

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780266

研究課題名(和文) エネルギー代謝に及ぼすミオスタチン作用

研究課題名(英文) The myostatin action on energy metabolism

研究代表者

高橋 秀之 (Takahashi, Hideyuki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60549872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミオスタチン欠損牛である草原短角牛の骨格筋におけるエネルギー代謝特性を解明することを目的とした。ミオスタチンが欠損した草原短角牛は、インスリン感受性糖輸送担体である GLUT4 発現が高く、筋細胞において糖取り込み能が高いことが明らかとなった。また、ミオスタチンは、GLUT4 mRNA 発現を抑制すること、その抑制作用は、転写因子である MEF2c を介して行われる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the characteristics of energy metabolism in skeletal muscle of myostatin-deficient Japanese Shorthorn cattle(DM cattle).The expression of GLUT4 mRNA in the skeletal muscle and in myoblasts at 72 h after differentiation in vitro was higher in DM cattle than in NM cattle. Glucose uptake in myoblasts was increased in DM cattle relative to that of NM cattle. Results of the present study suggest that myostatin inhibits the expression of GLUT4 mRNA possibly via MEF2c.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：myostatin

1. 研究開始当初の背景

ミオスタチンは主に骨格筋で発現し、その分化や成長を負に制御する (MacPherron et al., 1997)。日本短角種 DM 形質牛である草原短角牛では、ミオスタチンによる筋分化の抑制作用が解除され、筋細胞の過形成による筋肉量増加(骨格筋肥大)と脂肪組織形成の減少が誘導される (Hayashi et al., 2008)。このミオスタチン欠損による骨格筋肥大に必要な代謝エネルギーの増加は採食量に依存するものではなく、骨格筋固有のものであることが強く示唆されるが、いまだ十分に理解されていないのが現状である。

筋肉におけるエネルギーは、主に糖や脂肪酸を利用する (Hedden et al., 1982; Hocquette et al., 1998)。骨格筋における糖の取り込みは、インスリン非依存型糖輸送担体 GLUT1 と小胞体に存在するインスリン依存型糖輸送担体 GLUT4 が細胞膜上に膜移行 (トランスロケーション) することにより行われ、このトランスロケーションはインスリンのシグナル伝達により調節される (Kahn et al., 1998)。一方、脂肪酸は、細胞膜上の脂肪酸輸送タンパク質 (CD36) により取り込まれ、脂肪酸結合蛋白質 3 (FABP3) と結合することにより、細胞内小器官に輸送されることで ATP が生産される。マウスの骨格筋において、ミオスタチンの欠損は、インスリン感受性を増加させる (Guo et al., 2009)。加えて、FABP3 は脂質代謝だけでなく、インスリンシグナル経路を介した糖代謝にも深く関与している (Yamashita et al., 2009)。これらのことから、ミオスタチンはインスリン依存型である GLUT4 や FABP3 発現を制御し、糖取り込み能や脂肪酸利用に影響を及ぼす事が予測される。(図 1)。しかしながら、ミオスタチンの糖取り込み能や脂肪酸利用のエネルギー調節機構については、国内外を問わずこれまでほとんど知見が得られていない。

2. 研究の目的

本研究は、新たな側面から骨格筋細胞におけるミオスタチンの糖代謝、脂肪酸代謝を中心としたエネルギー代謝に対する作用解明を目的とする。

3. 研究の方法

1: 日本短角種牛 (NM) および草原短角牛 (DM) における血中栄養成分を測定した。

2: 骨格筋および筋細胞での GLUT4、GLUT1、CD36、FABP3、およびインスリンレセプター発現の解析

日本短角種牛ならびに草原短角牛の腰最長筋から組織を採取し、ウシ骨格筋におけるこれらの遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析した。また、日本短角種牛ならびに草原短角牛由来の筋芽細胞培養系を用いて分化誘導前 0 時間から分化誘導後 72 時間まで 24 時間ごとに細胞を採取し real-time PCR 法を用いて解析した。

3: ミオスタチン欠損が糖取り込み能に及ぼす影響

日本短角種牛ならびに草原短角牛由来の筋芽細胞培養系において、ELISA 法を用いて GLUT トランスポーターを利用して細胞へ取り込まれるグルコースアナログである 2-Deoxy-D-[1,2-3H]glucose を添加し、分化誘導後 72 時間における糖取り込み能を測定した。

4: ミオスタチンの GLUT4、GLUT1、MEF2c 発現制御作用の解析

日本短角種牛ならびに草原短角牛由来の筋芽細胞培養系において、ミオスタチン (100ng/ml) を添加させたときの GLUT4、GLUT1 および MEF2c 発現を real-time PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

1: 9 か月齢時における DM 牛の血糖値は、NM 牛と比較して有意に減少をしていた (図 1)。

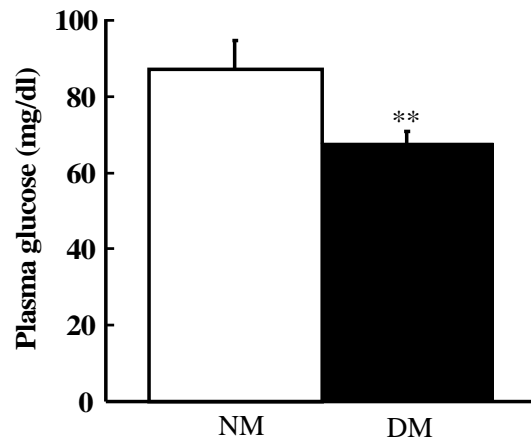


図1. 日本短角種牛および草原短角牛における血糖値

2: 胸最長筋における糖代謝関連遺伝子発現について DM 牛の GLUT4m RNA 発現は、NM 牛と比較し有意に高い値を示したが、その他の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。

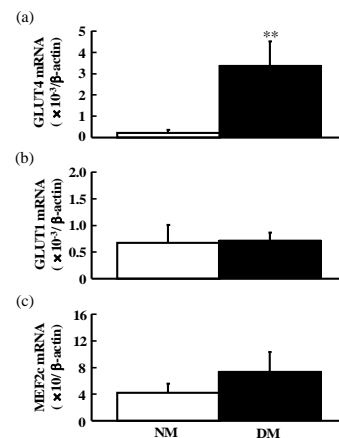


図2. 日本短角種牛および草原短角牛の骨格筋における GLUT4、GLUT1 および MEF2c 発現

3: 日本短角種牛ならびに草原短角牛由来の筋芽細胞培養系を用いて分化誘導前0時間から分化誘導後72時間まで24時間ごとに細胞を採取し糖および脂質代謝関連遺伝子発現を解析した結果、DM牛のGLUT4発現はNM牛と比較し分化誘導後72時間で有意に高い発現を示した。また、GLUT1およびMEF2c発現は分化誘導後24時間から有意に高い発現を示した。その他の遺伝子発現に両種の間には差は無かった。

4: DM牛骨格筋細胞における糖取り込み能は、NM牛よりも高い。また、インスリン存在下においては、より糖の取り込み能が上昇した(図3)。

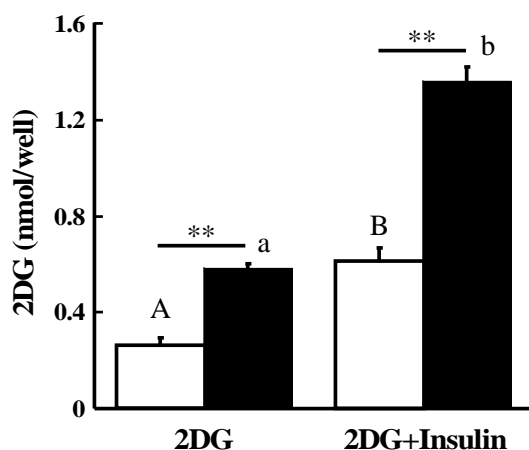


図3. 日本短角種牛および草原短角牛骨格筋細胞における糖取り込み能

5: 骨格筋細胞における GLUT4 及び GLUT4 転写因子である MEF2c mRNA 発現は分化誘導後 96 時間で上昇した。しかしながら、分化誘導後 72 時間後の細胞にミオスタチンを添加した結果、GLUT4 および MEF2c mRNA 発現は抑制された。一方で、GLUT1 発現においてはミオスタチンの抑制効果は認められなかった(図4)

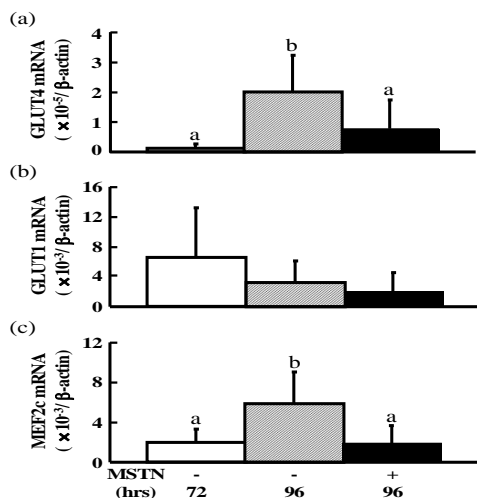


図4. ミオスタチン添加における遺伝子発現

本研究成果より、ミオスタチンが欠損した草原短角牛は、インスリン感受性糖輸送担体である GLUT4 発現が高く、筋細胞において糖取り込み能が高いことが明らかとなった。また、ミオスタチンは、GLUT4 mRNA 発現を抑制すること、その抑制作用は、転写因子である MEF2c を介して行われる可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

1. H. Takahashi, K. Sato, T. Yamaguchi, M. Miyake, H. Watanabe, Y. Nagasawa, E. Kitagawa, S. Terada, M. Urakawa, M. T. Rose, C. D. McMahon, K. Watanabe, S. Ohwada, T. Gotoh, H. Aso. Myostatin alters glucose transporter-4 (GLUT4) expression in bovine skeletal muscles and myoblasts isolated from double-muscled (DM) and normal-muscled (NM) Japanese shorthorn cattle. 2014. Domestic Animal Endocrinology. 査読有. In press.

2. Hitoshi Watanabe, Ryo Saito, Tatsuya Nakano, Hideyuki Takahashi, Yu Takahashi, Keisuke Sumiyoshi, Katsuyoshi Sato, Xiangning Chen, Natsumi Okada, Shunsuke Iwasaki, Dian W. Harjanti, Natsumi Sekiguchi, Hiroaki Sano, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Shyuichi Ohwada, Kouichi Watanabe, Hisashi Aso. Effect of Peripheral 5-HT on Glucose and Lipid Metabolism in Wether Sheep. 2014. PLoS ONE. 査読有. 9 (2).

3. 丸居篤, 藤堂乃夫宏, 岡安崇史, 後藤貴文, 衛藤哲次, 塩塚雄二, 高橋秀之. 放牧による耕作放棄地解消がイノシシの行動に及ぼす影響. 2014. 日本暖地畜産学会報. 査読有. In press.

4. Ogino M, Matsuura A, Yamazaki A, Irimajiri A, Takahashi Hideyuki, Komatsu T, Kushibiki S, Shingu H, Kasuya E, Hasegawa Y, Hodate K. Biological rhythms related to metabolism in Japanese Shorthorn cattle under varying environments and management techniques. 2013. Animal Science Journal. 査読有. 84: 513-26.

5. 黒瀬 陽平, 鈴木 喜博, 高橋 秀之, 児島 将康, 寒川 賢治, 長谷川 喜久, 東善行, 小林 茂樹. 放牧牛の飼養管理における血液成分濃度の有用性. 2012. 日本畜産学会報. 査読有. 83: 357-362.

6. 渡邊 一史, 高橋 辰行, 高橋 秀之, 佐藤 勝祥, 加藤 和雄, 大和田 修一, 渡邊 康一, 庄司 則章, 麻生 久. 飼料中タンパク質含量が血漿脂質成分の日内変動に及ぼ

す影響. 2012. 東北畜産学会報. 査読有.62: 1-5.

7. Masato Miyake, Hideyuki Takahashi, Eri Kitagawa, Hitoshi Watanabe, Takahiro Sakurada, Hisashi Aso and Takahiro Yamaguchi. AMPK activation by AICAR inhibits myogenic differentiation and myostatin expression in Cattle. 2012. CELL & TISSUE RESEARCH. 査読有. 349: 612-623.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. A Nomura, R Fujimura, S Khounsakunlath, K Saito, K Sakuma, T Abe, S Kaneda, T Etoh, Y Shiotsuka, H Takahashi, T Gotoh. Metabolic imprinting effect during Early Growth on Extra Cellular Matrix Construction in Japanese Black . The 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 17-20 November, 2013 in SUNTEC, Singapore.

2. Sithyphone K, R Fujimura, K Etoh, K Saito, K Sakuma, K Kaneda, T Abe, T Etoh, Y Shiotsuka, H Hasebe, H Hasebe, S Maak, A Elke, H Takahashi, A Saito, T, Gotoh. “Metabolic Imprinting Effect in Beef Production: Influence of Nutrition Manipulation during an Early Growth Stage on PPAR $\gamma$ 2 and PMRT5 Expressions in the Longissimus Muscle in Wagyu (Japanese Black). The proceedings of the 8th Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) at SUNTEC Singapore, 17-20 November, 2013.

3. A Nomura, R Fujimura, A Saito, S Khounsakunlath, K Saito, K Sakuma, T Abe, H Hasebe, S Kaneda, T Etoh, Y Shiotsuka, S Maak, E Albrecht, H Takahashi, T Gotoh. Metabolic imprinting effect during Early Growth on Extra Cellular Matrix Construction in Wagyu (Japanese Black Steers). Joint Annual Meeting 2013 in Indiana, USA.

4. Y. Kimura, H. Takahashi, A. Saito, K. Inouti, A. Nomura, Y. Shiotsuka, T. Etoh and T. Gotoh. The effect of nutrients of milk replacer on gene expressions related to intramuscular adipogenesis in longissimus muscle of Japanese Black calves. The AFELiSA 2013, 7-8 November, 2013 in Miyazaki, Japan.

5. Sithyphone, K., T, Fumita., A, Matsubara., Y, Shiotsuka., T, Etoh., H. Takahashi., T, Gotoh. “Comparison of intramuscular fat contents between muscles of Japanese Black heifers (Wagyu) fed with different nutrients”. The proceedings of the 10th International Joint Symposium among Japan, Korea and China, Topic: International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia

(AFELiSA), 2013 at Sun Hotel, November 7-8, 2013 in Miyazaki, Japan.

6. Atsuko Matsubara, Khounsakunlath Sithyphone, Kumihito Sakashita, Kenji Kawabata, Hideyuki Takahashi, Yuji Shiotsuka, Tetsuji Etoh and Takahumi Gotoh “Preliminary Report: The Pattern of Intramuscular Fat Accumulation of Several Kinds of Muscles with Growth in Wagyu” . The proceedings of the 10th International Joint Symposium among Japan, Korea and China, Topic: International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia (AFELiSA), 2013 at Sun Hotel, November 7-8, 2013 in Miyazaki, Japan.

7. 野村碧・齋藤邦彦・佐久間香織・増田恭久・岡田真人・阿部剛・小林栄治・鈴木英敏・金田修一・塩塚雄二・藤村亮佑・衛藤哲次・高橋秀之・後藤貴文. 黒毛和種における初期成長期栄養と筋内細胞外マトリックスの關係に関する研究. 第 116 回日本畜産学会、つくば市、2014 年 3 月 28 日

8. 木村優里・高橋秀之・齋藤昭・猪内勝利・野村碧・藤野亮一・塩塚雄二・衛藤哲次・後藤貴文. 黒毛和種における哺乳期の給与飼料の差異が離乳直前の筋内脂肪形成関連遺伝子群の発現に与える影響. 第 6 回日本暖地畜産学会、鹿児島市、(2013 年 10 月 26 日 - 27 日)

9. 野村碧・齋藤邦彦・佐久間香織・増田恭久・岡田真人・阿部剛・小林栄治・鈴木英敏・金田修一・塩塚雄二・藤村亮佑・衛藤哲次・高橋秀之・後藤貴文. 黒毛和種における初期成長期栄養と筋内細胞外マトリックスの關係に関する研究. 第 116 回日本畜産学会、広島市、2013 年 3 月 30 日.

10. 高橋秀之・木村優里・齋藤昭・猪内勝利・秋月亮介・野村碧・藤村亮佑・塩塚雄二・衛藤哲次・後藤 貴文. 哺乳期の給与飼料の違いが黒毛和種仔牛の成長および胸最長筋における栄養素代謝に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会、広島市、平成 25 年 3 月 30 日 .

11. 木村優里・高橋秀之・齋藤昭・猪内勝利・秋月亮介・野村碧・藤村亮佑・塩塚雄二・衛藤哲次・後藤貴文. 哺乳期の給与飼料の違いが黒毛和種仔牛の胸最長筋における脂肪形成にかかわる遺伝子群の発現への影響. 第 116 回日本畜産学会、広島市、平成 25 年 3 月 30 日 .

12. 秋月亮介・木村優里・齋藤昭・猪内勝利・野村碧・藤村亮佑・塩塚雄二・衛藤哲次・高橋秀之・後藤貴文. 黒毛和種仔牛における哺育形態の違いが肝の免疫および成長系因子

の発現に与える影響 第 116 回日本畜産学会、  
広島市、2013 年 3 月 30 日。

( )

研究者番号：

13. 西土井健・横尾郁・杉山準・石川頌平・  
塩塚雄二・衛藤哲次・高橋秀之・後藤貴文。  
牛のバイタルデータセンシングを実現する  
インプラント無線機の研究開発。第 116 回日  
本畜産学会、広島市、2013 年 3 月 30 日。

14. Aoi Nomura, Kunihiko Saitou, Kaori Sakuma,  
Tsuyoshi Abe, Eiji Kobayashi, Hidetoshi Suzuki,  
Syuichi Kaneda, Akira Saito, Yuji Shiotsuka,  
Ryosuke Fujimura, Tetsuji Etoh, Hideyuki  
Takahashi and Takafumi Gotoh. Relationship  
between early nutrition and extra cellular matrix  
construction in Japanese Black cattle. The  
Proceedings of International Symposium on  
Agriculture, Food, Environmental and Life  
Science in Asia 2012 in Deajeon, Korea.

〔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 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  
[http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kuju\\_](http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/kuju_hp/)  
hp/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋秀之 (Hideyuki Takahashi)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：60549872

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者