

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580136

研究課題名（和文） 脂肪酸による骨格筋線維型変換機構：培養筋線維によるアプローチ

研究課題名（英文） Analysis of skeletal muscle fiber type transition by fatty acids using isolated fiber culture system

研究代表者

水野谷 航（MIZUNOYA WATARU）

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：20404056

研究成果の概要（和文）：骨格筋には、遅筋型と速筋型という異なる線維型が存在し、骨格筋の代謝能力や疲労耐性を左右する。持久トレーニングを行うと、遅筋型が増えることが知られていたが、食品成分による筋線維型への影響は知られていなかった。本研究では、まずラットの筋線維を生体外で培養できる実験系の確立に成功し（単離筋線維）、さらに魚油に含まれるエイコサペンタエン酸がこの単離筋線維に対し、遅筋型で発現が多い代謝関連因子の遺伝子発現量を直接的に増加させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle fibers are classified as slow-type and fast-type based on color, metabolism and contractile properties. Here, we tested whether food component could affect muscle fiber type. Here, we succeeded in establishing a rat muscle fiber-culture assay, in which fibers express mature myofibrillar proteins. Then, we revealed that PDK4 and UCP3 mRNAs, known target genes of PPAR δ and abundant in slow-type fibers, were up-regulated when eicosapentaenoic acid (EPA), abundant in fish oil, was added to fiber cultures for 24 hours.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：栄養化学、骨格筋、筋線維型、脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

骨格筋線維は、遅筋型（1型、赤筋）と、速筋型（2B型、白筋）および中間型（2A, 2X

型）の3種類に大きく分けられる。これらの指標は主として、収縮タンパク質（ミオシン重鎖アイソフォーム）あるいは代謝能力（酸化系酵素活性、ミトコンドリア量）

である。運動トレーニングにより遅筋型の筋線維が増加し、不活動により速筋型の筋線維が増加することが多くの研究により示されているが、現在まで、運動以外で筋線維型を変化させる要因はほとんど示されていない。

核内受容体とはリガンド依存的に標的遺伝子の発現を制御する転写因子である。これまでに核内受容体の一種ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) δ を骨格筋に過剰発現させることで、遅筋型ミオシン重鎖の発現増加や酸化系酵素発現の増加が引き起こされることが報告されている(1)。脂肪酸は PPAR δ の内因性リガンドとなることから、筆者は『骨格筋内に流入する脂肪酸により PPAR δ が活性化され、それに呼応して遅筋型筋線維へ変化する』という仮説を立てた。脂肪酸の PPAR に対するリガンド活性は飽和脂肪酸より多価不飽和脂肪酸 (PUFA) で高いという特徴があることから、筆者は脂肪酸組成が異なる食用油(ラード、大豆油、魚油) をラットに4週間与え、筋線維タイプを調べた。その結果、PPAR δ リガンド活性が高いと考えられる n-3 系 PUFA を多く含む魚油摂取群ではラード、大豆油摂取群に比べ、遅筋型への筋線維型移行が観察された(2)。しかしながら、ここで見られた変化が、食用油由来の脂肪酸が PPAR δ を介し筋線維に直接作用したために生じたかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪酸が筋線維タイプに及ぼす影響を、培養筋細胞を用いた *in vitro* の実験系から、直接的に証明することを目指した。つまり、ラットから筋線維を単離後、各種脂肪酸を含む培地で培養し、筋線維型に関わる因子の発現量を解析することとした。そのために、本研究ではまず、ラット筋線維の単離・培養法の確立を目指し、次にその実験系を用いて脂肪酸の影響を評価することとした。

3. 研究の方法

(1) ラット筋線維の単離・培養法の確立

既に報告されているマウスの単離筋線維培養プロトコル(3,4)を参考にラット単離筋線維培養法の確立を試みた。Fischer344 雄性ラットの短趾屈筋 (FDB) から筋線維を単離・培養し、7日目まで生存率を調べた。単離筋線維と4日間分化誘導し筋管を形成させたラット筋芽細胞株 L6 で成熟筋線維の指標であるミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォームの発現量を比較した。

(2) 各種脂肪酸の PPAR δ リガンド活性測定

と単離筋線維への影響

CV-1 細胞(アフリカドリザル、腎臓由来)を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより、各種脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、 α -リノレン酸、ドコサヘキサエン酸: DHA、エイコサペンタエン酸: EPA) の PPAR δ アゴニスト活性を測定した。ラットから単離した筋線維の培地中に各種脂肪酸(パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、DHA、EPA) を終濃度 30 μ M となるように添加し、培養 72 時間後に PPAR δ の標的遺伝子であるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (PDK) 4 の mRNA 発現量を調べた。

(3) EPA あるいは PPAR δ アゴニストが単離筋線維の代謝関連遺伝子と筋収縮関連遺伝子発現へ及ぼす経時的影響

魚油に多く含まれ、n-3 系 PUFA の一種である EPA (30 μ M)、PPAR δ 特異的アゴニストである GW501516 (100 nM) を培地中に添加し、培養 12、24、72、120 時間後に脂肪代謝に関わる因子、ミトコンドリアタンパク質および MyHC アイソフォームの mRNA 発現量を調べた。

(4) EPA、PPAR δ 特異的アゴニストと PPAR δ アンタゴニスト及び RXR アゴニストの共添加試験

30 μ M EPA と 800 nM GSK0660 (PPAR δ アンタゴニスト) を共添加し、EPA による効果が PPAR δ 活性化を介して生じたかを調べた。また、PPAR δ は生体内でレチノイド X 受容体 (RXR) とダイマーを形成して働いていることが分かっている。そこで RXR のアゴニストである 30 μ M DHA と 30 μ M EPA を共添加することで EPA 単独で見られた効果が増強されるかを調べた。

4. 研究成果

(1) ラット筋線維の単離・培養法の確立

既報のマウス単離筋線維培養系の概略を述べると、マウスから FDB 筋を摘出し、コラゲナーゼ処理後、穏やかなピペッティングにより筋線維をほぐし、コラーゲンによりディッシュ上に固定する。同様の方法をラットに適用したところ、解析に必要と考えられる筋線維数および生存率が得られなかった。そこで、いくつかの実験条件について調整を行った結果、0.2% コラゲナーゼ 3 時間処理の条件で最も筋線維の生存率が高かった。コラーゲンで筋線維を固定したディッシュでは、培養日数の経過に伴い、衛星細胞と思われる単核の細胞の増殖が筋線維の周囲で認められた。筋線維以外の細胞が増殖すると筋線維のみに由来するサンプルの採取が困難になる。この問題は、コラーゲンコートを行わないことで解決した。

培養 6 日目における筋線維の生存率は上腕三頭筋で 48%、長趾伸筋で 13%、ヒラメ筋で 0% と筋組織による顕著な違いが認められた。筋組織と単離筋線維のミオシン重鎖組成を SDS-PAGE で調べたところ同一であったことから、単離操作により特定の筋線維型の選別は起こっていないことが分かった。単離操作に含まれる多くの実験条件の中でも、細胞を分散させるためのコラゲナーゼ処理条件と、筋組織の種類が生存率に大きく影響をすることが検討の結果、明らかとなった。以上の点に注意してさらに検討を重ねた結果、筋組織には FDB を、コラゲナーゼには Worthington 社の Collagenase, Type 2 を用いると、生存成績が格段に向上した。Fig.1A は FDB から単離した筋線維の写真と生細胞染色色素である Calcein-AM 陽性の筋線維である。Calcein-AM 陽性筋線維をカウントすることで、単離筋線維の生存率を経時的に測定した結果、培養 7 日目でも筋線維の生存率を 90 % 以上に維持することができた (Fig.1B)。従って培養過程で、死細胞が増えることはなく、ディッシュ上から回収した単離筋線維の RNA およびタンパク質サンプルは、ほぼ生細胞に由来すると考えられた。現在まで筋線維モデルとして用いられているラット由来筋芽細胞株 L6 を分化誘導培地で 4 日間培養し、筋管のミオシン重鎖 (MyHC) 発現量を比較した。その結果、単離筋線維では分化誘導した L6 に比べ、MyHC の発現量が高かった (Fig.1C)。単離筋線維は成熟筋線維の培養モデルとして優れていることが分かった。

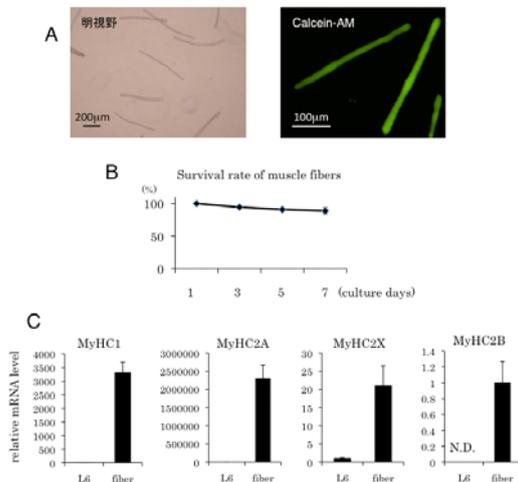


Fig 1. (A) 単離筋線維 (左) と生細胞染色色素 Calcein-AM で染色された筋線維 (右)。 (B) 単離筋線維の生存率の経時的な変化。 (C) 単離筋線維とラット筋芽細胞株 L6 における MyHC 発現量の比較。単離筋線維は単離直後。L6 は分化誘導培地で 4 日間培養し、筋管を形成させた。

(2) 各種脂肪酸の PPARδ リガンド活性の測定

CV-1 細胞に PPARδ-GAL4 キメラタンパ

ク質を発現させたルシフェラーゼレポーターアッセイで、各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、α-リノレン酸、DHA、EPA) の PPARδ リガンド (アゴニスト) 活性を測定した。結果、オレイン酸、アラキドン酸、EPA が他の脂肪酸に比べ、高い PPARδ リガンド活性を示した (Fig.2)。

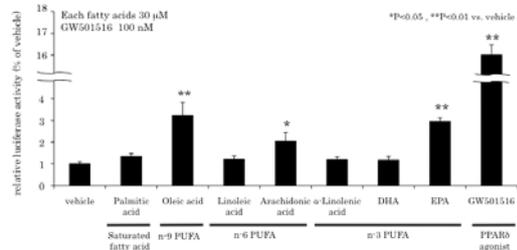


Fig 2. ルシフェラーゼレポーターアッセイによる各種脂肪酸の PPARδ アゴニスト活性測定。脂肪酸はそれぞれ終濃度 30 µM で添加し、添加時間は 24 時間とした。GW501516 は PPARδ の特異的アゴニストであり、終濃度 100 nM で添加した。

ラットから単離した筋線維の培地中に各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、DHA、EPA) を終濃度 30 µM となるように添加し、培養 72 時間後に PPARδ の標的遺伝子である PDK4 の mRNA 発現量を調べた。その結果、オレイン酸、EPA の単離筋線維への添加により、PDK4 の発現量が増加した (Fig.3)。この結果はルシフェラーゼレポーターアッセイの結果と非常に類似した結果であった。

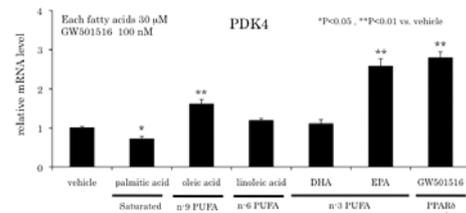


Fig 3. 各種脂肪酸添加後の単離筋線維の PDK4 発現量。培養液に終濃度 30 µM となるように添加して培養 72 時間後に PDK4 の発現量を観察した。

(3) EPA あるいは PPARδ アゴニストが単離筋線維の代謝関連遺伝子と筋収縮関連遺伝子発現へ及ぼす経時的影響

培養 12 時間の結果を Fig.4 に示した。まず PPARδ 特異的アゴニストの影響について説明する。Fig.4 の黄色いバーが GW501516 処理区である。単離筋線維への GW501516 の添加により代謝関連酵素である PDK4、ミトコンドリア外膜で働く代謝酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 1a、ミトコンドリアに存在する UCP3、クエン酸合成酵素、ミトコンドリアタンパク質である porin の発現量が増加した。収縮タンパク質においては、GW501516 の添加により遅

筋タイプの MyHC1 が減少し、中間タイプの MyHC2X、速筋タイプの MyHC2B が増加した。収縮タンパク質についての影響は、速筋タイプの増加という実験開始前の予想と反対の結果であった。この他にも培養 24、72、120 時間後の影響も観察した結果、程度の差はあったものの同様の傾向が得られた。反応のピークは添加 12 時間後であった。また、解糖系酵素の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHa) と遅筋タイプのトロポニン (TNNI1) の発現量は GW501516 による影響を受けなかった。

次に EPA の効果を説明する。Fig.4 の青色のバーが EPA 処理区である。EPA の添加により培養 12 時間後に PDK4、UCP3、クエン酸合成酵素、porin の発現量が増加し、収縮タンパク質においては MyHC2X、MyHC2B が増加した。これらの反応は GW501516 添加による反応と非常に似た傾向であった。GW501516 添加試験と同様に培養 24、72、120 時間後の影響も観察した結果、程度の差はあったものの同様の傾向が得られた。反応のピークは添加 12 時間後であった。以上の結果は、遊離脂肪酸の一種 EPA が筋線維の遺伝子発現を変動させること、そしてその作用は PPAR δ 特異的アゴニストと非常に類似していることが分かった。

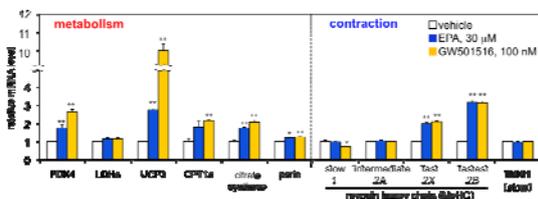


Fig 4. EPA 添加後の単離筋線維の筋線維タイプ関連遺伝子の発現量 (12 時間)

(4) EPA、PPAR δ 特異的アゴニストと PPAR δ アンタゴニスト及び RXR アゴニストの共添加試験

EPA の作用が PPAR δ を介したのか調べるために、PPAR δ 特異的アゴニストの影響を調べた。30 μ M EPA と PPAR δ 特異的アゴニストである GSK0660 (800 nM) の共添加により EPA 単独添加による PDK4 の発現量増加がほぼ完全に抑制された (Fig.5)。従って、EPA の作用が PPAR δ を介した結果である事が強く示唆された。PPAR δ は RXR とヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子の転写を制御していると言われる。魚油に含まれる DHA は PPAR δ アゴニスト活性が見られなかったものの RXR のアゴニストとして作用することが報告されている。そこで DHA の共添加により、GW501516 と EPA の遺伝子発現作用が増強されるか調べた。結果、DHA (30 μ M) の共添加により、GW501516 も、EPA も PDK4 遺伝子発現の増強は観察されなかった。

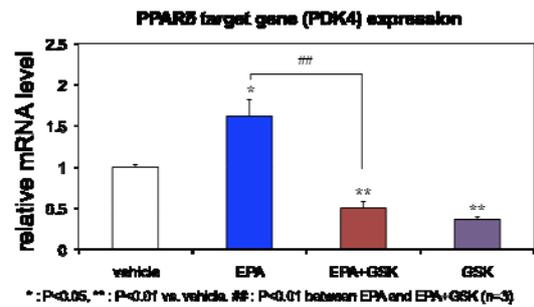


Fig 5. EPA 添加による PDK4 の増加は PPAR δ アンタゴニスト (GSK0660) 添加によって阻害された

筋線維では RXR が何らかの内因性リガンドにより既に十分に活性化されているためか、DHA を添加しても PPAR δ の転写活性の増強は引き起こされないようである。

結論 (Fig.6)

以上より、魚油に多く含まれる n-3 系 PUFA の一種 EPA は、単離筋線維の脂肪代謝に関わる遺伝子の発現を 12 時間で上昇させることが明らかとなった。そしてその作用経路は PPAR δ であることが示唆された。またその一方で、EPA も PPAR δ アゴニストも、単離筋線維の遅筋型 MyHC アイソフォーム (MyHC1, MyHC2A) の発現は増加させず、予想に反し速筋型 (MyHC2X, MyHC2B) の増加を誘導することが分かり、PPAR δ による筋線維型制御は単純な機構ではないことが示唆された。

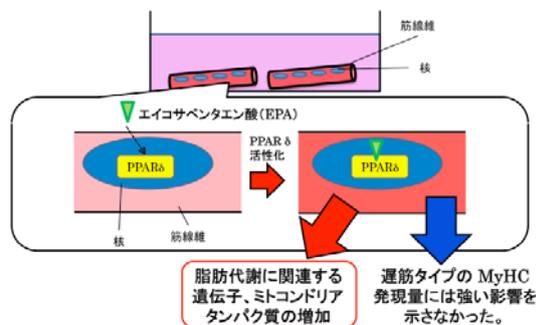


Fig 6. EPA による筋線維型関連遺伝子発現制御のモデル図

参考文献

- 1) Wang Y.X., Zhang C.L., Yu R.T., Cho H.K., Nelson M.C., Bayuga-Ocampo C.R., Ham J., Kang H., Evans R.M. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ . *PLoS Biol.* 2: e294.
- 2) 水野谷航, 岩本洋平, 辰巳隆一, 池内義秀, 2008. n-3 系不飽和脂肪酸は骨格筋を赤筋型に変えるのか. 上原記念生命科学財団研究報告集 22.
- 3) Ravenscroft G., Nowak K.J., Jackaman C.,

Clement S., Lyons M.A., Gallagher S., Bakker A.J., Laing N.G. 2007. Dissociated flexor digitorum brevis myofiber culture system--a more mature muscle culture system. *Cell Motil. Cytoskeleton* **64**: 727-738.

4) Wozniak A.C., Anderson J.E. 2005. Single-fiber isolation and maintenance of satellite cell quiescence. *Biochem. Cell Biol.* **83**: 674-676.

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) 以下全て査読有

① Suzuki T., Do M.K., Sato Y., Ojima K., Hara M., Mizunoya W., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and EDL muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 476-482. 2013.

② Sato Y., Do M.K., Suzuki T., Ohtsubo H., Mizunoya W., Nakamura M., Furuse M., Ikeuchi Y. and Tatsumi R. Satellite cells produce neural chemorepellent semaphorin 3A upon muscle injury. *Anim Sci J* 84: 185-189. 2013.

③ 丸居篤, 水野谷航, 中野豊, 城内文吾, 友永省三, 清水邦義, 泉清隆, 堀江ちひろ. イノシシ肉ソーセージの理化学的特性および食味評価. *日本暖地畜産学会報* 55: 177-180. 2012. (和文)

④ Hara M., Tabata K., Suzuki T., Do M.K., Mizunoya W., Nakamura M., Nishimura S., Tabata S., Ikeuchi Y., Sunagawa K., Anderson J.E., Allen R.E. and Tatsumi R. Calcium influx through a possible coupling of cation channels impacts skeletal muscle satellite cell activation in response to mechanical stretch. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1741-1750. 2012.

⑤ Do M.K., Suzuki T., Gerelt B., Sato Y., Mizunoya W., Nakamura M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Time-coordinated prevalence of extracellular HGF, FGF2 and TGF-beta3 in crush-injured skeletal muscle. *Anim Sci J* 83: 712-717. 2012.

⑥ Anderson J.E., Wozniak A.C. and Mizunoya W. Single muscle-fiber isolation and culture for cellular, molecular, pharmacological, and evolutionary studies. *Methods Mol Biol* 798: 85-102. 2012.

⑦ Upadhaya R., Mizunoya W. and Anderson J.E. Detecting multiple proteins by Western blotting using same-species primary antibodies, precomplexed serum, and hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 419: 342-344. 2011.

⑧ Mizunoya W., Upadhaya R., Burczynski F.J.,

Wang G. and Anderson J.E. Nitric oxide donors improve prednisone effects on muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C1065-1077. 2011.

⑨ Do M.K., Sato Y., Shimizu N., Suzuki T., Shono J., Mizunoya W., Nakamura M., Ikeuchi Y., Anderson J.E. and Tatsumi R. Growth factor regulation of neural chemorepellent Sema3A expression in satellite cell cultures. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C1270-1279. 2011.

⑩ Yamada M., Tatsumi R., Yamanouchi K., Hosoyama T., Shiratsuchi S., Sato A., Mizunoya W., Ikeuchi Y., Furuse M. and Allen R.E. High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C465-476. 2010.

⑪ Suzuki T., Takaishi H., Sakata T., Do M.K., Hara M., Sato A., Mizunoya W., Nishimura T., Hattori A., Ikeuchi Y. and Tatsumi R. In vitro measurement of post-natal changes in proliferating satellite cell frequency during rat muscle growth. *Anim Sci J* 81: 245-251. 2010.

[学会発表] (計 6 件)

① Mizunoya W., Komiya Y., Anderson J.E., Goto T., Takahashi N., Kawada T., Nakamura M., Tatsumi R. and Ikeuchi Y., Eicosapentaenoic acid affects skeletal muscle fiber types relating factors via PPAR δ pathway in isolated fibers of rats., *Keystone Symposia, Nuclear Receptors and Friends: Roles in Energy Homeostasis and Metabolic Dysfunction*, 2013.4.6. Alpbach, Austria.

② 小宮佑介, 水野谷航, 中村真子, 辰巳隆一, 池内義秀, エイコサペンタエン酸はラット単離筋線維の脂肪代謝に関わる遺伝子発現を上昇させる, 第 116 回日本畜産学会大会, 2013.3.30. 広島

③ Komiya Y., Mizunoya W., Anderson J.E., Goto T., Takahashi N., Kawada T., Nakamura M., Tatsumi R. and Ikeuchi Y., Change of skeletal muscle fiber types by n-3 poly unsaturated fatty acid., 2012 FASEB Science Research Conference on "Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells", 2012.8.12. Lucca, Italy

④ 小宮佑介, 水野谷航, 後藤剛, 高橋信之, 河田照雄, 中村真子, 佐藤祐介, 辰巳隆一, 池内義秀, n-3 系不飽和脂肪酸による骨格筋線維タイプの変換, 第 115 回日本畜産学会大会 (優秀発表賞受賞), 2012.3.28. 名古屋

⑤ Mizunoya W., Upadhaya R. and Anderson J.E., Novel nitric oxide donor alleviates detrimental effects of prednisone on diaphragm muscle of dystrophic mdx mice, *The 6th International Conference on the Biology,*

Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010.6.16. Kyoto, Japan

⑥ 水野谷航, 岩本洋平, Rahimi Razin Farzaneh, 辰巳隆一, 池内義秀, 魚油摂取はラット骨格筋の線維型を遅筋型の方
向へ移行させる, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会, 2010. 5. 23. 徳島

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: AGENT DERIVED FROM NATURAL MATERIALS WHICH ACTIVATES PPAR δ AND AGENT FOR INCREASING SLOW-TWITCH MUSCLE FIBER

発明者: 水野谷航, 清水邦義

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 61/804325

出願年月日: 2013 年 03 月 22 日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/muscle_and_meat/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野谷 航 (MIZUNOYA WATARU)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 20404056

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

池内 義秀 (IKEUCHI YOSHIHIDE)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 90168112

辰巳 隆一 (TATSUMI RYUICHI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 40250493