

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11日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780245

研究課題名（和文） ほ乳期の栄養制御による豚の筋肉内脂肪調節機構の解明

研究課題名（英文） Effect of energy and protein restriction during nursing period on intramuscular fat accumulation of longissimus dorsi muscle of pigs

研究代表者

芦原 茜（ASHIHARA AKANE）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・研究員

研究者番号：40547717

研究成果の概要（和文）：

ほ乳期におけるエネルギーおよびタンパク質摂取量制限が筋肉内脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。その結果、摂取量制限により、タンパク質分解が抑制されると同時に合成も抑制されたために筋肉の発達が抑制されることが明らかとなった。また、総コラーゲン含量は増加し、筋肉内脂肪含量は変化しないことが明らかとなったが、コラーゲンおよび脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量には影響しなかった。以上から、ほ乳期におけるエネルギー量およびタンパク質摂取量制限は、筋肉内コラーゲンタイプおよび筋肉内脂肪細胞合成に影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This experiment was conducted to determine the effect of energy and protein restriction during nursing period on intramuscular fat (IMF) accumulation of pigs. The restriction of energy and protein during the nursing period in pigs resulted in suppression of muscle development and this suppression was responsible for increased protein degradation and decreased protein synthesis, and increased total collagen contents in muscle, but no difference of IMF. While mRNA levels of collagen and lipid metabolism related genes were not changed. It was suggested that the feed restriction during nursing period resulted in suppression of muscle development, but no difference of intramuscular collagen type and IMF synthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：豚、筋肉内脂肪、ほ乳期、栄養制限

1. 研究開始当初の背景

筋肉内脂肪は、食味性（柔らかさ、多汁性など）に影響を及ぼす因子の一つである。このことから、育種改良（Suzuki et al., J Anim. Sci. 2005, 83; 2058-2065）や低タンパク質および低リジン飼料給与といった栄養制御（Kerr et al., J Anim. Sci. 1995, 73; 3000-3008, Katsumata et al., Anim. Sci. J 2005, 76; 237-244）による手法を用いて、筋肉内脂肪の多い豚肉の作出が行われてきた。しかしながら、筋肉内脂肪の蓄積メカニズムについては不明な点が多い。その理由として、豚における筋肉内脂肪蓄積は、遺伝および栄養の両方の影響を受けるためと考えられる。

そこで、申請者らは、同一管理条件下で飼養した父方半兄弟である産子を用いることにより、遺伝的要因および環境要因を考慮した上で、肥育豚の筋肉内脂肪蓄積に影響を及ぼす要因を探索してきた(1)。さらに、得られた結果から、ほ乳期の発育遅延と筋肉内脂肪蓄積との関連について検討を行ってきた(2)。

- (1) 豚の筋肉内脂肪に関わる因子の探索（芦原ら, 栄養生理研究会報, 2009, 53; 43-54）

同一管理条件下で飼養した父方半兄弟の産子豚を用いて、筋肉内脂肪蓄積に関わる要因を探索した。その結果、同一家系内で筋肉内脂肪含量（胸椎部）が1~10%と広範囲に分布し、筋肉内脂肪含量が多い個体はほ乳期の発育が遅延した。以上のことから、筋肉内脂肪の蓄積には、ほ乳期の発育遅延が関与している可能性が示唆された。

- (2) ほ乳期における栄養制限が筋肉内脂肪蓄積に及ぼす影響（芦原ら, 日畜会報, 2008, 79; 227-234, 芦原ら, 日畜会報, 2007, 78; 435-440）

(1)より、筋肉内脂肪の蓄積には、ほ乳期における発育遅延が関与していることが推察された。このことから、ほ乳期に意図的に発育を遅延させるため、エネルギーとタンパク質含量を制限した飼料を給与することにより、肥育後出荷時の筋肉内脂肪蓄積に及ぼす影響を調べた。その結果、出荷時の筋肉が小さくなり、結合組織の主成分である1型コ

ラーゲン含量が増加し、筋肉内脂肪の蓄積が増大することを示した。

以上から、エネルギーおよびタンパク質摂取量制限をほ乳期に行い、その後肥育することにより、筋肉内脂肪含量が増加することを示した。しかし、ほ乳期における低栄養処理が筋肉、結合組織および筋肉内脂肪細胞に及ぼす直接的な影響は明らかではない。このことから、ほ乳期の栄養制限による筋肉の発達抑制（筋肉タンパク質の合成の抑制、分解の促進）、結合組織（コラーゲン）量および筋肉内脂肪細胞の分化を明らかにすることが、筋肉内脂肪蓄積のメカニズムを探索する上で重要であると考えた。

2. 研究の目的

これまでに、ほ乳子豚への低栄養飼料給与により、筋線維の発達が抑制され、筋肉タンパク質が対照区に比べ減少することが報告されている（Lefaucheur et al., J Nutr. 2003, 133; 140-147）。また、低タンパク質飼料および低リジン飼料を給与することによって、筋肉タンパク質の合成が抑制あるいは分解が促進されることが報告されている（Li et al., J Physiol. 1976, 231; 441-448, Wassner et al., Am. J Physiol., 1977, 233; 119-123）。一方、筋ジストロフィーでは、筋肉が萎縮するとともに結合組織および脂肪が増加することが報告されている（池平ら, 核医学, 1986, 23; 1731-1738）。また、VおよびVI型コラーゲンは脂肪細胞の分化を促進させることが報告されている（Nakajima et al. Biol Cell, 2002, 94; 197-203）。これらから、ほ乳期にエネルギーおよびタンパク質摂取量が制限されることによって、ほ乳期中の筋肉タンパク質の合成抑制あるいは分解促進により筋肉発達が抑制され、筋線維間に隙間ができ、結合組織（コラーゲン）が増加し、筋肉内脂肪細胞が増加する可能性が考えられた。

そこで本研究では、筋肉内脂肪蓄積のメカニズムを解明することを目的として、筋肉タンパク質合成が盛んなほ乳期にエネルギーおよびタンパク質摂取量を制限することにより、結合組織（コラーゲン）や筋肉内脂肪細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

栄養制御による筋肉内脂肪蓄積のメカニズムの一端を明らかにすることを目的として、豚のほ乳期中（3日齢から28日齢）におけるエネルギーおよびタンパク質摂取量制限が、筋肉の発達（タンパク質合成ならびに分解）、コラーゲン量およびタイプ、筋肉内



脂肪細胞の分化に及ぼす影響を調べた。

(1) ほ乳期中のエネルギーおよびタンパク質摂取量制限が筋肉の発達、結合組織量および筋肉内脂肪細胞の大きさと数に及ぼす影響の検討

供試動物は LWD 種雌 16 頭とし、処理区は対照区 (100%区) と実験区 (50%区) の 2 処理区とした。3 日齢から 28 日齢のほ乳期間を試験期間とし、100%区には、養分要求量を満たす量を給与し、50%区には、ビタミン、ミネラル摂取量は充足させ、エネルギーおよびタンパク質摂取量のみ 100%区の 50%に相当する量を給与した。28 日齢に供試豚をと畜し、第一胸椎から腰椎部までの胸最長筋を採取した。採材した筋肉サンプルは重量を測定し、さらに、凍結切片を作成し、筋線維の面積を測定した。また、結合組織の量の指標として、コラーゲン含量 (熱可溶性コラーゲンおよび不溶性コラーゲン) の測定を行った。さらに、凍結切片を作成し、アザン染色を行うことにより、筋肉中結合組織のコラーゲンを染色した。筋肉内脂肪含量は、エーテル抽出法により測定し、さらに、凍結切片を作成し、オイルレッド O で脂肪細胞を染色することによって数と大きさの測定を行った。

(2) ほ乳期中のエネルギーおよびタンパク質摂取量制限が筋肉のタンパク質代謝、コラーゲンタイプならびに脂肪細胞分化に及ぼす影響の検討

(1) での結果を踏まえ、胸最長筋における筋肉タンパク質の合成および分解、コラーゲンタイプの発現パターンおよび脂肪細胞の分化マーカーの測定を行うことにより、ほ乳期のエネルギーおよびタンパク質摂取量制限によって筋肉および結合組織と筋肉内脂肪の蓄積に及ぼす影響について詳細に検討した。

胸最長筋のタンパク質合成の指標として、リボゾーナル S6 タンパク質のリン酸化をウエスタンブロッティング法で検討し、タンパク質分解の指標として、タンパク質分解酵素 (カルパイン、プロテアソーム、カテプシン B、カテプシン B+L) 活性を測定した。

コラーゲンタイプは、筋肉内脂肪細胞の分化に影響すると報告されていることから、コラーゲンタイプ (I、III、IV) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。また、筋肉内脂肪細胞では、脂肪細胞の分化マーカーである PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、アディポネクチンの発現をリアルタイム PCR 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) ほ乳期にエネルギーおよびタンパク質摂取量を 1/2 に制限していたため、50%区の

摂取量は 100%区の 1/2 程度であった。そのため、50%区の体重および日増体量は 100%区の約半分であり有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。50%区の胸最長筋肉重量は、100%区より有意に低かった ($P < 0.05$) (図 1) が、体重あたりの胸最長筋肉重量は処理区間で差は認められなかった。また、筋肉内脂肪含量は処理区間で差はなかった。一方で、50%区の総コラーゲン含量は 100%区より高かった ($P < 0.05$) (図 2) が、不溶性コラーゲン含量は差がなく、50%区の可溶性コラーゲン含量は 100%区より高い値であった ($P < 0.05$)。凍結切片における筋肉内結合組織をアザン染色した場合、50%区が 100%区より染色部面積が多かった。一方で、オイルレッド O で脂肪細胞を染色することによって、数と大きさに差は見られなかった。以上から、ほ乳期による栄養制限により、筋肉の発達は抑制されるものの、筋肉内脂肪含量は変化せず、結合組織中のコラーゲン含量は増加することが示された。

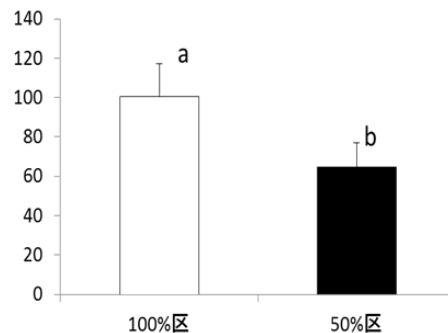


図1 胸最長筋肉重量(g)

a,b: 異符号間に有意差 ($P < 0.05$) あり

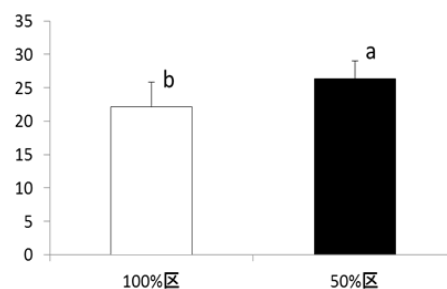


図2 胸最長筋内総コラーゲン含量 (mg/g)

a,b: 異符号間に有意差 ($P < 0.05$) あり

(2) さらに、筋肉タンパク質分解酵素であるカルパイン、プロテアソームでは差が認められなかったが、カテプシン (B および L) において 50%区が 100%区より有意に低い値を示した ($P < 0.01$)。また、S6 タンパク質のリン酸化は低い値を示した ($P < 0.05$)。このことから、50%区におけるタンパク質分解は抑制されていたものの合成も抑制されたために、筋肉重量の増加が抑制されたと考えられた。

一方、各タイプのコラーゲン（I、III、IV）および脂質代謝関連遺伝子（PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、アディポネクチン）の mRNA 発現量は処理区間で差がなかった。

以上のことから、ほ乳期におけるエネルギーおよびタンパク質摂取量制限により、筋肉の発達が抑制されるが、筋肉内脂肪含量は変化せず、筋肉内コラーゲン含量は増加することが明らかとなった。また、筋肉の発達抑制は、筋肉タンパク質合成が抑制されると同時に分解も抑制されることによって生じることが明らかとなった。しかし、筋肉内脂肪蓄積に関わる分化マーカーの遺伝子発現には差が認められなかった。また、コラーゲンタイプの mRNA 発現量においても、I、III、IV 型のいずれのコラーゲンタイプにおいても、処理区間で差は認められなかった。これらのことから、ほ乳期におけるエネルギーおよびタンパク質摂取量制限が筋肉タンパク質の発達には影響を及ぼすものの、筋肉内コラーゲンタイプおよび脂肪細胞合成には影響を及ぼさないことが示唆された。

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）

〔学会発表〕（計 1 件）

Ashihara A. et al., Effect of energy and protein restriction during nursing period on intramuscular fat accumulation of longissimus dorsi muscle of pigs during growing-finishing period, 3rd EAAP International symposium on energy and protein metabolism and nutrition, 677-678, 2010 6-10 Sept., Parma (Italy).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦原 茜 (ASHIHARA AKANE)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・研究員

研究者番号：40547717