

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07423

研究課題名(和文)ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する応答の違いを利用した筋肉タイプ別萎縮抑制

研究課題名(英文) Muscle type-specific inhibition of atrophy using the differential response of muscle types to the protein synthetic stimulus of leucine

研究代表者

吉澤 史昭 (YOSHIZAWA, Fumiaki)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10269243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する応答は骨格筋の種類によって異なり、遅筋型線維を多く含む骨格筋は、速筋線維を多く含む骨格筋よりもロイシン刺激に応答したタンパク質合成亢進の程度は小さいが、低用量のロイシンに鋭敏に応答することが、ラットを用いた実験で示された。また、ロイシンの筋萎縮抑制作用を、デキサメタゾン誘導筋萎縮モデル動物を用いて評価したが、顕著な筋萎縮抑制作用は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：The findings from this study suggest that the protein synthetic response of rat skeletal muscle to leucine stimulation is different between muscle fiber types. It appears that skeletal muscles rich in slow fibers are more sensitive to leucine stimulation, but the magnitude of the acceleration of protein synthesis in these muscles is lower than that in muscles rich in fast fibers. We also investigated the inhibitory effects of leucine on muscle atrophy in a rat model of dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. Unfortunately, no significant inhibitory effects of leucine were observed in this model.

研究分野：栄養生化学

キーワード：ロイシン 骨格筋 筋肉タイプ タンパク質合成 mTOR

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸はタンパク質をはじめとする生体成分の材料になるばかりでなく、複雑な細胞内情報伝達系を制御して代謝を調節する調節因子として機能することが知られている。なかでも分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)は代謝を調節するシグナル因子として広く認識されており、食品科学分野のみならず基礎生命科学分野、さらに臨床医学分野でもその機能研究は活況を呈している。これまでに研究代表者は、分岐鎖アミノ酸、なかでも特にロイシンが mammalian target of rapamycin(mTOR)シグナル伝達系を介して翻訳開始を刺激して骨格筋のタンパク質合成を促進する機能と、タンパク質分解系を制御してタンパク質分解を抑制する機能を有すること、イソロイシンが骨格筋への糖の取り込みと全身の糖の酸化的利用を促進し、かつ肝臓での糖新生を抑制して、血糖値を低下させる機能を有することを明らかにした(総説:吉澤・バイオサイエンスとインダストリー, 67, 238-244 (2009), Yoshizawa, F. J. Pharmacol. Sci., 118, 149-155 (2012))。

我国は世界で屈指の平均寿命と健康寿命を誇る一方で、超高齢社会を迎えて、メタボリックシンドロームに由来する生活習慣病や高齢者のサルコペニア(加齢に伴う筋肉減弱症)等が大きな社会問題となっている。サルコペニアの原因ははっきりとは解明されていないが、他の疾患と同様に遺伝的要因と環境的要因が関連して引き起こされるものと考えられる。いずれの要因も結果的に骨格筋を構成する骨格筋タンパク質の合成と分解のアンバランスによって骨格筋タンパク質の減少を引き起こす。サルコペニアでは骨格筋タンパク質の分解よりもむしろ合成に問題があると考えられている。食餌摂取や筋収縮などによる骨格筋タンパク質合成の刺激に対して抵抗性を示すようになり、結果的に骨格筋タンパク質合成速度を若年者のように増加させることが出来なくなってくることによってサルコペニアが引き起こされると考えられている。これには加齢に伴う骨格筋タンパク質合成のインスリン抵抗性の関与が示唆されているが、アミノ酸の骨格筋タンパク質合成刺激作用は加齢の影響を受けないとされている。

サルコペニアでは、筋肉タイプ(筋線維タイプ)によって萎縮の度合いが異なることが知られており、特定の筋肉タイプの萎縮予防を目的とした運動療法が行われている。ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する応答が臓器間で異なることから(Yoshizawa, F. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 839-842 (2013))、ロイシンの刺激に対する感受性が高い骨格筋においても、筋肉タイプごとに感受性に違いがあることが予想される。実際、ラット骨格筋のマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析の結果、ロ

イシンの単回経口投与によって遅筋特異的遺伝子の発現が上昇するものの、速筋特異的な遺伝子の発現は変化しないことを突き止めている。

以上のような背景を基に、ロイシン刺激に対する筋肉タイプ(筋線維タイプ)ごとの感受性を明らかにし、ロイシンを筋萎縮抑制に効率的に活用するとの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、超高齢社会を迎えた我国において大きな社会問題になっている高齢者のサルコペニアの予防・改善に、ロイシンの筋タンパク質代謝改善作用を効率的に活用することを最終目的としている。サルコペニアでは筋肉タイプ(筋線維タイプ)によって萎縮の度合いが異なることが知られていることから、遅筋と速筋のロイシン刺激に対する感受性の違いとその原因を明確にし、ロイシン刺激に対する感受性の違いを利用した筋肉タイプ特異的な萎縮抑制の可能性を、筋萎縮モデル動物を用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する遅筋と速筋の感受性の相違の明確化

ロイシン刺激に対する骨格筋ごとの応答の相違の解析

ロイシンは、mTORシグナル伝達系を介して、翻訳開始調節因子である ribosomal protein S6 kinase (S6K1)と eukaryotic initiation factor (eIF) 4-binding protein 1 (4E-BP1)をリン酸化することでタンパク質合成を翻訳の開始段階で促進することが知られている。S6K1と4E-BP1のリン酸化状態は、刺激に対して鋭敏に応答して変化するため、これら2つの翻訳開始調節因子のリン酸化状態をタンパク質合成活性の指標にして、ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する遅筋と速筋の感受性の相違を調べた。

18時間絶食させた5週齢のWistar系雄性ラットを2群に分け、1群はそのまま屠殺して対照群とした。残りの1群には、ラットが1日に標準飼料(AIN93G)から摂取する量のロイシン(135mg/100g体重)を、蒸留水に懸濁して強制的に胃内投与し、1時間後に屠殺してロイシン群とした。筋線維組成の異なる5種類の後肢の骨格筋(長趾伸筋、足底筋、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋)を摘出して、S6K1と4E-BP1のリン酸化状態をウェスタンブロット法で解析した。

ロイシン投与量変化に伴う骨格筋ごとの応答の相違の解析

ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する遅筋と速筋の感受性の相違をより詳細に解析するために、絶食ラットに投与量を変えてロイシンを経口投与し、S6K1及び4E-BP1

のリン酸化の投与反応曲線を作成して、ロイシンに対する感受性を骨格筋ごとに評価した。

18 時間絶食にした 5 週齢の Wistar 系雄性ラットを 5 群に分け、1 群は何も投与せずそのまま屠殺して対照群とした。ラットが 1 日に標準飼料 (AIN93G) から摂取する量のロイシン (135mg/100g 体重) を基準 (100%) にして、4 群にはそれぞれ体重 100g 当たり 135mg (100%)、67.5mg (50%)、33.8mg (25%)、16.9mg (12.5%) のロイシンを強制胃内投与して、1 時間後に屠殺した。後肢から前記の 5 種類の骨格筋を摘出し、S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化状態をウェスタンブロット法で解析した。

(2) 遅筋と速筋におけるロイシンの「感知」の相違の明確化

本研究課題の申請時には、ロイシンセンサー分子として leucyl-tRNA synthetase (LRS) を想定していたが、その後ストレス応答タンパク質の Sestrin2 がロイシンセンサーであるとの報告がなされたため、Sestrin2 に注目して Sestrin2 の mRNA の発現量を qPCR 法で定量した。

(3) 筋萎縮モデル動物を用いたロイシンによる筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果の検証

若齢ラットを用いたデキサメタゾン誘導筋萎縮モデル動物作成の検討

合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンは、インスリン抵抗性を惹起して筋萎縮を誘導することから、筋萎縮モデル動物の作成に用いられている。デキサメタゾンに対する感受性は年齢によって異なり、高齢ラットは若齢ラットと比べてデキサメタゾンによって筋萎縮が誘導されやすいことが知られている。しかし、高齢ラットは、準備に手間や時間がかかり個体差も大きいことなどから、出来るだけ若いラットの方が実験に利用しやすい。そこで、まず若い成熟ラットのデキサメタゾンに対する感受性を評価した。

9 週齢と 10 週齢の Wistar 系雄性ラットの腹腔内にデキサメタゾンを毎日 1 回 5 日間投与して筋萎縮を誘導し、最後にデキサメタゾンを投与した翌日に屠殺し (屠殺時点では 10 週齢と 11 週齢) 5 種類の後肢の骨格筋 (長趾伸筋、足底筋、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋) を摘出し、重量を測定して筋萎縮を評価した。

デキサメタゾン誘導若齢筋萎縮モデルラットを用いたロイシンによる筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果の検証

筋萎縮が確認された週齢の筋萎縮モデルラットを用いて、ロイシンの筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果を検証した。6 時間の時間制限給餌に馴致した 8 週齢のラットを 3 群

に分け、1 群には給餌開始直前に蒸留水に懸濁したロイシン (135mg/100g 体重) を、2 群には蒸留水を強制的に経口投与し、14 日間飼育した。実験開始 9 日目から 5 日間、ロイシンを投与した群と蒸留水を投与した群のうちの 1 群の腹腔内にデキサメタゾンを投与して筋萎縮を誘導し、それぞれロイシン投与群、ロイシン非投与群とした。蒸留水を投与したもう 1 群には生理的食塩水を腹腔内投与して、ノーマル群とした。最終投与日の翌日に屠殺して (屠殺時 10 週齢) 前記の 5 種類の骨格筋の重量を測定した。6 時間の時間制限給餌を行ったのは、デキサメタゾンを投与した群の摂食量と投与しないノーマル群の摂食量を合わせるとともに、両群の絶食時間を同じにするためである。

4. 研究成果

(1) ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する遅筋と速筋の感受性の相違の明確化

ロイシン刺激に対する骨格筋ごとの応答の相違の解析

ロイシン群はロイシンを経口投与していない対照群と比べて、血清中ロイシン濃度が約 13 倍に有意に増加していたことから、経口投与したロイシンが血中に移行したことを確認した。

5 種類全ての後肢骨格筋中の S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化が、対照群と比較してロイシン群で有意に促進されていた。対照群の S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化レベル (リン酸化されている因子の割合) に対するロイシン群のそれぞれの因子のリン酸化レベルの割合を、ロイシン経口投与による S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化増加率として骨格筋ごとに評価した。

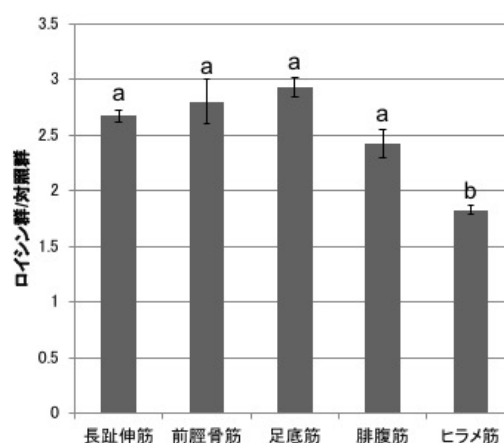


図 ロイシン経口投与による骨格筋ごとの S6K1 のリン酸化増加率

値はすべて平均値 ± 標準誤差で表示
異符号間で有意差あり (p<0.05)

ロイシン経口投与による S6K1(図)及び 4E-BP1 のリン酸化増加率は、ヒラメ筋が他の骨格筋に比べて低かった。これは、絶食時(対照群)のヒラメ筋の S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化レベルが他の骨格筋に比べて高いことに起因していた。ヒラメ筋は今回調べた 5 種類の骨格筋の中で、最も遅筋線維の割合が多い。このことから、ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対する応答は骨格筋の種類によって異なり、遅筋型線維を多く含む骨格筋は速筋線維を多く含む骨格筋よりもロイシン刺激に応答したタンパク質合成亢進の程度が小さいことが示唆された。

ロイシン投与量変化に伴う骨格筋ごとの応答の相違の解析

ロイシンの投与量増加に伴い S6K1 のリン酸化レベルは増加したが、その用量反応性は骨格筋の種類により異なっていた。速筋線維を多く含む長趾伸筋及び前脛骨筋は投与量依存的に応答して、ロイシンの投与用量がある一定以上に達するとリン酸化レベルはプラトーに達する飽和曲線的な用量反応性を示した。それに対して遅筋線維多く含むヒラメ筋と比較的遅筋線維の割合が多い足底筋は、ロイシンの投与用量がある一定の量を超えると鋭敏に応答するシグモイド曲線的な用量反応性を示した。腓腹筋はそれらの中間的な用量反応性を示した。50%効果用量(ED50)を求めると、ヒラメ筋はラットが 1 日に標準飼料(AIN93G)から摂取するロイシンの量の 30.5%、足底筋は 42.4%、長趾伸筋は 55.7%、腓腹筋は 80.5%、そして前脛骨筋は 237.0%であった。これらのことから、遅筋線維多く含む骨格筋ほど、低用量のロイシンに鋭敏に応答することが示された。

(2)遅筋と速筋におけるロイシンの「感知」の相違の明確化

最も発現量が少なかった前脛骨筋での Sestrin2 mRNA 発現量を基準として、各骨格筋での Sestrin2 mRNA 発現量を相対値で示すと、長趾伸筋で 11.38 ± 1.05 、足底筋で 4.72 ± 1.70 、腓腹筋で 4.86 ± 0.36 、そしてヒラメ筋で 10.17 ± 1.38 であった。

このように骨格筋の種類により Sestrin2 の mRNA の発現量は異なっており、ヒラメ筋及び長趾伸筋は他の組織に比べて Sestrin2 の mRNA 発現量が有意に多かった。Sestrin2 の mRNA 発現量は骨格筋の種類によって異なっていたが、筋線維組成と Sestrin2 の mRNA 発現量の間には一定の相関は見られなかった。Sestrin2 をウェスタンブロット法で定量するために用いる適切な抗 Sestrin2 抗体が入手できなかったため、本研究期間中に Sestrin2 のタンパク質量の定量はできなかった。ロイシンのタンパク質合成刺激に対する骨格筋ごとの感受性の違いを明確にするためには、ロイシンセンサー分子の定量が必須であると考え、引き続き Sestrin2 のタン

パク質量の定量に取り組んでいる。

(3)筋萎縮モデル動物を用いたロイシンによる筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果の検証

若齢ラットを用いたデキサメタゾン誘導筋萎縮モデル動物作成の検討

屠殺時 10 週齢、11 週齢のいずれのラットも、デキサメタゾン投与群ではデキサメタゾン投与 2 日後から体重の有意な減少が観察された。屠殺時には、どちらの週齢のラットも 5 種類の後肢の骨格筋(長趾伸筋、足底筋、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋)のうち、ヒラメ筋を除いた 4 種類の骨格筋の重量がデキサメタゾン投与によって有意に減少した。このように、若齢期のラットにおいてもデキサメタゾン投与によって筋萎縮が誘導されることが確認された。

デキサメタゾン誘導若齢筋萎縮モデルラットを用いたロイシンによる筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果の検証

筋萎縮が確認された(屠殺時)10 週齢の筋萎縮モデルラットを用いて、ロイシンの筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果を検証した。デキサメタゾンを投与しなかったノーマル群と比べてデキサメタゾンを投与したロイシン投与群及びロイシン非投与群で、ヒラメ筋を除いた 4 種類の骨格筋の重量が有意に減少した。しかし、ロイシン投与群及びロイシン非投与群のいずれの骨格筋の重量にも統計的に有意な差は見られなかった。ロイシンによる筋肉タイプ特異的な萎縮抑制効果を検証するためには、ロイシンの投与量や投与方法について、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

吉澤史昭、アミノ酸のシグナル分子としての代謝調節機能、食と医療、3 巻、2017、22-31

[学会発表](計 4 件)

高見有希、骨格筋タンパク質合成に対するロイシンとアルギニンの相互作用解析、第 71 回 日本栄養・食糧学会大会、2017 年

浜田敬太、ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対するラット後肢骨格筋の種類ごとの感度の相違、日本アミノ酸学会 10 周年記念大会、2016 年

佐藤より子、ロイシン投与が骨格筋と脂肪の遺伝子発現に及ぼす影響、日本アミノ酸学会 10 周年記念大会、2016 年

浜田敬太、ロイシンのタンパク質合成促進
刺激に対する後肢骨格筋の筋肉ごとの応
答の相違、日本アミノ酸学会第9回学術大
会、2015年

〔図書〕(計 1 件)

吉澤史昭 他、(株)シーエムシー出版、
食品機能性成分吸収・代謝、2018年、316
(64-73)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 史昭 (YOSHIZAWA, Fumiaki)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10269243