

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658217

研究課題名(和文)食肉中の不飽和脂肪酸濃度を増大する遺伝子発現の可視化

研究課題名(英文)Visualization of expression of gene increased the unsaturated fatty acids in meat

研究代表者

加藤 和雄 (Kato, Kazuo)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60091831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では不飽和脂肪酸に関わるdelta-9不飽和化酵素(ステアロイルCoA 9-デサチュラーゼ、SCD)の遺伝子発現量の調節作用と飽和脂肪酸濃度を増大する遺伝子発現の可視化のためのマウスを作成した。結果として、1)ウシ脂肪細胞においてbGH(100と1000ng/ml)を添加したところ、SCD遺伝子の発現量が減少した。2)相同組換え法を用いて、内在性delta-9不飽和化酵素のExon1部分に蛍光蛋白質を挿入させたマウス胚由来万能細胞を樹立した。ES細胞由来の細胞を持つキメラマウスを同定し、delta-9不飽和化酵素のゲノム部位にGFP遺伝子をヘテロに持つマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：This study was to 1) investigate the gene expression of SCD in bovine adipocytes, and 2) generate delta-9-desaturase-GFP- knock in mice to visualize the activation of an enzyme generating a flavor and taste of the intramuscular fat.
1) Bovine GH (100 and 1000 ng/ml) decreased SCD mRNA expression in bovine differentiated adipocytes. 2) Using the homologous recombination method, embryo stem cell derived from the mouse embryo with GFP protein in an Exon1 of the internal delta-9 desaturase was established. The chimera mouse with delta-9-desaturase-GFP was identified and hetero delta-9-desaturase-GFP mouse generated.

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：食肉組成 不飽和脂肪酸 SCD 遺伝子導入 可視化

1. 研究開始当初の背景

我が国で確立された黒毛和牛肉は、筋肉内脂肪交雑が高く、霜降り肉と呼ばれる。国際的にも柔らかく味が良いと評価が高い。和牛肉の旨味と食感は筋肉内不飽和脂肪酸に依存するとされており、牛肉生産現場において重要な指標となっている。一方、牛のような大型の家畜を用いた遺伝子改変は高額な経費と時間を必要とするため、効率的な研究開発にはモデル動物の作製が必須である。したがって本研究の目的は、和牛肉の旨味を決定する不飽和脂肪酸を合成する酵素の発現を可視化できるモデル動物を作成し、将来、和牛肉の旨味成分を増加する技術の開発に貢献することである。

大動物である牛において、delta-9-不飽和化酵素の mRNA レベルの解析研究から、本遺伝子の発現は成長に伴って大きく変化するという結果を得ている。一般的に、牛においては個体差が大きく経時的なサンプル採取が困難である。しかし、従来手法、すなわち遺伝子診断と旧来の交配・選抜による育種技術によっては、集団内の遺伝子頻度を上げるために長期間を必要とする。したがって、不飽和脂肪酸の割合を上昇させる新規な方法の開発が望まれていた。本研究では、delta-9-不飽和化遺伝子の GFP ノックインマウスを樹立しパイロット動物として利用することにより、細胞内の不飽和化脂肪酸の生成を高める酵素発現をリアルタイムで可視化し、不飽和度を高めるための技術開発を開発することである。

2. 研究の目的

筋肉内脂肪細胞における不飽和脂肪酸生成は、delta-9 不飽和化酵素 (ステアロイル CoA 9-デサチュラーゼ、SCD) の遺伝子発現量によって制御されており、本遺伝子の発現を促進することで筋肉内脂肪の不飽和度を高めることができる。本研究では、(1) ウシ脂肪細胞を用いて SCD の遺伝子発現調節機構について調査し、(2) delta-9-GFP-ノックインマウスを樹立し、イメージング技術と組み合わせることにより、筋肉内脂肪の風味や旨味を生成する酵素の活性状態を可視化することである。

3. 研究の方法

(1) ウシ脂肪細胞における SCD 遺伝子発現の調節

黒毛和種牛の皮下脂肪組織から定法に従い脈間質細胞 (SV 細胞) を分離し、SV 細胞より前駆脂肪細胞をクローニングした。クローニングした前駆脂肪細胞をコンフルエントになるまで培養し、脂肪細胞分化培地 (酢酸ナトリウム $10^{-2}M$ 、オクタン酸 $5 \times 10^{-3}M$ 、Lipid Mixture 100 倍希釈、デキサメタゾン $10^{-7}M$ 、トログリタゾン $10^{-5}M$ 、インスリン $10^{-7}M$ 、トリヨードサイロニン $2 \times 10^{-11}M$ 添加) によ

り分化誘導を行った。

黒毛和牛の脂肪細胞を培養し、GH やインスリン濃度と SCD mRNA 発現を、リアルタイム PCR 法にて定量化する。その結果から SCD 遺伝子発現を調節するホルモンを解明した。

(2) GH 遺伝子型が mRNA 発現量に及ぼす影響

山形県内で肥育された黒毛和種牛 ($n = 168$) の僧帽筋サンプルを用いて、GH 遺伝子多型による SCD と FASN の遺伝子発現の違いについて調査した。

(3) ノックインベクターの作製、キメラマウスの作製および生殖細胞キメラ動物作成

マウス ES 細胞の delta-9 不飽和化酵素のゲノム DNA 断片を BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーからサブクローニングを行い、得られたゲム DNA 断片を元にノックインベクターを作製する。現在、ノックインプラスミドの構造の確認と相同組み換え ES 細胞クローンの判定のためのサザンブロット用のプローブを作成した。

スクリーニングによって同定された相同組換え ES 細胞を野生型 3.5 日胚にマイクロインジェクションし、キメラ動物を作製した。

生殖細胞系列に ES 細胞が存在するキメラ動物を F1 後代を検査することにより同定する。同定された生殖細胞キメラ動物を野生型動物と交配させ、実験に必要な数の動物を確保するとともに、安定的に保存出来るよう配偶子凍結を行った。

4. 研究成果

(1) 牛脂肪細胞における SCD 遺伝子発現の調節

SCD 遺伝子発現は、GH 多型間で有意な差は認められなかったが、SCD 酵素活性は GH 遺伝子型の AA 型で他の遺伝子型よりも低い値を示す傾向が認められた。また、SCD1 遺伝子発現は、SCD 遺伝子型の AA 型 > AV 型 = VV 型を示す傾向が見られた。SCD 酵素活性は SCD1 遺伝子型の AA 型が他の遺伝子型よりも有意に高い値を示した。しかし、SCD1 遺伝子発現量と SCD 酵素活性との間に有意な相関は認められなかった。

分化脂肪細胞に bGH を 100ng/ml と 1000ng/ml 添加したところ control 区と比べ bGH 100ng/ml、1000ng/ml 添加区で FASN、SCD-1、SREBP-1 mRNA の発現量が減少した。

以上のことより、SCD の遺伝子発現量は産肉性や脂質代謝に影響を与えるメカニズムの一部を生理学的に解明することができた。

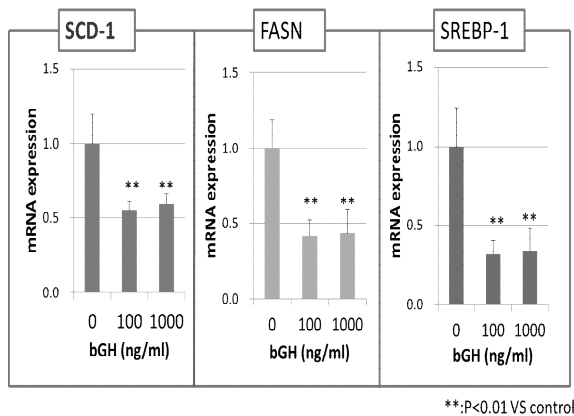
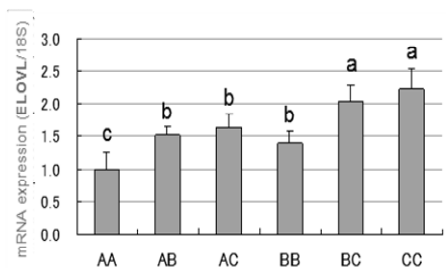
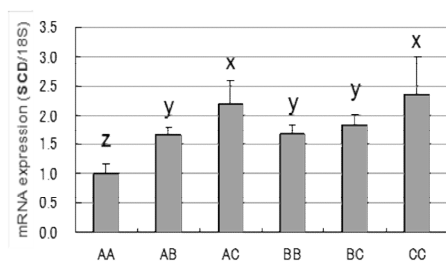


図1 . ウシ培養脂肪細胞における bGH 添加による SCD, FASN, SREBP-1 の遺伝子発現量

(2) GH 遺伝子型が mRNA 発現量に及ぼす影響

SCD mRNA 発現量は GH 遺伝子 AA 型で最も低く、AB, BB, BC 型で中間の値を示し、AC および CC 型で最も高い傾向がみられた (P=0.09) (図2)。そこで GH 遺伝子ホモ接合体である AA, BB および CC 型の 3 群のみを比較したところ、AA 型は CC 型に対して有意に SCD mRNA 発現量が低いという結果になった (P=0.01) (図2)。

ELOVL-6 mRNA 発現量は GH 遺伝子 AA 型で最も低く、AB, AC, BB 型で中間の値を示し、BC および CC 型で最も高かった (P=0.03) (図2)。



GH genotype	AA	AB	AC	BB	BC	CC
n	12	61	27	23	37	8

図2 . 黒毛和種牛横隔膜における SCD および ELOVL-6 mRNA 発現量に対する GH 遺伝子型の影響。各 GH 遺伝子型について、AA 型の SCD mRNA 発現量を 1 としたときの発現量を示す。異符号間には有意差が認められた (a, bP<0.05, x, yP<0.10)。

(3) ノックインベクターの作製、キメラマウスの作製および生殖細胞キメラ動物作成

筋肉内脂肪細胞における不飽和脂肪酸生成は、delta-9 不飽和化酵素の遺伝子発現量によって制御されており、本遺伝子の発現を促進することで筋肉内脂肪の不飽和度を高めることができる。マウス ES 細胞の delta-9 不飽和化酵素のゲノム DNA 断片を BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーよりサブクローニングを行い、得られたゲノム DNA 断片を元にノックインベクターを作製した。相同組換え法を用いて、内在性 delta-9 不飽和化酵素の Exon1 部分にオワンクラゲ由来の蛍光蛋白質 (GFP) を挿入させたマウス胚由来万能細胞 (ES 細胞) を樹立した。

マウス胚由来万能細胞 (ES) の内在性 delta-9-不飽和化酵素の Exon 1 の部分に、クラゲ由来蛍光蛋白質、すなわち GFP を相同組み換え法により導入する。スクリーニングにより相同組み換え ES 細胞を同定し、野生型 3.5 日胚へ ES 細胞をインジェクションして、ES 細胞由来の細胞を持つキメラマウスを同定し生殖細胞系列を通過させることにより、delta-9-不飽和化酵素のゲノム部位に GFP 遺伝子をヘテロに持つマウスを作製した。しかし、生殖細胞系列に ES 細胞が存在するキメラ動物は出来なかった。再度、相同組換え ES 細胞を野生型 3.5 日胚にインジェクションし、生殖細胞キメラ動物を作成中である。

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 5 件)

Sugita H, Ardiyanti A, Yokota S, Yonekura S, Hirayama H, Shoji N, Yamauchi E, Suzuki K, Katoh K, Roh SG (Corresponding author). 2014. The effect of single nucleotide polymorphisms in GH gene promoter region on carcass traits and intramuscular fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Livestock Science* (Accepted)、査読有、2014
 Roh SG, Koiwa K, Sato K, Ohtani Y, Takahashi T, Katoh K. 2014. Actions of intravenous injections of AVP and oxytocin on plasma ACTH, GH, insulin, and glucagon concentrations in goats. *Animal Science Journal*、査読有、85(2)、2014、286-292
 DOI: 10.1111/asj.12142.

Bahrani A, Ardiyanti A, Tonosaki K, Suzuki K, Tanida N, Hirayama T, Roh SG, Nishio T, Katoh K. Haplotype C of growth hormone (GH) gene in Japanese Black cattle: Structure of GH protein

and a novel method for detection of the gene, Animal Science Journal、査読有、84、2013、802-804
DOI: 10.1111/asj.12132

Bahrami A, Behzadi Sh, Miraei-Ashtiani S.R., Roh SG, Katoh K, Genetic polymorphisms and protein structures in growth hormone, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 1 and leptin in Mehraban sheep, Gene、査読有、527(1)、2013、397-404.

DOI: 10.1016/j.gene.2013.05.066.

Ardiyanti A, Abe T, Tameoka N, Kobayashi E, Shoji N, Suzuki K, Roh SG, Katoh K, Effects of bovine growth hormone (GH) gene polymorphism on lipogenic genes expression levels in diaphragm tissues of Japanese Black Heifer, Asian-Australian Journal of Animal Science、査読有、25(8)、2012、1055-1062

doi:http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2012.12029

〔学会発表〕(計 2件)

小林諒子、Harajanti D.W.、盧尚建、佐野 宏明、加藤和雄、黒毛和種牛の内分泌変化と糖代謝に及ぼすGH多型の影響、日本畜産学会第117回大会、2013年09月09日～2013年09月10日、新潟大学五十嵐キャンパス(新潟)

加藤 大幾、谷田奈々子、Astrid Ardiyanti、鈴木 裕、宋 相憲、加藤和雄、盧 尚建、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、日本畜産学会第116回大会、2013年03月27日～2013年03月29日、安田女子大学キャンパス(広島)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・准教授
研究者番号：60091831

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：