

## 肉用鶏の筋芽細胞を用いた食肉の特性評価に資する 遺伝子の探索

Exploration of the genes to assess meat characteristics using skeletal  
muscle myoblasts from meat-type chickens

高 谷 智 英・鏡 味 裕  
(信州大学農学部)

Tomohide Takaya and Hiroshi Kagami  
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

Skeletal muscle tissues of broiler chickens rapidly develop and grow compared with those of layer chickens. Myoblasts which are myogenic progenitor cells play central roles during muscle development and growth, suggesting that the cell characteristics of broiler myoblasts are critically important for meat production. Thus identification of the genes which are specifically expressed in broiler myoblasts will be useful as genetical markers for selective breeding, improving feed efficiency, and quality evaluation of the meat. In this study, we compared cell growth, myogenic differentiation, and gene expression of the primary-cultured myoblasts between UK Chunky (UKC) as broiler chicken and White Leghorn (WL) as layer chicken. In growth medium, the numbers of UKC myoblasts were significantly larger than WL myoblasts after 48 h of culture. And the ratio of proliferating EdU-positive cells were significantly higher in UKC myoblasts than WL myoblasts. In differentiation medium, the ratio of myosin heavy chain-positive myocytes and myotubes were significantly higher in UKC myoblasts than WL myoblasts. These results clearly indicated that UKC myoblasts possess remarkable capabilities of cell proliferation and myogenic differentiation compared with WL myoblasts. It suggests that such cell characteristics of UKC myoblasts actively contribute to the well-developed skeletal muscle of broiler chickens. To explore the genes specifically expressed in broiler myoblasts, comprehensive gene expression patterns of UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiating condition were analyzed by RNA sequencing. We successfully identified the genes differentially expressed between UKC and WL myoblasts; 640 genes at day 0, 608 genes at day 1, 677 genes at day 2. Notably, expression patterns of 336 genes were consistently different throughout differentiation process. Functional analyses of these gene products will elucidate the mechanism how broiler myoblasts actively proliferate and differentiate.

## 1. 目 的

近年、特に開発途上国では、人口増加に加えて一人当たりの食肉消費量が著増しており、世界的な食肉需要が高まっている。肉用鶏の飼料効率(0.5)は、肥育豚(0.3)や肥育牛(0.1)と比較して非常に高い。徹底した育種改良により、過去50年間で肉用鶏の成長率は1日25 gから100 gに上昇した。安価で良質なタンパク質であり、宗教的な禁忌も少ない鶏肉は、過去40年で最も高い生産量増加率を示している。日本国内の鶏肉生産量も、消費者の国産志向などを反映して増加傾向で推移している。ところが、日本で市販されている鶏肉の約98%はブロイラーであり、その原種鶏はほぼ100%を輸入に依存している。鶏肉の安定供給という点で我が国は危機的状況にあり、有用な国産鶏(地鶏)の開発が喫緊の課題である。

加えて、先進諸国では、健康意識の高まりと嗜好の多様化から、高付加価値の鶏肉が求められている。地鶏はその代表例であり、多彩な品質を謳う様々な品種が提供されている。しかし、これらの鶏肉=鶏骨格筋の遺伝的な特性を厳密に評価する方法は確立されていない。筋肉組織の特性は、飼料・飼育環境・個体の生育段階による後天的な影響を受けるため、各品種に固有な特性を明確に抽出するのは困難である。

そこで本研究では、骨格筋の前駆細胞である筋芽細胞に着目した。筋芽細胞は細胞分裂によって増殖した後、筋細胞へと分化する。分化した筋細胞は互いに融合して多くの筋管を形成し、筋管がさらに成長・融合して骨格筋線維が形成される。したがって、筋形成において中心的な役割を果たす筋芽細胞の遺伝子発現パターンは、鶏肉の特性と密接な関係があると考えられる。

本研究では、肉用鶏と卵用鶏から採取した筋芽細胞を用い、肉用鶏で特徴的に発現する遺伝子を

探索したので、その結果を報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 鶏筋芽細胞の初代培養と筋分化誘導

鶏筋芽細胞の採取、初代培養、および筋分化誘導は、高谷らの方法を用いた<sup>1)</sup>。肉用鶏としてUK Chunky種(UKC)、卵用鶏としてWhite Leghorn種(WL)を用いた。孵卵器で培養した鶏の10日胚の後脚の骨格筋組織を摘出し、コラーゲナーゼ処理によって分散させた筋芽細胞を、コラーゲン処理した培養皿に播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。増殖中の未分化な筋芽細胞は、増殖培地(RPMI1640培地、20%牛胎児血清、1%非必須アミノ酸、1%鶏胚抽出物、2 ng/ml塩基性線維芽細胞成長因子)で培養した。増殖培地で培養中の筋芽細胞を分化0日目と定義した。2.0×10<sup>5</sup>個の筋芽細胞を、コラーゲン処理した30 mm径の培養皿に播種し、分化培地(DMEM培地、2%牛胎児血清)で培養することで筋分化を誘導した。

### 2.2 細胞組織化学染色

DAPI染色により筋芽細胞の核を染色した。骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン重鎖の染色は以下の方法で行った。筋芽細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton溶液で透過処理した後、マウスモノクローナル抗ミオシン重鎖(MHC)抗体(MF20)で蛍光免疫染色した。ミオシン重鎖陽生細胞の核の数を、すべての核の数で除した値を、ミオシン重鎖陽性細胞率として計測し、筋分化の指標とした。

筋芽細胞の増殖は、チミジンのアナログであるEdUの取り込みによって評価した。10 μMのEdUで3時間処理した筋芽細胞をClick-iT EdU Alexa Fluor Imaging Kit (Thermo)で染色し、EdU陽性細胞率を計測した。

### 2.3 RT-PCR

Trizolを用いて筋芽細胞のRNAを回収した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mixを用いて、RNAを逆転写し、cDNAを合成した。GoTaq qPCR Master Mix (Promega)を用いて、定量的PCRを行った。PCR反応にはStepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色によって検出した。

### 2.4 RNAシーケンス

筋芽細胞で発現する遺伝子を網羅的に定量するため、RNAシーケンスを行った。RNAシーケンスは、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターとの共同研究で行った。分化0, 1, 2日目の筋芽細胞からRNAを精製し、Illumina TruSeq RNA Library Prep kit v2を用いてシーケンスライブラリを調整した。Illumina HiSeq 2500を用いて、シングルリードで100塩基のシーケンス反応を行った。シーケンスによって得られた配列を、Gallus\_gallus-5.0 Assembly (Genebank assembly accession: GCA\_000002315.4)にマッピングし、遺伝子を同定した。このとき、1塩基の不一致を許容した。Trimmed mean of M values正規化によってシーケンスのリード数を正規化し、発現量を算出した。発現量が2倍以上 ( $p < 0.05$ ) 変動している遺伝子を抽出し、解析を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞の増殖・分化能の比較

肉用鶏UKCと卵用鶏WLの筋芽細胞を増殖培地で培養し、24時間ごとの細胞数を計測した。培養48時間後には、UKC筋芽細胞の数はWL筋芽細胞の1.7倍 ( $p < 0.05$ ) に達し、96時間後に至るまで、UKC筋芽細胞数はWL筋芽細胞を有意に上回った

(Fig. 1)。また、細胞分裂に伴うゲノムDNAの複製の指標であるEdU陽性率は、UKC筋芽細胞で49%であり、WL筋芽細胞の35%を有意に上回った (Fig. 2)。これらの結果から、UKC筋芽細胞はWL筋芽細胞と比較して活発に細胞分裂をし、増殖することが明らかになった。

次に、分化培地でUKC筋芽細胞とWL筋芽細胞の筋分化を誘導し、24時間ごとに、骨格筋の最終分化マーカーであるMHCの免疫染色を行った (Fig. 3)。分化誘導1日目および2日目において、

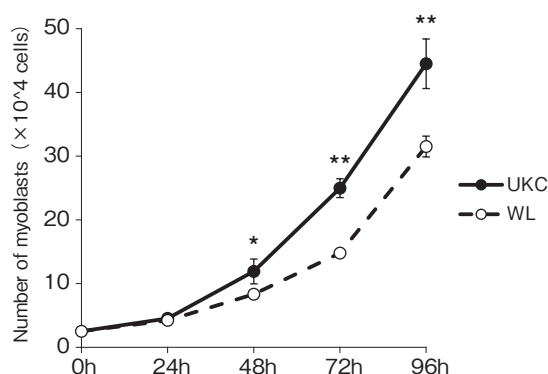


Fig. 1

Number of UKC and WL myoblasts cultured in growth medium. Graphs represent mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .  $n = 3$ .

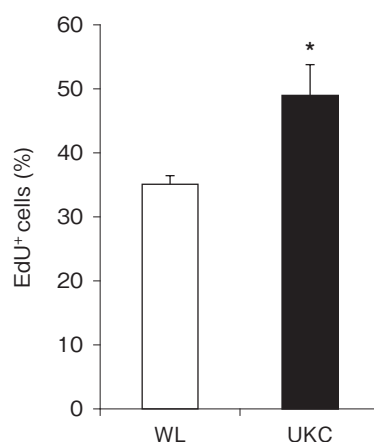


Fig. 2

Ratio of EdU-positive UKC and WL myoblasts cultured in growth medium. Graphs represent mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .  $n = 4$ .

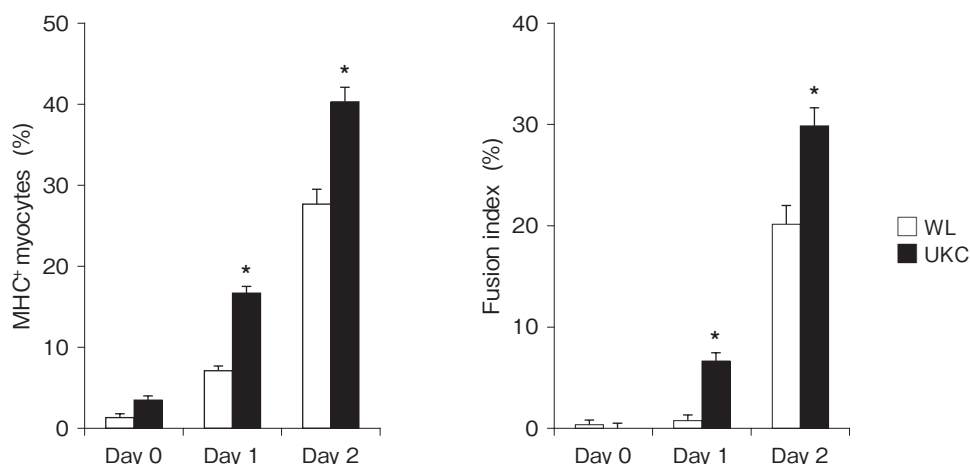


Fig. 3

Ratio of MHC-positive myocytes (left panel) and fused myotubes (right panel) derived from UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiation medium. Graphs represent mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ ,  $n = 4$ .

UKC筋芽細胞のMHC陽性率はWL筋芽細胞を有意に上回った。また、成熟した多核の筋管の割合を示す細胞融合率も同様に、分化誘導1日目および2日目において、UKC筋芽細胞で有意に高い値を示した。これらの結果から、UKC筋芽細胞はWL筋芽細胞と比較して高い筋分化能を示すことが分かった。

以上のことから、WL筋芽細胞と比較して、UKC筋芽細胞は活発な細胞分裂によって急速に増殖した後、速やかに成熟した筋管に分化することが明らかとなった。このようなUKC筋芽細胞の性質が、卵用鶏の2-3倍の速度で成長する肉用鶏の骨格筋線維の形成に貢献していることが強く示唆された。

### 3.2 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞におけるToll様受容体遺伝子群の発現の比較

我々はこれまで、UKC筋芽細胞とWL筋芽細胞で、筋芽細胞特異的に発現する転写因子群(*PAX3*, *PAX7*, *MYF5*, *MYOD1*, *MYOG*など)やミオシン軽鎖および重鎖(*MYL1*, *MYL3*, *MYH1*, *MYH7B*)の遺伝子発現を比較してきた。

本研究では、多様な外来因子を認識して免疫反応を誘導するToll様受容体(Toll-like receptor; TLR)遺伝子群の発現を解析した。鶏には10種類のTLR遺伝子(*TLR1A*, *TLR1B*, *TLR2A*, *TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *TLR21*)が存在する<sup>2)</sup>。RT-PCRの結果(Fig. 4), WL筋芽細胞ではすべてのTLR遺伝子が発現しているが、UKC筋芽細胞では*TLR1A*の発現は検出されなかった。免疫細胞を多数含む脾臓組織からRNAを抽出し、同様のRT-PCRを行った結果、UKCおよびWLの両方の脾臓ですべてのTLR遺伝子が発現していることを認めた。このことから、*TLR1A*遺伝子は、UKC筋芽細胞でのみ特異的に発現が抑制されていることが明らかになった。

近年、肉用鶏では、過剰に発達した筋組織内で生じる炎症が大きな問題となっている<sup>3)</sup>。この炎症の原因には諸説あるが、発症機序の詳細は不明である。TLRは細胞内にシグナルを伝達することで、インターロイキンなどの炎症性サイトカインの放出を誘導するなど、免疫疾患に深く関与す

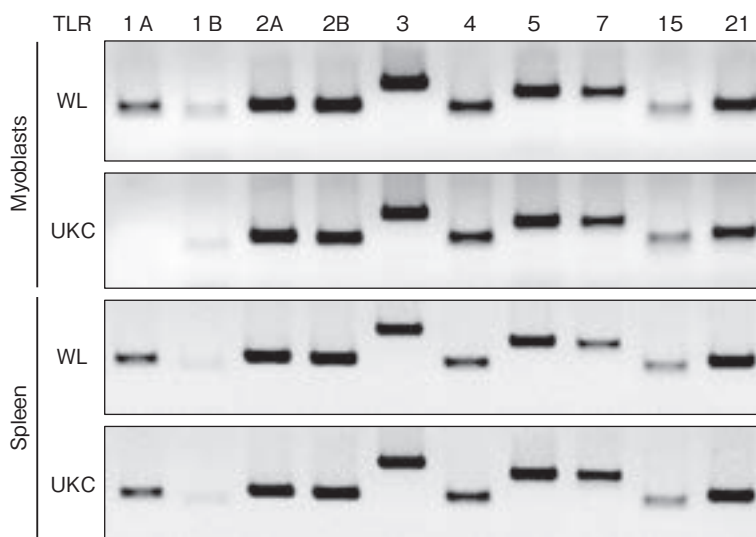


Fig. 4

Total RNAs from myoblasts and spleen of UKC and WL chickens were subjected to RT-PCR to amplify cDNAs of TLR genes. PCR products were then subjected to agarose gel electrophoresis.

る受容体である。本研究で明らかになった、UKCおよびWL筋芽細胞におけるTLR遺伝子群の発現パターンの違いが、肉用鶏の筋組織で生じる炎症と関連しているのかについて、今後の研究で明らかにしていきたい。

### 3.3 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞における遺伝子発現パターンの網羅的解析

上記の実験から、UKCとWLの筋芽細胞では増殖・分化能が明らかに異なること、UKCとWLの筋芽細胞で明確に発現パターンが異なる遺伝子が存在することが明らかになった。このような性質の相違は、UKCとWLの筋芽細胞で発現する遺伝子群によって既定されていると考えられる。これまで、肉用鶏の胸筋組織における遺伝子発現の飼料依存的な変化を網羅的に調べたDNAマイクロアレイ<sup>4)</sup>や、肉用鶏と卵用鶏の胸筋組織の遺伝子発現を調べたRNAシーケンス<sup>5, 6)</sup>の解析結果が報告されている。しかし胸筋組織は、筋線維や筋芽細胞以外にも、血管、血球、脂肪、線維など多数の細胞腫を含むサンプルであり、解析で得られ

た結果が真に骨格筋系の細胞に起因するものであるかどうかは定かではない。

そこで本研究では、UKCとWLの筋芽細胞における遺伝子発現を網羅的に比較・定量するために、RNAシーケンスを行った。分化0, 1, 2日目のUKCおよびWL筋芽細胞からRNAを精製した。分化誘導は独立して3回行い、各群 $n = 3$ とした。すべてのサンプルで、各2,000万以上のリードを取得した後、ニワトリゲノムにマッピングして遺伝子を同定し、正規化したカウント数から遺伝子発現量を算出した。

発現が変動していた遺伝子を解析した結果、UKCとWLの筋芽細胞を比較した場合、分化0日目では640個の遺伝子が、分化1日目では608個の遺伝子が、分化2日目では677個の遺伝子の発現が異なることが明らかになった (Fig. 5)。このうち336個の遺伝子は、分化過程を通じてUKCとWLの筋芽細胞で発現量が異なっており、両品種で異なる筋芽細胞の形質に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、UKCとWLの筋芽



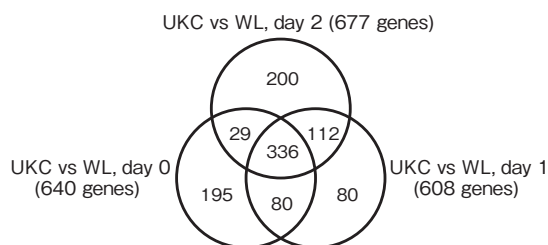


Fig. 5

Venn diagram of the number of the genes differentially expressed between UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiation condition. The genes was defined as : fold change $\geq$ 2,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

細胞でそれぞれ、分化に伴って発現が変化する遺伝子も抽出した。特に分化0日目と2日目では、UKC筋芽細胞では1,307個、WL筋芽細胞では1,204個の遺伝子の発現が変化していた。これらの遺伝子群の中には、筋分化に重要な因子が多数含まれていると推測される。これらを比較し、特にUKC筋芽細胞でのみ発現が変化する遺伝子を特定することで、UKC筋芽細胞が示す高い筋分化能力を実現している因子を特定できるのではないかと考えている。今後さらに解析を進め、UKC筋芽細胞が有する旺盛な細胞増殖・分化能の機構を解明できれば、肉用鶏の特性検定に有用な遺伝マーカーの開発、肉用鶏の品種改良、肉用鶏の飼料要求率の改善などへの貢献が期待される。

#### 4. 要 約

本研究により、肉用鶏UKCと卵用鶏WLでは、骨格筋形成で中心的な役割を果たす筋芽細胞の性質が明確に異なっていることが明らかになった。遺伝子発現解析の結果、UKCとWLの筋芽細胞では、TLR遺伝子をはじめ、多くの遺伝子群の発現パターンが異なることが分かった。肉用鶏で特異的な発現パターンを示す遺伝子群を追及することで、鶏肉の生産に資する遺伝マーカーの確立に

つながることが期待される。将来的には、地鶏などさらに多数の品種の筋芽細胞における遺伝子発現を調べることで、鶏の筋形成や鶏肉の品質に寄与する遺伝子群の立体的な理解につながると考えられる。

#### 謝 辞

RNAシーケンスに多大なるご協力を頂きました東京農業大学の浜口悠先生、小林久人先生、河野友宏先生、そして本研究の実験で中心的な役割を果たしてくれた信州大学大学院の二橋佑磨君に心より感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Takaya, T., Nihashi, Y., Kojima, S., Ono, T., Kagami, H. : Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts, *Anim Sci J*, **88**, 1880~1885, 2017.
- 2) Temperley, N. D., Berlin, S., Paton, I. R., Griffin, D. K., Burt, D. W. : Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family : a story of gene gain and gene loss, *BMC Genomics*, **9**, 62~73, 2008.
- 3) Kawasaki, T., Yoshida, T., Watanabe, T. : Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens, *J Poult Sci*, **53**, 291~297, 2016.
- 4) Kong, B. W., Song, J. J., Lee, J. Y., Hargis, B. M., Wing, T., Lassiter, K., Bottje, W. : Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes, *Poult Sci*, **90**, 2535~2547, 2011.
- 5) Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X. J., Zhu, D. : Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens, *BMC Genomics*, **10**, 87, 2009.
- 6) Kong, B. W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Cook, D., Piekarski, A., Dridi, S., Anthony, N., Bottje, W. : RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line, *BMC Genomics*, **18**, 82, 2017.