

# 鶏骨格筋から分離した単一筋線維の筋線維型判別方法の開発

井尻 大地

鹿児島大学農学部生物資源化学科栄養生化学・飼料化学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21-24

TEL 099-285-8652

## 要旨

本研究では、ニワトリの骨格筋から単一の筋線維を単離する方法と単一筋線維から RNA 抽出し、遺伝子発現解析により筋線維型判別を行う方法の確立を目的とした。まず、ニワトリから採取した骨格筋（縫工筋）を 4%パラホルムアルデヒド中で 4°C、24 時間静置することにより固定した。その後、0.2%コラゲナーゼ溶液中で 37°C、6 時間静置し、実体顕微鏡下で単一筋線維を単離した。それぞれの単一筋線維から RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、単離した全ての筋線維から Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の遺伝子発現が確認された。さらに、遅筋型トロポニン I と速筋型トロポニン I の遺伝子発現を調べることによって、単一筋線維の筋線維型を確認することができた。

## 1. 緒言

食肉の色調は、消費者の購買意欲を左右する要因の一つであり、近年では赤みを帯びた食肉に対する指向性が高まっている。そのため、良質な赤肉生産技術の開発は、今後の肉用鶏生産への貢献が期待される重要な研究課題である。骨格筋は大別して 2 種類の筋線維型（赤・白）で構成され、運動などの生理刺激や寒冷感作などの環境要因により骨格筋中の筋線維型の割合は可逆的に変化する<sup>1)3)</sup>。そのため、筋線維型変換メカニズムの解明は、肉質制御に直結する知見として期待されるが、筋線維型変換時に 2 種類の筋線維型がそれぞれどのように変化するのかについては完全に解明されていない。

これまで筋線維型の定量的な評価は、各筋線維型に特異的に発現している mRNA またはタンパク質の発現量を指標として行われてきた<sup>4)</sup>。そのため、筋線維型に特異的な mRNA またはタンパク質の発現量について骨格筋全体として評価することは可能であったが、1 本 1 本の筋線維について遺伝子発現量や筋線維型の評価はあまり行われていない。近年、げっ歯類を用いた研究において骨格筋からの単一筋線維の単離方法<sup>5)</sup>や単一筋線維中の遺伝子発現の解析方法などが報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、ニワトリの骨格筋を用いた筋線維の単離方法についての報告はない。そこで、本研究では、ニワトリの骨格筋からの単一筋線維の単離方法および単一筋線維中の遺伝子発現解析方法の確立を目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 試薬

リン酸二水素ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、リン酸水素二ナトリウム・12H<sub>2</sub>O、水酸化ナトリウムはナカライテスク株式会社（京都）、パラホルムアルデヒドはメルク（Darmstadt, Germany）、コラゲナーゼは新田ゼラチン株式会社（大阪）、ディスペーゼは Gibco (grand island, NY, USA)、NucleoSpin® RNA XS kit、Prime Script RT reagent Kit、SYBR® Primix EX Taq™ はタカラバイオ株式会社（滋賀県）、ReliaPre™ RNA Tissue Miniprep System は Promega (Madison, WI, USA)、プライマーは greiner bio-one (Frickenhausen, Germany) より購入した。

### 2.2. 供試動物

供試動物には、くみあいチキンフーズ株式会社（鹿児島県）から譲渡されたチャンキー（Ross308）系ブロイラー（雄）を用いた。1日齢から24日齢まで市販飼料（粗タンパク質含量22%、代謝エネルギー量3.1Mcal/kg、日和産業株式会社、兵庫県）を用いて飼育した。水および飼料は自由摂取とし、試験室の環境温度は25±1°Cとした。また、1日齢から14日齢までは給温を行った。24日齢で断頭によってと殺し、縫工筋を摘出し、直ちに氷冷したリン酸緩衝液（PBS、pH 7.2）または4%パラホルムアルデヒド溶液に入れた。ニワトリヒナから摘出した縫工筋は、PBS中または4%パラホルムアルデヒド溶液中でトリミングをした後、PBS中の縫工筋は直ちに、4%パラホルムアルデヒド溶液中の縫工筋は、4°Cで24時間静置した後以後の操作を行った。また、本実験で用いたニワトリヒナ縫工筋は、速筋型および遅筋型の両方の筋線維特異的タンパク質を発現する骨格筋である<sup>4),7)</sup>。

### 2.4. 40%水酸化ナトリウム（NaOH）水溶液を用いた筋線維の単離

トリミングを行った縫工筋から Wada ら (2002)<sup>5)</sup>の方法に準じて筋線維を単離した。40% NaOH 水溶液が1mL 入った2.0mL 容プラスチックチューブに入れ、室温で3時間静置し軟化させた後、チューブをボルテックスミキサーにかけ筋線維を単離した。単離した筋線維は、実体顕微鏡下（SZ4045、オリンパス株式会社、東京都）で精密ピンセット（Dumont、Montignez、Switzerland）を用いて回収した。回収した筋線維は、顕微鏡（AX80、オリンパス株式会社）を用いて観察またはRNA抽出に供した。

### 2.5. 酵素（コラゲナーゼ、ディスペーゼ）を用いた筋線維の単離

トリミングを行った縫工筋をコラゲナーゼとディスペーゼの両方またはどちらか一方を用いて処理することで筋線維の単離を試みた。トリミングを行った縫工筋を0.2%コラゲナーゼ、0.2%ディスペーゼ、および0.2%コラゲナーゼと0.2%ディスペーゼがそれぞれ1mL 入った2.0mL 容プラスチックチューブに入れ、37°Cで6時間静置した。その後、単一筋線維を実体顕微鏡下で精密ピンセットを用いて回収した。回収した筋線維は、顕微鏡を用いて観察またはRNA抽出に供した。

## 2. 6. RNA 抽出

単一筋線維からの RNA 抽出は、NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS kit または ReliaPre<sup>™</sup> RNA Tissue Miniprep System を用いて行った。100 $\mu$ L の Buffer RA1 と 2 $\mu$ L の TCEP (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS kit) または 250 $\mu$ L の LBG+TG Buffer (ReliaPre<sup>™</sup> RNA Tissue Miniprep System) を入れた 1.5 mL 容のマイクロチューブに実体顕微鏡下で精密ピンセットを用いて単離した筋線維をそれぞれ入れた。その後の操作は、各キットの取扱説明書に準じて行った。抽出した RNA の濃度は、NanoDrop Lite (Waltham, MA, USA) を用いて計測した。

## 2. 7. cDNA の合成

Prime Script RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。

## 2. 8. Real Time PCR

本研究で PCR 反応に用いたプライマーを表 1 示した。mRNA 発現は、7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて分析した。PCR の反応は、50 $^{\circ}$ C で 2 分間、95 $^{\circ}$ C で 2 分間反応させた後、95 $^{\circ}$ C で 15 秒、55 $^{\circ}$ C で 15 秒、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の反応を 70 回行った。

Table 1. List of primers sequence used for quantitative real time polymerase chain reaction

Gene		Sequence (5'-3')	Size (BP)	Accession No.
sTnI	Forward	GAC CTG AGA GCC AAC CTG AA	175	XM_419242.3
	Reverse	TTC TGT CCT GGT GCT CCT CT		
fTnI	Forward	CGG ACT CGG GTT CAC AAC CA	108	NM_205417.1
	Reverse	GCA AGC TGG AGC ATA GCA CT		
GAPDH	Forward	CCT CTC TGG CAA AGT CCA AG	200	NM_204305.1
	Reverse	CAT CTG CCC ATT TGA TGT TG		

sTnI, slow-type troponin I; fTnI, fast-type troponin I; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

## 3. 結果と考察

抽出後 PBS 中でトリミングを行い直ちに 40% NaOH 中でインキュベートした縫工筋は、組織が断片化してしまい、単一の筋線維を確認することができなかった。これは、水酸化ナトリウムによるタンパク質の分解が進みすぎた結果であると考えられる。一方、

4% PFA 中で 4°C、24 時間インキュベートした後に 40% NaOH 中でインキュベートした縫工筋からは、単一の筋線維を単離することができた (Fig 1)。顕微鏡観察の結果、4% PFA および 40% NaOH 処理によって得られた線維は、筋線維に特徴的な構造である横紋が観察され、筋線維の周囲に複数の核が確認された。これらの結果より、4% PFA および 40% NaOH 処理によって得られた単一筋線維は、元の形状が維持されているものと考えられた。そこで、4% PFA および 40% NaOH 処理によって単離した筋線維から RNA 抽出を試みたが、その後の分析に十分な RNA 量を得ることはできなかった。RNA はアルカリ条件下で分解されやすいためこの方法では、RNA を回収することが困難であると考えられた。

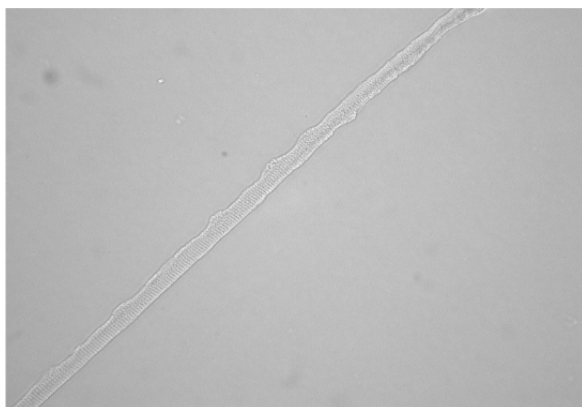


Fig 1. A single fiber isolated by using 40 % sodium hydroxide solution.

次に、コラゲナーゼとディスパーゼのどちらかまたは両方を用いた酵素処理によって筋線維を単離する方法を試みた。骨格筋の摘出後 PBS 中でトリミングを行い直ちに酵素処理を行った結果、コラゲナーゼで処理した縫工筋から単一の筋線維を得ることができた (Fig 2A)。一方、ディスパーゼのみで処理した縫工筋からは、組織の軟化が起これず単一の筋線維を得ることができなかった。また、ディスパーゼによる酵素処理を 24 時間行った場合においても組織の軟化は起これなかった。ディスパーゼは、上皮系の細胞をはく離する際に用いられる酵素であり、骨格筋筋線維の単離には不向きであると考えられた。さらに、コラゲナーゼおよびディスパーゼの両方によって処理した縫工筋では、組織が断片化してしまい、単一の筋線維の回収が困難であった (Fig 2B)。これらの結果から、コラゲナーゼ処理によって単一筋線維を単離する方法が望ましいと考えられたが、実体顕微鏡下で精密ピンセットによって単離する場合に筋線維の強度が弱く、千切れ易いことが問題であると考えられた。そこで、4% PFA 中で 4°C、24 時間インキュベートした後にコラゲナーゼ処理によって筋線維を単離する方法を試みた結果、ある程度の強度を持った単一筋線維を単離することが可能となった。

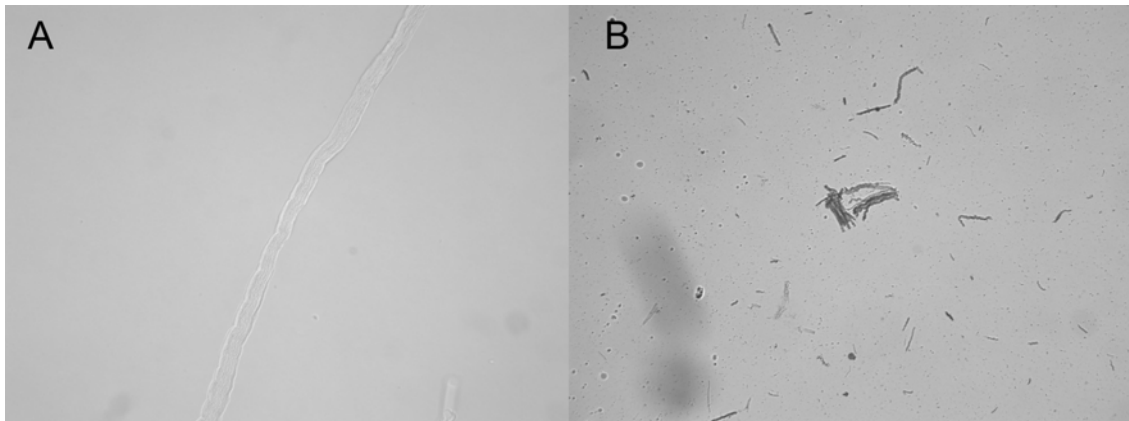


Fig 2. A single fiber isolated by using enzymes. A, 0.2% collagenase solution. B, 0.2% collagenase with 0.2% dispase solution.

続いて、4% PFA 中で 4°C、24 時間インキュベートした後にコラゲナーゼ処理によって単離した筋線維から RNA の抽出を試みた。本実験では、NucleoSpin® RNA XS kit および ReliaPre™ RNA Tissue Miniprep System を用いてそれぞれ 10 本の単一筋線維から RNA を抽出した。その結果、抽出に用いた全ての単一筋線維から RNA が抽出された。NucleoSpin® RNA XS kit により抽出した場合  $112.59 \pm 46.83 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (n=10)、ReliaPre™ RNA Tissue Miniprep System により抽出した場合  $12.38 \pm 6.27 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (n=10) の RNA を得ることができた。

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、全ての細胞にユビキタスに発現していることから遺伝子発現解析の内部標準としてよく用いられている。そこで、それぞれの単一筋線維より抽出した RNA から cDNA を合成し、GAPDH のプライマーを用いてリアルタイム PCR にかけたところ、全てのサンプル (20 サンプル中 20 サンプル) において増幅が確認された。したがって、単一筋線維より抽出した RNA は、PCR による遺伝子発現解析に使用することが可能であることが明らかとなった。続いて、単一筋線維由来の cDNA を用いて遅筋型筋線維特異的トロポニン I (sTnI) mRNA および速筋型筋線維特異的トロポニン I (fTnI) mRNA の増幅を試みた。その結果、20 サンプル中 6 サンプルで sTnI の増幅が確認され、20 サンプル中 6 サンプルで fTnI の増幅が確認された。これらの結果より、単一筋線維から抽出した RNA を用いて筋線維型の判別が可能であることが明らかとなった (Fig 3)。しかしながら、sTnI および fTnI のどちらの増幅も確認されないサンプルもあったが、GAPDH を増幅した際には全てのサンプルにおいて増幅が確認されたことから、PCR に供する鋳型 cDNA 量の検討または PCR のサイクル数の検討により改善できるものと考えられる。

以上、本研究の結果より、ニワトリから採取した骨格筋を 4%PFA 中で 4°C、24 時間の固定を行い、その後、0.2%コラゲナーゼ溶液中で 37°C、6 時間静置すると単一筋線維を単離できることが明らかとなった。また、それぞれの単一筋線維から RNA を抽出し、遺伝子発現解析によって単一筋線維の筋線維型の判別が可能となった。

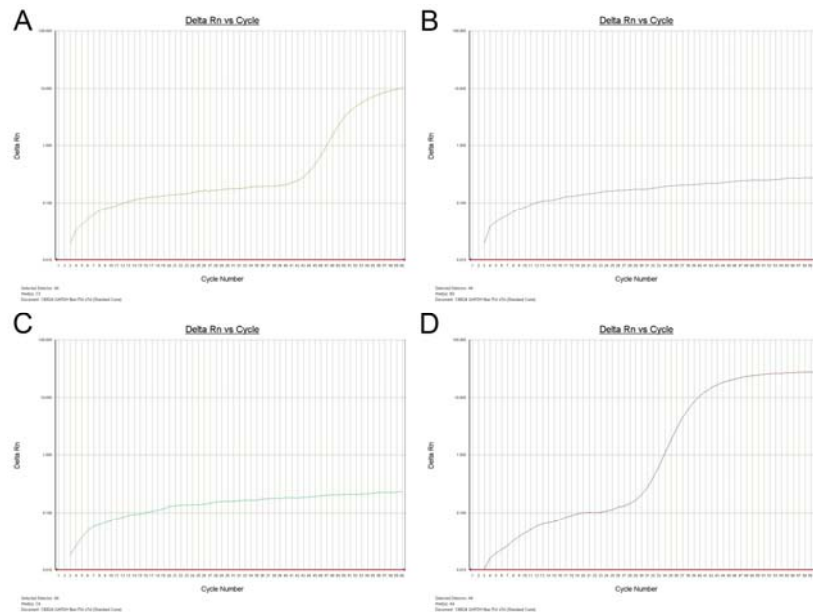


Fig 3. Results of real time PCR. Slow-type troponin I (A, B). Fast-type troponin I (C, D). One cDNA was used for A and C, and another cDNA was used for B and C.

#### 4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深甚なる感謝の意を捧げます。

#### 5. 引用文献

- 1) Barnard RJ, Edgerton VR, Peter JB. Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and histochemical properties. *Journal of Applied Physiology* 1970a; 28:762-766.
- 2) Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Molé PA, Holloszy JO. Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *American Journal of Physiology* 1972; 222: 373-378.
- 3) Hirabayashi M, Ijiri D, Kamei Y, Tajima A, Kanai Y. Transformation of skeletal muscle from fast- to slow-twitch during acquisition of cold tolerance in the chick. *Endocrinology* 2005; 146: 399-405.
- 4) Nishida J, Machida NW, Tagome M, Kasugai Y. Existence of parvalbumin and biochemical characterization in quail and pigeon skeletal muscles with different fiber type compositions. *Journal of Experimental Zoology* 1997; 277: 283-292.
- 5) Wada KI, Takahashi H, Katsuta S, Soya H. No decrease in myonuclear number after long-term denervation in mature mice. *American Journal of Physiology* 2002; 283: C484-488.
- 6) Jemiolo B, Trappe S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle:

validation of internal control with exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 320: 1043-1050.

- 7) Daichi Ijiri, Moe Miura, Yukio Kanai, Miho Hirabayashi., Increased mass of slow-type skeletal muscles and physiologically depressed myostatin gene expression in cold-tolerant chicks. , *Zoological Science* 2009; 26: 277-283.

## Identification of muscle fiber type from single muscle fiber in chicken skeletal muscle

Daichi Ijiri

Department of Biochemical Science and Technology, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto,  
Kagoshima 890-0065, Japan

TEL 099-285-8652

The aims of this study was to isolate single muscle fiber from chicken skeletal muscle and to distinguish muscle fiber type. The sartrius muscle collected from chicken leg was incubated in 4% Paraformaldehyde solution in PBS at 4°C for 24 hours. Then, it was digested in 0.2% collagenase solution at 37 °C for 6 hours, and single muscle fibers were isolated by using tweezers under stereoscopic microscope. Total RNA was purified from each muscle fibers and real time PCR was performed. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA was amplified in all samples. And muscle fiber type of single fiber was indentified by using real time PCR.