

# 研究結果報告書作成要領

2018 年 12 月 11 日

<研究課題>骨格筋に発現するうま味受容体を介したアミノ酸シグナルが担う骨格筋代謝制御機構

代表研究者 九州歯科大学分子情報生化学分野 教授 古株 彰一郎  
共同研究者 九州歯科大学分子情報生化学分野 助教 松原 琢磨  
九州歯科大学生理学分野 講師 人見 涼露

## 【まとめ】

うま味受容体 Tas1r1/Tas1r3 は骨格筋の同化、つまり増殖と分化に伴い発現が増加した。逆に異化過程、骨格筋の萎縮とともに発現量が減少した。また、Tas1r1 をノックダウンした細胞では骨格筋の増殖がうまくいかなかった。すなわち、骨格筋に発現するうま味受容体は骨格筋の同化に不可欠であり、同化と異化のスイッチとして働いている可能性が示唆された。今後は動物モデルでうま味受容体役割を検討したい。

### 1. 研究の目的

#### 1-1 うま味受容体の発現

骨格筋組織幹細胞サテライト細胞におけるうま味受容体の発現を確認する。

#### 1-2 同化過程におけるうま味受容体の発現

In vitro に取り出したサテライト細胞を増殖・分化させ、そのプロセスにおけるうま味受容体の発現量を定量する。

#### 1-3 異化過程におけるうま味受容体の発現

C2C12 細胞を用いた In vitro 骨格筋萎縮で骨格筋の異化過程におけるうま味受容体の発現を定量する。

#### 1-4 同化過程におけるうま味受容体の役割

サテライト細胞のうま味受容体をノックダウンし同化過程におけるその役割を同定する。

### 2. 研究方法と経過

#### 2-1 シングルファイバーの採取

4~8 週齢雄野生型マウスを安楽死後に長指伸筋を採取し、コラゲナーゼ処理によりシングルファイバーを採取した。採取したファイバーを 0 日および 2 日間器官培養し anti-Pax7 mouse monoclonal antibody および anti-Tas1r1 rabbit polyclonal antibody、anti-Tas1r3 rabbit polyclonal antibody を用いて免疫染色を行なった。

#### 2-2 サテライト細胞の分化誘導

シングルファイバーからマウス骨格筋組織幹細胞であるサテライト細胞を単離し、マトリゲル上で培養した。培養し増殖したサテライト細胞は 5%ウマ血清含有培地により分化を誘導した。

#### 2-3 リアルタイム PCR

サテライト細胞から RNA を採取し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR 法を用いて、Tas1r1 と Tas1r3 のメッセンジャーRNA(mRNA)を定量した。mRNA量は $\beta$ -actinのmRNA量で補正した。

#### 2-4 siRNA のトランスフェクション

マウス Tas1r3 に対する siRNA を合成し、リポフェクション法を用いてサテライト細胞に導入した。筋管細胞は anti-myosin heavy chain mouse monoclonal antibody を用いて免疫染色を行なった。

#### 2-5 In vitro 骨格筋萎縮モデル

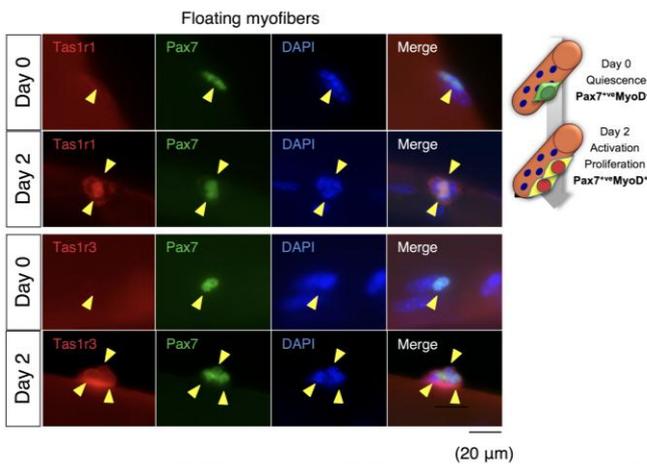
マウスサテライト細胞由来細胞株 C2C12 を 2%ウ

マ血清で筋分化を誘導し、筋管を形成させた。その後、血清を取り除くことで、飢餓状態にし、筋萎縮を誘導した。

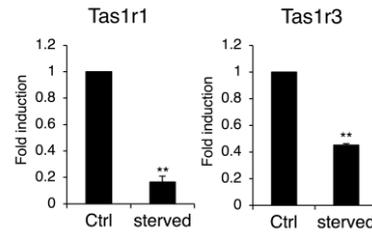
### 3. 研究の成果

#### 3-1 活性化したサテライト細胞でうま味受容体が発現する

静止期にあるサテライト細胞 (Day 0) では *Tas1r1*、*Tas1r3* ともに発現を認めなかったが、活性化し、増殖を始めたサテライト細胞 (Day 2) では *Tas1r1*、*Tas1r3* ともに細胞膜上に発現を認めた。*Pax7* はサテライト細胞の特異的のマーカータンパク質。(下図)。

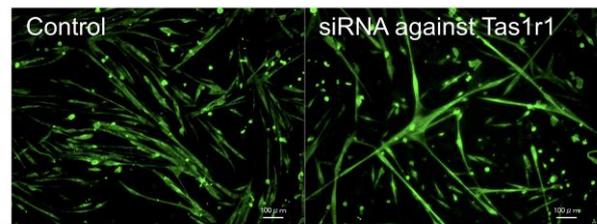


mRNA の発現レベルが減少した。(下図)。



#### 3-4 うま味受容体は増殖に不可欠である

siRNA を導入しサテライト細胞の *Tas1r1* をノックダウンすると、十分に増殖しないまま、分化融合し不定形な筋管細胞を形成した。(下図)。



### 4. 今後の課題

我々研究室で有している骨格筋特異的うま味受容体ノックアウトマウスに対して、カルディオトキシンを注射することで骨格筋の再生を、坐骨神経を切除することで骨格筋の萎縮を促し、それぞれ骨格筋の同化・異化におけるうま味受容体の役割を in vivo で同定する。

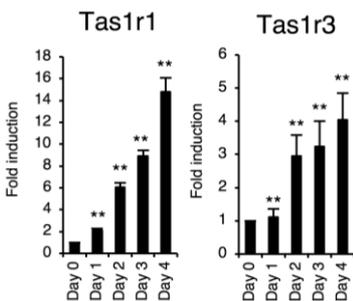
うま味受容体 *Tas1r1*/*Tas1r3* は創薬のターゲットに適した G タンパク質共益型受容体であり、将来的にうま味受容体を活性化することで骨格筋量を維持・増加させる治療法開発へ本研究を繋げていきたい。

### 5. 研究成果の公表方法

英文雑誌に投稿し、国際社会に向けて発表する予定。

#### 3-2 うま味受容体は同化過程で増加する

サテライト細胞の分化過程における *Tas1r1* と *Tas1r3* の mRNA 量を検討したところ、両遺伝子ともに分化にともなって発現量が増加することが明らかとなった。(下図)。



#### 3-3 うま味受容体は異化過程で減少する

C2C12 から分化させた筋管細胞を飢餓状態、すなわち萎縮させると *Tas1r1* および *Tas1r3* ともに