

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24650407

研究課題名（和文） 高エネルギーリン酸含有レベルと筋特性の調節機構の関係

研究課題名（英文） Relationship between the contents of high-energy phosphates and Regulation of muscular properties

研究代表者

大平 充宣 (OHIRA YOSHINOBU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50185378

研究成果の概要（和文）：

骨格筋の特性は、運動トレーニングや環境、栄養、発育・発達、老化などに伴って変化することが知られている。筋収縮のエネルギー源は、アデノシン・3・リン酸 (ATP) であり、その産生には有酸素的および無酸素的エネルギー代謝が重要な役割を果たしているが、クレアチン含有量も顕著な影響を及ぼすことも報告されている (AJP Cell Physiol, '94; Jpn J Physiol, '94 & '95)。しかしながら、骨格筋の代謝・収縮特性に変化を誘発する詳細なメカニズムは必ずしも明らかではない。そこで、この調節メカニズムを追求するために、C57BL/6 オスマウスにクレアチン・アナログである β -guanidinopropionic acid (β -GPA) を経口投与し、体内クレアチン含有量を減少させた場合の後肢足底筋の特性を追求した。生後3週齢のマウスを任意に2群に分け、1群には通常の粉末飼料、他群にはその飼料に1%濃度で β -GPAを混入したエサを毎日同量ずつ与えた。発育に応じてエサの量は漸増したが、3週目から1日1g/匹の一定量とした。水は自由に与えた。4および8週目に体重測定後、ネブタールの腹腔内投与による麻酔下で頸静脈より採血した。その後遠心分離し、血清中クレアチン含有量を測定した。また、足底筋を両後肢より採取し、右筋は生体内長にストレッチした状態で（液体窒素で冷却した）イソペンタン中で瞬間凍結した。これらでは、横断切片でミオシン重鎖発現を分析した。左筋では、網羅的に遺伝子発現を分析した。特に8週目ではクレアチン枯渇と遅筋化が顕著であったが、すでに4週目から遅筋化またはミトコンドリア代謝に関係する遺伝子発現が亢進した。クレアチン枯渇が筋の遅筋化を誘発することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is known that the properties of skeletal muscles are regulated in response to exercise training, environment, nutrition, growth and development, and/or aging. The energy source for muscle contraction is adenosine triphosphate (ATP), which is synthesized through aerobic and anaerobic energy metabolism. It is also influenced by the content of creatine (AJP Cell Physiol, '94; Jpn J Physiol, '94 & '95). However, the precise mechanism responsible for the regulation of contractile and metabolic properties of muscles is still unclear. Therefore, the current study was performed to investigate the effects of creatine depletion, by feeding creatine analogue, β -guanidinopropionic acid (β -GPA) on the properties of plantaris muscle of C57BL6 mice. Three weeks old male mice were separated into two groups randomly. One group of mice were fed regular powdered diet and other group were supplied the same diet, but containing 1% β -GPA. The amount of food, pair-fed, was gradually increased following growth, but 1 g of food was given to each mouse daily after 3 weeks. Water was supplied *ad libitum*. At 4th and 8th week, blood and muscle samplings were performed. Blood was withdrawn from the jugular vein under anesthesia with *i.p.* injection of sodium pentobarbital. Serum was saved after centrifugation and creatine content was analyzed. Plantaris muscles were sampled bilaterally. Muscle fiber types were analyzed in the cross-section of right muscles. Gene expressions were determined in the left muscles. Significant depletion of creatine and shift of fibers toward slow-type were noted, especially after 8 weeks of β -GPA feeding. Increase in the expression of genes related to slow-type fibers and mitochondrial metabolism was noted even at 4th week. It is suggested that depletion of creatine causes the transformation of

muscle fibers toward slow-twitch type.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：骨格筋、可塑機構、遺伝子、タンパク質、クレアチンアナログ

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の収縮特性は、それを構成する筋線維のミオシン重鎖発現やミトコンドリア酵素活性等に密接に関連している。筋の特性を改善するためのトレーニングは国内外で処方されているが、顕著な効果は得られておらず、意図する効果を筋に誘発させる機構も必ずしも明らかではない。そこで、筋活動レベルに加えて筋中高エネルギーリン酸レベルを変えた場合の遺伝子やタンパク質発現を網羅的に分析し、筋の可塑機構を追求しようとするユニークな研究が計画された。また、応募者は、ラットに長期間β-GPAを経口投与した場合、筋中ATPおよびクレアチンリン酸(PCr)含有量の低下{Fitchら, *Am J Physiol (AJP)*, '75}に伴って、遅筋化が誘発されたと報告した(*AJP, Cell Physiol*, '94; *Jpn J Physiol*, '94 & '95)。似たような現象は、他にも報告されているが、遅筋化を誘発する詳細な機構は明らかではない。そこで、このような現象に遺伝子およびタンパク質が如何なる役割を演じているのか追求するために、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

骨格筋の形態・収縮・代謝特性の調節に、高エネルギーリン酸含有レベルに応じた遺伝子およびタンパク質発現の反応がどのように関与するのか、マウスを使って追求した。筋中高エネルギーリン酸含有量は、クレアチンまたはそのアナログであるβ-guanidinopropionic acid (β-GPA)の経口投与によって調節し、それに伴う骨格筋における遺伝子およびタンパク質発現の変化パターンを追求した。

3. 研究の方法

骨格筋の収縮・代謝特性等の調節に、高エネルギーリン酸含有レベルがどのように関与するのか、マウスを使って追求した。筋中高エネルギーリン酸含有量は、クレアチンまたはそのアナログであるβ-guanidinopropionic acid (β-GPA)の経口投与によって調節し、それに伴う骨格筋にお

ける遺伝子およびタンパク質発現の変化パターンを追求した。

方法の詳細は次のようなものである。生後3週齢のオスマウス(C57Bl/6)を使って実験した。これらのマウスを、正常食およびβ-GPA食群に任意に分けた(それぞれn=5)。正常食には日本クレアのCE-2を使う。β-GPA食群のエサには、1%濃度でβ-GPAを正常食に混入した。エサの量は、はじめの3週間くらいは12時間くらいで食べつくす程度で漸増したが、その後は1日に21gずつ与えた。水は自由摂取させた。

その後、ネンブタールの腹腔内投与による麻酔下で、頸静脈から採血し、遠心分離後の血清でクレアチン濃度を測定した。また、両後肢から足底筋を採取した。右筋は生体内長にストレッチして、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した。その後筋腹中央部をoptimum cutting temperature (OCT) compoundを使ってコルク上に立て、横断切片の分析を行った。左筋は、液体窒素で凍結し、遺伝子発現分析を分析した。

4. 研究成果

特に8週目ではクレアチン枯渇と遅筋化が顕著であったが、すでに4週目から遅筋化またはミトコンドリア代謝に関する遺伝子発現が亢進した。その結果、クレアチン枯渇は、筋の遅筋化を誘発する遺伝子発現を刺激するという示唆が得られた。遺伝子の変化は、タンパク質レベルの遅筋化は顕著でなかった4週目でも有意であった。今後は、今回のβ-GPA投与と同じような筋の遅筋化が、運動や低酸素環境暴露等でも起こるのか追求する必要がある。もし、同じような結果が得られれば、筋に加わる刺激は異なっても、遅筋化を誘発する直接的な因子は高エネルギーリン酸の枯渇によるmitochondrial biogenesisの亢進がkey factorである可能性が高まる。

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 11 件)

1. Kawano, F., R. Fujita, N. Nakai, M. Terada, T. Ohira, and Y. Ohira. HSP25 can modulate myofiber desmin cytoskeleton following the phosphorylation at Ser15 in rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 112: 176-186, 2012.
2. Arima, Y., M. Harada, D. Kamimura, J-H. Park, F. Kawano, F.E. Yull, T. Kawamoto, Y. Iwakura, U.A.K. Betz, G. Marquez, T.S. Blackwell, Y. Ohira, T. Hirano, and M. Murakami. *Cell* 148: 447-457, 2012.
3. Terada, M., F. Kawano, T. Ohira, N. Nakai, N. Nishimoto, and Y. Ohira. Effects of mechanical over-loading on the properties of soleus muscle fibers, with or without damage, in wild type and *mdx* mice. *PLoS ONE* 7 (4): e34557, 2012.
4. Terada, M., F. Kawano, N. Ishioka, A. Higashibata, H. J. Majima, T. Yamazaki, T. Watanabe-Asaka, M. Niihori, R. Nakao, S. Yamada, C. Mukai, and Y. Ohira. Biomedical analysis of rat body hair after hindlimb suspension for 14 days. *Acta Astronautica* 73: 23-29, 2012.
5. Nomura, S., K. Kami, F. Kawano, Y. Oke, N. Nakai, T. Ohira, R. Fujita, M. Terada, K. Imaizumi, and Y. Ohira. Effects of hindlimb unloading on neurogenesis in the hippocampus of newly weaned rats. *Neurosci. Lett.* 509: 76-81, 2012.
6. Sandoà, D., J.-F. Desaphy, G.M. Camerino, E. Bianchini, S. Ciciliot, D. Danieli-Betto, G. Dobrowolny, S. Furlan, E. Germinario, K. Goto, M. Gutschmann, F. Kawano, N. Nakai, T. Ohira, Y. Ohno, A. Picard, M. Salanova, G. Schiffl, D. Blottner, A. Musarò, Y. Ohira, R. Betto, D. Conte, and S. Schiaffino. Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PLoS ONE* 7 (3): e33232, 2012.
7. Masini, M.A., E. Albi, C. Barmo, T. Bonfiglio, L. Bruni, L. Canesi, S. Cataldi, F. Curcio, M. D'Amora, I. Ferri, K. Goto, F. Kawano, R. Lazzarini, E. Loreti, N. Nakai, T. Ohira, Y. Ohira, S. Palmero, P. Prato, F. Ricci, L. Scarabelli, T. Shibaguchi, R. Spelat, F. Strollo, and F.S. Ambesi-Impiomato. The impact of long-term exposure to space environment on adult mammalian organisms: a study on mouse thyroid and testis. *PLoS ONE* 7 (4): e35418, 2012.
8. Santucci, D., F. Kawano, T. Ohira, M. Terada, N. Nakai, N. Francia, E. Alleva, L. Aloe, T. Ochiai, R. Cancedda, K. Goto, and Y. Ohira. Evaluation of gene, protein and neurotrophin expression in the brain of mice exposed to space environment for 91 days. *PLoS ONE* 7 (7): e40112, 2012.
9. Kawano, F., N. Nakai, and Y. Ohira. Regulation of soleus muscle properties by mechanical stress and/or neural activity. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 (1): 29-36, 2012.
10. Goto, K., Y. Ohno, A. Goto, A. Ikuta, M. Suzuki, T. Ohira, N. Tsuchiya, S. Nishizawa, T. Koya, T. Egawa, T. Sugiura, Y. Ohira, and T. Yoshioka. Some aspects of heat stress on the plasticity of skeletal muscle cells. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 (2): 197-204, 2012.
11. Nakai, N., F. Kawano, and Y. Ohira. Control of muscle protein synthesis in response to exercise and amino acids. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 1 (2): 297-305, 2012.

〔学会発表〕 (計 11 件)

1. Kawano, F., T. Ohira, T. Ochiai, and Y. Ohira. Recording of neuromuscular activities of rats in a real microgravity environment using telemetry system. Next-generation suborbital researchers conference. May 5 – 8, 2012, Calif., U.S.A.
2. Ochiai, T., H. Murase, and Y. Ohira. Expectation for suborbital flight as life science experiment opportunity. Next-generation suborbital researchers conference. May 5 – 8, 2012, Calif., U.S.A.
3. Tomo. Ohira, Tak. Ohira, F. Kawano, T. Shibaguchi, H. Okabe, N. Nakai, T. Ochiai, K. Goto, and Y. Ohira. Responses of myosin heavy chain phenotypes and gene expressions in neck muscle to micro- and hyper-gravity in mice. 12th European Life Sciences Symposium and 33rd Annual International Gravitational Physiology Meeting. June 18-22, 2012, Aberdeen, United Kingdom (Scotland).
4. Tomo. Ohira, Tak. Ohira, F. Kawano, H. Okabe, N. Nakai, T. Ochiai, K. Goto, Y. Ohno, R. Cancedda, and Y. Ohira. Responses of gene and protein expressions in mouse neck muscle to micro- and/or hyper-gravity environment. 28th Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research. November 28 – December 2, 2012, New Orleans, Louisiana, U.S.A.

5. H. Okabe, Tomo. Ohira, Tak. Ohira, F. Kawano, K. Goto, H. Naito, and Y. Ohira. Responses of rat soleus muscle to mechanical stress and /or high-energy phosphate contents. 28th Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research. November 28 – December 2, 2012, New Orleans, Louisiana, U.S.A.
6. 岡部洋興、大平友宇、大平宇志、河野史倫、芝口翼、後藤勝正、内藤久士、大平充宣. ラット後肢筋における機械的刺激と高エネルギーリン酸レベルの関係. 第58回日本宇宙航空環境医学会大会, 2012年11月15-17日, 豊橋商工会議所.
7. 大平友宇、大平宇志、河野史倫、芝口翼、岡部洋興、大野善隆、須藤正道、後藤勝正、Ranieri Cancedda、大平充宣. 重力レベルがマウス頸筋におけるタンパク質発現に及ぼす影響. 第58回日本宇宙航空環境医学会大会, 2012年11月15-17日, 豊橋商工会議所.
8. 大平友宇、鈴木美穂、後藤亜由美、生田旭洋、大野善隆、古屋智之、西澤苑、江川達郎、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、後藤勝正. 骨格筋の量的変化に伴う細胞内脂肪とその分布. 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月14-16日, 岐阜長良川国際会議場.
9. 後藤亜由美、大野善隆、江川達郎、大平友宇、鈴木美穂、生田旭洋、西澤苑、古屋智之、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、後藤勝正. マウスヒラメ筋の量的変化に伴う sirtuin 発現の変化. 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月14-16日, 岐阜長良川国際会議場.
10. 古屋智之、西澤苑、別府諸兄、大平充宣、吉岡利忠、杉浦崇夫、大平友宇、鈴木美穂、後藤亜由美、生田旭洋、唐柳林、江川達郎、大野善隆、後藤勝正. 骨格筋の萎縮と肥大に伴うミオシン重鎖発現と熱ショック転写因子1. 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月14-16日, 岐阜長良川国際会議場.
11. 西澤苑、古屋智之、大野善隆、江川達郎、大平友宇、鈴木美穂、後藤亜由美、生田旭洋、杉浦崇夫、大平充宣、吉岡利忠、別府諸兄、後藤勝正. 損傷骨格筋の再生における熱ショック転写因子1の生理学的意義. 第67回日本体力医学会大会, 2012年9月14-16日, 岐阜長良川国際会議場.

[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
大平充宣 (OHIRA YOSHINOBU)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50185378

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：