

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21224

研究課題名（和文）骨格筋LPGAT1が筋性状・筋機能に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）The effect of phospholipid remodeling by LPGAT1 on muscle characterization and function

研究代表者

佐藤 友紀 (Satp, Tomoki)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：30908455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋のグリセリン脂質のリポクオリティ、特に本研究ではステアリン酸(18:0)が結合したホスファチジルコリン(PC)に着目して解析を行い、18:0-PC量が過剰に増加する遺伝子組み換えマウスの速筋線維で筋萎縮が生じることを見出した。速筋線維の中でも最も速筋としての特徴を持つType2b線維において筋断面積の縮小が認められた。加えて、そのマウスでは筋損傷時に認められるタンパク質発現変化に加え、再生時に観察される中心核を含む筋線維が多いことから骨格筋リポクオリティの変化が骨格筋の性質に寄与していることが明らかになった。四肢握力の低下も確認しており、筋性状の変化が機能に影響していると推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、リポクオリティの違いが臓器機能に及ぼす影響が明らかになりつつあるが骨格筋機能との関係性は不明瞭であった。本研究では速筋線維に多く含まれる18:0-PCに着目して、遺伝子組み換えによって18:0-PCが過剰になるモデルを作製し、筋性状・機能に及ぼす影響を検証した。その結果、大きな表現型として速筋線維における筋萎縮を発見した。細胞を構成する脂質分子の変化が筋萎縮に影響することはこれまでに報告がなく、新たな筋萎縮予防の標的となり得る。今後さらに細胞のどこで(オルガネラなど)脂質が変化しているかを明確にすることで、新たな筋萎縮発症機序の発見に結び付けることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the lipo-quality of glycerophospholipids in skeletal muscle, especially phosphatidylcholine (PC) bound with stearic acid (18:0). We found that muscle atrophy occurs in fast-twitch muscle fibers of genetically modified mice with excessively increased amounts of 18:0-PC. Type 2b fibers, fast-twitch fibers, showed a reduction in the cross-sectional area of the muscle. In addition, the mice had more myofibers containing the central nucleus, observed during regeneration, and changes in protein expression observed during muscle injury. These results suggest that skeletal muscle lipo-quality contributes to the properties of skeletal muscle. A decrease in limb grip strength was also observed, suggesting that changes in muscle properties via changes in muscle lipo-quality affect muscle function.

研究分野：栄養学

キーワード：リン脂質 リポクオリティ 骨格筋 筋萎縮 筋機能

## 1. 研究開始当初の背景

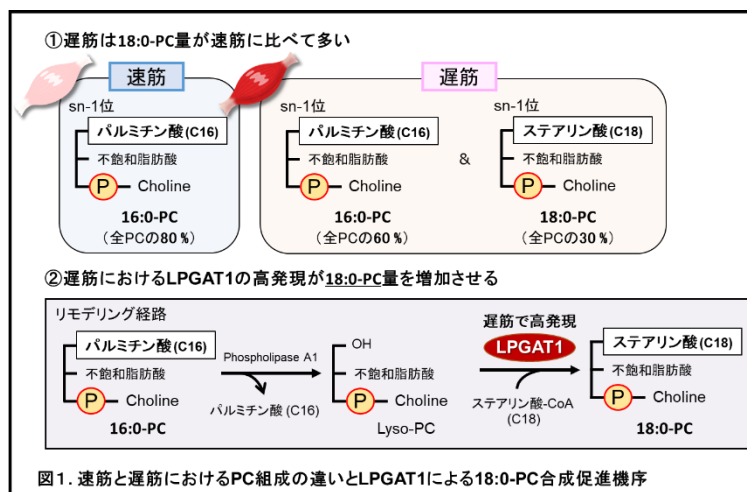
骨格筋は収縮速度の違う速筋タイプと遅筋タイプの筋線維によって構成される。筋線維タイプの違いは、機能性タンパク質、構造タンパク質、ミトコンドリア、情報伝達系分子などの違いによって説明されてきたが、筋細胞の大切な構成分子である脂質に関する情報は十分とは言えない。Phosphatidylcholine (PC)は細胞膜を構成する主要リン脂質であり、グリセロール骨格に結合している脂肪酸の種類(炭素数、二重結合の数)やその組み合わせによって生体内には数多くの分子種が存在する。これまでにラットやヒトの骨格筋において PC に結合する脂肪酸種が筋線維タイプごとに異なること、すなわち速筋ではパルミチン酸 (C16)が結合した PC 量が多く、遅筋ではステアリン酸 (C18)が結合した PC 量が多いことが報告されている(Am J Physiol 2000; 2010)。これら事実、PC 分子種の違いが速筋・遅筋の特性や機能の制御に関与している可能性を示しているが、先行研究では、PC を加水分解することによって生じる脂肪酸を分析対象としており、PC 分子種を未破壊の状態で検出できていないことから、PC 分子種の多様性を生み出す責任酵素の同定および PC 分子種の違いと筋機能の関係を検証できていない。

## 2. 研究の目的

申請者らは、Liquid Chromatography–Mass

Spectrometry (LC-MS)を用いて PC 分子種を未破壊の状態で分析したところ、マウス骨格筋に存在する全 PC 分子種のうち、速筋では 1-palmitoyl 型 PC (16:0-PC)が約 80%であるのに対し、遅筋では 16:0-PC が 60%である代わりに、1-

stearoyl 型 PC (18:0-PC)が 30%存在することを見出した(図 1-① : J Biol Chem 2023)。また、速筋と遅筋における 18:0-PC 存在量の違いを説明できる責任酵素が、PC の sn-1 位に脂肪酸を導入するリゾリン脂質アシル基転移酵素 LPGAT1 であることを、LPGAT1 欠損マウスを作出・解析したことで明らかにしている(図 1-② : J Biol Chem 2023)。しかし、これまでに PC の sn-1 位の脂肪酸リモデリングを調節する酵素は同定されていなかったため、LPGAT1 による PC の脂肪酸リモデリングと生体機能の関係は分かっていない。上記背景を手掛かりに、申請者らは LPGAT1 による PC の sn-1 位への stearoyl 基の導入が骨格筋機能の維持と発揮に関与しているという考えに至った。本研究では、「生体膜を構成する PC に結合している脂肪酸の種類が筋機能の調節に関与する」という新規概念が成立するか否かを、LPGAT1 過剰発現マウスを用いて検証した。



### 3. 研究の方法

LPGAT1 mTg マウスは human  $\alpha$ -skeletal actin promoter (HSA) の下流に LPGAT1 が結合したコンストラクトを受精卵にマイクロインジェクションし、作出されたマウスを複数世代交配した後に実験に使用した。対照群には同腹仔の野生型(WT)マウスを使用した。LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスの骨格筋中のリン脂質組成変化および筋性状・筋機能の変化を下記の方法によって検討した。

#### (1) 骨格筋特異的 LPGAT1 過剰発現マウスにおけるリン脂質組成の変化

LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスより長趾伸筋(EDL、速筋優位)およびヒラメ筋(soleus、遅筋優位)をそれぞれ採取し、クロロホルム/メタノールで脂質を抽出した。抽出した脂質に含まれるリン脂質を LC-MS を用いて定量した。

#### (2) LPGAT1 過剰発現マウスの骨格筋切片の評価

LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスより前脛骨筋(TA、混合筋)、EDL および soleus を採取して冷却したイソペンタン中で凍結した。クライオスタットを用いて凍結した EDL および soleus を薄切することで筋切片を作製し、myosin heavy chain 抗体を用いて筋線維タイプ別に免疫染色した後に蛍光顕微鏡で 1 つの筋切片サンプルに対して複数枚の画像を撮影した。撮影した画像全ての線維タイプ別の本数を計測し、全体の線維数を除すことでタイプ別の筋線維割合を算出した。それぞれのタイプ別線維における線維径についても測定した。加えて、TA 筋切片の組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い中心核の数の有無を調べた。

#### (3) プロテオミクス解析によるタンパク質発現量の網羅的解析

LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスより EDL、soleus をそれぞれ採取し、凍結粉砕した後にタンパク質を抽出した。トリプシンを用いてタンパク質をペプチドへと消化し、LC/MS で断片化されたペプチドを網羅的に測定し、データベース照合によってタンパク質を同定・定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨格筋特異的 LPGAT1 過剰発現マウスにおけるリン脂質組成の変化

LPGAT1 mTg マウスの EDL、soleus において 18:0-PC 量が増加し、16:0-PC 量が減少した(図 2)。一方で、どちらの骨格筋においても 18:0-PE 量は減少し、16:0-PE 量が増加した。PS に関しては EDL において、18:0-PS 量、16:0-PS 量がともに減少した。Soleus では、18:0-PS 量、16:0-PS 量ともに有意な変化は認められなかった。

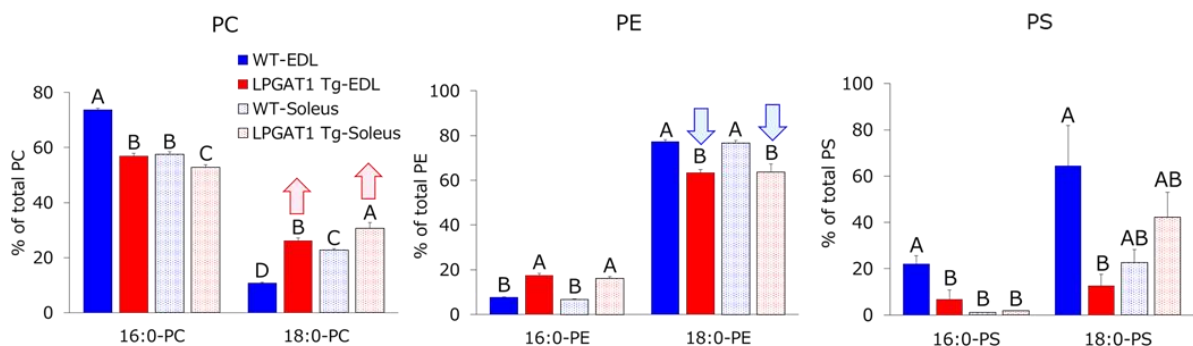
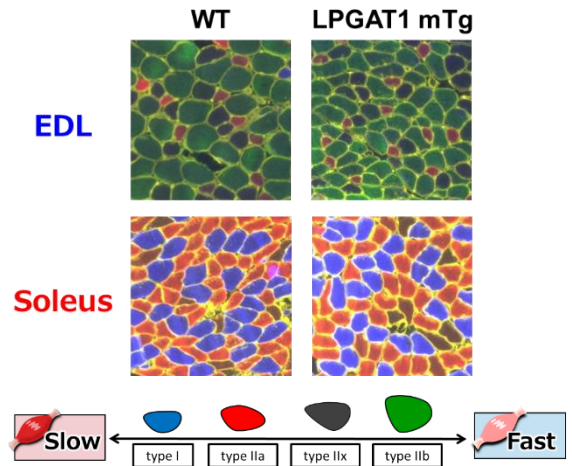


図2. EDL、Soleusにおけるリン脂質組成の違い

## (2) LPGAT1 過剰発現マウスの骨格筋切片の評価

### ①タイプ別筋線維数への影響

EDL、soleus に含まれる筋線維をタイプ別に免疫染色で染め分けて 1 サンプルにつき複数枚の画像を取得し(図 3)、全ての線維数およびタイプ別の線維数を計測した。EDL、soleus とともに TypeI(青)、TypeIIa(赤)、TypeIIx(黒) および TypeIIb(緑)どのタイプ線維もマウス間で存在割合に差は認められなかった(図 3A, 3B)。このことから LPGAT1 の過剰発現は筋線維タイプ割合には影響しないことが明らかになった。



### 筋線維タイプ別割合

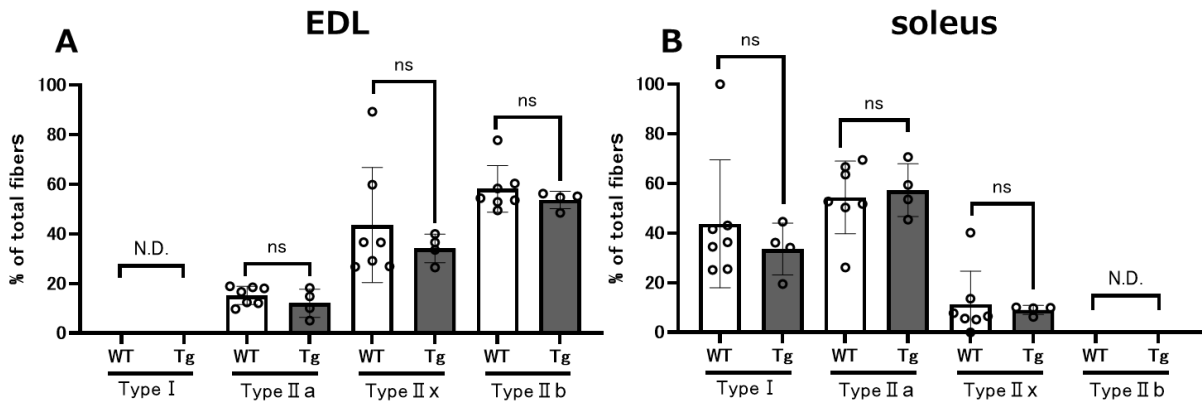


図3. 筋切片の染色像とEDL (A)、soleus (B)における筋線維タイプ別割合

### ②各タイプ別線維の筋横断面積への影響

EDL において、LPGAT1 mTg マウスでは Type IIb 線維の筋横断面積が WT マウスに比して有意に低値を示した(図 4A)。一方で TypeI、TypeIIa および TypeIIx 線維の筋横断面積は LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスの間で大きな差は認められなかった。Soleus については TypeI、TypeIIa、TypeIIx、TypeIIb どのタイプにおいても LPGAT1 過剰発現に伴う筋断面積の変化は見られなかった(図 4B)。これらの結果より、LPGAT1 の過剰発現は速筋線維である TypeIIb 線維のサイズを縮小させることが明らかになった。

### タイプ別筋横断面積

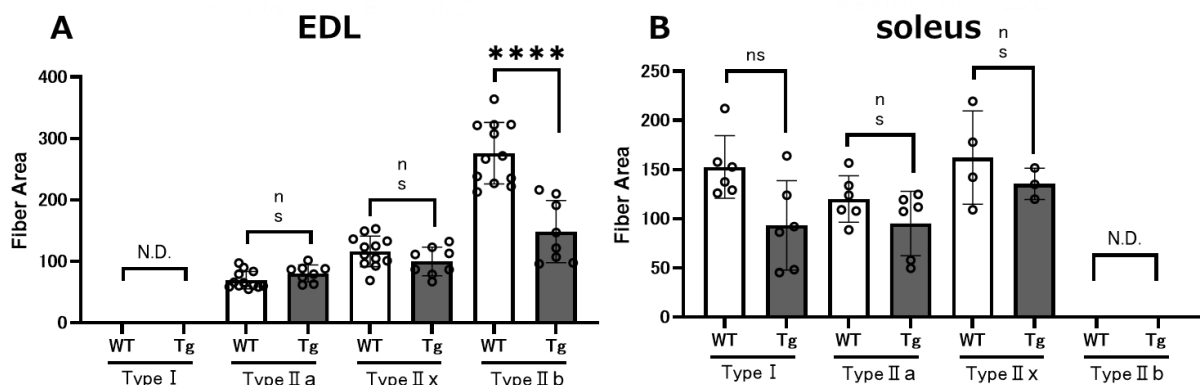


図4. EDL (A)、soleus (B)における筋線維タイプ別横断面積



### ③HE 染色による組織学的評価

採取した TA より凍結切片を作製し、HE 染色を行ったところ、LPGAT1 mTg マウスでは中心核を含む線維(筋線維の細胞質に核が存在している状態)が WT マウスに比べて多く観察された(図 5)。中心核は再生過程の骨格筋線維で見られることから、LPGAT1 の過剰発現は筋線維が再生せざるを得ない状態を引き起こすことが示唆された。

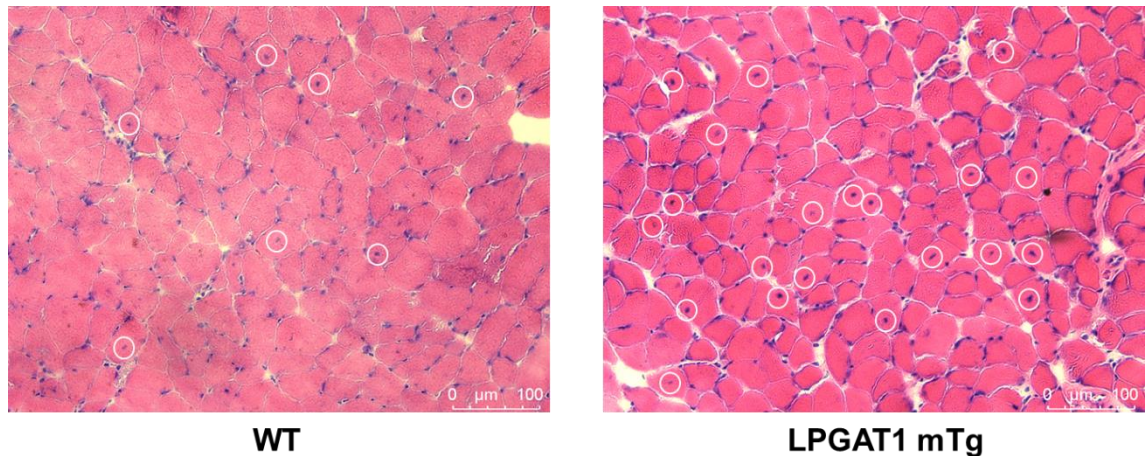


図5. TAのHE染色画像

画像中の白丸は中心核の存在を示している

### (3) プロテオミクス解析によるタンパク質発現量の網羅的解析

EDL、soleus それぞれの骨格筋において、LPGAT1 の過剰発現に伴い変化したタンパク数は EDL において 1,248 分子、soleus において 1,091 分子であった(図 6)。図 5 の結果より、速筋優位な骨格筋である TA で中心核を含む線維が LPGAT1 Tg マウスで多く観察されたので、筋再生マーカーとして報告されている Myoz1, 2, 3 の発現量を EDL の解析結果より個別に確認した。LPGAT1 過剰発現マウスでは Myoz1 および 3 の発現量が有意に減少しており、Myoz2 に関しては有意ではないが低下傾向が認められた。Myoz1, 2, 3 は筋損傷初期に劇的に発現量が減少する分子であることから、LPGAT1 過剰発現に伴い筋線維の損傷が生じていることが示唆された。

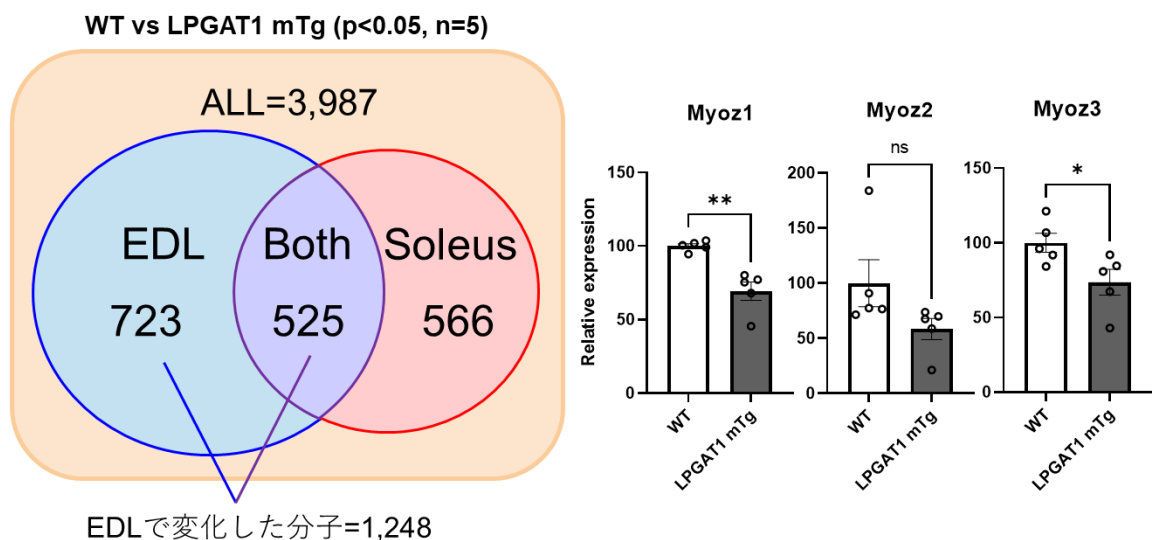


図6. プロテオミクス解析結果とMyozタンパク質発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦 菜穂、赤堀 拓、梅林 脩平、妹尾 奈波、佐藤 友紀、三好 規之、守田 昭仁、川名 裕己、進藤 英雄、多賀谷 光男、清水 孝雄、青木 淳賢、三浦 進司
2. 発表標題 骨格筋に含まれるホスファチジルコリンのsn-1位に結合する脂肪酸リモデリング機構の解明と骨格筋機能への影響
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾我茜、市田日和、榛葉有希、三好規之、佐藤友紀、三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPGAT1の過剰発現が骨格筋機能と性状に及ぼす影響
3. 学会等名 第86回 日本生化学会大会 中部支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾我茜、三浦菜穂、赤堀拓、梅林脩平、妹尾奈波、三好規之、守田昭仁、亀井康富、川名祐己、青木淳賢、佐藤友紀、三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPGAT1による骨格筋でのリン脂質リモデリングが持久運動能力に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦進司、佐藤友紀
2. 発表標題 リン脂質クオリティと骨格筋機能
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤友紀、曾我茜、市田日和、榛葉有希、三好規之、三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPGAT1の過剰発現が骨格筋機能と性状に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 進司、梅林 脩平、佐藤 友紀、妹尾 奈波、赤堀 拓、三好 規之、杉浦 悠毅、井上 菜穂子、川名 裕己、進藤 英雄、亀井 康富、清水 孝雄、青木 淳賢
2. 発表標題 骨格筋に含まれるリン脂質のアシル基プロファイル制御機序の解明と生理学的意義
3. 学会等名 第8回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sae Takita, Shuhei Umebayashi, Tomoki Sato, Nanami Senoo, Takumi Akahori, Noriyuki Miyoshi, Yuki Sugiura, Naoko Goto-Inoue, Hiroki Kawana, Atsushi Hatano, Hideo Shindou, Yasutomi Kamei, Takao Shimizu, Junken Aoki, Shinji Miura
2. 発表標題 LPGAT1-mediated remodeling of sn-1-acyl chain profiles in muscular phospholipids affect endurance capacity
3. 学会等名 The 27th Shizuoka Forum on Health and Longevity
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akane Soga, Hiyori Ichida, Yuki Shimba, Noriyuki Miyoshi, Tomoki Sato, Shinji Miura
2. 発表標題 Overexpression of acyltransferase LPGAT1 induces skeletal muscle atrophy
3. 学会等名 The 27th Shizuoka Forum on Health and Longevity
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 友紀、曾我 茜、市田 日和、榛葉 有希、三好 規之、三浦 進司
2. 発表標題 LPGAT1によるリン脂質のアシル基リモデリングと骨格筋機能(2)
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 進司、梅林 脩平、佐藤 友紀、妹尾 奈波、赤堀 拓、市田 日和、曾我 茜、三好 規之、吉田 卓矢、杉浦 悠毅、井上 菜穂子、川名 裕己、進藤 英雄、馬場 崇、前本 佑樹、亀井 康富、清水 孝雄、青木 淳賢
2. 発表標題 LPGAT1によるリン脂質のアシル基リモデリングと骨格筋機能(1)
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Miura, Tomoki Sato, Shuhei Umebayashi, Nanami Senoo, Takumi Akahori, Noriyuki Miyoshi, Yuki Sugiura, Naoko Goto-Inoue, Atsushi Hatano, Masaki Matsumoto, Hiroki Kawana, Hideo Shindou, Yasutomi Kamei, Takao Shimizu, Junken Aoki
2. 発表標題 LPGAT1/LPLAT7-mediated regulation of acyl chain profiles in muscle phospholipids affects endurance capacity in mice
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoki Sato, Akane Soga, Hiyori Ichida, Noriyuki Miyoshi, Shinji Miura
2. 発表標題 Over expression of acyl transferase LPGAT1 changes muscle character
3. 学会等名 第9回 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Shinji Miura, Tomoki Sato, Shuhei Umebayashi, Nanami Senoo, Takumi Akahori, Noriyuki Miyoshi, Yuki Sugiura, Naoko Goto-Inoue, Atsushi Hatano, Masaki Matsumoto, Hiroki Kawana, Hideo Shindou, Yasutomi Kamei, Takao Shimizu, Junken Aoki
2. 発表標題 Myofiber type-specific phospholipid remodeling and muscular function
3. 学会等名 第9回 骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoki Sato, Shuhei Umebayashi, Nanami Senoo, Takumi Akahori, Hiyori Ichida, Noriyuki Miyoshi, Takuya Yoshida, Akihito Morita, Yuki Sugiura, Naoko Goto-Inoue, Hiroki Kawana, Hideo Shindou, Takashi Baba, Yuki Maemoto, Yasutomi Kamei, Atsushi Hatano, Masaki Matsumoto, Takao Shimizu, Junken Aoki and Shinji Miura
2. 発表標題 LPGAT1/LPLAT7 regulates acyl chain profiles at sn-1 position of phospholipids in murine skeletal muscle
3. 学会等名 11th International Singapore Lipid Symposium
4. 発表年 2023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
---------	---------