムの解明

研究課題名(英文)Exploration of novel mechanism underlying energy expenditure of skeletal muscle of fattening cattle

研究代表者

松井 徹 (Matsui, Tohru)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40181680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの哺乳類において、褐色・ベージュ脂肪細胞でのみ発現している脱共役タンパク質(UCP)1は、これらの細胞における熱産生の責任分子である。肥育牛ではこれらの細胞に加えて筋組織でも発現することを先に明らかにした。本研究では、肥育牛筋組織におけるUCP1発現に影響を及ぼす要因に関して、動物試験ならびに細胞培養試験から検討した。26か月齢で屠畜した肥育牛よりも30か月齢で屠畜した肥育牛の方が筋組織でのUCP1発現は高いことが明らかになった。また、肥育牛の筋由来細胞を用いた解析により、TGF-ファミリーがUCP1発現を制御していることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱共役タンパク質(UCP)1はエネルギーを浪費するタンパク質で、特殊な脂肪細胞でのみ発現すると理解されていた。しかし、肥育牛筋組織でもUCP1を発現することを先に明らかにした。肥育牛におけるUCP1は、肥育効率(飼料摂取量当たりの増体)の観点から不要な存在といえる。筋組織でのUCP1発現レベルは、26か月齢で屠畜した肥育牛よりも30か月齢で屠畜した肥育牛の方が高かった。また、肥育牛の筋由来細胞を用いた解析により、TGF-ファミリーがUCP1発現を制御していることも明らかにした。これらの結果の集積は、より効率的な肉牛生産法の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In many kinds of mammals, uncoupling protein (UCP) 1, a principal protein of non-shivering thermogenesis, is exclusively expressed in brown/beige adipocytes. We previously identified that UCP1 is also expressed in the skeletal muscle of fattening cattle. The present study explored factors affecting UCP1 expression in animal study as well as cell culture study. Expression levels of muscular UCP1 were higher in cattle aged 30 months than in those aged 26 months. Cell culture using bovine myogenic cells indicated that TGF- family regulates UCP1 expression.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：畜産学 栄養学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥育牛では、基礎代謝量(維持のための正味エネルギー量)は、必要とされる全てのエネルギーの50%を大きく上回る。白色脂肪細胞におけるエネルギー消費は、それ以外の細胞のエネルギー消費より著しく小さい。そのため、肥育による体脂肪率増加に伴って、体重当たりの基礎代謝量は激減するはずであるが、代謝体重(体重^{0.75})当たりの基礎代謝量は一定であり、体重当たりで示してもわずかに減少するのみである。

(2) この結果は、肥育の進行に伴い、基礎代謝が亢進することを示している。

(3) 濃厚飼料を多給された肥育牛では、絶食時熱生産が増加するが、この増加は、未知の熱生産器官の増加に起因することが示唆されている。つまり、肥育時には、基礎代謝が亢進するため、エネルギー利用効率は低下する。この問題は、肥育にとって極めて重要であるが、原因は解明されていない。

(4) 脱共役タンパク質(UCP)1はATP生産に使われるべきエネルギーを熱に変える「エネルギー浪費」タンパク質である。UCP1は褐色脂肪細胞・ベージュ脂肪細胞のみが特異的に発現しているとされていた。寒冷環境や体脂肪増加は交感神経の活性化により、褐色脂肪細胞・ベージュ細胞におけるUCP1発現増加を介した非ふるえ熱産生を増加させる。

(5) ウシでは、褐色脂肪細胞は出生直後に消失するとされてきた。

(6) 研究代表者らは、黒毛和種後期肥育牛の脂肪組織でUCP1遺伝子が発現しており、濃厚飼料を多給するとUCP1遺伝子発現が増加すること、脂肪組織にはUCP1を発現している多房性のベージュ脂肪細胞が存在していることを明らかにしている。

(7) TGF-βファミリーのBMPは褐色脂肪細胞分化に必須であり、同じファミリーのTGF-βやアクチピンは分化を抑制すること、褐色脂肪細胞の分化方向を転写因子であるPRDM16が決定しているが、ビタミンAを制限した黒毛和種肥育牛の脂肪組織ではPRDM16ならびにUCP1の発現が増加すること、ビタミンA制限や濃厚飼料の多給(体脂肪増加)は、黒毛和種肥育牛の脂肪組織におけるTGF-βファミリーの発現やその受容体の発現に影響することを見出してきた。

(8) 骨格筋も寒冷環境下では非ふるえ熱産生に貢献しており、褐色脂肪組織が著しく発達しているげっ歯類でも骨格筋は褐色脂肪細胞より非ふるえ熱産生に大きく貢献している。褐色脂肪細胞は骨格筋由来であり、PRDM16はその分化を決定しているが、PRDM16は骨格筋を含め多くの組織で発現している。

(9) 研究代表者らは、「筋肉内脂肪細胞は褐色脂肪細胞である」との仮説を立て、黒毛和種肥育牛の骨格筋に着目し、骨格筋におけるUCP1発現を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。その結果、脂肪組織より著しく多くのUCP1発現細胞が存在すること、この骨格筋由来の間質脈管系細胞を脂肪細胞に分化させるとUCP1発現が減少することを見出している。

(10) したがって、黒毛和種肥育牛では、脂肪組織におけるベージュ脂肪細胞よりも骨格筋におけるUCP1発現細胞が非ふるえ熱産生に大きく貢献している可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、黒毛和種肥育牛の筋組織でUCP1を発現する細胞の特定、ならびに、飼養条件の変化に応じた骨格筋UCP1遺伝子の発現変化を明らかにすることである。

(2) また、ウシ筋系細胞におけるUCP1発現に影響を及ぼす因子の同定とその機構を明らかにすることも本研究の目的である。

(3) UCP遺伝子はファミリーを形成しており、他のUCPの発現制御を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 黒毛和種肥育牛の骨格筋におけるUCP1タンパク質の局在を免疫組織化学的手法により検討した。

(2) 黒毛和種肥育牛におけるビタミンA制限の影響を検討した。京都大学農学研究科附属牧場で飼育されている黒毛和種肥育牛を用い、半数の牛にはビタミンA制限飼料を給与し、残りには対照飼料を給与した。30か月齢に達した時点で屠畜し、頸部最長筋、皮下脂肪、腸間膜脂肪を採取し、UCP1などの遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRで測定した。

(3) 黒毛和種肥育牛におけるビタミン C 補給ならびに肥育期間の影響を検討した。京都大学農学研究科附属牧場で飼育されている黒毛和種肥育牛を、肥育時にビタミン C を補給した(しない)群、出荷時の月齢を 26 か月齢、あるいは 30 か月齢とした群のいずれかに割り当て、頸部最長筋ならびに皮下脂肪を採取し、UCP1 などの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で検討した。

(4) 頸部最長筋より単離した筋衛星細胞の UCP1 発現に及ぼす影響を検討した。マウスやヒトの褐色・ベージュ脂肪細胞において、ホルスコリン(A キナーゼ活性化剤)、レチノイン酸、TGF- β ファミリーが UCP1 発現に影響を及ぼすことが明らかにされている。また、先の試験で、UCP1 発現は筋分化に伴って増加傾向にあることを示している。TGF- β ファミリーは筋分化に影響を及ぼすことから、筋分化の調節を通して UCP1 発現が変化する可能性もある。したがって、これらの因子が UCP1 発現に及ぼす影響を検討した。

(4) 肝臓由来細胞である HepG2 や Hepa1-6、脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を様々な酸化ストレス誘導剤(過酸化水素、エタノール、クメンヒドロペルオキシド)で処理し、酸化ストレスマーカーであるヘムオキシゲナーゼ-1 発現ならびに UCP2 発現を検討した。また、様々なリガンド、恒常活性型受容体、転写(調節)因子の発現ベクターをウシ UCP2 プロモーターレポーターとともに遺伝子導入し、UCP2 遺伝子転写に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 先の試験で用いた UCP1 抗体と異なる UCP1 抗体を用いて、筋組織中に存在する UCP1 陽性細胞を検討したところ、先の試験と同様、筋線維の周辺部に存在する多くの細胞で発現していることを確認した。

(2) ビタミン A 制限が UCP1 発現に及ぼす影響を検討した。供試牛の筋組織中での UCP1 発現に関して、検出下限未満の個体が複数いたので、ビタミン A 制限が筋組織中の UCP1 発現に及ぼす影響は明らかではなかった。UCP1 発現が極端に低い個体がいいた理由は不明である。一方、皮下脂肪や腸間膜脂肪における UCP1 発現は、ビタミン A 制限によって高い値を示したが、統計的には有意ではなかった。また、ビタミン A 制限群の方が、いくつかの褐色・ベージュ脂肪細胞関連遺伝子(皮下脂肪: Cidea, Pgc-1 α ; 腸間膜脂肪: Cidea, Dio2, Nfia) 発現が有意に高い、もしくは、高い傾向を示した。

(3) ビタミン A 制限飼料を摂取した一頭の肥育牛では、皮下ならびに腸間膜脂肪における UCP1 発現が極端に高く、この個体の一日当たり増体量、肥育後期の飼料効率、枝肉重量、皮下脂肪厚、ばらの厚さは他の個体の 95%信頼区間の下限未満であり、UCP1 高発現による熱産生が原因でエネルギー消費が高くなり、これらの結果につながった可能性が示唆された。

(4) 肥育期間ならびにビタミン C 補給が肥育牛骨格筋における UCP1 発現に及ぼす影響を検討した結果、頸部最長筋での UCP1 発現は、26 か月齢で屠畜した肥育牛よりも 30 か月齢で屠畜した肥育牛の方が高いことが明らかになった。UCP1 発現がエネルギーの無駄遣いを反映することを考えると、これらの結果は、肥育の進行に伴うエネルギー利用効率の低下に筋組織における UCP1 発現の関与が考えられる。一方、皮下脂肪における UCP1 発現は、ビタミン C 補給により減少することが明らかになった。

(5) 筋分化後の細胞にホルスコリン(10 μ M)あるいはレチノイン酸(0.1, 1 あるいは 10 μ M)処理を行っても UCP1 発現は明瞭な変動を示さなかった。

(6) レチノイン酸の影響は、筋分化期間を通して処理した場合も、筋分化前に処理した場合も認められなかった。

(7) 筋分化誘導に応じて TGF- β ファミリーのうちの TGF- β /アクチピンのシグナルメディエーターの一つである Smad3 のリン酸化が誘導され、このリン酸化は、少なくとも分化誘導後 10 日間継続した。一方、同じファミリーの BMP のシグナルメディエーターである Smad1/5/8 のリン酸化は、分化誘導前後を通して認められた。

(8) 分化誘導後 4~8 日目に TGF- β /アクチピンシグナルの阻害剤である A-83-01 (5 μ M)処理、あるいは、分化誘導前(0 日目)から誘導 6 日後まで BMP シグナルの阻害剤である LDN-193189 (100 nM)処理を行った。Myod や Myog などの筋分化制御因子によって筋分化は促進される。骨格筋の筋線維はミトコンドリアを豊富に含みミトコンドリア酵素活性が高い遅筋と運動時に主としてグリコーゲンをエネルギー源とする速筋に大別できる。それぞれの筋線維で優先的に発現する筋原線維が知られており、Myh1 は主として速筋で発現し、Myh7 は遅筋、Myh2 は中間型筋線維で高発現する。A-83-01 処理により Myod や Myog 発現は増加した。この結果

は、内因性の TGF- β /アクチビン活性は筋分化を抑制していることを示唆する。筋原線維の発現を検討したところ、Myh1 と Myh2 は A-83-01 処理により増加したが、Myh7 発現には影響しなかった。また、A-83-01 により UCP1 発現は増加したが、統計的に有意ではなかった。つまり、TGF- β /アクチビン活性は筋分化制御を通して UCP1 発現に影響する可能性が考えられた。

(9) 一方、LDN-193189 処理は、筋分化制御因子ならびに筋原線維遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。また、UCP1 を除く褐色・ベージュ脂肪細胞関連遺伝子発現にも影響を及ぼさなかった。しかしながら、UCP1 発現は LDN-193189 によって有意に増加した。つまり、内因性の BMP 活性は UCP1 発現を抑制している可能性が考えられた。マウスやヒトの知見では、BMP は褐色・ベージュ脂肪細胞分化促進を通して UCP1 発現を高めることが明らかにされている。本研究では、むしろ BMP の UCP1 抑制活性が明らかになった。UCP1 発現制御における BMP の役割に関して、マウス・ヒトの褐色・ベージュ脂肪細胞での知見とウシ筋系細胞での知見が正反対の結果を示したことが、動物種差に起因するのか、細胞種に起因するのかは今後の検討課題と考えられた。

(10) UCP1 とは異なり UCP2 は多くの臓器で発現する。また、UCP2 は活性酸素の除去に関わっていることが知られている。酸化ストレスが UCP2 発現に及ぼす影響を検討したところ、Hepa1-6 マウス肝臓由来細胞や 3T3 - L1 マウス脂肪前駆細胞では酸化ストレスの誘導に対して UCP2 発現は変化を示さなかった。

(11) 研究代表者らが樹立した転写調節要因スクリーニングの系により、ウシ UCP2 遺伝子転写は、Smad3、Xbp1、C/ebp β 、ERR β 、TAZ、c-Jun、JunB などにより促進される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（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hsuan-Ju Chen, Tsubasa Ihara, Hidetugu Yoshioka, Erina Itoyama, Shoko Kitamura, Hiroshi Nagase, Hiroaki Murakami, Yoichiro Hoshino, Masaru Murakami, Shozo Tomonaga, Tohru Matsui, Masayuki Funaba	4. 巻 96
2. 論文標題 Expression Levels of Brown/Beige Adipocyte-Related Genes in Fat Depots of Vitamin A-restricted Fattening cattle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Animal Science	6. 最初と最後の頁 3884-3896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jas/sky240.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木実佳、Wong Yun Yi、友永省三、吉岡秀貢、糸山恵理奈、北村祥子、長瀬祐士、村上弘明、星野洋一郎、舟場正幸、松井 徹
2. 発表標題 黒毛和種肥育牛におけるビタミンA制限が筋組織と皮下および腸間膜脂肪の低分子代謝物質濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第124回日本畜産学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友永省三、熊谷元、星野洋一郎、吉岡秀貢、糸山恵理奈、北村祥子、長瀬祐士、舟場正幸、松井徹
2. 発表標題 肥育期の黒毛和種牛にビタミンC補給が及ぼす影響
3. 学会等名 第125回日本畜産学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kim Doo Hyun、定兼熙幸、村上賢、舟場正幸、松井徹
2. 発表標題 脱共役タンパク質2 (UCP2)発現・転写に関わる因子
3. 学会等名 第69回関西畜産学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	舟場 正幸 (Funaba Masayuki) (40238655)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	