

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780256

研究課題名(和文) 赤肉形成過程におけるCLAのミオスタチンおよびIL-6産生制御機構の解明

研究課題名(英文) Effect of Myostatin and IL-6 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・助教

研究者番号：30535472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

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生産システムにおいて、骨格筋細胞におけるミオスタチンとIL-6の作用に着目し、哺乳期の日本短角種の採食量および哺乳量、増体成績、血液性状、第一胃の発達、筋線維型構成割合などを解析した。6ヶ月間の自然哺乳でも第一胃発達に十分な固形飼料を採食すること、放牧飼養で初期成長が助長されることが明らかとなった。ミオスタチンの発現は放牧生で高く、IL-6では両区に明確な差は見られなかった。骨格筋間での発現では、咬筋でミオスタチンは低く、IL-6が高いことから、両者のクロストーク作用が存在し、出生後の特殊な筋線維型移行に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated fundamental characteristics of the complete grass-fed beef production system focusing on the effect of Myostatin and IL-6 in skeletal muscle of Japanese shorthorn under the condition of sucking period.

In the grazing management group, body weight increased among 30-120 days after birth. Food intake, serum components, development of rumen papilla, rate of muscle fiber, however, were not significantly different in the two groups. Expression of Myostatin mRNA was lower in skeletal muscle of myosin-slow rich. We found that specific slow skeletal muscle fiber type (ID) contain lipid droplets. It was suggested that the possibility of the interaction on Myostatin and IL-6 in M masseter. These findings can provide a basis of the complete grass-fed beef production system, furthermore, the presence of lipid droplets in ID muscle fiber type, the interaction of Myostatin and IL-6 may become a new factor for the shift of fiber type.

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：家畜生産システム 赤身牛肉生産 日本短角種 放牧 筋線維型

### 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。北里大学八雲牧場では6ヶ月間の自然哺乳と放牧、自給粗飼料給与のみでの肉牛生産を実践している。この生産方式では放牧と粗飼料での飼養となるが、生体重が30ヶ月齢で約700kgに達する。哺乳期の飼養管理や増体成績は育成および肥育期の増体成績に影響を及ぼす。

(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)炎症性サイトカインであるIL-6は骨格筋細胞からも分泌され、オークライン的に骨格筋の肥大を調整することが報告されている。

(4)我々は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、CLAが増加する放牧飼養では腹鋸筋において、筋線維が肥大することを明らかにしている。

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IL-6の相互作用(クロストーク作用)により赤肉生産を増強させる可能性を示唆する。しかしながら、放牧・粗飼料を主体とした赤肉生産ではこれらの知見は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、哺乳期の日本短角種に着目し、下記の点を明らかにする。

6ヶ月間の自然哺乳と放牧および自給粗飼料のみで生産した日本短角種牛において

- (1) 増体成績、採食量および哺乳量、血液性状
- (2) 第一胃乳頭突起の形態学的解析
- (3) 骨格筋組織における筋線維型構成割合およびミオスタチンおよびIL-6 mRNAの発現解析
- (4) 筋管に分化可能な筋芽細胞樹立法の確立

以上より、6ヶ月間自然哺乳された日本短角種の特徴と骨格筋細胞に対するCLAを介したミオスタチンとIL-6の影響が明らかとなる。

### 3. 研究の方法

(1) 放牧期(5月:放牧生)および舎飼期(12月:舎飼生)に出生した日本短角種(N:各3頭)を供試牛とした。供試牛は出生を0日とし、出生後から3、14、30、60、90、120、150、180日目に血清を採取し、血液性状(NEFA, TG, T-CHO, BUN, Glucose)を測定した。また、体重測定を行い、増体成績を比較した。

(2)上記供試牛を6ヶ月間の哺乳期間が終了後、と畜・解剖し、6ヶ月哺乳がルーメン発達に与える影響を明らかにするため、第一胃を噴門部、第一・二胃溝、筋柱筋部、背囊に分け、各部位の乳頭突起の長さおよび幅、密度を計測した。

(3)分別可能な限りの骨格筋組織に分け(44種類)、凍結包埋後、クレオスタットにより薄切し、免疫組織学的および酵素組織化学的染色を行った。得られた染色像より、筋線維型構成割合を算出した。

(4)上記から採取した骨格筋から、咬筋、最長筋、腹鋸筋、三角筋、半膜様筋、半腱様筋、大腿二頭筋において、リアルタイムPCR法でmyostatin, IL-6, slow-myosin, fast(2A&2X)-myosinの発現を解析した。

(5)10ヶ月齢の日本短角種最長筋からの組織片を採取して、筋管細胞への分化可能な筋芽細胞樹立を試みた。

### 4. 研究成果

哺乳期全期間(0~6ヶ月齢)の日増体量は放牧生および舎飼生でそれぞれ1.04±0.04、1.02±0.08kg/日であり、両区に差は見られなかった。哺乳期前期(0~3ヶ月齢)の日増体量では放牧生および舎飼生でそれぞれ1.12±0.1、0.79±0.1kg/日であり、体重は1~4ヶ月で放牧生が有意に高かった(p<0.05)(図1)。哺乳期の日本短角種における乾物摂取量は0~2ヶ月齢、2~4ヶ月齢で有意に増加した。(図2A)。給与飼料の成分はRBSおよび青草でそ

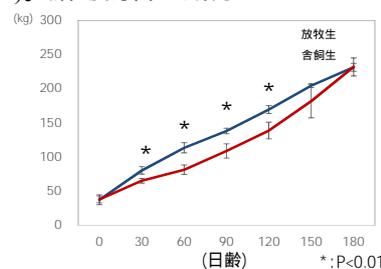


図1. 6ヶ月間自然哺乳した日本短角種の増体成績

れぞれ、水分で37.1±11.2、80.3±4.2%、以下全て乾物中の成分値であり、TDNで57.3±4.3、64.9±3.3、CPで15.0±4.7、19.5±5.0%、ADFで37.8±4.4、34.1±5.5%、NDFで60.9±6.2、48.9±7.5%、NFCで21.1±3.0、26.0±3.9%、粗脂肪で2.4±0.8、3.3±0.9、灰分で7.0±1.4、8.2±1.1%、ADLで6.2±1.1、3.4±0.8%、NDICPで6.5±1.9、30.5±3.4%、Oaで3.2±1.4、5.4±5.5%、Obで59.0±7.6、43.5±6.3%、Caで0.96±0.4、0.89±0.44%、Pで0.29±0.1、0.34±0.07%、Mgで0.34±0.1、0.31±0.08%、Kはで1.39±0.6、2.14±0.13%であった。TDNおよびCPは給与

飼料の栄養価の指標となる値であるため、図2Bに示した。

4ヶ月齢以降では有意な差は認められず、哺乳量は3ヶ月齢移行、徐々に減少した(図2C)。

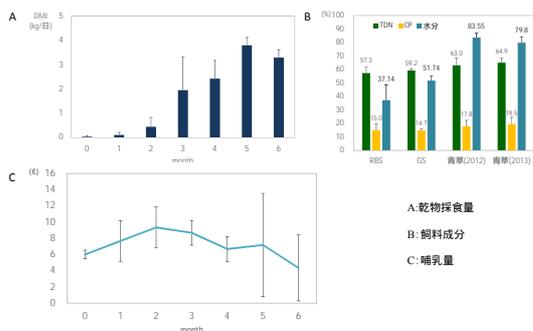


図2. 6ヶ月間の自然哺乳下での採食量および飼料成分、哺乳量の推移

血液成分では、BUNで放牧生が高い傾向があり、また、両区で哺乳期を通じた変動が大きかった(図3A)。Gluは両区に差は認められず、30日齢を最大として徐々に減少した(図3B)。TGは哺乳期を通して放牧生で高い傾向があったが、有意な差は認められなかった(図3C)。NEFAに両区で差はなく、哺乳期を通して一定であった(図3D)。T-CHOは両区に差は見られず、月齢依存的に増加した(図3E)。

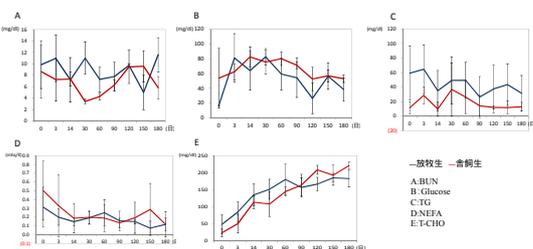


図3. 哺乳期の日本短角種の血液成分の変動

第一胃乳頭突起の長径は、放牧生および舎飼生でそれぞれ、噴門部で $4.7 \pm 1.1$ 、 $4.7 \pm 1.3$ mm、背囊で $2.6 \pm 1.1$ 、 $3.2 \pm 1.1$ mm、筋柱近部で $2.7 \pm 0.9$ 、 $2.9 \pm 0.7$ mm、第一・二胃溝で $4.5 \pm 1.4$ 、 $3.4 \pm 1.3$ mmで、短径では、放牧生および舎飼生でそれぞれ、噴門部で $1.4 \pm 0.4$ 、 $1.4 \pm 0.4$ mm、背囊で $1.3 \pm 0.5$ 、 $1.6 \pm 0.4$ mm、筋柱近部で $1.2 \pm 0.3$ 、 $1.6 \pm 0.4$ mm、第一・二胃溝で $1.5 \pm 0.5$ 、 $1.7 \pm 0.4$ mmで(表1)、密度では、放牧生および舎飼生でそれぞれ噴門部が $56 \pm 18$ 、 $81 \pm 8$ 枚/cm<sup>2</sup>、背囊が $63 \pm 15$ 、 $59 \pm 15$ 枚/cm<sup>2</sup>、筋柱近部が $72 \pm 13$ 、 $74 \pm 16$ 枚/cm<sup>2</sup>、第一・二胃溝が $65 \pm 15$ 、 $59 \pm 15$ 枚/cm<sup>2</sup>であった。全ての測定項目において両区および部位間に有意な差は認められなかった。

6ヶ月間自然哺乳した日本短角種の腹鋸筋、最長筋、三角筋、大腿二頭筋、半腱様筋、半膜様筋、咬筋の筋線維型構成割合を図4に示した。今回測定した骨格筋では放牧生および舎飼生の筋線維型構成割合に有意な差はなかったが、腹鋸筋、三角筋、大腿二頭筋、咬

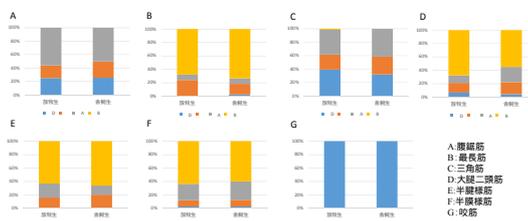


図4. 6ヶ月間自然哺乳した日本短角種の筋線維型構成

筋で脂肪酸代謝およびケトン体代謝に関わる3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(3-HBD)の発現が高いD型筋線維の存在が認められた。さらに3-HBD染色と脂肪滴を染色するoil red O染色を連続切片で行ったところ、筋線維内に染色される小型脂肪滴は3-HBDの染色像と完全に一致した(図5)。

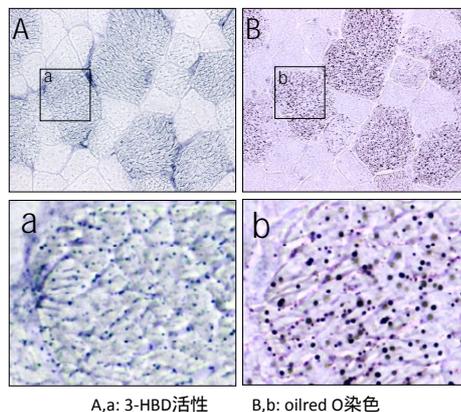


図5. D型筋線維内における小型脂肪滴の局在

リアルタイムPCR法で咬筋、最長筋、腹鋸筋、三角筋、半腱様筋、半膜様筋、大腿二頭筋におけるミオスタチン(図6A)とIL-6(図6B)のmRNAの発現解析を行ったところ、放牧生および舎飼生の各骨格筋組織で両遺伝子とも発現の差異が認められた。ミオスタチンの発現は咬筋では著しく低く、その他の骨格筋では一様に発現が認められたが、放牧生で高い傾向であった。一方、IL-6の発現は咬筋で高く、その他の筋線維では低かった。

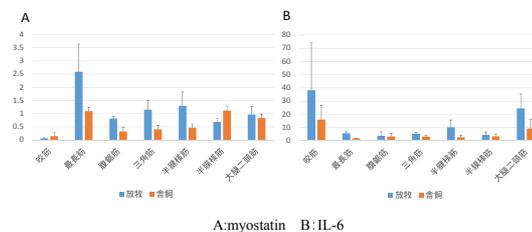
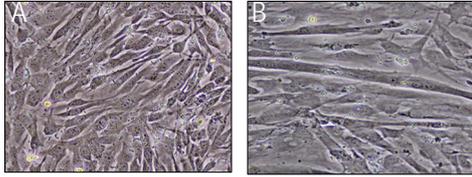


図6. 各骨格筋におけるmyostatinおよびIL-6 mRNAの発現

10ヶ月齢の日本短角種のも最長筋から筋芽細胞を採取し、筋管細胞に分化させることに成功した。今後、培養筋芽細胞を用いて、筋管細胞分化時の筋特異的遺伝子発現の変動、ならびにIL-6の発現解析を行うことが可能となった(図7)。



A:筋芽細胞 B:筋管細胞

図7. 日本短角種最長筋由来の培養筋細胞

本研究より放牧など自給粗飼料のみで生産される哺乳期の採食量および哺乳量、増体成績、血液性状、第一胃の発達、筋線維型構成割合が明らかとなった。慣行的な飼養管理と比較すると6ヶ月間の哺乳期間は長く、固形飼料の摂取が制限されることから、第一胃の発達不足が懸念されるが、6ヶ月間の自然哺乳でも第一胃発達に十分な固形飼料を採食することが明らかとなり、また、増体成績も慣行飼養牛と変わらない増体量を得ること、放牧飼養で初期成長が助長されることも明らかとなった。さらに筋線維型構成割合では、持続的運動に関わる骨格筋でD型筋線維の構成割合が高く、その筋線維は小型の脂肪滴を含有することが明らかとなった。各骨格筋でミオスタチンとIL-6の発現解析を行ったところ、ミオスタチンの発現は放牧生で高く、IL-6では両区に明確な差は見られなかった。全てD型筋線維で構成される特殊な骨格筋である咬筋(出生直後ではD型は認められず、および型筋線維が混在)でミオスタチンが低く、IL-6が高いことから、両者のクロストーク作用が存在し、出生後の特殊な筋線維型移行に影響する可能性が示唆された。しかしながら、本研究では咬筋以外の骨格筋で両因子の明確な相互作用は認められなかったことから、今後は*in vitro*または初期成長時における骨格筋形成過程でのさらなる解析が必要である。

## 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 1 件)

1. 畔柳正,小野泰,松本英典,久保田博昭,山田拓司,庄司勝義,折目愛,小笠原英毅,寶示戸雅之. 自給粗飼料型肥育雌牛を利用した子牛生産における哺乳方法および哺乳期間の違いによる生産子牛の発育と購入飼料費の比較.肉用牛研究会報.2013.94.4-8.

[学会発表](計 11 件)

1. 小笠原英毅,岡田海渡,小林美里,鈴木由美子,渡邊康一,麻生久,寶示戸雅之. 肉用牛における放牧行動量が筋線維型移行に及ぼす影響. 第116回日本畜産学会.2013.3.28.安田女子大学(広島県)
2. 小林美里,小笠原英毅,岡田海渡,小野泰,折目愛,畔柳正,寶示戸雅之. 放牧地分娩で

出生した日本短角種の増体成績と消化管構造. 第116回日本畜産学会.2013.3.28.安田女子大学(広島県)

3. 岡田海渡,小笠原英毅,小林美里,庄司勝義,山田拓司,久保田博昭,畔柳正,寶示戸雅之. 放牧地分娩で出生した日本短角種の骨格筋特性. 第116回日本畜産学会.2013.3.28.安田女子大学(広島県)
4. 寶示戸雅之,足立陽子,小野泰,小笠原英毅,畔柳正. 有機的管理の二宮姿勢さん牧場における窒素フロー. 2013年度日本草地学会山形大会.2013.3.25.山形大学(山形県)
5. 小笠原英毅,岡田海渡,小林美里,渡邊康一,麻生久,寶示戸雅之. 放牧飼養が日本短角種の枝肉成績と筋線維型構成割合に及ぼす影響. 第117回日本畜産学会.2013.9.9.新潟大学(新潟県)
6. 岡田海渡,小笠原英毅,小林美里,佐藤真毅,庄司勝義,畔柳正,寶示戸雅之. 6ヶ月自然哺乳した日本短角種における筋線維型構成割合. 第117回日本畜産学会.2013.9.9.新潟大学(新潟県)
7. 小林美里,小笠原英毅,岡田海渡,小野泰,山田拓司,折目愛,寶示戸雅之. 6ヶ月自然哺乳した日本短角種の増体成績と消化管構造. 第117回日本畜産学会.2013.9.9.新潟大学(新潟県)
8. 寶示戸雅之,足立陽子,小野泰,小笠原英毅,畔柳正. 無化学肥料で管理した肉牛牧場における窒素フロー. 日本土壤肥料学会名古屋大会.2013.9.13.名古屋大学(愛知県)
9. 小笠原英毅,岡田海渡,小林美里,小路晶子,渡邊康一,麻生久,寶示戸雅之. 成長および飼養管理の違いが日本短角種の筋線維型構成割合に与える影響. 第118回日本畜産学会.2014.3.29.エポカルつくば(茨城県)
10. 小林美里,小笠原英毅,小野泰,折目愛,山田拓司,庄司勝義,佐藤真毅,松本英典,小路晶子,成田卓美,室谷進,寶示戸雅之. 北里八雲方式における哺乳期の日本短角種の増体特性. 第118回日本畜産学会.2014.3.29.エポカルつくば(茨城県)
11. 小笠原英毅,畔柳正,寶示戸雅之. 北里大学における自給飼料100%による牛肉生産と加工・販売の取り組み~北里大学発・北里八雲牛ここにあり!!~. 第118回日本畜産学会90周年記念シンポジウム.2014.3.29.エポカルつくば(茨城県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔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