

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22380143

研究課題名（和文） 黒毛和種牛の生産性を制御する成長ホルモン遺伝子多型に関する
内分泌・代謝学的研究研究課題名（英文） Endocrine and metabolic studies on single nucleotide
polymorphism of *GH* gene in Japanese Black cattle

研究代表者

加藤 和雄（KATO KAZUO）

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60091831

研究成果の概要（和文）：1) Dot-plot-SNP解析法を確立し、直接的なセクエンス解析結果と完全に一致することが出来た。2) GH多型と脂肪酸合成酵素関連遺伝子であるFASN、SCDおよびSREBP-1遺伝子発現の解析を行った結果、CC型遺伝子多型の脂肪細胞ではGH感受性が高いことが示された。3) AAおよびBB型間の糖代謝能をグルコース・クランプ法を実施して検討した結果、BB型での糖代謝におけるインスリン感受性がAA型よりも大きいことが示された。

研究成果の概要（英文）：1) We successfully established an applied method of Dot-plot-SNP for analyzing GH single nucleotide polymorphisms (SNPs), 2) In the studies on gene expression of fatty acid synthesis enzymes (FASN, SCD and SREBP-1), adipocytes isolated from the animal with type CC demonstrated greater sensitivity to GH stimulation than those with another type, 3) Glucose-clamp analysis demonstrated greater insulin sensitivity in the animals with the type AA than that with type BB.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農 学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：黒毛和種牛、遺伝子多型、成長ホルモン、脂肪細胞、インスリン

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、良質な動物性食品の生産性向上を目的とした技術開発を目的として、家畜の生産性（成長・脂肪蓄積・乳腺の発育や泌乳）にとって不可欠なソマトトロピン軸、お

よびその中枢を担う成長ホルモン(GH)の分泌機構について研究を行ってきた。

ウシでは、19番目の染色体上に存在するGH遺伝子は、5つのエキソンから構成され、191個のアミノ酸をコードしている。申請者らは、黒毛和種牛において、N端から127

番目および172番目のアミノ酸をコードする塩基配列に一塩基の変異(SNP)が存在するため、合計3種類の対立遺伝子(A、B、C)が存在し、組み合わせによって合計6種類の遺伝子型が存在することを発見・報告した(業績17)。申請者らがウシGH遺伝子のSNPに関して今までに報告した一連の研究成果は以下の通りである。

(1) A型とC型の遺伝子の特徴

A型: 大きな体躯・体重、大きな泌乳量、高い血中GH・インスリン濃度

C型: 黒毛和牛に特異的、小さな体躯・体重、高い不飽和脂肪酸蓄積能、低い血中インスリン・IGF-I濃度、低いGH分泌能

(2) C型動物が小さな体躯である原因: レプチンの遺伝子発現が高い。

(3) C型動物が不飽和脂肪酸を多く蓄積する原因:

SCD遺伝子発現が高い。

これらのGH多型の影響に関する研究結果から以下のような**仮説**を提起できる。(1) 多型間のGH分子構造の相違は、種々の組織における分子-受容体の結合カイネティクスおよび刺激-反応連関を変化させる。(2) 結果としてGHの作用効果が異なるため、それぞれの多型に適応するように内分泌や代謝動態がシフトする。(3) したがって多型間に認められる成長や脂肪蓄積能力の相違は、GHの刺激-反応連関の変化がIGF-Iや脂肪酸合成酵素遺伝子の発現などを変化させる。

本申請では、このような黒毛和種牛のGH遺伝子多型と脂肪蓄積機構との関連性に関する申請者の仮説を実証し、将来、遺伝的に選抜した黒毛和種牛による不飽和脂肪酸に富んだ産肉増産技術開発の可能性を検討する。

2. 研究の目的

申請者らは、黒毛和牛の成長ホルモン(GH)遺伝子の一塩基変異(多型)が、屠体重の大きさと肉質(脂肪蓄積や脂肪酸組成)

の制御に有意に関わることを発見した。本研究では、和牛肉のおいしさを決定する不飽和脂肪酸蓄積における変異型GH(C型)の関与機構を詳細にする目的で、(1) 3種類の組換え多型GHの作成、および多型ごとの脂肪細胞のクローニング、(2) 多型GHと脂肪細胞受容体との結合能および情報伝達系の解析、(3) 多型GHの不飽和脂肪酸および脂肪酸合成能および関連遺伝子発現への影響などを実施する。(4) さらにGH多型牛の栄養代謝的特徴解明、およびすでに終了しているエコフィードの利用性・環境負荷への影響に関する解析結果と合わせて、多型選抜の有用性と環境負荷軽減効果への可能性を総合的に評価する。

3. 研究の方法

(1) ホモ型遺伝子を持つ実験材料の確立: AA、BB、CC型子牛の遺伝子解析を実施した。従来の直接セクエンス解析法で実施した。安価で簡便なC型多型の解析法を検討する。

(2) 皮下脂肪細胞を採取および脂肪細胞のクローニング: 皮下脂肪組織のサンプリングは、附属川渡フィールドセンター、岩手大学牧場や石垣島の農家で行った。採取した組織を教室に輸送し、クローニングを実施した。その細胞を用いて、GH刺激に対する感受性や、脂肪蓄積能を他の多型の脂肪細胞と比較した。

(3) ホモ型動物の内分泌的特徴の解析: ホモ型動物における内分泌的特徴を検索する目的で、GHRH刺激前後の採血を経時的に行い、内分泌的特徴の把握を、多型間の動物で実施した。

(4) ホモ型動物のインスリン感受性の解析: AA型とBB型間の動物を用いてグルコースクランプ法を実施した。

(5) 多型GH分子とGH受容体の結合能の解析: 多型ごとのGHタンパク質の3次元解析を実施し、受容体との結合を推定した。

4. 研究成果

(1) 従来の直接的な背救援巢解析法では1サンプル当たりの経費が500円以上となるために、現場での応用が困難である。したがって、今回は安価で容易な現場対応型

の解析法を検討した。具体的には、Dot-plot-SNP 解析法を確立し、直接的なセクエンス解析結果と完全に一致することが出来た。この結果、解析に要するコストを1/10以下に低減することができ、したがってこの解析法が実際の現場で十分に応用可能であることを示すことができた。

(2) 皮下脂肪細胞を採取して、研究室で脂肪細胞のクローニングを数回実施した。その結果、CC型遺伝子を有する脂肪細胞株を確立することが出来た。この細胞株を用いて、脂肪酸合成酵素関連遺伝子であるFASN、SCDおよびSREBP-1遺伝子発現の解析を行った結果、CC型遺伝子多型の脂肪細胞では、他の型の細胞と異なり、発現が徐々に進行すること、およびGH感受性が高いことが示された。

また、脂肪組織中の脂肪代謝関連酵素遺伝子発現と血中GHあるいはインスリン濃度との関連性を検討した結果、脂肪細胞はインスリンよりもGH感受性の高いことが示された。

(3) ホモ型動物間の内分泌的特徴の違いを検索する目的で、GHRH (4mg/kg BW) で刺激した時の経時的採血を行い、内分泌的特徴の把握を検討した。その結果、CC型動物では、GHRH刺激時のGH分泌量が他のホモ型動物よりも有意に小さいことがわかり、体重の小ささと平行することが示された。

(4) GH多型と代謝機能の関連性を知る目的で、AAおよびBB型間の糖代謝能をグルコース・クランプ法を実施して検討した。その結果、BB型での糖代謝におけるインスリン感受性がAA型よりも大きい、生体重とは必ずしも平行しないことが示された。この結果は、成長期における生体重は、インスリンではなく、GH感受性に依存することが示唆された。

(5) 多型ごとのGHタンパク質の3次元解析を実施し、受容体との結合を推定した。その結果、BとC型遺伝子は、A型遺伝子に変化したものであること、C型GHタンパク質はA型と比較して受容体との結合部位が奥深くに位置するようになり、受容体との結合がやや困難になるように推察できること、などが明らかとなった。

しかしながら、震災の影響があり、多型ごとの遺伝子組換えによるGH分子合成やエコフィールドの実験は実施できなかった。

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)

[雑誌論文] (計8件)

(1) Yonekura, S., Tokutake, Y., Hirota, S., Rose, M. T., Katoh, K. and Aso, H. (2013) Proliferating bovine intramuscular preadipocyte cell synthesize leptin. *Domestic Animal Endocrinology*、(巻数、ページ数未定)、(in press)

査読有

(2) Takahashi, T., Kobayashi, Y., Haga, S., Ohtani, Y., Sato, K., Obara, Y., Hagino, A., Roh, S.G. and Katoh, K. (2012) A high-protein diet induces dissociation between plasma concentrations of growth hormone and ghrelin in wethers. *Journal of Animal Science* 90: 4807-13

査読有 DOI: 10.2527/jas2011-4596

(3) Otsuka, T., Goto, M., Kawai, M., Togo, Y., Sato, K., Katoh, K., Mitsuhiro Furuse, M., Yasuo, S. (2012) Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in fischer 344 rats and C57BL/6J mice. *PLOS ONE* 7: e39090.

査読有 DOI:

10.1371/journal.pone.0039090

(4) Suzuki, Y., Song, S.H., Ardiyanti, A., Kato, T., So, K.H., Katoh, K. and Roh, S.G. (2012) The regulation of chemerin and CMKLR1 genes expression by TNF- α , adiponectin and chemerin analog in bovine differentiated adipocytes. *AJAS* 25: 1316 - 1321.

査読有 DOI: 10.5713/ajas.2012.12083

(5) Astrid Ardiyanti, Abe Tsuyoshi, Tameoka Nanae, Kobayashi Eiji, Shoji Noriaki, Ohtani Yoshihisa, Suzuki Keiichi, Roh Sang-gun and Kazuo Katoh (2012) Effects of growth hormone gene polymorphism on lipogenic genes expression levels in diaphragm tissues of Japanese Black heifers. *AJAS* 25:1055-1062.

査読有 DOI: 10.5713/ajas.2012.12029

(6) Yokota, S., Sugita, H., Ardiyanti, A., Shoji, N., Nakajima, H., Otomo, Y., Suda, Y., Katoh, K. and Suzuki, K. (2012) Contributions of FASN and SCD gene polymorphisms on fatty acid composition in muscle from Japanese Black cattle. *Animal Genetics* 43: 431-433

査読有

10.1111/j.1365-2052.2012.02331.x

(7) Orihashi, T., Mashiko, T., Sera, K., Roh, S.-G., Katoh, K., and Obara, Y. (2012) Effects at early stage of life of elevated milk replacer feeding on growth rate, plasma IGF-I concentration and intestinal nutrient transporter expression in Holstein bull calves. *Animal Science Journal* 83: 77 - 82. 査読有 DOI:

10.1111/j.1740-0929.2011.00911.x

(8) Kato, S., Sato, K., Chida, H., Roh, S.-G., Ohwada, S., Sato, S., Guilloteau, P. and Katoh, K. (2011) Effects of sodium-butyrate-supplementation in milk formula on plasma concentrations of GH and insulin, and on rumen papilla development in calves. *Journal of Endocrinology* 211: 241 - 248. 査読有 DOI: 10.1530/JOE-11-0299

[学会発表] (計 15 件)

(1) Katoh, K., Roh, SG ら Importance of polymorphism in the promoter region of GH gene for beef production and quality. EAAP 2012 (2012年08月27日) Bratislava, Slovakia

(2) Yamauch, E., Katoh, K., Roh, SG ら Three SNPs in the coding region of the bovine chemerin gene and its associations with carcass trait in Japanese Black cattle. AAAP2012 (2012年12月27日) Bangkok, Thailand

(3) Roh, SG, Katoh, K. ら Importance of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of bovine growth hormone gene for beef production in Japanese Black cattle. AAAP2012 (2012年12月29日) Bangkok, Thailand

(4) 山内恵利、加藤和雄、盧尚建、ら ケメリン遺伝子内の一塩基多型が黒毛和種牛の枝肉形質および脂肪酸組成に与える影響 日本畜産学会 116 回大会 (2013年03月30日) 安田女子大学、広島市

(5) 加藤大幾、盧尚建、加藤和雄 ら 成長ホルモンの CC 型黒毛和種牛の培養脂肪細胞の遺伝子発現について 日本畜産学会 116 回大会 (2013年03月30日) 安田女子大学、広島市

(6) 杉田春奈、盧尚建、加藤和雄 ら 黒毛和種牛の産肉性に及ぼす GH 遺伝子プロモーター領域多型の影響 日本畜産学会 115 回大会 (2012年3月29日) 名古屋大学

(7) 盧尚建、加藤和雄 ら ウシの脂肪細胞と乳腺上皮細胞におけるオキシトシン受容体 (OXT-R) の発現変動 日本畜産学会 115 回大会 (2012年3月29日) 名古屋大学

(8) 小松篤司、加藤和雄 ら ウシにおける短間隔の連続採血方法の検討および採食前後の血漿代謝産物の変化 日本畜産学会 115 回大会 (2012年3月28日) 名古屋大学

(9) Sugimoto, K., Roh, SG, Katoh, K. ら Interaction between GH gene polymorphism and expression of leptin and SCD (stearoyl-coA desaturase) in Japanese Black cattle. 62th EAAP (2011年8月29日) Stavanger, Norway

(10) Roh, SG., Katoh, K. Intervention of the insulin/somatotropic axes in the development of digestive function in pre-weaning calves fed a sodium (Na)-butyrate supplemented diet. 10th ISNH (2011年9月6日) Aberystwyth, UK

(11) 庄司 則章、阿部 剛、爲岡 奈々恵、長谷部 浩行、Astrid Ardiyanti、小林 栄治、加藤和雄。黒毛和種肥育牛における脂肪酸関連遺伝子 FASN・SCD・SREBP1 の発現量と血液成分との関連。日本畜産学会第 112 回大会 (2011年3月28日~29日) 明治大学、東京

(12) 杉田春奈、Astrid Ardiyanti、横田祥子、爲岡奈々恵、阿部剛、庄司則章、小林栄治、鈴木啓一、盧尚建、加藤和雄。黒毛和種肥育牛の枝肉成績・筋肉内脂肪酸組成と FASN および SCD 遺伝子多型との関連。日本畜産学会第 112 回大会 (2010年3月28日~29日) 明治大学、東京

(13) 二宮茂、加藤和雄、田中繁史、千葉孝。離乳期の黒毛和種子牛のブラッシングに対する反応性とウシ GH 遺伝子多型。日本畜産学会第 112 回大会 (2010年3月28日~29日) 明治大学、東京

(14) Roh, S.G., Katoh, K. ら Effects of SCD and GH gene polymorphism on carcass traits and muscle fatty acids compositions in Japanese Black cattle. The 61st European Association for Animal Production (2010 August 23-27) Heraklion, Crete Island, Greece

(15) Roh, S.G. New Regulating Factors in Adipogenesis. Seminar in Department of Animal Science (2010 September 11) Pusan National University, Pusan, Korea

〔図書〕 (計1件)

(1) 加藤和雄 農文協 「酪農大辞典」 2011
25

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/ruminol/index-j.html>

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・教授
研究者番号：60091831

(2) 研究分担者

佐野 宏明 (SANO HIROAKI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：20196306

盧 尚建 (ROH SANG-GUN)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90322130

(3) 連携研究者

平山 琢二 (HIRAYAMA TAKUJI)
琉球大学・農学部・助教
研究者番号：00274887

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：80156249