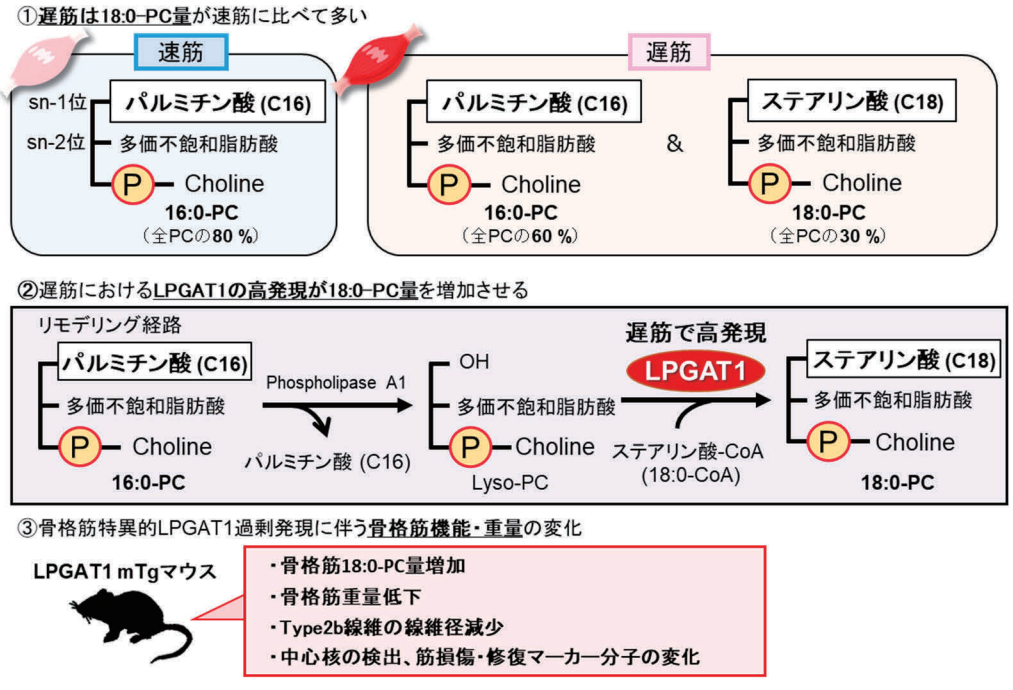
104　骨格筋膜リン脂質組成が骨格筋重量と機能を制御する	佐藤　友紀

【目的】筋線維は収縮特性の異なる速筋線維と遅筋線維に大別される。一方、生体膜の主な構成分子である phosphatidylcholine（PC）は、グリセロール骨格に 2 つの脂肪酸が結合するため、結合する脂肪酸の種類と組み合わせによって多種多様な分子種が形成される。筆者らはこれまでに、マウス骨格筋に存在する全 phosphatidylcholine（PC）分子種のうち、速筋では 1-palmitoyl 型 PC（16:0-PC）が約 80%であるのに対し、遅筋では 16:0-PC が 60%、1-stearoyl 型 PC（18:0-PC）が 30%存在することを見出した。加えて、この違いを生み出す責任酵素としてアシル基転移酵素 LPGAT1 を見出した。しかし、LPGAT1 による 18:0-PC 形成が骨格筋機能に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、骨格筋特異的 LPGAT1 過剰発現（LPGAT1 mTg）マウスを作出し、骨格筋性状および筋機能変化を評価した。

【方法】LPGAT1 mTg マウスおよび野生型（WT）マウスの前脛骨筋（TA）、長趾伸筋（EDL）およびヒラメ筋（soleus）を採取し、凍結切片を作製した。免疫染色法で骨格筋線維タイプ別に染め分け、線維タイプ割合および筋断面積を測定した。加えて、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色によって組織学的評価を行った。タンパク質発現量変化の網羅的探索はプロテオミクス解析によって測定した。

【結果】LPGAT1 mTg マウスの EDL、soleus の筋線維タイプ割合は WT マウスと同様であった。一方で、EDL に存在する速筋線維である Type Ⅱb 線維の筋断面積が WT マウスに比して減少していた。TA の組織学的評価の結果、LPGAT1 mTg マウスの筋線維では中心核を含む線維が多く観察された。プロテオミクス解析結果より EDL、soleus ともに LPGAT1 の過剰発現に伴い 1,000 を超えるタンパク質分子の発現量が有意に変化していた。その中でも EDL において筋損傷・再生マーカーである Myoz タンパク質分子の発現量が有意に減少していた。LPGAT1 mTg マウスでは骨格筋における 18:0-PC 量の増加に伴い、速筋優位な筋線維（Type Ⅱb 線維）において筋横断面積が減少した。また、中心核を含む筋線維が多く観察されたこと、筋損傷・再生マーカーである Myoz タンパク質分子の発現量が有意に減少していたことから、LPGAT1 過剰発現に伴うリン脂質クオリティの変化が骨格筋恒常性の維持に重要であることが示唆された。

LPGAT1 過剰発現マウスで観察された 18:0-PC 増加に伴う筋性状の変化



104. 骨格筋膜リン脂質組成が骨格筋重量と機能を制御する

佐藤　友紀

静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究院

Key words：骨格筋，リン脂質，アシル基転移酵素，LPGAT1，骨格筋機能

緒　言

骨格筋を構成する筋線維は、収縮速度の異なる速筋タイプと遅筋タイプに大別される。筋線維タイプの違いは、機能性タンパク質、構造タンパク質、ミトコンドリア、情報伝達系分子などの違いによって説明されてきたが、筋細胞の大切な構成分子である脂質に関する情報は十分とは言えない。Phosphatidylcholine（PC）は細胞膜およびオルガネラ膜を構成する主要なリン脂質であり、グリセロール骨格に 2 つの脂肪酸と極性基が結合した構造をしている。結合している脂肪酸の種類（炭素数、二重結合の数や位置）やその組み合わせによって多様な PC 分子が形成される。PC 分子の多様性はグリセロール-3-リン酸に 2 つの脂肪酸および極性基が導入される *de novo* 合成経路と、合成後に脂肪酸を入れ替えるリモデリング経路の 2 つの経路で形成される。PC に結合している脂肪酸のうち、飽和脂肪酸は sn-1 位に結合している場合が多く、細胞膜の厚さの決定因子であることが示唆されている［1］。多価不飽和脂肪酸は sn-2 位に結合している場合が多く、細胞膜の流動性に影響する［2］。sn-1 位のリモデリング反応については、実験系で検出することが困難であったことから、責任酵素の同定や sn-1 位の脂肪酸が臓器機能におよぼす影響についての解析は遅れており、骨格筋機能との関連性も不明のままであったが、近年、アシル基転移酵素の 1 つである LPGAT1 が lyso-PC の sn-1 位にステアリン酸-CoA を導入することでステアリン酸含有 PC（18:0-PC）を増加させることが報告された［3］。筆者らは骨格筋の中でも遅筋線維において 18:0-PC が速筋線維に比して高い割合で存在すること、LPGAT1 の発現量が高いことを見出した（未発表）。しかし、骨格筋機能の維持に LPGAT1 を介したステアリン酸含有リン脂質の産生がどのような影響を及ぼすかは不明である。

方　法

1. LPGAT1 過剰発現（LPGAT1 mTg）マウスの骨格筋切片の評価

LPGAT1 mTg マウスは human α-skeletal actin promoter（HSA）の下流に LPGAT1 が結合したコンストラクトを受精卵にマイクロインジェクションし、作出されたマウスを複数世代交配した後に実験に使用した。対照群には同腹仔の野生型（WT）マウスを使用した。LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスより前脛骨筋（TA、混合筋）、長趾伸筋（EDL、速筋優位）およびヒラメ筋（soleus、遅筋優位）を採取して冷却したイソペンタン中で凍結した。クライオスタットを用いて凍結した EDL および soleus を薄切することで筋切片を作製し、myosin heavy chain 抗体を用いて筋線維タイプ別に免疫染色した後に蛍光顕微鏡で 1 つの筋切片サンプルに対して複数枚の画像を撮影した。撮影した画像全ての線維タイプ別の本数を計測し、全体の線維数を除すことでタイプ別の筋線維割合を算出した。それぞれのタイプ別線維における線維径についても測定した。加えて、TA 筋切片の組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い中心核の数の有無を調べた。

2. プロテオミクス解析によるタンパク質発現量の網羅的解析

LPGAT1 mTg マウスおよび野生型マウスより EDL、soleus をそれぞれ採取し、凍結粉砕した後にタンパク質を抽出した。トリプシンを用いてタンパク質をペプチドへと消化し、liquid chromatography-mass spectrometry（LC/MS）

で断片化されたペプチドを網羅的に測定し、データベース照合によってタンパク質を同定・定量した。

結果および考察

1. LPGAT1 過剰発現（LPGAT1 mTg）マウスの骨格筋切片の評価

（1）タイプ別筋線維数への影響

EDL、Soleus に含まれる筋線維をタイプ別に免疫染色で染め分けて 1 サンプルにつき複数枚の画像を取得し（図 1）、全ての線維数およびタイプ別の線維数を計測した。EDL、soleus ともに Type Ⅰ（青）、Type Ⅱa（赤）、Type Ⅱx（黒）および Type Ⅱb（緑）どのタイプ線維もマウス間で存在割合に差は認められなかった（図 2A、B）。このことから LPGAT1 の過剰発現は筋線維タイプ割合には影響しないことが明らかになった。

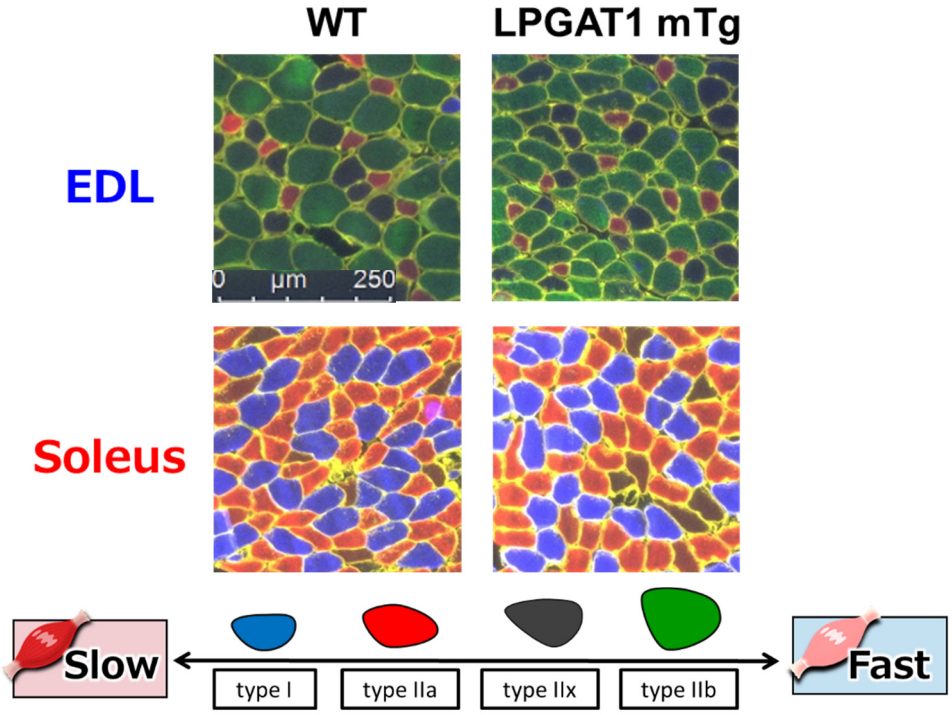


図 1. EDL、Soleus の筋線維タイプ別染色

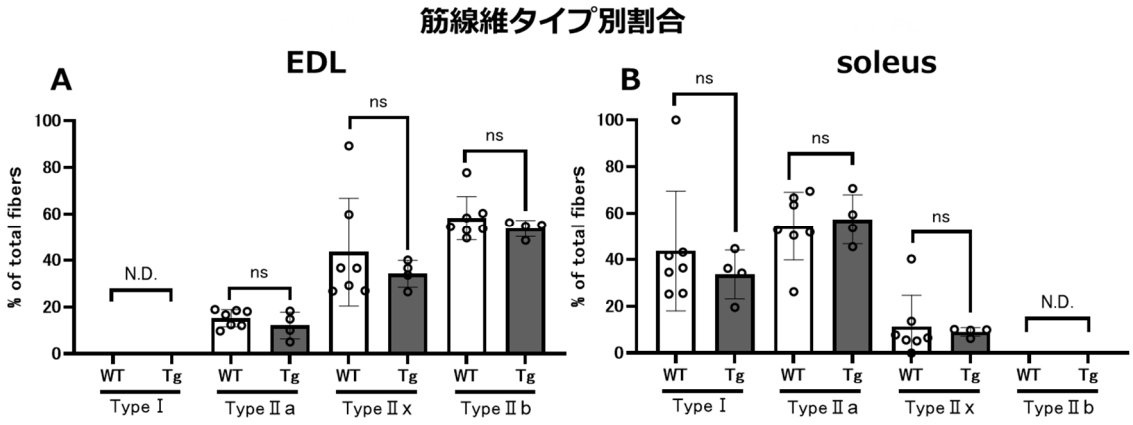


図 2. EDL（A）、soleus（B）における筋線維タイプ別割合

実験は n＝4～7 で実施し、統計解析は Student's t-test を用いた。

(2) 各タイプ別線維の筋横断面積への影響

EDL において、LPGAT1 mTg マウスでは TypeⅡb 線維の筋横断面積が WT マウスに比して有意に低値を示した（図 3A）。一方で TypeⅠ、TypeⅡa および TypeⅡx 線維の筋横断面積は LPGAT1 mTg マウスおよび WT マウスの間で大きな差は認められなかった。Soleus については TypeⅠ、TypeⅡa、TypeⅡx、TypeⅡb どのタイプにおいても LPGAT1 過剰発現に伴う筋断面積の変化は見られなかった（図 3B）。これらの結果より、LPGAT1 の過剰発現は速筋線維である TypeⅡb 線維のサイズを縮小させることが明らかになった。

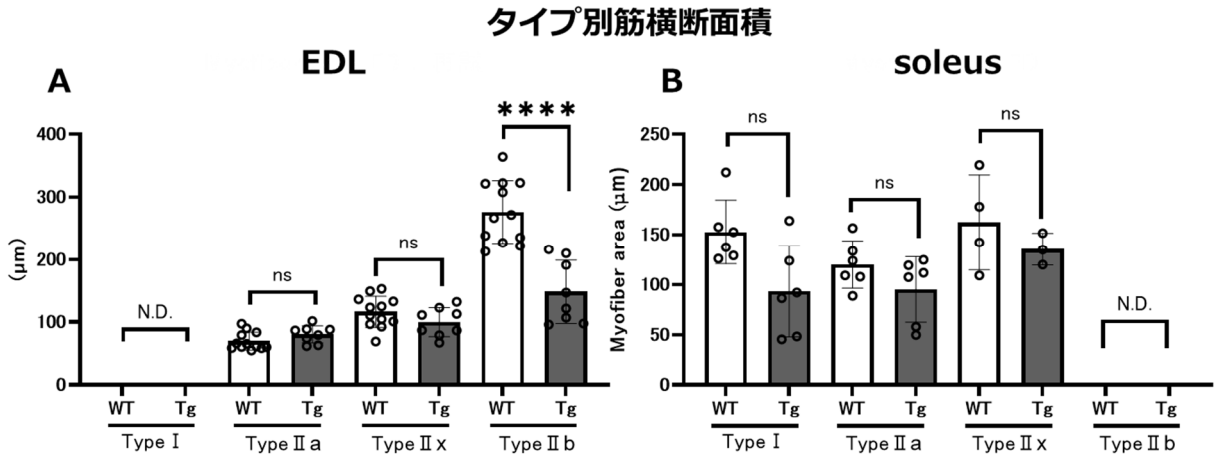


図3. EDL（A）、soleus（B）における筋線維タイプ別横断面積

実験は n＝4～7 で実施し、統計解析は Student's t-test を用いた（****P＜0.0001）。

(3) HE 染色による組織学的評価

採取した TA より凍結切片を作製し、HE 染色を行ったところ、LPGAT1 mTg マウスでは中心核を含む線維（筋線維の細胞質に核が存在している状態）が WT マウスに比べて多く観察された（図 4）。中心核は再生過程の骨格筋線維で見られることから、LPAGT1 の過剰発現は筋線維が再生せざるを得ない状態を引き起こすことが示唆された。

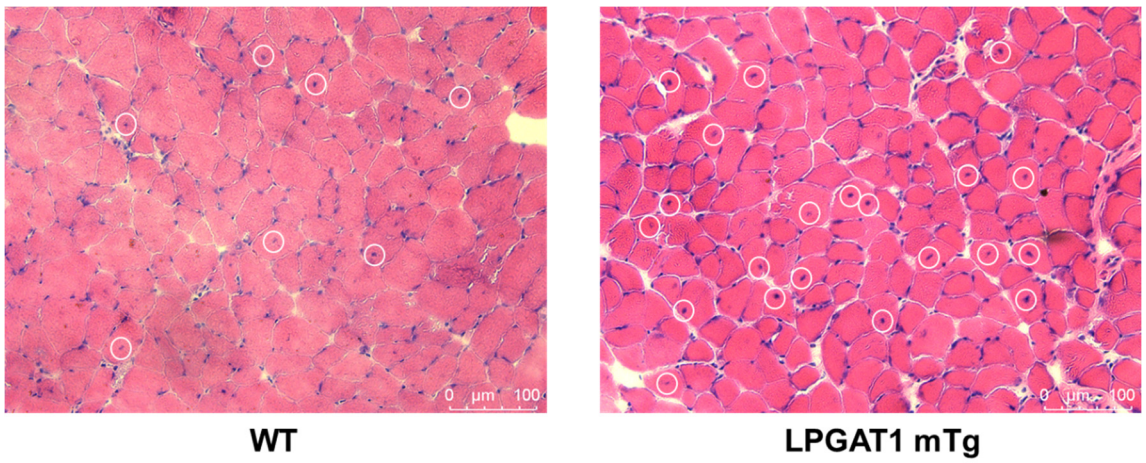


図 4. TA の HE 染色画像

画像中の白丸は中心核の存在を示している。

スケールバー：100μm。

2. プロテオミクス解析によるタンパク質発現量の網羅的解析

EDL、soleus それぞれの骨格筋において、LPGAT1 の過剰発現に伴い変化したタンパク数は EDL において 1,248 分子、soleus において 1,091 分子であった（図 5A）。図 4 の結果より、速筋優位な骨格筋である TA で中心核を含む線維が LPGAT1 Tg マウスで多く観察されたので、筋再生マーカーとして報告されている Myoz1, 2, 3 の発現量を EDL の解析結果より個別に確認した［4］。LPGAT1 過剰発現マウスでは Myoz1 および 3 の発現量が有意に減少しており、Myoz2 に関しても有意ではないが低下傾向が認められた。Myoz1, 2, 3 は筋損傷初期に劇的に発現量が減少する分子であることから、LPGAT1 過剰発現に伴い筋線維の損傷が生じていることが示唆された。

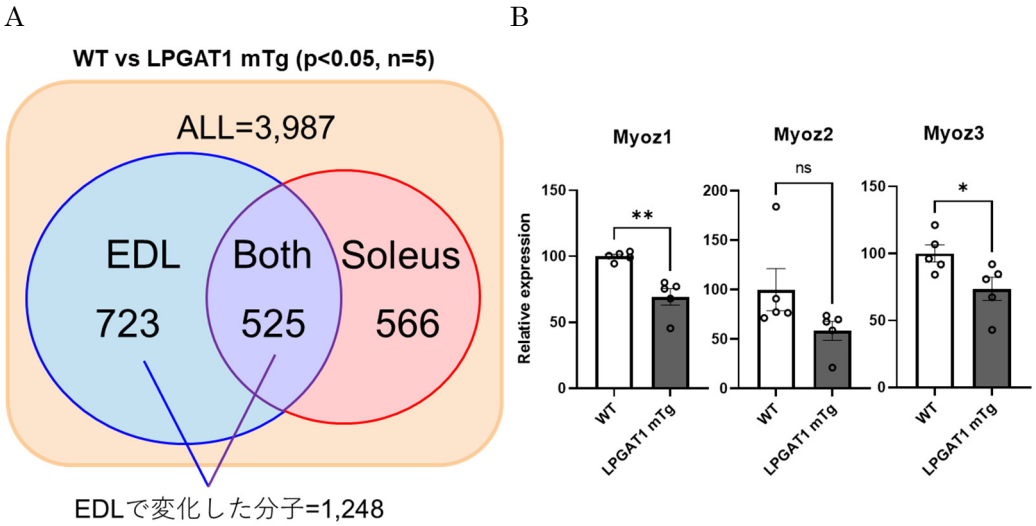


図 5. プロテオミクス解析結果（A）と Myoz タンパク質発現量（B）
実験は n＝5 で実施し、統計解析は Student's t-test を用いた（**P＜0.01、*P＜0.05）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科の松本雅記教授、幡野敦助教である。本研究に携わっていただきました皆様に感謝の意を申し上げます。

文　献

1) Antonny B, Vanni S, Shindou H, Ferreira T. From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function. Trends Cell Biol. 2015 Jul;25(7):427-36. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25906908 DOI: 10.1016/j.tcb.2015.03.004.

2) Neto AJP, Cordeiro RM. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. Biochim Biophys Acta. 2016 Sep;1858(9):2191-2198. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27349733　DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.06.018.

3) Kawana H., Ozawa M., Shibata T., Onishi H., Sato Y., Kano K., Shindou H., Shimizu T., Kono N, Aoki J. Identification and characterization of LPLAT7 as an sn-1-specific lysophospholipid acyltransferase. J Lipid Res. 2022 Oct;63(10):100271. Epub 2022 Aug 29. PMID: 36049524 DOI: 10.1016/j.jlr.2022.100271.

4) Yoshimoto Y, Ikemoto-Uezumi M, Hitachi K, Fukada S, Uezumi A. Methods for Accurate Assessment of Myofiber Maturity During Skeletal Muscle Regeneration. Front Cell Dev Biol. 2020 Apr 22;8:267. eCollection 2020. PMID: 32391357 DOI: 10.3389/fcell.2020.00267.