

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03078

研究課題名(和文) 運動による骨格筋肥大におけるリボソーム合成活性化の役割

研究課題名(英文) Roles played by ribosome biogenesis in exercise-induced muscle hypertrophy

研究代表者

石井 直方 (Ishii, Naokata)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20151326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：運動・トレーニングによる骨格筋肥大におけるリボソーム生合成の役割について、ラット骨格筋を用いて調べた。筋肥大率を段階的に調節可能な代償性肥大モデルにおいて、筋肥大率とリボソーム量およびrRNAの転写因子であるUBFの発現量の間には強い相関が認められた。筋力トレーニングモデルにおいては、トレーニング6週間後における筋肥大率とリボソーム量の間には強い相関が認められた。一方、トレーニングによるリボソーム量の増加は、トレーニングの初期段階で起こり、mTORシグナル伝達系活性、タンパク質合成とは異なる経時変化を示した。本結果は、トレーニング刺激によってリボソーム量がダイナミックに変化することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the role played by ribosome biogenesis in exercise-induced muscle hypertrophy using the rat skeletal muscles. A compensatory hypertrophy model, with which the degree of hypertrophy could be controlled, showed that both the ribosomal content and the expression of UBF (upstream binding factor), a transcription factor for rRNA, are strongly correlated with the degree of hypertrophy. In a resistance-training model, the muscle hypertrophy after the exercise period for 6 weeks showed a close association with the increase in ribosomal content. The ribosomal content increased at an early stage of training period (within 1 wk. after the initiation of training), and changed following a different time course from those of mTOR signal transduction activity and protein synthesis. These results suggest that the ribosomal content changes dynamically with the training stimulus, and the ribosomal biogenesis plays an important part in exercise-induced muscle hypertrophy.

研究分野：筋生理学

キーワード：トレーニング 筋肥大 リボソーム量 タンパク質合成 翻訳容量 翻訳効率 mTORシグナル伝達系

### 1. 研究開始当初の背景

運動・トレーニングによって骨格筋量を増大させることは、基礎的体力のためだけでなく、サルコペニアの予防・改善、糖および脂質代謝の向上などの観点でも重要である。運動による骨格筋肥大のメカニズムについては、断片的な理解が進んできたものの、まだ十分に解明されていない。骨格筋肥大は主に、1) タンパク質量の増加による筋線維肥大、2) 筋サテライト細胞の増殖・融合による筋線維核数の増加、によって起こる。1) にはさらに、a) 遺伝子転写過程、b) 翻訳過程、c) タンパク質分解、のそれぞれの調節が関わっており、特に b) 翻訳過程の活性化が筋線維の肥大に重要な役割を果たしていると考えられている (Ishii et al., 2012)。

翻訳過程におけるタンパク質合成速度は翻訳容量と翻訳効率によって決定される。翻訳容量は翻訳装置であるリボソームや tRNA・翻訳因子などの量に、翻訳効率はリボソームあたりのタンパク質合成速度に対応する。運動刺激は翻訳効率を上昇させることで筋タンパク質合成速度を増加させることがわかっている。特に、翻訳の開始段階において重要な役割を果たすタンパク質複合体 mTORC1 の活性化を介した調節 (mTOR シグナル伝達系) が重要と考えられている。

しかし最近の研究から、mTOR シグナル伝達系の活性化は筋タンパク質合成速度の増加に貢献しているものの、その増加の程度を完全に説明しうる要素ではないことが示唆されている。従って、運動による筋肥大における翻訳効率以外の要素、特にリボソーム生合成の役割について明確にすることが必要となっている。本研究により得られる成果は、筋疾患の有効な治療法の開発などにも貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、運動による筋肥大における翻訳容量の増大 (主に新たなリボソームの産生) の役割を明らかにすることを目的として行った。その目的のため、独自に開発した 2 種の動物実験モデル系を用い、異なる運動刺激によって筋サイズ、タンパク質合成速度、リボソーム量、リボソーム量調節因子などがどのように変化するかを調べた。

### 3. 研究の方法

(1) 代償性筋肥大モデル: Wistar 系雄ラット足底筋を対象とし、協働筋である腓腹筋とヒラメ筋の切除の程度を変えることで負荷強度を調節し、術後 2 週間で約 10 (WK)、20 (MO)、30 (MI)、50% (ST) の筋肥大を段階的に引き起こすことが可能なモデルを開発した (図 1)。このモデルを用い、筋肥大の程度とリボソーム量、mTOR シグナル伝達系の活性などとの関連を調べた。

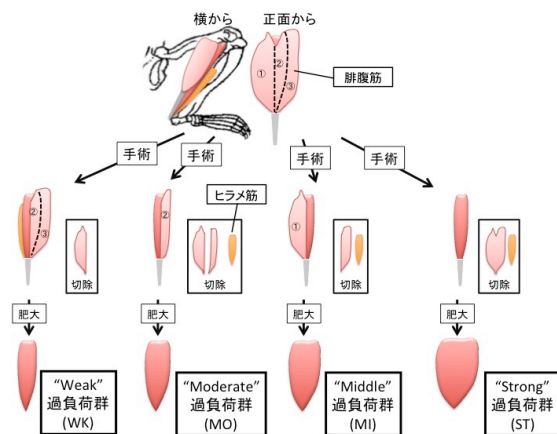


図 1. 本研究で開発したラット足底筋代償性肥大モデル。協働筋切除の程度を変えることで肥大率をコントロールできる。

(2) 筋力トレーニングモデル: Wistar 系雄ラット腓腹筋を対象とし、独自に作製した動物用等速性/等尺性ダイナモメータを用いて筋力トレーニングに相当する運動刺激を与えた (Ochi, Nakazato, Ishii et al., *J. Appl. Physiol.*, **108**, 2010)。本研究では主に、1 セットあたり 10 回の最大等尺性収縮を 5 セット (合計 50 回) 行うプロトコルを主に使用し、長期効果と短期効果を調べた。

(3) 生化学的分析: 筋サンプルをトレーニング刺激後一定の時間に採取、湿度重量を測定し凍結した。タンパク質の定量 (リン酸化フォームを含む) には Western blot を用いた。タンパク質合成は、puromycin 標識法 (SUnSET 法) により測定した。リボソーム量は rRNA 量 (18S+28S)、およびリボソームタンパク量 (rpS6) により測定した。筋線維核数の計数は、筋標本を固定・アルカリ処理により単一筋線維に分離後、核を蛍光標識し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1) 代償性肥大モデルにおける筋肥大率とリボソーム量の関係

代償性肥大モデルを用い、術後 2 週間で平均 7.9% (WK)、18.7% (MO)、33.1% (MI)、50.4% (ST) の肥大を生じさせた (それぞれ n=8)。それぞれの群での、同一筋重量あたりのリボソーム量 (rRNA 量) を図 2 に示す。また、rRNA 量はリボソームタンパク量 (rpS6 量) ときわめて強い相関を示した ( $R=0.98, P<0.0001$ )。

同じサンプルに対し、筋湿重量 (体重あたり)、リボソーム量、リン酸化 p70S6K (Thr389) 発現量の関係を調べたところ、図 3 のようになった。リン酸化 rpS6、4EBP1 発現はリン酸化 p70S6K 発現と同様の変化を示した。すなわち、筋肥大の程度は、リボソーム量の増加と強い相関を示したが、mTOR シグナル伝達系の活

性化に対しては、肥大の程度が小さい場合にのみ相関し、肥大の程度の大きな領域では相関しないことが判明した。

(2) 代償性肥大モデルにおける筋肥大率と筋線維核数

筋線維のサルコメア長あたりの核数は、最大筋肥大時においても若干の増加を示す程度であり、筋肥大率との間に有意な相関は見られなかった。

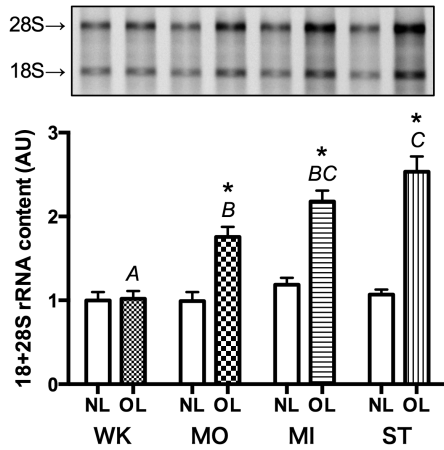


図2. 代償性肥大モデルにおける足底筋 rRNA 量 (18S+28S)。NL は対照側、OL は過負荷側を示す。平均値±標準誤差 (n= 8)。\* は対照側に対する有意差、アルファベットは群間の有意差を示す (P<0.05)。

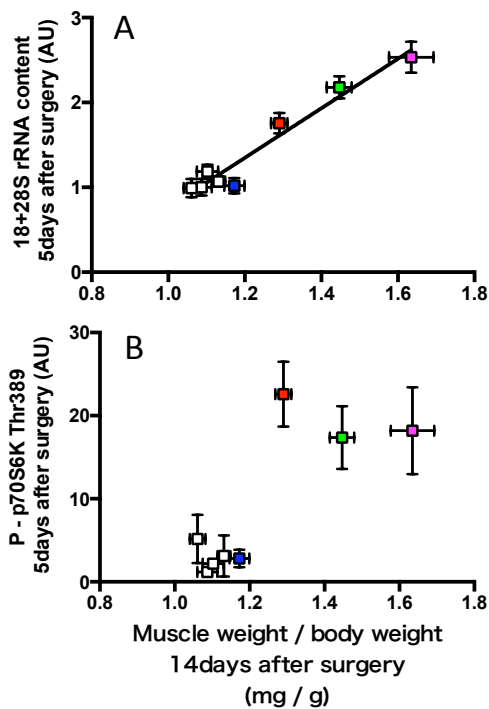


図3. 代償性肥大モデルにおける筋湿重量 (術後2週間) と、rRNA 量 (A) および術後5週でのリン酸化 p70S6K (B) の関係。それぞれのプロットは平均値±標準誤差 (n=8) を示す。A では強い相関が認められる (R=0.98, P<0.0001)。

(3) 代償性肥大モデルにおけるリボソーム生合成活性化因子

術後2週間における筋肥大率と術後5日でのリン酸化 UBF (upstream binding factor) 量の関係を調べたところ、強い相関が認められた。リン酸化 UBF は rRNA の転写因子としてはたらくことから、本モデル系におけるリボソーム量の増加は、UBF を介したリボソーム生合成活性化によるものであることが示唆された。

(4) リボソーム生合成阻害薬の効果

リボソーム生合成の阻害薬であるアクチノマイシン D を通常の転写が強く抑制されない程度の濃度で腹腔投与すると (214.3 および 500 µg/kg body weight)、rRNA 量が減少するとともに筋肥大率が低減した。この結果は、リボソーム量の増加と筋肥大の間の因果関係を示唆する。

(5) 筋力トレーニングモデルにおけるリボソーム量の変化

筋力トレーニングモデルを用い、50回の最大等尺性収縮を1 bout 行う群 (1B)、中1日あけて2 bout 行う群 (2B)、3 bout 行う群 (3B)、6 bout 行う群 (6B)、18 bout 行う群 (18B) に分け、最後のセッションから48時間後に筋をサンプルし、リボソーム量を調べた。その結果、リボソーム量はトレーニングの比較的初期の段階 (3Bまで) で徐々に増加し、その後はトレーニングを継続しても変わらないことが判明した (図4)。

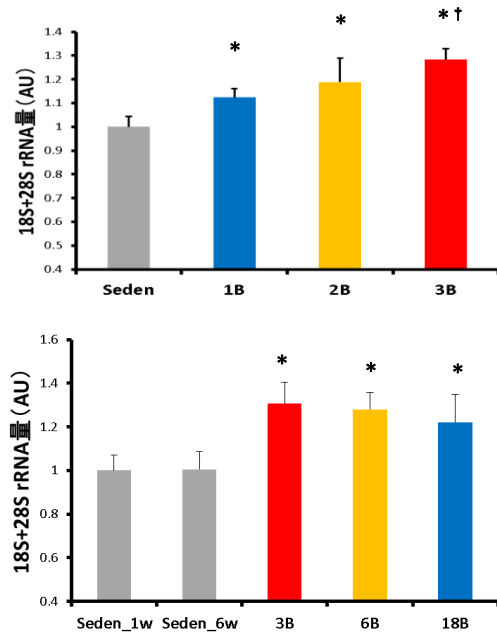


図4. レジスタンストレーニング初期(上)および中期(下)におけるリボソーム量の変化。Seden, 対照群; Seden\_6w, 6週間の対照群.; 1B, 1 bout group; 3B, 3 bout group...; 18B, 18 bout group (6週間) . 平均値±標準誤差 (n=5) で示す。\*は対照群に対する有意差、†は1B群に対する有意差を示す (P<0.05)。

(6) 筋重量とリボソーム量の関係

対照群と 18B 群について、体重あたりの筋湿重量と筋重量あたりの rRNA 量の関係を調べると、図 5 のようになり、強い相関が認められた。この結果は、代償性肥大のみならず、より生理的な運動刺激による筋肥大においても、リボソーム量の増加(リボソーム生合成)が重要な役割を果たすことを示唆する。

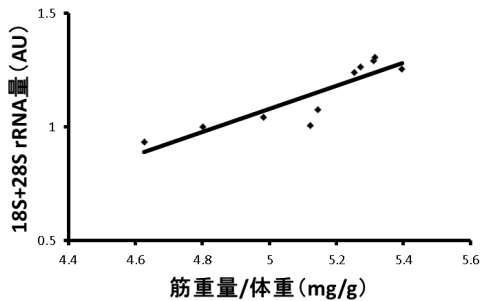


図 5. 対照群と 18B 群の腓腹筋 1mg 中の rRNA 量と腓腹筋湿重量の関係。(R=0.89, P<0.05)

(7) リボソーム量とリン酸化 UBF の関係

それぞれの群における rRNA 量とリン酸化 UBF 量の関係を図 6 に示す。この結果は、代償性肥大モデルの場合と同様、リボソーム量の増加が、UBF リン酸化を介した rRNA 転写活性化によるものであることを示唆する。

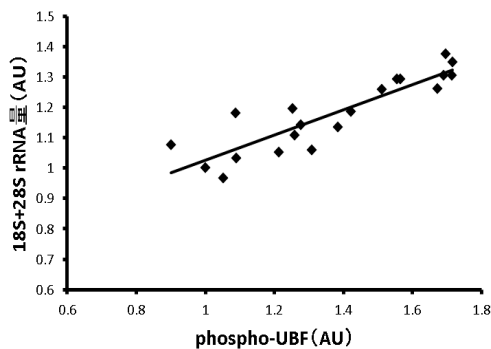


図 6. 最後のトレーニングセッションから 48 時間後における UBF のリン酸化量と rRNA 量の関係。(R=0.89, P<0.001)

(8) タンパク質合成量の変化

次にトレーニング初期段階(1B~3B)におけるタンパク質合成とシグナル伝達系の活性化につき、トレーニングセッション後 6 時間に筋サンプルを採取し調べた。タンパク質合成量(一定時間あたり)は図 7 A のような変化を示し、1 bout のトレーニング刺激でほぼ最大値に達し、以後のトレーニングの継続に伴って変化しないことが示唆された。

(9) mTOR シグナル伝達系の変化

翻訳過程の活性化に関わる mTOR シグ

ナル伝達系を構成する p70S6K のリン酸化は、セッションの進行に伴い図 7 B のように変化した。リン酸化 rpS6, 4EBP1 についても同様であった。この結果は、mTOR シグナル伝達系の活性化は、トレーニング開始直後に最も強く起こり、その後トレーニングの継続とともに減弱することを示している。

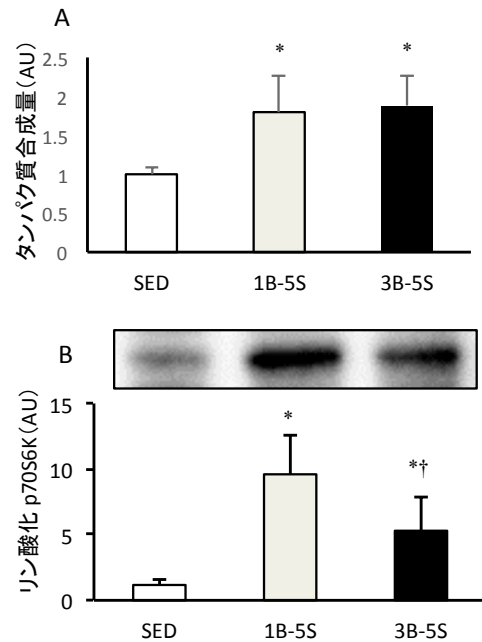


図 7. レーニング初期(1週)におけるタンパク質合成(A)とリン酸化 p70S6K 量(B)。SED, 対照群; 1B-5S, 1 bout group; 3B-5S, 3 bout group. 平均値±標準誤差 (n=5) で示す。\*は対照群に対する有意差、†は 1B 群に対する有意差を示す (P<0.05)。

(10) まとめと考察

本研究の主要な結果から、リボソーム量の増加(リボソーム生合成の活性化)が、骨格筋量を規定する重要な因子であることが明らかとなった。特に、生理的なトレーニング刺激による筋肥大の場合にも同様であることを示した点が、本研究の大きな成果と考えられる。

一方、代償性肥大モデルの結果から、筋肥大の程度が一定以上に上昇した場合にリボソーム量の増加が起こることが示唆されたが、トレーニングモデルの実験では予想に反し、トレーニング開始後初期の段階でリボソーム生合成活性化が見られた。そのため、トレーニングの継続とともに mTOR シグナル伝達系の活性化が減弱しても、タンパク質合成量が低下しなかったであろうと考えられる。

トレーニング刺激を構成する要素の中で、リボソーム生合成の活性化に関わるものを特定すること、加齢に伴うリボソーム生合成の変化を調べることなどが今後の課題であろう。

<引用文献>

- ① Ishii, N., Ogasawara, R., Kobayashi, K. and Nakazato, K. Roles played by protein metabolism and myogenic progenitor cells in exercise-induced muscle hypertrophy and their relation to resistance training regimens. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 1, 2012, 83-94.
- ② Ochi, E., Hirose, T., Hiranuma, K., Min, S., Ishii, N. and Nakazato, K. Elevation of myostatin and FOXOs in prolonged muscular impairment induced by eccentric contractions in rat medial gastrocnemius muscle. *J. Appl. Physiol.*, 108, 2010, 306-313.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Maekawa, T., Ogasawara, R., Tsutaki, A., Lee, K., Nakada, S., Nakazato, K., Ishii, N. Electrically evoked local muscle contractions cause an increase in hippocampal BDNF. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 2018, in press, 査読有,
- ② Takagi, R., Ogasawara, R., Takegaki, J., Tsutaki, A., Nakazato, K. and Ishii, N. Influence of Past Injurious Exercise on Fiber Type Specific Acute Anabolic Response to Resistance Exercise in Skeletal Muscle. *J. Appl. Physiol.*, 2018, in press. 査読有, DOI:10.1152/jappphysiol.00480.2017.
- ③ Madarame, H., Nakada, S., Ohta, T. and Ishii, N. Post-exercise blood flow restriction does not enhance muscle hypertrophy induced by multiple-set high-load resistance exercise. *Clin. Physiol. Funct. Imaging*, 18, 2018, 360-365, 査読有, DOI: 10.1111/cpf.12421.
- ④ Takegaki, J., Ogasawara, R., Tamura, Y., Takagi, R., Arihara, Y., Tsutaki, A., Nakazato, K., Ishii, N. Repeated bouts of resistance exercise with short recovery periods activates mTOR signaling, but not protein synthesis, in mouse skeletal muscle. *Physiol. Rep.*, 5, 2017, e13515. 査読有, DOI: 10.14814/phy2.13515.
- ⑤ Ogasawara, R., Arihara, Y., Takegaki, J., Nakazato, K. and Ishii, N. Relationship between exercise volume and muscle protein synthesis in a rat model of resistance exercise. *J. Appl. Physiol.*, 123, 2017, 710-716. 査読有, DOI: 10.1152/jappphysiol.01009.2016.
- ⑥ Takagi, R., Ogasawara, R., Tsutaki, A., Nakazato, K. and Ishii, N. Regional adaptation of collagen in skeletal muscle to repeated bouts of strenuous eccentric exercise. *Pflugers Archiv – Eur. J. Physiol.*, 468, 2016, 1565-1572. 査読有, DOI: 10.1007/s00424-016-1860-3.
- ⑦ Ogasawara, R., Fujita, S., Hornberger, T., Kitaoka, Y., Makanae, Y., Nakazato, K. and Ishii, N. The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. *Scientific*

*Reports*, 6, 2016, 31142. 査読有, DOI: 10.1038/srep31142.

- ⑧ Nakada, S., Ogasawara, R., Kawada, S., Maekawa, T. and Ishii, N. Correlation between ribosome biogenesis and the magnitude of hypertrophy in overloaded skeletal muscle. *PLoS ONE*, 11(1), 2016, e047284. 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0147284.
- ⑨ Watanabe, Y., Tanimoto, M., Oba, N., Sanada, K., Miyachi, M. and Ishii, N. Effect of resistance training using body weight in the elderly: comparison of resistance exercise movement between slow and normal speed movement. *Geriatrics Gerontol. Int.*, 15, 2015, 1270-1277. 査読有, DOI: 10.1111/ggi.12427.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takaya Kotani, Junya Takegaki, Ryo Takagi, Arata Tsutaki, Koichi Nakazato, Naokata Ishii. Changes in ribosome content during early and middle period of resistance training in rat skeletal muscle. Interdisciplinary Symposium for Up-and-coming Material Scientists 2017, Osaka, Japan, June 8, 2017.
- ② Junya Takegaki, Riki Ogasawara, Arata Tsutaki, Koichi Nakazato, Naokata Ishii. High frequency resistance training does not cause skeletal muscle hypertrophy due to activation of proteolytic systems in rat skeletal muscle. Cell symposia: Exercise Metabolism. Gothenburg, Sweden, May 23, 2017.
- ③ Takaya Kotani, Junya Takegaki, Satoshi Nakada, Ryo Takagi, Arata Tsutaki, Koichi Nakazato, Naokata Ishii. Ribosome biogenesis is activated during the early period of resistance training in rat skeletal muscle. Experimental Biology 2017, Chicago, USA, April 25, 2017. 1.
- ④ Junya Takegaki, Takaya Kotani, Riki Ogasawara, Arata Tsutaki, Koichi Nakazato, Naokata Ishii. Resistance training with short interval between bouts does not induce skeletal muscle hypertrophy in rats. Experimental Biology 2017. Chicago, USA, April 25, 2017.
- ⑤ Takagi R, Ogasawara R, Takegaki J, Tsutaki A, Nakazato K, Ishii N. Fiber type-dependent differences in anabolic response of skeletal muscle to resistance exercise. The Integrative Biology of Exercise VII. Phoenix, USA, November 2-4, 2016.
- ⑥ Junya Takegaki, Yuki Arihara, Riki Ogasawara, Arata Tsutaki, Koichi Nakazato, Naokata Ishii. Repeated bouts of resistance training activate Akt-mTOR signaling, but not protein synthesis in mouse skeletal muscle. Experimental Biology 2016. San Diego, USA. April 4, 2016.

〔図書〕（計 2 件）

- ① 石井直方・肥田岳彦. 筋トレのための人体解剖図. 東京, 成美堂出版, 2017, 175
- ② Sasaki, K. and Ishii, N. Stiffness of Contracting Human Muscle Measured with Supersonic Shear Imaging. In “Muscle Contraction and Cell Motility: Fundamentals and Developments” (Sugi, H., ed.), 2016, Pan Stanford Publishing, Singapore, pp 207-231

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://wildlife.jpn.com/wildlife-consul/ishii/content/labo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 直方 (ISHII Naokata)  
東京大学・大学院総合文化研究科・教授  
研究者番号：20151326

### (2) 研究分担者

中里 浩一 (NAKAZATO Koichi)  
日本体育大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：00307993

### (3) 研究分担者

小笠原 理紀 (OGASAWARA Riki)  
名古屋工業大学・工学系研究科・准教授  
研究者番号：10634602