

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292158

研究課題名(和文) ケメリンと他のアディポカインの相互作用の解析によるウシ体脂肪蓄積と脂質代謝の解明

研究課題名(英文) The analysis of interaction of chemerin and other adipokines in bovine fat accumulation and lipid metabolism

研究代表者

盧 尚建 (ROH, SANGGUN)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90322130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Chemerinについて離乳期と乳牛の泌乳期の代謝移行期における生理的機能を解明することを目的とした。肝臓におけるChemerinのタンパク質発現は離乳後に低下していたが、Chemerinは離乳期のインスリン分泌調節には関与せず、肝臓におけるプロピオン酸からの糖新生を調節した。乳牛ではChemerinの肝臓における発現量および血中量は分娩直後に低下していたが、この変化は肝臓の糖新生調節に直接的には関与しないことが明らかになった。以上のことから、ウシにおいてChemerinの発現・分泌は代謝移行期にダイナミックに変化し、脂質代謝または糖代謝の調節に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate the physiological function of chemerin in the metabolism transitional period of weaning and lactating dairy cattle. Protein expression of Chemerin in the liver was reduced after weaning, but chemerin regulated the gluconeogenesis by propionic acid in the liver without the regulation of insulin secretion in the weaning period. Chemerin gene expression and secretion was reduced in liver of dairy cows after delivery, but this change is directly related with the regulation hepatic gluconeogenesis. This results suggest that the expression and secretion of chemerin in cattle dynamically changes the metabolism transition and revealed to be involved in the regulation of lipid metabolism or glucose metabolism.

研究分野：動物生理学

キーワード：ウシ Chemerin Weaning Lactation dairy cattle

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪組織は、エネルギーの貯蔵庫として、また、アディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌する内分泌器官として、エネルギーバランスや摂食の調節など、生体において非常に重要な役割を演じていることが知られている。畜産分野においては、脂肪組織は枝肉の嗜好性を決定する上で重要な要素であると考えられている。しかしながら、脂肪蓄積の分子機構は未だ多くの不明な点を残しており、その解明は畜産分野のみならず、様々な分野における研究標的として重要視されている。

(2) 最近の研究により、家畜の体内で脂質蓄積と糖脂質代謝に重要な役割をする脂肪組織由来の分泌タンパク質(アディポカイン、Adipokine)が多数報告され、生体内で様々な生理活性を有し、有効な因子であることが知られている。そのアディポカインの中で、申請者は新規アディポカインとしてマウスとウシケメリンを分離、同定し、脂肪細胞分化・形成過程にケメリン(Chemerin)とその受容体の遺伝子とタンパク質の発現が上昇し、脂質分解を促進することを報告している。さらに、反芻動物においてケメリンアナログ投与によりインスリン分泌が上昇し、糖脂質代謝を調節する可能性を示唆した(業績番号8)。しかし、ウシの脂肪蓄積と脂質代謝調節におけるケメリンの生理学的な作用機構については不明なところが多い。したがって、本研究はウシケメリンの分泌動態、糖と脂質代謝におけるケメリンの生体内の応答の比較、黒毛和種の枝肉形質とケメリン、ケメリン受容体、ケメリンプロモーターの一塩基多型との関連解析、培養脂肪細胞と肝細胞からのケメリン分泌調節機構を調査することにより、新規アディポカインのケメリンの産生制御機構とその利活用について模索するものである。ケメリンの産生と調節に関する Adipokinome(アディポカインの網羅的解析)の研究成果は、脂肪蓄積と脂質代謝調節による黒毛和種牛と乳牛の栄養管理(健全性の向上)への新たな方向性を示すことになり、高品質の畜産品の生産において大いに期待できるものである。

## 2. 研究の目的

In vivo 実験によりウシケメリンと他のアディポカインの分泌動態の解析とケメリンによる体内代謝産物の調節メカニズムを明らかにする。また、ケメリンゲノム情報と枝肉形質との関連を明らかにする。平成26年度以降は In vitro 実験により培養脂肪細胞、肝細胞と乳腺上皮細胞を用いてケメリン分泌に対する分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ホルスタイン種仔牛における Chemerin と Chemerin 受容体発現の組織分布

ホルスタイン種仔牛(2~3ヶ月齢)から脂肪組織、肝臓、第1、2、3、4胃、肺、腎臓、副腎、脾臓、小腸、大腸を採取し、Q-RT-PCRにより Chemerin と Chemerin 受容体の遺伝子発現量を調査した。

(2) 離乳期の黒毛和種牛における Chemerin と Chemerin 受容体の発現調節

離乳前(1.5ヶ月齢、n=6)または離乳後(3.5ヶ月齢、n=8)の黒毛和種牛(雄)より、肝臓、脂肪組織(皮下、腸間膜、腎周囲、精巣周囲)、腰最長筋をサンプリングし、qRT-PCRまたは Western blotting により mRNA またはタンパク質発現量を解析した。

(3) ウシ培養肝細胞における Chemerin の発現と調節因子

離乳前後のウシの肝臓組織から単離した肝臓初代培養細胞を増殖させた後、無血清培地にて6時間培養した。その後、各種脂肪酸、インスリンを含む刺激培地で24時間培養し、Chemerin の発現量を測定した。

(4) ケメリン遺伝子内の一塩基多型が黒毛和種牛の枝肉形質および脂肪酸組成に与える影響

本研究ではケメリン遺伝子内の一塩基多型を同定し、それらが黒毛和種牛の枝肉形質および脂肪酸組成に与える影響を評価した。宮城県の黒毛和牛集団から筋肉組織と第6-第7肋骨間切開面胸最長筋の筋肉内脂肪を採材し、ゲノムDNAの抽出と筋肉内脂肪酸組成分析(を行った。遺伝子型はシーケンシングで判定し、対立遺伝子頻度と枝肉形質および筋肉内脂肪酸組成の関連を統計解析した。

(5) 乳牛における内分泌因子ケメリンのシグナル調節と役割

本研究では、泌乳期・乾乳期の乳牛におけるケメリンとその受容体(CMKLR1、CCRL2、GPR1)の遺伝子発現変化を検討し、生体内におけるケメリンの役割の解明を試みた。北農研において飼養された泌乳期(初・中・後期)または乾乳期のホルスタイン種乳牛より乳腺組織をサンプリングし、qRT-PCRによりケメリンおよびその受容体の mRNA 発現量を測定した。

(6) 周産期のホルスタイン種乳牛における Chemerin と Chemerin 受容体の発現調節

肝臓と乳腺における Chemerin と Chemerin 受容体の発現は泌乳期と乾乳期を通じてダイナミックに変化していた。次に、短期間で大きな代謝的变化が起きる周産期に焦点を当て、Chemerin シグナル変化を検討した。分娩予定日より30日前、10日前および分娩日(分娩後12時間以内)、分娩後10日、30日のホルスタイン種乳牛より肝臓組織を生検し、肝臓における Chemerin および Chemerin 受容体の mRNA 発現量を解析した。

## 4. 研究成果

(1) ホルスタイン種仔牛における Chemerin

と Chemerin 受容体発現の組織分布  
ホルスタイン種仔牛 (2-3 ヶ月齢) において Chemerin の mRNA 発現の組織分布を検討したところ、脂肪組織、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、小腸において発現しており、特に肝臓において高発現していた。Chemerin 受容体である CMKLR1 と CCRL2 は様々な組織で発現していたが、CMKLR1 は肝臓、副腎、脾臓、肺において発現が高く、CCRL2 は脂肪組織、副腎、脾臓、大腸、肺において高発現していた。また、GPR1 の発現は局在化しており、脂肪組織、肝臓、肺、第 1 ~ 3 胃にのみ発現がみられ、特に肝臓における発現が高かった。免疫染色により chemerin の組織内局在を確認すると、肝臓においては肝細胞の細胞質において、脂肪組織においては脂肪細胞の細胞質においてタンパク質の局在が確認された。Krautbauer らの報告によるとヒトの肝臓における chemerin は免疫細胞や胆管細胞ではなく、肝細胞において発現しており、今回の結果と一致する。また、当研究グループの以前の報告において脂肪組織における Chemerin の発現は脈管間質細胞よりも脂肪細胞において高発現していることを確認しているが、本研究の結果は矛盾ないものであった。発現量および臓器の体積から、ウシにおける Chemerin の主な内分泌器官は肝臓であると考えられる。

#### (2) 離乳期の黒毛和種牛における Chemerin と Chemerin 受容体の発現調節

子牛は離乳後に第一胃内発酵により産生された揮発性脂肪酸を第一胃壁から吸収し、肝臓や脂肪組織において糖新生と脂質合成に利用するようになる。このような反芻動物特有の代謝系への変化を引き起こす分子メカニズムには依然として未解明の部分が多いが、少なくとも内分泌系による制御が密接に関わっている。Chemerin がインスリン分泌調節作用および末梢組織の糖代謝・インスリン感受性調節作用を持つことに着目し、本研究では離乳期における肝臓の Chemerin の遺伝子発現と肝臓、脂肪組織、骨格筋の Chemerin 受容体の発現量の変化を解析した。Chemerin の mRNA 発現量は腸間膜脂肪組織において離乳前と比較して離乳後に増加した。Chemerin のタンパク質発現は肝臓において離乳後に顕著に減少したが、腸間膜脂肪組織では変化がなかった。また、ケメリン受容体の mRNA 発現量については CCRL2 および GPR1 が肝臓において離乳後に増加した。

脂肪組織における Chemerin の発現は肝臓の約 1/10 と低かったことから、子牛における血中 Chemerin の供給源は主に肝臓であると考えられる。Chemerin がインスリン分泌をポジティブに制御する作用を持つことから、離乳後の肝臓における Chemerin タンパク質の発現低下は、離乳後の血中 Insulin 濃度の低下に関与している可能性が示唆された。

#### (3) ウシ培養肝細胞における Chemerin の発現と調節因子

Chemerin は脂肪組織と肝臓組織において発現量が高く、糖脂質代謝の調節因子として注目されている。しかし、肝臓組織における Hepatokine としての Chemerin の発現と分泌の調節メカニズムは明らかにされていない。したがって、本研究では反芻動物の培養肝細胞における Chemerin 発現調節に関する因子について調査した。ウシ肝臓初代培養細胞において、Chemerin 発現量がオレイン酸、パルミチン酸刺激により上昇し、インスリン刺激により減少した。離乳前のウシ肝細胞では、Chemerin 発現量はプロピオン酸により減少し、離乳後のウシ肝細胞では、プロピオン酸により上昇した。以上の結果から、肝細胞における Chemerin 発現は反芻家畜において各種脂肪酸、インスリン刺激により調節さ、離乳後にグルコース基質であるプロピオン酸によって増大される可能性が示唆された。

#### (4) ケメリン遺伝子内の一塩基多型が黒毛和種牛の枝肉形質および脂肪酸組成に与える影響

ケメリンは脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一種であり、我々の以前の研究では反芻動物の糖・脂質代謝を制御する物質であること事が示唆されている。日本黒毛和種牛 (n=234) においてケメリンのコード領域内に 3 箇所の一塩基多型 (c.12A>G (4aa)、c.276C>T (92aa)、c.321A>G (107aa)) を発見した。また、枝肉形質との関連性を調べたところ、c.276C>T の一塩基多型と BMS NO. 等の経済形質との間に関連性があることが示された。さらに、今回解析を行った集団のアリル頻度を比較するとアリル C を持つ個体が 96.2%であったのに対し、アリル T を持つ個体は 3.8%であり、関連性のあった経済形質は全て遺伝子型が CC の個体において優れていた。

#### (5) 乳牛における内分泌因子ケメリンのシグナル調節と役割

乳牛の乳腺では、泌乳期のミルク合成、乾乳期の免疫細胞浸潤といったダイナミックな生理的变化が起こる。ケメリンは免疫器官や肝臓・脂肪組織より分泌され、免疫細胞誘引や糖代謝調節のほか、乳腺上皮細胞において泌乳関連遺伝子発現を調節する。また、畜草研那須研究拠点において飼養されたホルスタイン種乳牛 4 頭から定期的 (分娩予定 4 週前 ~ 4 週後) に肝臓を生検し、上記と同様の解析を行った。乳腺におけるケメリン、CMKLR1 および CCRL2 発現量は泌乳期に比べ乾乳期において有意に増加した。周産期の肝臓において CMKLR1 発現量は分娩 10 日前・10 日後において有意に増加していた。以上より、乳牛においてケメリンは周産期の肝臓の代謝調節ホルモンと乾乳期の乳腺におけるケモカインとしての役割を持つことが示唆された。

#### (6) 周産期のホルスタイン種乳牛における Chemerin と Chemerin 受容体の発現調節

結果として、肝臓における Chemerin の mRNA

発現量は実験期間を通じて変化しなかった。一方、Chemerin 受容体については、CMKLR1 の mRNA 発現が分娩 10 日前および 10 日後において、その他のサンプリング日と比較して増加していた。CCRL2 と GPR1 の発現量について変化は見られなかった。

周産期における肝臓では CMKLR1 の発現が変化していた。肝臓細胞において Adiponectin が CMKLR1 発現を上昇させることが報告されている。周産期において、血中 Adiponectin 濃度は分娩にかけて低下して、その後、徐々に回復する。本研究における分娩日における CMKLR1 発現低下は Adiponectin による調節が一因であると考えられる。また、Chemerin は肝臓のグルコース取り込みを阻害する作用が報告されていることから、Chemerin は周産期や泌乳期において泌乳代謝調節ホルモンとしての役割を持つことが示唆された。

#### 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 16 件)

鈴木裕、中野美智、芳賀聡、中島恵一、加藤和雄、盧尚建、反芻動物におけるヘパトカインとしての Chemerin と ANGPTL8 の発現調節、家畜栄養生理研究会会報、査読有、59(2)、2015、59-68

Suzuki Y, Haga S, Katoh D, So KH, Choi KC, Jung US, Lee HG, Kazuo K, Roh SG, Chemerin is a novel regulator of lactogenesis in bovine mammary epithelial cells、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、466、2015、283-288  
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.08.105.

Haga S, Nakano M, Ishizaki H, Roh SG, Katoh K, Expression of  $\alpha$ -tocopherol-associated genes and  $\alpha$ -tocopherol accumulation in Japanese Black (Wagyu) calves with and without  $\alpha$ -tocopherol supplementation. Journal of Animal Science、査読有、93、2015、4048-4057  
DOI:10.2527/jas.2015-9106

So KH, Suzuki Y, Yonekura S, Suzuki Y, Lee CH, Kim SW, Katoh K, Roh SG, Soluble extract of soybean fermented with *Aspergillus oryzae* GB107 inhibits fat accumulation in cultured 3T3-L1 adipocytes、Nutrition Research and Practice、査読有、9(4)、2015、439-444  
DOI:10.4162/nrp.2015.9.4.439

Yamauchi E, Suzuki Y, So KH, Suzuki K, Katoh K, Roh SG, Single Nucleotide Polymorphism in the Coding Region of Bovine Chemerin Gene and Their Associations with Carcass Traits in Japanese Black cattle、Asian-Australian Journal of Animal

Science、査読有、28(8)、2015、1084-1089  
DOI:10.5713/ajas.14.0560

Wang T, Lee SB, Hwang JH, Lim JN, Jung US, Kim MJ, Kang HS, Choi SH, Lee JS, Roh SG, Lee HG, Proteomic analysis reveals PGAM1 altering cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid synthesis in bovine mammary gland、Lipid、査読有、50(5)、2015、469-481

DOI:10.1007/s11745-015-4009-9

Wang T, Lim JN, Lee JS, Lee SB, Hwang JH, Jung US, Kim MJ, Hwang DY, Lee SR, Roh SG, Lee HG, Effects of dietary trans-9 octadecenoic acid, trans-11 vaccenic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in mice. Molecular Medicine Reports、査読有、12、2015、3200-3206

DOI:10.3892/mmr.2015.3767

Roh SG, Carroll JA, Kim SW, Effects of fermented soybean meal on innate immunity-related gene expressions in nursery pigs acutely challenged with lipopolysaccharides、Animal Science Journal、査読有、86(5)、2015、508-516  
DOI: 10.1111/asj.12319

Yi KJ, So KH, Hata Y, Suzuki Y, Kato D, Watanabe K, Aso H, Kasahara Y, Nishimori K, Chen C, Katoh K, Roh SG, The regulation of oxytocin receptor gene expression during adipogenesis、J. Neuroendocrinology、査読有、27、2015、335-342

DOI: 10.1111/jne.12268.

Valan M, Ilavenil S, Kim DH, Roh SG, Lee JC, Choi KC, In vitro and In vivo enhancement of adipogenesis by italian ryegrass (*Lolium Multiflorum*) in 3T3-L1 cells and mice. PLOS ONE、査読有、9(1)、2014、e85297

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085297>

Roh SG, Koiwa K, Sato K, Ohtani Y, Takahashi T, Katoh K, Actions of intravenous injections of AVP and oxytocin on plasma ACTH, GH, insulin, and glucagon concentrations in goats、Animal Science Journal、査読有、85(2)、2014、286-292

DOI: 10.1111/asj.12142

Ilavenil S, Arasu MV, Lee JC, Kim DH, Roh SG, Park HS, Choi GJ, Mayakrishnan V, Choi KC. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells、Phytomedicine、査読有、21(5)、2014、758-765

DOI: 10.1016/j.phymed.2013.11.007.

Sugita H, Ardiyanti A, Yokota S,

Yonekura S, Hirayama H, Shoji N, Yamauchi E, Suzuki K, Katoh K, Roh SG, The effect of single nucleotide polymorphisms in GH gene promoter region on carcass traits and intramuscular fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Livestock Science*, 査読有、165、2014、15-21  
DOI: 10.1016/j.livsci.2014.04.026  
Takahashi T, Sato K, Kato S, Yonezawa T, Kobayashi Y, Ohtani Y, Owada S, Aso H, Yamaguchi T, Roh SG, Katoh, K, Increased plasma ghrelin suppresses insulin release in wethers fed with a high protein diet, *J Endocrinology*、査読有、221(3)、2014、371-380  
DOI:10.1530/JOE-13-0501  
鈴木 裕、北山 峻、山内 恵利、宋 相憲、加藤 和雄、盧 尚建、反芻動物の糖脂質代謝系における Chemerin の生理的作用機構と生産性との関連。家畜栄養生理研究会、査読有、2013、57(1)、45-54。  
Ebara F, Inada S, Morikawa M, Asaoka S, Isozaki Y, Saito A, Etoh T, Shiotsuka Y, Roh SG, Wegner J, Gotoh, T. Effect of nutrient intake on intramuscular glucose metabolism during the early growth 2 stage in crossbred steers (Japanese Black male × Holstein female). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*、査読有、97(4)、2013、684-693  
DOI : 10.1111/j.1439-0396.2012.01310.x

[学会発表](計 7件)

鈴木裕、中島恵一、芳賀聡、中野美和、宮地慎、石崎宏、盧尚建、乳牛における内分泌因子ケメリンのシグナル調節と役割、講演要旨集 P.231。日本畜産学会第 120 回大会(酪農学園大学、江別、2015 年 9 月 11 日~12 日)  
鈴木 裕、蘇 敬夏、畑 優紀、熊谷 優希、加藤 和雄、盧 尚建。絶食・再給餌によるマウス肝臓および脂肪組織におけるケメリンの発現調節。講演要旨集 IV-10。第 48 回日本栄養・食糧学会東北支部大会および公開シンポジウム(東北大学、仙台、2014 年 11 月 1 日)  
山内 恵利、鈴木 裕、蘇 敬夏、芳賀 聡、加藤 和雄、盧 尚建。ウシ Betatrophin の発現と調節。講演要旨集 P.231。日本畜産学会第 118 回大会(つくば国際会議場、つくば、2014 年 3 月 27 日~29 日)  
蘇 敬夏、立花 かおる、畑 優紀、山内 恵利、鈴木 裕、鈴木 啓一、加藤 和雄、盧 尚建。黒毛和種牛の Adipogenin 遺伝子内に生じる一塩基多型と産肉形質との関連性。講演要旨集 P.231。日本畜産学会第 118 回大会(つくば国際会議場、つくば、

2014 年 3 月 27 日~29 日)  
芳賀 聡、中野 美和、石崎 宏、盧 尚建、加藤 和雄。ウシ乳腺上皮細胞における -トコフェロール細胞内輸送関連分子の発現に及ぼす催乳ホルモンの影響。講演要旨集 P.148。日本畜産学会第 118 回大会(つくば国際会議場、つくば、2014 年 3 月 27 日~29 日)  
佐々木 智子、小林 諒子、原田 剛之、大谷 喜永、増子 孝則、平山 琢二、萩野 顕彦、盧 尚建、加藤 和雄。哺乳仔ウシへの甘草給与による代謝・内分泌の調節機能。講演要旨集 P.122。日本畜産学会第 117 回大会(新潟大学、新潟、2013 年 9 月 9 日~10 日)  
小林 諒子、D. W. Harjanti、盧 尚建、佐野 宏明、加藤 和雄。黒毛和種牛の内分泌変化と糖代謝に及ぼす GH 多型の影響。講演要旨集 P.122。日本畜産学会第 117 回大会(新潟大学、新潟、2013 年 9 月 9 日~10 日)

[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

盧 尚建 (ROH, Sanggun)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：90322130

(2) 研究分担者

鈴木 啓一 (SUZUKI, Kei-ichi)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10344706

中島 恵一 (Nakajima, Kei-ichi)  
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・主任研究員  
研究者番号： 70362150

萩野 顕彦 (HAGINO, Akihiko)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号： 80156249  
(平成27年度より研究分担者)

芳賀 聡 (HAGA, Satoshi)  
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・研究員  
研究者番号： 90442748

(3)連携研究者

( )

研究者番号：