

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15029

研究課題名(和文) GH遺伝子多型選抜黒毛子牛の生産改善技術開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on the development of improvement technology of Japanese Black cattle production selected by GH gene polymorphism

研究代表者

加藤 和雄 (Kato, Kazuo)

東北大学・農学研究科・客員教授

研究者番号：60091831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では成長ホルモンの遺伝子多型に基づいて、高品質・高評価な産肉性をもつ黒毛和種仔牛を選抜するために、ルーメン柔毛組織における短鎖脂肪酸受容体と関連遺伝子について発現量を調査した。(1) Free fatty Acid Receptor 4は離乳前と比較し、離乳後のルーメン柔毛組織において有意に高くなった。(2) 哺乳区と離乳区のルーメン絨毛上皮組織においてIGF-1とIGF-1受容体の遺伝子発現量に差はなかった。離乳区は哺乳区と比べ、IGF-1の働きを抑制するIGFBP2、3、6の発現量が有意に減少し、IGF-1の働きを促進するIGFBP5の発現量が有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：This study was to analyze the free fatty acid receptors, IGFs and IGFBP in rumen papillae, to select Japanese Black cattle with high quality, based on the genetic polymorphism of growth hormone. (1) Free fatty acid receptor 4 were significantly higher in rumen papillae of weaned cattle compared with suckling cattle. (2) IGF-1 was not different between rumen papillae of suckling and weaned cattle. IGFBP2, 3 and 6 were significantly lower in weaned cattle, however, IGFBP5 was significantly higher in weaned cattle.

研究分野：家畜生理学

キーワード：ウシ ルーメン 脂肪酸受容体 IGF-1 IGFBP

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、黒毛和種牛の GH 遺伝子 (および脂肪酸合成関連酵素) 多型に基づいた選抜の有効性について、一連の成果を報告している。申請者らは、肉質が優れていて但馬系黒毛和種牛に多い C 型多型に注目し、その型の簡易検出法の開発や優れた脂肪酸蓄積能およびその原因となる GH の受容機構に関して報告した (Ardiyanti et al., 2009; Yokota et al., 2012; Bahrami et al., 2013; 加藤, 2015)。

また、1980 年の初頭から短鎖脂肪酸 (SCFAs) の生物活性に注目し、1) 栄養素の消化や脂肪蓄積を促進する膵消化酵素分泌やインスリン分泌促進 (Mineo et al., 1990) 2) 脂肪分解作用を持つ下垂体 GH 分泌抑制 (Ishiwata et al., 2000) 3) 飼料添加物給与レベルでの酪酸 Na 給与はルーメン絨毛発育促進 (Kato et al., 2011) などの成果を報告した。さらに、SCFAs の受容機構を検討し、1) 刺激効果はトリプシン処理で低減し、細胞外で認識 (Ohbo et al., 1996) 2) 効果は SCFAs の炭素数に依存し、動物種の体重に依存して増大 (Ohbo et al., 1996) 3) 効果の細胞内メッセンジャーはカルシウムイオン (Kato et al., 1996) 4) 2 種類の SCFAs 受容体の mRNA 発現が下垂体 GH 分泌細胞や乳腺上皮細胞に存在 (Ishiwata et al., 2000; Yonezawa et al., 2009) 5) 脂肪蓄積に関与する受容体は GPR43 (FFA2) (Hong et al., 2005) 6) ルーメン絨毛発育に伴って変化する SCFAs 代謝に関係する 3 種類の遺伝子の存在 (Kato et al., 2015) などを報告した。

一方、驚くことに、SCFAs 受容体は免疫細胞にも存在し機能調節への関与が示唆されたことから、SCFAs 受容体機能を介した免疫機能を調節する目的で、種々のリガンド (刺激薬、アゴニスト) や遮断薬 (アンタゴニスト、ブロッカー) が精力的に開発されてきた (Ulven, 2012)。しかし、これらの受容体開発の対象はヒトであり、反芻家畜の受容体の構造、薬物との親和性や作用効果などの機能性は異なるはずであるが研究報告は皆無である。また、Hudson ら (Hudson et al., 2012) の報告では、SCFAs には 2 種類の受容体、すなわち FFA2 (かつての GPR43) と FFA3 (かつての GPR41) が存在し、FFA2 が主要な効果を示すことを示した。しかし、ヒトの FFA2 と 3 はいずれもプロピオン酸に対して最大の親和性と反応性を示すが、反芻家畜の反応性は炭素数に依存して増加し、カプロン酸で最大になる。炭素数に異なるこのような反応は、ヒトでは FFA3 である (Ulven, 2012)。これらの矛盾は、反芻家畜では種特異的な SCFAs 受容体機構が存在するからである。すなわち、FFA3 として開発したりガンドの中には、ヒトではほとんど効果を示さないのにウシで顕著な効果を示すリガンドが存在するのである。このような反芻動物種特異的な

リガンド開発は、飼料添加剤として給与する際に、ヒトへの副作用を排除できる可能性が大きいし、また脂肪酸なので毒性はほとんど示さないの、生産性向上にとって極めて有効なツールとなりうる。

### 2. 研究の目的

本研究では成長ホルモンの遺伝子多型に基づいて、高品質・高評価な産肉性をもつ黒毛和種仔牛を選抜し、その生物機能を活性化させる短鎖脂肪酸誘導体や受容体刺激因子を開発することによって仔牛生産性の向上を目指す技術を開発するために、下記のようなことを目的にしている

(1) 短鎖脂肪酸の吸収で重要な役割をしているルーメン柔毛組織と培養上皮細胞において各種脂肪酸受容体 (Free Fatty Acid Receptor 1,2,3,4) の遺伝子発現量を解析した。  
(2) 反芻動物のルーメン絨毛上皮組織は、離乳後に劇的に発達する。反芻動物は、ルーメン絨毛上皮組織の長さや密度を増加させてルーメン内の表面積を増やすことで、揮発性脂肪酸 (VFA: 酢酸、プロピオン酸、酪酸など) の吸収効率を高める。ルーメン絨毛上皮組織の発達が不十分なまま離乳すると、離乳後の発育停滞や感染症発症率増加など生産性の低下を招くため、家畜生産の健全性において重要である。ルーメン絨毛上皮組織の発達は、飼料の物理的な刺激に加え、ルーメン内発酵により産生される VFA により促進され、その中でも酪酸による効果が最も強いことはよく知られているが、ルーメン絨毛上皮組織の発達に関わる分子機序は不明である。これまで、当研究室では、RNA-seq 解析により、離乳前後のルーメン絨毛上皮組織で Insulin-like Growth Factor 結合タンパク質 (IGFBPs: IGFBP1~6) の発現が変動していることを発見した。IGFBPs は、IGF-I に結合することで、IGF-I が血中を循環できるように働くほか、様々な動物の腸管上皮において IGF-I の働きを制御することで、上皮の分化や増殖を制御する働きを持つことで知られる。しかし、反芻動物の離乳に伴うルーメン絨毛上皮組織の発達における IGFBPs の役割に関する報告はない。したがって、本研究では、ルーメン絨毛上皮組織の発達における IGFBPs の役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 離乳前区 (n=5、3 週齢) および離乳後区 (n=5、15 週齢) の去勢黒毛和種牛より採取したルーメン柔毛組織から RNA を抽出し、各種脂肪酸受容体 (Free Fatty Acid Receptor 1,2,3,4) の遺伝子発現量を解析した。  
(2) (実験 1) 黒毛和種雄 (11 頭) を哺乳区 (6 頭) と離乳区 (5 頭) に分け、哺乳区は 5 週齢、離乳区 (離乳: 12 週齢) は 15 週齢にルーメン絨毛上皮組織を採取し、IGF、IGF 受容体と IGFBPs の遺伝子発現量を測定した。

また、加齢による影響を調査するために、ホルスタイン種雄（6頭）を哺乳持続区（3頭）と離乳区（3頭）に分け、離乳区は6週齢で離乳を行い、両区は14週齢にルーメン絨毛上皮組織を採取し、同様に解析を行った。（実験2）ルーメン絨毛上皮組織におけるIGF-1の局在を免疫組織化学染色法により解析した。（実験3）ウシルーメン上皮細胞を単離し、培養を行い、3種類のVFA（酪酸：10mM、プロピオン酸：20mM、酢酸：60mM）により6時間刺激し、IGFBPsとIGF-1とその関連因子の遺伝子発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 短鎖脂肪酸受容体である Free fatty Acid Receptor 2と3は離乳前後のルーメン柔毛組織において差は見られなかった。長鎖脂肪酸の受容体である Free fatty Acid Receptor 1は差はなく、Free fatty Acid Receptor 4は離乳前と比較し、離乳後のルーメン柔毛組織において有意に高くなった。また、細胞内の脂肪酸結合タンパク質 Free acid binding protein 4は離乳前と比較し、離乳後のルーメン柔毛組織において高い値を示した。

(2) (実験1)哺乳区と離乳区のルーメン絨毛上皮組織においてIGF-1とIGF-1受容体の遺伝子発現量に差はなかった。離乳区は哺乳区と比べ、IGF-1の働きを抑制するIGFBP2、3、6の発現量が有意に減少し（ $P < 0.05$ ）、IGF-1の働きを促進するIGFBP5の発現量が有意に上昇した（ $P < 0.05$ ）（図1）。

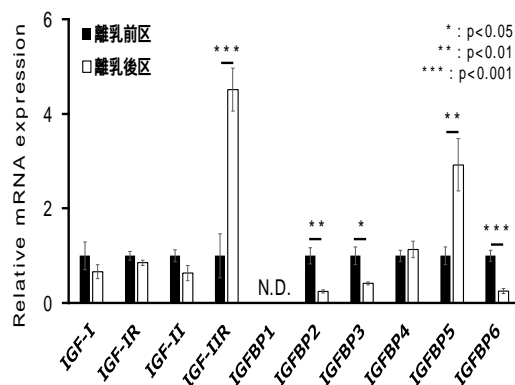


図1. 離乳前後の黒毛和種牛のルーメン柔毛組織において遺伝子発現量

一方、離乳区は哺乳持続区と比べ、IGFBP2、3、6の遺伝子発現量に差が認められず、IGFBP5の遺伝子発現量のみが上昇する傾向であった（ $P < 0.1$ ）（図2）。これらの結果から、黒毛和種牛の離乳区において、IGFBP2、3、6の発現量が低下したのは、加齢の影響によるものであり、IGFBP5の発現量の上昇は、離乳と加齢により促進されることが示唆された。IGFBP5がIGF-1の受容体への働きを促進することで、ルーメン絨毛上皮組織の発達が促進されたと考えられる。

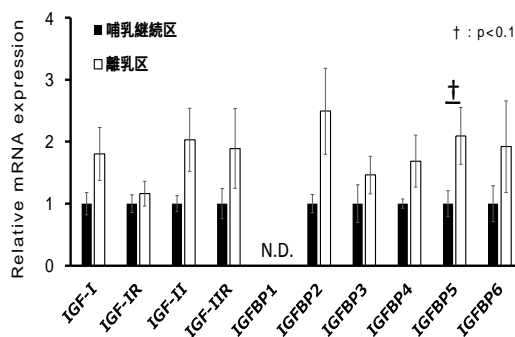


図2. 哺乳持続区と離乳区ホルスタインルーメン柔毛組織における遺伝子発現量

(実験2) IGF-1はルーメン組織中のケラチン層を除く上皮層に局在していたが、間質層にはIGF-1の局在は認められなかった。この結果より、IGF-1はルーメン組織の上皮層から合成・分泌され、居所での作用によりの上皮細胞の分化や増殖に関与することが考えられる。

(実験3)酪酸10mM刺激により、IGFBP2の発現量は有意に上昇し、IGF-1の働きを抑制するIGFBP4と6の発現量は有意に低下した。反対に、プロピオン酸20mM刺激では、IGFBP4の発現量が有意に上昇した。酢酸60mM刺激によるIGFBPs発現量の変化はなかった。いずれのVFAもIGFBP5やIGF-1、IGF-1受容体の発現量の変化は認められなかった。これらの結果より、VFAはIGFBP5の発現に対して直接的な影響はないことが示唆された。

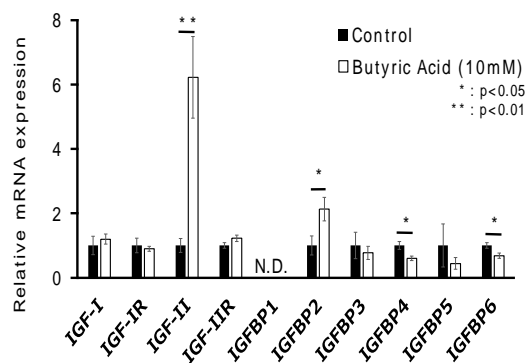


図3. 培養ルーメン上皮細胞における酪酸添加による遺伝子発現量

#### 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 3件)

Suzuki Y, Haga S, Nakano M, Ishizaki H, Nakano M, Song SH, Katoh K, Roh SG, 2016, Postweaning changes in the expression of chemerin and its receptors in calves are associated with the modification of

glucose metabolism, Journal of Animal Science, 94(11), 2016, 4600-4610  
DOI: 10.2527/jas.2016-0677

Kato D, Suzuki Y, Haga S, So KH, Yamauchi E, Nakano M, Ishizaki H, Choi KC, Katoh K, Roh SG, Utilization of digital differential display to identify differentially expressed genes related to rumen development. Animal Science Journal 87, 2016, 584-590  
DOI: 10.1111/asj.12448

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :

(4)研究協力者 ( )

〔学会発表〕(計 1件)

矢嶋 優、西原 昂来、金 多慧、芳賀 聡、中野 美和、石崎 宏、牛越 康一郎、鈴木 武人、鈴木 啓一、加藤 和雄、盧 尚建、哺乳仔ウシの内分泌、免疫機能および発育性に及ぼすリゾープス麹抽出物添加代用乳給餌の影響、要旨集 P.178. 日本畜産学会第 122 回大会(神戸大学、神戸市、2017 年 3 月 28 日~30 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

加藤 和雄 (Katoh, Kazuo)  
東北大学・大学院農学研究科・客員教授  
研究者番号 : 6 0 0 9 1 8 3 1

### (2)研究分担者

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 : 8 0 1 5 6 2 4 9