

Establishment of protocol for rat single muscle fiber isolation and culture: Practical application toward understanding mature muscle fiber characteristics

小宮, 佑介

<https://hdl.handle.net/2324/1807102>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	小宮 佑介			
論文名	Establishment of protocol for rat single muscle fiber isolation and culture: Practical application toward understanding mature muscle fiber characteristics (ラット筋線維単離・培養法の確立: 成熟筋線維の機能解明への応用)			
論文調査委員	主査	九州大学	職名	准教授 氏名 辰巳隆一
	副査	九州大学	職名	教授 氏名 古瀬充宏
	副査	九州大学	職名	教授 氏名 立花宏文
	副査	九州大学	職名	准教授 氏名 中村真子

論文審査の結果の要旨

食肉の生産量や肉質の向上を達成する画期的な食肉生産技術の開発には、食肉を構成する筋細胞（筋線維）の細胞機能の理解が不可欠である。筋線維は未分化な筋芽細胞が分化、融合し形成される多核の筋管（幼若な筋線維）を経て、成熟型へと最終分化したものである。細胞機能の解析には、実験管理や再現性の点で多くの利点を有する培養細胞系として、筋芽細胞から分化させた筋管が広く用いられている。しかしながら筋管は成熟した筋線維が持つ機能（例えば収縮機能）をほとんど有しておらず、成熟筋線維のモデルとして最適とは言えない。成熟筋線維の細胞機能を的確に解析するためには、より優れた細胞モデルが必要であると考え、筋組織から単離した筋線維の初代培養系に着目し、新たな知見を得るに至った。以下にその概要を記す。

1) ラット筋線維の単離・培養法の確立

まず単離した筋線維が長期培養可能であるか確認するために筋線維の生存率を経時的に測定した。3-4週齢のF344雄性ラットの短趾屈筋、ヒラメ筋および長趾伸筋から筋線維をそれぞれ単離し、培養1, 3, 5, 7日目の生存率を測定した。その結果、ヒラメ筋および長趾伸筋由来の筋線維は培養の経過に伴い著しく生存率が低下したが、短趾屈筋由来の筋線維は培養7日目でも90%以上の高い生存率を示した。従って、ラット短趾屈筋を用いることで、長期にわたる筋線維培養が可能となった。成熟型ミオシン重鎖（MyHC）アイソフォームの発現量を、筋分化の指標として測定した結果、単離筋線維は筋管に比べ成熟型MyHC mRNAの発現量が極めて高いことが分かった。以上より本研究で確立した単離筋線維培養系は、生存率および分子マーカーの観点から成熟筋線維の培養モデルとして適当であることが示された。

2) 筋線維タイプの識別への応用

筋線維には収縮特性と代謝特性が大きく異なる複数の筋線維タイプの存在が認められている。筋線維タイプは、大きく遅筋タイプ（type 1）と速筋タイプ（type 2）に分類される。type 2は2A, 2Xおよび2Bに細分化され、速筋タイプとしての特性は2Bが最も強く、次いで2Xである。成熟型MyHCはこれら筋線維タイプのマーカー分子として用いられるが、既存の抗MyHC抗体（マウスモノクローナルIgM抗体を含む）では、同時に複数のMyHCアイソフォームを検出することは不可能であった。そこで4種類の成熟型MyHCアイソフォームに特異的なラットモノクローナルIgG抗体を作製し、それらに異なる蛍光色素を結合させることで、筋線維タイプを単一検体で明瞭かつ簡便に判別する方法を確立した。本手法によって、培養細胞において4種類のMyHCアイソフォームを同時に識別可能であることを、ラットおよびマウスから単離した筋線維で示した。さらに単

離筋線維を用いた本手法により、ハイブリッドファイバー（2つ以上の異なる MyHC アイソフォームが1つの筋線維に存在している）の存在が明確に確認され、また異なる MyHC アイソフォームの筋線維内での空間的分布がはじめて観察可能となった。

3) 筋線維の細胞内脂肪蓄積能力と筋線維タイプの関係性に関する検討

遅筋タイプの筋線維は、脂肪酸酸化能力に優れていることは良く知られているが、筋線維内脂肪（IMCL）の蓄積と筋線維タイプとの関連を示す知見はほとんどない。そこで、単離筋線維を用いて、この両者の関係性を解析した。まず細胞内に脂肪が蓄積しやすい状況下（高脂肪食摂取と除神経処理の両方を施した場合）でマウスを飼育後、ヒラメ筋（遅筋タイプ優位）と長趾伸筋（速筋タイプ優位）を摘出し IMCL 蓄積に違いがあるかを単離筋線維を用いて調べた。その結果、ヒラメ筋由来の単離筋線維でのみ、肥大した脂肪滴が明瞭に観察された。type 1 を含めた 4 種類の筋線維タイプ別に、IMCL 蓄積の比較を行ったところ、type 1 ではなく type 2A の筋線維で IMCL の蓄積量が最も大きかった。以上の結果から、遅筋タイプ優位な筋組織であるヒラメ筋は IMCL の蓄積能力も優れており、この特性は type 1 ではなく次に組成比が高い type 2A 筋線維に依存していることを明らかにした。

以上要するに本論文では、単離筋線維の培養系を確立すると共に、その応用として筋線維タイプおよび IMCL 蓄積をはじめて解析した。また、本研究で確立した単離筋線維培養系および MyHC アイソフォーム多重免疫染色法が多くの研究者に利用され、骨格筋の機能がさらに解明されることも期待される。従って、食肉生産科学や畜産食品科学を含めた筋肉・食肉科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。