

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660117

研究課題名(和文) 骨格筋量調節における β -カロテンの役割と新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism by which beta-carotene increases skeletal muscle mass

研究代表者

山地 亮一 (Yamaji, Ryoichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：00244666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： β -カロテン摂取はヒラメ筋の筋線維の断面積を増加し、筋量を増加した。増加したヒラメ筋では単収縮は増加傾向を示し、強収縮力が増加した。最大等尺性収縮力に差はなく、質の維持された筋線維が増加した。 β -カロテン摂取はタンパク質合成を促進し、ユビキチン化タンパク質レベルを低下させた。一方、 β -カロテンは β -カロテン代謝酵素のBCMO1をノックダウンした筋細胞でもレチノイン酸受容体(RAR)活性を向上させ、またBCMO1ノックアウトマウスでもヒラメ筋重量を増加させた。つまり β -カロテンは質的に維持されたヒラメ筋の量を増加し、 β -カロテン自体がRARのリガンドとして機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Skeletal muscle plays a critical role in mobility and glucose and lipid metabolism. Food components effective for maintenance or enhancement of muscle mass are expected to contribute to prevention of decreased mobility and increased risk of metabolic diseases. Dietary beta-carotene increased the ratio of soleus muscle mass/body weight in mice. The cross-sectional area in soleus muscle fibers was increased. In soleus muscle of beta-carotene group, twitch force tended to be increased and tetanic force was increased, whereas specific force remains unchanged. beta-Carotene enhanced protein synthesis, but decreased ubiquitin conjugates. BCMO1 converts beta-carotene to retinal. However, beta-carotene enhanced retinoic acid receptor (RAR) transactivation in BCMO1-knockdown cells and increased soleus muscle mass in BCMO1-knockout mice. These results indicate that dietary beta-carotene induces functional hypertrophy in soleus muscle and suggest that beta-carotene transactivates RAR as a ligand.

研究分野：農学

キーワード： β -カロテン 骨格筋 ビタミンA レチノイン酸受容体 BCMO1 機能性食品成分

1. 研究開始当初の背景

体重の約 40%を占める骨格筋は、姿勢の保持や運動器としての機能以外に、糖の取り込みやエネルギー代謝の役割も担っているため、骨格筋量の維持・増加は運動機能を改善するだけでなく、肥満や糖尿病などの生活習慣病の予防・改善につながると期待される。しかし昨今の若齢者から中高年に至るまで多くのヒトがデスクワークを中心とし、また運動不足の生活スタイルをとっている。さらに加齢とともに骨格筋量は低下するため、骨格筋量の維持・増加に対する積極的な対策が必要である。特に高齢者が自立した健全な生活を送るためには「寝たきり」に対する対策を練る必要がある。骨格筋量は筋タンパク質の合成と分解の均衡によって維持されており、寝たきりで骨格筋が不活発状態になると活性酸素が発生して筋タンパク質の分解が促進する廃用性筋萎縮が惹起する。寝たきり予防のために機能性食品成分を利用して「廃用性筋萎縮の抑制」を目指す多くの研究がされている。昨今、フラボノイド類を含むポリフェノールの抗酸化性に期待が寄せられ、筋萎縮の抑制に有効なポリフェノールがいくつか見つかっている。我々は抗酸化力を持つビタミン A 前駆体の β -カロテンに注目し、 β -カロテンを廃用性筋萎縮モデルマウスに摂取させたところ、後肢筋肉(ヒラメ筋)の萎縮が抑制されることを見いだした。 β -カロテン摂取が筋タンパク質分解を促進する筋萎縮関連遺伝子(Atrogin-1, MuRF1, USP19, USP14)の発現を抑制することが筋萎縮抑制の要因であることを見いだした。しかし、筋萎縮予防以外に、骨格筋量の維持・増加に対する積極的な対策として「健常時での筋量の増加と維持」も検討する必要がある。したがって「健常時での筋量の増加と維持」をサポートする食品成分を同定し、その分子機構に関する情報を得る必要があるが、これまでに必分岐鎖アミノ酸のような必須アミノ酸による骨格筋タンパク質合成促進作用による筋量の調節に関する研究は進んでいるが、他の食品成分に関する知見は少ないのが現状である。

2. 研究の目的

骨格筋量は大きく 2 つのシステムで調節される。1 つは、筋線維の辺縁部に静止期の状態で存在している未分化性の高いサテライト細胞が、過度な運動や損傷のような物理的刺激を受けると活性化し、活性化したサテライト細胞は筋芽細胞へと分化し、さらに筋芽細胞は筋芽細胞同士が融合して多核の筋管細胞を形成する、あるいは筋芽細胞は既存の筋管細胞と融合して筋管をさらに伸張する、と言った複雑な分化過程を経るシステムである。このようにして筋管が修復される過程は筋再生と呼ばれる。もう 1 つは、筋肥大・筋萎縮と呼ばれる骨格筋を構成する筋線維のサイズが変わるシステムである。このシ

ステムでは、筋線維は分化を伴わずに筋量を増加する。例えば、適度な運動や適切な栄養状態によって骨格筋の筋タンパク質の合成が分解を上回ることによって筋線維のサイズが増加し、筋量が増加する(筋肥大)。しかし運動不足や不適切な栄養状態で、筋タンパク質の合成を分解が上回ると筋線維のサイズが減少し、筋量が低下する(筋萎縮)。

デスクワークを中心とし、また運動不足の生活スタイルをとっている現代人の「健常時での筋量の増加と維持」を日々摂取する食品成分でサポートすることは、不活動による筋量低下だけでなく、筋量の低下によって引き起こされる肥満や糖尿病のような代謝性疾患の予防や改善につながる。我々はこれまでに以下の予備的な研究成果を得ている。

- (1) β -カロテン摂取がマウスの後肢のヒラメ筋量を増加させた
- (2) β -カロテン摂取が筋萎縮回復(リハビリ)モデルマウスでヒラメ筋量の回復期間を短縮させた
- (3) β -カロテン自体がレチノイン酸受容体を活性化して筋細胞の分化を促進する可能性を示した

つまり β -カロテンが「筋萎縮の抑制」以外に、「健常時の筋量増加」という異なる状況下での筋量の維持・増加に寄与することを見いだしたので、本研究はこれらの状況下での β -カロテンによって増加した筋の特徴を比較検討することで、 β -カロテンが骨格筋に量的だけでなく、質的(機能的)にも有効であることを明確にする。また β -カロテンは、 β -カロテン 15,15'-モノオキゲナーゼ 1 (BCM01)によって代謝された後にビタミン A (レチノイン酸、ATRA)としてレチノイン酸受容体(RAR)を活性化するという従来の機構と異なり、 β -カロテン自体が RAR を直接活性化する可能性(新規分子機構の仮説)も見いだしたので、本研究ではその仮説も検証することで、 β -カロテンが筋量増加をもたらす分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験方法を以下に記載する。

- (1) 動物飼育法: ddY マウス、BCM01 ノックアウト(BCM01KO)マウス、Cre リコンビナーゼトランスジェニック(CreTG)マウスを室温(23±2°C)、湿度(60±10%)、明暗周期(明期 8:00-20:00)で飼育した。水と餌を自由に摂取できる環境とした。全ての動物実験は、公立大学法人大阪府立大学動物実験規定を遵守して実施した。また組換え DNA 実験は公立大学法人大阪府立大学遺伝子組換え実験規定を遵守して実施した
- (2) 動物実験法
ddY マウス(7週齢、雄性)を 2 群(Vehicle 投与群と β -Carotene 投与群)に分けた。Vehicle と β -Carotene はミセルとして

- 調製し、上記2群のマウスに1日1回の投与(0.5 mg)で7または14日間連続して経口投与した。体重を測定後、イソフルラン麻酔下で屠殺し、左右の後肢の骨格筋を採取し、筋湿重量を測定した。摘出した筋は分析を行うまで-80 で凍結保存した。
- International Knockout Mouse Consortium から購入した BCM01^{+/-}マウスと理化学研究所から分与された Cre-TG マウス交配させ、BCM01^{-/-}マウスを作製した。BCM01^{-/-}マウスを2群(Vehicle 投与群と -Carotene 投与群)に分けた。コントロールとして野生型(WT)マウスも同様に2群(Vehicle 投与群と -Carotene 投与群)に分けた。Vehicle と -Carotene はミセルとして調製し、上記4群のマウスに14日間経口投与した。体重を測定後、イソフルラン麻酔下で屠殺し、左右の後肢の骨格筋を採取し、筋湿重量を測定した。摘出した筋は分析を行うまで-80 で凍結保存した。
- (3) 単離筋の筋力測定: マウスの後肢のヒフク筋を単離した。単離後, 37 で酸素が飽和したリンガー液を含む濾紙上で両端の腱を慎重に結んだ。糸を電極の一端に結び、骨格筋が白金線の間に入るようにした。37 で酸素が飽和したリンガー液で満たされたマグヌス管内に単離筋を入れ、もう一端の糸をトランスデューサーに結んだ。電気刺激を与え、筋力を測定した。
- (4) *in vivo* SUnSET 法: -Carotene または Vehicle を摂取させたマウスの腹腔に、ピューロマイシンを投与した。投与30分後にマウスを安楽殺し、ヒラメ筋を単離後、抗ピューロマイシン抗体を用いてウエスタンブロットを行った。
- (5) 血清 IGF-1 レベル: マウスから採取した血液を遠心分離し、血清を得た。血清 IGF-1 レベルは ELISA-based assay kit (Quantikine mouse IGF-1 immunoassay) を用いて測定した。
- (6) 細胞培養法
細胞培養法: マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を 95% air、5% CO₂、37°C の条件下で、10% 牛胎児血清と抗生物質を含む DMEM 培地 (DMEM 培地 (10% FBS, +P/S)) で培養した。
筋管細胞への分化誘導法: C2C12 細胞がコンフルエントになった状態で 2% 馬血清と抗生物質を含む DMEM 培地 (DMEM 培地 (2% HS, +P/S)) に交換し、以降2日毎に DMEM 培地 (2% HS, +P/S) を交換し続けた。培地交換時に試料を添加した。
- (7) *in vitro* SUnSET 法: 筋管細胞をピューロマイシン存在下で -カロテンによって刺激し、細胞を破碎後、抗ピューロマイシン抗体を用いてウエスタンブロットを行った。
- (8) 免疫蛍光染色法: C2C12 細胞を分化誘導4日後に 4% paraformaldehyde/PBS (-) で固定した。0.1% TritonX-100/PBS (-) で処理した後、細胞をブロッキング処理した。その後、1次抗体、続いて2次抗体 Alexa Fluor 488 結合抗マウス IgG と反応させた。核を DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で細胞の観察を行った。
- (9) siRNA 導入: コントロール siRNA と BCM01 siRNA を終濃度が 16 nM になるように Lipofectamin RNAiMAX を用いて C2C12 細胞に導入した。
- (10) ルシフェラーゼ活性測定: ルシフェラーゼレポーターベクターに RAR の応答配列を組み込んだ pGL3-SV40-5xRARE-Luc を作製した。C2C12 細胞にコントロールベクター (pRL-SV40) とともに HiLlyMax を用いて遺伝子導入した。24 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。
- (11) ウエスタンブロット法: SDS-PAGE 終了後、エレクトロトランスファーを行った。PVDF 膜の目的タンパク質は、1次抗体、続いて2次抗体と反応させた後、化学発光試薬と反応させ、ImageQuant LAS-4000 で検出を行った。
- (12) 組織染色と筋断面積
paraffin 包埋: 採取した筋肉組織を 10% formalin に室温で 24 時間浸漬した。固定した組織を ethanol で脱水した後、xylene で脱アルコールし、さらに paraffin に浸漬した。
切片の作製: 作製した paraffin 試料をマイクロームで薄切りにした後、micro slide glass 上に伸展させながら乗せた。脱 paraffin 後、切片から水分を除去するため乾燥させた。
hematoxylin-eosin (HE) 染色: 切片試料を Mayer 's hematoxylin に浸漬した後、eosinY 溶液に浸漬した。切片を ethanol、そして xylene に浸漬した。染色した切片はオイキット液で封入し、蛍光顕微鏡で切片の観察を行った。
筋線維サイズが Image J (version 1.46; National Institutes of Health) を使って測定した。平均線維筋断面積はヒラメ筋あたり約 250 本の線維から測定した。
- (13) 定量 PCR 法
Total RNA の抽出: 凍結後の組織 (20 mg) をハサミでミンス後、Sepasol-RNA I Super G を用いて破碎した。クロロホルムを加え転倒混和し、遠心分離した。水層をイソプロパノールと混和し、遠心した。沈殿を風乾し、DEPC milliQ に溶解した。
得られた Total RNA 溶液を RNase inhibitor 存在下で DNase によって処理した。除タンパク処理後、エタノール沈殿処理し、風乾後に DEPC milliQ に溶解した。

cDNA 合成 : DNase 処理した RNA を oligo dT20 存在下で ReverTra Ace でサーマルサイクラーを用いて逆転写反応を行った。

semi-quantitative RT-PCR : 逆転写した cDNA をテンプレートとし、センスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて PCR を行った。

real-time RT-PCR : Plexor® One-Step qRT-PCR System (Promega) のプロトコルに従い、Thermal Cycler Dice Real Time を使用して、逆転写した cDNA をテンプレートとし、センスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて PCR を行った。mPPIA または β -actin を内部コントロールとして定量的 PCR のサンプル間の補正を行った。

- (14) 統計解析 : データの有意差検定は、JMP statistical software version 8.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて解析した。Student の t 検定、もしくは多重比較検定である Tukey 検定を用いてコントロールとの比較を行った。

4. 研究成果

- (1) 筋重量 : ddY マウスに 14 日間 β -カロテンを投与したところ、体重に対するヒラメ筋重量の比(ヒラメ筋重量比)が増加した。しかし 7 日間の β -カロテン投与群のヒラメ筋重量比は vehicle (コントロール) 投与群と有意な差がなかった。しかし 14 日間の β -カロテン投与は、腓腹筋、足底筋、長趾伸筋の体重に対する重量比に影響しなかった。これらの結果から β -カロテンは遅筋に分類されるヒラメ筋の重量に特異的に影響を与えることが判明した。
- (2) 筋断面積 : ヒラメ筋の筋線維の筋断面積をヘマトキシリン-エオシン染色して、測定したところ、筋断面積サイズの分布が β -カロテン投与群では Vehicle 投与群に比べて大きいサイズにシフトした。これらの筋断面積の平均値を求めたところ、 β -カロテン投与群で有意に高かった。これらの結果から、 β -カロテン投与はヒラメ筋において重量を増加し、肥大を誘発することが明らかとなった。
- (3) 等尺性収縮力 : β -カロテン投与群でヒラメ筋の等尺性収縮力は増加した。単回の電気刺激による単収縮 (twitch force) は、 β -カロテン投与群で増加する傾向 ($p=0.06$) を示した。さらに β -カロテン投与群では強収縮力 (tetanic force) が有意に増加した。また単位面積あたりの最大等尺性収縮力 (specific force) は β -カロテン投与群と vehicle 投与群で差は認められなかった。これらの結果は、 β -カロテン投与群でヒラメ筋によって発生した強収縮力の増加はヒラメ筋量の増加によるものであり、ま

た増加したヒラメ筋は質的に vehicle 投与群と同じであり、質的に低下した筋肉が増えた訳ではないことを示した。

- (4) IGF-1 レベル : ヒラメ筋における IGF-1 と IGF-1 のスプライシングバリエーションである IGF-1Ea と MGF の mRNA の発現量を測定したところ、 β -カロテン投与 7 日目では IGF-1、Igf-1Ea、Mgf の発現量に変化はなく、 β -カロテン投与 14 日目で IGF-1 と IGF-1Ea の発現量が有意に増加した。しかし投与 14 日目の MGF の発現量に変化はみられなかった。さらに肝臓における Igf-1 レベルと血清の IGF-1 レベルは β -カロテン群で変わらなかった。つまり、局所的に骨格筋において発現の増加した IGF-1 (IGF-1Ea) が筋量増加に寄与するかもしれない。
- (5) *in vivo* 筋タンパク質合成 : β -カロテン投与はヒラメ筋においてピューロマイシンでラベルされたタンパク質のレベルを増加させた。つまり β -カロテン投与はヒラメ筋においてタンパク質合成を促進させることが明らかとなった。
- (6) 筋タンパク質分解 : ヒラメ筋における β -カロテン投与によるユビキチン-プロテアソーム系におよぼす影響を検討したところ、 β -カロテン投与がユビキチン化タンパク質のレベルを低下させた。しかし β -カロテン投与は骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである *Atrogin-1* と *Murf1* の発現レベルに影響しなかった。一方、ヒラメ筋における β -カロテン投与によるオートファジー系におよぼす影響を検討したところ、オートファジーマーカー LC3 の LC3-I から LC3-II への転換に β -カロテン投与は影響しなかった。これらの結果から、 β -カロテン投与は *Atrogin-1* と *Murf1* の発現に影響せずユビキチン化タンパク質レベルを緩和することが判明した。
- (7) *in vivo* 筋タンパク質合成 : β -カロテンによる C2C12 筋管細胞のタンパク質合成におよぼす影響を検討した結果、 β -カロテンはタンパク質合成を促進し、ATRA も同様にタンパク質合成を促進した。
- (8) シグナル伝達 : C2C12 筋管細胞において β -カロテンによって mTOR の上流に位置する Akt のリン酸化が増加し、また mTOR の下流の p70S6K と 4EBP1 のリン酸化は増加する傾向を示した。つまり β -カロテンは mTOR シグナルを活性化してタンパク質合成を促進することが示唆された。
- (9) *in vitro* でのレチノイン酸受容体転写活性 : β -カロテンは濃度依存的に RAR の転写活性を促進した。10 μ M の β -カロテンは 10 nM の ATRA と同レベルの RAR の転写活性を示した。RAR の pan-antagonist である AGN193109 は濃

度依存的に RAR の転写活性を抑制した。10 nM の AGN193109 存在下で 10 nM の ATRA による RAR の転写活性の抑制はみられなかったが、10 μM の β-カロテンによる転写活性を同濃度の AGN193109 が抑制した。β-カロテンは生体内で BCMO1 によってレチナールに変換される。したがって β-カロテンによる RAR の転写活性が BCMO1 によって代謝されたビタミン A 類縁体としてではなく、β-カロテン自体としての作用であるかを評価するため、siRNA を用いて C2C12 細胞の BCMO1 をノックダウンした。β-カロテンによる RAR の転写活性の上昇は BCMO1 をノックダウンした細胞でもコントロール細胞と同レベルで維持された。これらの結果から、BCMO1 による β-カロテンの ATRA への変換が行われなくても、RAR の転写活性が増加することが示唆された。

- (10) BCMO1KO マウスの筋量におよぼす β-カロテンの影響：BCMO1KO マウスに 14 日間 β-カロテンを投与したところ、体重に対するヒラメ筋重量の比(ヒラメ筋重量比)が増加した。14 日間の β-カロテン投与は、腓腹筋、足底筋、長趾伸筋の体重に対する重量比に影響しなかった。これらの結果から BCMO1 による β-カロテンの ATRA への変換が行われなくても、ヒラメ筋量が増加することが示唆された。

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) 原田直樹、三谷壘一、山地亮二、多機能性を持つ Moonlighting Proteins、生化学 (2015) 87: 279-285. doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870279 (査読有り)
- (2) 北風智也、原田直樹、山地亮二、カロテノイドによる加齢性筋萎縮予防・改善作用、ビタミン (2015) 89, 543-545. <http://web.kyoto-inet.or.jp/people/vsojkn/journal/topics-89.html> (査読有り)
- (3) Kitakaze T, Harada N, Imagita H, Yamaji R. β-Carotene increases muscle mass and hypertrophy in the soleus muscle in mice. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2015) 61, 481-487. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jnsjv/61/6/_contents (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 杉平貴史, 北風智也, 原田直樹, 山地亮二、骨格筋での β-カロテンの取り込み

における CD36 の関与について、日本ビタミン学会大会、2016 年 6 月 18 日、富山国際会議場(富山県富山市)

- (2) 北風智也、原田直樹、山地亮二、β-カロテンはレチノイン酸受容体 を介して筋重量を増加させる、日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 15 日、武庫川女子大学(兵庫県、西宮市)
- (3) 北風智也、原田直樹、山地亮二、β-カロテンはレチノイン酸受容体 を介して骨格筋のタンパク質合成を促進する、日本農芸化学会大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター/札幌市産業振興センター(北海道、札幌市)
- (4) Kitakaze T, Harada N, Yamaji R. The effects of dietary β-carotene on synthesis and degradation of muscle proteins, ICoFF 2015, 2015 年 11 月 24 日, Seoul (Republic of Korea)
- (5) 北風智也、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮二、骨格筋肥大を誘発する β-カロテンの作用機序について、日本ビタミン学会第 67 回大会、2015 年 6 月 5 日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県、奈良市)
- (6) Kitakaze T, Harada H, Nakano Y, Yamaji R. β-carotene promotes hypertrophy and protein synthesis in soleus muscle in mice. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
- (7) 北風智也、原田直樹、中野長久、山地亮二、β-カロテンの骨格筋量増加作用における mTOR シグナル経路の関与、日本農芸化学会大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県、岡山市)
- (8) Kitakaze T, Harada N, Nakano Y, Yamaji R. β-Carotene increases mass and changes fiber types of soleus muscle in mice. The Fourth International Conference on Cofactors, 2014 年 8 月 26 日, Parma (Italy)
- (9) 北風智也、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮二、β-カロテンを投与したマウスの骨格筋の特徴、日本栄養・食糧学会大会、2014 年 6 月 1 日、酪農学園大学(北海道・江別市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/NC/>

アウトリーチ活動

山地亮二、健康寿命を担う骨格筋、出前講座、2014 年 10 月 7 日、サラヤ株式会社(大阪府・柏原市)

山地亮二、ロコモティブシンドローム予防・改善策としての機能性食品成分、第 5 回バイオメディカルフォーラム、2016 年 2 月 19 日、大阪府立大学(大阪府・

堺市)
山地亮一、大阪府立大学連携講座、健康
寿命を担う骨格筋：医食同源って何？、
2015年7月10日、河内長野市立市民交
流センター（大阪府、河内長野市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山地 亮一 (YAMAJI RYOICHI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号： 00244666

(2) 研究分担者

岩田 晃 (IWATA AKIRA)
大阪府立大学・総合リハビリテーション学
部・准教授
研究者番号： 90382241

(3) 連携研究者

足達 哲也 (Adachi Tetsuya)
湊川短期大学・人間生活学科・教授
研究者番号： 60345014