

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18176

研究課題名(和文) 骨格筋量増加に向けた朝食のタンパク質摂取の重要性と体内時計の関与に関する研究

研究課題名(英文) Influences of protein intake at early active phase on murine skeletal muscle volume

研究代表者

青山 晋也 (AOYAMA, Shinya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00757677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1日におけるタンパク質の偏り(朝食と夕食での摂取量の差)が骨格筋量の増加に及ぼす影響と体内時計との関連について検討した。マウスを1日2回食(活動期初期の餌を朝食と後期の餌を夕食と定義した)の条件で飼育した場合、朝食に多くのタンパク質を摂取したマウスでは、朝食と夕食で等量のタンパク質を摂取したマウスや夕食に多くのタンパク質を摂取したマウスに比べて筋量の増加がみられた。さらに体内時計の関与を司る時計遺伝子のClockに変異の入ったClock mutantマウスを用いて朝食におけるタンパク質摂取の影響を評価したところ、朝食における筋量増加作用はみられず、体内時計の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、1日の中でのタンパク質の摂取パターンと骨格筋量の関係を示す基礎的データとなり、今後ヒトの栄養を考える上で基礎的情報となり得る。特に本課題では朝食におけるタンパク質の重要性に着目している点から、若年者に多い朝食欠食を減らすための効果的なエビデンスであると考えられる。一方、高齢者に対しては、老化による歩行機能や運動機能の低下を抑える新たな手段として、タンパク質の摂取タイミングの重要性について説く可能性もみられた。

研究成果の概要(英文)：Meal distribution of protein throughout the day is usually skewed. However, its physiological implications are largely unknown. In this study, we evaluated that the timing-dependent effects of protein intake on skeletal muscle volume, using the two-meal-per-day-feeding model. The protein intake at the early active phase promoted skeletal muscle hypertrophy in mice. Its hypertrophic effect was not observed in Clock mutant mice. These data suggest that protein intake at breakfast could be better for the maintenance of skeletal muscle mass.

研究分野：食品科学

キーワード：タンパク質栄養 時計遺伝子 時間栄養学 筋肥大 分岐鎖アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食事からのタンパク質摂取は骨格筋において筋量の維持・増加に重要であることがこれまで数多く報告されている。ヒトは1日3回の食事を行うが、米国の食事調査によるとすべての世代においてタンパク質摂取量は朝食に少なく、そのほとんどは夕食から摂取していることが報告されている (USDA/NHANES, 2011)。近年、1日の中でのタンパク質摂取の偏りが運動機能や筋合成と関連する可能性を示した報告が増えてきている。例えば、タンパク質摂取が朝食から少なく、夕食から多い食事パターンの高齢者には、虚弱状態(老化に伴う恒常性維持機能低下:筋力や運動機能等の低下が見られる)であるヒトが多いことや (Bollwein et al., Nutrition Journal, 2013)、健康人を対象に夕食から多くのタンパク質を摂取させるヒトと朝・昼・夕食と均等にタンパク質を摂取させるヒトの筋合成能を調べたところ、夕食に多くのタンパク質を摂取するより、均等に摂取したヒトの方が筋合成速度が高いことが明らかとなっており (Mamerow et al., JN, 2015)、タンパク質の摂取は1日の総量だけでなく、朝・昼・夕食における配分も重要であると考えられ始めている。このように1日の中でのタンパク質の摂取パターンは筋量の増加に関わってくる事が示唆されているが、その作用機構についてはほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、筋量増加に対する朝食からのタンパク質摂取の重要性について体内時計の観点から明らかにするために、タンパク質の消化吸收機構、アミノ酸の骨格筋への取り込み、筋タンパク質合成機構まで、タンパク質を摂取してから筋合成に至るまでの過程における体内時計の関与を明らかにし、なぜ朝食に多くのタンパク質を摂取すれば筋量が増加しやすいのか、その作用機構を解き明かすための根本となる科学的エビデンスを蓄積することを目指す。

3. 研究の方法

実験(1) 朝食と夕食のタンパク質の摂取配分が筋量に及ぼす影響

本研究では、朝食と夕食におけるタンパク質の摂取配分の影響をマウスで評価するため、1日2食の時間制限給餌モデルを作成した。各食餌は活動期の前期と後期に2グラムずつ与え、活動期(暗期:マウスは夜行性のため、暗期のはじめを朝する)の前期に与える餌を朝食、活動期後期に与える餌を夕食とした。この飼育条件で朝食と夕食に含まれるタンパク質含量を変化させることで各食餌のタンパク質の影響を評価した。具体的には、朝食に多くのタンパク質を摂取する群(朝食20%カゼイン食・夕食3%カゼイン食)、朝食と夕食で均等にタンパク質を摂取する群(朝・夕食ともに11.5%カゼイン食)、夕食に多くのタンパク質を摂取する群(朝食3%カゼイン食・夕食20%カゼイン食)を用いて試験を行い、各群間の1日合計のタンパク質摂取量は揃えた。骨格筋量の増加を評価するため、本試験では協働筋切除術による代償性筋肥大モデルを用いた。処置後1週間後に足底筋を摘出し、筋重量にて筋量の増加を評価した。活動量の増減が筋量へ及ぼす影響も予想されるため、飼育期間中は赤外線エリアセンサーによる行動量の測定を行った。さらに、血中および筋中の各遊離アミノ酸レベル(HPLC)や遺伝子発現(Realtime-PCR)、タンパク質レベル(Western Blot)を調べるために、同様に1日2食の時間制限給餌で飼育後、4時間おきに計6回のサンプリングを行い、各パラメーターの日内変動を評価した。

実験(2) 朝食タンパク質摂取による筋量増加効果に及ぼす分岐鎖アミノ酸の関与について

実験(1)と同様に1日2食の時間制限給餌モデルを用いて、朝食と夕食における分岐鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)の摂取配分が筋量増加に及ぼす影響を評価した。ICRマウスを朝食に分岐鎖アミノ酸を多く摂取する群と夕食に多く摂取する群に分け飼育した。添加量はそれぞれ20%カゼイン食に含まれる分岐鎖アミノ酸相当量とし、分岐鎖アミノ酸を添加していない方には低タンパク質食を用いた。協働筋切除1週間後に筋湿重量を測定し、筋量増加効果を評価した。また、分岐鎖アミノ酸以外のアミノ酸の効果も評価するため、同様に20%カゼイン食に含まれる分岐鎖アミノ酸以外のアミノ酸を添加した餌を用いて、朝食と夕食における摂取配分が筋量に及ぼす影響を評価した。

実験(3) タンパク質や分岐鎖アミノ酸の摂取配分による筋量増加効果に対する体内時計(概日時計)の関与

時計遺伝子の一つであるClockに変異の入ったClock mutantマウスを用いて検証した。野生型マウスとClock mutantマウスをそれぞれ、上記同様1日2食の時間制限給餌モデルで飼育し、朝食高タンパク質群と夕食高タンパク質群の2群と、朝食高分岐鎖アミノ酸群と夕食高分岐鎖アミノ酸群の2群にそれぞれのマウスを分けた。評価項目は実験(2)と同様に協働筋切除による筋重量や、その増加率とした。

4. 研究成果

実験(1) 朝食と夕食のタンパク質の摂取配分が筋量に及ぼす影響

協働筋を切除していないSham処置の筋重量は朝食に多くのタンパク質を摂取する群、均等に摂取する群、夕食に多く摂取する群の3群間で差は認められなかった。協働筋切除を介した過負荷による筋量増加はすべての群において認められたものの、その値は朝食に多くのタンパク質

を摂取しているマウスでは他の群に比べ有意に大きかった ($P < 0.05$)。Sham 筋に対する肥大筋重量の割合 (増加率) でも同様に朝食に多くのタンパク質を摂取している群で有意に高かった。飼育期間中、各群の総行動量には差はなかった。次に、アミノ酸の吸収や骨格筋への取り込みに着目し、血中および筋中の遊離アミノ酸を測定したところ、血中および筋中ともに多くの必須アミノ酸においてタンパク質の摂取時に増加したが、摂取時刻による差は認められなかった。このことからタンパク質の消化吸収や骨格筋でのアミノ酸の取り込み能は朝食時と夕食時で大きな差がないと予想される。一方で、筋分化関連遺伝子である *Myog* や *Myf5*、筋合成に関わる *Igf1* の遺伝子発現量は朝食に高タンパク質を摂取しているマウスの肥大筋では活動期にピークがみられる日内変動がみられたが、夕食に高タンパク質を摂取しているマウスの肥大筋では、そのような変動はみられず、発現量も低い傾向を示した。時計遺伝子 (*Per2* や *Bmal1*) の発現パターンには大きな違いは認められなかった。さらに、オートファジーのマーカの一つである LC3B-II のタンパク質レベルについて検討を実施したところ、LC3B-II レベルは肥大させた筋肉において増加し、夕食に多くのタンパク質を摂取しているマウスでは、朝食に摂取しているマウスに比べてその増加が抑制されており、オートファジーの抑制の可能性がみられた。

実験(2) 朝食タンパク質摂取による筋量増加効果に及ぼす分岐鎖アミノ酸の関与について

実験(1)と同様に筋肥大を誘導していない Sham 肢の筋重量には分岐鎖アミノ酸の摂取配分の影響は見られなかったが、朝食における分岐鎖アミノ酸の摂取は夕食における分岐鎖アミノ酸摂取と比べて、有意に筋量増加を高め、実験(1)と同様の結果が分岐鎖アミノ酸を用いた実験でも得られた。一方で、分岐鎖アミノ酸以外のアミノ酸 (カゼインに含まれるもの) を添加した餌では、協働筋切除による筋量増加は認められるが、朝食と夕食の摂取配分による影響はみられなかった。このことは、朝食と夕食のタンパク質の摂取配分による筋量への影響には分岐鎖アミノ酸が関与している可能性が示唆された。

実験(3) タンパク質や分岐鎖アミノ酸の摂取配分による筋量増加効果に対する体内時計 (概日時計) の関与

野生型のマウスでは朝食のタンパク質摂取による筋量増加効果が認められたが、*Clock mutant* マウスでは過負荷による筋肥大はみられるが、摂取配分による差は認められなかった。同様の結果が、分岐鎖アミノ酸添加食を用いた実験でも明らかとなり、朝食のタンパク質や分岐鎖アミノ酸の摂取による筋量増加効果には時計遺伝子 *Clock* が関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、朝食と夕食のタンパク質の摂取パターンが骨格筋量の増加に関わることが明らかとなり、タンパク質に含まれるアミノ酸の中でも分岐鎖アミノ酸が重要な役割を果たす可能性が示された。また、時計遺伝子 *Clock* の変異マウスでは朝食と夕食における摂取配分の影響はみられないことから、時計遺伝子によって調節される何らかの生体リズムがこれら朝食タンパク質の筋量増加効果に関わっている可能性がある。今後、時計遺伝子がどのような因子に作用することで朝食のタンパク質摂取による筋量増加効果を発揮しているかを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aoyama Shinya, Kojima Shuichi, Sasaki Keisuke, Ishikawa Ryosuke, Tanaka Mizuho, Shimoda Takeru, Hattori Yuta, Aoki Natsumi, Takahashi Kengo, Hirooka Rina, Takizawa Miku, Haraguchi Atsushi, Shibata Shigenobu	4. 巻 37
2. 論文標題 Day-Night Oscillation of Atrogin1 and Timing-Dependent Preventive Effect of Weight-Bearing on Muscle Atrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 499 ~ 508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.10.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Masaki, Ozaki Mamiho, Kang Moon-Il, Sasaki Hiroyuki, Fukazawa Mayuko, Iwakami Tamao, Lim Pei, Kim Hyeon-Ki, Aoyama Shinya, Shibata Shigenobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Meal Timing on Postprandial Glucose Metabolism and Blood Metabolites in Healthy Adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/nu10111763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Shinya, Shibata Shigenobu	4. 巻 7
2. 論文標題 Time-of-Day-Dependent Physiological Responses to Meal and Exercise	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnut.2020.00018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Shinya, Hirooka Rina, Shimoda Takeru, Shibata Shigenobu	4. 巻 20
2. 論文標題 Effect of different sources of dietary protein on muscle hypertrophy in functionally overloaded mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100686 ~ 100686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoyama Shinya, Kojima Shuichi, Sasaki Keisuke, Shimoda Takeru, Takahashi Kengo, Hirooka Rina, Tahara Yu, Shibata Shigenobu	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of day-time feeding on murine skeletal muscle growth and synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism	6. 最初と最後の頁 100099 ~ 100099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jnim.2019.100099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 青山晋也	4. 巻 12
2. 論文標題 筋機能や骨機能の概日制御と食・運動による調節作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食と医療	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 青山晋也	4. 巻 62
2. 論文標題 体内時計を意識した食事の時間と配分の重要性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本栄養士会雑誌	6. 最初と最後の頁 402 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shinya Aoyama
2. 発表標題 Control of skeletal muscle mass by timing of nutrition and exercise.
3. 学会等名 Health Promotion through Food Science, Chrono-nutrition and Sports Science -From basic to applied research- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinya Aoyama
2. 発表標題 Meal Distribution of Dietary Protein Influences Muscle Mass
3. 学会等名 20th German-Japanese Joint Symposium on Life and Medical Sciences: Interdisciplinary Research for Ageing Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋健吾, 青山晋也, 廣岡里奈, 佐々木啓佑, 下田武尊, 柴田重信
2. 発表標題 運動のタイミングがマウス筋タンパク質合成に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山晋也, 佐々木啓介, 下田武尊, 廣岡里奈, 高橋健吾, 滝澤美紅, 柴田重信
2. 発表標題 体内時計による筋タンパク質分解制御とリハビリのタイミングが筋萎縮に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山晋也, 下田武尊, 小島修一, 佐々木啓佑, 廣岡里菜, 高橋健吾, 柴田重信
2. 発表標題 タンパク質摂取パターンによる筋肥大制御機構の解明
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣岡里菜, 青山晋也, 高橋健吾, 下田武遵, 小島修一, 佐々木啓佑, 柴田重信
2. 発表標題 絶食・給餌のタイミングが筋タンパク合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山晋也, 廣岡里菜, 高橋健吾, 田原優, 篠原一之, 柴田重信
2. 発表標題 1日におけるタンパク質の摂取配分は骨格筋の肥大に影響する
3. 学会等名 西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Aoyama, Shuichi Kojima, Keisuke Sasaki, Takeru Shimoda, Kengo Takahashi, Rina Hirooka, Yu Tahara, Kazuyuki Shinohara, Shigenobu Shibata
2. 発表標題 摂取時刻が筋肥大や筋合成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考