

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 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780242

研究課題名（和文） CLA を介した赤肉産生機構の解明～ミオスタチンとレプチンの
クロストーク作用～研究課題名（英文） Effect of CLA on crosstalk between Myostatin and Leptin in muscle
tissues on complete grass-fed beef production system

研究代表者

小笠原 英毅 (OGASAWARA HIDEKI)

北里大学・獣医学部・教育系技術職

研究者番号：30535472

研究成果の概要（和文）：

本研究は放牧など自給粗飼料のみによる赤肉産生システムの詳細を解明することを目的とし、共役リノール酸(CLA)が骨格筋細胞におけるレプチンとミオスタチンのクロストーク作用に及ぼす影響に焦点を当て、放牧など自給粗飼料のみで生産した日本短角種牛(N)および肉用交雑種(N×サレール種(S)×N:NSN)の増体および枝肉成績、栄養状態、ホルモン動態、筋組織の特性とCLAを添加したウシ培養筋芽細胞を用いて解析した。本研究より放牧など自給粗飼料のみで生産された肥育牛の筋線維型構成割合と放牧期の骨格筋組織ではⅡ型筋線維型からⅠ型筋線維へ移行すること、腹鋸筋においてⅠ型筋線維がⅠD型筋線維へ肥大化することが明らかとなった。また、放牧期では血中NEFA濃度が有意に上昇し、筋組織の肥大は筋芽細胞が分化して肥大する機構に依存しないことも明らかとなった。さらに培養筋芽細胞において筋管形成誘導時にミオスタチンとレプチンのクロストーク作用が存在し、CLAが筋管形成に影響を与えること、また、放牧時のウシ血清中に筋管分化を促進する新規因子が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To further understand the complete grass-fed beef production system, we investigated the effect of CLA on crosstalk between Myostatin and Leptin in muscle tissue. We analyzed body weight, rate of muscle fiber, mRNA expression of muscle specific gene, and morphological and physiological analysis in Japanese shorthorn (N) and F2 ((N×salers(S))×N:NSN). We found that fast skeletal muscle fiber type switched to slow skeletal muscle fiber type, and slow skeletal muscle fiber type hypertrophied in the *M. serratus ventralis*. Furthermore, the concentration of serum NEFA increased during grazing period, and hypertrophy of muscle tissue was not involved with differentiation of myotube. We showed that crosstalk between Myostatin and Leptin, and the effect of CLA on myotube formation. These finding suggested that an unknown factor in cattle serum may induce differentiation of myotube during grazing period.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：家畜生産システム・自給飼料・放牧・赤肉生産

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の肉牛生産は飼料の大部分を輸入穀物飼料に依存し、さらに粗飼料も輸入依存傾向を強め、飼料自給率は極めて低い。また、牛肉の自給率の向上と消費者の安全で健康的な畜産物に関心が高まっていることから、放牧と粗飼料を主体とした牛赤肉の生産基盤の形成が急務である。

(2) 骨格筋量には骨格筋形成を負に制御するミオスタチンが深く関与し、ミオスタチン蛋白を欠損するウシは筋形成の抑制が解除され、骨格筋重量が約 1.5 倍増加する。このことは、ミオスタチン作用を制御することにより筋肉量を増加させることが可能なことを意味する。

(3) 摂食抑制ペプチドであるレプチンは、その受容体である OBRb がヒト骨格筋細胞に発現し、ブタでは筋芽細胞の分化を抑制し、増殖を促進する。

(4) 骨格筋細胞においてミオスタチンとレプチンはクロストーク機構で互いの作用を調整し、筋肉量を制御していることを強く支持する。

(5) 放牧した肥育牛の最長筋における共役リノール酸(CLA)含量は慣行肥育の黒毛和種牛と比較して著しく高いことが知られ、マウスの筋芽細胞ではCLAがミオスタチン発現を減少させることによって、筋管形成を促進することが報告されている。

以上の研究成果は、放牧・粗飼料多給による肥育方式では、CLA を介して筋細胞でのミオスタチンとレプチンのクロストーク機構が調節され、赤肉生産を増強させることを強く示唆している。しかしながら、放牧・粗飼料を主体とした赤肉生産の科学的基盤は未だ明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は放牧および自給粗飼料による赤肉生産の学術的基盤の構築を目的としているため、下記の点を明らかにする。

放牧および自給粗飼料のみで生産した日本短角種牛(N)および寒地適応牛(N×サレル種(S)×N:NSN)において

- (1) 骨格筋組織における筋線維型構成割合
- (2) 放牧期の血液性状の変動ならびに成長ホルモン(GH)動態
- (3) 放牧期の骨格筋細胞における筋特異的遺伝子の発現変動
- (4) 骨格筋細胞におけるレプチンレセプター(OBRb)とミオスタチンレセプター(ActR II B)の発現

(5) ウシ筋芽細胞を用いた CLA 刺激による筋特異的遺伝子の発現変動

以上より、放牧および自給粗飼料のみで生産された牛の特性と骨格筋細胞に対するCLAを介したミオスタチンとレプチンのクロストーク作用の存在が明らかとなる。

3. 研究の方法

(1) 肥育後期の放牧および自給粗飼料のみで生産したNおよびNSN(各3頭)を供試牛とした。試験期間は放牧期である5月から10月と設定し、舎飼期から放牧期、次の舎飼期まで血液性状(AST, γ -GT, NEFA, TG, T-CHO, BUN, Glucose, GH)を測定した。また、毎月体重測定を行い、増体成績を比較した。

(2) 上記供試牛をと畜後、最長筋、腹鋸筋、半膜様筋よりサンプルを採取し、凍結包埋後、クレオスタットにより薄切し、酵素染色を行った。得られた染色像より、筋線維型構成割合と筋線維径を算出した。

(3) 育成期の放牧および自給粗飼料のみで生産したNおよびNSN(各6頭)を放牧期に放牧区および舎飼い区に各3頭(6頭/区)に分け、増体および血液性状を解析し、試験開始から2ヶ月間隔で最長筋よりバイオプシー法でサンプルを採取した。得られたサンプルはリアルタイムPCR法で筋特異的遺伝子(Myf5, MRF4, myogenin, MyoD, myostatin, slow-myosin, fast-myosin)とOBRbとActR II Bの発現変動を解析した。

(4) 日本短角種最長筋由来の筋芽細胞を用いて、反芻家畜に多く含有する9(c), 11(t)-CLAならびに放牧期に採取した供試牛の血清添加を行い、筋芽細胞から筋管細胞への分化時における上記遺伝子の発現をリアルタイムPCR法で解析した。

4. 研究成果

(1) 肥育後期の放牧および自給粗飼料のみで生産したNおよびNSNの試験期間中日増体量に有意な差はなかった。血液性状では放牧日数依存的に両品種ともに γ -GT, BUNが微増、GH濃度が減少、NEFAが有意に増加した。その他の因子には明確な変動がなく、品種間差も認められなかった。

(2) 放牧肥育終了後の供試牛から最長筋、腹鋸筋、半膜様筋を採取し、酵素染色を行い、筋線維型構成割合と筋線維径を算出した。筋線維型構成割合は両品種で有意な差はなく

(図1)、慣行肥育の黒毛和種と比較すると(鈴木ら, 1977) I型およびIIA型筋線維構成割合が全ての筋組織で多い傾向にあり、その特性は腹鋸筋で顕著であった。したがって、放牧によってII型筋線維からI型筋線維へ移行している可能性が示唆された。

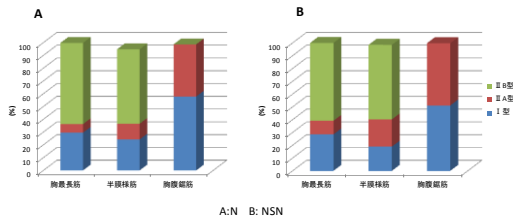


図1. 放牧など自給粗飼料のみで生産した牛の筋線維型構成割合(肥育後期)

また、両品種とも胸腹縦筋においてI型筋線維の垂型である肥大したI型(I D型)筋線維の発現

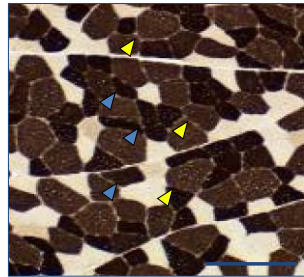


図2. 胸腹縦筋におけるI D型筋線維の発現

が認められ(図2)、その構成割合は慣行肥育の黒毛和種のI型筋線維中32%に対して、NおよびNSNで57.1%と有意に高い値であった。放牧によりI D型筋線維の構成割合が増加する報告は国内外を含めて本研究で初めて明らかになった。さらに筋線維の直径は全ての筋組織で両品種に有意な差が認められないが、胸腹縦筋のI D型の直径は慣行肥育牛 $79.4 \pm 3.8 \mu\text{m}$ に対して $90 \pm 0.8 \mu\text{m}$ と有意に太かった。

(3) 肥育後期の筋組織の筋線維型移行の時期および肥大化の要因を明らかにするために育成期の放牧および自給粗飼料のみで生産したNおよびNSN(各6頭)を放牧期に放牧区および舎飼区に各3頭(6頭/区)に分け、増体および血液性状を解析した。品種間ではデータの変動が大きく、放牧区および舎飼区としてデータを算出した。試験期間中の日増体量は放牧区で有意に高く(放牧区 $0.9 \pm 0.1\text{kg}$ vs 舎飼区 $0.4 \pm 0.2\text{kg}$)、血液性状ではAST、T-CHO、NEFA、BUNが有意に高かった。一般的に血中NEFA濃度の増加は栄養不足の指標として考えられているが、本研究により肥育牛と同様に血中NEFAが放牧区では高いことから、放牧牛では端的に栄養不足の指標としては使用できず、血中NEFA濃度は放牧牛の放

牧強度の新たな指標となる可能性が考えられた。また、myostatinのmRNA発現は放牧区で低下する傾向が観察されたが、筋分化関連遺伝子の発現は両区で有意な差は認められなかったが、放牧区でActR II BおよびOBRbのmRNA発現が低く(図3)、fastが低くslow-myosinのmRNA発現が有意に高かった

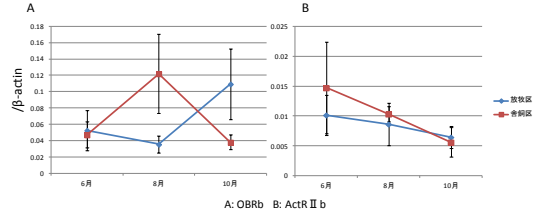


図3. 最長筋におけるレプチンレセプターとミオスタチンレセプターのmRNA発現変動

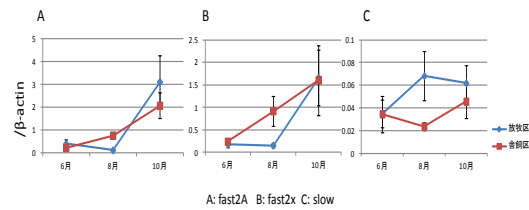
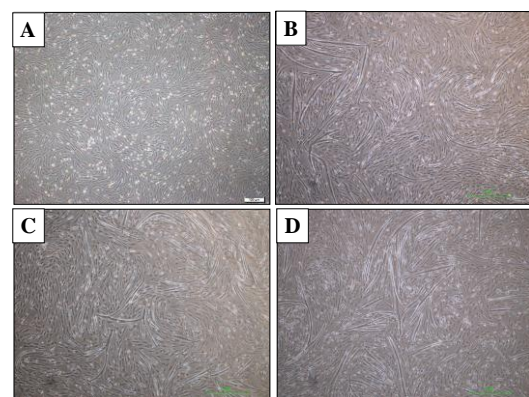


図4. 最長筋におけるミオシン重鎖mRNA発現変動

(図4)。したがって、本研究より、放牧期の筋線維型移行は育成期よりすでに始まり、その増体要因は筋関連遺伝子に有意な変動が認められないことから、筋芽細胞が分化して筋管細胞に誘導する肥大機構を介さないことが明らかとなった。また、放牧よりミオスタチンレセプターおよびレプチンレセプターの発現が低下することが明らかとなり、放牧期においてミオスタチンとレプチンにクロストーク機構が存在し、筋肥大に関与する可能性が示唆された。

(4) 日本短角種最長筋由来の筋芽細胞を用いて、反芻家畜に多く含有する9(c),11(t)-CLAならびに放牧期に採取した供試牛の血清添加を行い、CLAの筋芽細胞から筋管細胞への分化時における上記筋分化特異的遺伝子の発現をリアルタイムPCR法で解析した。筋管分化誘導時では9(c),11(t)-CLA刺激で筋管形成が抑制傾向を示し、血清刺激で形態学的観察から筋管形成を有意に促進した(図5)。



A: 筋芽細胞 B: 無刺激 C: CLA添加 D: 血清刺激

図5. 筋管細胞分化時におけるCLAおよび血清刺激による形態変化

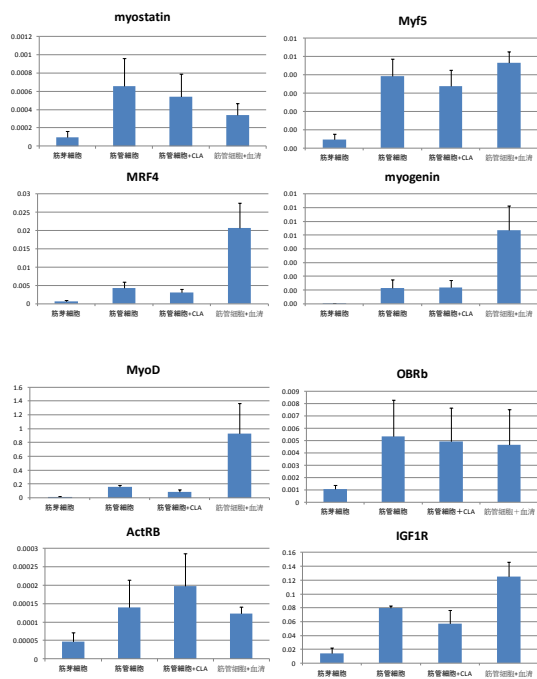


図6. 筋管細胞分化誘導時におけるCLAおよび血清刺激による筋管分化関連遺伝子の発現変化

また、筋分化を負に制御する myostatin およびそのレセプターある ActR II b は血清刺激で減少、筋分化を正に制御する MRF4、myogenin、MyoD、IGFR は増加し、OBRb は筋分化時に全ての刺激で増加した。CLA 刺激では全ての遺伝子で無刺激区である筋管細胞と変わらないか、減少傾向にあった。(図6)。

本研究より放牧など自給粗飼料のみで生産された肥育牛の筋線維型構成割合と放牧期の骨格筋組織において筋線維型移行および筋線維が肥大化することが明らかとなった。また、放牧期では血中 NEFA 濃度が有意に上昇し、筋組織の肥大は筋芽細胞が分化して肥大する機構に依存しないことも明らかとなった。さらに培養筋芽細胞において筋管形成誘導時にミオスタチンとレプチンのクロストーク作用が存在し、CLA が筋管形成に影響を与えること、また、放牧時のウシ血清中に筋管分化を促進する新規因子が存在する可能性が示唆された。しかしながら、本研究では育成期および肥育期の赤肉産生機構の一部は解明されたが、哺乳期におけるその詳細は明らかとなっていない。また、筋形成過程における CLA の筋管形成抑制機構および放牧時の血清に含まれる新規筋管分化促進因子の同定も明らかとなっていない。したがって、今後、脂肪酸含量など血清成分および放牧草など自給飼料の成分解析、試験牛の行動量の調査を行い、これら因子と運動が放牧時の筋線維型移行ならびに肥大化へどのように関与するか多角的に解析し、筋肥大におけるキープファクターを明確にする必要が考えられた。

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 2 件)

1. Orime A., Yonezawa T., Ogasawara H., Kuroyanagi T., Manda T. Analysis of preference for domestic grass-fed beef in Japanese youths. *Animal Science Journal*. 査読有. 2012. 83:268-271.

2. 折目愛, 小笠原英毅, 岡山和代. 放牧など粗飼料 100% で生産された赤身牛肉におけるドライエージング効果. 伊藤記念財団平成 22 年度食肉に関する助成研究調査報告書. 査読なし. 2011. VOL.29:68-74.

[学会発表] (計 10 件)

1. 小笠原英毅, 畔柳正, 北川絵理, 渡邊康一, 渡邊一史, 高橋秀之, 小野泰, 大和田修一, 麻生久, 寶示戸雅之. 放牧期の日本短角種および肉用交雑種における筋線維型移行と血液性状. 第 115 回日本畜産学. 2012.3.29. 名古屋大学 (愛知県)

2. 小笠原英毅, 畔柳正, 米澤智洋, 渡邊康一, 三宅雅人, 高橋秀之, 小野泰, 大和田修一, 麻生久, 山口高弘, 寶示戸雅之. 放牧など自給粗飼料 100% で生産した日本短角種および肉用交雑種の枝肉成績と筋線維型構成. 第 114 回日本畜産学会大会. 2011.8.27. 北里大学 (青森県)

3. 米澤智洋, 小笠原英毅, 塩谷篤史, 山田拓司, 小野泰, 畔柳正, 寶示戸雅之. 放牧など自給粗飼料 100% による飼育がウシの血中・肉中ジェニステイン含有量に及ぼす影響. 第 114 回日本畜産学会大会. 2011.8.27. 北里大学 (青森県)

4. 小笠原英毅, 北里八雲牛の産肉性と今後の展望. 日本産肉研究会第 8 回学術集会 (指名講演). 2011.8.25. 北里大学 (青森県)

5. 小野泰, 松本英典, 庄司勝義, 小笠原英毅, 畔柳正, 萬田富治, 寶示戸雅之. 有機草地におけるエゾノギシギシの生態的防除法の検討. 平成 22 年度北海道畜産草地研究会. 2010.12.27. 北海道大学 (北海道)

6. 小笠原英毅, 小野泰, 折目愛, 久保田博昭, 山田拓司, 庄司勝義, 松本英典. 牧場職員の研究と実践. 平成 22 年度北海道・東北地域大学附属農場協議会及び農場教育研究会. 2010.8.9. 山形大学 (山形県)

他 4 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 畜牛の飼養方法

発明者: 米澤智洋, 小笠原英毅, 畔柳正, 山田拓司, 小野泰, 塩谷篤史

権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-0065050
出願年月日：24年1月16日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kitasato-u-fsc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原英毅 (OGASAWARA HIDEKI)
北里大学・獣医学部・助教
研究者番号：30535472