

## 論文の内容の要旨

氏名：森笹 瑞季

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：魚肉タンパク質摂餌が引き起こす骨格筋肥大メカニズムの解析

### 【緒言】

食事は身体の発達・成長・維持において重要な役割を担っており、そのバランスが崩れることで身体に異常をきたす。近年、慢性的なタンパク質不足が問題となっており、タンパク質の摂取量が不足すると筋肉量の減少や筋力の低下が起こり、フレイル（健康と身体機能障害の中間的な段階）や生活習慣病の発症リスクが高くなることが知られている。近年、若年者においても除脂肪量（筋肉量の指標）と1日における総タンパク質摂取量との関係性が確認され（Yasuda J et al., *Nutrients*. 2019）、骨格筋量の維持には若年・中年期からの健康維持・増進を考慮した食事の提案が急務である。先行研究において、タンパク質源をスケソウダラの魚肉（Alaska Pollack Protein）に置き換えた餌料（以下、APP）をラットに摂餌させることで骨格筋重量の増加を観察した（Mizushige T et al., *Biomed Res*. 2010）。そこで私は、魚肉タンパク質の有効性を明らかにすべく、APP摂餌による骨格筋への影響及び筋肥大のメカニズムを解析することを本研究の目的とした。

### 【1章 APP摂餌によるラット骨格筋の形態変化の解析】

本章では、APP摂餌による骨格筋の変化について、組織学的解析及び質量分析イメージング法を用いて解析を行った。骨格筋は収縮特性と代謝特性の異なる速筋と遅筋から構成されており、ミオシン重鎖（Myosin Heavy chain: MyHC）アイソフォームの違いにより、MyHC IIb, MyHC IIx, MyHC IIa, MyHC Iの4種類に分けることができる。哺乳類の骨格筋は、これらの筋線維が混ざり合っているため、骨格筋の部位ごとに構成する筋線維組成が大きく異なる。よって、各々の筋線維の代謝変化に着目した解析が必要であるため、局所解析に重点を置くこととした。今回解析に用いた腓腹筋は下肢の最も主要な筋肉であり、筋線維タイプの組成の違いにより、3つの部位に分けられる（図1）。そこで筋肥大の有無を部位・筋線維ごとに確認することを目的とし、ミオシン重鎖タンパク質の抗体を用いた多重蛍光免疫染色に供し解析を行った。その結果、筋線維比率に変化は見られなかったものの、表層部と深層部においてAPP摂餌モデルで有意（ $p < 0.05$ ）な筋線維肥大を確認することができた。特に、表層部は変化が大きく、約1.5倍の肥大が見られた。表層部は95.9%が速筋であるため、この筋肥大が速筋に有効であることが分かった。

筋線維の膜脂質は、常に繰り返される筋肉の破壊・肥大などに順応するため、特徴的な細胞膜脂質を有している。これまでに、運動トレーニングによって特定の膜脂質が変動することが明らかになっており（Goto-Inoue et al., *Sci Rep*. 2013）、脂質は骨格筋の肥大や機能維持に重要な役割を担っていることが知られている。そのため、今回のAPP摂餌による骨格筋肥大においても、これらの膜脂質に変化が起きている可能性を考え、質量分析イメージング法を用いた脂質の局在解析を行った。その結果、APPを摂餌したラットの腓腹筋表層部においてDocosahexaenoic acid（DHA）含有型の膜脂質が有意（ $p < 0.05$ ）に増加していることを確認した。DHA含有型の膜脂質は、前述の先行研究により、運動トレーニング等で肥

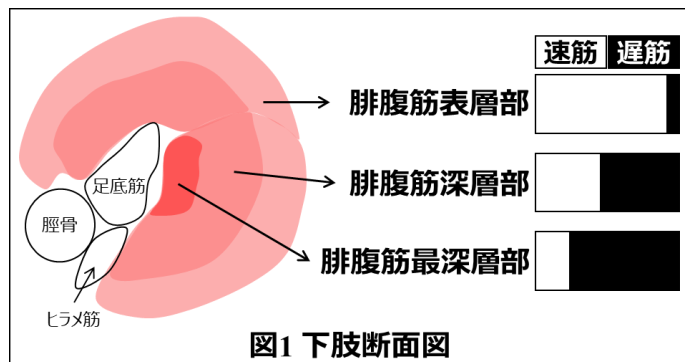


図1 下肢断面図

大した筋肉に増加する脂質であることが分かっており、今回の動物モデルにおいても、運動モデル同様の膜脂質変化を観察した。つまり DHA 含有型の膜脂質は骨格筋肥大特異的に変動する膜脂質である可能性を示唆した。

## 【2章 骨格筋肥大時における APP の作用機序の解析】

1章において、APP 摂餌によりラットの骨格筋線維が有意 ( $p<0.05$ ) に肥大し、肥大に伴い代謝が変動している可能性を示した。特に顕著な肥大が速筋で起きており、運動トレーニングと共通した細胞膜脂質の変動が観察されたことから、APP 摂餌が運動による筋肥大と類似しているのではないかと考えた。

運動による筋肥大は、Mechanistic target of rapamycin (mTOR) 系を介したタンパク質の合成を促進する経路の活性化が起こることが知られている。そこで今回の動物モデルにおいても、運動モデル同様、タンパク質の合成経路の活性化の有無を解析した。運動モデルの作出には長期間を要するが、本モデルは7日間と短く、前述の経路とは異なる系が動いている可能性も考えられる。そこで網羅的な解析手法として、定量プロテオミクス iTRAQ 法を選択した。

APP 摂餌により肥大した骨格筋の代謝変化からそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、網羅的なタンパク質発現量の比較解析を行った(図2)。得られたデータをパスイ解析に供し、変動が予測される上流タンパク質を推定した。その結果、Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 下流のユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質の分解やオートファジーの亢進に関連

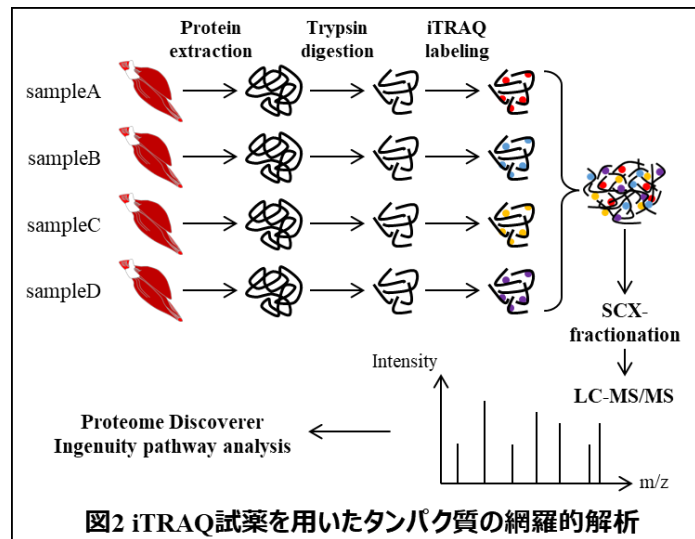


図2 iTRAQ試薬を用いたタンパク質の網羅的解析

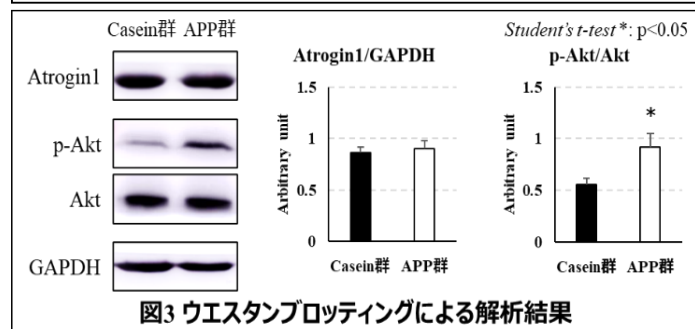


図3 ウェスタンブロットングによる解析結果

する FOXO signaling の抑制と、タンパク質の合成や細胞増殖・分化に関連する Protein kinase B (Akt) /mTOR signaling の亢進が示唆された。その後、これらの経路に関連するタンパク質の発現変化を確認するためにウエスタンブロットングに供した(図3)。タンパク質の分解やオートファジーの亢進に関連する Atrogin1 や Myostatin には変化が見られなかった。一方、タンパク質の合成に関連する Akt と mTOR は上昇が確認され、筋肥大のシグナル伝達経路の活性化が示唆された。しかし末梢組織中と血清中の IGF-1 の存在量に変化は見られず、筋肥大のシグナル伝達経路の上流は他の因子であることが予測された。

先行研究において、APP 由来のペプチドを摂餌したマウスの骨格筋における糖取り込みが亢進し、血糖値が低下することが報告 (Ayabe T et al., *Food Funct.* 2015) されていたことに加え、今回のパスイ解析により Insulin receptor signaling の亢進が示唆されていたことから、糖代謝に関連するタンパク質の変動も考えられた。そこで、血中の糖代謝関連のサイトカインをウエスタンブロットングにより観察した。その結果、血中のインスリンの存在量が上昇傾向であることを確認し、APP 摂餌により膵臓の  $\beta$  細胞のインスリン分泌が正に制御されたことが示唆された。さらにインスリン分泌を制御する2種類のインクレチンの存在量を ELISA 法で測定した。その結果、血中の Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が上昇傾向であることを確認した。APP がどのようにしてインスリンの分泌を制御したのかについては、今後さらなる解析が必要

であると考えている。

### 【3章 培養細胞によるモデルの構築と筋管細胞の肥大評価法の検討】

2章より、APP 摂餌による筋肥大は Akt/mTOR signaling を介したタンパク質の合成経路の活性化によるものであることが示唆された。しかし、筋肥大のシグナル伝達経路の上流因子やその作用機序は明らかにされていない。一方、血中のインスリンやインクレチンの存在量が増加している可能性が示唆された。すでに GLP-1 は、末梢の骨格筋組織における糖取り込みを制御すること (Ja Young Jeon., *Int J Mol Med.* 2019)、また筋萎縮モデルにおいて Atrogin1 や Myostatin の発現量を低下させ、筋原性因子の発現を増加させることで筋萎縮を改善することが報告されている (Yeonhee Hong et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2019)。このことから、GLP-1 が APP 摂餌による骨格筋肥大を引き起こしている上流因子の1つであると予測された。そこで骨格筋細胞における骨格筋肥大に GLP-1 が寄与するか否かを解析するために、培養細胞に GLP-1 analog を投与しその影響について解析した。まず筋管細胞の肥大の有無を観察するため、蛍光免疫染色に供した。解析の結果、GLP-1 analog 群において筋管細胞の核数が有意に増加し、太さが約 1.2 倍になっていることを確認した。ゆえに GLP-1 analog 投与により、筋管細胞の分化が促進しただけでなく、筋管細胞の肥大の傾向を観察することができた。ウエスタンブロッティングによる解析結果からは、GLP-1 analog 群で Sarcomere の存在量が有意に上昇し筋細胞の分化が促進していることが確認できたが、タンパク質の合成経路に関連する Akt と mTOR の存在量に有意な差は認められなかった。今後は GLP-1 analog により変動する網羅的なタンパク質発現量の比較解析を行い、様々なシグナル伝達経路を解析する必要があると考える。

### 【総括】

本研究は、APP 摂餌による骨格筋への影響及び筋肥大のメカニズムを解析することを目的とした。その中で、APP を摂餌したラットの骨格筋において、速筋が有意に肥大し、DHA 含有型の膜脂質が肥大した部位でのみ増加するなどの運動トレーニングと類似した筋肥大が起こることを明らかにした。すでに DHA 含有の脂質が増えると、リポドミクスプロファイルを変化させ、糖尿病リスクを減少させるという報告がある (Inger Ottestad et al., *PLoS One.* 2012)。このことから APP 摂餌により糖代謝が改善する可能性が示唆された。また、タンパク質レベルでは Akt/mTOR signaling を介したタンパク質の合成経路の活性化が確認されたが、上流の IGF-1 には変化が見られなかった。そこで上流因子の候補として GLP-1 を予測し、骨格筋培養細胞へ GLP-1 analog を投与したところ、筋管細胞の分化が促進していることを確認することができ、筋管細胞の肥大の傾向を観察した。今後の課題として、すでに抗肥満薬として応用されている GLP-1 の骨格筋への新たな作用として、速筋線維の肥大効果をさらに明らかにするため、蛍光免疫染色により染めつけた筋管細胞の陽性エリアを計測するなど、肥大評価法を確立したい。加えて、筋が肥大した際に、筋の機能が増強されているかを評価するため、筋張力に与える影響についても検討する必要があると考える。