

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14568

研究課題名(和文)ニワトリの骨格筋重量の増大を司るインスリンとIGF-1の生理的役割の違い

研究課題名(英文)Differential physiological roles between insulin and IGF-1

研究代表者

實安 隆興 (Saneyasu, Takaoki)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：20721236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋が産生するIGF-1が筋分化や筋タンパク質代謝調節に及ぼす影響を明らかにする目的で、ニワトリ胚より採取した筋芽細胞、及びそれを用いて形成させた筋管細胞のIGF-1を siRNAでノックダウンし、筋分化関連遺伝子の発現量や、タンパク質代謝調節に関与するAktやErkのリン酸化の割合を調べた。その結果、IGF-1 siRNAにより、調べた全ての筋分化関連遺伝子の発現量、及びAktとErkのリン酸化の割合が有意に低い値を示した。これらのことから、骨格筋由来のIGF-1は、筋分化関連遺伝子の発現調節や、骨格筋のタンパク質代謝調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋IGF-1は骨格筋の成長(筋形成と筋肥大)に重要であると考えられているが、それは骨格筋にIGF-1を過剰発現させた実験動物、及び筋細胞の培養液中にIGF-1を添加したin vitro実験等によって示唆されていることであり、骨格筋で本来作られるだけのIGF-1が筋分化や骨格筋のタンパク質代謝調節に影響を及ぼし得るのかが不明であった。本研究により、骨格筋が作るIGF-1は、筋分化や骨格筋のタンパク質代謝調節に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify effects of skeletal muscle-derived IGF-1 on muscle differentiation and regulation of protein metabolism, I examined the expression of muscle differentiation-related genes and phosphorylation rates of Akt and Erk in chicken embryonic myoblasts and myotubes treated with IGF-1 siRNA. The treatment of IGF-1 siRNA significantly decreased the mRNA levels in the myoblasts and the phosphorylation rates in the myotubes. These results suggest that skeletal muscle-derived IGF-1 plays an important role in regulating the expression of muscle differentiation-related genes and protein metabolism in the skeletal muscle.

研究分野：動物生命科学

キーワード：ニワトリ インスリン IGF-1 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界人口の持続的な増加や、発展途上国の経済発展により、食肉の需要は近年増加し続けている。その中でニワトリは、他の畜種に比べて飼育期間が短く、飼料効率に優れていることから、増加する需要に応え得る畜種として期待されている。ここで、食肉となる骨格筋の重量はタンパク質の合成と分解のバランスによって調節されており、骨格筋のタンパク質代謝調節機構は哺乳動物とニワトリで基本的に同じであることが知られている。即ち、Akt/mTOR/S6 経路が骨格筋重量を調節する極めて重要な経路であり、ニワトリ骨格筋におけるこの経路の調節機構の詳細を明らかにできれば、鶏肉の更なる効率的な生産方法の開発につながると考えられる。

骨格筋の Akt/mTOR/S6 経路を活性化する主要因子として、インスリン(膵臓由来)及びインスリン様成長因子-1 (IGF-1) が知られている。IGF-1 は肝臓、及び骨格筋において合成されるが、肝臓の IGF-1 をノックアウトしてもマウスの体重に影響を及ぼさないことから、骨格筋で合成される IGF-1 が骨格筋の成長に重要であると考えられる。実際、骨格筋に IGF-1 を過剰発現させたマウスの体重や骨格筋重量は増加すること、及び *in vitro* の研究において IGF-1 が筋芽細胞の増殖や分化を促進することが報告されている。しかしながら、これらの報告だけでは、骨格筋で生理的に合成され得る量の IGF-1 が筋分化や骨格筋のタンパク質代謝に影響を及ぼしているのか不明である。また、骨格筋のタンパク質代謝調節におけるインスリンと IGF-1 の役割の違いも未だ明らかにされていない。さらに、血中のインスリン及び IGF-1 (肝臓由来)の合成・分泌機構は数多くの研究報告により明らかにされているが、骨格筋 IGF-1 のそれに関する研究報告は少なく、殆ど明らかにされていない。研究代表者は、先行研究を参考に研究を進め、本研究を開始するまでに下記の研究成果を得ていた。

ニワトリにおいて、絶食により血中インスリン濃度は減少し、それに伴い骨格筋中の Akt/S6 経路は下向きに調節され、再給餌により反転するが、骨格筋 IGF-1 の mRNA 量に絶食による有意な変化は認められない。

ニワトリ骨格筋における IGF-1 mRNA 量、Akt のリン酸化率、及びリボソームプロテイン S6 のリン酸化タンパク質 (pS6) 量は、孵化後から 1 週齢にかけて増加した後、1 週齢から 2 週齢にかけて急激に減少する。

摂食開始前の初生ヒナへの市販飼料の経口投与は骨格筋 IGF-1 mRNA 量を有意に増加させるが、エネルギー源を含まない飼料(セルロース、ビタミン及びミネラルからなる)の経口投与では有意な変化は認められない。また、エネルギー源が糖質あるいはタンパク質のいずれかである飼料の経口投与により、骨格筋 IGF-1 mRNA 量を有意に増加する。

2. 研究の目的

本研究では、インスリンと IGF-1 の生理的役割の具体的な違い、骨格筋由来 IGF-1 が筋分化や骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響、孵化後に骨格筋 Akt/S6 を活性化させるエネルギー源の種類、及び骨格筋 IGF-1 の遺伝子発現調節因子を明らかにする目的で行った。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ筋芽細胞、及び筋管細胞の培養

孵卵 14 日目のプロイラー (Ross308) 胚から胸部の骨格筋を採取し、ハサミで細断した後、0.2% コラゲナーゼ溶液中で 37℃、20 分間処理した。得られた細胞を 15% Fetal Clone III、non-essential amino acid、アンフォテリシン及びゲンタマイシンを含む DMEM 培地に浮遊させ、未コーティングの接着細胞用フラスコに加え、37℃、5% CO₂ で 1 時間培養した。これを繰り返して線維芽細胞を除去した後、I 型コラーゲンをコートした 6 ウェルあるいは 12 ウェルプレートに播種した。その翌日、IGF-1 siRNA (対照群には non-targeting control siRNA) を添加し、2 日間培養後に細胞中の総 RNA を抽出し、筋分化関連遺伝子 (Pax7、MyoD、及び myogenin) の遺伝子発現量を調べた。また、プレートに播種した筋芽細胞を筋管が形成されるまで培養した後、同様に IGF-1 siRNA を添加して 2~3 日間培養後、細胞中のタンパク質を抽出し、タンパク質代謝調節に関与する Akt 及び Erk のリン酸化の割合を調べた。

(2) ニワトリ胚へのストレプトゾトシン投与

プロイラー (Ross308) 受精卵を用い、孵卵 12 日あるいは 18 日にストレプトゾトシン (500mg/kg) を羊膜内に投与した。孵卵を継続し、孵化したヒナを 1 週間飼育し、体重、摂食量、血糖値、及び血中インスリン濃度を測定した。

(3) エネルギー源が異なる飼料の経口投与

プロイラー (Ross308) の初生ヒナに、エネルギー源が糖質、タンパク質、あるいは脂質のいずれかからなる飼料をカルボキシメチルセルロース溶液に分散させたものを 6 時間間隔で 4 回経口投与した。各試料の代謝エネルギーは全て等しくなるように設計した。また、1 回に投与する飼料重量は、初生ヒナが 24 時間で摂食する市販飼料重量から算出した代謝エネルギーの 1/4 に相当する量とした。4 回目の投与から 3 時間後に浅胸筋を採取し、浅胸筋中の Akt と S6 のリン酸化の割合と、筋タンパク質分解に関与する atrogin-1 の遺伝子発現量を調べた。

(4) マイクロアレイ解析

2 週齢のプロイラー (Ross308) の浅胸筋を摘出し、IGF-1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR

法で解析した。体重は同じくらいだが IGF-1 の遺伝子発現量が 2 倍程度異なるサンプルを選び、それらの総 RNA を用いて GeneChip Array 発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ニワトリ筋芽細胞、及び筋管細胞の培養

筋芽細胞を用いた実験において、IGF-1 siRNA 添加により今回調べた 3 つの遺伝子発現量は有意に低い値を示した。また、筋管細胞を用いた実験において、IGF-1 siRNA 添加により、Akt 及び Erk のリン酸化の割合は有意に低い値を示した。これらのことから、骨格筋由来の IGF-1 は、筋分化関連遺伝子の発現調節や、骨格筋のタンパク質代謝調節に関与していることが示された。

(2) ニワトリ胚へのストレプトゾトシン投与

測定した全ての項目において、ストレプトゾトシン投与による有意な差は認められず、内因性のインスリンが骨格筋の成長に及ぼす影響について調べることができなかった。

(3) エネルギー源が異なる飼料の経口投与

糖質試料の投与により、Akt のリン酸化の割合は増加したが、S6 のリン酸化の割合に変化はなかった。また、atrogin-1 の遺伝子発現量は減少した。一方、タンパク質試料の投与により、S6 のリン酸化の割合は増加したが、Akt のリン酸化の割合に変化はなかった。脂質試料の投与では、いずれのリン酸化の割合も変化はなかった。これらのことから、飼料中の糖質とタンパク質が骨格筋の Akt/S6 に及ぼす影響は異なる可能性が示された。

(4) マイクロアレイ解析

GeneChip Array 発現解析の結果、IGF-1 の遺伝子発現が高いサンプルと低いサンプル間でのシグナルの倍率変化が 2 倍以上であった遺伝子は 821 個抽出された。しかし、それらの中に遺伝子の転写調節に関与する因子は見当たらなかった。

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
--	---------------------------	-----------------------	----