

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15362

研究課題名（和文）アルギニンによる骨格筋のCat-2発現制御、NO産生および筋線維型の関係の解明

研究課題名（英文）Study of regulation of arginine on Cat-2 expression, NO production and muscle fiber type

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・上級研究員

研究者番号：30414684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：飼料中アルギニン濃度によるブタの筋線維タイプの変化は、Cat-2の発現量の変化を伴わず、筋線維タイプの変化にCat-2の変化が必須ではないことが示唆された。飼料中アルギニン濃度を变化させたブタでの実験と、培養細胞の培地中アルギニン濃度の実験では、MyHCアイソフォームへの影響が異なり、ブタでの変化は内分泌を介した結果と考えられた。培養骨格筋細胞では、培地中のアルギニンおよびクレンブテロールは分化中にはCat-2AおよびCat-2BのmRNA発現量に影響を及ぼしたが、分化後には影響がなかった。クレンブテロールの実験よりCat-2のmRNA発現制御に β 2受容体を介した刺激の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、Cat-2はマクロファージや腫瘍細胞におけるNO産生時に、基質となるアルギニンを供給するトランスポーターとして研究が進められてきた。Cat-2の骨格筋における研究はこれまでに報告が少なく、発現量の変化や制御については明らかになっていなかった。本研究は栄養により骨格筋のCat-2発現量に及ぼす影響を明らかにした研究である。さらに、培養骨格筋細胞を用いて、アルギニンの直接的な影響、また発現制御まで検討したことは、学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Dietary arginine concentration changed expression level of myosin heavy chain isoform in skeletal muscles of pigs without changes of expression of cationic amino acid transporter (Cat)-2 mRNA. It suggests that changes in Cat-2 mRNA expression are not essential for changes in muscle fiber type. The effect on myosin heavy chain (MyHC) isoform are different between the experiment in pigs with dietary arginine level and the experiment in cultured C2C12 cells with arginine concentration of medium, which suggests that the effect of in pigs are mediated by endocrine. In C2C12 cells, arginine concentration of medium and clenbuterol affects the expression of Cat-2A and Cat-2B mRNA expression during differentiation, but not after differentiation. Clenbuterol promoted the expression of Cat-2 mRNA, which suggests that β 2-adrenergic receptor mediated stimulation is involved in the regulation of Cat-2 mRNA expression.

研究分野：家畜栄養生化学

キーワード：Cat-2 アルギニン ブタ 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は、豚の穀物主体飼料において第一制限アミノ酸であるリジンの栄養状態が生体に及ぼす影響に着目し、リジン、アルギニンのトランスポーター：塩基性アミノ酸トランスポーター(Cationic amino acid transporter 以下 Cat)の研究を行ってきた。これまでに、Cat-1 は豚の組織にコピキタスに発現するが、Cat-2 は肝臓、骨格筋および心筋でのみ発現すること、出生直後から 80 日齢までの初期成長時に、骨格筋において Cat-1 は発現量が 1/3 に減少する一方で、Cat-2 は 5 倍に増加すること、筋線維構成が異なる筋肉の 3 部位(胸最長筋、大腿二頭筋、菱形筋)の発現量を比較すると、Cat-1 は差がないが、Cat-2 は、胸最長筋 > 大腿二頭筋 > 菱形筋となることを明らかにした。これらの結果から、Cat-2 は Cat-1 と異なる発現調節を受け、骨格筋の部位とその発現量に関係があることが示唆された。

さらに、豚にリジン不足飼料を給与したところ、Cat-1 発現量は増加するが、Cat-2 は増加しなかった。Cat-1 はリジンの不足により、タンパク質合成されないアミノアシル tRNA の増加が起き、General control nonderepressible2(GCN2) Activating transcription factor 4(ATF4)

Cat-1 増加、が起こることが報告されている(Averous ら, 2003)。しかし、Cat-2 については、その発現量の変化や、制御については明らかでない。胸最長筋、大腿二頭筋、菱形筋は、この順で解糖系のエネルギー代謝をおこなう II 型筋線維の割合が高い。Liu ら(2015)は、豚で 2 型筋線維の割合が高い筋肉ほど一酸化窒素(NO)の含量が高いことを報告している。アルギニンは一酸化窒素合成酵素(NOS)により、フリーラジカルである NO⁻へ合成され、NO は栄養代謝を制御するシグナル伝達分子として骨格筋のエネルギー代謝を調節するペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター 共役因子(PGC)-1 や、ミトコンドリア合成に作用する。また、成長にとともに、骨格筋中の NO が増加する(Capanni ら, 1998)。これらのことから、骨格筋における Cat-2 の発現がリジンではなくリジンと拮抗するもう一つの塩基性アミノ酸であるアルギニンにより制御されており、NO 産生を介し、筋線維型の決定に影響している可能性が考えられる。あるいは、栄養状態により血中の IGF-I やグルココルチコイド濃度が変化することから、IGF-I やグルココルチコイドの作用により PGC-1 の発現量が変化し、その結果筋線維型が変化し、Cat-2 の発現量が増加して NO 産生量が変化する可能性が考えられた。このことから、アルギニンが骨格筋の Cat-2 発現量、NO および筋線維型に及ぼす影響について検討し、Cat-2 発現量を変化させるトリガーを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、飼料中のアルギニン濃度が骨格筋における Cat-2 発現量に及ぼす影響を成長期の豚を用いて明らかにするとともに、骨格筋における NO 含量および筋線維型の変化について明らかにする。また、培養筋肉細胞を用いて、アルギニンや生理学的制御が Cat-2 発現量や筋線維タイプに及ぼす影響とその機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アルギニンの増給および不足がブタ骨格筋における Cat-2 発現、NO、筋線維型に及ぼす影響の検討

28 日齢で離乳した 35 日齢のブタ(ランドレース×大ヨークシャー×デュロック交雑種、去勢オス、開始体重 11.2kg)を供試した(終了時体重 19.8kg)。処理区は、対照飼料(Arg 0.63%, Lys 1.40%)、アルギニン不足飼料(Arg 0.44%, Lys 1.40%)、リジン不足飼料(Arg 0.63%, Lys 0.80%)、アルギニン増給飼料(Arg 1.10%, Lys 1.40%)を給与する 4 区を設けた。いずれの飼料も粗タンパク質(19.2%)やエネルギー(DE:3.5Mcal/kg)については、日本飼養標準(2013)および NRC(2012)が規定する要求量を満たすように設計した。同腹子から 4 頭をそれぞれの区に供試し、6 反復を実施した。自由摂取・自由飲水とし、飼養試験中に飼養成績(飼料摂取量、増体重および飼料効率)を記録するとともに、試験終了時に血液および胸最長筋、菱形筋および大腿二頭筋の 3 部位の骨格筋を採取した。血漿中インスリン、IGF-I およびコルチゾール濃度は市販の ELISA キットを用いて分析した。骨格筋 3 部位の NO 量はキットを用いて測定した。骨格筋 3 部位の Cat-2、一酸化窒素合成酵素(NOS:nitric oxide synthase)1、2 および 3、およびミオシン(MyHC)アイソフォーム 2x, 2b, 2a および slow の mRNA 発現量を RT-PCR の後にリアルタイム PCR 法で測定した。

(2) アルギニンおよび生理学的制御が培養骨格筋細胞の Cat-2 および MyHC アイソフォームの mRNA 発現に及ぼす影響の検討を目的として、分化誘導 3 日後の培養骨格筋細胞(C2C12 細胞株)を用いて以下の実験を行った。

培地中のアルギニンあるいは/およびリジンを欠乏させる実験

常法で用いるダルベッコ変法培地のアルギニン濃度を×1として、培地中のアルギニン濃度を欠乏から×4の培地で培養する実験

N-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)を添加する実験

アドレナリン作動薬クレンブテロール、アドレナリン遮断薬プロプラノロールを培地に

添加する実験。

各実験において、培養骨格筋細胞の Cats, NOS1, PGC-1 および MyHC アイソフォーム(1,2,4,7) の mRNA の発現量を調べた。

(3) 分化中の培養骨格筋細胞における(2) ~ の処理が、骨格筋の筋線維型および Cat-2 mRNA 発現量に及ぼす影響を検討するために、分化誘導 1 日後の C2C12 細胞株を用いて実験を行った。Cat-2 は、アイソフォームである Cat-2A と Cat-2B に対応するプライマーを設計し、それぞれの発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) アルギニンの増給および不足がブタ骨格筋における Cat-2 発現、NO、筋繊維型に及ぼす影響の検討

アルギニン不足飼料、リジン不足飼料およびアルギニン増給飼料の給与は、増体重、飼料摂取量および飼料効率に影響を及ぼさなかった。血漿中のアルギニン濃度はアルギニン増給区が他の3区より高く、リジン濃度は低リジン区が他の3区より低かった。血漿中インスリン濃度およびコルチゾール濃度に給与飼料の影響はなかったが、血漿中 IGF-1 濃度は、低アルギニン区およびアルギニン増給区では対照区と有意な差がなく、低リジン区のみ対照区より低かった。骨格筋3部位、肝臓および血液の NO 量に給与飼料による有意な差はなかった。胸最長筋の Cat-2A mRNA 発現量は、低アルギニン区およびアルギニン増給区は対照区と有意な差がなかったが、低リジン区より低アルギニン区が高かった。胸最長筋の MyHC1 mRNA 発現量はリジン不足区がアルギニン不足区およびアルギニン増給区に対して低く、胸最長筋の MyHC7 mRNA 発現量はアルギニン不足区およびリジン不足区に対してアルギニン増給区で高かった。これらの結果から、飼料中アルギニンの濃度は、胸最長筋において Cat-2a の発現量に影響を及ぼさないものの、アルギニンの不足は、取り込みが拮抗するリジンが不足した飼料を給与した場合より Cat-2a mRNA 発現量が高くなることが明らかになった。飼料中のアルギニン濃度による筋線維型の変化は菱形筋、大腿二頭筋より、胸最長筋で影響が出やすい可能性が示唆された。

(2) アルギニンおよび生理学的制御が分化した C2C12 細胞に及ぼす影響の検討

培地中アルギニン欠乏の影響

培地中のアルギニンあるいは/およびリジンを欠乏させると、6H および 24H で Cat-1 の mRNA 発現量は高くなるが、Cat-2 mRNA 発現量は変化しない。24H のアルギニン欠乏により、MyHC2 mRNA 発現量が高く、MyHC4 は低くなったが、MyHC1 および MyHC7 mRNA 発現量は変わらなかった。NOS1 mRNA 発現量はアルギニン欠乏により低くなったが、PGC-1 mRNA 発現量はアルギニン欠乏による影響はなかった。

培地中アルギニン濃度の影響

培地中のアルギニンが欠乏から常法 (DMEM) の 4 倍濃度 ($\times 0$, $\times 1/100$, $\times 1$, $\times 2$, $\times 4$) の培地で 24 時間培養すると、Cat-1 mRNA は 6H 後に $\times 1/100$ および $\times 0$ で $\times 1$ より高かったが、Cat-2 mRNA 発現量はアルギニン濃度による影響がなかった。NOS1 mRNA 発現量は 24H で $\times 1$ に対して $\times 0$ で低く、MYH1 および MYH7 では発現量に変化がなかったが、MYH2 mRNA は 24H で $\times 1$ に対して $1/100$ および $\times 0$ で発現量が高く、MYH4 mRNA 発現量は 24H で $\times 1$ に対して $\times 0$ で低かった。このとき、NOS1 および PGC-1 mRNA 発現量は、 $\times 1$ に対して $\times 0$ で低かった。

以上より、リジンと同様に、培地中のアルギニンを欠乏させると Cat-1 の mRNA 発現量は増加するが、Cat-2 の mRNA 発現量は変化しないこと、NOS1 の発現量および筋線維タイプは培地中のアルギニン濃度の影響を受けることが明らかになった。

L-NAME の影響

L-NAME を培地へ添加すると、24H で Cat-2 の発現量が高くなったが、他の遺伝子には差がなかった。

クレンブテロール、プロプラノロールの影響

クレンブテロールにより、24H で Cat-2、NOS1 および MyHC4 の mRNA 発現量が高かった。

(3) アルギニンおよび生理学的制御が分化中の C2C12 細胞に及ぼす影響の検討

培地中アルギニン濃度の影響

Cat-1 は 24H および 72H の培養で $\times 1$ に対して $\times 0$ で発現量が高かった。Cat-2A は 24H で $\times 1$ に対して $\times 0$ で、Cat-2B は $\times 2$ に対して $\times 0$ で mRNA 発現量が低く、72H では有意な差がなかった。NOS1 は 24H で $\times 1$, $\times 2$, $\times 4$ に対して $\times 0$ で mRNA 発現量が低かった。MyHC1 と MyHC4 は 24H および 72H でアルギニン濃度が高いと mRNA 発現量が高く、MyHC2 と MyHC7 は 72H で、アルギニン濃度が高いと mRNA 発現量が低かった。24H で NOS1 および PGC-1 の mRNA 発現量はアルギニン濃度が低いと低かった。

L-NAME の影響

L-NAME により 72H で Cat-2A および Cat-2B の mRNA 発現量が高くなった。L-NAME により 24H および 72H で MyHC2 の mRNA 発現量が高く、24H で MyHC4 の mRNA 発現量が高かった。

クレンブテロール、プロプラノロールの影響

クレンブテロールにより、Cat-2A は 24H で mRNA 発現量が高かったが、Cat-2B、MyHC1、MyHC4 お

よび MyHC7 が 6H で mRNA 発現量が低かった。クレンプテロールにより NOS1 は 6H, 24H, 72H で mRNA が高かった。クレンプテロールにより PGC-1 は 24H で mRNA 発現量が高かった。

以上より、ブタにおける、飼料中アルギニン濃度による筋線維タイプの変化は、Cat-2 の発現量の変化を伴わずに生じることから、筋線維タイプの変化に Cat-2 の mRNA 発現量の変化が必須ではないことが示唆された。ブタへ給餌する飼料のアルギニン濃度を不足および増給した結果と、培養骨格筋細胞の培地中のアルギニン濃度を变化させた実験では、筋線維タイプへの影響が異なったことから、生体での変化はアルギニンが直接影響を及ぼしたのではなく、内分泌などの変化に伴うと考えられた。培養骨格筋細胞の実験より、骨格筋細胞では分化後よりも、分化中における培地中のアルギニンや、クレンプテロールが CAT-2A および CAT-2B の mRNA 発現量に影響を及ぼすことが明らかになった。また、クレンプテロールが CAT-2A を増加させることから、 α 2 受容体を介した刺激が CAT-2 の mRNA 発現制御に関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------