

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07708

研究課題名(和文)放牧飼養で増強する筋線維内脂肪滴蓄積機構の解明

研究課題名(英文)The effect of grazing on lipid droplets accumulation in bovine skeletal muscle

研究代表者

小笠原 英毅 (OGASAWARA, Hideki)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：30535472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放牧飼養する日本短角種において血液性状、筋線維型構成、脂肪滴含有筋線維、CD36の割合、筋形成および脂肪酸代謝因子の発現を解析した。放牧飼養では血中NEFA濃度が増加すること、脂肪滴含有筋線維の筋線維型は および D型筋線維で、CD36は時期および飼養管理に関わらず全体の20%で発現し、および D型で発現することが明らかとなった。また、筋形成因子の発現に明確な変動はなく、脂肪酸代謝因子は増加する傾向が観察された。以上より、放牧飼養する日本短角種では血中由来のNEFAがCD36を介して および D型筋線維に取り込まれ、筋線維内の脂肪酸合成も促進されることで脂肪滴が蓄積される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the effects of grazing on lipid droplets accumulation in skeletal muscle of Japanese Shorthorn cattle. We analyzed distribution of muscle fiber types and intramyocellular lipid, identification of CD36 immunoreactivity myofiber, expression of myogenic (MyoD, myogenin, myostatin, ActR2B) and lipogenic (DGAT1 and 2, LPL, HSL) genes of M. biceps femoris (BF). Serum NEFA concentrate increased among 0-60 days after grazing. CD36 immunoreactivity myofiber was found in about 20% of BF. Expression of myogenic genes were no significant difference among grazed and housed managements. We found that lipogenic genes of DGAT2, LPL, HSL increase on grazing. It suggests that myogenic genes may not contribute to lipid droplets accumulation in BF. These findings can provide a basis of the complete grass-fed beef production system, furthermore, lipid droplets accumulation by grazing, the mechanism was partly revealed to be through CD36.

研究分野：畜産学

キーワード：CD36 脂肪滴含有筋線維 放牧 日本短角種 筋線維型構成割合

1. 研究開始当初の背景

(1)日本の肉牛生産は飼料の大部分を輸入穀物飼料に依存し、さらに粗飼料も輸入依存傾向を強め、飼料自給率は極めて低い。また、牛肉の自給率の向上と消費者の安全で健康的な畜産物に関心が高まっていることから、放牧と粗飼料を主体とした牛赤肉の生産基盤の形成が急務である。北里大学八雲牧場では6ヶ月間の自然哺乳と放牧、自給粗飼料給与のみでの肉牛生産を実践している。この生産方式では放牧と粗飼料での飼養となるが、生体重が30ヶ月齢で約700kgに達する。

(2)骨格筋量には筋特異的因子(myostatin、MyoD、myogenin、Myf5など)が関与し、例えば、骨格筋形成を負に制御するミオスタチンが深く関与し、ミオスタチン蛋白を欠損するウシは筋形成の抑制が解除され、骨格筋重量が約1.5倍増加する。このことは、ミオスタチン作用を制御することにより筋肉量を増加させることが可能なことを意味する。

(3)申請者は放牧牛において哺乳期および肥育期の胸腹鋸筋および大腿二頭筋の筋線維が肥大することを明らかにしている。また、肥大する筋線維は遅筋型筋線維(I型)に顕著で、この筋線維は脂肪酸代謝をエネルギー源とし、脂肪酸代謝に関わる β ヒドロキシ酪酸脱水素(3-HBD)活性が著しく高く、3-HBD活性の高い筋線維とオイルレッドO陽性の筋線維は完全に一致し、筋線維内の脂肪滴の蓄積が筋線維の肥大に繋がることを明らかにしている。申請者らは、放牧と自給粗飼料100%による肉牛生産方式の確立に向け、実践的な研究を続けており、放牧飼養が産肉性に与える影響を解析するために、生涯を通じて放牧をさせない牛群を設置し(舎飼区)、舎飼区の枝肉成績ではロース芯断面積が小さく、皮下脂肪が厚くなり、可食部分となる赤身牛肉の歩留まりが低下することを明らかにしている。以上の成果は放牧・粗飼料を主体とする肉牛生産方式では放牧飼養により赤身牛肉の産肉性を増強させることが可能であることを示唆している。

(4)以上の研究成果は放牧飼養が赤身牛肉生産において効率的な飼養管理であることを示唆しており、さらに筋線維内脂肪蓄積を増加させ、結果的に筋組織の肥大化に影響し、放牧・粗飼料主体による肉牛生産方式が赤肉生産を増強させることを強く示唆している。しかしながら、この筋肥大機構は筋前駆細胞の活性化の機構とは大きく異なり、筋線維内の脂肪滴蓄積が肥大に関与していると推測されるが、その蓄積機構の詳細は明らかになっていない。また、放牧飼養の骨格筋において筋形成因子(myostatin、MyoD、myogenin、Myf5など)が赤身肉形成過程に対する作用機序も明らかとなっていないため、放牧・粗飼

料を主体とした効率的な赤肉生産の科学的基盤は国内外を問わず未だ明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は放牧および自給粗飼料による赤肉生産の学術的基盤の構築を目的としており、放牧飼養で増強される筋線維内脂肪滴の蓄積機構の詳細を明らかにするため、放牧飼養する日本短角種に着目し、下記の点を明らかにする。

夏期間に放牧区と舎飼区に分けた日本短角種去勢牛において

- (1)各試験区における増体成績および血液性状
- (2)大腿二頭筋における筋線維型構成割合および脂肪滴含有筋線維、脂肪酸取り込み受容体CD36の発現割合
- (3)大腿二頭筋における筋形成因子および脂肪酸代謝関連因子のmRNA発現
- (4)大腿二頭筋からの初代筋芽細胞採取法の確立と筋芽細胞株の作製

以上より、放牧飼養で増強する筋線維内脂肪滴の蓄積機構が明らかとなる。

3. 研究の方法

(1)肥育期(18ヶ月齢)の日本短角種(去勢)を5月末から10月末までの放牧期に放牧区と舎飼区に分け(各4頭)、放牧区は放牧草を自由採食、舎飼区は毎朝刈り取った放牧草を飽食給与した。供試牛は放牧開始時から、毎月体重測定を行い、日増体量を算出し、体重測定時と同時に頸静脈より採血を行い、血液性状(NEFA, TG, T-CHO, BUN, Glucose)を測定した。

(2)上記供試牛を放牧開始前(5月)、放牧中期(8月)にバイオプシー法で大腿二頭筋より筋組織を採取し、凍結包埋後、クレオスタットにより薄切し、免疫組織学的および酵素組織化学的染色を行った。得られた染色像より、筋線維型構成割合を算出した。また、オイルレッドO染色により脂肪滴含有筋線維の割合を算出した。免疫組織化学的手法によりCD36の発現筋線維の同定を行い、画像解析ソフト「Image J」で筋線維型の短径を計測した。

(3)上記と同様のサンプルから、リアルタイムPCR法で筋形成因子であるmyostatin、MyoD、Myogenin、Activin type IIB receptor(ActR)、脂肪酸代謝関連因子であるトリグリセリド合成酵素(DGAT1および2)、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)、リポプロテインリパーゼ(LPL)のmRNA発現を解析した。

(4)肥育期の日本短角種の大腿二頭筋から組織片を採取して、筋管細胞への分化可能な筋芽細胞樹立と筋芽細胞株の作製を試みた。

4. 研究成果

試験期間中の両区の体重の推移に有意な差は認められなかった。一方、日増体量では

5-6月、6-7月、8-9月において両区で有意な差が見られたが、放牧期間全体(5~10月)の日増体量では両区に有意な差は認められなかった(放牧区:0.71±0.2kg/日、舎飼区:0.75±0.3kg/日)。試験期間全体の給与飼料成分では放牧区および舎飼区でそれぞれ、TDN(可消化養分総量)が67.9±0.5および64.9±0.9%、CP(粗タンパク質)ではそれぞれ19.6±0.6および16.8±1.4であった。両区において有意な差は見られなかった。以上より、本試験の放牧区および舎飼区の試験区の設定は飼料の影響を極力抑えた放牧による運動負荷が骨格筋に与える影響を解析するために最適であることが明らかとなった。

試験期間中の一般血液成分の推移を図1に示す。血漿中グルコース(Glu)濃度は6月、7月、8月において両区で有意な差が見られ、舎飼区においては8月まで低い傾向が見られた。血漿中総コレステロール(T-CHO)濃度は8月において両区間で有意な差が見られた。血漿中トリグリセライド(TG)濃度は全期間において両区間で差は見られなかった。血漿中遊離脂肪酸(NEFA)濃度については、放牧区の7月、舎飼では6月に上昇し、その後有意に減少した。試験期間中の血液成分の推移では放牧区および舎飼区の血漿中NEFA濃度が試験開始初期に上昇した。一般的にNEFAはエネルギー不足の指標として用いられ、採食量の減少や運動時に脂肪組織で蓄積されているTGが分解され、NEFAとグリセロールがエネルギー源として血中に放出される。放出されたNEFAが心筋をはじめとする各組織の細胞でエネルギー源として利用される。舎飼区での血漿中NEFA濃度の上昇については今後の検討課題であるが、放牧区の放牧開始2ヶ月間の血漿中NEFA濃度の上昇は放牧区の日増体量の低さと一致する。以上より、放牧飼養の増体成績と血液性状の推移が明らかとなった。

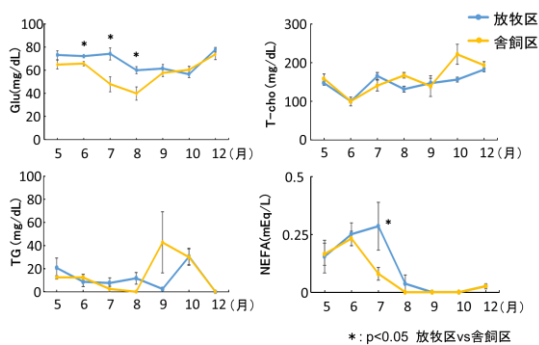


図1 試験期間中の血液成分の推移

放牧区および舎飼区の日本短角種大腿二頭筋における筋線維型構成、脂肪滴含有筋線維、CD36陽性筋線維の割合を図2に示した。放牧区のI型筋線維では放牧開始前(5月)、放牧中期(8月)でそれぞれ、17.6±3.8および10.1±5.5%、ID型筋線維で6.0±2.5および13.6±3.3%、IIA型筋線維で33.0±10.0および33.0±4.9%、IIB型筋線維で43.8±10.6お

よび43.3±5.9%、脂肪滴含有筋線維で10.4±2.6および20.0±4.5%、CD36陽性筋線維で23.1±3.8および23.1±4.1%だった。舎飼区のI型筋線維では5月、8月でそれぞれ、16.3±3.0および15.1±5.1%、ID型筋線維で5.2±1.8および5.8±3.1%、IIA型筋線維で23.8±7.4および24.5±7.0%、IIB型筋線維で54.6±8.8および55.8±10.7%、脂肪滴含有筋線維で6.7±2.4および6.2±3.3%、CD36陽性筋線維で21.6±1.3および17.9±5.7%だった。放牧中期の放牧区のID型筋線維および脂肪滴含有筋線維で有意に増加した。CD36陽性筋線維の発現割合は時期および飼養管理にかかわらず全筋線維の約20%で発現した。

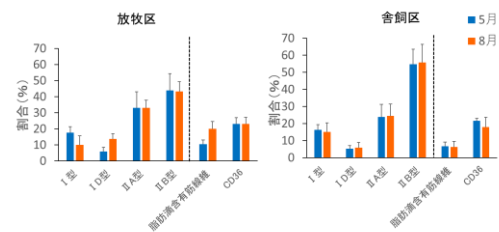


図2 筋線維型構成、脂肪滴含有筋線維、CD36陽性筋線維の割合

次に脂肪滴含有筋線維の筋線維型構成割合を解析したところ、放牧区、舎飼区ともにIおよびID型筋線維でのみ脂肪滴が蓄積されること、放牧区の8月のみ、ごく少数のIIA型筋線維に脂肪滴が蓄積した(図3A)。各筋線維型で脂肪滴を蓄積する筋線維の短径を計測したところ、舎飼区では時期による変動はなく、放牧区では脂肪滴を蓄積する筋線維型(IおよびID型)で有意に短径が増加した(図3B)。

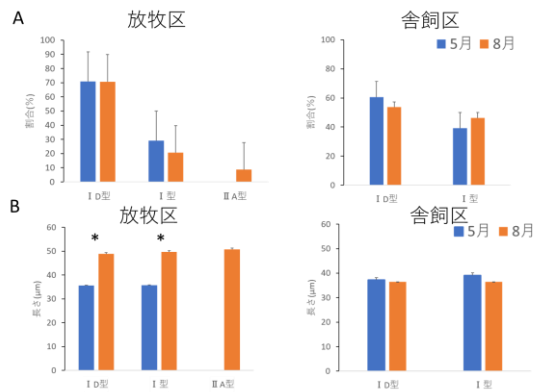


図3 脂肪滴含有筋線維の筋線維型構成割合とその短径

CD36陽性筋線維における筋線維型構成割合は、放牧区の5月でIおよびID型筋線維でそれぞれ、74.1±11.6および25.7±11.5%、8月では、IおよびID型筋線維でそれぞれ、48.3±10.3%および51.5±10.3%発現した。舎飼区の5月ではIおよびID型筋線維でそれぞれ、74.1±11.6および25.7±11.5%、8月ではIおよびID型筋線維でそれぞれ、68.1±15.8および32.0±15.8%であり、両区両時期ともIIAおよびIIB型筋線維では発現しなかった。CD36陽性筋線維における脂肪滴含有筋線維

の割合では、放牧区の5月および8月でそれぞれ、 39.6 ± 16.2 および $79.3 \pm 11.7\%$ 、舎飼区の5月および8月でそれぞれ、 39.6 ± 16.2 および $28.4 \pm 20.7\%$ であり、8月の放牧区で CD36 陽性かつ脂肪滴を含有する筋線維が増加した(図 4A&B)。

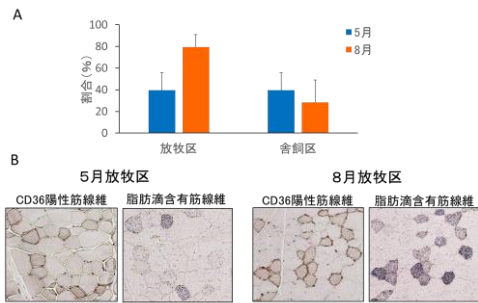


図4 CD36陽性筋線維中の脂肪滴含有筋線維割合

リアルタイム PCR 法で放牧区および舎飼区の日本短角種大腿二頭筋における筋形成因子 (myostatin、MyoD、Myogenin、ActR) (図 5A) および脂肪酸代謝関連因子 (DGAT1 および 2、HSL、LPL) (図 5B) の mRNA 発現を解析した。全ての筋形成因子は放牧区で増加する傾向でなく、今回測定した筋形成因子は筋線維内脂肪滴蓄積機構に関与しない可能性が示唆された。一方、脂肪代謝関連因子は DGAT1 を除く、全ての因子が放牧区で増加傾向にあり、筋線維内の脂肪滴蓄積に関与する可能性が示唆された。

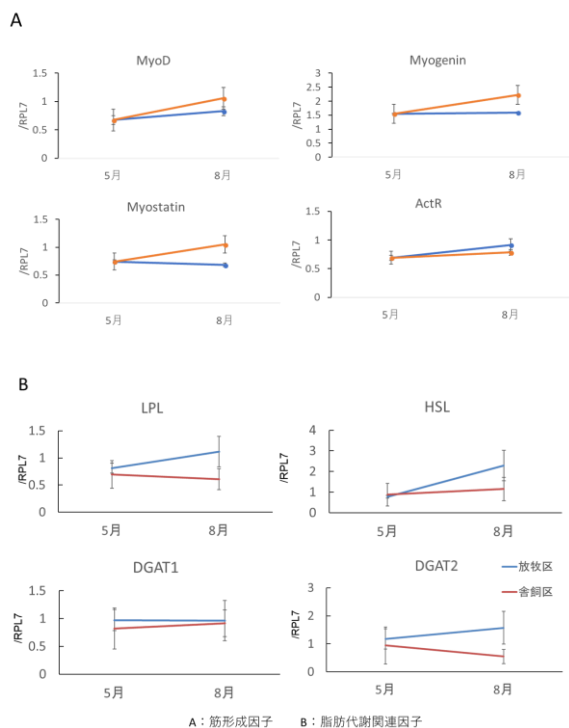


図5 筋形成因子および脂肪代謝関連因子の発現

放牧飼養する日本短角種では放牧開始から放牧中期まで血中 NEFA 濃度が上昇し、CD36 を介して I および ID 型筋線維に取り込まれ、エネルギー消費に利用および蓄積される可能性が示唆された。さらに、放牧飼養では筋線維内の脂肪酸合成も促進されることで脂肪滴が蓄積される可能性が示唆された。以上より、大腿二頭筋における CD36 を介した筋線維内脂肪滴蓄積機構の一部が解明された(図 6)。

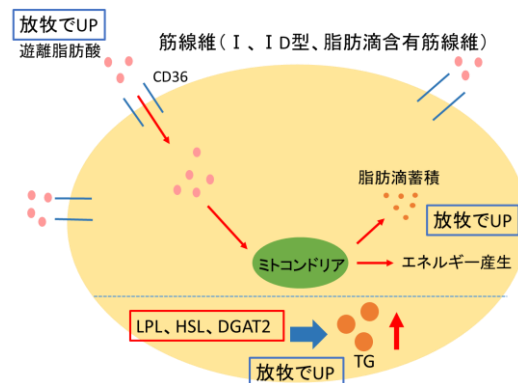


図6 CD36を介した筋線維内脂肪滴蓄積機構

日本短角種の大腿二頭筋から初代培養筋芽細胞の採取に成功した。採取した初代培養筋芽細胞は筋管細胞に分化可能で、筋細胞の存在が認められた。したがって、この初代培養筋芽細胞から限界希釈法によるクローニング(単一細胞株作製)を行った。得られた細胞株は8株(図 8)で、うち1株(A-2株)は筋形成因子である MyoD を発現した。A-2株は継代数6まで MyoD を発現し、筋芽細胞由来の細胞株である可能性が示唆され、純粋な筋細胞のみによる脂肪滴蓄積機構の解析が可能となった。

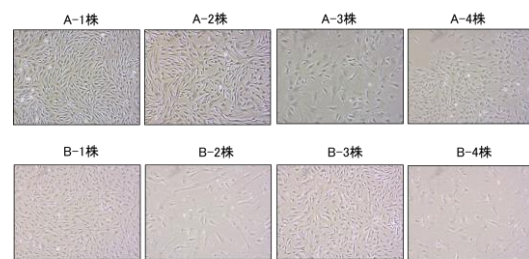


図8 大腿二頭筋由来の細胞株

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 7 件)

- ① Tsutsumi M., Ono Y., Ogasawara H., Hojito M. Life-cycle impact assessment of organic and non-organic grass-fed beef production in Japan. Journal of Cleaner Production. 2018. 172:2513-2520. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.159>

- ② 小笠原英毅. 北里八雲牛～草資源で生産・販売・研究する牛肉～. 食肉の科学. 58:151-157.2017. (査読無)
- ③ Hojito M, Adachi Y, Ono Y, Ogasawara H. 2016. Nitrogen Flow on an Organically Managed Beef Farm in Hokkaido, Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*. 62: 545-552. 2016. (査読有)
<https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1203730>
- ④ Watanabe H.†, Nakano T.†, Saito R.†, Akasaka D., Saito K., Ogasawara H., Minashima T., Miyazawa K., Kanaya T., Takakura I., Inoue N., Ikeda I., Chen X., Miyake M., Kitazawa H., Shirakawa H., Sato K., Tahara K., Nagasawa Y., Rose M.T., Ohwada S., Watanabe K., Aso H. Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. *PLoS One*. 2016. 11: e0147143. (査読有)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147143>
- ⑤ Horikawa A., Ogasawara H., Okada K., Kobayashi M., Muroya S. and Hojito M. Grazing-induced changes in muscle microRNA-206 and -208b expression in association with myogenic gene expression in cattle. *Animal Science Journal*. 2015. 86:952-960. (査読有)
<http://doi.org/10.1111/asj.12381>
- ⑥ 鈴木由美子, 小笠原英毅, 梅村和弘, 田中勝千, 寶示戸雅之, 皆川秀夫. 有機管理実践牧場における植生と牛の採食行動の関係(第2報)～夏季における肉用牛の採食行動～. *農業食料工学会東北支部報*. 2015. 62:41-44. (査読無)
- ⑦ Muroya S., Ogasawara H., Hojito M. Grazing Affects Exosomal Circulating MicroRNAs in Cattle. *PLoS One*. 2015. 10475: e0136. (査読有)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136475>
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 小笠原英毅, 野原香菜, 高野風花, 高橋辰行, 黒瀬陽平, 寶示戸雅之. 放牧飼養で増加する脂肪滴含有筋線維と血液性状との関連性. 日本畜産学会第 124 回大会. 2018.
- ② 室谷進, 小笠原英毅, 野原香菜, 大江美香, 尾嶋孝一, 寶示戸雅之. 放牧で変化するウシ骨格筋・脂肪・肝臓のトランスクリプトーム. 日本畜産学会第 124 回大会. 2018.
- ③ 野原香菜, 小笠原英毅, 高野風花, 高橋辰行, 寶示戸雅之, 黒瀬陽平. 放牧飼養する日本短角種の大腿二頭筋における CD36 の発現動態. 日本畜産学会第 124 回大会. 2018.
- ④ 小笠原英毅. 食肉としての放牧技術のポテンシャル～北里八雲牛の生産～. 放牧技術の新たな展開とそのポテンシャルを探るシンポジウム. 2018. (招待講演)
- ⑤ 小笠原英毅. 北里大学が実践する有機畜産. 第一回アニマルウェルフェアサミット. 2017. (招待講演)
- ⑥ 小笠原英毅, 安航太朗, 落合みのり, 高橋辰行, 黒瀬陽平, 寶示戸雅之. 放牧飼養が日本短角種の大腿二頭筋における脂肪滴含有筋線維構成割合に与える影響. 日本畜産学会第 122 回大会. 2017.
- ⑦ 小笠原英毅. 放牧と自給飼料 100% で生産する北里八雲牛～生産・販売・地域普及・研究～. 九州沖縄地域における放牧・粗飼料多給による赤身牛肉生産振興に関する情報交換会. 2017. (招待講演)
- ⑧ 小笠原英毅. 有機管理で生産する肉用牛(日本短角種と肉専用種)の放牧飼養とその販売状況. 肉用牛(肉専用種)放牧技術研修会. 2016. (指名講演)
- ⑨ S Muroya, H Ogasawara and M Hojito. Circulating microRNA expression changes during grazing in cattle. *EAAP-67th Annual Meeting*. 2016.
- ⑩ H Ogasawara, Y Suzuki, T Tatabashi, Y Ono, K Okayama, M Hojito. Effects of grazing on meat quality of Japanese Shorthorn cattle under complete grass-fed beef production system. *The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science congress*. 2016.
- ⑪ T Takahashi, A Saito, M Fujimura, M Sugiyama, H Ogasawara, K Sato, Y Kurose. Stimulatory action of L-aspartic acid on growth hormone secretion in the anterior pituitary of wethers. *The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science congress*. 2016.
- ⑫ 小笠原英毅. 本当の国産牛肉とは何か? 北里八雲牛の生産・販売から考える. 平成 28 年度学校給食共同調理場管理運営研修会. 2016. (招待講演)
- ⑬ 堤道生, 小野泰, 小笠原英毅, 寶示戸雅之. 北里八雲牛の環境影響評価. 2016 年度日本草地学会石川大会. 2016.
- ⑭ 小笠原英毅, 森井崇光, 高橋辰行, 鈴木由美子, 畔柳正, 寶示戸雅之. 放牧飼養した肉用牛の皮下脂肪抑制機構. 日本畜産学会 121 回大会. 2016.
- ⑮ 小笠原英毅. 放牧と自給飼料 100% で生産する北里八雲牛～生産・販売・地域普及～. 第 6 回無畜舎・周年放牧技術セミナー. 2016. (招待講演)
- ⑯ 小笠原英毅. 北海道における赤身牛肉生産～放牧と自給飼料のみで生産する北里八雲牛～. 北海道畜産草地学会ワークショップ. 2015. (招待講演)
- ⑰ 小笠原英毅, 森井崇光, 鈴木由美子, 畔柳正, 寶示戸雅之. 有機管理で生産された肉用

牛における出荷時期の違いが牛肉の栄養成分と筋線維型構成に与える影響. 日本畜産学会第 120 回大会. 2015.

- ⑱ 小笠原英毅. 北里八雲牛は地方活性化の起爆剤となり得るか. 日本産肉研究会第 16 回大会. 2015. (指名講演)
- ⑲ 室谷進,小笠原英毅, 實示戸雅之. ウシ血中を循環するマイクロ RNA は放牧によって変動する. 日本畜産学会第 120 回大会. 2015.

[図書] (計 3 件)

- ① 小笠原 英毅, 公益社団法人北海道農業改良普及協会、北海道オーガニックビーフ振興協議会の設立背景とこれから、農家の友、69.9、2017、44-46
- ② 小笠原 英毅, 株式会社養賢堂、北里大学が実践する有機畜産 日本と世界のアニマルウェルフェア畜産上巻、2016、25-32 (分担)
- ③ 小笠原 英毅, 公益社団法人北海道農業改良普及協会、地域特性を活かしたブランド牛「北里八雲牛」を生産する、農家の友、67.12、2015、63-65

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u-fsc.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 英毅(OGASAWARA Hideki)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：30535472