

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05476

研究課題名(和文) 酢酸による骨格筋GPR43の活性化と骨格筋機能に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Effect of acetic acid on the activation of G-protein-coupled receptor GPR43 in skeletal muscle cells and on the skeletal muscle function

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GPR43は脂肪の蓄積を抑制し、生体エネルギーの恒常性を維持する作用に関わり、酢酸やプロピオン酸により活性化されるGタンパク質共役型受容体GPCRの一つである。これまでの研究で、経口的に摂取された酢酸が、肝臓や骨格筋の脂質代謝の改善、肥満の抑制、ならびに耐糖能の改善に寄与することを示した。申請者は骨格筋にGPR43が発現するのではないかと考え、骨格筋GPR43の発現、ならびに酢酸によるその活性化について検討した。その結果、ラット骨格筋にはGPR43が発現し、その発現は酢酸により増加すること、またその活性化により生じるカルシウムシグナルを介して遅筋線維の増幅が生じることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット骨格筋にGPR43が発現すること、さらに酢酸により活性化されることを明らかにした。酢酸による骨格筋GPR43の活性化の機序が明らかになったことから、GPR43の活性化を介して骨格筋機能を改善することができる。高齢化社会の我が国における課題となっている加齢による骨格筋の代謝異常を改善させ、健康寿命延長にも寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：GPR43 functioning involves the suppression of lipid accumulation and maintaining body energy homeostasis, and is activated by acetic acid or propionic acid. It was hypothesized that acetic acid would stimulate GPR43 in skeletal muscle cells and has function in modulating skeletal muscle function. The objective of the current study was to clarify the expression of GPR43 and the effect of acetic acid on the activation of GPR43 in the skeletal muscle cells. The GPR43 expression, observed in the differentiated myotube cells, was increased upon acetic acid treatment. Acetic acid induced the intracellular calcium influx and modulated genes expression associated with slow-twitch fibers in the cells and these effects were significantly inhibited by the GPR43-specific siRNA treatment. It was concluded that acetic acid plays a role in the activation of GPR43 and involves the proliferation of slow-twitch fibers in L6 skeletal muscles through the calcium-signaling pathway.

研究分野：食品機能学

キーワード：GPR43 酢酸 骨格筋 遅筋線維 L6筋管細胞

## 1. 研究開発当初の背景

超高齢化社会に突入した我が国の高齢者人口は、3,459万人（平成28年10月）となり、総人口に占める割合は27.3%に達した。高齢者の生活の質（QOL）の向上は、我が国における重要な課題となっている。加齢に伴う生活機能低下の要因の一つとして、骨格筋系の老化が挙げられ、その成因として、ミトコンドリアの機能障害が関与するとの報告がある。ミトコンドリアの生合成に関わる鍵因子として PGC-1 $\alpha$ が広く知られ、PGC-1 $\alpha$ を活性化しミトコンドリアを増幅させると、筋委縮並びにそれに関連した代謝疾患を予防・改善できると報告されている。これまで申請者らは、PGC-1 $\alpha$ を活性化する AMP キナーゼ（AMPK）、さらに AMPK 活性化剤として作用する食品中の酢酸に着目して研究を行ってきた。骨格筋において酢酸は代謝過程で AMP を生成し、AMP/ATP 比の増加により AMPK を活性化させること、AMPK の活性化により骨格筋では MEF2A や PGC-1 $\alpha$ の活性化、さらにそれらを介してミオグロビンや GLUT4 遺伝子の発現が増加し、糖取り込みの促進、脂肪蓄積の抑制、ならびに脂肪酸代謝が活性化されることを明らかにした。一方で申請者らは最近、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸である、酢酸、酪酸、プロピオン酸をリガンドとして活性化する G タンパク共役型受容体（G protein coupled receptor; GPCR）のうち、腸管細胞および脂肪細胞に高発現する GPR43 が骨格筋でも発現しており、脂質代謝を促進するように作用する可能性を見出した。脂肪組織における GPR43 は過度な脂肪組織の増大を抑制して肥満を抑制するように作用することが報告されているが、骨格筋における GPR43 の存在やその機能については未だ明らかにされていない。骨格筋 GPR43 の機能の解明、さらに経口的に摂取した酢酸により骨格筋 GPR43 を活性化させることができれば、加齢による骨格筋の代謝異常を改善させ、健康寿命延長に寄与する可能性がある。

## 2. 研究の目的

酢酸は、腸内細菌により腸管内で産生される短鎖脂肪酸の一つである。遊離脂肪酸を天然リガンドとする G タンパク共役型受容体（GPCR）のうち、酢酸をリガンドとして活性化される GPR43 は、腸管細胞および脂肪細胞には高発現するが、骨格筋での発現については明らかにされていなかった。しかし申請者らは、GPR43 が骨格筋にも一定量発現し、脂質代謝の調節および骨格筋機能に作用する可能性を見出したことから、骨格筋にも GPR43 が発現し、酢酸により活性化されるのではないかと推測した。本研究では、骨格筋における GPR43 の発現、ならびに GPR43 の酢酸による活性化と骨格筋における機能について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 筋管細胞における *GPR43* の発現動態の解析、ならびに酢酸によるその発現への影響

L6 筋芽細胞を用いて、筋管細胞への分化過程における *GPR43* の発現動態を解析するとともに、酢酸の添加濃度による *GPR43* の発現動態を qRT-PCR 法により解析した。

- (2) 酢酸および *GPR43* アゴニストによる細胞内カルシウムレベルの解析

*GPR43* アゴニスト ((S)-2-(4-chlorophenyl)-3,3-dimethyl-N-(5-phenylthiazol-2-yl)butanamide) を L6 筋管細胞の培養液に添加し、カルシウム測定試薬を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

- (3) 酢酸またはアゴニストによる *GPR43* の活性化を介した AMPK の活性化ならびに遅筋線維関連因子の動態解析

細胞内のカルシウム濃度が増加すれば、カルシウム依存性タンパク質キナーゼである CAMKK が活性化し AMPK の活性化が引き起こされると共に、カルシニューリン/NFATc1 経路が活性化され筋線維の遅筋化が促進する可能性がある。*GPR43* のアゴニストならびに酢酸を用いて、*GPR43* の作用による AMPK のリン酸化、ミオグロビン、GLUT4、MEF2A、PGC-1 $\alpha$ 、NFATc1 などの発現をウェスタンブロット法により解析するとともに、*GPR43* の siRNA を用いてアゴニストおよび酢酸の作用が阻害されるか解析した。

- (4) *GPR43* の作用を介した骨格筋特異的因子群の細胞内局在変化の解析

MEF2A、PGC-1 $\alpha$ 、NFATc1 の核内局在をウェスタンブロット法により解析した。

### 4. 研究成果

- (1) 筋管細胞における *GPR43* の発現動態の解析、ならびに酢酸によるその発現増加

L6 筋芽細胞の分化過程における *GPR43* の発現動態を調べた結果、分化が進むにつれて *GPR43* の発現が増加し (図 1)、分化した筋管細胞に酢酸を添加すると *GPR43* の発現が増加した (図 2)。*GPR41* の発現は増加しなかった。またラットの骨格筋においても発現が見られ、8 週齢より 20 週齢のヒラメ筋および腓腹筋において有意に増加した。これより骨格筋には *GPR43* が発現することが示された。

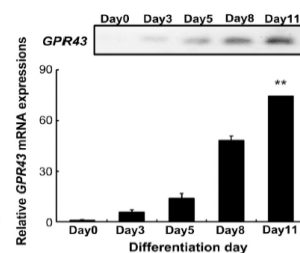


図 1 L6 筋管細胞の分化過程における *GPR43* 遺伝子の発現増加

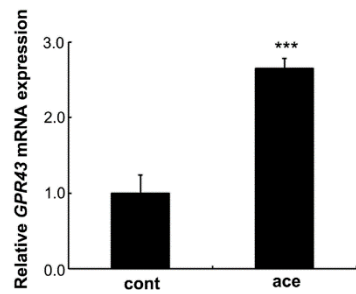


図 2 酢酸処理した L6 筋管細胞における *GPR43* 遺伝子の発現増加

## (2) 酢酸および GPR43 アゴニストによる細胞内カルシウムレベルの増加

酢酸により L6 筋管細胞におけるカルシウム放出が増加したが、*GPR43*siRNA によりその効果は消去された (図 3)。GPR43 アゴニストも同様に細胞内カルシウムレベルを増加させたが *GPR43*siRNA により低下した (図 3)。またホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤 u73122 によってもその効果は低下した (図 3)。これより、酢酸は骨格筋 GPR43 を活性化させて細胞内カルシウムレベルを増加させることが明らかとなった。

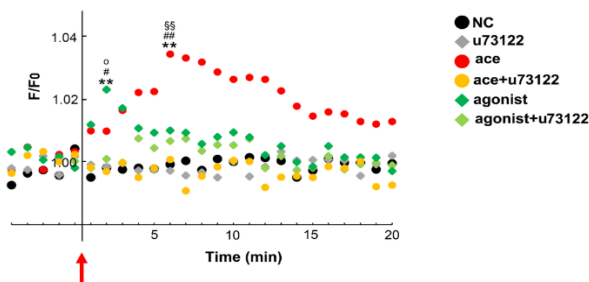


図 3 酢酸ならびに GPR43 アゴニストによる骨格筋細胞内カルシウムレベルの増加

## (3) 酢酸による GPR43 の活性化を介した AMPK の活性化ならびに遅筋線維関連因子の動態解析

L6 筋管細胞に酢酸を処理すると、MEF2A、ミオグロビン、PGC-1 $\alpha$ などの骨格筋遅筋線維およびミトコンドリア関連因子の発現が増加したが *GPR43*siRNA により *GPR43* 遺伝子をノックダウンするとその効果が消去された (図 4)。AMPK のリン酸化レベルも同様に低下した (図 4)。この結果より、酢酸は骨格筋 GPR43 を活性化させて骨格筋の遅筋線維に関連する因子を増加させることが示唆された。

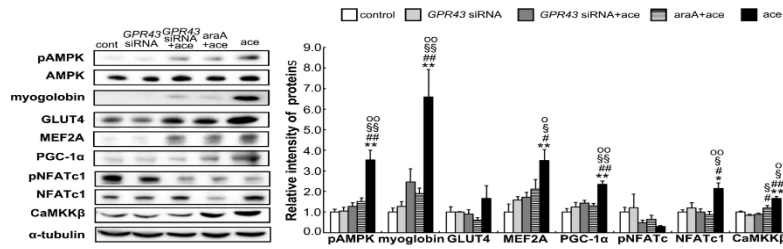


図 4 酢酸による GPR43 の活性化を介した遅筋線維関連因子の発現増加

#### (4) GPR43 の作用を介した骨格筋特異的因子の細胞内局在変化の解析

骨格筋でカルシウムレベルの増加と共に AMPK のリン酸化が増加し、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤によりリン酸化は低下した。またカルシニューリン阻害剤 CsA およびカルモジュリン阻害剤 W7 により酢酸による遅筋線維関連遺伝子およびタンパク質の発現が低下した。さらに酢酸により増加した MEF2A、PGC-1 $\alpha$ 、および NFATc1 の核内局在もそれら阻害剤により低下した(図 5)。ミトコンドリア DNA やミトコンドリア酵素である SDH 活性も酢酸で増加し *GPR43*siRNA により低下した。以上の結果より、酢酸は骨格筋細胞内の GPR43 の活性化を介してカルシウムレベルを増加させ、それにより AMPK、MEF2A、PGC-1 $\alpha$ 、NFATc1 を活性化させて遅筋線維関連因子の増幅に作用することを明らかにした。

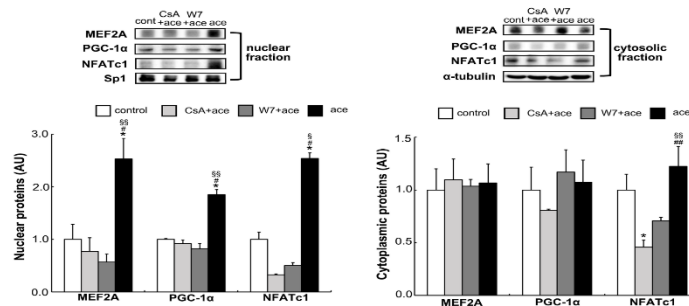


図 5 酢酸による核内タンパク質 MEF2A、PGC-1 $\alpha$ 、NFATc1 の核内局在の増加  
(左図：核内タンパク質の相対量、右図：細胞質タンパク質の相対量)

#### <引用文献>

1. Hitomi Maruta, Hiromi Yamashita, Acetic acid stimulates G-protein-coupled receptor GPR43 and induces intracellular calcium influx in L6 myotube cells, PLOS ONE, 15(9):e0239428 (2020) 1-19,  
**DOI:10.1371/journal.pone.0239428**

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 2件）

1. 著者名 Yun Ma, Hitomi Maruta, Baojun Sun, Chengduo Wang, Chiaki Isono, Hiromi Yamashita	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of long-term taurine supplementation on age-related changes in skeletal muscle function of Sprague-Dawley rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 159-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-020-02934-0	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 Hitomi Maruta, Hiromi Yamashita	4. 巻 15
2. 論文標題 Acetic acid stimulates G-protein-coupled receptor GPR43 and induces intracellular calcium influx in L6 myotube cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239428	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 Chiaki Isono, Hitomi Maruta, Yun Ma, Natsuki Ganeko, Tsuyoshi Miyake, Hiromi Yamashita	4. 巻 86
2. 論文標題 Seasonal variations in major components of Crassostrea gigas from Seto Inland Sea	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1087-1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-020-01458-6	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 Yun Ma, Hitomi Maruta, Baojun Sun, Hiromi Yamashita	4. 巻 27
2. 論文標題 Age-related changes in energy metabolism and skeletal muscle function of Sprague-Dawley rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 岡山県立大学保健福祉学部紀要	6. 最初と最後の頁 83-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15009/00002367	査読の有無 無
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 山下広美	4. 巻 135
2. 論文標題 研究室で学んでみませんか	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床栄養	6. 最初と最後の頁 824-825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 山下広美	4. 巻 3
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本栄養学教育学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌株の特性と肥満抑制効果に関する研究
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yun Ma, Baojun Sun, Hitomi Maruta, Chengduo Wang, Hiromi Yamashita
2. 発表標題 The effects of long-term taurine supplementation on SD ageing rats
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 広美、磯野 千晶、板谷 智恵美、孫 宝軍、丸田 ひとみ
2. 発表標題 瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキ含有成分の季節および地域差の解析
3. 学会等名 第72回日本家政学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 肥満抑制効果を持つ新規ピフィズス菌株に関する研究
3. 学会等名 第53回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下広美
2. 発表標題 酢酸の生理機能性と利用
3. 学会等名 令和2年度食品技術ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸田ひとみ、王承鐸、天満晴菜、馬芸、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 ピフィズス菌発酵乳の抗肥満効果
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌発酵乳の肥満抑制効果
3. 学会等名 第52回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ、山下広美
2. 発表標題 酢酸の骨格筋における生理機能
3. 学会等名 岡山実験動物研究会第77回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 新規ビフィズス菌株の肥満抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitomi Maruta, Syoji Nakamura, Yusuke Fujii, Naoki Toyokawa and Hiromi Yamashita
2. 発表標題 Effect of Bifidobacterium fermented milk on anti-obesity
3. 学会等名 ICPH2019K0BE The 9th International Conference on Polyphenols and Health
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸田ひとみ、Wang Chengduo、天満晴菜、Ma Yun、中村昇二、藤井祐介、豊川直樹、山下広美
2. 発表標題 ビフィズス菌発酵乳の肥満抑制効果に関する研究
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸田ひとみ、富田真江、田中沙都、山下広美
2. 発表標題 酢酸塩による肥満抑制効果の検討
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yun Ma, Hitomi Maruta, Chengduo Wang, Hiromi Yamashita
2. 発表標題 Study on mechanism of taurine function on skeletal muscle and liver of SD aged rat
3. 学会等名 国際タウリン研究会日本部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯野千晶、丸田ひとみ、三宅剛史、山下広美
2. 発表標題 瀬戸内海沿岸で養殖されたマガキ含有成分の解析および機能性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Maruta1*, Chengduo Wang2, Haruna Tenma1, Yun Ma2, Syoji Nakamura, Yusuke Fujii, Naoki Toyokawa and Hiromi Yamashita
2. 発表標題 Effect of Bifidobacterium fermented milk on anti-obesity
3. 学会等名 3rd International Conference on Biologically Active Substances Bioactive Okayama 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chengduo Wang, Hitomi Maruta, Yun Ma, Syoji Nakamura, Yusuke Fujii, Naoki Toyokawa, Hiromi Yamashita
2. 発表標題 Beneficial effect of functional foods on fatty liver
3. 学会等名 3rd International Conference on Biologically Active Substances Bioactive Okayama 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yun Ma, Hitomi Maruta, Chengduo Wang, Hiromi Yamashita
2. 発表標題 2. Study on mechanism of taurine function on skeletal muscle of aged rats
3. 学会等名 3rd International Conference on Biologically Active Substances Bioactive Okayama 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Maruta, Reina Abe, Ma Yun, Aya Araki, Chiaki Isono, Hiromi Yamashita
2. 発表標題 4. Effect of acetic acid intake on muscle quality and expressions of atrophy-related genes of aged rats
3. 学会等名 11th International SCWD Conference on Cachexia, Sarcopenia and Muscle Wasting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下広美
2. 発表標題 瀬戸内海の養殖マガキの栄養と特徴
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会、ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山下広美 他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 331
3. 書名 食べ物と健康 食品の科学	

1. 著者名 山下広美 他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 223
3. 書名 分子栄養学	

〔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
---------	---------