

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580341

研究課題名（和文） ウシ骨格筋におけるミオスタチンの有無が筋紡錘の分布と形態に及ぼす影響

研究課題名（英文） Morpho-functional relationship between myostatin and muscle spindle in bovine skeletal muscles.

研究代表者

渡邊 康一（WATANABE KOUICHI）

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80261494

研究成果の概要（和文）：

筋形成抑制因子であるミオスタチンがウシ骨格筋における筋紡錘の分布と形態に及ぼす影響を解析するため、ミオスタチン自然欠損の「草原短角牛」を用いた。2010年度までに蓄積した凍結筋試料を震災によって失い研究に支障を来したが、筋紡錘が機能調節に深く関与するI型筋線維の多い筋ではミオスタチンの発現レベルが低いことを見出し、また筋線維型分化におけるカルシウムイオンを介した細胞内調節機構の重要性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Morpho-functional relationship between myostatin and muscle spindle was investigated in bovine skeletal muscles, using double-muscled cattle “Grass-field shorthorn”. Though this study was stricken seriously by the Great East Japan Earthquake, we found that slow muscles contained many type I myofibers exhibited lower expression of myostatin than fast muscle did. Furthermore our results suggested that a calcium ion signaling in myofiber might play a crucial role in myofiber type fast-to-slow transformation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：筋線維型、筋紡錘、ミオスタチン、筋運動制御、ウシ、筋小胞体カルシウムポンプ、カルパイン

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋線維は3種類の筋線維型に大別される。収縮が遅く疲労に強いI型筋線維，収縮が速く疲労に強いII A型筋線維，収縮が速

く疲労に弱いII B型筋線維である。動物の姿勢保持は重力に対抗する筋運動であり，この時にはI型筋線維のみが働き，運動時にはI型筋線維に加えてII A型筋線維が動員され，瞬発力を要する場合にII B型筋線維までが

動員される。骨格筋は筋の機能に応じた固有の筋線維型構成を有する。

姿勢保持の筋運動制御では、筋紡錘と I 型筋線維が伸張反射を介して単シナプス的に連係することから、骨格筋における筋紡錘の分布と I 型筋線維の分布とは密接な関係にあるとされ、I 型筋線維の割合が多い筋に筋紡錘の密度が高く、筋内でも I 型筋線維の割合が多い部位に筋紡錘が多く分布するということが定説となっている。しかし、代表者はこれまでにヒツジの後肢の骨格筋では I 型筋線維の分布と筋紡錘の多寡が必ずしも関連しないことを見出した (Watanabe & Suzuki, 1999)。一方、ウシ骨格筋における筋紡錘の形態学的解析は頸部の一部の筋に限られ (Kobota et al., 1980)、筋線維型構成との関連についての報告は皆無である。

さらに、筋形成の負の制御因子であるミオスタチンが自然欠損した Double-Muscling (DM) 形質を持つウシでは、筋線維の肥大ではなく、過形成によって骨格筋が著しく発達する。この時、形成される筋線維の形態と筋線維型構成に異常は無いことが知られているが、胎児期において通常よりも筋形成能が高まり、筋芽細胞や筋管の数が増している環境下で形成される筋紡錘については、その多寡や形態などについての詳細は全く不明である。

## 2. 研究の目的

筋線維型制御の要因を成す重要な筋感覚器である筋紡錘に焦点を置いて骨格筋形成と筋運動制御系との関連を解析するとともに、ミオスタチンの作用欠損によって筋線維の過形成が生じる日本短角種 DM 牛の骨格筋を用い、その骨格筋における筋紡錘の形態的特徴と分布特性を、通常の本短角種牛の骨格筋の筋紡錘と比較解析することによって、筋紡錘の形成と紡錘外の骨格筋線維の形成との関連においてミオスタチンがどのように関与するかを解明することを目的とする。また、筋紡錘は伸張反射により I 型筋線維と単シナプス的に連携していることから、I 型筋線維の機能的特性に大きく関連している。

## 3. 研究の方法

ウシ骨格筋の筋紡錘の形態学的特徴と紡錘外筋線維の筋線維型分布との関連を解析するため、草原短角牛 (ミオスタチン欠損日本短角種 DM 牛) の新生子 3 頭 (MSTN<sup>-/-</sup>: 死亡個体より採材) と 14 ヶ月齢 (MSTN<sup>+/-</sup>: 枝肉より採材) 6 頭、ホルスタイン種牛 4 ヶ月齢 (MSTN<sup>+/+</sup>) 3 頭より筋材料を採取し、新鮮凍結およびホルマリン固定サンプルを得

た。

また、通常の本短角種若齢牛 14 カ月齢 6 頭と 20 カ月齢 6 頭の枝肉より後肢および前肢帯の骨格筋 35 種類、ホルスタイン種 6 カ月齢 18 頭より腰最長筋、胸腹鋸筋、中間広筋および半腱様筋を採取し、また、そのうち 6 頭については骨格筋 20 部位を採取した。

筋材料は、筋横断試料をドライアイス・アセトンによる急速凍結とパラフォルムアルデヒド固定によるパラフィン包埋を行った組織学的解析用試料と、mRNA 発現解析に供するため細切して液体窒素で凍結した分子生物学的解析試料に分けて採取した。

組織学的解析試料は、厚さ 10 μm のクリオスタット凍結連続切片、あるいは厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製し、抗ミオスタチン抗体、抗ミオシン重鎖 (MyHC) 抗体 (Slow、Fast)、抗筋小胞体カルシウムイオンポンプ (SERCA) 抗体 (Slow:2、Fast:1)、抗カルパイン抗体 (カルパイン 1、2) を用いた免疫組織化学的解析を行った。

分子生物学的解析では、常法に従い筋材料より mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により筋関連遺伝子発現を解析した。

さらに、ホルスタイン種牛については、胸最長筋、半腱様筋、中間広筋、ヒラメ筋については、正常筋組織を採取して、酵素処理法にて筋衛星細胞を単離調整し、differential adhesion 法による純化処理を経て筋芽細胞培養系を確立した。分化誘導処理により筋管形成を誘導し、ミオスタチンや MyHC など筋関連因子の発現を培養系にて解析した。

一方、筋紡錘の紡錘内筋線維の酵素組織化学的性状を骨格筋の機能と併せて解析する試みとして、ヒツジの腰最長筋と大腿部および下腿の筋において、筋線維のミオシン ATPase 反応 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (3-HBD) 活性を解析した。

なお、震災後の対応として、既存の筋組織プレパラートを探索し、草原短角牛や通常のウシの標本上に見出された筋紡錘について形態観察を行った。

## 4. 研究成果

本研究では、ウシ骨格筋における筋紡錘分布とミオスタチンとの関連を機能形態学的に解析し、特に I 型筋線維の機能制御と分化機構を探ることを目的として、採取した筋材料によって有用な 3 次元解析法を検討していたが、2010 年度末の東日本大震災の被災により凍結筋試料はすべて融解滅失し、プレパラートやデータの一部も失われた。震災被害は主たる研究材料である Double-muscled 日本短角種牛「草原短角牛」の生産牧場 (宮城県農業公社牡鹿牧場: 宮城県石巻市) にも及び、最終年度に新たな草原短角牛の供試牛を

確保することができなかった。このことにより3次元再構築解析が期間内に達成不能となるなど研究推進に大きな支障が生じたものの、以下のような関連成果が得られており、筋紡錘によって機能調節されるI型筋線維の分化機構に新たな知見が得られた。

(1) 筋紡錘と筋線維型の3次元分布解析

ウシの筋紡錘の基本的な構造は他の哺乳類と同様であり、赤道部の両側に錘袖部を持つ紡錘形のカプセルが紡錘内筋線維を包む構造からなっていた。カプセル外(錘外部)まで伸びる核袋筋線維が2~3本、核鎖筋線維が4~6本程度であった(図1)。紡錘内筋線維は著しく強いNADH脱水素酵素活性を示し、通常の筋線維(紡錘外筋線維)とは容易に識別可能であった。核鎖筋線維は紡錘外の速筋線維と同じミオシンATPase反応性であったが、核袋筋線維はミオシンATPase反応が酸前処理・アルカリ前処理ともに反応の弱いか中等度となり、紡錘外の遅筋線維とは異なる酵素組織化学的特性を示した(図2)。同様に、免疫組織化学染色でも核袋筋線維が抗slowおよび抗fastMyHC抗体に陰性となり、

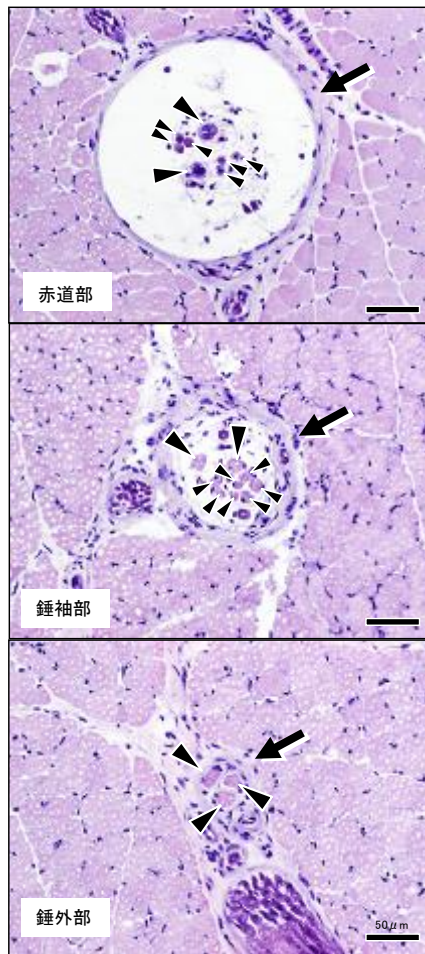
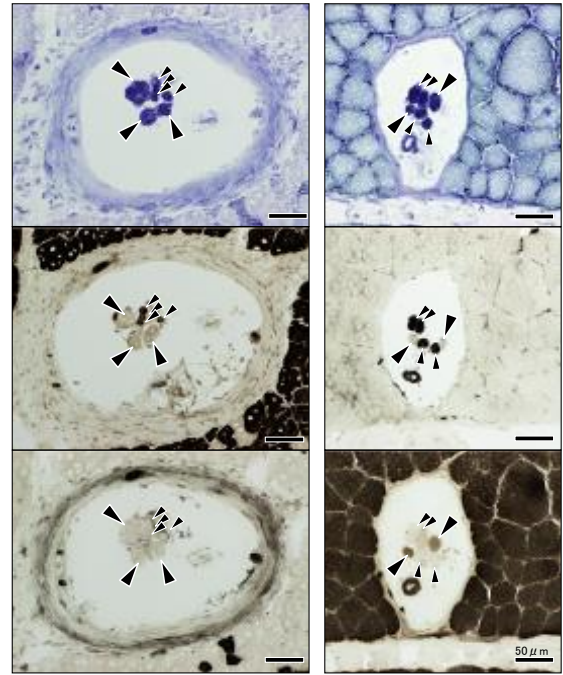


図1 筋紡錘の構造

矢印: 筋紡錘、大矢頭: 核袋筋線維、小矢頭: 核鎖筋線維、ウシ胸最長筋、HE染色



草原短角牛 長腓骨筋 日本短角種 咬筋浅部  
図2 草原短角牛と日本短角種の骨格筋における筋紡錘の紡錘内筋線維型構成

大矢頭: 核袋筋線維、小矢頭: 核鎖筋線維

核鎖筋線維が抗fastMyHC抗体に陽性となった(図3)。このことは、核袋筋線維のミオシンは緊張性の徐筋線維(tonic myofiber)からなることを示す。

ミオスタチンを自然欠損するDouble-muscling形質を持つ草原短角牛は、胎生期に筋線維が過形成されて筋肥大となる。筋紡錘は、胎生期の一次筋管に知覚神経終末が到達し、筋管と神経終末との複合体を作ることによって形成される。正確な比較はできなかったものの、草原短角牛と日本短角種牛の骨格筋において、筋紡錘の紡錘内筋線維数に大きな差異は見受けられず、ミオスタチンが筋紡錘の形態に及ぼす影響は大きくは無いのと考えられる。ミオスタチンが筋特異的調節因子であることから、筋線維は過形成されるものの知覚神経終末の発達には直接的な影響は無いものとみられ、筋紡錘の形成は通常どおり進行するためではないかと考えられる。今回の研究では調査できなかったが、ミオスタチン欠損による筋肥大が生じているため、筋紡錘密度には差異が生じるかもしれないが、更なる研究が必要である。

固定筋標本においては、当初予定していた筋紡錘の紡錘内筋線維の組織化学的特徴である極めて強いNADH脱水素酵素活性を検出することができず、筋紡錘の同定が困難であった。また筋線維型分類のための免疫組織化学染色も長期固定に伴う抗原性低下のため不調であった。固定筋材料を用いた免疫組

織化学的 3 次元再構築解析には新たな手法の開発が必要となり完遂に至ることができなかった。

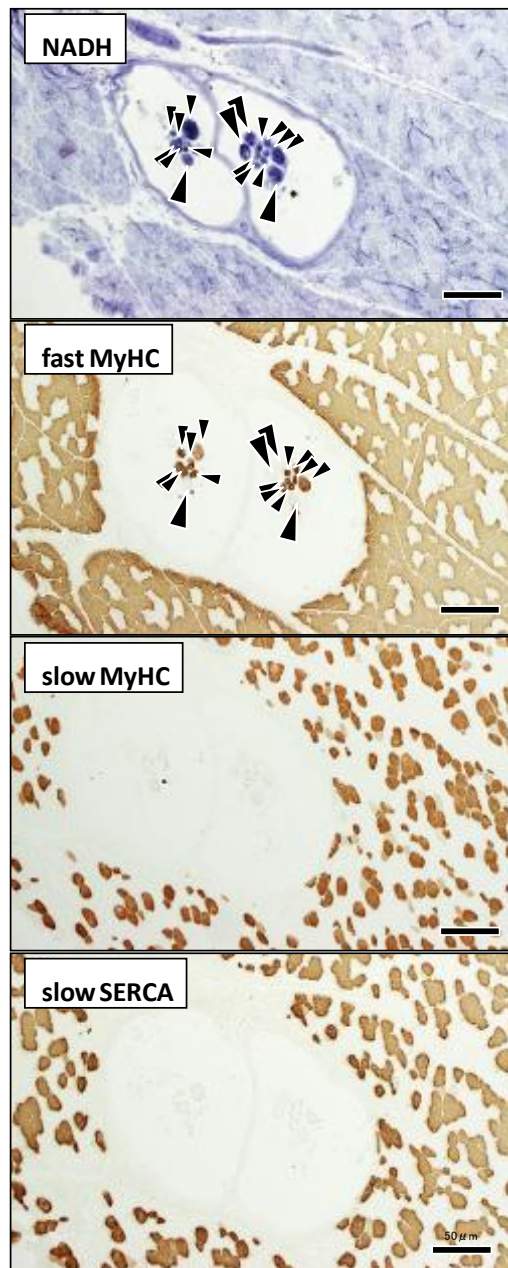


図3 ウシ筋紡錘の紡錘内筋線維における免疫組織化学的特性

大矢頭:核袋筋線維、小矢頭:核鎖筋線維、胸最長筋、複合型筋紡錘

(2) 骨格筋の筋線維型構成とミオスタチン発現の関連

ホルスタイン種の骨格筋においては、中間広筋のように I 型筋線維の多い筋でミオスタチン mRNA の発現が低く、半腱様筋のように II B 型筋線維の多い筋でミオスタチン mRNA 発現が有意に高いことが示された。Fast 型

MyHC を持つ筋線維型が優勢な筋ほどミオスタチン発現が高い傾向にあり、筋線維型分化とミオスタチンの作用機序に関連性があることが示唆された (学会発表 2)。

また、培養筋細胞 (筋衛星細胞) における実験により、ウシ骨格筋でミオスタチン mRNA 発現は II 型筋線維の多い速筋において高く、I 型筋線維の多い遅筋では発現が低いという特性が、それぞれの筋由来の培養筋細胞レベルでも維持されていることを見出した (学会発表 6, 15)。筋衛星細胞は間葉系幹細胞としての多分化能を持つことが知られ、未分化な状態のまま休止した筋芽細胞であると考えられてきたが、特定の筋線維型への分化を方向付けられている可能性が示された。骨格筋への低周波電気刺激によってミオスタチンが発現低下することは代表者らがすでに明らかにしているが (基盤研究 (C)、19580323)、本成果により、ミオスタチン発現に筋線維型依存的な調節機構が存在することと、筋線維型の機能的適応にも関連していることが強く支持された。

(3) 放牧による運動効果と筋線維型機能適応

放牧牛において、放牧による運動効果によって筋線維型の機能的適応が生じ、筋線維の肥大と I 型および II A 型筋線維の割合の増加が起こることが明らかとなった (学会発表 3, 4, 10, 17)。その際に同じ筋線維型でも放牧によって NADH 脱水素酵素活性が亢進していること、ミオスタチン mRNA の発現が減少して、筋線維型の移行機序に影響を与えることが示唆された (学会発表 3)。随意運動による筋線維型の機能適応においても筋紡錘を介した姿勢保持のための筋運動制御機構が働いているため、筋感覚器とミオスタチン発現制御の新規の関連性を解析することは、筋線維型移行機構の解明においても意義深いものと考えられる。

(4) 筋線維型移行モデルにおける変移機序

持続的低周波電気刺激 (CLFS) によって、II 型筋線維が筋線維型変移を起こす過程で、遅筋型 MyHC の発現上昇に追従して遅筋型 SERCA が発現上昇することが分かった (学会発表 8, 12)。また、この時、I 型筋線維でも遅筋型 SERCA の発現上昇が認められ、CLFS による筋運動負荷に I 型筋線維が機能的に適応することも明らかとなった。このことは反芻動物に存在する I 型筋線維の疲労耐性の高い亜型との関連が示唆され、筋紡錘の関与も推測される。なお、紡錘内筋線維では遅筋型 MyHC が陰性であり、遅筋型 SERCA も発現していなかった (図 3)。

またこの時、MyHC 亜型の Fast-to-Slow 変移に先んじて、カルシウムイオン依存型プロテアーゼであるカルパイン 1 の発現上昇が

起こることを見出した(図4、学会発表16)。持続的な筋運動の開始によって筋線維内に多量のカルシウムイオンが放出され、カルパイン分解系が活性化することが筋線維型移行に重要な要因となることが示唆された。I型筋線維の機能的適応は、通常は筋紡錘を介した筋運動制御の機構の中で生じるものであるが、CLFS実験モデルではその調節機能を超える筋運動が負荷されることが推測される。このような過負荷条件化での筋紡錘の機能的変化を調べることは今後興味深い点である。この時の筋線維型移行は既存の筋線維が維持されながら筋蛋白質が置換されていく現象であり、蛋白質分解系の調節が重要であると考えられる。今後は、カルパインの内因性インヒビターであるカルパスタチンの発現動態、あるいは特定の物質をユビキチン化することで分解する、ユビキチン・プロテアソーム系の動態を解析することが課題となる。

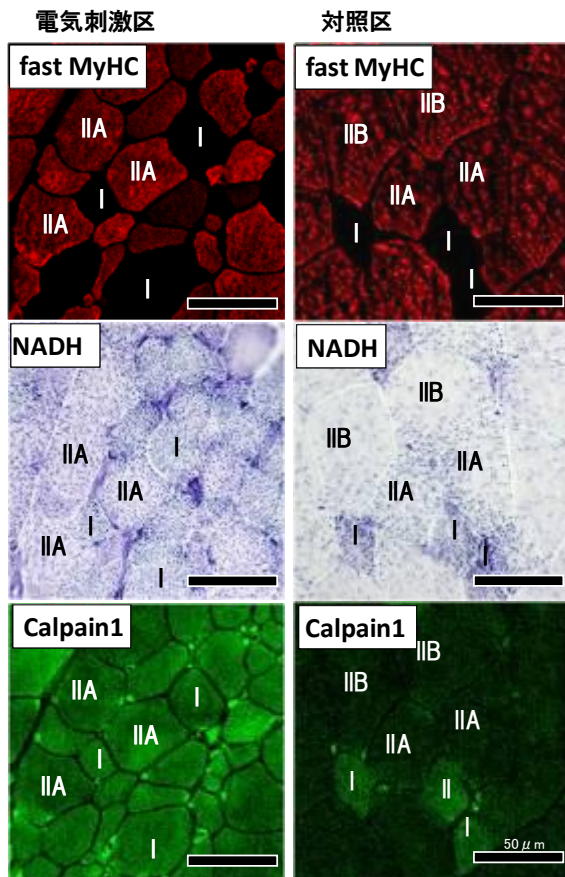


図4 CLFSによるウシ胸最長筋筋線維のCalpain1の発現増強

(5) 反芻家畜の骨格筋における紡錘内筋線維と紡錘外筋線維の機能的関連

ウシの解析モデルとして、同じ反芻家畜であるヒツジの腰最長筋と大腿部および下腿の筋において、筋線維の3-ヒドロキシ酪酸

脱水素酵素(3-HBD)活性を解析したところ、紡錘内筋線維の3-HBD活性が高いことが分かった。3-HBD活性はI型筋線維の中でも特に疲労耐性の高い筋運動に適応した反芻家畜特有のI型筋線維亜型(I D型とI E型)にのみ発現するものであり、これらの筋線維は姿勢保持に働く遅筋に分布している。また、骨格筋線維に3-HBD活性の高いI型筋線維亜型が多い筋ほど紡錘内筋線維の3-HBD活性が高いことが判明し、筋線維型分化と筋紡錘による筋運動制御が深い関係を持つことが確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Miyake M., Hayashi S., Taketa Y., Iwasaki S., **Watanabe K.**, Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. Myostatin down-regulates the IGF-2 expression via ALK-Smad signaling during myogenesis in cattle. *Animal Science Journal*. 査読有、81-2 巻、2009年、223-229
- ② Miyake M. Hayashi S., Iwasaki S., Uchida T., **Watanabe K.**, Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. TIEG1 negatively controls the myoblast pool indispensable for fusion during myogenic differentiation of C2C12 cells. *Journal of Cellular Physiology*. 査読有、226-4 巻、2011年、1128-1136

[学会発表] (計17件)

- ① **Watanabe K.** Perspective of beef production in Japan and studies on muscle biology. China-Japan joint Seminar: Improvement of beef production and beef quality. 2009年10月10日. Beijing, China
- ② 北川絵理・三宅雅人・高橋秀之・岩崎俊輔・**渡邊康一**・大和田修一・麻生久・山口高弘. ウシ筋線維型におけるマイオスタチン mRNA の発現. 日本畜産学会第111回大会. 2010年3月29日. 明治大学駿河台キャンパス
- ③ 木戸恭子・池田哲也・三宅雅人・北川絵里・**渡邊康一**・山口高弘. 放牧飼養下におけるウシ腰最長筋中の筋機能関連因子 mRNA 発現動態. 日本畜産学会第111回大会. 2010年3月29日. 明治大学駿河台キャンパス
- ④ 小笠原英毅・畔柳正・**渡邊康一**・三宅雅人・岩崎俊輔・大和田修一・麻生久・山口高弘・萬田富治. 放牧など自給粗飼料100%で生産した肥育牛の筋線維型構成. 日本畜産学会第111回大会. 2010年3月29日. 明治大学駿河台キャンパス
- ⑤ **渡邊康一**. 牛肉としての骨格筋. 日本産肉研究会第6回学術集会(招待講演).

- 2010年3月30日、明治大学駿河台キャンパス
- ⑥ 北川絵理、三宅雅人、今井由佳、岩崎俊輔、渡邊康一、大和田修一、麻生 久、山口高弘。牛骨格筋における筋衛星細胞の分布と挙動。第60回東北畜産学会大会。2010年8月30日。岩手県盛岡市
- ⑦ 巢 国正、三宅雅人、渡邊一史、北川絵理、中野辰也、高橋 遊、大和田修一、渡邊康一、麻生 久、山口高弘。血小板由来セロトニンの骨格筋再生に及ぼす影響。第60回東北畜産学会大会。2010年8月30日。岩手県盛岡市
- ⑧ Sakurada T., Kitagawa E., Miyake M., Ohwada S., Aso H., Watanabe K. Early adaptation of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  pump in bovine myofiber under chronic low-frequency electrical stimulation. ADSA-ASAS 2011 Joint Annual Meeting 2011年7月14日。New Orleans, USA
- ⑨ 渡邊康一、国内外における赤身牛肉の評価の実情について、日本産肉研究会第8回学術集会（指名講演）、2011年8月24日、北里大学獣医学部
- ⑩ 小笠原英毅・畔柳 正・米澤智洋・渡邊康一・三宅雅人・高橋秀之・小野 泰・大和田修一・麻生 久・山口高弘・寶示戸雅之、放牧など自給粗飼料100%で生産した日本短角種および北里八雲牛の枝肉成績と筋線維型構成、第114回日本畜産学会大会、2011年8月27日、北里大学獣医学部
- ⑪ 中野辰也・渡邊一史・齋藤和輝・齋藤 遼・高橋 遊・長澤裕哉・井上奈穂・池田郁男・大和田修一・渡邊康一・山口高弘・麻生 久、末梢セロトニンの骨格筋におけるエネルギー代謝亢進作用、第114回日本畜産学会大会、2011年8月26日、北里大学獣医学部
- ⑫ 櫻田隆大・白須直樹・北川絵理・三宅雅人・大和田修一・山口高弘・麻生 久・渡邊康一、ウシ骨格筋線維型における筋小胞体カルシウムイオンポンプの発現様式、第61回東北畜産学会、2011年9月9日、青森県青森市
- ⑬ 佐藤裕尚・岩月俊樹・内田江一朗・渡邊康一・麻生 久・山口高弘、粗飼料多給肥育による草原短角牛の肉質特性、第49回肉用牛研究会、2011年11月17日、山形県山形市
- ⑭ 渡邊康一、新たな肉用牛資源としての草原短角牛の産肉能力、東北大学農学研究科先端農学研究センター第25回先端農学セミナー（招待講演）、2011年11月24日、東北大学大学院農学研究科
- ⑮ 北川絵理・三宅雅人・高橋秀之・櫻田隆大・白須直樹・渡邊康一・大和田修一・

- 麻生 久、ウシ骨格筋線維型に依存した筋衛星細胞のミオスタチン発現、第115回日本畜産学会大会、2012年3月29日、名古屋大学東山キャンパス
- ⑯ 櫻田隆大・白須直樹・北川絵理・大和田修一・山口高弘・麻生 久・渡邊康一、筋線維型移行モデルにおける筋線維新生誘導、第115回日本畜産学会大会、2012年3月29日、名古屋大学東山キャンパス
- ⑰ 小笠原英毅・畔柳 正・北川絵理・渡邊康一・渡邊一史・高橋秀之・小野 泰・大和田修一・麻生 久・寶示戸雅之、放牧期の日本短角種および肉用交雑種における筋線維型移行と血液性状、第115回日本畜産学会大会、2012年3月29日、名古屋大学東山キャンパス

〔図書〕（計1件）

- ① 山口高弘、渡邊康一、学窓社、「獣医組織学 第5版」、2011、71-82 ページ

〔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.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 康一 (WATANABE KOUICHI)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：80261494

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし