

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24年 5月23日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880006

研究課題名（和文）筋形成抑制因子マイオスタチンの機能制御における栄養センサーAMPKの作用

研究課題名（英文）Role of nutrient sensor AMPK on regulation of myogenic inhibitory factor myostatin.

研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE MASATO)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：30588976

研究成果の概要（和文）：ウシ腰最長筋より高効率で筋管へと分化可能なウシ初代筋芽細胞培養系を確立した。採取した筋芽細胞は、筋芽細胞マーカーMyf5を発現し、分化誘導によって分化マーカーmyogeninを発現した。AMPKを活性化する低グルコース培地で分化誘導したとき分化が抑制され、マイオスタチン（MSTN）発現が減少した。しかし、MSTNレセプターの発現に変化は無かった。AMPKの活性化剤AICARは同様に筋分化を抑制し、MSTN発現を低下させた。また、AICARはMSTNシグナル阻害剤の作用を打ち消した。よって、AMPKはMSTNの作用を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Primary myoblasts that can efficiently differentiate to myotube was established from bovine skeletal muscle. The myoblasts was expressed myoblast marker Myf5 during proliferation and differentiation marker myogenin during differentiation. These cells were inhibited differentiation and MSTN expression under low glucose condition, which activates AMPK. However expression of MSTN receptor was not changed. AMPK activator AICAR also inhibited differentiation and expression of MSTN in myotubes. The effect of antagonist of MSTN signaling was abolished by AICAR. These results suggest that AMPK regulates the action of MSTN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：ウシ、骨格筋、マイオスタチン、AMPK、グルコース、分化、

1. 研究開始当初の背景

(1) マイオスタチン（MSTN）は、主として骨格筋から産生され、骨格筋の形成を負に制御する分泌因子として発見された。MSTNは、受容体である Activin receptor type IIB

に結合し、細胞内シグナル伝達因子である Smad2/3 を介して作用する。また、MSTNは脂肪形成を促進することも報告されている。MSTN機能の全容解明や制御法の確立は、畜産学分野では産肉量や脂肪交雑量の制御

法の開発、医学分野では筋疾患やメタボリックシンドロームの治療薬への応用が期待されている。

(2) AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内の AMP/ATP 比を感知して AMP が高いエネルギー欠乏時に活性化してシグナルを伝える因子である。AMPK は主としてグルコース取り込みの増加や脂肪酸 β 酸化の促進などの異化作用を通してエネルギーを産生する。よって、AMPK は細胞内で栄養センサーとして働いていると考えられている。また、筋肥大の制御に関与することも報告されており、筋機能制御における中心的な因子の一つである。

2. 研究の目的

生体の栄養環境は、筋細胞や脂肪細胞における遺伝子発現やタンパク質機能の制御を介して筋の成長や脂肪蓄積を調節している。成長や代謝に関わる MSTN も同様に栄養環境によって発現や機能が変動すると考えられヒトやマウスでは MSTN が肥満などで発現が変化することが報告されているが、その詳細は未解明な部分が残されている。以上のことから、MSTN 作用が生体の栄養素のうちグルコースによって調節され、その調節が栄養センサーである AMPK を介して行われているのではないかとこの着想に至った。MSTN の作用制御の可能性としては、主として 1) MSTN と関連遺伝子の発現制御と 2) MSTN の活性制御が考えられる。よって、本研究ではウシ筋細胞において正確な解析を可能とする筋芽細胞培養系を確立し、筋細胞の MSTN の発現と活性制御における AMPK の役割を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ウシ初代筋芽細胞培養系の確立

ウシの最長筋より初代筋芽細胞培養系の確立を行った。さらにそれらの筋分化能、筋細胞マーカー(Myf5、myogenin、myosin)の発現を免疫染色法で確認した。

(2) 低グルコース下における MSTN 関連遺伝子発現とシグナル伝達活性の解析

作成したウシ初代筋芽細胞培養系を用いて AMPK を活性化する低グルコース培地で培養したときの筋分化を抗 myosin 抗体による免疫染色法で、MSTN とレセプターなどの関連遺伝子の mRNA 発現を定量 PCR 法で解析した。

また、MSTN の作用の強さについて下流のシグナル伝達因子である Smad2/3 のリン酸化を wesern blot 法で、Smad2/3 の活性化を Smad 応答配列によるルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。

(3) AMPK 活性化による MSTN 関連遺伝子発現

ウシ筋芽細胞培養系に AMPK 活性化剤である AICAR を加えたときの筋分化を抗 myosin 抗体による免疫染色法で、MSTN 関連遺伝子の mRNA 発現を定量 PCR 法で解析した。また MSTN 発現変動の機能的意義を確認するため AICAR と MSTN もしくは AICAR と MSTN シグナル阻害剤 SB431542 の共刺激下での筋分化について免疫染色法で解析を行った。

4. 研究成果

(1) ウシ腰最長筋より消化酵素を用いて初代筋芽細胞培養系を確立した。これら筋芽細胞は増殖期において筋芽細胞マーカーである Myf5 を発現し (図 1A)、分化誘導によって初期から筋分化マーカー myogenin を発現した (図 1B)。さらに、分化誘導によって融合し筋前駆細胞である筋管を形成した (図 1C)。これら解析から今回確立した方法による培養系は高い分化能をもちウシ骨格筋の形成や代謝機能などを解析する上で有用である。

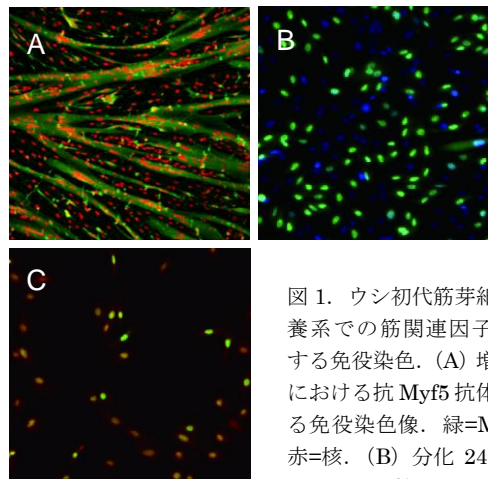


図 1. ウシ初代筋芽細胞培養系での筋関連因子に対する免疫染色像。(A) 増殖期における抗 Myf5 抗体による免疫染色像。緑=Myf5、赤=核。(B) 分化 24 時間後における抗 myogenin 抗体による免疫染色像。緑=myogenin、青=核。(C) 分化 48 時間後における抗 myosin 抗体による免疫染色像。緑=myosin、赤=核。

(2) AMPK は、AMP/ATP 比の上昇によって活性化するため細胞外グルコース濃度の低下が AMPK を活性化することが報告されている。そこで、ウシ初代筋芽細胞培養系を通常グルコース(25 mM)もしくは低グルコース(5、0.5、0.1 mM)培地を用いて分化誘導を行った。その結果、細胞内 ATP 量が減少し筋分化(筋管形成)が抑制された。このとき、MSTN mRNA 発現は、0.5 mM 以下の低グルコース培地での培養時に大きく低下した (図 2A)。しかし、MSTN レセプターである ActRIIB の発現に変化は見られなかった。以上のことからグルコース量が筋分化と

MSTN 発現を制御していることが示唆された。

さらに、MSTN 活性を調べるために筋芽細胞を低グルコースで培養したときの MSTN のシグナル伝達活性を解析した。培地のグルコース濃度を低下させても Smad2/3 のリン酸化に変化は見られなかった。一方で、0.5 mM のグルコース濃度で細胞を培養したとき MSTN による Smad 応答配列のレポーター活性の上昇は抑制された(図 2B)。よって、グルコースは細胞外での MSTN 活性には影響しないが、MSTN が作用したあとの細胞内シグナル伝達を調節している可能性が示された。

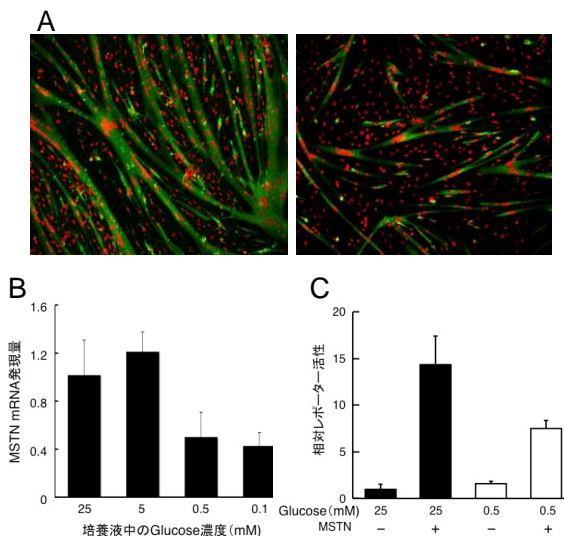


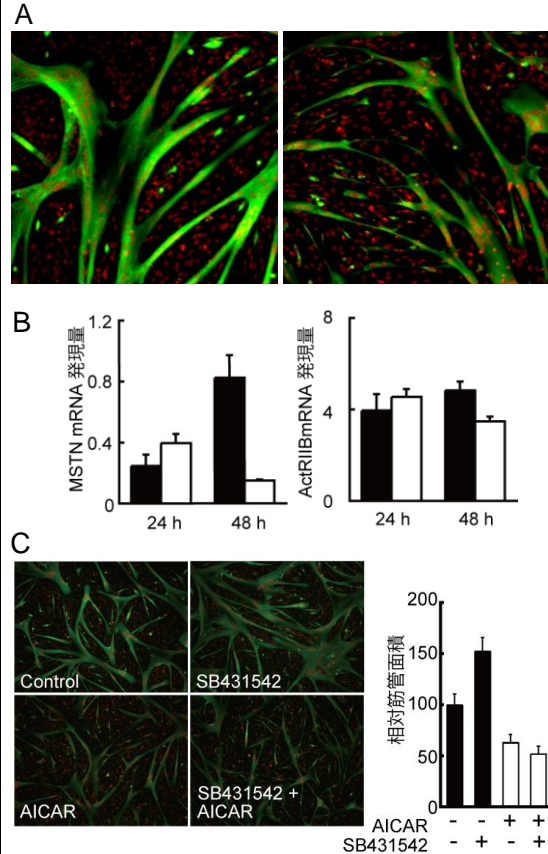
図 2. 低グルコース培養での筋分化と MSTN 関連遺伝子発現. (A) 分化 48 時間後における抗 myosin 抗体による免疫染色像. 緑=myosin, 赤=核. 左: 25 mM グルコース培養区, 右: 0.5 mM グルコース培養区. (B) 低グルコース培養時のウシ筋芽細胞における MSTN mRNA 発現解析. (C) 低グルコース培養時のウシ筋芽細胞における Smad 応答配列のレポーター活性.

(3) AICAR は AMPK の特異的活性化剤として知られている。ウシ初代筋芽細胞の筋分化時に AICAR で刺激したところ、AMPK の活性化が確認された。そのとき AICAR によって筋分化が抑制された(図 3A)。しかし、分化マーカーである myogenin のタンパク質発現は上昇した。そのとき、MSTN 発現は著しく抑制された(図 3B)。さらに、ActRIIB、Smad2 の mRNA 発現も有意に抑制された。よって、AMPK の活性化が MSTN 発現を制御し、グルコースによる MSTN 発現調節は AMPK 活性と関連する可能性が示唆された。

筋分化における AMPK 活性化と MSTN 作用の関連を解析するためにウシ筋芽細胞を AMPK と AICAR で共刺激して筋分化を解析した。共刺激によって AICAR や MSTN 単独よりも強く分化を抑制した。一方 AICAR と SB431542 で共刺激したとき、SB431542 は

分化を促進するが、AICAR での分化抑制時は分化促進することが出来なかった(図 3C)。以上のことから、筋分化期において AMPK シグナルと MSTN シグナルのクロストークの存在が示唆された。

図 3. ウシ筋芽細胞における AICAR の MSTN 関連遺伝子発



現と分化に及ぼす作用. (A) 分化 48 時間後における抗 myosin 抗体による免疫染色像. 緑=myosin, 赤=核. 左: 25 mM 対照区, 右: AICAR 刺激区. (B) AICAR 刺激時のウシ筋芽細胞における MSTN (左)、ActRIIB (右) mRNA 発現解析. (C) 分化 48 時間後における抗 myosin 抗体による免疫染色像と myosin 陽性細胞面積の相対値. 緑=myosin, 赤=核.

以上のことから、ウシ骨格筋において MSTN は細胞外グルコース濃度の低下によって AMPK を介して発現低下すること、MSTN シグナルとグルコース-AMPK シグナル伝達の間にはクロストークが存在することが示唆された。さらなる解析によって栄養環境と骨格筋成長の関連が明らかになることが期待される。

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 3 件)

- ① Masato Miyake, Hideyuki Takahashi, Kitagawa Eri, Hitoshi Watanabe,

Takahiro Sakurada, Aso Hisashi, Takahiro Yamaguchi. AMPK activation by AICAR inhibits myogenic differentiation and myostatin expression in Cattle. Cell and Tissue Research, 査読有, 2012 (印刷中)
DOI: 10.1007/s00441-012-1422-8

- ② Masato Miyake, Shinichiro Hayashi, Shunsuke Iwasaki, Takafumi Uchida, Kouichi Watanabe, Shyuichi Ohwada, Hisashi Aso, Takahiro Yamaguchi. TIEG1 negatively controls the myoblast pool indispensable for fusion during myogenic differentiation of C2C12 cells. Journal of Cellular Physiology, 査読有, 226, 2011, pp. 1128-1136
DOI: 10.1002/jcp.22434
- ③ Hitoshi Watanabe, Daisuke Akasaka, Hideki Ogasawara, Kan Sato, Masato Miyake, Hisashi Aso et al. Peripheral Serotonin Enhances Lipid Metabolism by Accelerating Bile Acid Turnover. Endocrinology, 査読有, 151, 2010, pp. 4776-4786
DOI: 10.1210/en.2009-1349

[学会発表] (計 11 件)

- ① 北川絵理、三宅雅人、高橋秀之、櫻田隆大、白須直樹、渡邊康一、大和田修一、麻生 久、ウシ骨格筋線維型に依存した筋衛星細胞のミオスタチン発現、第 115 回日本畜産学会大会、2012.3.27、名古屋大学 (名古屋市)
- ② 麻生 久、高橋秀之、三宅雅人、浦川めぐみ、渡邊一史、長澤裕哉、寺田俊介、大崎慶也、平田利幸、佐藤光美、佐藤富雄、大和田修一、渡邊康一、草原短角種牛におけるグルコース代謝特性、第 115 回日本畜産学会大会、2012.3.27、名古屋大学 (名古屋市)
- ③ 櫻田隆大、白須直樹、北川絵理、三宅雅人、大和田修一、山口高弘、麻生 久、渡邊康一、ウシ骨格筋線維型における筋小胞体カルシウムイオンポンプの発現様式、第 61 回東北畜産学会大会、2011.9.8、青森市文化観光交流施設 (青森市)
- ④ 小笠原英毅、畔柳 正、米澤智洋、渡邊康一、三宅雅人、高橋秀之、小野 泰、大和田修一、麻生 久、山口高弘、寶示戸雅之、放牧など自給粗飼料 100% で生産した日本短角種および北里八雲牛の枝肉成績と筋線維型構成、第 114 回日本畜産学会大会、2011.8.26、北里大学 (十和田市)
- ⑤ 浦川めぐみ、名谷真琴、高橋秀之、三宅雅人、堀越頼子、佐藤富男、佐藤光美、大崎慶也、平田利幸、麻生 久、山口高弘、黒毛和種、日本短角種ならびにホルスタイン種子ウシの白血球と T 細胞サブセットの比較、第 114 回日本畜産学会大会、2011.8.26、北里大学 (十和田市)
- ⑥ Takahiro Sakurada, Eri Kitagawa, Masato Miyake, Shyuichi Ohwada, Hisashi Aso, Kouichi Watanabe. Early adaptation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in bovine myofiber under chronic low-frequency electrical stimulation. ADSA-ASAS 2011 Joint Annual Meeting 2011. 7. 10, Ernest N. Morial Convention Center (アメリカ合衆国ルイジアナ州)
- ⑦ 名谷真琴、高橋秀之、三宅雅人、堀越頼子、渡邊康一、田中沙智、佐藤富雄、佐藤光美、大崎慶也、平田利幸、大和田修一、麻生 久、山口高弘、黒毛和種新生仔牛の末梢血における白血球および T 細胞サブセットの出現割合、第 60 回東北畜産学会大会、2010. 8. 29、いわて県民情報交流センター (盛岡市)
- ⑧ 巢 国正、三宅雅人、渡邊一史、北川絵理、中野辰也、高橋 遊、大和田修一、渡邊康一、麻生 久、山口高弘、血小板由来セロトニンの骨格筋再生に及ぼす影響、第 60 回東北畜産学会大会、2010. 8. 29、いわて県民情報交流センター (盛岡市)
- ⑨ 北川絵理、三宅雅人、今井由佳、岩崎俊輔、渡邊康一、大和田修一、麻生 久、山口高弘、牛骨格筋における筋衛星細胞の分布と挙動、第 60 回東北畜産学会大会、2010. 8. 29、いわて県民情報交流センター (盛岡市)
- ⑩ 渡邊一史、齋藤和輝、三宅雅人、高橋 遊、本堂哲也、佐藤 幹、大和田修一、渡邊康一、山口高弘、麻生 久、糖代謝および脂質代謝における末梢セロトニンの作用機構の解析、第 60 回東北畜産学会大会、2010. 8. 29、いわて県民情報交流センター (盛岡市)
- ⑪ 渡邊一史、齋藤和輝、三宅雅人、高橋 遊、本堂哲也、佐藤 幹、大和田修一、渡邊康一、山口高弘、麻生 久、末梢セロトニンの血糖値上昇作用メカニズムの解析、第 15 回アディポサイエンス研究会、2010.8.21、千里阪急ホテル (豊中市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 雅人 (MIYAKE MASATO)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・特任助教

研究者番号：30588976