

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07437

研究課題名(和文) 加齢に伴う骨格筋機能低下予防における酢酸の作用及びその機序に関する研究

研究課題名(英文) Function of acetic acid on the prevention in dysfunction of ageing skeletal muscle

研究代表者

山下 広美 (Yamashita, Hiromi)

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70254563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、酢酸が骨格筋に及ぼす生理機能について明らかし、加齢による骨格筋機能低下予防における酢酸の作用を明らかにすることを目的とした。筋管細胞を用いて解析したところ、酢酸は細胞に速やかに取り込まれた後、糖・脂質代謝などの調節に関与するAMPKの活性化をもたらした。さらに、ミオグロビンの転写制御を担う転写因子MEF2Aの発現を増加させ、その核内局在を促進させると共に、ミオグロビンおよびGLUT4の発現を増加させて脂質代謝やグルコースの取り込みを増加させることを明らかにした。加えてPGC1aの発現についても増加させたことから、酢酸はミトコンドリア増幅にも関与すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the activation of AMPK and the stimulation of GLUT4 and myoglobin expression by acetic acid in skeletal muscle cells to clarify the physiological function of acetic acid in skeletal muscle cells. Acetic acid added to culture medium was taken up rapidly by L6 cells, and AMPK was phosphorylated upon treatment with acetic acid. We observed increased gene and protein expression of GLUT4 and myoglobin. Furthermore, treated cells also showed increased gene and protein expression of myocyte enhancer factor 2A (MEF2A), which is a well-known transcription factor involved in the expression of myoglobin and GLUT4 genes.

These results indicate that acetic acid enhances glucose uptake and fatty acid metabolism through the activation of AMPK, and increases expression of GLUT4 and myoglobin. In addition, this study presented that the treatment of acetic acid would increase expression of PGC1a that involves with mitochondrial generation in skeletal muscle cells.

研究分野：食品機能学

キーワード：酢酸 骨格筋 L-6筋管細胞 脂肪代謝

1. 研究開始当初の背景

我が国における高齢者人口の総人口に占める割合は 23.3% (平成 23 年) となり、我が国は近い将来、超高齢化社会に突入すると予測されている。高齢者の生活の質 (QOL) の向上のため健康で自立した生活の維持が課題である。人間の生理機能は加齢に伴って低下するが、生活機能を著しく低下させる原因の一つとして、骨格筋系の老化が挙げられる。「サルコペニア」は加齢に伴う骨格筋量および筋力の低下を特徴とする症候群であり、筋力の低下による有酸素能力の低下、さらには歩行能力の低下により転倒、骨折、また寝たきりのリスクをもたらす¹⁾。筋力の低下は基礎代謝量の低下も招き、肥満や 2 型糖尿病などの生活習慣病の引き金になる²⁾。サルコペニアの発症要因については、未だ不明な点が多いが、最近、その骨格筋委縮にミトコンドリアの機能障害が関与すると報告されている³⁾。ミトコンドリアの生合成に関わる鍵因子として PGC1 α が広く知られている。PGC1 α を活性化しミトコンドリアを増幅させると、サルコペニア、ならびにそれに関連した代謝疾患を予防・改善できることが報告されている^{4,5)}。PGC1 α は、エネルギー代謝の鍵因子として知られる AMP キナーゼ (AMPK) によりリン酸化され活性化される。申請者らはこれまで、動物に酢酸を経口的に摂取させると、組織における代謝過程で AMP を生成し、AMP/ATP 比の増加により AMPK が活性化されることを報告してきた。肥満を発症する病態動物に酢酸を摂取させた場合、AMPK 活性化を介して体脂肪蓄積の抑制や肥満の抑制、また脂肪肝を抑制し、2 型糖尿病を改善すること⁶⁾、また酢酸摂取により、骨格筋におけるミオグロビンや GLUT4 遺伝子の発現増加ならびに動物のエネルギー消費量が増大することを示した⁷⁾。酢酸は、AMPK の活性化を介して PGC1 α を活性化させ、骨格筋のミトコンドリアを増幅させることにより骨格筋の加齢変化を遅延させ、健康寿命延長に寄与する可能性がある。

2. 研究の目的

酢酸を摂取させた動物の骨格筋における核酸レベル (ATP, ADP, AMP) の変化を調べると、酢酸摂取後 10 分以内に AMP 量が増加し AMP/ATP 比が増加する。骨格筋細胞質には細胞質型アセチル CoA 合成酵素 (ACS1) が局在しており、摂取した酢酸が組織に取り込まれると ACS1 活性によりアセチル CoA 生成と共に AMP も生成する。その結果細胞質内での AMP/ATP 比が増加して AMPK が活性化される⁸⁾。活性化 AMPK は、ミトコンドリア生合成の鍵因子である PGC1 α をリン酸化し活性化させると共に、ミトコンドリア

内の β 酸化促進により NAD/NADH を上昇させて SIRT1 を活性化し、PGC1 α の脱アセチル化を生じさせて、PGC1 α 活性化を促進する⁹⁾。これらの事実より酢酸には、AMPK 活性化を介して骨格筋のミトコンドリアを増幅させ、骨格筋委縮を予防・改善する可能性がある。本研究では、高齢動物の骨格筋委縮に対する効果およびその機序を明らかにするために、高齢動物に酢酸を継続的に摂取させた場合の代謝動態の解析、また骨格筋における AMPK 活性化レベルおよび PGC1 α レベルの解析やミトコンドリア関連タンパク質の解析により酢酸の作用機序を明らかにすることを目的とした。本研究成果報告においては、培養細胞を用いた酢酸の機能性の機序について主に報告する。

3. 研究の方法

(1) L6 筋管細胞の培養

L6 筋芽細胞は抗生物質および 10% FBS を含む DMEM 培地で培養した。筋芽細胞が 80% コンフルエントに達した後、2% 馬血清を含む DMEM 培地を用いて筋管へ分化した。分化誘導後 8 - 11 日後に実験に用いた。

(2) L6 筋管細胞による酢酸の取り込み

筋管細胞を 0.5mM 酢酸で処理し、細胞による経時的な酢酸吸収量を測定した。培養液中の酢酸濃度は、UV 法により測定した。

(3) L6 筋管細胞によるグルコースおよび脂肪酸の取り込み

酢酸またはインスリンを処理した筋管細胞におけるグルコースの取り込みは、培養液中の残存グルコース濃度をグルコース測定キットを用いて測定した。また、筋管細胞による脂肪酸の取り込み量を測定するために、0.6 μ mol のパルミチン酸で処理した後、培地中の遊離脂肪酸濃度および細胞中の中性脂肪濃度を測定キットを用いて測定した。

(4) Nucleotides の分析

酢酸を一定時間処理した筋管細胞における、細胞中の ATP、ADP、および AMP 濃度を逆相高速液体クロマトグラフィー法により測定した。

(5) 核画分の抽出

筋管細胞の核画分を抽出するために、酢酸、または AICAR で処理した細胞を冷 PBS で洗い、溶解緩衝液にて細胞を収集した。ホモジナイズ後抽出液を遠心し上清を得た。核画分は高張の緩衝液中に懸濁し、遠心により得た。タンパク質濃度は Bradford 法により測定した。

(6) AMPK 活性の測定

Protein-Gagarose ビーズに AMPK の -2 サブユニットの特異的抗体を結合させ、細胞抽出液を用いて AMPK を免疫沈澱させた。その画分の活性を SAMS ペプチドおよび Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay kit を用いて測定した。

(7) ウェスタンブロット

筋管細胞を RIPA 緩衝液にて溶解させ、遠心上清をウェスタンブロットに供した。試料

は、SDS-PAGE 後に PVDF 膜に転写し一次抗体で反応させ、HRP が結合した二次抗体で反応させた。

(8) 定量的リアルタイム PCR 解析

酢酸を処理した筋管細胞から総 RNA をセパゾール RNA 1 super G を用いて抽出した。さらに RNA から cDNA を調製し、KAPA SYBR FAST qPCR Kits を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。

(9) 蛍光免疫染色

L6 筋管細胞を 4%ホルムアルデヒド溶液で固定し、0.1%TritonX-100/PBS でインキュベートしたのち 3%BSA で処理した。その後試料を一次抗体で 1 時間反応させ、その後 Alexa Fluor を結合した二次抗体で反応させ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 筋管細胞による酢酸の取り込み

0.5mM の酢酸を筋管細胞に添加すると、2分以内に酢酸の速やかな取り込みが見られた(図1)。

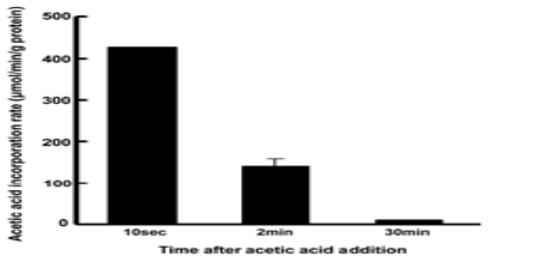


図1 筋管細胞における酢酸の取り込み速度
酢酸(0.5mM)を培養液に添加後の各時間後における、細胞の酢酸取り込み速度を測定した。

(2) 筋管細胞における酢酸の AMPK の活性化および ACC のリン酸化による阻害

筋管細胞に 0.05-0.5M の酢酸を添加すると濃度依存的に AMPK のリン酸化が見られた。また AMPK のリン酸化はその阻害剤である CompoundC により阻害された(図2)。

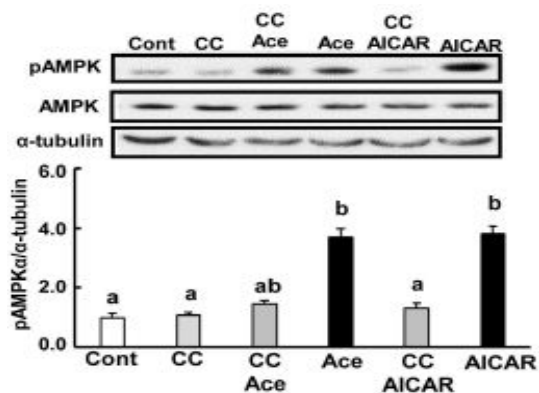


図2 酢酸による AMPK のリン酸化における AMPK 阻害剤 CompoundC の影響

(3) 酢酸による AMPK のリン酸化は CompoundC 以外の阻害剤である AraA により同様に阻害された。AMPK によるリン酸化を受ける ACC についても解析すると、酢酸により ACC のリン酸化が促進し、AraA により阻害された(図3, 4)。

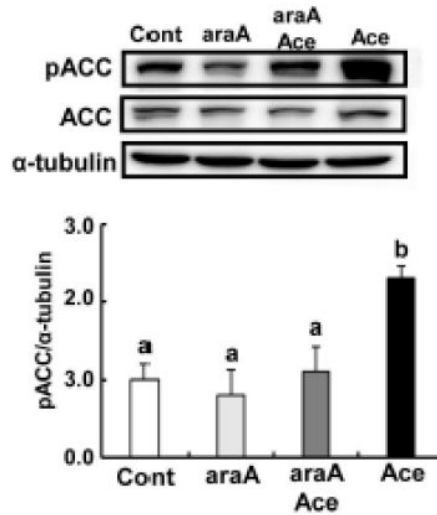


図3 酢酸による AMPK のリン酸化における AMPK 阻害剤 AraA の影響

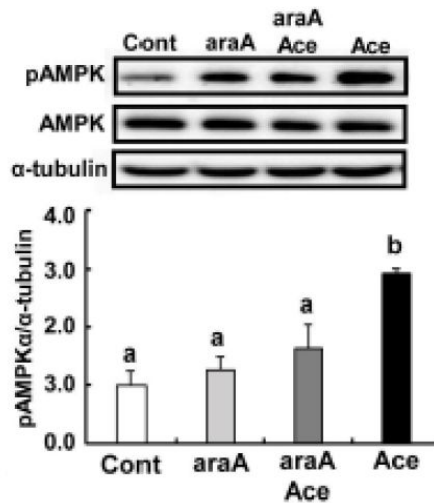


図4 酢酸による ACC のリン酸化における AMPK 阻害剤 AraA の影響

以上のことから、酢酸は AMPK をリン酸化し活性化させることが明らかとなった。

(4) 筋管細胞における酢酸による転写因子 MEF2A および PGC1αの発現増加

酢酸を実験動物に摂取させると、ミオグロビンおよび GLUT4 遺伝子およびタンパク質の発現が増加することをこれまで報告している。本研究でも筋管細胞に酢酸を添加すると、それらの遺伝子およびタンパク質が増加することを認めたことから、酢酸によるそれらの増幅の機序を明らかにする目的で、骨格筋分化に関わり、ミオグロビンおよび GLUT4 の

発現に関わる転写因子である MEF2A およびミトコンドリアの増幅に関与する因子である PGC1 α の発現について解析した。

酢酸を添加した筋管細胞における MEF2A および PGC1 α の mRNA の発現は増加し、それらの発現はいずれも AMPK 阻害剤の CompoundC および AraA により阻害された (図 5, 6)。またタンパク質の発現も同様に酢酸で増加し、阻害剤により抑制された (図 7, 8)。

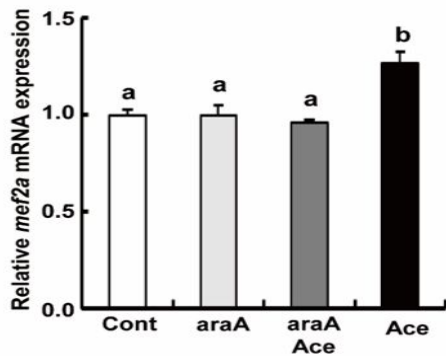


図 5 L6 筋管細胞における酢酸の MEF2A mRNA 発現に及ぼす影響

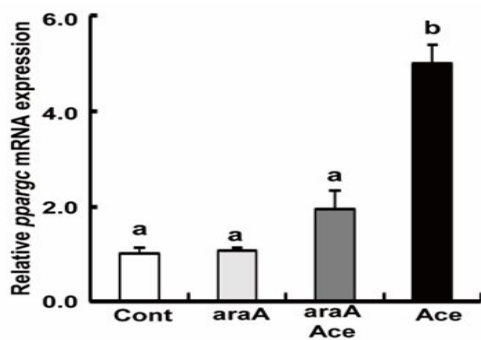


図 6 L6 筋管細胞における酢酸の PGC1 α mRNA 発現に及ぼす影響

MEF2A は筋芽細胞から筋管細胞に分化するにつれて核内から細胞質への存在割合が増加していた。そこで酢酸による MEF2A の発現増加に伴う MEF2A の核内存在量を解析した結果、酢酸の添加により MEF2A の核内移行が増加していた (図 9)。さらに AMPK 活性化阻害剤の CompoundC に添加により、核内局在が阻害された (図 9)。

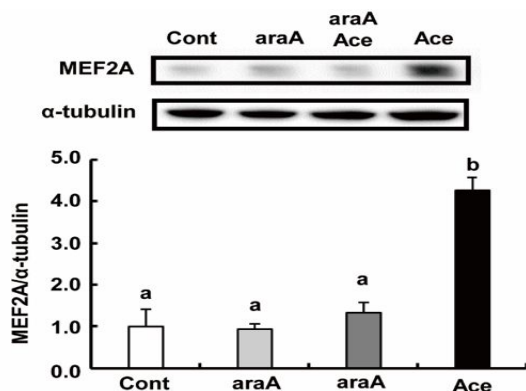


図 7 L6 筋管細胞における酢酸の MEF2A タンパク質の発現に及ぼす影響

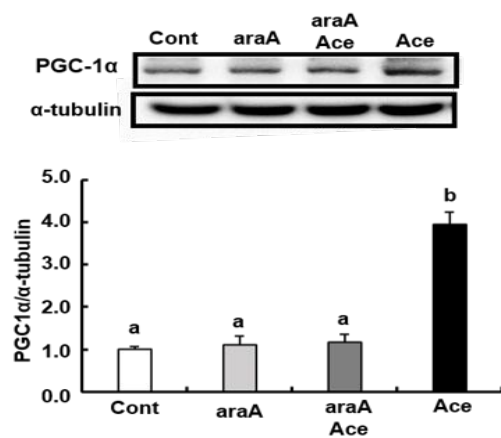


図 8 L6 筋管細胞における酢酸の PGC1 α タンパク質の発現に及ぼす影響

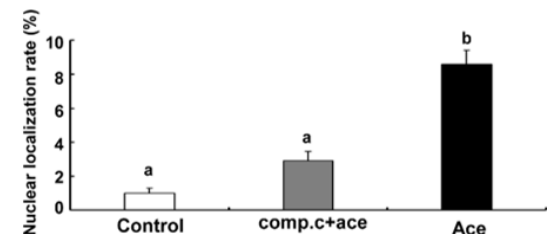


図 9 L6 筋管細胞における MEF2A の細胞内局在におよぼす酢酸の影響

以上の結果より、酢酸は筋管細胞において AMPK をリン酸化し活性化させると共に、AMPK のリン酸化を介して MEF2A の発現を増加させ、さらに核内局在を促進させ、ミオグロビンおよび GLUT4 の発現を増加させて、脂質代謝やグルコースの取り込みを増加させることが明らかになった。さらに PGC1 α の発現についても増加させたことから、酢酸はミトコンドリア増幅にも関与すると示唆された。

< 引用文献 >

- Fried, L.P. et al. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., 56, M146-156(2001).
- Dela, F. and Kjaer, M., Essays Biochem., 42, 75-88 (2006).
- Marzetti, E., et al., Biofactors, 35, 28-35 (2009).
- Marco, S., et al., PNAS, 103, 16260-16265 (2006).
- Wenz, T., et al. PNAS, 48, 20405-20410 (2009).
- Yamashita, H., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 1236-1243 (2007).
- Yamashita, H., et al., Biosci. Biochem. Biochem., 73, 570-576(2009).
- Yamashita, H., et al., Biosci. Biochem.

Biochem., 73, 570-576 (2009).
Iwabu, M., et. al., Nature 464, 1313-1319 (2010).

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 4 件)

Hiromi Yamashita, Biological function of acetic acid -Improvement of obesity and glucose tolerance by acetic acid in type 2 diabetic rats-, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56: S171-S175

(2016).DOI:10.1080/10408398.2015.1045966

Hitomi Maruta, Yukihiro Yoshimura, Aya Araki, Masumi Kimoto, Yoshitaka Takahashi, Hiromi Yamashita, Activation of AMP-activated Protein Kinase and Stimulation of Energy Metabolism by Acetic Acid in L6 Myotube Cells, PLOS ONE, 11 (6) (2016).

Araki A, Yoshimura Y, Maruta H, Kimoto M, Takahashi Y and Yamashita H, Changes in the 5'-AMP concentration of skeletal muscles on acetic acid treatment under fed or starved conditions in rats, Annals of Obesity & Disorders, 1-3, 1(3): 1013, (2016).

Yoshimura Y, Araki A, Maruta H, Takahashi Y and Yamashita H, Molecular Cloning of Rat acss3 and Characterization of Mammalian Propionyl-CoA Synthetase in the Liver Mitochondrial Matrix, The Journal of Biochemistry, 161(3):279-289 (2017).

[学会発表](計 19 件)

Hiromi Yamashita, Chihiro Araoka, Yukihiro Yoshimura, Aya Araki, Masumi Kimoto, Effects of chronic intake of acetate on muscle fiber type and endurance performance, 12th Asian Congress of Nutrition, Pacifico Yokohama(Yokohama), 14-18 May, 2015.

Hitomi Maruta, Yukihiro Yoshimura, Aya Araki, Masumi Kimoto, Yoshitaka Takahashi, and Hiromi Yamashita, Activation of AMP-activated protein kinase and stimulation of energy metabolism by the treatment of acetic acid in L6 myotube cells, 8th International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Muscle Wasting, Paris (France), 4-6, Dec., 2015.

山下広美, 健康食品管理士会中国支部研修会・市民公開講座、上手に付き合おう！機能性表示食品「醸造酢の主成分である酢酸の機能性について-肥満と生活習慣病の予防の観点から-」, 平成 27 年 7 月 4 日(土)

岡山大学鹿田キャンパス保健学科棟 301 講義室

山下広美, 「生活の中で生かす機能性食品、食酢の機能と健康 - 酢酸のメタボリックシンドローム予防効果 - 」第 48 回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会 市民公開講座、メルバルク広島(広島市)、平成 27 年 10 月 31 日(土)

丸田ひとみ、阿部怜奈、荒岡千尋、吉村征浩、木本眞順美、高橋吉孝、山下広美、骨格筋に及ぼす酢酸の継続的な摂取の影響についての検討、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年(平成 28 年)5 月 14 日(土)、武庫川女子大学(西宮市)

磯野千晶、近藤千尋、柗岡、吉村征浩、花田、伊東佳邦、平澤、山下広美、瀬戸内海の 3 つの地域で養殖されたマガキ含有成分の季節変動および養殖地域による違い、(一社)日本家政学会第 68 回大会、2016 年 5 月 29 日(日)、金城学院大学(名古屋)

岩田三有紀、丸田ひとみ、吉村征浩、田中晃一、入江康至、山下広美、酢酸摂取が腸内細菌叢組成に与える影響に関する研究、第 49 回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2016 年 11 月 12 日(土)、徳島大学(徳島市)

Hitomi Maruta, Yukihiro Yoshimura, Aya Araki, Masumi Kimoto, Yoshitaka Takahashi, Hiromi Yamashita, Activation of AMP-activated Protein Kinase and Stimulation of Energy Metabolism by Acetic Acid in L6 Myotube Cells, The 10th Joint Conference on Nutrition between Nanchang, Okayama Prefectural, Sichuan and Woosong Universities, Oct 8, 2016

山下広美, 栄養改善学会四国支部会特別講演、「酢酸の代謝とメタボリックシンドローム予防効果」、四国大学(徳島市)、平成 28 年 4 月 23 日(土)

丸田ひとみ、吉村征浩、荒木彩、高橋吉孝、山下広美、「加齢に伴うラット骨格筋における生化学的变化に関する研究」、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年(平成 29 年)5 月 20 日(土)、ポスターセッション、沖縄コンベンションセンター(那覇市)

磯野千晶、近藤千尋、柗岡沙梨、丸田ひとみ、吉村征浩、伊東佳邦、花田恭孝、平澤久紀、三宅剛史、山下広美、「瀬戸内海沿岸海域で養殖されたマガキの脂肪酸および遊離アミノ酸含有量の季節変動」、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年(平成 29 年)5 月 21 日(日)、ポスターセッション、沖縄コンベンションセンター(那覇市)

吉村征浩、岩田三有紀、丸田ひとみ、山下広美、「酢酸摂取がラットの腸内細菌叢構成に与える影響」、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年(平成 29 年)5 月 21 日(日)、ポスターセッション、沖縄コンベンションセンター(那覇市)

吉村征浩、岩田三有紀、丸田ひとみ、山下

広美、「酢酸摂取がラットの腸内細菌叢構成に与える影響」、第71回日本栄養・食糧学会大会、2017年(平成29年)5月21日(日)、ポスターセッション、沖縄コンベンションセンター(那覇市)

磯野千晶、寺尾美貴、丸田ひとみ、三宅剛史、山下広美、マガキ含有成分の機能性に関する研究、第50回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会、平成29年11月11日(土)

12日(日)、鳥取大学農学部(鳥取市)

丸田ひとみ、吉村征浩、荒木彩、磯野千晶、山下広美、酢酸の骨格筋における生理機能に関する研究、おかやまバイオアクティブ研究会第52回シンポジウム 第18回学生プレゼンテーション・ポスターセッション、平成30年1月20日(土)岡山ロイヤルホテル(岡山市)

山下広美、丸田ひとみ、吉村征浩、磯野千晶、川上貴代、入江康至、綾部誠也、「加齢に伴う骨格筋の萎縮および生活習慣病の発症を予防する機能性食品に関する研究」、KMSメディカル・アーク2018、教員シーズ・ポスター発表、川崎医科大学附属病院本館8階大講堂(倉敷市)、平成30年2月7日(水)

丸田ひとみ、王承铎、天満晴菜、馬芸、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美、2型糖尿病モデル動物を用いたビフィズス菌発酵乳の肥満抑制効果、日本農芸化学会2018年度大会、平成30年3月17日(土)、名城大学(名古屋市)

山下広美、第6回日本栄養学教育学会学術総会、「酢酸の生理機能性を軸にしたこれまでの研究と栄養学分野での教育活動」、アスティとくしま(徳島市)、平成29年9月16日(土)

山下広美、「お酢のチラカを学ぶ~カラダにいいお酢のおはなし~」、ライフパーク倉敷市民学習講座、ライフパーク倉敷(倉敷市)、平成30年3月7日(水)

〔図書〕(計 4 件)

山下広美(共著)脂質 pp.57-74、全285p、食べ物と健康 食品の科学、南江堂、2015年3月10日発行

山下広美(共著)食品の科学 太田英明他編、改訂第2版 脂質 pp.58-76、全331ページ、南江堂、2018年、1月30日発行

山下広美(共著)分子栄養学、宮本賢一他編、テーラーメイド栄養学とニュートリゲノミクス、食品の遺伝子組換え、pp.77-83、pp.189-196、全223頁、講談社、2018年、3月27日発行

山下広美(共著)食品学、辻英明他編、水分、脂質、pp.31-34、62-75、全211頁、講談社サイエンティフィック、2017年、8月30日、第4刷発行

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 広美(YAMASHITA, Hiromi)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号: 70254563

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木本 眞順美(KIMOTO, Masumi)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号: 40108866

(4) 研究協力者

阿部 伶奈(ABE, Reina)
岩田 三有紀(IWATA, Miyuki)