

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20161

研究課題名(和文)運動に依存しない新規骨格筋肥大メカニズムの解明

研究課題名(英文)Muscle hypertrophic mechanism without exercise using tadpole model

研究代表者

井上 菜穂子 (INOUE, Naoko)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00509515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エル幼生の尾部骨格筋を対象としたプロテオームを行い構成するタンパク質を明らかにすることができた。その結果、4000程度のタンパク質の発現を確認し、尾部骨格筋は速筋線維で構成されていることを明らかにした。一方、捕食者ストレス誘導型の骨格筋肥大時におけるタンパク質及び脂質の発現変化を解析したところ、中性脂質の蓄積やミトコンドリアタンパク質の増加が観察され、肥大に伴い骨格筋が「遅筋化」していることを示唆した。哺乳類の場合、遅筋は萎縮しにくい筋と言われ、サルコペニアの予防には遅筋を増強させることが重要であるといわれている。今後はこの遅筋化がどのようにして起こるのか、上流の制御因子の解析を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な進展として、本研究で用いた運動非依存的な捕食者ストレス誘導型骨格筋肥大は、運動による肥大システムとは異なるシステムを用いて肥大していることが明らかとなった。具体的に、運動による筋肥大では主に速筋線維が肥大することがわかっているが、今回の肥大モデルでは肥大に伴い遅筋線維が増加している様子をタンパク質及び脂質代謝物から明らかにすることができた。遅筋は筋萎縮が起こりにくく、サルコペニア予防のためには遅筋を増やすことが効果的であるといわれている。今後、如何にして筋肥大と同時に遅筋へのシフトが起こるのか、その作用因子を同定することができれば、我々の生活への応用も期待される結果が得られると考える。

研究成果の概要(英文)：We performed a proteome analysis for skeletal muscle of tadpole tail. As a result, we found about 4000 proteins, and we realized tadpole tail was mainly composed of fast fibers. On the other hand, we also demonstrated to make unique muscle hypertrophy model "Predation exposure model" and tried to find expression difference of proteins and lipids. We set control (no predation) and Yago-EX (predation exposure) and compared the difference between them. As a result, upstream analyses clearly presented drastic changes in their metabolic conditions. Furthermore, we found significant accumulation of triacylglycerol in their hypertrophied tail muscles. Triacylglycerol was enriched in slow fiber muscle, we realized predation exposure resulted in fiber shift from fast to slow fibers. In mammals, slow muscle is resistant to atrophy, which is important to prevention of sarcopenia. In the future, we will try to investigate upstream regulators to shift these muscles.

研究分野：脂質生化学

キーワード：骨格筋 脂質 タンパク質 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は糖を代謝する重要な糖代謝器官であり、筋萎縮は全身性の代謝疾患を引き起こす。特に高齢化に伴い発生する筋萎縮はサルコペニアとも呼ばれ、その予防・治療方法の確立は喫緊の課題である。骨格筋を維持あるいは肥大させるためには「運動療法」が第一選択とされる。実際糖尿病の患者へも運動療法が推奨されているものの、患者の中には運動療法が困難な患者も多いため、「運動以外の手法において骨格筋を肥大する」ことができないか、と考えた。この問題を解決しうるユニークな動物モデルとして、運動非依存的に骨格筋が肥大するユニークな動物モデルを見出した。本モデルはカエル幼生に捕食ストレスを与えるモデルであり、エゾアカガエルの幼生とその捕食者であるオオルリボシヤンマの幼生を同水槽で飼育すると、カエル幼生の尾部の筋肉が発達することを見出した。捕食者にさらされている間、カエル幼生は水槽の底部にじっとしており活動自体は抑制的であることから、この肥大化が運動により生じていないことがわかった。本モデルを用いた実験により、あらたな骨格筋肥大メカニズムを明らかにしたいと考え、研究を着想した。

## 2. 研究の目的

我々はカエル幼生が捕食圧から逃避する能力を向上させる目的で能動的に骨格筋を肥大させていると予想した。そしてこの肥大のメカニズムはいわゆる運動による筋肥大メカニズムと同じなのか、それとも全く異なる新規のメカニズムであるのかを明らかにすることで、「運動非依存的な骨格筋肥大メカニズム」を明らかにできると考えた。この目的を克服するうえで課題となるのは骨格筋筋線維の不均一性である。骨格筋の筋線維には速筋・遅筋という二種類の筋線維が存在し、それぞれによって主要な代謝経路も異なることが知られている。エゾアカガエル幼生の場合、ゲノムが明らかにされていないことから尾部を構成する筋線維組成もいまだ明らかとなっていない。そこで、局所での代謝動態を明らかにする目的で質量分析イメージングなどの可視化法を併用しながら、どのような筋線維が有意に肥大しているのか、またその肥大のメカニズムについて明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

まずはエゾアカガエル幼生の尾部骨格筋がどのようなタンパク質・代謝物によって構成されているのかを知る必要があるため、プロテオーム、トランスクリプトーム、およびメタボロームの技術を用いて解析を行うこととした。その後、捕食者ストレスを与えた動物モデルを作成し、どういったタンパク質や脂質に変化が見られたのかを解析し、その肥大のメカニズムを明らかにすることとした。その際、網羅的なタンパク質解析のために定量プロテオミクス (iTRAQ) の手法を用いた。さらに、局所での代謝物変化に着目するため、質量分析イメージングを用いた解析を行うこととした。

## 4. 研究成果

初めに、カエル幼生の尾部骨格筋に存在するタンパク質の発現解析を行うため、タンパク質の発現解析を試みた。その結果、約 4,000 個のタンパク質発現データを得ることができた。骨格筋は遅筋・速筋といった異なる性質をもつ筋線維によって構成されている。マウスにおいては部位ごとに構成する筋繊維組成が明らかになっている一方、カエル幼生は約 16 種類の Myosin Heavy chain (MHC) アイソフォームが遺伝子レベルでは知られているものの、筋肉組織ごとの局在などは不明な点が多かった。そこで、今回解析対象としている尾

部における各線維組成を明らかにする目的で、SDS-PAGE によって検討したところ、尾部骨格筋は速筋タイプが非常に多いということが推察された。次にこれらの筋線維がこういった変化を呈するのかについて、捕食ストレス誘導型動物モデルを用いてその変化を解析することとした。

捕食者誘導型モデルによって有意に筋肉部位が肥大していることを確認したのち、タンパク質について iTRAQ 法を用いて解析を行い、捕食ストレスによって変動するタンパク質の発現解析を行った(図1)。10,000 以上のペプチドを検出することができ、これらの定量解析より、骨格筋内で変動するシグナル伝達について Ingenuity Pathway Analysis による上流解析で解析した。その結果、捕食ストレスによって活性しているパスウェイの上流因子として MYC, INSR, PPARG などエネルギー代謝関連レギュレーターが上位にリストされた。一方、抑制されたものとして MAP4K4, RICTOR がリストされた(表1)。我々は PPARG 及び PPARA が上位に存在することに着目し、骨格筋内の脂質代謝に変動があったのではないかと考え、調べることにした。

前述からカエル幼生の尾部はほとんどが速筋で構成されており、中性脂質 (Triacylglycerol) の蓄積はそれほど多くないことがわかっていたが、捕食ストレスによって尾部骨格筋中の中性脂質が有意に増加することを見出した(図2)。先行研究としてトランスクリプトームの結果からもカルニチントランスポーターである OCTN2 などの発現変化の上昇が観察されていたが、PPAR の活性化や TG の蓄積などを確認できたことから、やはり捕食ストレス誘導型動物モデルでは筋の肥大にともない「遅筋化」も起きていることが推測された。一方、尾部を構成する最も主要な脂質はホスファチジルコリンであるが、その含量は肥大によって変化しないことが明らかとなった。ただし、捕食ストレス負荷により尾部において有意に高発現するホスファチジルコリンに変動が起きることがイメージングより明らかとなった。具体的にはオレイン酸 (OA) 含有 PC は全体として主要分子でありその発現に変化は見られなかったものの、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を含有している PC は捕食ストレスによって有意に多く検出される分子種であることが明らかとなった(図3)。

骨格筋におけるエネルギー調節に重要な役割を担っているのは、AMPK (AMP-activated

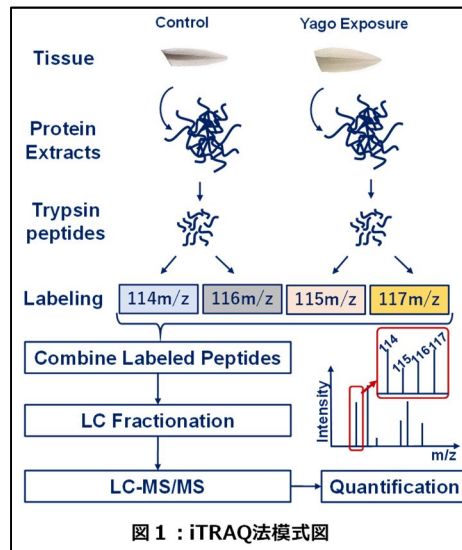


図1：iTRAQ法模式図

Upstream Regulator	Molecule Type	State	z-score
MYC	transcription regulator	Activated	6.428
INSR	kinase	Activated	5.02
PPARG	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	4.449
PPARGC1A	transcription regulator	Activated	4.215
estrogen	chemical drug	Activated	3.371
IGF1	growth factor	Activated	3.027
TGFB1	growth factor	Activated	2.989
PPARA	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.937
MYOD1	transcription regulator	Activated	2.489
MAP4K4	kinase	Inhibited	-5.916
RICTOR	other	Inhibited	-8.25

表1：捕食ストレスによって変動したタンパク質の上流因子解析

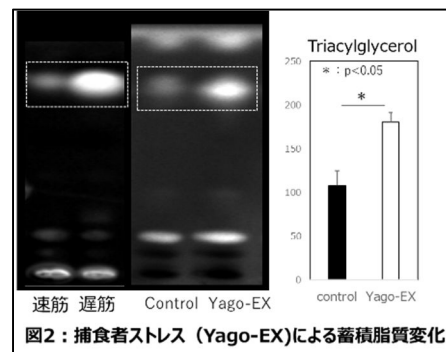


図2：捕食者ストレス (Yago-EX)による蓄積脂質変化

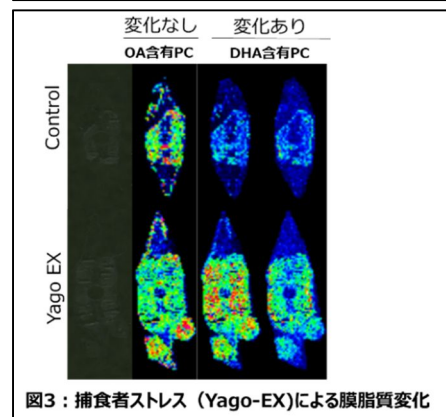


図3：捕食者ストレス (Yago-EX)による膜脂質変化

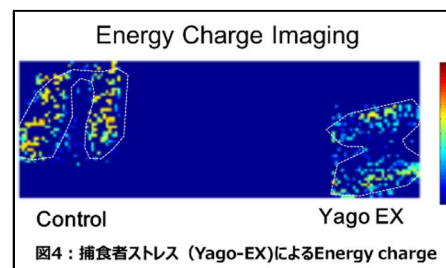


図4：捕食者ストレス (Yago-EX)によるEnergy charge

protein kinase) とよばれるエネルギーセンサータンパク質である。そこで、尾部骨格筋における AMPK の活性化の指標であるインデックス ( $[AMP] + 1/2[ADP] / [AMP] + [ADP] + [ATP]$ ) を質量分析イメージングのデータから算出した (図 4)。このインデックスは増加するほど AMPK が活性化するといわれており、一般的に糖代謝メインの速筋においてこのインデックス値が高いことがわかっている。捕食ストレスによって尾部の骨格筋でこのインデックスが有意に減少しており、ATP プールが過剰になっていることが推察される。同じようにエネルギーの源である TG が上昇していることから、骨格筋の代謝システムが糖代謝から脂質代謝優位に変化したのではないかと考えた。AMPK 自身は一般的に知られている GLUT4 を介した糖取り込み制御のほかに、CPT1 を介したミトコンドリアへの脂肪酸輸送、PGC1 を介したミトコンドリアの生合成の促進、脂肪酸の酸化の亢進にも関与し、脂質代謝にも大きく影響を与える。そこで、CPT1 の遺伝子発現変化について確認したところ、上昇傾向にあることがわかった。これらの結果が AMPK を介しているのかを調べるため、AMPK のリン酸化によって活性化し、運動を模倣した作用が得られるとの報告がある PPAR の発現についてウェスタンブロットング解析を行っている。これらの解析から、どのようなメカニズムでエネルギーセンサーが活性化したのかを明らかにしていきたいと考えている。また、ウェスタンブロットング及び免疫染色により、ミトコンドリア関連タンパク質の発現解析を行った。その結果、遅筋のマーカーである MYH7 や遅筋化を促す PGC1 が捕食者暴露によって有意に増加することを示した。以上のことから、我々の捕食者誘導型骨格筋肥大においては、遅筋化も同時に起こっていることが示唆された。今後はこれらの遅筋化がどのようなメカニズムで引き起こされるのか、その上流因子の研究を行うことが肥大メカニズムを明らかにするうえで重要な一歩になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto-Inoue N, Morisasa M, Kimura K, Mori T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Novel approach to enhance sensitivity while retaining morphology in fragile tissue sections for mass spectrometry imaging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Mass Spec	6. 最初と最後の頁 e4670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jms.4670.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamura K, Goto-Inoue N, Miyata K, Furuichi Y, Fujii NL, Manabe Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of treatment with conditioned media derived from C2C12 myotube on adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0237095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morisasa M, Sato T, Kimura K, Mori T, Goto-Inoue N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging for Food Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 E633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods8120633	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上菜穂子
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いた骨格筋研究
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上菜穂子
2. 発表標題 質量分析イメージングによる骨格筋代謝変化の可視化
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森笹瑞季、木村圭佑、水重貴文、蕪山由己人、内田健志、吉田恵里子、森司、井上菜穂子
2. 発表標題 不運動・軽運動モデルに対する魚肉タンパク質の効果の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村圭佑、森笹瑞季、水重貴文、蕪山由己人、早坂孝宏、吉田恵里子、内田健志、森司、井上菜穂子
2. 発表標題 関節固定による筋萎縮時の脂質代謝動態
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森笹瑞季、木村圭佑、藤谷美菜、岸田太郎、岡田晋治、吉田恵里子、内田健志、森司、井上菜穂子
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いたスケソウダラタンパク質摂餌ラットの肥大骨格筋解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村圭佑、森笹瑞季、水重貴文、蕪山由己人、唐沢陸央、金丸千夏、内田健志、吉田恵里子、森 司、井上菜穂子
2. 発表標題 廃用性筋萎縮の回復時においてスケソウダラ由来タンパク質配合餌の摂取が骨格筋肥大に与える影響の解析
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森笹瑞季、井上菜穂子、木村圭佑、岸田太郎、藤谷美菜、内田健志、吉田恵里子、岡田晋治、森 司
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いたスケソウダラタンパク質摂餌ラットの肥大骨格筋解析
3. 学会等名 第13回日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村圭佑、井上菜穂子、森笹瑞季、水重貴文、蕪山由己人、唐沢陸央、金丸千夏、内田健志、吉田恵里子、森 司
2. 発表標題 廃用性筋萎縮の回復時において魚肉摂餌が骨格筋肥大に与える影響の解析
3. 学会等名 第13回日本アミノ酸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上菜穂子、森笹瑞季、木村圭佑、松島至道、生島嘉津也、三浦進司、森 司
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いた新規骨格筋線維マーカーの探索とその応用
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森笹瑞季、井上菜穂子、佐藤友彦、藤谷美菜、岸田太郎、内田健志、森 司
2. 発表標題 質量分析イメージングを用いたスケソウダラタンパク質摂餌ラットの骨格筋脂質解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関