

ショウガオールが骨格筋細胞の代謝および運動機能に与える影響

The effect of 6-Shogaol on energy metabolism and formation of myofibrils.

栗山 恵弥

Megumi Kuriyama

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード : 骨格筋, ショウガオール, 電気刺激

Key words : Skeletal muscle, Shogaol, Electrical stimulation

1. 研究目的

ショウガの辛味成分にはジンゲロール, ショウガオール, ジンゲロンがある. その中でも主要辛味成分であるジンゲロールは熱に不安定な化合物で, 加熱により簡単に脱水反応を起こしショウガオールに変わることがわかっている. ショウガオールには, 代謝の促進, エネルギー消費の促進, 血糖降下作用があることが報告され, メタボリックシンドローム患者への効果が期待されているが, 骨格筋に対する代謝促進効果の結果, 運動機能にどのような影響があるか調べた研究は少ない.

また, 筋肉量の減少が, 高齢者の健康状態を「負のスパイラル」に導くことが指摘されている. 骨格筋細胞内の筋原繊維量の変化には運動習慣だけでなく栄養状態が大きな影響を与えられらる. ショウガ抽出液が, 骨格筋細胞におけるグルコースの取込みを増加させ, 代謝およびエネルギー消費を促進させる効果が報告されているが, その結果, 骨格筋の筋原繊維量や運動機能にどのような影響を与えるかについて, 細胞・分子レベルでの研究はない.

本研究では, ショウガオールの摂取が, 筋肉の機能や運動能力にどのような効果を持つか, また, 運動を通して血中グルコースや脂質濃度をどのように調節しているかを細胞レベルで調べる.

2. 研究実施内容

【方法】

1. C2C12 細胞の培養・電気刺激の条件検討

マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を, 2% ウマ血清を含む分化誘導培地中で 6 日間培養した. 培養用プレートは PLL コート, MAS コート, コラーゲンコートの 3 種類を用いて比較した. その細胞の

筋運動を観察するために, 緑色蛍光色素 Fluo4 で細胞内 Ca^{2+} の蛍光染色をおこない, 1 秒毎に電気刺激 10~30V/10mm を与えた.

2. 電気刺激時にショウガオールを添加した場合の C2C12 細胞への効果

C2C12 細胞を分化誘導培地中で 7 日間培養した後, 0~50 nM のショウガオールを含む培地に交換し, 電気刺激装置 C-Dish (IonOptix 社) を用いて 24 時間 16.7V/25 mm (6.9V/10mm) の電気刺激を与えた. その細胞から mRNA を抽出し, cDNA に逆転写をおこない, RealTimePCR (SYBR 法) にて, 筋分化および代謝, 炎症に関する 11 種類のプライマーを用いて各 mRNA 発現量を定量した.

【結果および考察】

1. C2C12 細胞の培養・電気刺激の条件検討

位相差顕微鏡による細胞の培養 6 日目の様子から, コラーゲンコートプレートで最も太い筋管細胞が観察できた (図 1).

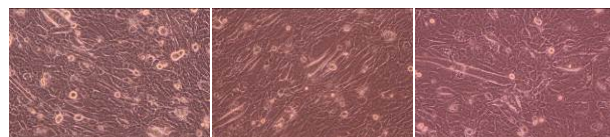


図 1. 分化誘導 6 日目の細胞の様子 (左から PLL コート, MAS コート, コラーゲンコート)

図 2 には電気刺激下の Ca^{2+} 応答の蛍光観察像を示す. MAS コートとコラーゲンコートのプレートで培養した細胞を用いて観察をおこなったところ, コラーゲンコートで最も Ca^{2+} 応答を確認することができた.

位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡において, コラ

ーゲンコートで C2C12 細胞がより分化し Ca^{2+} 応答を活発におこなっている様子を観察できたことから、C2C12 細胞の培養にはコラーゲンコートの培養用プレートを用いることが望ましいと考えられた。

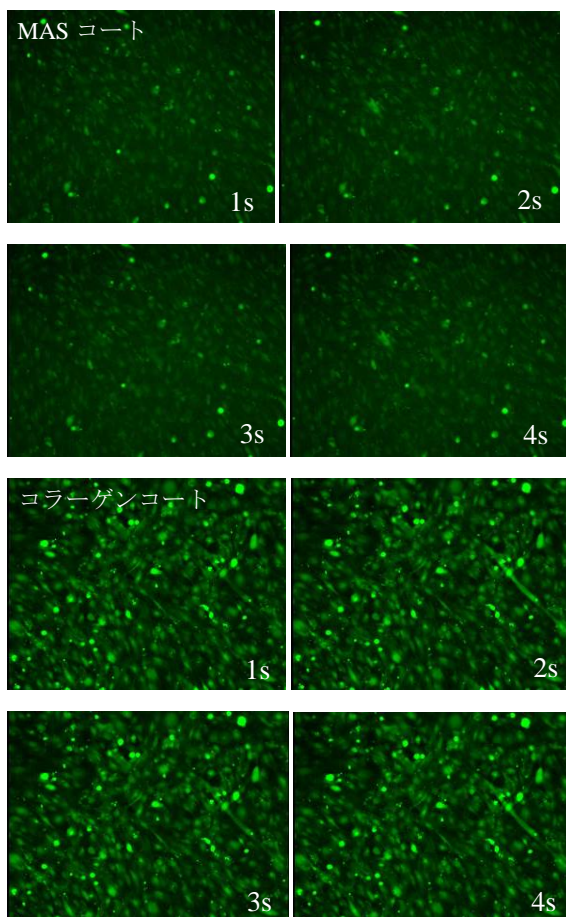


図 2. 細胞内 Ca^{2+} には緑色蛍光色素 Fluo4 を用いた電気刺激下での Ca^{2+} 応答の蛍光観察 (上図が MAS コート, 下図がコラーゲンコート)

また、電気刺激の強さを変えて蛍光観察をおこなったところ、20V/10mm の強さで、細胞毎にさまざまな Ca^{2+} 応答を観察することができた。この結果から、20V/10mm の強さが C2C12 細胞に電気刺激を与えながら蛍光観察する場合において、最も適していると考えられた。しかし、今後の実験を考えると、24 時間電気刺激処理において 20V/10mm では強すぎるように感じられた。そのため、24 時間電気刺激処理をおこなう場合は、10V/10mm よりも弱い強さの電気刺激を与えることが望ましいと考えられた。さらに、C2C12 細胞に電気刺激を与える研究の論文で、40V/60mm

(6.6V/10mm) で 24 時間電気処理を与えた実験があったため、この数値を参考にし、使用する電気刺激装置 C-Dish の設計に当てはめて数値を設定することとした。

2. 電気刺激時にショウガオールを添加した場合の C2C12 細胞への効果

(1) 電気刺激が与える影響

図 3 に位相差顕微鏡による分化誘導 8 日目の細胞の様子を示す。電気刺激 24 時間処理をおこなった細胞とそうでない細胞とで、筋管細胞の太さに差がみられた。RealTimePCR の結果より、電気刺激によって筋管細胞の分化および肥大化が促進されることが確認できた。

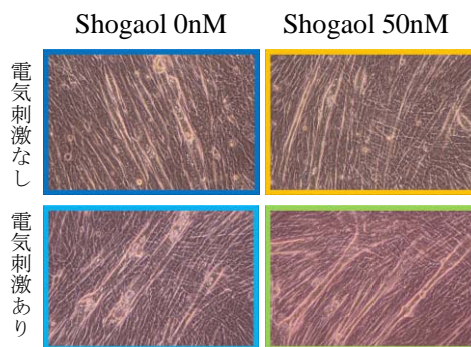


図 3. 分化誘導 8 日目の細胞の様子

また、ミトコンドリアの融合および増殖も促進された。さらに AMPK1 が活性化され、脂肪酸合成の低下、糖の取り込みが増加したが、解糖系は低下していた。これらのことから、電気刺激によりミトコンドリアの融合が促進されたが、解糖系酵素発現は減少していたため、脂肪酸の利用が促進されていた可能性が考えられる。

(2) ショウガオールが与える影響

図 3 から、ショウガオール 24 時間処理をおこなった細胞とそうでない細胞とでは、電気刺激を与えた細胞と比較すると、ショウガオールを添加しない場合に、筋管細胞が最も太く分化しているように見えた。すなわち、ショウガオールは電気刺激による筋分化を抑制している可能性が示唆された。RealTimePCR の結果からも、電気刺激下で筋管細胞の分化および肥大化を抑制していることが示された。

また、ミトコンドリアの融合および増殖も抑制し、AMPK1 の活性も抑制されていた。

これらのことから、ショウガオールには、筋分化および肥大化だけでなく、ミトコンドリア融合および増殖、AMPK 活性に対してネガティブな効果があることが示唆された。しかしながら、ショウガオールには C2C12 細胞への電気刺激による炎症反応を抑制する傾向があることも示唆されたので、今後の課題としたい。

3. まとめと今後の課題

C2C12 細胞への電気刺激における条件は C-Dish で 16.7V/25 mm の強さが適していることがわかった。これは、細胞の筋分化の様子や RealTimePCR の解析結果からも妥当であると考えられる。電気刺激を与える時間など再度検討すべき点もあるが、この結果をひとつの指標として、電気刺激実験をおこなっていきたいと考えている。

ショウガオールに関して、残念ながら今回の実

験では、筋分化、エネルギー代謝（ミトコンドリアの融合および増殖、AMPK 活性）においてネガティブな効果であることが示唆された。

しかし、炎症を抑える効果があることも示唆されたので、ショウガオール処理のタイミングや処理時間など、検討すべき点はいくつもあることが予測できる。それだけでなく、ショウガ辛味成分にはジンゲロールおよびジンゲロンもあるため、それらを用いて再度同様の実験をおこなうことも視野に入れて研究を進めていきたいと考えている。

4. この助成による発表論文等

②学会発表

[1]「栗山 恵弥, 田中 光, 田中 直子」「ショウガ成分 shogaol が筋分化に与える影響」「薬学会」「2018 年 3 月 26 日」「もてなしドーム (石川県・金沢市)」「(発表確定)」