

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292163

研究課題名(和文) 脂肪代謝関連遺伝子変異に基づいて選抜した日本黒毛和種牛の肥育と評価

研究課題名(英文) Fattening and evaluation of Japan Japanese Black Cattle selected on the basis of the fat metabolism-related gene mutation

研究代表者

加藤 和雄 (KATOH, 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) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではウシ成長ホルモン(bGH)の一塩基多型による脂質蓄積の特徴を明らかにし、肥育評価に用いることである。(1)GH遺伝子多型がSCD-1を調節し、筋肉内の脂肪酸組成に占めるオレイン酸の割合を変化させた。(2)GH遺伝子型の違いによりGH刺激に対する反応性が異なった。(3)インスリンは下垂体前葉に直接作用しGHの分泌を抑制する作用を有するが、生体では急激な血糖値の低下に伴うストレスやNEFA濃度の変化によりGH分泌が増加した。以上のことから黒毛和種牛の成長ホルモン多型によりインスリンなどの内分泌反応がことなり、体内の脂肪蓄積の変化により産肉性に影響を与えられられる。

研究成果の概要(英文)：This study was to conduct the fattening evaluation by characterizing the fat accumulation and endocrine regulation in single nucleotide polymorphism of bovine growth hormone (bGH). (1) GH gene polymorphism changed the oleic acid composition in the intramuscular fat by regulating the SCD-1. (2) Response to GH stimulation was different depending on the GH genotype. (3) Insulin has an action to suppress the secretion of GH acts directly on the anterior pituitary, GH secretion is increased by changes in stress and NEFA concentrations caused by the sharp reduction in blood glucose levels in vivo. These results indicate that endocrine regulations such as insulin may different by GH polymorphism of Japanese Black Cattle, affecting the meat quality and production due to changes in fat accumulation.

研究分野：動物生理学

キーワード：黒毛和種牛 脂肪蓄積 成長ホルモン 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 安全で、効率的で良質な食肉の生産性向上技術開発を目的として、家畜の成長・脂肪蓄積・乳腺の発育や泌乳にとって不可欠な役割を担う成長ホルモン(GH)の分泌調節機構や脂肪蓄積機構について研究を行ってきた。その結果、19番目の染色体上に存在するGH遺伝子に、複数の突然変異(一塩基多型:SNP)が存在し、黒毛和種牛においては合計3種類の対立遺伝子(A、B、C)が存在することを報告した。その中でも、C型遺伝子は日本黒毛和種牛に特異的で、体型は小さいものの、筋肉内の不飽和脂肪酸比率が高いことを発見し報告した。

(2) C型の効果が生じる原因については、以下のような仮説を立てて検証する。GH遺伝子発現量を調節するプロモーター領域に変異が存在する、最近行ったGH分子の3次元解析では、C型GH分子の内側がA型より狭く、GH分子と受容体との結合が悪い。したがって、C型GHの作用効果が小さいため、不飽和脂肪酸を合成する酵素(SCD-1)や脂肪分子を長くする酵素(FASNやELOVL-6)活性が高く保持される。

(3) 日本黒毛和種牛肉の旨味成分を呈するオレイン酸を豊富にする遺伝子を3種類(GH、SCD、FASN)特定したこれまでの研究成果を背景に、実際に3種類の遺伝子を揃えた牛を肥育し、生産性や肉質などの評価以外にも遺伝子選抜牛肥育による環境への負荷を総合的に判断することにより、遺伝子選抜法に基づいた生産システムを採用することの生物的・社会的・経済的意義を総合的に判断する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これらの現状を背景として、今までの研究成果に基づき、以下の通りである。

(1) ウシ成長ホルモン(bGH)は191のアミノ酸からなり2カ所の一塩基多型(SNP)によりアリルA、B、Cが存在することが知られている。これまで本研究室ではGH遺伝子多型によって血中GH濃度やGHRH投与後のGH放出量、脂肪酸組成、脂肪蓄積が異なることを報告している。本研究ではC18:1(オレイン酸)に着目してGH遺伝子多型が脂肪酸組成に及ぼす影響を検討した。また、ウシ脂肪細胞においてbGHが脂質分解に及ぼす影響について検討した。

(2) ウシ成長ホルモン(GH)には2カ所の一塩基多型(SNP)が存在し、アリルA、B、C型に区別される。当グループではGH遺伝子多型により黒毛和種牛において脂肪蓄積量や不飽和脂肪酸含量が異なることを報告しているが、その生理的なメカニズムは未解明である。本研究では、AA型およびCC型動物の脂肪細胞をA型およびC型GHにより刺激し、遺伝子型の異なるGHタンパク質の生理作用の違いと、各遺伝子型の動物の脂質代謝

の特徴を解明することを目的とした。

(3) 反芻動物の採食に伴う成長ホルモン分泌抑制に関する研究

反芻動物では採食に伴い成長ホルモン(GH)の分泌が抑制される。また、発表者らは、高インスリン状態を維持したグルコースランブ下で、採食時と同様に血中GH濃度が低下することを報告している。従って本研究では、採食後のGHの分泌抑制にインスリンが関与する可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 黒毛和種牛におけるGH遺伝子多型と脂質代謝関連酵素発現調節

宮城県で肥育された黒毛和種牛の筋組織からゲノムDNAを抽出しGH多型をシーケンス解析で決定した。また筋肉内脂肪の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。統計解析はSASを用いて最小二乗分散分析を行った。また、横隔膜からはtotal RNAを抽出し、モノ不飽和脂肪酸を合成する酵素であるSCD1 mRNAの発現量を調査した。

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 5×10^{-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 2×10^{-11} M添加)により分化誘導を行った。分化誘導後12日目に分化した脂肪細胞にbGHを100と1000ng/ml添加し、24時間後にmRNAを抽出、脂質代謝関連遺伝子(FASN、SCD-1、SREBP-1)のReal-Time PCR法による発現解析を行った。

(2) GH多型による黒毛和種牛の脂肪細胞の生理的特徴

AA型およびCC型黒毛和種牛から脂肪前駆細胞を単離し、培養・分化誘導した。分化した成熟脂肪細胞を、作製したA型またはC型のGHにより24時間刺激し、qRT-PCR法により脂質代謝関連酵素の遺伝子発現量を測定した。

(3) 反芻動物の採食に伴う成長ホルモン分泌抑制に関する研究

シバヤギ5頭を用いインスリン(0.2 IU/kgBW)を頸静脈カテーテルより投与し、投与前30分から投与後180分まで15回採血を行った。同様に頸静脈カテーテルよりグルコース(1.0 mmol/kgBW)を投与し、投与前60分から投与後120分まで13回採血を行った。ホルスタイン種牛から下垂体前葉を摘出しDMEMでスライス培養を2日間行った後、インスリン及びグルコース添加実験を行いGH分泌への影響を検討した。グルコース、

NEFA、GH、インスリン濃度は比色定量法及びRIA法で測定した。

4. 研究成果

(1) 黒毛和種牛における GH 遺伝子多型と脂質代謝関連酵素発現調節

今回用いたサンプルでは遺伝子型頻度は AA 型 12%、AB 型 31%、AC 型 18%、BB 型 19%、BC 型 18%、CC 型 4%であった。CC 型が最も脂肪酸組成に占める C18:1 の割合が高く、SCD1 mRNA の発現量も高かった。また AA 型が最も C18:1 の割合が低く、SCD-1 mRNA の発現量も低かった。

本研究で用いた前駆脂肪細胞は分化誘導後、細胞への脂肪蓄積が見られ、Oil red-o 染色により脂肪細胞への分化が確認された。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。以上の結果から GH 遺伝子多型が SCD-1 を調節し、筋肉内の脂肪酸組成に占めるオレイン酸の割合を変化させている可能性が示唆された。

(2) GH 多型による黒毛和種牛の脂肪細胞の生理的特徴

作製した組み換え GH タンパク質刺激は ERK リン酸化を誘導し、生理活性を有することが示された。脂肪細胞を A 型および C 型の GH により刺激すると、AA 型細胞では SCD と PPAR の遺伝子発現量が減少した。また、A 型と C 型 GH の遺伝子発現に対する作用に差は見られなかった。一方、CC 型細胞では GH 刺激に対して遺伝子発現変動は見られなかった。本研究により、動物の GH 遺伝子型の違いにより GH 刺激に対する反応性が異なることが示唆された。

(3) 反芻動物の採食に伴う成長ホルモン分泌抑制に関する研究

インスリン投与では GH 濃度は一時的に増加しその後減少した。グルコース投与では GH 濃度が増加する傾向が見られた。下垂体前葉スライスへのインスリン添加では GH 分泌は濃度依存的に減少した。以上の結果から、インスリンは下垂体前葉に直接作用し GH の分泌を抑制する作用を有するが、生体では急激な血糖値の低下に伴うストレスや NEFA 濃度の変化により GH 分泌が増加した可能性があると考えられた。

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 7 件)

Komatsu T, Higashiyama Y, Fukasawa M, Katoh K, and Oshibe A, *Physiological*

changes during feeding and rumination in cows. *Animal Science Journal*、査読有、85(3)、2014、271-276
DOI: 10.1111/asj.12117

Sugita H, Ardiyanti A, Yokota S, Yonekura S, Hirayama H, Shoji N, Yamauchi E, Suzuki K, Katoh K, Roh SG, 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*、査読有、165、2014、15-21
DOI:10.1016/j.livsci.2014.04.026

Tachi N, Tanaka S, Ardiyanti A, Katoh K, Sato S、Bovine growth hormone gene polymorphism affects stress response in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*、査読有、85(6)、2014、722-728
DOI: 10.1111/asj.12212.

Takahashi T, Sato K, Kato S, Yonezawa T, Kobayashi Y, Ohtani Y, Owada S, Aso H, Yamaguchi T, Roh SG, Katoh K、Increased plasma ghrelin suppresses insulin release in wethers fed with a high protein diet、査読有、*J Endocrinology*、221(3)、2013、371-380
DOI: 10.1530/JOE-13-0501

Bahrami 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(12)、2013、802-804
DOI: 10.1111/asj.12132

Yonekura S, Tokutake Y, Hirota S, Rose MT, Katoh K, Aso H、Proliferating bovine intramuscular preadipocyte cells synthesize leptin. *Domest Anim Endocrinol*. 査読有、45(1)、2013、33-37
DOI: 10.1016/j.domaniend.2013

Bahrami A, Behzadi SH, Miraei-Ashtiani SR, 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. 査読有、*Gene* 527(1)、2013、397-404
DOI: 10.1016/j.gene.2013.05.066.

〔学会発表〕(計 4 件)

鈴木 裕、谷田 奈々子、加藤 大地、
村井 篤嗣、平山 琢二、加藤 和雄、
盧 尚建 GH 多型による黒毛和種牛の脂
肪細胞の生理的特徴、講演要旨集 P.197 .
日本畜産学会第 121 回大会(日本獣医生
命科学大学、東京、2016 年 3 月 27 日 ~
30 日)

小林 諒子、D. W. Harjanti、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 . 講演要旨集 P.122 . 日本畜産学会
第 117 回大会(新潟大学、新潟、2013 年
9 月 9 日 ~ 10 日)

佐々木 智子、小林 諒子、原田 剛之、
大谷 喜永、増子 孝則、平山 琢二、
萩野 顕彦、盧 尚建、加藤 和雄 . 哺
乳仔ウシへの甘草給与による代謝・内分
泌の調節機能 . 講演要旨集 P.122 . 日本
畜産学会第 117 回大会(新潟大学、新潟、
2013 年 9 月 9 日 ~ 10 日)

Kobayashi, R., Harjanti, D.W., Sano,
H., Hirayama, T., Katoh, K. and Roh,
S.G. Effects of GH SNPs on endocrine
status and glucose metabolism in
Japanese Black calves. Book of
Abstracts of The 64th Annual Meeting of
the European Association for Animal
Production No.19: P440 (Nantes, French,
2013, August 26-30)

〔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・教授
研究者番号：60091831

(2)研究分担者

平山 琢二 (HIRAYAMA, Takujie)
滋賀県立大学・環境科学部・准教授
研究者番号：00274887

盧 尚建 (ROH, Sanggun)
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

()

研究者番号：