

37. 骨格筋の遅筋特性獲得メカニズム

三浦 進司

Key words : リピドミクス, リン脂質, PGC-1 α , LC-MS

静岡県立大学 食品栄養科学部

緒 言

脂質は細胞膜の主要な構成因子として生命を包み、外界との境界を定めている。特に真核生物はリン脂質からなる脂質二重膜によって区画化されたオルガネラを発達させることで、複雑な生命活動を支える機能を巧妙に発現している。そのためリン脂質の視点から各組織の機能調節を解明することは極めて重要である。骨格筋においても筋細胞膜リン脂質中の脂肪酸組成がインスリン感受性に影響を及ぼすことが報告されており¹⁻³⁾、骨格筋細胞膜のリン脂質分子種と骨格筋機能維持には何らかの関連性があると考えられる。一方、骨格筋は遅筋と速筋に大別され、筋線維タイプを変化させることで様々な外部環境変化に適応しており、このうち持久的運動トレーニングは骨格筋の遅筋化を促進し、糖・脂質代謝、筋持久力、ストレス耐性などにおいて高い優位性をもたらす⁴⁾。この優位性にも適応反応により変化したリン脂質分子が貢献していると想定され⁵⁻⁷⁾、どのようなリン脂質分子種を変化させることが骨格筋機能の維持促進に重要なかが判明すれば、骨格筋機能維持に有用な新規方策の開発に発展させることが可能となる。しかし、現在までに、骨格筋の筋線維変化と骨格筋細胞膜リン脂質組成との関連性や、どのような機序で骨格筋細胞膜リン脂質分子種が変化しているのか、その変化が骨格筋機能にどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。私たちはこれまでに、転写共役因子 peroxisome proliferators- activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC-1 α) を骨格筋特異的に過剰発現させた「筋 PGC-1 α マウス」を作製し、骨格筋の遅筋化と持久力の向上を認めている⁸⁾。本研究では骨格筋の遅筋特性獲得、特に脂質分子種変化において PGC-1 α の役割を明らかにすることを目的とし、骨格筋の脂質組成を赤筋と白筋別に網羅的に解析する測定系を確立し、筋 PGC-1 α マウスにおける脂質分子種の変化について検討した。

方 法

マウスより赤筋としてヒラメ筋 (soleus) を、白筋として長指伸筋 (extensor digitorum longus, EDL) を採取し、質量分析計付き高速液体クロマトグラフィー (LC-MS) にて分析した。LC-MS は、LC システムに ACCELA (Thermo Fisher Scientific 社)、MS には Q Exactive (Thermo Fisher Scientific 社) を用い、ACQUITY C18 2.1 \times 150 mm カラム (Waters 社) を接続した。LC-MS で得られたデータより、Signpost MS (Reifycs 社) を用いてピーク抽出を行った。得られたピークについて多変量解析を行い、各群間において特異的なピークを選出した。選出されたピークの分子種の同定は、当該ピークの MS/MS 解析から得られるフラグメントイオンデータを用いて、オンラインデータベースサイト LIPID MAPS Tools (Lipidmics Gateway, <http://www.lipidmaps.org/>) により解析した。

結 果

マウスから得られた soleus と EDL 中の脂質分析を行い、Fig. 1 のような total ion chromatogram (TIC) が得られた。各脂質分子種はカラム保持時間の違いから、おおよそ遊離脂肪酸、リゾリン脂質、モノアシルグリセロール、リン脂質、ジアシルグリセロール、トリアシルグリセロールに分離することができた。

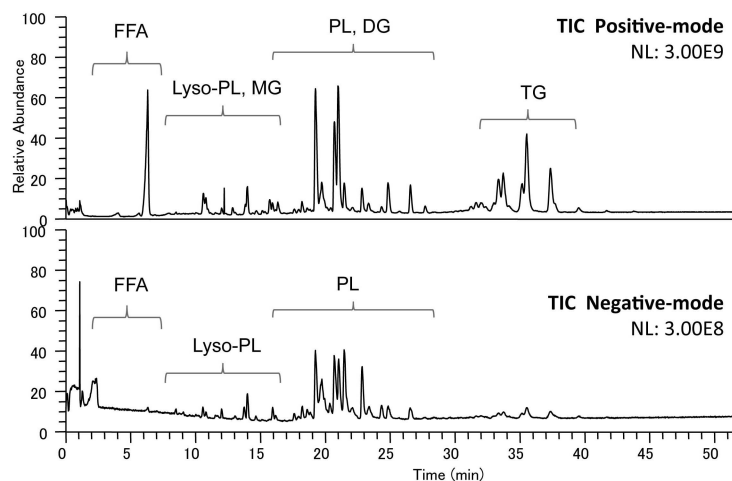


Fig. 1. Representative total ion chromatogram (TIC) separation of the lipid extract from PGC-1 α overexpressed soleus muscle using LC-MS performed in positive and negative ionization mode, respectively.

Because many lipid species are isobaric, an understanding of the chromatographic retention time pattern can facilitate the identification and characterization of unknowns. Sections of the chromatograms are labeled with the lipid categories detected, indicating the regions where each will elute using the LC-MS method. FFA: free fatty acids, Lyso PL: lyso glycerophospholipids, MG: monoglycerides, PL: glycerophospholipids, DG: diglycerides, TG: triglycerides.

Fig. 2 には分子種の同定結果の代表例として、質量電荷比 (m/z) が 832.61 のピークから MS/MS 解析によって得られたフラグメントイオンのクロマトグラムを示した。親イオンから 2 つの脂肪酸が解離した $m/z=224.07$ のピーク、解離した脂肪酸 $m/z=281.25$ および 283.26 などが検出された。これらの情報をもとに LIPID MAPS による解析を実施すると、本分子はホスファチジルコリン (18:0/18:1) と同定された。

PC (18:0/18:1)

Negative-ion mode [M+HCOO]⁻

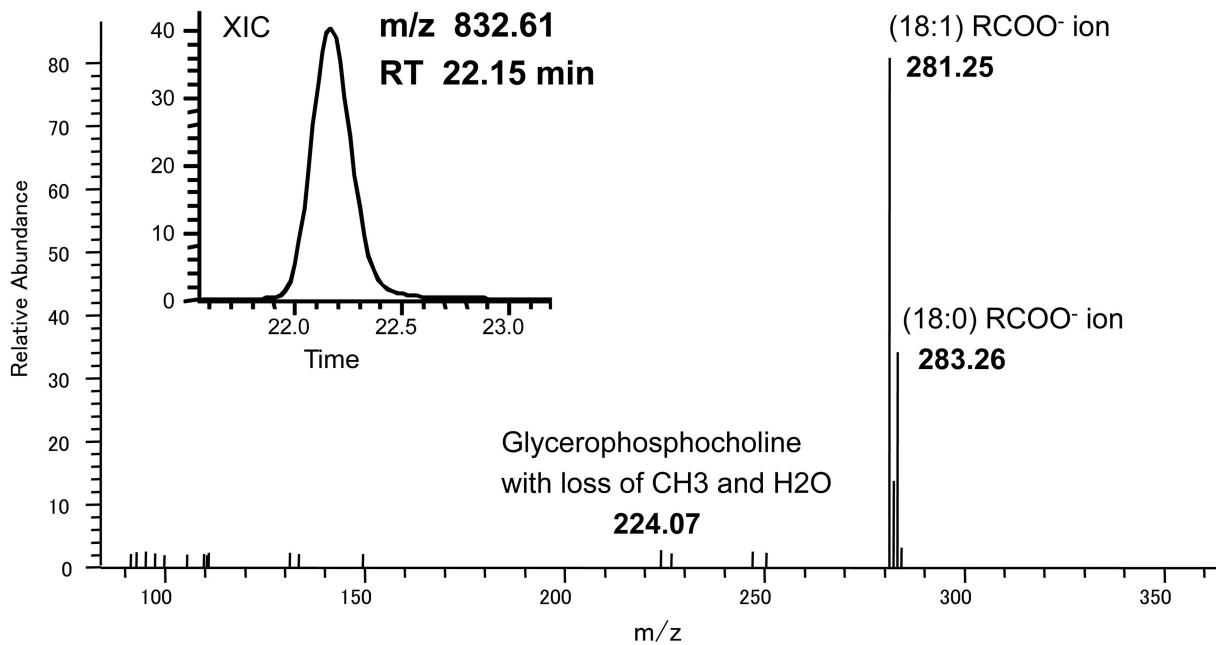


Fig. 2. MS/MS spectrum of m/z=832.61 corresponding PC (18:0/18:1) ([M+HCOO]⁻) in negative-ion mode.

Fragment ions are annotated according to the structural attributes of fatty acid and glycerophosphocholine moieties. The extracted ion chromatogram (XIC) of parent ion m/z=832.61 detected in the lipid extract of PGC-1 α overexpressed EDL is also shown.

次に、この方法を用いて予備的に野生型マウスおよび筋 PGC-1 α マウスの soleus と EDL の脂質成分の網羅的分析を実施した。抽出された 314 ピーク情報をもとに多変量解析を実施したところ (Fig. 3), クラスタ分析により, EDL と soleus で含まれる分子種が大きく異なること, PGC-1 α の過剰発現は骨格筋脂質組成を変化させるが, EDL を soleus と同じような脂質組成までには変化させないことが判明した。また, 主成分分析の結果, 成分 1 の変化から EDL と soleus ではトリアシルグリセロール含有量が大きくことなること, 成分 2 の変化から PGC-1 α は骨格筋の脂質分子種, 特にグリセリン脂質の分子種に変化を引き起こすことが示唆された。

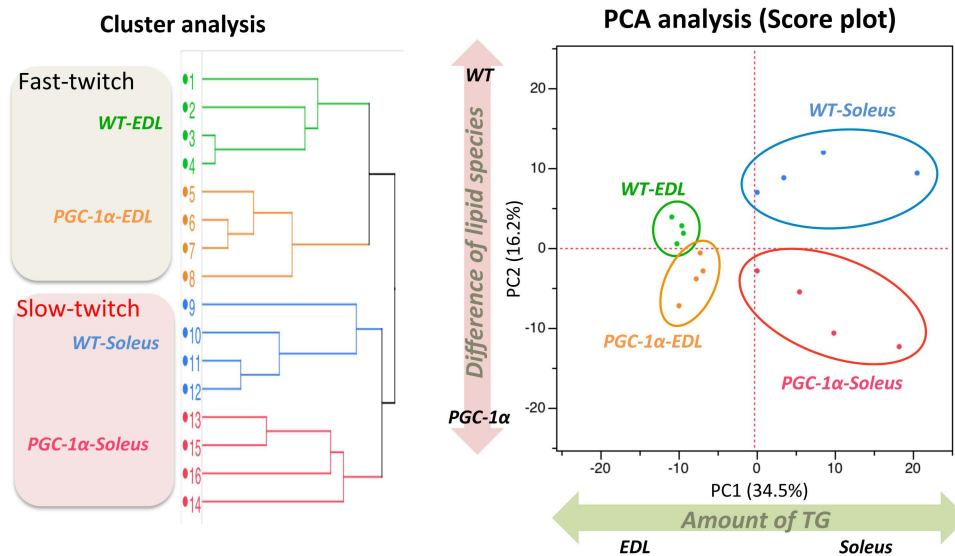


Fig. 3. PGC-1 α induced changes of lipid profiling observed in soleus and EDL.

Four mice were used in each group (WT: wild-type mice, PGC-1 α : muscle PGC-1 α mice). In the lipidomics analysis, 314 peaks were detected by the anion and cation modes of LC-MS. (Left) Dendrograms of hierarchical clustering of samples, based on lipid profiles. As demonstrated from the cluster analysis, skeletal muscle samples from individual WT and muscle PGC-1 α mice segregated into tight clusters, indicating that PGC-1 α has profound effects on the lipid profile of the skeletal muscle. Although the skeletal muscles of muscle PGC-1 α mice showed a red color characteristic of oxidative muscle, PGC-1 α -EDL segregated into different from soleus. (Right) Scatter plots of principal components from principal component analysis (PCA) on samples. The first principal component effectively and distinctly separated the mice based on muscle fiber type (x axis) and the second principal component separated the mice based on the genotype (y axis), suggesting that overexpression of PGC-1 α in the skeletal muscle caused a significant change in the overall lipid profile of the muscle, however the profile of PGC-1 α -EDL was different from soleus. From the results, it was observed that PGC-1 α overexpression had a significant influence in the lipid profiles of the skeletal muscle because the two groups (WT and PGC-1 α) were clearly distinguishable. However, the lipid profile of PGC-1 α -EDL showing oxidative characteristics was different from the profile of originally oxidative muscle such as soleus.

考 察

今回の検討により、白筋と赤筋では構成している脂質分子種が大きく異なり、赤筋ではトリアシルグリセロール含有量が高いことが判明した。持久的運動では脂肪酸を筋収縮のためのエネルギー源として利用するため、持久的運動に適した骨格筋である赤筋には、エネルギー源としての脂肪酸をトリアシルグリセロールの形で筋細胞内に蓄積していると考えられている。今回の分析結果は、このような既知情報に一致するものであった。

細胞中のグリセロリン脂質組成は、生合成されるリン脂質分子種によって変化することに加え、一度生合成された分子種がリモデリングによって再構成されることによっても変化する。リン脂質の生合成はグリセロール 3-リン酸へのアシル基転移反応によって開始され、この生成物はグリセロリン脂質のみならずトリアシルグリセロールの生合成原料となるため、ある特定の脂肪酸が積極的にグリセロール 3-リン酸へのアシル基転移反応に用いられた場合、グリセロリン脂質のみならずトリアシルグリセロールの脂肪酸組成も同様に変わると考えられる。今回、PGC-1 α の過剰発現によって引き起こされたグリセロリン脂質分子種の変化は、トリアシルグリセロールの脂肪酸組成とは独立したものであるか、あるいは並行して認められる変化なのかを解析する必要がある。その結果により、PGC-1 α がグリセロリン脂質の生合成時に特定の脂肪酸種を積極的に利用してアシル化しているのか、あるいはグリセロリン脂質のリモデリング

時にそのような変化が生じているのかが判明する。そのため、引き続き解析を進め、骨格筋機能とリン脂質分子種の変化に関連性が認められるか否かを解明していく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都府立大学大学院生命環境科学研究科の亀井康富、静岡県立大学食品栄養科学部の妹尾奈波、三好規之、守田昭仁である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Clore, J. N, Li, J., Gill, R., Gupta, S., Spencer, R., Azzam, A., Zuelzer, W., Rizzo, W. B. & Blackard, W. G. : Skeletal muscle phosphatidylcholine fatty acids and insulin sensitivity in normal humans. *Am. J. Physiol., Endocrinol Metab* **275** : E665-E670, 1998.
- 2) Han, X., Abendschein, D. R., Kelley, J. G. & Gross, R. W. : Diabetes-induced changes in specific lipid molecular species in the rat myocardium. *Biochem. J.*, **352** : 78-89, 2000.
- 3) Helge, J. W. & Dela, F. : Effect of training on muscle triacylglycerol and structural lipids: a relation to insulin sensitivity? *Diabetes*, **52** : 1881-1887, 2003.
- 4) Egan, B. & Zierath, J. R. : Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.*, **17** : 162-184, 2013.
- 5) Mitchell, T. W., Turner, N., Hulbert, A. J., Else, P. L., Hawley, J. A., Lee, J. S., Bruce, C. R. & Blanksby, S. J. : Exercise alters the profile of phospholipid molecular species in rat skeletal muscle. *J. Appl Physiol.*, **97** : 1823-1829, 2004.
- 6) Ayre, K. J. & Hulbert, A. J. : Dietary fatty acid profile affects endurance in rats. *Lipids*, **32** : 1265-1270, 1997.
- 7) Ruf, T., Valencak, T., Tataruch, F. & Arnold, W. : Running speed in mammals increases with muscle n-6 polyunsaturated fatty acid content. *PLoS ONE*, **1** : e65, 2006.
- 8) Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y. & Ezaki, O. : Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS ONE*, **6** : e28290, 2011.