

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06366

研究課題名(和文) 成長初期の光環境応答性を利用した産肉性制御システムの生物学的基盤

研究課題名(英文) Mechanisms underlying beef production system with enduring effects of early-life photoperiod

研究代表者

安尾 しのぶ (Yasuo, Shinobu)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30574719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：適切な光線管理は家畜の飼養管理において重要である。本研究では、哺乳期の日長による生体調節機構を解明するため、マウスと黒毛和種のウシを用いた解析を行なった。哺乳期の日長を毎日徐々に延長する長日処理によりマウスの増体が促進された。この影響には、視床下部における成長および神経発達に関する遺伝子群が関与する可能性が示唆された。哺乳期に長日処理を行なったウシでは、短日処理群に比べて、出荷時における総枝肉重量の増加傾向が確認された。また、胸最長筋サンプルにおけるヒストン修飾の一部が、哺乳期の日長により長期的に調節されることが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳期の日長処理による増体促進機序として、単なる刺激応答的な摂食やエネルギー代謝の調節ではなく、生後初期の神経回路モデリングという長期持続可能な機序の関与を示す初の知見である。さらに、黒毛和種のウシにおいて、哺乳期における光環境の影響が出荷時まで継続し、長期的に枝肉重量やヒストン修飾を調節する可能性を示した。哺乳期の日長情報がエピジェネティックに生体に刷り込まれ、数年スパンの長期的な生体調節を担う可能性を示唆しており、光環境を利用した効率的な生産性向上技術開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Appropriate management of lighting condition is important in livestock. The present study analyzed effect of postnatal photoperiod on growth and muscle development as well as molecular/epigenetic mechanisms using mice and Japanese Black cows. Gradually increasing photoperiod promoted body weight gain in mice. RNA-seq analysis revealed that expression of hypothalamic genes involved in growth and neuron development were widely altered by postnatal photoperiod. Cows exposed to long-day condition during postnatal period exhibited higher weight of total carcass at slaughter, compared to those exposed to short-day condition. Several modifications of histone proteins were significantly altered by postnatal photoperiod over several years.

研究分野：動物生理学

キーワード：季節 日長 骨格筋 哺乳期 成長 ウシ マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

適切な光線管理は家畜の効率的な飼養管理において重要である。家禽やヒツジなどの季節繁殖動物では、日長の季節変化に対する適応メカニズムである光周性を備えており、適切な日長管理が高生産性に必要である。我が国の主要産業動物であるウシは周年繁殖性であるが、冬季における成長遅延や脂肪の過剰蓄積、分娩季節と仔牛の性成熟速度との関連、人工照明による長日条件下の体重・乳量増加などが報告されている。一方、長期飼養が必要とされるウシにおいて常時の光線管理は非効率的であり、慢性的な日長処理により日長応答性が低下することなどが懸念される。

動物は早期ライフステージの環境情報をエピジェネティックなレベルで生体に刷り込み、成長後に至るまでの代謝・生理基盤を形成する。出生季節の環境情報も生体に刷り込まれ、ヒトでは出生季節により成長速度や成熟後の代謝・神経関連疾患リスクが異なる。哺乳期の季節情報を日長で再現して家畜に刷り込むことができれば、短期間の日長処理で長期的な代謝・生理制御が可能となる。

我々はこれまでに、哺乳期の日長処理がマウスや黒毛和種のウシに長期的に及ぼす影響を解析し、体重増加速度や肉質関連指標を日長により調節できる可能性を見出した。また、ウシとマウスの骨格筋に共通して哺乳期の日長により長期的な発現制御を受ける「日長応答遺伝子」として、細胞内の膜融合に関わる *Syntaxin 16 (Stx16)* を同定した。しかし骨格筋や肝臓を含め、*Stx16* が生体内で担う役割は部分的にしか解明されていない。これらの機序を詳細に解明できれば、哺乳期の光環境を利用した効率的な生産システムの生物学的基礎が築かれる。

2. 研究の目的

(1) 哺乳期の日長により増体速度が変化するメカニズムを解明するため、様々なパターンで日長処理を加えたマウスの増体変化を比較し、効率的な体重増加が見られる条件を設定する。当該条件にて、体重・摂食・エネルギー代謝の中核である視床下部の遺伝子発現プロファイルを網羅的に明らかにする。

(2) *Stx16* ノックアウトマウスを作製し、個体成長や行動などの全体的な表現型とともに、骨格筋や肝臓に関する表現型を解析する。

(3) 哺乳期の日長が黒毛和種の筋肉の生化学的指標やエピジェネティック機構に及ぼす影響を解明する。哺乳期を長日条件あるいは短日条件で飼育した黒毛和種のウシの出荷時における胸最長筋・皮下脂肪サンプルを用いて各種分析を行う。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスを 10 時間明期:14 時間暗期 (10L14D) で交配し、出生直後から明期を 1 週間に 20 分あるいは 40 分の速度で毎日徐々に延長 (LD20, LD40) あるいは短縮させる条件 (SD20, SD40) で飼育した。これらの処理は、中緯度および高緯度地域の春から夏あるいは秋から冬への変化を再現したものである。対称群 (CN) は 10L14D で飼育した。増体促進の見られた LD40 と CN の 6 週齢時の視床下部を用いて mRNA-seq を行い、結果を qPCR で確認した。Ingenuity Pathway Analysis (キアゲン) を用いて遺伝子発現ネットワーク解析を行い、中心的制御経路のハブ遺伝子を推定した。また、日長伝達ホルモンの一つであるグルココルチコイドが遺伝子発現変化に及ぼす影響について、グルココルチコイド受容体アンタゴニストである RU486 の腹腔投与により解析した。

(2) *Stx16* のノックアウトマウスの凍結精子をアメリカの Mutant Mouse Resource & Research Centers より入手し、個体化後に交配してホモ接合のノックアウトマウスを作製して表現型解析を行なった。体重、活動・体温リズム (nanotag)、不安様行動 (オープンフィールド試験、ホールボード試験)、性周期 (膣スメア観察) を解析した。また、*Stx16* と関連するオートファジー遺伝子やホルモン受容体遺伝子の発現について、肝臓や筋肉組織を用いて qPCR で解析した。

(3) 哺乳期を長日条件あるいは短日条件で飼育した黒毛和種のウシの出荷時 (41-47 ヶ月齢) における胸最長筋および皮下脂肪サンプルを採取し、肉質項目の比較、LC-MS/MS による遊離アミノ酸・ジペプチド分析、GC-MS による脂肪酸分析、毛細管法による脂肪融点の分析を行なった。

胸最長筋のゲノム DNA およびヒストンタンパク質を抽出し、エピジェネティック制御機構として、DNA メチル化とヒストン修飾について解析した。*Stx16* のプロモーター領域に存在する CpG アイランドにおいて、11 領域を標的にプライマーを作製し、DNA メチル化抗体および DNA ヒドロキシメチル化抗体を用いた免疫沈降後のサンプルで qPCR を行った。また、ヒストン H3 の 21 箇所およびヒストン H4 の 10 箇所における化学修飾をマルチプレックス検出キット (EpiGenetek Group Inc., EpiQuik Histone H3/H4 Modification Multiplex Assay kit) により測定した。

4. 研究成果

(1) LD40 の体重は 4 週齢から対照群よりも有意に重く、高緯度地域の日長変遷速度で徐々に延長する日長が増体を促進することが解明された (図 1A)。LD40 の摂食量には有意な影響は見られなかった。哺乳期の日長がマウスの成長を促進するメカニズムを解析するため、LD40 と CN の 6 週齢時における視床下部を用いて mRNA-seq を行なったところ、成長や神経発達に関連する遺伝子群の発現が LD40 で有意に増加していた (図 1B)。遺伝子発現ネットワーク解析の結果、中心的経路のハブ遺伝子と予測される 2 つの遺伝子を同定した。qPCR により、それらの遺伝子発現が哺乳期から離乳後まで継続してみられること、上流制御遺伝子の発現も日長で変化することを確認した (図 1C)。

mRNA-seq で検出された遺伝子発現変化について、グルココルチコイド受容体の関与を拮抗薬投与で検討したが、発現に有意な変化は見られなかった。日長はホルモン分泌のみでなく、神経発達にクリティカルな役割を持つ脳内モノアミン系にも影響を及ぼす。今後、脳内モノアミン系の関与について解析を進める。

これらの結果は、光環境を利用して哺乳類の成長速度を速める技術に応用可能であり、光を利用した家畜生産技術にむけた重要な基礎データとなる。

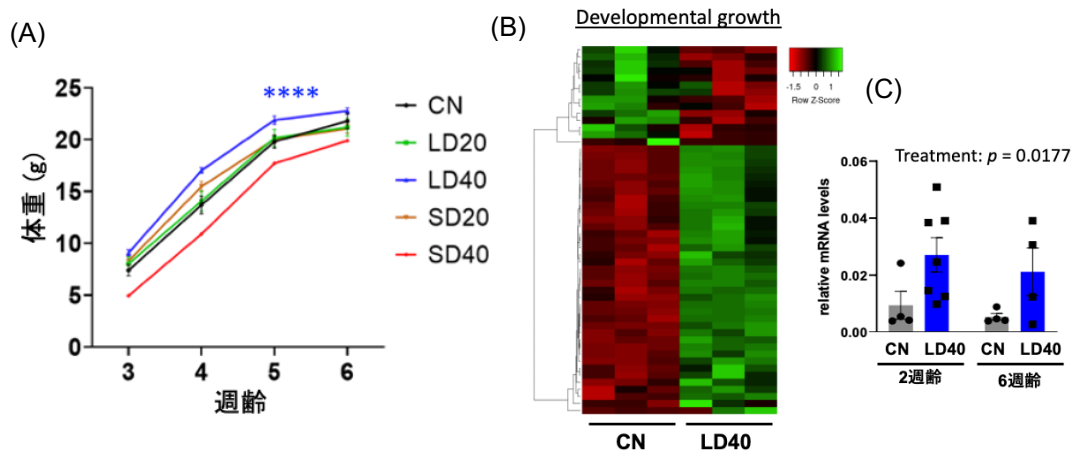


図 1. 哺乳期の日長がマウスの体重および視床下部の遺伝子発現に及ぼす影響

(A) 1 週間に 20 分あるいは 40 分の速度で毎日徐々に日長を延長した群 (LD20, LD40) と短縮した群 (SD20, SD40) における体重推移を示す。CN; 対称群, **** $p < 0.0001$, vs. CN, Bonferroni test. (B) 6 週齢時の LD40 と CN の視床下部を用いた mRNA-seq で検出された発現差異遺伝子のうち、developmental growth 経路に含まれる発現変化のヒートマップを示す。 (C) 遺伝子発現ネットワークで検出されたハブ遺伝子の発現を示す。p 値: two-way ANOVA.

(2) *Stx16* のノックアウトマウスでは、自発運動量や不安様行動、体温リズム、体重に変化は見られず、骨格筋や肝臓で *Stx16* と関連するオートファジー関連遺伝子の発現にも変化は見られなかった。一方で、*Stx16* ノックアウトマウスのホモ接合体同士を交配すると、新生仔が出生直後に死亡する現象が頻繁に確認された。ヘテロ接合体同士の交配で出生したホモ個体は正常に発育すること、ホモ接合体メスマウスの性周期は正常であることから、子育てに関する生理機能に異常が生じている可能性が示唆される。

(3) 黒毛和牛において、哺乳期を長日で飼育した区では、短日区に比べて出荷時の枝肉総重量が多い傾向が見られた ($p = 0.0512$, 図 2A)。出生季節で比べると、秋生まれ群で有意に多い結果であった ($p = 0.0253$, 図 2B)。肉質項目には、日長処理や出生季節による有意な影響は認められなかった。以前の研究にて、これらのウシの 10 カ月齢時までの筋線維断面積の分布を計測したところ、長日処理のほうが太い分布域にあった。以上より、長日処理により筋発達が促進され、発達した筋肉量が屠畜時まで継続した可能性が示唆される。

胸最長筋のアミノ酸やジペプチド組成を分析したところ、長日処理群および秋生まれ群ではグルタミン酸が有意に多かった。また、カルノシンやアンセリンは春生まれで多かった。胸最長筋内の脂肪や皮下脂肪における脂肪酸組成や脂肪融点を分析したが、日長による有意な影響は見られなかった。

胸最長筋からゲノム DNA を抽出し、*Stx16* のプロモーターにおける DNA メチル化/ヒドロキシメチル化解析を行なった。しかし、調査したいずれの CpG 領域についても、DNA メチル化・ヒドロキシメチル化率ともに、哺乳期の日長は見られなかった。そこで別のエピジェネティック制御機構であるヒストンタンパク質修飾を分析したところ、H3 の 2 カ所 および H4 の 1 カ所における化学修飾が哺乳期の日長により有意に変化していた (図 2C)。これらの修飾は長期的な遺伝子発現変化に影響するため、哺乳期の日長による代謝プログラミングに関わる可能性が考えられる。

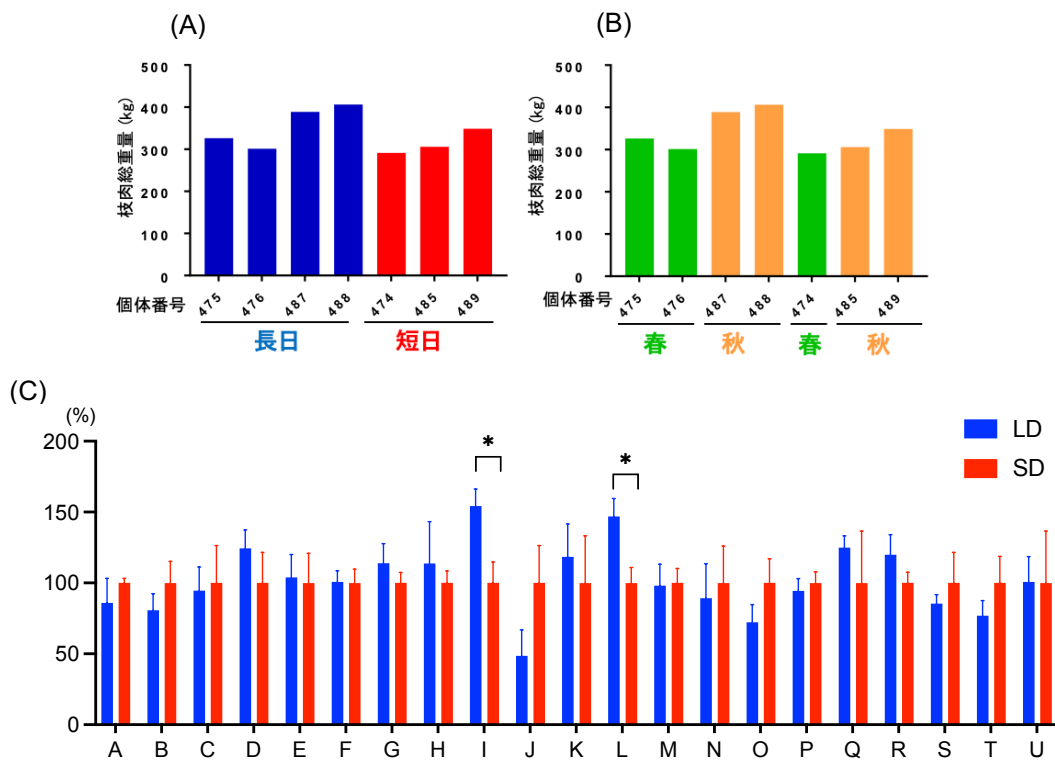


図2. 哺乳期の日長が黒毛和種のウシの出荷時における枝肉総重量および胸最長筋のヒストン修飾に及ぼす影響

(A)(B) 哺乳期に 16L8D の長日あるいは 10L14D の短日条件で飼育したウシの出荷時 (41-47 カ月齢) における枝肉総重量を日長ごと・出生季節ごとに示した。

(C) 胸最長筋の H3 ヒストンにおける 21 箇所化学修飾レベルについて、短日区 (SD) を 100% として長日区 (LD) と比較した。A から U までは、個別の修飾部位を示す。* $p < 0.05$, t -test.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taniguchi E, Hattori A, Kurogi K, Hishida Y, Watanabe F, Furuse M, Yasuo S.	4. 巻 84
2. 論文標題 Temporal patterns of increased growth hormone secretion in mice after oral administration of L-ornithine: possible involvement of ghrelin receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1283-1287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0125.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohashi, M., Lee, S. I., Eto, T., Uotsu, N., Tarumizu, C., Matsuoka, S., Yasuo, S., Higuchi, S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Intake of L-serine before bedtime prevents the delay of the circadian phase in real life	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Anthropology	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40101-022-00306-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Dan Yang , Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Spermidine resets circadian clock phase in NIH3T3 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 221-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.221.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Dan Yang , Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of regular and irregular stimulation cycles of dexamethasone on circadian clock in NIH3T3 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chronobiology International	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07420528.2021.1977654.	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 Yang Dan、福島早記、洲崎礼記、安尾しのぶ	4. 巻 1
2. 論文標題 時間栄養学における動物実験代替法の可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 時間栄養学研究の最前線	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Taniguchi E, Tashiro A, Hattori A, Furuse M, Yasuo S	4. 巻 403
2. 論文標題 Photoperiodic changes in hippocampal neurogenesis and plasma metabolomic profiles in relation to depression-like behavior in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113136.	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 安尾しのぶ	4. 巻 4
2. 論文標題 肥満・メタボリックシンドロームと時間栄養学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安尾しのぶ
2. 発表標題 脳機能と時間栄養学
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾涼平、黒木海斗、丸山創平、Dan Yang、Viet Phuong Tran、高井優生、大嶋雄治、後藤貴文、安尾しのぶ
2. 発表標題 哺乳期の日長によるマウスの増体促進メカニズムおよびウシ骨格筋のエピジェネティック制御
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木海斗、松尾涼平、洲崎礼紀、篠塚 まりな、谷口楓果、高井優生、大嶋雄治、安尾しのぶ
2. 発表標題 周期的な住環境変化に対する脳内遺伝子応答の網羅解析
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinobu Yasuo, Saki Fukushima, Dan Yang, Hiroko Miyazaki, Daisuke Maji
2. 発表標題 Internal desynchrony in mice under social jetlag-like condition
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木海斗、松尾涼平、洲崎礼紀、谷口 栄望、服部歩実、菱田幸宏、渡邊史子、古瀬充宏、安尾しのぶ
2. 発表標題 オルニチンによる成長ホルモン分泌促進機序の解析
3. 学会等名 第9回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山創平、黒木海斗、松尾涼平、青木一生、篠塚まりな、安尾しのぶ
2. 発表標題 夜型給餌リズム下の記憶低下に対する大豆イソフラボンの改善効果
3. 学会等名 第9回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾涼平、黒木海斗、丸山創平、Dan Yang、Viet Phuong Tran、高井優生、大嶋雄治、後藤貴文、安尾しのぶ
2. 発表標題 哺乳期の日長によるマウスの増体促進メカニズムおよびウシ骨格筋のエピジェネティック制御
3. 学会等名 第9回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安尾しのぶ
2. 発表標題 食のタイミングと脳機能：機能性成分による体内時計の保護へ向けて
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木海斗、松尾涼平、洲崎礼紀、篠塚まりな、谷口楓果、高井優生、大嶋雄治、安尾しのぶ
2. 発表標題 周期的な住環境変化に対する行動解析および脳内遺伝子応答の網羅的解析
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山創平、黒木海斗、松尾涼平、青木一生、篠塚まりな、安尾しのぶ
2. 発表標題 夜型給餌リズム下の記憶低下に対する大豆イソフラボンの改善効果および海馬の各種遺伝子発現に対する影響
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾涼平、黒木海斗、丸山創平、Dan Yang、Viet Phuong Tran、高井優生、大嶋雄治、後藤貴文、安尾しのぶ
2. 発表標題 漸進的な日長の延長によるマウスの増体促進および哺乳期の日長によるウシ骨格筋のエピジェネティック制御
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinobu Yasuo
2. 発表標題 Seasonal adaptation of growth, muscle, and brain via early-life photoperiod
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安尾しのぶ、福島早記、Dan Yang、宮崎裕子、間地大輔
2. 発表標題 体内時計と環境リズムの関係から切り拓くアンチエイジングの可能性
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dan Yang, Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo
2. 発表標題 Establishment of cellular jet lag model and search for nutrients that modulate circadian phase
3. 学会等名 5th Asian Forum on Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dan Yang, Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo
2. 発表標題 Establishment of cellular jet lag model and identification of spermidine as a potent modulator of circadian clock phase in NIH3T3 cells
3. 学会等名 第9回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島早記、大坪駿、柴田健児、黒木海斗、宮崎裕子、間地大輔、古瀬充宏、安尾しのぶ
2. 発表標題 社会的時差ぼけ様条件下の中高齢マウスにおける概日時計の内的脱同調
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dan Yang, Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo
2. 発表標題 Spermidine resets circadian clock phase in vitro
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安尾しのぶ
2. 発表標題 食事リズムによる体内時計調節とアンチエイジング
3. 学会等名 第4回日本抗加齢医学会 九州地方会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島早記、Dan Yang、谷口栄望、服部歩実、宮崎裕子、間地大輔、古瀬充宏、安尾しのぶ
2. 発表標題 明暗周期の乱れや過サイクルの環境エンリッチメントが中高齢マウスに及ぼす影響
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Dan Yang, Hideaki Oike, Mitsuhiro Furuse, Shinobu Yasuo
2. 発表標題 Interaction effect of regular and irregular stimulation cycles of dexamethasone and insulin on circadian clock in NIH3T3 cells
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大坪駿、柴田健児、福島早記、古瀬充宏、安尾しのぶ
2. 発表標題 時間制限給餌による恒明条件下の短期記憶低下の改善
3. 学会等名 第7回日本時間栄養学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院農学研究院 代謝・行動制御学ホームページ
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/lrmb/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------