

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03130

研究課題名(和文)肥育牛におけるUCP1の発現調節機構解明と生産性への影響

研究課題名(英文)Clarification of the regulatory expression of UCP1 in fattening cattle and its effect on beef production

研究代表者

松井 徹 (Matsui, Tohru)

京都大学・農学研究科・名誉教授

研究者番号：40181680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱共役タンパク質(UCP)1は、適応性熱産生の責任分子であり、効率的な肉牛肥育にマイナスに働く。本研究において、1. ウシUCP1遺伝子の特徴ならびに発現制御、2. 肥育牛の脂肪・筋組織におけるUCP1発現と生産性の関係、3. 筋系細胞におけるUCP1発現誘導条件の解明を試みた。ウシUCP1遺伝子には変異体があること、筋組織でのUCP1発現は速筋線維の形成と関係すること、内因性BMP経路はUCP1発現を抑制すること、脂肪・筋組織におけるUCP1発現は生産性と明確な関係を示さないことが明らかになった。また、マウス筋系細胞ではBMP7がUCP1発現を正に制御していることも明らかにした。

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はエネルギー浪費タンパク質なので肉牛での発現は低い方が良い。ヒトやマウスとは異なり、ウシUCP1は筋組織でも発現する。ウシUCP1発現に関して詳細に解析したところ、ヒトやマウスでの知見を必ずしも適用できないことが明らかになった。これは比較生物学上の基礎知見として有用である。ウシUCP1発現制御に関してウシ個体、細胞、遺伝子を用いて解析することにより、より効率的な肉牛生産法の開発が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Uncoupling protein (UCP)1 is responsible for adaptive heat production and has an adverse effect for efficient beef production. The present study attempted to elucidate 1) the characterization of bovine UCP1 gene, 2) the relationship between adipose and muscular UCP1 expression and beef production, and 3) factors affecting UCP1 expression in muscular cells. We found variants of bovine UCP1 gene, regulatory expression of muscular UCP1 related to formation of fast-twitch muscle fibers, and negative regulation of bovine UCP1 expression by endogenous BMP pathway. We also revealed that adipose and muscular UCP1 expression had no clear relationship with beef production, and that BMP7 positively regulates UCP1 expression in mouse myogenic cells.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：畜産学 栄養学

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥育牛の基礎代謝量（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) このことは、肥育の進行に伴い、基礎代謝が亢進し、肥育効率が低下することを示唆しており、効率的な肥育を考える上で極めて重要であるが、原因は解明されていない。

(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 はヒトやマウスでは褐色脂肪細胞・ベージュ脂肪細胞のみで特異的に発現するとされていた。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) 研究代表者らは、肥育の進行に伴って基礎代謝が亢進するのは、UCP1 発現が増加することにより ATP 生産に使われるべきエネルギーが熱として消費されるからではないか？との仮説を立てている。

(6) 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が、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) 研究代表者らは、また、ヒトやマウスでの知見とは異なり、UCP1 は骨格筋組織においても発現していることを見出している。

(8) UCP1 活性は UCP1 mRNA 量と連動する。黒毛和種肥育牛 12 頭を使った予備的な検討において、脂肪組織中で UCP1 mRNA 量がとくに高い個体の飼料効率は著しく低いことを見出しており、UCP1 mRNA 量が実際に肥育牛の生産性に影響を及ぼすことを検証する必要がある。

(9) マウスやヒトの UCP1 発現制御は精力的に解析されている一方、ウシにおける解析は進められていない。上述のように、ヒト・マウスとは異なり、ウシでは筋肉でも UCP1 が発現していることから、ウシ特有の UCP1 発現制御機構がある可能性がある。

(10) ヒトやマウスでは、エクソソームを介した細胞間情報伝達機構が明らかにされており、マウスでは、血清エクソソーム中マイクロ RNA(miR-92a など)濃度は褐色脂肪細胞活性と負の関係を示す。ウシにおいても血清エクソソーム中のマイクロ RNA による UCP1 発現制御の可能性がある。

(11) UCP2 は UCP1 と構造的な類似性を有する分子である。ウシ UCP2 の発現制御に関する研究は見当たらない。

2. 研究の目的

(1) 肥育牛における UCP1 の発現調節機構解明と生産性への影響を明らかにすることが本研究の最終的な目的である。

(2) 具体的には、1. ウシ UCP1 mRNA の単離、2. ウシ UCP1 発現に影響を及ぼす要因の解析、ならびに、3. 肥育牛の脂肪・筋組織における UCP1 発現と生産性の関係解明を目的とする。

(3) また、関連する研究として、下記の項目 1-3 の解明も目的とした：1. 肥育に伴う血漿エクソソーム中 miRNA 濃度変化、2. 筋系細胞が UCP1 陽性褐色脂肪細胞に分化する条件、3. UCP2 発現制御機構

3. 研究の方法

(1) ウシ UCP1 mRNA 単離：ジャージー種新生子牛の褐色脂肪組織から総 RNA を単離し、既知の塩基配列を基に部分的な UCP1 mRNA を単離した。その配列を基に 5'-RACE 法ならびに 3'-

RACE 法によりウシ UCP1 mRNA を単離した。

(2) ウシ UCP1 発現に影響を及ぼす要因の解析： 月齢が黒毛和種肥育牛の筋組織における UCP1 発現に及ぼす影響を検討するため、26 ヶ月齢あるいは 30 ヶ月齢肥育の頸部最長筋における UCP1 遺伝子発現を測定した。黒毛和種肥育牛頸部最長筋より筋衛星細胞を単離し、2% ウマ血清存在下で培養することにより筋分化を誘導した。筋分化過程においてホルスコリン、レチノイン酸、TGF- β 経路阻害剤、あるいは BMP 経路阻害剤を添加し、UCP1 発現に及ぼす影響を検討した。

(3) 肥育牛の脂肪・筋組織における UCP1 発現と生産性の関係：食肉市場に出荷された黒毛和種肥育牛の皮下脂肪、腸間膜脂肪、頸部最長筋における UCP1 mRNA 発現を測定し、枝肉重量を含む枝肉形質との関係を評価した。

(4) 肥育に伴う血漿エクソソーム中マイクロ RNA 濃度に及ぼす影響：10 ヶ月齢あるいは 30 ヶ月齢黒毛和種去勢牛の血漿エクソソーム中に存在するマイクロ RNA を網羅的に解析した。また、10 ヶ月齢から 30 ヶ月齢まで 5 ヶ月おきに採血を行い、血漿エクソソーム中の特定のマイクロ RNA 濃度を測定した。

(5) 筋系細胞が UCP1 陽性褐色脂肪細胞に分化する条件：マウス筋系細胞 C2C12 を様々な条件で培養することにより、脂肪細胞に分化させ、UCP1 発現を検討した。

(6) UCP2 発現制御機構の解明：ヒト肝臓由来細胞 HepG2 を用いて酸化ストレスならびに小胞体ストレスが UCP2 発現に及ぼす影響を検討した。また、ウシ UCP2 プロモーター活性を評価するレポーターを構築し、ウシ UCP2 転写に及ぼす要因を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒトやマウス UCP1 に相当するウシ UCP1 mRNA を褐色脂肪組織より単離した。これは 6 つの Exon から構成されていた。Exon 3 のスキップ、Exon 5 の伸長に由来する 4 種の変異体 (variant 1-4) の存在が明らかになった。この変異体の存在は、これまで解析されてきた動物種で知られていない新規のものであった。

(2) 各 UCP1 変異体 mRNA を識別できる qPCR の系を確立し、ウシ脂肪組織で発現する UCP1 変異体を解析したところ、ヒトやマウス UCP1 に相当する variant 1 と Exon 3 を欠く variant 3 が主要な UCP1 mRNA であることが明らかになった。各 UCP1 変異体タンパク質を発現させたところ、variant 1 以外の variant 2-4 のタンパク質発現は低いこと、これはプロテアソーム系によって速やかに分解されることが原因であることが明らかになった。

(3) 26 ヶ月齢または 30 ヶ月齢の黒毛和種肥育牛の骨格筋組織における UCP1 mRNA レベルを評価したところ、26 ヶ月齢の肥育牛よりも 30 ヶ月齢の肥育牛の方が高いこと、速筋線維で多く発現すミオシン重鎖(MYH)1 の発現量も 26 ヶ月齢の肥育牛に比べて 30 ヶ月齢の肥育牛で有意に高いこと、同様の傾向は、速筋線維で高発現する他の MYH である MYH2 および MYH4 の発現でも観察されたこと、一方、遅筋線維に発現する MYH7 の発現は、月齢の影響を受けないことが明らかになった。UCP1 mRNA レベルは、MYH1、MYH2、MYH4 mRNA レベルと正の相関を示したが、MYH7 mRNA とは相関を示さず、肥育牛の速筋線維形成時に UCP1 発現が亢進する可能性が考えられた。

(4) ウシ骨格筋から筋衛星細胞を単離し筋管分化を誘導し、UCP1 発現に影響を及ぼす要因を解析した。ヒトやマウスの褐色脂肪細胞において UCP1 発現を誘導することが知られているホルスコリンやレチノイン酸はウシ UCP1 mRNA レベルに影響を及ぼさなかった。マウス筋系細胞の分化と同様、阻害剤により、内因性の TGF- β 経路を抑制したところ筋形成は促進された。UCP1 発現も統計的に有意ではなかったものの TGF- β 経路阻害剤により増加する傾向を示した。一方、内因性 BMP 経路の阻害により筋分化は変化しなかったが UCP1 発現は増加した：ヒトやマウスの褐色脂肪細胞では BMP 経路活性化により UCP1 発現は増加することが知られている。以上の結果は、ウシ骨格筋における UCP1 発現制御はヒトやマウス褐色脂肪細胞での知見をそのまま適用できない可能性を示唆している。

(5) 肥育牛の脂肪・筋組織における UCP1 発現と生産性の関係を検討したが、UCP1 mRNA 発現量と枝肉重量等との間に注目すべき関係性はなかった。また、月齢の異なる肥育牛 (10 ヶ月齢と 30 ヶ月齢) の血漿エクソソーム中マイクロ RNA の網羅的解析において明確な違いが認められたマイクロ RNA、ならびにマウス UCP1 発現との関連が指摘されているマイクロ RNA に関して、肥育に伴う血漿エクソソーム中における濃度変化を検討したが、明瞭な経時変化を示さなかった。この原因として個体差が大きいことが考えられた。

(6) C2C12 マウス筋系細胞に PRDM16 や EBF2 などの遺伝子を導入することにより UCP1 陽性脂肪細胞が形成されることは知られているが、実際に起こり得る処理で C2C12 細胞に UCP1 発現を誘導させる報告はなかった。本研究課題では、試薬類の添加による C2C12 細胞での UCP1 遺伝子誘導条件の解明を試みた。その結果、PPAR γ アゴニストであるロシグリタゾン存在下で BMP7 処理を行うとホルスコリン誘導性 UCP1 発現が著しく亢進されることが明らかになった。また、その過程に FGF 経路が関わっている可能性を見出した。

(7) UCP1 とは異なり、UCP2 や UCP3 は非ふるえ熱産生に関与しておらず、活性酸素種の除去に関わっていることが知られている。そこで酸化ストレス誘導剤が UCP2 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討した。HepG2 ヒト肝臓由来細胞をクメンヒドロペルオキシド処理することにより酸化ストレスマーカー遺伝子は顕著な増加を示したが、UCP2 mRNA は変化を示さなかった。ウシ UCP2 転写に影響を及ぼす因子のスクリーニングを行ったところ、小胞体ストレスによって活性化される転写因子群が UCP2 転写を促進した。そこで、HepG2 細胞ならびにマウス肝臓由来細胞である Hepa1-6 細胞を様々な小胞体ストレス誘導剤で処理したが、UCP2 mRNA レベルは変化しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto T, Diao Z, Murakami M, Shimokawa F, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 157
2. 論文標題 Factors affecting the induction of uncoupling protein 1 in C2C12 myogenic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 155936 ~ 155936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2022.155936	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 -
1. 著者名 Diao Z, Shimokawa F, Yoshioka H, Itoyama E, Matsumura M, Murakami M, Kitamura S, Nagase H, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 85
2. 論文標題 Possibility of uncoupling protein 1 expression in bovine fast-twitch muscle fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0057	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 -
1. 著者名 Diao Z, Murakami M, Sato R, Shimokawa F, Matsumura M, Hashimoto O, Onda K, Shirai M, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Identification and expression of bovine Ucp1 variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159111 ~ 159111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2022.159111	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 -
1. 著者名 Abd Eldaim MA., Zhao K, Murakami M, Yoshioka H, Itoyama E, Kitamura S, Nagase H, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Regulatory expression of uncoupling protein 1 and its related genes by endogenous activity of the transforming growth factor family in bovine myogenic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3592	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 該当する

1. 著者名 Kim DH, Sadakane H, Nishikiori Y, Matsumura M, Ikeda M, Diao Z, Jha R, Murakami M, Matsui T, Funaba M.	4. 巻 82
2. 論文標題 Factors affecting expression and transcription of uncoupling protein 2 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1734 ~ 1741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0444	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Diao Zhicheng・村上賢・佐藤礼一郎・下河史枝・恩田賢・白井明志・松井徹・舟場正幸
2. 発表標題 ウシ脱共役タンパク質1バリエーションの同定と発現
3. 学会等名 第71回関西畜産学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上賢・下河史枝・佐藤礼一郎・恩田賢・舟場正幸
2. 発表標題 ウシUcp1遺伝子における4つのバリエーションの同定とその発現
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022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・教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	村上 賢 (Murakami Masaru)		
研究協力者	吉岡 秀貢 (Yoshioka Hidetsugu)		
研究協力者	糸山 恵理奈 (Itoyama Erina)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関