

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08067

研究課題名(和文) 損傷筋線維除去システムにおける酸化タンパク質の種類と役割

研究課題名(英文) The role of oxidized proteins in the removal of damaged muscle fibers

研究代表者

岩崎 智仁 (Iwasaki, Tomohito)

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：30305908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：mdxマウス骨格筋の筋損傷に伴う酸化タンパク質の形成について調査した。骨格筋(大腿四頭筋)中において、最初にタンパク質SH基が可逆的に酸化され、次いで不可逆的に酸化されたタンパク質(ジチロシンやカルボニル化タンパク質)が生成された。電子顕微鏡にて観察すると筋小胞体の膜に酸化タンパク質の存在が認められた。さらに酸化された領域(損傷筋線維)にプロテアーゼが局在しており、不可逆的な酸化タンパク質の形成に伴う損傷筋線維の分解が明らかになった。プロイラーの異常硬化胸肉中にはリポフスチンの蓄積と酸化タンパク質の形成が明らかとなった。異常硬化胸肉の発現に及ぼす酸化ストレスの影響が強く示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家畜の骨格筋は人のタンパク質源として重要である。そのために、その産生量を増加させるためのさまざまな畜産技術の発展が必要である。筋損傷-除去-再生(肥大)プロセスの筋損傷ステージでの酸化タンパク質形成が、損傷領域の除去に必要であることが確認され、筋肥大に重要であることが明らかになった。また、養鶏において、過度な酸化ストレスにさらされることでプロイラーの異常硬化胸肉が発現していることも明確になった。本結果で明らかになった知見は、給餌飼料の栄養価などを適切化することで、異常硬化胸肉発現を低減させる飼育方法の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The formation of oxidized proteins during muscle injury was investigated. In skeletal muscle (quadriceps muscle), the protein SH group was first reversibly oxidized, and then irreversibly oxidized proteins (dityrosine and carbonylated proteins) were generated. Electron microscopy revealed the presence of oxidized proteins in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. Furthermore, endogenous proteases were localized in the oxidized region (damaged muscle fibers), indicating that the degradation of damaged muscle fibers proceeds with the formation of irreversibly oxidized proteins. Accumulation of lipofuscin and formation of oxidized proteins was evident in wooden breast meats of chickens. It is strongly suggested that oxidative stress influences the development of wooden breast chickens.

研究分野：食肉科学

キーワード：酸化タンパク質 筋損傷 鶏異常硬化胸肉

1. 研究開始当初の背景

生体内で生じる様々な酸化ストレスが骨格筋の萎縮や疾病(筋ジストロフィー)に関係していること、さらに、適切な酸化ストレス自体が骨格筋の環境適応能力や再生に深く関与していること報告されている。これまでにデシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルであるmdxマウスを用いて、タンパク質中SH基の酸化還元状態を可視化する手法(Thiol Histology)を考案し、筋損傷を受けた筋線維中のタンパク質が特異的に酸化されていることを明らかにした(Iwasaki et al., 2013)。また、人為的に損傷させた損傷初期の筋線維中のタンパク質も酸化されており、mdxマウスと同様の様相であったことから、損傷筋線維におけるタンパク質の酸化が筋損傷-除去-再生という骨格筋の生理的イベントにおいて普遍的な現象であるとの確信を得た。

2. 研究の目的

筋組織の損傷とその除去機構においてタンパク質の酸化は明らかに関係があり、この関わりを明らかにすることで、損傷-除去-再生(肥大)という骨格筋生理の重要なイベントをより深く理解することに大きく寄与できるだろうと予想した。さらに、得られた知見を基に、近年、世界的に問題視されているプロイラーの筋肥大異常(Sihvo et al., 2014)における酸化タンパク質の関わりを明らかにして、本研究で得られた筋損傷と酸化タンパク質の形成に関わる知見を養鶏産業へ還元することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mdxマウス大腿四頭筋の採取と急速凍結ならびに凍結連続切片の作製

自家繁殖させた8-12wksのメスのmdxマウスの左右の大腿四頭筋を採取し、一方はトラガカントガムにて包埋し液体窒素下で冷却したイソペンタンにて急速凍結し、凍結切片作製用試料とした。もう一方の大腿四頭筋は液体窒素下で急速凍結した。凍結切片作製用試料から、10 μ m厚の切片を連続で作製して各種の組織化学染色に用いた。

(2) mdxマウス大腿四頭筋の酸化型SH基含有タンパク質量の測定

マウスの大腿四頭筋を液体窒素下で乳鉢乳棒を用いて粉末にし、液体窒素で予め冷却してある2.0 ml チューブに液体窒素とともに入れた。次に、別の2.0 mlチューブに10 mg程度計り取り、直ちに、-20 $^{\circ}$ C に冷却した20% TCA /アセトン筋肉粉末10mgに対して500 μ l加えた。軽くボルテックスした後、ポリトロンで10-20秒程度ホモジナイズした。後の操作は2tag-assay(Armstrong et al., 2011)にて行なった。

(3) 凍結連続切片を用いた各種酸化タンパク質の局在解析

上記で調製した凍結切片を用いて、組織中の酸化タンパク質の局在を調査した。調査した酸化タンパク質種は、カルボニル化タンパク質、ニトロシル化タンパク質、ならびにジチロシンである。それぞれの酸化タンパク質を検出するために、対応する抗体ならびに化学修飾手法を用いて調査を行なった。

(4) 灌流固定法による酸化型SH基含有タンパク質の電子顕微鏡による局在観察

酸化型SH基の検出方法についてはThiol Histology (Iwasaki et al, 2013) の変法を用いた。実際の実施

方法については以下の通りである．mdxマウスを3%イソフルランのガス麻酔下にて開胸し，左心室から50 mM NEMを含むPBSを60分間灌流させた．その後，4%PFAを含むPBSを30分間灌流させて固定した．固定後のマウスから大腿四頭筋を採取して，4%PFAを含むPBSに浸漬して60分間固定処理を行なった．0.3ならびに0.6Mスクロースでそれぞれ3時間処理したのちに，トラガントガムに包埋し，液体窒素下で冷却したイソペンタンにて急速凍結した．得られた凍結試料から20 μ m厚の厚切り凍結切片を連続で作製した．スライドガラス上でTCEPにて酸化型SH基を還元処理し，生じた還元型SH基をマレイミド標識された金コロイドと反応させた．その後，定法にて導電染色，脱水，ならびにエポキシ樹脂包埋を行い，ガラス接地面から15 μ mの距離から100nm厚の超薄切片を単穴グリットに回収してTEM観察を行い，金コロイドが標識されている筋肉組織部位を調査した．

(5) ニワトリ異常硬化胸肉の採取と理化学分析

種卵場から入手したRoss308系ブロイラーの種卵を孵化させ，酪農学園大学FEDREC付属実験鶏舎にて45-55日齢まで飼育した．血液検査のために，飼育途中で翼下静脈より3-5mLの血液を採取して血液生化学検査を実施した．また，臨床所見として翼の挙上試験を行い，異常硬化胸肉発現の有無を確認した．飼育した全ての鶏を剖検し，浅胸筋を採材した．採取した胸肉の一部は，組織化学観察のためにホルマリン固定，電子顕微鏡観察用にハーフカルノフスキー溶液固定を行なった．さらに，残存した浅胸筋の部位ごとに剪断力を測定して胸肉における硬さの分布解析を行なった．測定後の残存試料を用いて，定法にて凍結切片作製試料を調製した．

(6) ニワトリ異常硬化胸肉中のリポフスチンと酸化タンパク質の定量と局在観察

リポフスチンの定量は，リポフスチン自体が自家蛍光を持つことを利用した．すなわち，上記にて調製した凍結切片用急速凍結試料から10 μ m厚の凍結切片を作製し，暗所での乾燥後に封入材にて封入し，蛍光顕微鏡にて励起される自家蛍光を観察した．また同一の連続切片のシュモール反応部分と自家蛍光部位が一致することを確認し，自家蛍光顆粒をリポフスチンとした．この自家蛍光顆粒の単位面積当たりの占有率を画像解析にて算出し，リポフスチンの割合とした．異常硬化胸肉中の酸化タンパク質の組織化学的検出については，mdxマウスで実績のある抗体と手技を用いた．

4. 研究成果

(1) 各種酸化タンパク質の局在解析

mdxマウスの大腿四頭筋中の筋細胞の損傷→分解→再生の中で生成される酸化タンパク質の種類について組織化学的に調査を進めた．過収縮した筋線維と内在性プロテアーゼによって分解が始まった初期の損傷部位で形成されている酸化

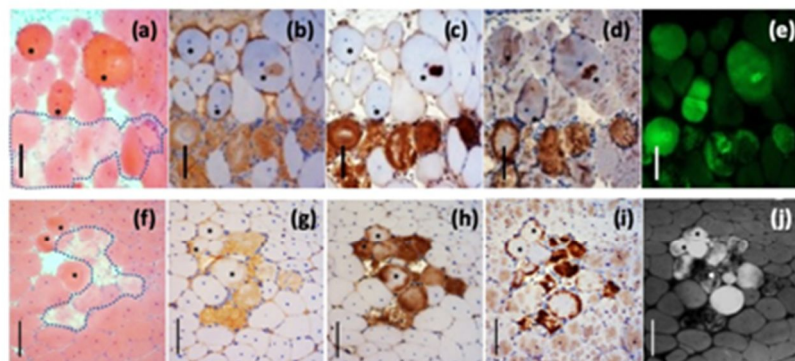


図1. mdxマウス(8wks, ♀)大腿四頭筋中の酸化タンパク質の分布.

(a, f) HE染色像, (b, g) カルボニル化タンパク質, (c, h) ジチロシン, (d, i) ニトロシル化タンパク質, (e, j) 酸化型SH基含有タンパク質. バー; 100 μ m.

タンパク質について調べた結果を示した。過収縮筋線維は、HE染色にて濃く染まっていた(図1a, h)。損傷筋線維領域を青色の点線で囲ってあるが、上下いずれの領域も、筋細胞内にある筋原線維等がプロテアーゼ分解を受けて薄いピンク色を呈していた。過収縮筋線維では、SH基の酸化が著しく生じていたが、カルボニルならびにニトロシル化は外周から生じており中心部では形成されていなかった。そしてジチロシンも同様の形成傾向であった。一方、損傷筋線維では、カルボニル、ニトロシル化およびジチロシンが形成されていたが、SH基の酸化の程度は低くなった。マクロファージが侵入した損傷筋線維領域と中心核をもち未成熟な再生筋線維での酸化タンパク質の形成について調べた。損傷筋線維領域に形成されている酸化タンパク質は図1と同様であったが、マクロファージにはジチロシン以外、酸化タンパク質が形成されていなかった。幼若な再生筋線維においては、正常な筋線維と同様に酸化タンパク質の形成は認められなかった。各ステージにおける内在性プロテアーゼでの活性についても調査を行い、損傷筋線維領域ならびにマクロファージ浸潤損傷筋線維領域では、いずれも種々のプロテアーゼが局在している様子が認められた。これらのことから、傷害を受けた筋線維で発生したタンパク質の酸化は以下のように進行することが明らかになった。すなわち、最初にタンパク質SH基が可逆的に酸化され、次いで不可逆的に酸化されたタンパク質が生成される。さらに酸化された領域(損傷筋線維)に内在性プロテアーゼが局在しており、損傷筋線維の分解が進んでいることが示唆された。mdxマウスの筋線維再生の各ステージで、酸化タンパク質の種類がわずかに異なること、ならびに内在性プロテアーゼの発現が酸化タンパク質の発現に連動していることが明らかになった。

(2) TEMによる酸化型SH基含有タンパク質の局在観察

タンパク質を構成するアミノ酸の一部に存在するSH基は、最も感受性の高い(酸化されやすい)官能基の一つである。したがって、酸化されたSH基を持つタンパク質の局在を電子顕微鏡で同定することが可能となれば、

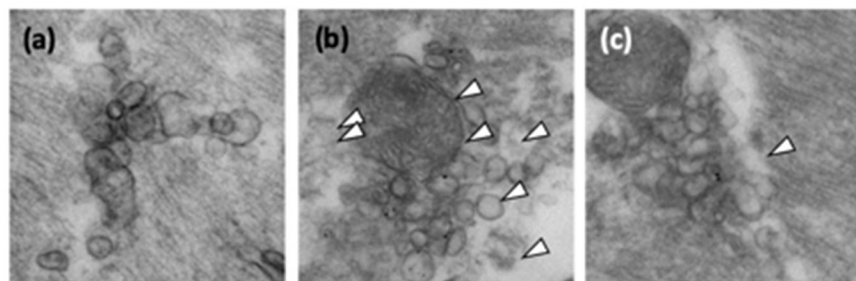


図2. mdxマウス(♀)筋小胞体構造中酸化タンパク質の電子顕微鏡観察。

(a)コントロール(金コロイド標識無), (b)酸化型SH基, (c)バックグラウンド(還元処理無)。矢じりは金コロイドを示す。

筋損傷初期あるいは今後損傷するであろう部位の特定につながると予想される。しかしながら、酸化型SH基含有タンパク質の局在観察法については、これまでに既報が存在しないことから、Thiol histology (Iwasaki et al., 2013)を参考に新規に考案した。結果として、金コロイドが筋小胞体と考えられる組織構造部位に多く局在している様子が観察された。筋小胞体表面に存在するRyR(リアノジン受容体)はその構造中に多くのシステイン残基を有しており、酸化ストレスによって酸化されて、筋小胞体中のカルシウムイオンをリークしやすくなることが報告されている。したがって、本研究によって金コロイド標識された酸化タンパク質は、RyRである可能性が考えられた。

(3) ニワトリ異常硬化胸肉中のリポフスチンと酸化タンパク質の定量

プロイラーに発現している異常硬化胸肉の筋組織にある損傷筋線維の様子は、mdxマウスでの損傷筋線維構造や人為的な損傷筋線維構造に共通する部分があることから、我々はニワトリ異常硬化胸肉が酸化ストレスによって生じると予測を立てた。mdxマウスでは筋組織中に加齢マーカーであるリポフスチンの異常蓄積が観察されたことから、この異常硬化胸肉のリポフスチンの観察を試みた。結果として、異常硬化胸肉中にリポフスチンの蓄積が認められた。さらにその蓄積は、より硬い頭部表皮側に多く蓄積していることが明らかになった。このリポフスチンの蓄積と肉の硬さである剪断力との関連は強い正の相関 ($R=0.604$) を示した。同様に筋肉中の酸化タンパク質の定量を2tag-assayにて分析し、有意に高い割合で酸化タンパク質が存在していることを示した。その種類や組織分布についても調査を進め、mdxマウスに存在していた酸化タンパク質種の一部(ニトロシル化タンパク質とジチロシン)の損傷筋線維領域への局在が認められた。以上の結果から、プロイラーの異常硬化胸肉は酸化ストレスの影響を受けていることが強く示された。本結果で明らかになった知見は、給餌飼料の栄養価などを適切化することで、異常硬化胸肉発現を低減させる飼育方法の開発に繋がるものである。

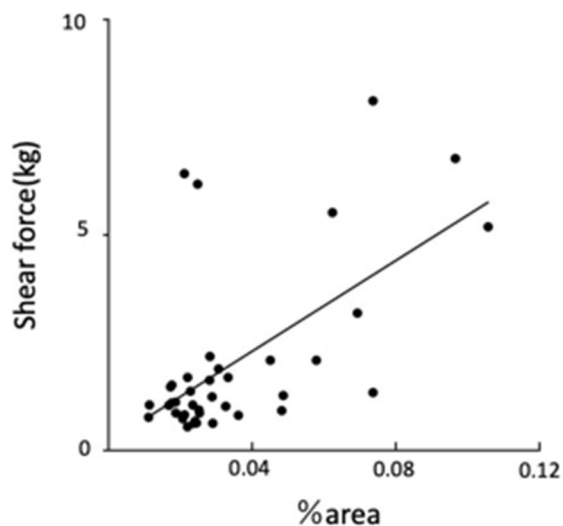


図3. 剪断力価とリポフスチン蓄積量の関係

<引用文献>

- Armstrong, A. E., Zerber, R., Fournier, P. A., and Arthur, P.G. (2011). *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 510-517.
- Iwasaki, T., Terrill, J. R., Shavlakadze, T., Grounds, M. D., and Arthur, P. G. (2013). *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 1408-1416.
- Sihvo, H.K., Immonen, K., and Puolanne, E. (2014). *Veterinary Pathology*. 51, 619-623.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hasegawa Yasuhiro, Hara Takayuki, Kawasaki Takeshi, Yamada Michi, Watanabe Takafumi, Iwasaki Tomohito	4. 巻 315
2. 論文標題 Effect of wooden breast on postmortem changes in chicken meat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 126285 ~ 126285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2020.126285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Takeshi, Iwasaki Tomohito, Ohya Itsuki, Hasegawa Yasuhiro, Noguchi Mitsuo, Watanabe Takafumi	4. 巻 57
2. 論文標題 Effects of Sampling and Storage Method on Chicken Blood Glucose Measurement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 241 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwasaki Tomohito, Masuda Yasuyuki, Hasegawa Yasuhiro, Maeda Naoyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of actomyosin form extracted from skeletal fast muscle on the structural and rheological properties of heat-induced gels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Structure	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Takeshi, Iwasaki Tomohito, Yamada Michi, Yoshida Takashi, Watanabe Takafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Rapid growth rate results in remarkably hardened breast in broilers during the middle stage of rearing: A biochemical and histopathological study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大矢樹, 松田幸大, 井林功太, 長谷川靖洋, 岩崎智仁
2. 発表標題 筋損傷部位で生じる酸化タンパク質への金コロイド標識と電子顕微鏡観察の試み
3. 学会等名 2019年度日本微鏡学会北海道支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上坂朋美, 齊藤美悠, 大久保彩夏, 長谷川靖洋, 渡邊敬文, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 Wooden Breastにおける神経筋接合部の変化
3. 学会等名 2019年度日本微鏡学会北海道支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎智仁
2. 発表標題 ニワトリ異常硬化胸肉の組織と物性
3. 学会等名 第46回食品の物性に関するシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎智仁
2. 発表標題 ニワトリ異常硬化胸肉の組織と構造
3. 学会等名 食品科学工学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 森祐輔, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 Wooden Breast発現鶏のミトコンドリア性状
3. 学会等名 2019年度日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 森祐輔, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 ブロイラー異常硬化胸肉におけるミトコンドリア異常
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎智仁, 稲積佳祐, 長谷川靖洋, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志
2. 発表標題 ニワトリ異常硬化胸肉ミオシンの理化学特性
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 伊東麻夏, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 ブロイラーの異常硬化胸肉におけるリポフスチン蓄積
3. 学会等名 2018年度日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊敬文, 亀谷清和, 大野伸彦, 瀧本恭子, 岩崎智仁, 川崎武志, 平松浩二
2. 発表標題 ニワトリの1型と2b型筋線維のミトコンドリアの3次元構造解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田悠生, 沼田佳樹, 森祐輔, 長谷川靖洋, 山田未知, 渡邊敬文, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 異常硬化胸肉を発現したニワトリ骨格筋の顕微鏡観察
3. 学会等名 2018年度日本微鏡学会北海道支部学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 渡邊敬文, 川崎武志, 山田未知, 岩崎智仁
2. 発表標題 酸化ストレスによって生じるプロイラー異常硬化胸肉の性状
3. 学会等名 2018年度日本微鏡学会北海道支部学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎智仁, 川原井圭, 田上貴祥, 長谷川靖洋
2. 発表標題 骨格筋損傷部位における酸化タンパク質の組織化学染色
3. 学会等名 第73回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 岩崎智仁, 川崎武志, 山田未知, 渡邊敬文
2. 発表標題 異常硬化胸肉におけるリポフスチンの蓄積
3. 学会等名 日本家禽学会2017年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊敬文, 瀧本恭子, 川崎武志, 岩崎智仁, 平松浩二
2. 発表標題 ニワトリの速筋と遅筋におけるミトコンドリアの3次元構造解析
3. 学会等名 日本畜産学会第123回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊東麻夏, 長谷川靖洋, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 ブロイラーの異常硬化胸肉におけるリポフスチン蓄積
3. 学会等名 2017年度日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川靖洋, 伊東麻夏, 渡邊敬文, 山田未知, 川崎武志, 岩崎智仁
2. 発表標題 ブロイラーの異常硬化胸肉におけるリポフスチン蓄積
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎智仁, 長谷川靖洋, 山田未知, 渡邊敬文, 前田尚之, 阿部茂, 渡邊治, 川崎武志
2. 発表標題 プロイラー異常硬化ムネ肉の官能特性
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018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
研究協力者	渡邊 敬文 (Watanabe Takafumi)	酪農学園大学・獣医学類・准教授 (30109)	
研究協力者	川崎 武志 (Kawasaki Takeshi)	人と鳥の健康研究所・代表社員	
研究協力者	長谷川 靖洋 (Hasegawa Yasuhiro)	食と健康学類・助教 (30109)	