

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580351

研究課題名（和文）牛脂肪交雑作用機序解明と遺伝子マーカーの開発

研究課題名（英文）Studies for mechanisms of bovine marbling and developments of genetic markers

研究代表者

溝口 康（MIZOGUCHI YASUSHI）

明治大学・農学部・講師

研究者番号：80514158

研究成果の概要（和文）：

本研究は、先行研究である「黒毛和種筋肉内脂肪前駆細胞株（BIP）分化における網羅的遺伝子発現プロファイリング」の研究結果を発展させ、脂肪交雑の作用機序解明と遺伝子マーカーの開発を目指した。BIP 分化前後で有意 ($P < 10^{-12}$) に発現量が変化した遺伝子 16 種（増加:8, 減少:8）に着目し、分化誘導およびレチノイン酸 ($1 \mu\text{M RA}$) 添加による経時的発現動態を解析した。比較対照細胞株は、脂肪細胞における栄養代謝経路の異なる非反芻動物マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 を用いた。その結果 BIP において、RA 存在によって発現動態が異なり、3T3-L1 と発現動態が異なる遺伝子 6 種を同定した。また RA は、BIP の①中性脂肪蓄積を増大させる、②一価不飽和脂肪酸組成であるオレイン酸割合を増加させた。これらの知見は、BIP における RA の作用機序が 3T3-L1 と全く異なっていることを明らかにした。BIP 分化誘導後に発現増加する ADFP 遺伝子およびタンパク質は、RA によって更に活性化された。それらの発現パターンは、BIP と 3T3-L1 間で顕著な違いを示した。また、BIP における ADFP 遺伝子の siRNA を用いたノックダウン解析により、ADFP は中性脂肪蓄積を有意に促進させることを明らかにした ($P < 0.001$)。以上のことから、ADFP は、脂肪交雑に有用な遺伝子マーカーの候補であると結論した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate genes involved in ruminants intramuscular adipogenesis, sixteen target genes (8 up and 8 down regulated genes) with dramatically changed expression ($P < 10^{-12}$) were selected between differentiation and proliferation phases libraries in our previous SAGE studies of a clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) cell line (Mizoguchi, 2010), with reference to 3T3-L1 cell lines as monogastric animals. We harvested the BIP and 3T3-L1 cells 0, 3, 6, 9 and 12 days after adipogenic stimulation containing all-trans retinoic acid (RA), which inhibits preadipocyte differentiation in non-ruminants and measured the gene expression levels by quantitative real-time PCR and the accumulation levels of triglyceride (TG). Fourteen genes expression pattern of the 16 genes during adipogenesis were confirmed the SAGE studies. The expression pattern of eleven genes clearly differed between 3T3-L1 and BIP cells. Simultaneously, we investigated the profiles of target genes by RA. TG accumulation was significantly induced ($P < 0.05$) in BIP cells whereas completely inhibited ($P < 0.05$) in 3T3-L1 cells by RA at day 6 after adipogenic stimulation. RA induced the expression levels of six genes and suppressed these of eight genes at day 3 after adipogenesis in BIPs ($P < 0.05$; respectively). The effect of ADFP down-regulation on the accumulation of TG was examined by transfecting the BIP cells with ADFP siRNA. The expression level of ADFP in the ADFP-siRNA transfected cells was 21.4% of that in the scr-siRNA transfected cells in BIP 3 days after induction ($P < 0.05$). Also, 6 days after induction, the accumulation of TG in the ADFP-siRNA transfected cells was 20 % less than in the control cells ($P < 0.001$). Our findings of gene expression profiles by RA will cause a favorable and detailed understanding in the molecular mechanisms of bovine intramuscular adipogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物科学

キーワード：遺伝子、応用動物、ゲノム、畜産学、育種学

1. 研究開始当初の背景

我が国の肉牛産業界において、脂肪交雑は牛肉の枝肉格付け評価や販売価格に影響を与える重要な因子の一つである。これまでに遺伝学的手法による脂肪交雑責任遺伝子の探索が行われている。このアプローチに加え、分子生物学的手法を用いた解析を実施することにより、より精度の高い研究展開ができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、黒毛和種筋肉内脂肪前駆細胞株(BIP)の分化誘導システムを脂肪交雑形成のモデルとして、研究展開することとした。先行研究である網羅的遺伝子プロファイリングにより分化前後に有意に発現量が異なる ($P < 10^{-12}$) 16 遺伝子を選択し、詳細な解析を実施することとした。更に、ウシ生体内の脂肪交雑度合いに影響を及ぼすことが知られているビタミン A (レチノイン酸) の効果についても検討を加え、脂肪交雑作用機序の解明と遺伝子マーカーの開発を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 分化誘導後、発現増加を示した、ADFP・ANPEP・BGN・CLU・FN1・GPX3・PTX3・TIMP1 の 8 遺伝子、発現減少を示した、ACTG1・VIM・SPARC・IGFBP6・S100A4・SST・IGFBP4・ANXA2 の 8 遺伝子、計 16 遺伝子を解析に用いた。
- (2) BIP を常法により分化誘導をおこなった。
- (3) 比較対照細胞株としてマウス 3T3-L1 を用いた。
- (4) 上述した 16 遺伝子の発現動態を分化誘導後 0 日～12 日 (3 日毎) にリアルタイム PCR の $\Delta\Delta CT$ 法を用いて定量した。内因性マーカーは、GAPDH を用いた。
- (5) レチノイン酸 (1 μM RA) 添加による遺伝子発現動態を(4)と同様にして定量した。
- (6) 中性脂肪蓄積含量の測定は、Oil Red O 染

色法による可視化と酵素法による定量をおこなった。

(7) RA 添加・無添加群を用いた分化誘導後 9 日目における脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより測定した。

(8) 16 遺伝子に含まれる ADFP タンパク質の発現動態をウエスタンブロッティング法により定量した。内因性マーカーは GAPDH を用いた。

(9) ADFP 遺伝子の siRNA を作成し、中性脂肪蓄積含量を指標としてノックダウン解析をおこなった。

4. 研究成果

(I) BIP 分化誘導後における経時的遺伝子発現解析

先行研究で分化誘導後に発現増加を示した 8 遺伝子: BIP 分化誘導後 0～3 日間に有意な発現量の増加を示した遺伝子は ADFP・ANPEP・BGN・CLU・GPX3・PTX3・TIMP1 の 7 遺伝子 ($P < 0.05$) であった。一方、FN1 遺伝子は分化誘導後 0～3 日間に有意な発現量の減少を示した ($P < 0.001$)。

先行研究で分化誘導後に発現減少を示した 8 遺伝子: BIP 分化誘導後 0～3 日間に有意な発現量の減少を示した遺伝子は ACTG1・VIM・SPARC・IGFBP6・S100A4 の 5 遺伝子であった。ANXA2 遺伝子は、分化誘導後に発現減少傾向を示し、誘導後 12 日目において有意な発現減少を示した ($P < 0.05$)。IGFBP4 遺伝子は分化誘導 9～12 日目に発現減少傾向が見られたが有意な発現量の変化は確認出来なかった。一方、SST 遺伝子は、分化誘導後有意な発現増加を示した ($P < 0.01$)。

以上の結果から、16 種中 14 遺伝子の発現動態が先行研究結果を支持した。

(II) 3T3-L1 分化誘導後における経時的遺伝子発現解析

BIP において分化誘導後発現増加を示した遺伝子について解析した結果、ADFP・FN1・

PTX3 の 3 遺伝子においては BIP 同様、分化誘導後 3 日目に発現増加した ($P < 0.05$)。しかしながら、TIMP1 遺伝子は分化誘導 6 日目から有意な発現減少を示し ($P < 0.01$)、ANPEP・BGN・CLU・GPX3 の 4 遺伝子は発現量の変化を確認できなかった。一方、BIP において分化誘導後発現減少を示した遺伝子では、ACTG1・ANXA2 の 2 遺伝子が BIP 同様、分化誘導後 3 日目に発現減少を示した ($P < 0.05$)。しかしながら、VIM・IGFBP4 の 2 遺伝子は有意な発現増加 ($P < 0.05$) を示し、SPARC・IGFBP6・S100A4 の 3 遺伝子は発現量に有意な差を確認できなかった。また、SST・GPX3 遺伝子については、分化誘導後 12 日間を通じて遺伝子発現を検出することが出来なかった。解析した 16 遺伝子のうち、BIP と同様の発現を示したのは、分化誘導後に発現増加を示した ADFP・FN1・PTX3 の 3 遺伝子および分化誘導後に発現減少を示した VIM・IGFBP4 の 2 遺伝子だけであった。残りの 11 遺伝子は BIP における発現動態と異なった。

(III) RA による BIP 遺伝子発現解析

先行研究で分化誘導後に発現増加を示した 8 遺伝子: 分化誘導後 3 日目において、ANPEP・BGN・PTX3・TIMP1 の 4 遺伝子は RA 添加によって有意な発現量の減少を示した ($P < 0.05$)。一方で、ADFP・CLU・GPX3 の 3 遺伝子は RA 添加によって有意な発現増加を示した ($P < 0.05$)。FN1 は RA 添加によって分化誘導後 3 日目に有意な発現増加を示し ($P < 0.01$)、その後減少した。

先行研究で分化誘導後に発現減少を示した 8 遺伝子: 分化誘導後 3 日目において、SPARC・IGFBP6 の 2 遺伝子は RA 添加によって発現増加を示した ($P < 0.05$)。一方、分化誘導後 3 日目において VIM・S100A4 の 2 遺伝子が、分化誘導後 6 日目において ACTG 遺伝子が、RA 添加によって発現減少を示した ($P < 0.05$)。SST・IGFBP4・ANXA2 の 3 遺伝子は RA による遺伝子発現制御は確認されなかった。

(IV) RA による 3T3-L1 遺伝子発現解析

分化誘導後 3 日目において、RA 添加によって発現減少を示したのは ADFP・BGN・FN1・VIM の 4 遺伝子であった ($P < 0.05$)。RA は分化誘導後 6 日目において、ANXA2 遺伝子の一時的な発現増加を抑制した ($P < 0.05$)。一方、RA 添加によって分化誘導後、発現増加傾向を示したのは GPX3・IGFBP6・IGFBP4 の 3 遺伝子であった。IGFBP6 遺伝子はサンプル間の誤差が激しく RA 添加による発現量の有意な差は示されなかったが、RA によって発現誘導される傾向であった。ANPEP・CLU・PTX3・TIMP1・ACTG1・SPARC・S100A4 の 7 遺伝子は RA 添加による発現量の変化は、ほとんど確認されなかつ

た。

(V) RA によるトリグリセリド (TG) 蓄積への影響

BIP および 3T3-L1 分化誘導への RA の影響を評価するため、RA 添加・無添加群における TG 蓄積量を Oil Red O 染色および TG 定量によって解析した。BIP の RA 添加群および無添加群で Oil Red O をおこなった結果、両群において分化誘導後日数が経過する (0・3・6・9・12 日) に伴い細胞が赤色に染色されるのを観察した。酵素法により細胞内 TG 蓄積量を測定した結果、分化誘導後 0~12 日間で 4.4 倍に増加した ($P < 0.01$)。分化誘導後 6 日目における RA 添加群の TG 蓄積量は、無添加群よりも 1.3 倍有意に高かった ($P < 0.05$)。このことから、BIP における脂肪細胞分化は RA 添加によって促進されることが明らかとなった。

3T3-L1 における Oil Red O 染色の結果、無添加群で分化誘導後 6 日以降に強く赤色に染色された。一方、RA 添加群では分化誘導 12 日間を通じてほとんど染色を確認出来なかった。細胞内 TG 蓄積量は、分化誘導後 0~12 日間で 62.9 倍に増加した ($P < 0.001$)。分化誘導後 6 日目における RA 添加群の TG 蓄積量は、無添加群の TG 蓄積量よりも 6.9 倍有意に低かった ($P < 0.05$)。このことから 3T3-L1 では、RA 添加によって脂肪細胞分化が強く抑制されることが明らかとなった。

(VI) RA 添加による脂肪酸組成への影響

分化誘導後 9 日目の BIP において、RA はオレイン酸 (C18:1) 含有量を 4.5% 有意に増加させ ($P < 0.01$)、パルミチン酸 (C16:0) 含有量をやや減少させた ($P = 0.08$)。また RA は、一価不飽和脂肪酸含量を 4.9% 有意に増加させ ($P < 0.01$)、飽和脂肪酸含量を 5.1% 有意に減少させた ($P < 0.01$)。

以上のことから、以下の仮説を立てた。

「BIP において、RA が TG 蓄積量を増加させるのであれば、それに関与する遺伝子発現量が促進するのではないか？」この仮説をもとに、解析に用いた 16 遺伝子について更なる選抜をおこなった。BIP 分化誘導後に発現量の増加を示す遺伝子では、RA 添加によって発現量がさらに増加した ADFP・CLU・GPX3 の 3 遺伝子を、また BIP 分化誘導後に発現量が減少する遺伝子では、RA 添加によって発現量がさらに減少した ACTG1・VIM・S100A4 の 3 遺伝子を BIP 脂肪細胞分化の候補遺伝子とした。中でも、分化誘導後 12 日間における TG 蓄積量変化と最も類似した発現変化を示した ADFP を候補遺伝子として同定した。更に BIP を用いて、以下の研究を展開した。

(VII) RA による ADFP タンパク質発現への影響

RA 添加時における ADFP タンパク質発現をウェスタンブロッティング法によって解析した。GAPDH タンパク質発現量に変化はなかった。分化誘導後 12 日目の BIP において、RA は ADFP タンパク質の発現量を約 3 倍量増加させた。一方 3T3-L1 においては、RA は ADFP タンパク質発現量を 1/2 量に減少させた。両細胞株共に、GAPDH タンパク質発現量に変化はなかった。以上の結果は、先に示した経時的遺伝子発現プロファイルと同様であった。

(VIII)ADFP 遺伝子の脂肪細胞分化への影響

予備実験として、合成した 3 種の ADFP siRNA の BIP における ADFP 遺伝子発現抑制効果の評価するため、遺伝子導入 2 日後における ADFP mRNA の発現量を解析した。その結果、1 種の ADFP siRNA において最も高い ADFP mRNA の発現抑制効果が示され、Scr siRNA における ADFP mRNA レベルの約 1/30 量に抑制した。この ADFP siRNA を用いて ADFP の脂肪細胞分化への影響を解析した。

遺伝子導入 2 日後に分化誘導を開始し、0 日目・3 日目・6 日目の ADFP mRNA およびタンパク質発現量と TG 蓄積量を解析した。ADFP siRNA の導入 2 日後の分化誘導 0 日目における ADFP mRNA 発現量は、Scr siRNA 導入群の約 1/10 量に有意に抑制された ($P < 0.05$)。また 3 日目における ADFP mRNA 発現量は、Scr siRNA 導入群の約 1/5 量に有意に抑制された ($P < 0.05$)。しかしながら、6 日目の ADFP siRNA 導入による抑制効果は、Scr siRNA 導入群との間で有意な差が見られなかった。

ADFP siRNA 導入による ADFP タンパク質発現への影響は、分化誘導後 3 日目で Scr siRNA 導入群の 1/3 量に ADFP タンパク質発現を抑制し、6 日目では Scr siRNA 導入群の 1/2 量に ADFP タンパク質発現を抑制した。

分化誘導後 6 日目において、ADFP siRNA 導入群の TG 蓄積量は、Scr siRNA 導入群に比べて 21.8% 有意に減少した ($P < 0.05$)。

以上の結果から、BIP において ADFP は、中性脂肪蓄積を促進させることを明らかにした。

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)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. 中藤由紀、黒岩恵、馬場誠、溝口康、杉本喜憲 DNA マーカーを指標とした牛の育種手法の開発に関する研究-岡山県基幹種雄牛「花茂勝 2」における QTL 領域の推定(第 1 報). 岡山県総合畜産センター研究報告 18, 1-4. 2009.
2. 星野佑子、溝口康、佐々木洋介、瀬野雄三.

繁殖雌豚の毛根の付いた体毛からの DNA の抽出法と遺伝子多型の検出法の開発. 明治大学農学部研究報告 59(1), 9-13. 2009.

3. Kou Yokouchi, Yasushi Mizoguchi, Toshio Watanabe, Eiji Iwamoto, Yoshikazu Sugimoto, Akiko Takasuga. Identification of a 3.7-Mb region for a marbling QTL on bovine chromosome 4 by identical-by-descent and association analysis. *Animal Genetics* 40(6), 945-951. 2009.
4. 秋山敬孝、龍田健、溝口康、西村翔太、杉本喜憲. 但馬牛における経済形質に関わるゲノム解析~鶴山土井における QTL の効果検証. 兵庫県農林水産技術総合センター研究報告 46, 1-4. 2010.
5. Y. Mizoguchi, T. Hirano, T. Itoh, H. Aso A. Takasuga and Y. Sugimoto, T. Watanabe Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation profiled by serial analysis of gene expression *Animal Genetics* 41(4), 436-441. 2010.
6. 坪井一真, 村上慶太郎, 石垣長健, 渡辺信, 溝口康. 西表島に生息するリュウキュウイノシシの遺伝的多様性解析手法の開発 明治大学農学部研究報告 60(4), 53-59. 2011.
7. 田淵一郎, 小江敏明, 溝口康, 杉本喜憲. 黒毛和種種雄牛におけるマイクロサテライトマーカーを用いた QTL (量的形質遺伝子座) の探索—気高系種雄牛 C における QTL 領域の探索. 鳥取県農林水産部農林総合研究所畜産試験場研究報告 (37), 17-20, 2011.

[学会発表] (計 10 件)

1. Toshio Watanabe, Yasushi Mizoguchi, Takashi Hirano, Tomohito Itoh, Hisashi Aso, Akiko Takasuga Yoshikazu Sugimoto Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte. differentiation profiled by using serial analysis of gene expression (SAGE). Proceedings of the Plant & Animal Genome XVII. 2009. P729. San Diego, USA.
2. Makoto Moriya, Yasushi Mizoguchi, Akitoshi Satou, Akiko Takasuga, Yoshikazu Sugimoto, Toshio Watanabe. Gene expression profiles of bovine intramuscular preadipocytes during adipogenesis. Proceedings of the 32th international Conference on animal genetics. 107. 2010. Edinburgh, UK.
3. Keitaro Murakami, Shin Watanabe, Yasushi Mizoguchi. Distinguishing between pig breeds and wild boars using genetic approaches. Allen D. Leman Swine Conference. 2011. Vol.38 290 Minnesota, USA.
4. Makoto Moriya and Yasushi Mizoguchi

Second screening of differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation. 4th International Symposium on Animal Functional Genomics. 2011. Dublin, Ireland.

5. 横内耕, 溝口康, 岩本英治, 麻生久, 渡邊敏夫, 高須賀晶子, 杉本喜憲. ウシ脂肪交雑 QTL(Marbling-3)の責任 SNP の検出. 第 10 回日本動物遺伝育種学会 2009. 群馬会館 群馬県前橋市
6. 守屋真, 溝口康. ウシ筋間脂肪細胞分化における遺伝子発現機構に関する研究. 第 11 回日本動物遺伝育種学会 2010. (独)家畜改良センター 福島県西白河郡
7. 降矢尚征, 守屋真, 溝口康. ウシ筋間脂肪前駆細胞分化誘導におけるグルコース輸送体 4 型(GLUT4)の遺伝子発現. 第 11 回日本動物遺伝育種学会 2010. (独)家畜改良センター 福島県西白河郡
8. 村上慶太郎, 坪井一真, 渡辺信, 溝口康. 沖縄県南西諸島西表島に生息するリュウキュウイノシシの遺伝的多様性に関する解析. 第 11 回日本動物遺伝育種学会 2010. (独)家畜改良センター 福島県西白河郡
9. 溝口康・堀江紗都子・長野優子・石原智大. 雌豚繁殖形質と PROP1 遺伝子多型を用いた相関解析. 第 96 回日本養豚学会 2012. 武蔵野スイングホール 東京都武蔵野市
10. 村上慶太郎, 渡辺信, 溝口康. 西表島に生息するリュウキュウイノシシの遺伝資源は由々しき事態にある. 第 115 回日本畜産学会 (優秀発表賞応募演題) 2012. 名古屋大学 愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1)研究代表者

溝口 康 (YASUSHI MIZOGUCHI)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：80514158