

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850170

研究課題名(和文)ブタ骨格筋の塩基性アミノ酸輸送体発現とタンパク質・エネルギー代謝の関係の解明

研究課題名(英文) Relationship among cationic amino acid transporter, protein metabolism, and energy metabolism in porcine skeletal muscle

研究代表者

石田 藍子 (Ishida, Aiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 家畜代謝栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：30414684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブタを用いた2週間の飼養試験から、タンパク質不足はブタ骨格筋におけるCat-1のmRNA発現を高くするが、Cat-2のmRNA発現には影響を及ぼさず、エネルギー制限ではCat-1の発現量は変化しないが、Cat-2のmRNA発現が高くなった。つづくC2C12筋管細胞を用いた実験から、タンパク質不足によるCat-1発現量の増加は、アミノ酸の不足が直接的に作用したと考えられた。一方で、制限給餌によるエネルギー制限時のCat-2発現量の増加は、エネルギーの不足の直接的な作用によるものではなく、血中のインスリン様成長因子(IGF-1)の濃度の低下による可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although The expression of Cat-1 mRNA increased in skeletal muscle of pigs fed low protein diet increased, but the expression of Cat-2 mRNA did not change. The expression of Cat-1 mRNA did not change, but the expression of Cat-2 mRNA increased in skeletal muscle of pigs restricted diet. The results of C2C12 experiment suggest that the deficiency of amino acid directly induce the expression of Cat-1 mRNA. Moreover, the results of C2C12 experiment suggest that the increase of Cat-2 expression by restrictive diet was not induced directly by energy restriction, but by low concentration of IGF-1 of serum.

研究分野：家畜栄養

キーワード：ブタ 塩基性アミノ酸トランスポーター タンパク質栄養 エネルギー不足

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内におけるアミノ酸は、体タンパク質の構成成分であるとともに、食肉となる骨格筋においては、遊離アミノ酸は呈味成分となる(Nishimura and Kato, 1988, Food Rev. Int.). アミノ酸の細胞内外への細胞膜透過は、膜たんぱく質であるアミノ酸トランスポーターが媒介する。アミノ酸トランスポーターは、遊離アミノ酸プールの調節をしていると考えられているが、生体における骨格筋の栄養状態の変化に対するアミノ酸トランスポーター発現の適応については情報が無い。

(2) 申請者は成長中のブタの複数の骨格筋におけるアミノ酸トランスポーターの発現について調べた。その結果、アミノ酸トランスポーターの一つでブタの第一制限アミノ酸であるリジンやアルギニンなど塩基性アミノ酸を輸送する Cationic amino acid transporter (Cat)の発現量は、Cat-1が成長中に1日齢の1/5まで減少し、一方でCat-2は5倍に増加した。さらに、ブタおよびラットヘリジン含量の低い飼料を3週間給与したところ、リジン不足により骨格筋におけるCat-1のmRNA発現量が増加し、Cat-2発現量は変わらなかった。これらのことから骨格筋におけるCat-1、Cat-2の発現制御は異なる可能性が示唆された。また、ブタのCats発現量を骨格筋間で比較すると、Cat-1は骨格筋間に差がないが、Cat-2は胸最長筋、大腿二頭筋、菱形筋の順にII型筋線維が多い骨格筋ほど高かった。I型筋線維は酸化的リン酸化でエネルギーを産生し、II型筋線維は解糖系でエネルギーを産生する。また、上記のように、リジン不足飼料の給与によってCat-2発現量は変わらなかったことから、Cat-2はタンパク質代謝だけでなく、骨格筋におけるエネルギー代謝にも関与する可能性が考えられた。このように、Cat-1とCat-2は発現制御が異なり、さらにタンパク質代謝だけでなくエネルギー代謝にも関与すると考えられるが、これまでにアミノ酸トランスポーターと骨格筋におけるタンパク質代謝ならびにエネルギー代謝については検討されていない。

## 2. 研究の目的

申請者は、培養骨格筋細胞における培地中リジン不足によるCATs発現への影響を調べた結果、Cat-1およびCat-2の発現量が増加することを確認した。これはブタおよびラットで得た結果と異なる。この理由として生体内では、栄養の影響によるアミノ酸濃度の変化だけでなく、同時にホルモン濃度の変化が生じることが影響していると考えられる。このことから、生体におけるCatsの発現制御機構も、培養骨格筋細胞を用いてアミノ酸およびエネルギー源とホルモン濃度との関係についても組み合わせることで検討を行う必要があ

る。

## 3. 研究の方法

ブタへの低タンパク質飼料給与の実験および、制限給餌によるエネルギー制限の実験をおこない、タンパク質代謝およびエネルギー代謝によるCat-1とCat-2の発現量調節の違いについて明らかにする。また、このとき生体内で変化するの血中のホルモンを測定し、Cat-1、Cat-2発現に関与するホルモンを決定する。生体による実験の結果を基に、培養骨格筋細胞を用いてアミノ酸制限、エネルギー制限およびホルモン添加の実験を実施し、Cat-1およびCat-2の発現量に栄養素、ホルモン濃度が及ぼす影響について明らかにする。これらの実験を通じて、骨格筋におけるCat-1およびCat-2のタンパク質代謝・エネルギー代謝への関与について明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) 栄養生理学的制御がブタ骨格筋におけるCat-1およびCat-2の発現とタンパク質代謝およびエネルギー代謝へ及ぼす影響を検討するために、ブタを用いた飼養試験を実施した。始めに、タンパク質栄養について実験をおこなった。28日齢LWD種ブタ去勢雄を12頭用いて、粗タンパク質(CP)含量が21%の飼料を給与する対照区と、CP16%の飼料を給与する低タンパク質区に振り分け、2週間給与した。試験終了時に、血液、胸最長筋、菱形筋および大腿二頭筋を採取した。飼料摂取量は対照区と低タンパク質区で有意な差が無かったが、日増体重および飼料効率は低タンパク質区で有意に低くなり( $P<0.05$ )。試験計画に沿った低タンパク質栄養状態になったと考えられた。その時の骨格筋におけるCat-1の発現量は、胸最長筋、大腿二頭筋では低タンパク質区で有意に高くなり( $P<0.05$ )、菱形筋では低タンパク質区で高い傾向があった( $P=0.11$ )。一方で、Cat-2の発現量は、いずれの骨格筋でも低タンパク質飼料給与による影響はなかった。血中のグルコースおよびコルチゾールは給与飼料による有意な差は無く、インスリンおよびインスリン様成長因子(IGF-1)は低タンパク質飼料の給与により低くなった( $P<0.05$ )。以上のことから、Cat-1のmRNA発現はタンパク質不足の影響を受けるが、Cat-2は影響を受けないことが明らかになった。

(2) エネルギー制限による栄養生理学的制御がブタ骨格筋におけるCat-1およびCat-2の発現とタンパク質代謝およびエネルギー代謝へ及ぼす影響を検討するために、ブタを用いた飼養試験を実施した。処理区は、対照区と、対照区と同じCP21%の対照飼料を76%に制限して給与するエネルギー制限区およびCP16%の飼料を給与する低タンパク質区である。前述の実験では、低タンパク質区で

はタンパク質のみが制限されていたが、この実験ではタンパク質栄養に加えてエネルギー制限状態となる。28日齢LWD種ブタ去勢雄を各区6頭、計18頭用いて2週間給与し、試験終了時に、血液、胸最長筋、菱形筋および大腿二頭筋を採取した。飼料摂取量は対照区と低タンパク質区で有意な差が無かったが、実験計画通り制限区では有意に飼料摂取量は低かった。日増体重および飼料効率は制限区で有意に低くなり ( $P < 0.05$ )。飼料効率は低タンパク質区でのみ低かった。このときのCP摂取量は、対照区に比べて制限区と低タンパク質区で低く、エネルギー摂取量では対照区と低タンパク質区には差がなかったが、制限区でのみ低くなり、試験計画に沿った低タンパク質栄養状態または、低タンパク質およびエネルギー制限になったと考えられた。その時の骨格筋におけるCat-1の発現量は、胸最長筋、大腿二頭筋および菱形筋において低タンパク質区で有意に高くなり ( $P < 0.05$ )。制限区では有意な差がなかった。一方で、Cat-2の発現量は、いずれの骨格筋でも低タンパク質飼料給与による影響はなく、胸最長筋と菱形筋において制限区で有意に高くなった。血中のグルコースおよびコレステロールは給与飼料による有意な差は無く、IGF-1は制限区で対照区より低くなった ( $P < 0.05$ )。以上のことから、タンパク質不足はCat-1のmRNA発現を高くするが、Cat-2へは影響を及ぼさず、エネルギー制限はCat-2の発現量を増加させることが明らかになった。

(3) ブタ生体を用いた研究では、栄養制御によるCat-1およびCat-2の発現量の変化について検討したが、生体で観察されたCat-1およびCat-2の発現量の変化について、栄養による直接の作用と、血中のホルモン濃度の変化による生理的な作用を分けて検討することを目的として、C2C12の筋芽細胞を用いた実験をおこなった。最初に、一連の実験に用いるC2C12筋芽細胞の、筋管細胞への分化に伴うCat-1およびCat-2の発現量の変化について検討した。C2C12筋芽細胞を分化誘導する前日から、分化誘導6日後までのCat-1、Cat-2および筋分化の指標となる遺伝子の発現量を測定した。その結果、筋管への分化に伴い、分化前から分化6日後までCat-1の発現量は変化しなかった ( $P > 0.05$ ) が、Cat-2の発現量は、分化誘導後1日で増加し、その後6日まで維持された ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、筋芽細胞から筋管への分化に、Cat-1ではなく、Cat-2が重要な働きをしている可能性が示唆された。

(4) 生体におけるリジン、タンパク質およびエネルギー制限のモデルとして、定法で用いられるダルベッコ改変イーグル (DMEM) 培地からそれぞれリジンとグルコースを除いた、リジン欠乏培地およびグルコース欠乏培

地を用いて、C2C12を用いて培養実験をおこなった。その結果、リジン欠乏により培養6時間でCat-1 mRNA発現量は増加し、24時間後も高かった ( $P < 0.05$ ) が、Cat-2発現量はリジン欠乏培地での培養で変化しなかった ( $P > 0.05$ )。一方、グルコース欠乏培地で培養したエネルギー制限状態において、Cat-1は培養12時間後から発現量が増加し、24時間後にも高かった。Cat-2は12時間後から減少し、24時間後はさらに減少した ( $P < 0.05$ )。

(5) タンパク質や、エネルギーの栄養状態により、生体内で濃度が変化するホルモンによるCat-1およびCat-2の発現量への影響を調べるために、インスリン、インスリン様成長因子IGF-1、デキサメタゾン (Dex)、トリヨードサイロニン (T3) をDMEM培地に添加してC2C12筋管細胞を培養した。その結果、Cat-1 mRNAはインスリン添加により培養6時間および24時間で、IGF-1添加により培養6時間で発現量が増加した ( $P < 0.05$ )。また、Dexの培地への添加でCat-1は培養6時間、Cat-2は培養3, 6, 24時間で発現量が減少した ( $P < 0.05$ )。T3の添加ではCat-1およびCat-2のいずれも発現量に変化がなかった。これらの結果から、インスリンおよびIGF-1はCat-1の発現量を増加し、一方でCat-2の発現量を低下させるが、DexはCat-1、Cat-2ともに発現量を低下させることが明らかになった。

(6) 以上の結果より、ブタへの低タンパク質飼料給与によりCat-1の発現量は増加するが、飼料摂取制限では増加しないこと、一方で、Cat-2は低タンパク質飼料給与によりCat-2の発現量は影響しないが、飼料摂取制限で増加することが明らかになった。つづくC2C12筋管細胞を用いた実験から、低タンパク質飼料給与によるCat-1発現量の増加は、アミノ酸の不足による直接的な作用である可能性が示唆された。一方で、制限給餌によるCat-2発現量の増加は、エネルギーの不足の直接的な作用ではないことが示唆された。IGF-1の濃度の低下が、Cat-2の発現量の増加を引き起こした可能性も考えられるが、その点についてはさらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

石田 藍子、芦原 茜、井上 寛暁、松本 光史、田島 清、授乳豚への飼料用玄米多給が飼養成績および産子の増体に及ぼす影響、日本畜産学会第122回大会、2017年3月29日、神戸大学(兵庫県・神戸市)

石田 藍子、中島 一喜、Changes in expression of CAT-1 and CAT-2 mRNA during myogenesis、The 17th AAAP

(Asian-Australasian Association of Animal Production Societies) Animal Science Congress、2016年8月23日、九州産業大学(福岡県・福岡市)

石田 藍子、中島 一喜、勝俣 昌也、ブタ培養筋肉細胞の分化にともなう Cat-1 および Cat-2 発現量の変化、日本畜産学会第120回大会、2015年9月11日、酪農学園大学(北海道・江別市)

石田 藍子、芦原 茜、中島 一喜、勝俣 昌也、エネルギー制限がブタの筋肉における Cat-1 および Cat-2 発現量に及ぼす影響、日本畜産学会第119回大会、2015年3月29日、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 藍子 (ISHIDA, Aiko)

農研機構・畜産研究部門 家畜生理栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：30414684