

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450461

研究課題名(和文)反芻動物特異的な超疲労耐久性筋線維型分化機構の解明

研究課題名(英文) Differentiation mechanism of type ID myofiber as a ruminant-specific super fatigue-resistant myofiber type

研究代表者

渡邊 康一 (WATANABE, Kouichi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80261494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：反芻動物の抗重力筋にのみ存在する、強い3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素活性を持つI型筋線維(ID型：超疲労耐久性筋線維)は、筋小胞体から放出されるカルシウムイオンを筋線維内に高いレベルで維持して持続的な筋運動に適応し、高い脂肪代謝能力によってエネルギーを供給することで、超疲労耐久性を発揮することが判明した。ウシの筋線維型分化においては、Sirtuin1によって活性化したPGC-1 $\alpha$ がミトコンドリアを増生するとともにIIA型筋線維への変移が進行し、さらにI型筋線維への分化誘導時にミトコンドリアでSirtuin3が発現上昇することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ruminant-specific type ID myofibers as a super fatigue-resistant myofiber, which are distributed in anti-gravity muscles involved in posture maintenance, possess strong 3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity. In bovine muscles, our results suggest that type ID myofibers are possible to keep higher sarcoplasmic calcium ion level for long-term muscular movement, and have higher metabolic capacity of fatty acid than other myofiber types for sufficient energy supply. Moreover, it suggests that sirtuin1 activate PGC-1 $\alpha$  for increasing of mitochondria in myofiber transition of "type IIB to type IIA" as oxidative change. Successively, upregulation of sirtuin3 in mitochondria seems to lead induction of fast-to-slow transformation and appearance of type ID myofiber involved in super fatigue-resistance.

研究分野：機能形態学

 キーワード：超疲労耐久性筋線維 ウシ 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 カルシウムイオン関連因子 Sirtuin カルニチンアシル基転移酵素-1 $\beta$  機能適応 ID型筋線維

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の骨格筋線維は遅筋型の I 型筋線維と速筋型の IIA 型および IIB 型筋線維に分類される。反芻動物の I 型筋線維には、姿勢保持の抗重力作用や反芻時の咀嚼など持続的筋運動に高度に適応した超疲労耐久性筋線維型の ID 型と IE 型の亜型が存在する。これらは通常の I 型 (IC 型) 筋線維より大きな径を持ち、ミトコンドリアの好氣的代謝能が高いことが特徴的で、特に強い 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (3-HBD) 活性を示す。しかし、ID 型筋線維の発見より約 40 年を経てもその機能特性の詳細は不明な点が多い。

筋線維は機能的要請に対する適応能力があり、筋タンパク質を置き換えて筋線維型を変化させる高い可変性を持つ。このことは申請者が、速筋型筋線維から遅筋型筋線維への筋線維型移行させるウシ骨格筋への持続的低周波電気刺激 (CLSF) 負荷実験からも実証されている。CLSF や持続的な運動負荷などで筋線維内カルシウム濃度が上昇すると、カルシニューリンを介したシグナル伝達によって、ミトコンドリア増生に作用する PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) が発現上昇することが報告されている。また、筋線維型変移に応じてカルシウムと関連するトロポニンや筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA) の Slow 型アイソフォームの発現上昇も生じることから、筋線維でのカルシウムシグナリングが筋線維型分化機構を制御するキープクターの一つであることは疑いないが、本質的な筋線維型変移トリガーは未確定である。

## 2. 研究の目的

反芻動物の骨格筋にのみ存在する、強い 3-HBD 活性を持つ I 型筋線維 (ID 型と IE 型筋線維) は、超疲労耐久性を有する筋線維であると考えられているが、その詳細な特徴は明らかではない。また、I 型筋線維は持続的筋運動に応じた PGC-1 $\alpha$  発現上昇で分化誘導されるが、電気刺激による人為的な筋線維型誘導において、細胞内カルシウムイオンシグナリング経路が筋線維型分化まで直接作用する機序は未確定である。また、超疲労耐久性筋線維の持続的筋運動への適応ではミトコンドリアの増生と好氣的代謝能の向上が伴うため、細胞内の代謝制御因子 Sirtuin (SIRT) が、筋線維型分化誘導に関与する可能性がある。細胞質の SIRT1、ミトコンドリア内の SIRT3 の動態から筋線維型変移機序を解析することで、反芻動物特有の筋線維型分化調節機構を解明し、骨格筋線維の持つ機能的可変性の本質をエネルギー代謝の面から明らかにする。

## 3. 研究の方法

ウシ骨格筋より抗重力機能の異なる筋 (ID

型筋線維の多い腹鋸筋と中間広筋、ID 型筋線維の無い腰最長筋および IE 型筋線維の咬筋) を採取し、それぞれの筋の筋線維型を組織化学的に解析した。

酵素組織化学的には NADH 脱水素酵素活性、3-HBD 活性による染色を行ない、免疫組織化学的解析には、ミオシン重鎖 (MyHC; Slow, Fast)、SERCA、リアノジンレセプター (RyR) ミトコンドリア内膜のカルシウムイオンチャネル調節因子 (MICU1)、脂肪酸輸送タンパク質 (FAT/CD36)、カルニチンアシル基転移酵素 (CPT-1b) について抗体を用いて免疫染色し、それぞれの染色強度を画像解析した。また、超疲労耐久性筋線維型における PGC-1 $\alpha$  や Sirtuin 等の遺伝子発現様式をリアルタイム PCR 解析によって定量化した。

また、持続的低周波電気刺激 (CLFS) による I 型筋線維誘導モデルを用いて超疲労耐久性筋線維型を誘導し、筋線維型移行時の Ca シグナリング因子、PGC-1 $\alpha$ 、Sirtuin および筋関連因子の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。さらに発育過程あるいは CLFS 筋線維型変移モデルで、筋線維型変移過程での Sirtuin とキープクター候補遺伝子発現動態の時系列作用連関をリアルタイム PCR 法によって解析した。

## 4. 研究成果

## (1) 反芻動物特異的な超疲労耐久性筋線維型の特性解明

## a. カルシウムイオンシグナリング機構

ウシの腰最長筋、腹鋸筋および中間広筋における超疲労耐久性筋線維型としての ID 型筋線維の特性を酵素および免疫組織化学的に解析した。3-HBD 活性の強い ID 型筋線維は、腹鋸筋と中間広筋に確認され、腰最長筋には認められなかった (図 1)。

免疫組織化学染色によって、ID 型筋線維は通常の IC 型筋線維と同等の遅筋型 MyHC の発現強度を示すが、ID 型筋線維は遅筋型 SERCA (SERCA2) の発現と筋小胞体からカルシウムイオンを放出する RyR の発現が IC 型筋線維よりも発現が低く、一方ミトコンドリア内膜の MICU1 の発現が高いことを見出した (図 2)。筋収縮の際に筋小胞体から放出されたカルシウムイオンを細胞質から回収するイオンポンプが下方制御され、カルシウムイオン濃度が一定に保たれる必要のあるミトコンドリアのイオンチャネル調節因子が上方制御されることは、ID 型筋線維が姿勢保持の持続的筋運動のために細胞内カルシウムイオンを高濃度に維持していることを示唆する。

ID 型筋線維は IC 型筋線維に比べ、①SERCA2 発現が有意に低いこと、②RyR 発現が有意に低いこと、③MICU1 に発現が有意に高いこと、の 3 点を見出した。反芻動物の抗重力筋に分布する I 型筋線維は、姿勢保持のため常時反射的な筋運動を行っており、I 型筋線維の分布は骨格筋の中でも体重を支えるの

に適した部位に局在している。筋収縮はカルシウムイオンをトリガーとしていることから、ID型筋線維では持続的に筋収縮を行えるよう細胞内のカルシウムレベルが高く維持されていること、すなわちSERCA2の発現が下がり、RyRの要求性も減少するという機能的適応が生じたと考えられる。一方、高レベルのカルシウムイオンからミトコンドリアを守るため、MICU1が発現上昇していると考えられる。

図1 ウシの筋線維型分類  
1a: 抗 Slow MyHC 抗体による免疫染色。I型筋線維が陽性、1b: 抗 Fast MyHC 抗体による免疫染色。II型筋線維が陽性。  
1c: NADH 脱水素酵素による酵素染色。I型とIIA型筋線維に強い活性。1d: 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素による酵素染色。ID型筋線維に強い活性。A: IIA型筋線維、B: IIB型筋線維、C: IC型筋線維、D: ID型筋線維。ウシ腹筋。Bar = 40 μm。

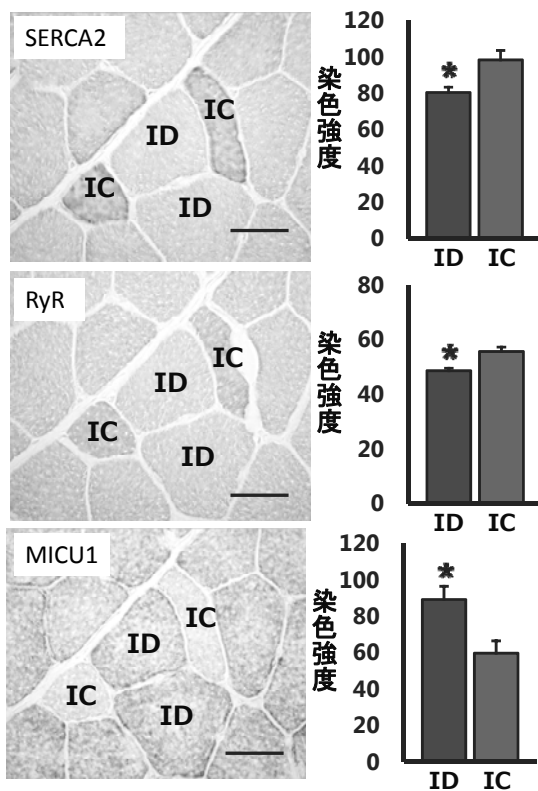


図2 ウシ中間広筋におけるカルシウムイオン関連因子の発現 Bar=40μm

## b. エネルギー代謝特性

ID型筋線維が発見されたとき、3-HBD活性が著しく高く、筋線維内に微細な脂肪滴が存在することから、ID型筋線維には高い脂肪代謝能力があることが予測されていたが、3-HBD自体は脂肪代謝酵素ではないため直接的な証拠が無く、機能の詳細は不明なままであった。筋線維が脂肪代謝を行うためには、まず細胞内に脂肪酸を取り込み、さらにそれをミトコンドリア内に送り込む必要がある。そこで、筋線維内に脂肪酸を取り込む細胞膜の脂肪酸輸送タンパク質 (FAT/CD36) の発現と、ミトコンドリア内に脂肪酸を輸送するカルニチンアシル基転移酵素 (CPT-1b) の発現を、免疫組織化学的染色によって調べ、画像解析によってそれらの染色強度を測定した。

ウシ骨格筋におけるFAT/CD36の発現は、ID型、IC型およびIIA型筋線維に認められ、好氣的代謝能の高い筋線維型で筋線維内に脂肪を取り込む能力が高まっていることが示された。一方、CPT-1bはID型筋線維に最も強く発現しており、IC型とIIA型筋線維がそれに次ぐ発現の強さとなった。また、IIB型筋線維には脂肪代謝関連因子の発現は認められなかった(図3)。

本研究の結果により、ウシのID型筋線維において、筋線維内への脂肪酸取り込み能とミトコンドリア内への脂肪酸輸送能力が高いことが明らかとなり、超疲労耐久性を発揮するID型筋線維のエネルギー供給が脂肪代謝によってもたらされることが初めて証明された。

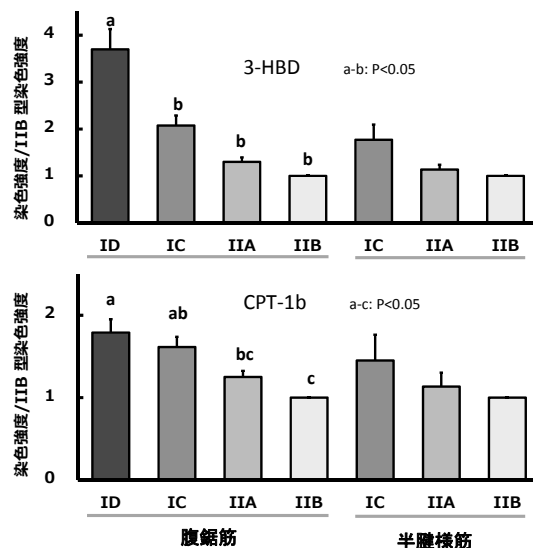


図3 ウシの筋線維型における3-HBD活性とCPT-1b発現

## (2) 筋線維型分化調節機構の解明

I型筋線維を支配する運動神経と同等の頻度のCLFSを40日間行なうことによって、ID型筋線維の存在しないウシ腰最長筋に3-HBD活性陽性のI型筋線維を人為的に誘導できることを明らかにした。持続的低周波電気刺激はII型(速筋型)筋線維からI型(遅筋型)筋線維への筋線維型変移を誘導するが、同時

に通常の I 型 (IC 型) 筋線維をさらに ID 型筋線維へ亜型変移させ得ることが明らかとなった。

この反芻動物特異的な超疲労耐久性筋線維型の分化機構を明らかにするため筋線維型移行キープクター候補について、PGC-1 $\alpha$ 、SIRT1 および SIRT3 の遺伝子発現を中間広筋、腹鋸筋、半腱様筋、最長筋においてリアルタイム PCR によって解析した (図 4)。

PGC-1 $\alpha$  と SIRT3 は筋間で有意な差異は認められなかった。一方、SIRT1 は II 型筋線維の多い筋で高く、I 型筋線維の多い筋で低いという結果が得られた。さらに、30 日間の持続的低周波電気刺激 (CLSF) を行なった最長筋では、PGC-1 $\alpha$  と SIRT1 の発現に変化は見られなかったが、SIRT3 に発現上昇が認められた。SIRT1 は筋線維が嫌氣的代謝から好氣的代謝に移行する際に発現上昇し、PGC-1 $\alpha$  を活性化させることを示唆する。ウシ最長筋への CLFS では、30 日間の刺激で I 型筋線維への誘導よりも IIB 型から IIA 型筋線維への誘導が主となっていたため、CLFS による SIRT1 の発現変動が認められなかった可能性があり、一方でミトコンドリアの増生に呼応して SIRT3 の発現が上昇したものと考えられる。

本研究で明らかとなった、反芻動物特異的な超疲労耐久性筋線維型の分化機構を図 5 に示す。本研究では、I 型筋線維の分化において想定された PGC-1 $\alpha$  の発現上昇はみられず、I 型筋線維分化のキープクターとは確定で

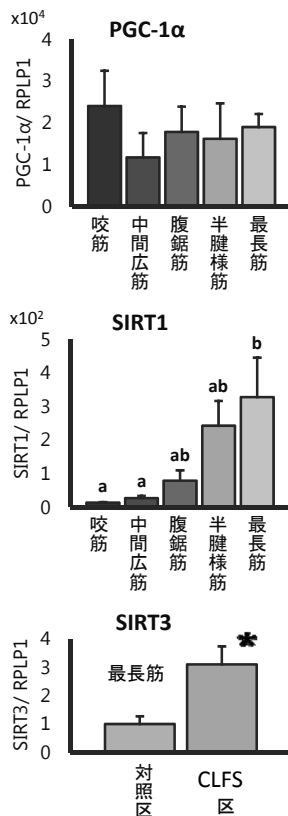


図 4 ウシ骨格筋における PGC-1 $\alpha$ 、SIRT1 および SIRT3 の遺伝子発現

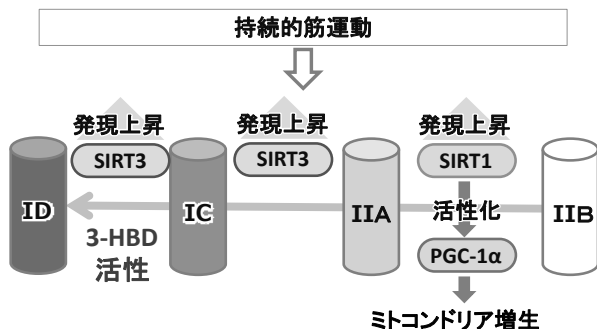


図 5 反芻動物特異的な超疲労耐久性筋線維型の分化機構

きなかった。しかし、I 型筋線維の少ない最長筋や半腱様筋で SIRT1 の発現が高かったことは、PGC-1 $\alpha$  を活性化してミトコンドリア増生を誘導し、IIB 型筋線維から IIA 型筋線維に筋線維型移行する際のキープクターとなっている可能性が示された。また、ミトコンドリアの代謝機能と関連する SIRT3 は、CLFS で人為的に筋線維型誘導を行なった際に発現上昇が見られたことから、筋線維の好氣的代謝機能の亢進に一過性に作用し、I 型筋線維の亜型変移に貢献すると考えられる。

## 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 5 件)

- ① 渡邊康一, 筋線維型と食肉のおいしさ—反芻動物特異的な I 型筋線維の産肉論的機能形態学解析—, 東北畜産学会報, 査読有, 66 巻, 2016, 1-6.
- ② Watanabe H., Nakano T., Saito R., Akasaka D., Saito K., Ogasawara H., Minashima T., Miyazawa K., Kanaya T., Takakura I., Inoue N., Ikeda I., Chen X., Miyake M., Kitazawa H., Shirakawa H., Sato K., Tahara K., Nagasawa Y., Rose M. T., Ohwada S., Watanabe K., Aso H., Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. PLoS One, 査読有, Vol. 11:e0147143, 2016, - DOI: 10.1371/journal.pone.0147143
- ③ Yi K., So K., Hata Y., Suzuki Y., Kato D., Watanabe K., Aso H., Kasahara Y., Nishimori K., Chen C., Katoh K., Roh SG., The regulation of oxytocin receptor gene expression during adipogenesis. Journal of Neuroendocrinology, 査読有, Vol. 27, 2015 335-342. DOI: 10.1111/jne.12268
- ④ Watanabe H., Chen X., Shoji N., Saito R., Nakano T., Saito K., Sumiyoshi K., Rose M. T., Okada N., Watanabe K., Aso H., Stimulatory effect of plasma samples from fattening cattle on adipogenesis-related gene expression in preadipocyte cells. Animal Science Journal, 査読有, Vol. 86, 2015, 698-706. DOI: 10.1111/asj.12344
- ⑤ Takahashi H., Sato K., Yamaguchi T., Miyake M., Watanabe H., Nagasawa Y., Kitagawa E., Terada S., Urakawa M., Rose M. T., McMahon C. D., Watanabe K., Ohwada S., Gotoh T., Aso H. Myostatin alters glucose transporter-4 (GLUT4) expression in bovine skeletal muscles

and myoblasts isolated from double muscled (DM) and normal muscled (NM) Japanese shorthorn cattle. Domestic Animal Endocrinology, 査読有, Vol. 48, 2014, 62-68,  
DOI: 10.1016/j.domaniend.2014.01.007

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 對木陽淳・佐藤貴俊・野地智法・麻生久・渡邊康一、ウシ ID 型筋線維の脂肪代謝能に関する免疫組織化学的解析、第 121 回日本畜産学会大会、2016 年 03 月 28 日、日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)
- ② 渡邊康一、反芻動物特異的 I 型筋線維の産肉論的機能形態学解析、第 65 回東北畜産学会大会、2015 年 08 月 27 日、東北大学農学部(宮城県仙台市)
- ③ 佐藤貴俊、白須直樹、櫻田隆大、野地智法、麻生久、渡邊康一、反芻動物特異的 I 型筋線維サブタイプの免疫組織化学的特性の解明、第 119 回日本畜産学会大会、2015 年 03 月 28 日、宇都宮大学峰キャンパス(栃木県宇都宮市)
- ④ 佐藤貴俊・白須直樹・櫻田隆大・野地智法・麻生久・渡邊康一、ウシ骨格筋への低周波電気刺激による ID 型筋線維の誘導、第 64 回東北畜産学会大会、2014 年 09 月 12 日、コラッセふくしま(福島県福島市)
- ⑤ 白須直樹、佐藤貴俊、櫻田隆大、野地智法、麻生久、渡邊康一、ウシ最長筋における筋線維型移行に伴う筋タンパク質分解系の発現解析、第 118 回日本畜産学会大会、2014 年 03 月 27 日~2014 年 03 月 28 日、エポカルつくば(茨城県つくば市)
- ⑥ Watanabe K., Sakurada T., Shirasu N., Sato T., Nochi T., Aso H. Immunohistochemical profiles of a ruminant-specific type I myofiber in the bovine skeletal muscles: Type ID myofiber revisited. International Symposium on Morphological Sciences (XXIII ISMS 2013), 2013 年 09 月 10 日~2013 年 09 月 13 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 渡邊康一・麻生久、学窓社、獣医組織学 第 6 版、2014、364(73-84)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊康一 (WATANABE, Kouichi)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80261494

(2) 研究分担者

麻生久 (ASO, Hisashi)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50241625

(3) 連携研究者

なし