

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18786

研究課題名(和文)ウシのヒストン脱アセチル化酵素の酪酸感受性と栄養代謝・繁殖能に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental study on butyric acid susceptibility of bovine histone deacetylase and nutritional metabolism / breeding performance

研究代表者

鈴木 武人 (Suzuki, Takehito)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90532052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝機能障害を軽減して、ウシの繁殖障害を改善することが、申請者の最終目標である。そのために酪酸の機能活用について検討した。ウシ由来の卵巣顆粒膜細胞で性ホルモン産生に関わる遺伝子は、ウシの血中濃度と同レベルの酪酸(0.25mM)を添加した時に発現が維持された。したがって、酪酸のHDAC阻害効果を引き出すためには、血中酪酸濃度を一定範囲に調節する必要があるかもしれない。一方、最終濃度1.0 mMより高いレベルの酪酸を添加すると、ウシ由来の卵巣顆粒膜細胞で性ホルモン産生に関わる遺伝子の発現が低くなった。このことは、ウシの血中酪酸濃度を過度に高くなると、繁殖成績の低下につながることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：It is the ultimate target of us to improve reproductive disorders of dairy cow by reduction of hepatic dysfunction. For that purpose, we studied the function of butyric acid. In bovine ovarian granulosa cells, the gene expression involved in sex hormone production was maintained when granulosa cells were supplemented with butyric acid (0.25 mM) at the same level as bovine blood levels. Therefore, in order to induce the HDAC inhibitory effect of butyric acid, it may be necessary to adjust the concentration of blood butyric acid within a certain range. Meanwhile, when butyric acid at a higher level than 1.0 mM was added, expression of genes involved in sex hormone production was lowered. This suggests that excessive increase in bovine blood butyrate concentration cause a decrease in reproductive performance.

研究分野：獣医栄養学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素 酪酸 栄養代謝 性ホルモン産生

1. 研究開始当初の背景

乳牛の周産期は、栄養管理の不備によって肝障害が起こりやすく、それが繁殖障害を引き起こすことも多い。乳牛、肉牛問わず、人工授精での初回種付けの受胎率は、90年代前半を境に年々低下していることが(社)家畜改良事業団の調査であきらかになっている。特に乳牛はいちじるしく、90~93年には62%前後だった受胎率は05年以降50%を下回っている。受胎率の低下は空胎日数の延長につながり、特に乳牛ではそれが酪農家の経済的負担に直結する大きな問題となっている。受胎率低下の原因として育種改良による高泌乳牛化に起因する肝障害が指摘されている。分娩後の大量の乳生産が肝臓の栄養素代謝に過大な負担をかけ、脂肪肝をはじめとする肝障害を引き起こす。その結果として、肝臓における1型インスリン様成長因子(IGF-1)の分泌抑制により生殖機能が阻害される(Kawashima *et al.*, 2007)。乳牛が正常な性周期を営み、高い生産性を持続的に引き出すには、肝臓に負荷をかけない適切な栄養管理が重要である。

DNAのメチル化やヒストンタンパク質のアセチル化およびメチル化のような、DNAの塩基配列によらない遺伝子発現の制御・伝達システムをエピジェネティクスという。ウシではルーメン発酵により多量の揮発性脂肪酸(VFA)が産生され、重要なエネルギー源となっているが、VFAのひとつである酪酸は、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤でもある。ウシの肝臓のエネルギー代謝は、ルーメン発酵によって産生されたVFAからの連続的な糖新生や、脂質が放出されにくいというウシならではの特徴がいくつかある。このような肝臓でのエネルギー代謝に関わる遺伝子のなかにはHDACによるエピジェネティックな発現制御を受けるものがある(Oiso *et al.*, 2011, Feng *et al.*, 2011)。一方、卵巣は生殖器として卵を産生するだけでなく、エストロゲンやプロゲステロンなどの性ホルモンを産生する内分泌器官でもある。卵巣顆粒膜細胞におけるエストラジオール(E2)産生はFSHだけでなくIGF-1の影響も受ける。また、E2産生の律速酵素アロマターゼや17-ヒドロキシステロイド脱水素酵素などいくつかの酵素がHDACの制御を受ける(Glister *et al.*, 2012)。

乳牛では疾病の約7割が周産期に集中しているといわれ、栄養管理の不備が直接的あるいは間接的な要因となっている。よって、ウシの飼養管理の中でライフステージに合わせた栄養管理は生産性の観点からも非常に重要である。ウシの栄養管理を高度化することにより、酪酸の血中濃度を制御し、酪酸のHDAC阻害活性を介して肝臓や卵巣顆粒膜細胞に影響を及ぼすことで、繁殖能を大きく改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

肝機能障害を軽減して、ウシの繁殖障害を改善することが、申請者の最終目標である。そのために、酪酸の機能を活用できないか検討した。HDACは、遺伝子発現調節作用を介して肝臓のエネルギー代謝や卵巣の顆粒膜細胞のエストラジオール産生に影響を及ぼし、酪酸にはHDAC活性を阻害する作用がある。ルーメン発酵で酪酸を産生できるウシでは、酪酸によるHDAC活性の調節、HDACを介した代謝調節が、単胃動物と異なる可能性がある。ウシの培養肝および顆粒膜細胞を用い、酪酸 HDAC 代謝調節の特徴をあきらかにすることを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究ではウシの肝細胞と卵巣顆粒膜細胞(以降顆粒膜細胞と略)における酪酸 HDAC 代謝調節の特徴を明らかにし、ウシの生理に合致した飼料設計による生産性の向上に展開するための基礎的研究をおこなう。研究期間内には以下の解析を行った。

周産期のウシおよび単胃動物の血中酪酸濃度についてGC分析を行い、両動物の血中酪酸濃度をもとめる。次項の細胞を用いた実験では、これを元に細胞への酪酸処理濃度を決定した。

ウシおよび単胃動物の肝細胞および顆粒膜細胞における酪酸のHDACファミリーに対する阻害濃度について、HDACの影響を受けるいくつかの遺伝子の発現量をもとに検討した。

酪酸のHDACを介する肝臓の糖代謝や脂質代謝、あるいは顆粒膜細胞のE2産生に与える影響を、上記 *in vitro* の系を用いて律速酵素の遺伝子発現や酵素活性、ホルモン産生などの解析により検討した。

4. 研究成果

分娩8週後のホルスタイン種雌ウシ(n=22)とWister系の雄ラット(7~9週齢; n=30)の血中の酪酸濃度は、ウシが 0.211 ± 0.048 mM、ラットが 0.016 ± 0.010 mMとウシがラットより有意に高値を示すことを確認した(図1)。VFAは単胃動物の消化管、特に大腸においても産生されるが、そのほ

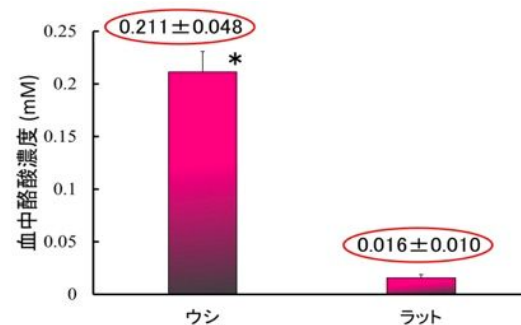


図1. ウシとラットにおける血中酪酸濃度

* : ラットに対して有意差あり (P < 0.05)

とんどは大腸上皮細胞のエネルギー源として利用され、VFA 産生量に占める割合の低い酪酸は血中でほとんど検出されなかった。一方で、ルーメン発酵により大量に VFA が産生されるウシではラットの 13 倍と予想通り高値を示した。この酪酸血中濃度から、細胞を用いた *in vitro* 試験では添加する酪酸の最終濃度を 0.001, 0.01, 0.25, 0.5, 1.0 mM の 5 段階とした。

FSH 刺激によりエストラジオール(E2)産生を誘導した JTC-35 細胞(ウシ由来顆粒膜細胞株)、KGN 細胞(ヒト由来顆粒膜細胞株)に、0.01~2.5mM の酪酸を添加して、HSD171、アロマターゼなど E2 産生に不可欠な酵素をコードする遺伝子群とその転写調節因子について mRNA 発現量を Real time RT-PCR 法により解析した。ウシ顆粒膜細胞では HSD17B1 の発現量が酪酸濃度依存的に低下した($p < 0.05$)。アロマターゼをコードする CYP19A1 は酪酸濃度 0.25mM で発現量が維持されたが、その他の濃度では低下した($p < 0.05$) (図 2)。上記各実験条件にお

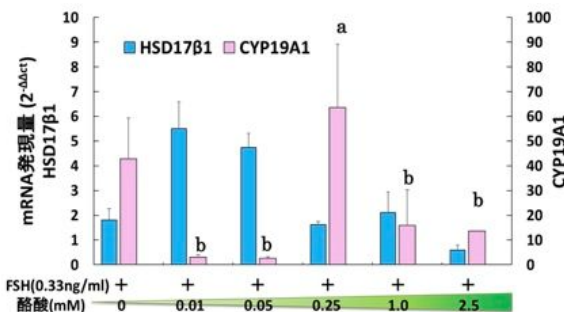


図2. 酪酸の添加がE2産生経路の各遺伝子発現量に及ぼす影響 (異なる記号間に有意差あり; $p < 0.05$)

ける核抽出物中の HDAC 活性を測定した結果、酪酸濃度上昇とともに漸減し、0.25mM の時に最も低い活性を示し、1mM で上昇に転じた (図 3)。つまり、CYP19A1 の発現量が維持された酪酸濃度 0.25mM では HDAC 活性が最も低地を示したことから、ヒストンアセチル化による遺伝子発現が維持されたものと考えられた。また、培地中に分泌されたエストロゲン濃度については、エストラジオール(E2)に実験条件による変化は認められなかったが、エストロン(E1)は酪酸濃度上昇とともに低下する中で酪酸濃度 0.25mM のみ E1 産生量が回復した (図 4)。

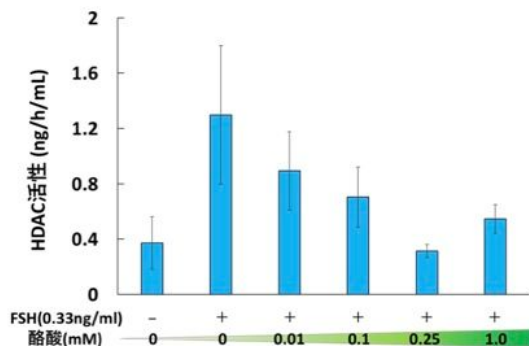


図3. 酪酸の添加がHDAC活性に及ぼす影響

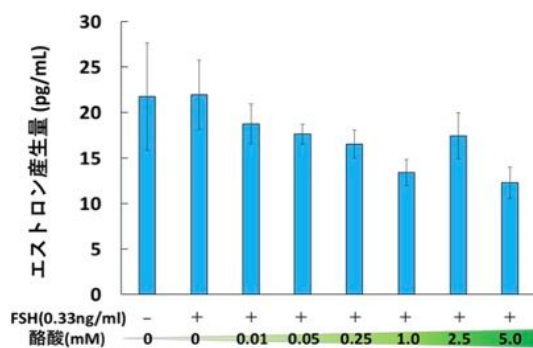


図4. 酪酸の添加がエストロン産生に及ぼす影響

一方、ヒト顆粒膜細胞では HSD17B1 の発現量は酪酸濃度にかかわらず低下し ($p < 0.05$)、CYP19A1 も酪酸濃度依存的に低下した ($p < 0.05$) (図 5)。培地中のエストロゲン濃度については、酪酸濃度 0.05mM の時に最も E2 濃度が上昇し、酪酸濃度上昇とともに低下した (図 6)。E1 は実験条件による変化は認められなかった。

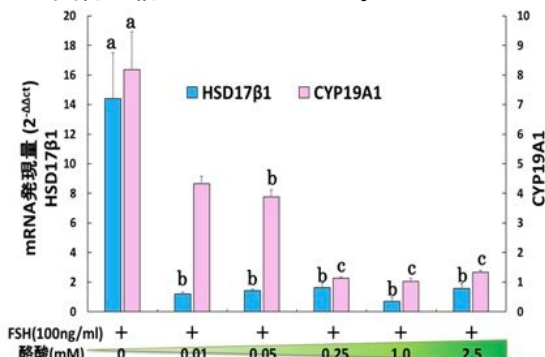


図5. 酪酸の添加がE2産生経路の各遺伝子発現量に及ぼす影響 (異なる記号間に有意差あり; $p < 0.05$)

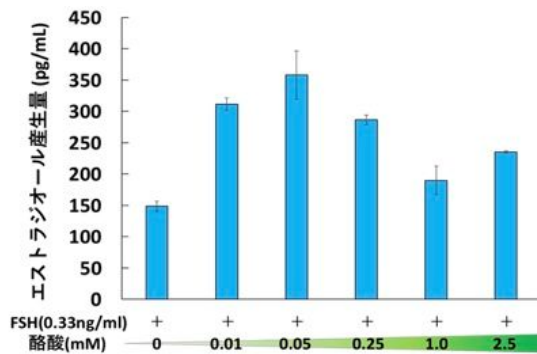


図6. 酪酸の添加がエストラジオール産生に及ぼす影響

このように、反芻動物と単胃動物では酪酸に対する反応が異なり、また遺伝子により酪酸への反応が異なることを確認した。ウシ初代培養肝細胞に最終濃度 0.01 または 0.25mM の酪酸、100nM のインスリン、50 μ M のオレイン酸を添加し、6 時間後の Fatty acid synthase (Fas)、diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)、diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2)、acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1)、Phosphofructokinase (PFK) の各遺伝子の発現量を測定した (オレイン酸は泌乳初

期牛の血清遊離脂肪酸の主要な脂肪酸である。)。その結果を図7-9に示した。酪酸のみを添加した場合の脂質代謝は、0.01mMで脂肪酸合成が優位になり、0.25mMでは脂肪酸の合成と分解が同程度、2.5mMでは分解が優位となった。同じく糖質代謝は、0.01および2.5mMで糖新生が抑制傾向にあったのに対し、0.25mMでは抑制されにくい傾向にあった。同細胞にインスリンを添加すると解糖系の律速酵素 PFK が活性化したが、酪酸を添加するとさらに発現量が高まる傾向にあった。しかし、酪酸0.25mM添加時はこの高発現が見られなかった。インスリンは脂肪酸合成も促進するが、酪酸を0.25mM添加すると著性に Fas の発現量が低下したが、さらにオレイン酸を加えると Fas の発現量は逆に増加した。

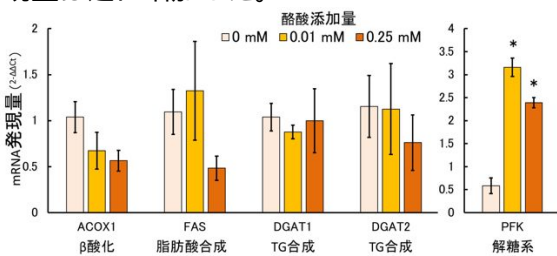


図7. 酪酸添加量と肝臓の脂質代謝・糖代謝遺伝子の発現量 (* : $p < 0.05$)

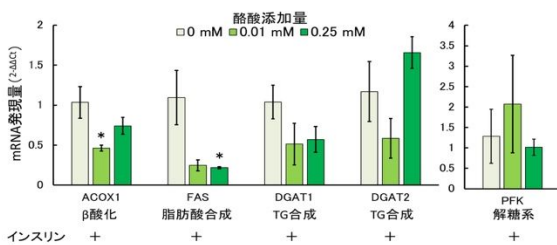


図8. 酪酸添加量と肝臓の脂質代謝・糖代謝遺伝子の発現量 (* : $p < 0.05$)

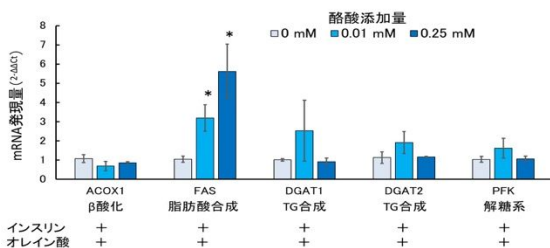


図9. 酪酸添加量と肝臓の脂質代謝・糖代謝遺伝子の発現量 (* : $p < 0.05$)

一方、株化ラット肝細胞(RLN-10)に最終濃度0.01、0.25、2.5 mMの酪酸を添加し、6時間後のFas、DGAT1、DGAT2、ACOX1の各遺伝子の発現量を測定したが、2.5mMのみ全ての遺伝子の発現量に増加傾向が見られ、酪酸感受性に遺伝子の違いは認められなかった。

ウシ初代培養肝細胞における脂質代謝は

酪酸濃度の高低によって逆の反応を示し、糖代謝においてもインスリン感作時にウシ血中と同じレベルの酪酸濃度で解糖系の律速酵素 PFK や脂肪酸合成酵素 Fas が抑制されるなどインスリンの作用を打ち消すような特徴的な反応を示した。泌乳牛はインスリン抵抗性を亢進させることで乳糖の合成に必要なグルコースを乳腺に効率的に分配していると言われている。泌乳期の濃厚飼料多給によってルーメンで産生される酪酸が、インスリン抵抗性の一端を担っている可能性が示唆された。ウシ由来の卵巣顆粒膜細胞で性ホルモン産生に関わる遺伝子の発現が維持されたのは、ウシの血中濃度と同じレベルの酪酸を添加したときだった。したがって、酪酸のHDAC阻害効果を引き出すためには、血中酪酸濃度を一定範囲に調節する必要があるかもしれない。一方、最終濃度1.0 mMより高いレベルの酪酸を添加すると、ウシ由来の卵巣顆粒膜細胞で性ホルモン産生に関わる遺伝子の発現が低くなった。このことは、ウシの血中酪酸濃度を過度に高くなると、繁殖成績の低下につながることを示唆している。

つまり、肝臓のエネルギー代謝や卵巣顆粒膜細胞の性ホルモン産生に関わる遺伝子の発現量を変化させる酪酸濃度は種特異的であることが分かった。

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)

[学会発表](計 1 件)

鈴木武人、岸森弘子、佐藤礼一郎、勝俣昌也

ウシ卵巣顆粒膜細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害の特徴

日本畜産学会第123回大会(2017年3月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木武人 (SUZUKI TAKEHITO)

麻布大学獣医学部

講師

研究者番号：90532052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし