

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05501

研究課題名(和文) アルギニンのタンパク質合成促進シグナル分子としての機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of arginine as a signaling molecule to stimulate protein synthesis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋をターゲット組織と定めてアルギニンのシグナル分子としてのタンパク質合成調節機能を明らかにすることを目的とした。アルギニンは骨格筋においてmTORC1を活性化することがマウスを用いた動物実験で示唆された。また、C2C12筋管細胞を用いた実験で、アルギニンのタンパク質合成促進作用はmTORC1経路を介することが示唆された。さらに、アルギニンの代謝過程で生じるオルニチンおよびシトルリン、アルギニンから一酸化窒素合成酵素によって産生される一酸化窒素は、アルギニンのタンパク質合成促進作用に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルギニンは、代謝産物である一酸化窒素を介して、成長ホルモンの分泌促進、免疫機能の向上、脂肪代謝の促進など、生体内で種々の作用に関与していることが知られている。さらに、近年アルギニンがタンパク質合成を促進する作用をもつ可能性が示され、運動時のサプリメント等に広く利用されている。しかし、アルギニンの骨格筋タンパク質合成に対する作用を調べた研究は殆どなく、本研究の成果は栄養素によるタンパク質代謝調節に関する基礎研究のみならず、サプリメントや栄養剤等の開発に関する応用研究にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the regulatory role of arginine as a signaling molecule to stimulate protein synthesis in skeletal muscle. Mice experiments suggested that arginine activated mTORC1 in skeletal muscle. In addition, the results obtained from experiments using C2C12 myotubular cells suggested that the stimulating effect of arginine on protein synthesis was mediated by the mTORC1 pathway. The effects of ornithine and citrulline, which were produced during arginine metabolism, on protein synthesis were also examined using C2C12 myotubular cells, but their involvement was not confirmed. Furthermore, nitric oxide, produced from arginine by nitric oxide synthase, was also suggested not to be involved in arginine-induced increases in protein synthesis.

研究分野：栄養生化学

キーワード：アルギニン タンパク質合成 骨格筋 C2C12細胞 S6K1 4E-BP1 mTOR CASTOR1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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単なる材料として認識されがちであるが、細胞内や血漿などに遊離した形で存在するわずかなアミノ酸が、それぞれ独自の生理機能をもって膨大な役割を担っていることが明らかとなり、アミノ酸がもつ個性が注目されている。ある種のアミノ酸は、内分泌系シグナルを共有して生体調節に深く関与するシグナル分子として機能している。なかでも不可欠アミノ酸(必須アミノ酸)である分岐鎖アミノ酸(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分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。一方、不可欠アミノ酸のうち、その生理機能が最も注目されているアミノ酸のひとつがアルギニンである。新生児では、アルギニン合成経路に含まれるすべての酵素量が十分ではないため、条件付き不可欠アミノ酸と見なされている。アルギニンは、代謝産物である一酸化窒素(NO)を介して、成長ホルモンの分泌促進、免疫機能の向上、脂肪代謝の促進など、生体内で種々の作用に関与していることが知られている。研究代表者らは、分岐鎖アミノ酸のタンパク質代謝調節作用、特にタンパク質合成調節作用について長年研究を行ってきたが、その過程でアルギニンがNOを介さずに直接タンパク質合成を促進する機能をもつ可能性が培養筋管細胞を用いた実験で示された。こうした中、2016年に米国の研究グループが、アルギニン依存性のmTORC1(栄養の供給および増殖因子のシグナル伝達にตอบสนองして細胞増殖を制御するタンパク質複合体)の活性化に重要なアルギニンセンサーとして、それまで特性不明のタンパク質を同定した。このことは、アルギニン自身がシグナル分子として機能していることを示唆している。

2. 研究の目的

幼若期の哺乳類では、生体内での生合成速度が十分でないために条件付き不可欠アミノ酸と見なされているアルギニンは、様々な生理機能をもつことが多くの研究で示されているが、その多くが代謝産物である一酸化窒素を介して発揮される機能であり、アルギニン自身のシグナル分子としての機能は明らかではない。研究代表者らは、培養筋管細胞を用いた予備検討で、アルギニン自身がタンパク質合成を促進するシグナル分子として機能する可能性を示す知見を得た。また、アルギニンがアルギニンセンサーであるCASTOR1により特異的に検知されることが報告された。これらの状況証拠を基に、分岐鎖アミノ酸のシグナル分子としての機能解析研究を通してこれまでに培ってきたノウハウを応用して、骨格筋をターゲット組織と定めてアルギニンのシグナル分子としてのタンパク質合成調節機能を明らかにすることを最終目的として実施した。

3. 研究の方法

アルギニンの骨格筋タンパク質合成促進作用の確認とその作用機序の明確化

マウス由来筋芽細胞(C2C12細胞)を筋管に分化させた後(以下C2C12筋管細胞)、アミノ酸不含培地で4時間培養して実験に供した。以下の実験1~3において、細胞を回収した後、タンパク質合成活性の指標として、mTORC1の下流標的でタンパク質合成の翻訳開始段階を調節するribosomal protein S6 kinase beta-1(S6K1)およびeukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1(4E-BP1)のリン酸化状態(いずれのリン酸化度もタンパク質合成活性と正の相関がある)を、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

【実験1】アルギニン、ロイシン、ヒスチジン、アラニン、あるいはリジンを5mMになるように添加して、30分間培養した後にS6K1および4E-BP1のリン酸化状態を解析した。

【実験2】添加するアルギニン、またはロイシンの濃度を0.2-10mMで変化させて30分間培養し、用量反応性を比較した。

【実験3】アルギニン、またはロイシンを5mMになるように添加し、培養する時間を変えて、経時変化を比較評価した。

ロイシンのタンパク質合成促進作用との比較および相互作用の明確化

ラットを用いたin vivo評価系(実験4)で、ロイシンおよびアルギニンのタンパク質合成促進刺激に対する応答感度を骨格筋タイプ毎に評価した。また、培養細胞を用いたin vitro評価系(実験5)で、アルギニンとロイシンの相互作用について調べた。

【実験4】5週齢のWistar系雄性ラットを18時間絶食させた後、蒸留水に懸濁したアルギニン(L-Arg HCl)を体重100g当たり135mg、あるいはその1/2、1/4、1/8量を経口投与して1時間後に屠殺した。後肢から長趾伸筋、前脛骨筋、足底筋、腓腹筋、ヒラメ筋を摘出して、アルギニン投与量の変化に伴うタンパク質合成活性の変化を、S6K1と4E-BP1のリン酸化レベルを指標として評価した。また、アルギニンの代り

にロイシン(L-Leu)を投与した同様の実験を行なった。

- 【実験5】C2C12 筋管細胞をアミノ酸不含培地で4時間培養して実験に供した。アルギニン(5mM)、ロイシン(5mM)、ロイシン(5mM)+アルギニン(5mM)、ロイシン(5mM)+ヒスチジン(5mM)を添加して30分間培養して、その作用を比較した。

in vivo の骨格筋におけるアルギニンのシグナル分子としての作用の明確化

ラットを用いた in vivo 評価系(実験4)で、アルギニンのタンパク質合成促進作用が確認できなかったため、実験動物をラットからマウスに変更し、アルギニンの投与方法も経口投与から腹腔内投与に変更してアルギニンのタンパク質合成促進作用を in vivo 評価系で再検証した(実験6、実験7)。さらに、アルギニンセンサーと考えられている CASTOR1 の後肢筋での発現を調べた(実験8)。また、動物実験と並行して培養細胞を用いて、アルギニンによるタンパク質合成促進作用のシグナル伝達経路の探索を行った(実験9~11)。

- 【実験6】6週齢のICR系雄性マウスを18時間絶食させた後、生理食塩水に溶解したアルギニンを体重100g当たり80mg、あるいは160mg腹腔内投与(対照群には生理食塩水を投与)して1時間後に屠殺し、後肢から腓腹筋と前脛骨筋を摘出して、S6K1のリン酸化状態を指標としてタンパク質合成活性の変化を評価した。
- 【実験7】6週齢のICR系雄性マウスを18時間絶食させた後、生理食塩水に溶解したアルギニンを体重100g当たり80mg、あるいは160mg腹腔内投与(対照群には生理食塩水を投与)した。30分後に、PBSに溶解したピューロマイシンを体重100g当たり4 μ mol腹腔内投与した。30分後に屠殺し、直ちに後肢から腓腹筋を摘出して液体窒素中で急速冷凍してタンパク質合成速度測定用のサンプルとした。タンパク質合成速度は、抗ピューロマイシン抗体を用いたウェスタンブロット法で、30分間に新規合成されるタンパク質に取り込まれたピューロマイシン量を測定するSurface Sensing of Translation (SUnSET)法で評価した。
- 【実験8】アルギニンセンサーと考えられているCASTOR1の遺伝子およびタンパク質のマウス後肢骨格筋(腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋)での発現を調べた。
- 【実験9】アルギニンのタンパク質合成促進作用は、mTORC1シグナル伝達経路を介して発現するのかを、mTORC1阻害剤であるラパマイシンを用いて調べた。C2C12筋管細胞をアミノ酸不含培地で3時間培養して実験に供した。ラパマイシン(10nM)でC2C12筋管細胞を1時間処理した後、アルギニンを5mMになるように添加して15分後に細胞を回収した。回収した細胞のS6K1のリン酸化状態を、ウェスタンブロット法を用いて解析してタンパク質合成活性の指標とした。
- 【実験10】AKT経路、ERK経路、AMPKのmTORC1活性化への関与についても、これらのリン酸化状態の変化を指標に調べた。C2C12筋管細胞をアミノ酸不含培地で4時間培養後、アルギニンを10mMになるように添加して15分後に細胞を回収した。回収した細胞のAKT、ERKおよびAMPKのリン酸化状態を、ウェスタンブロット法を用いて解析した。
- 【実験11】アルギニンのタンパク質合成促進作用は、ERK経路を介して発現するのかを、ERK1/2の阻害剤であるSCH772984を用いて調べた。C2C12筋管細胞をアミノ酸不含培地で3時間培養後、SCH772984(1 μ M)で1時間処理した。その後、アルギニンを5mMになるように添加して15分後に細胞を回収した。回収した細胞のS6K1のリン酸化状態を、ウェスタンブロット法を用いて解析してタンパク質合成活性の指標とした。
- 【実験12】アルギニンの代謝過程で生じるオルニチンとシトルリンがタンパク質合成に与える影響を調べた。C2C12筋管細胞をアミノ酸不含培地で4時間培養した後、アルギニン、シトルリン、あるいはオルニチンを5mMになるように添加して15分後に細胞を回収し、S6K1のリン酸化状態を、ウェスタンブロット法を用いて解析してタンパク質合成活性の指標とした。
- 【実験13】アルギニンは、一酸化窒素合成酵素(NOS)によって一酸化窒素(NO)を産生することが知られている。本実験ではNOS阻害剤であるL-NMMAを用いて、アルギニンのタンパク質合成促進作用にNOが関与するのかを調べた。C2C12筋管細胞をアミノ酸不含培地で3時間培養した後、L-NMMAを0.1-2mMになるように添加し、さらに1時間培養した。その後、アルギニンを10mMになるように添加して15分後に細胞を回収し、S6K1のリン酸化状態を、ウェスタンブロット法を用いて解析してタンパク質合成活性の指標とした。

4. 研究成果

アルギニンの骨格筋タンパク質合成促進作用の確認とその作用機序の明確化

C2C12筋管細胞を用いてアルギニン、ロイシン、ヒスチジン、アラニン、あるいはリジン処理によるS6K1および4E-BP1のリン酸化状態の変化を調べたところ(実験1)、アルギニンおよびロイシン処理によってリン酸化が顕著に増加した。次に、アルギニン、またはロイシンの濃度を変えて30分間(実験2)、あるいは時間を変えて処理し(実験3)、用量反応性および経時変化を比較評価した。その結果、S6K1および4E-BP1のリン酸化は、アルギニンおよびロ

イシン処理によって濃度依存的に増加した。また、15～30 分間の処理でリン酸化がピークに達した。

以上の結果から、アルギニンは S6K1 および 4E-BP1 のリン酸化を促進することで骨格筋のタンパク質合成を促進する作用を有すること、また、アルギニンの作用には濃度依存性があり、作用は急性的であることが示唆された。

ロイシンのタンパク質合成促進作用との比較および相互作用の明確化

ラットを用いた *in vivo* 評価系 (実験 4) で、ロイシンおよびアルギニンのタンパク質合成促進刺激に対する応答感度を骨格筋タイプ毎に評価した。その結果、全ての後肢骨格筋でロイシンの投与量増加に伴い S6K1 および 4E-BP1 のリン酸化レベルが増加したが、その用量反応性は遅筋線維を多く含むヒラメ筋とその他の骨格筋で異なっていた。一方、アルギニンを投与した場合は、何れの骨格筋においても S6K1 および 4E-BP1 のリン酸化レベルの増加は観察されなかった。そのため、ロイシンとアルギニンの相互作用の *in vivo* 評価系での検証は行わず、C2C12 筋管細胞を用いた *in vitro* 評価系で検証した (実験 5)。その結果、ロイシン+アルギニン処理で、ロイシン処理よりも S6K1 および 4E-BP1 のリン酸化が亢進したことから、アルギニンはロイシンと相加的、あるいは相乗的な作用を示す可能性が示唆された。

in vivo の骨格筋におけるアルギニンのシグナル分子としての作用の明確化

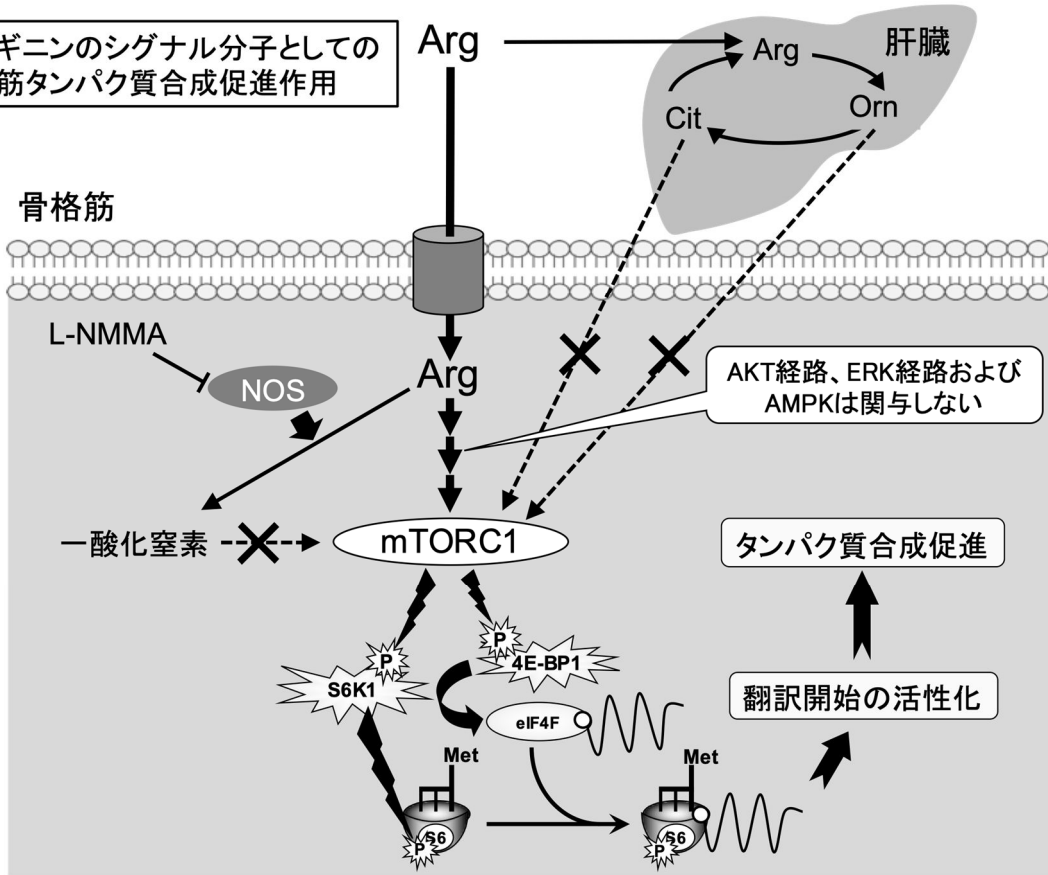
ラットにアルギニンを経口投与した実験 (実験 4) では、アルギニンのタンパク質合成促進作用は確認できなかったが、実験動物をラットからマウスに、アルギニンの投与方法を経口投与から腹腔内投与に変更したところ (実験 6)、アルギニン投与によって腓腹筋と前脛骨筋のいずれでも S6K1 のリン酸化が有意に増加し、アルギニンがタンパク質合成を促進する作用を有することが *in vivo* で示された。しかし、SUnSET 法で評価したタンパク質合成速度は、アルギニン投与で変化しなかった (実験 7)。これらの結果から、アルギニンは mTORC1 シグナル伝達経路を活性化するが、タンパク質合成速度を SUnSET 法で検出可能な程度まで増加させる能力はないものと考えられる。

続いて、アルギニンセンサーと考えられている CASTOR1 の遺伝子およびタンパク質の後肢骨格筋での発現を調べた (実験 8)。その結果、腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋で CASTOR1 遺伝子の発現が確認されたが、タンパク質は検出できなかった。タンパク質発現と遺伝子発現の違いは、ウェスタンブロットによるタンパク質の検出感度と RT-PCR による遺伝子発現の検出感度が異なることに起因すると考えられるが、いずれにせよ骨格筋での CASTOR1 の発現量は非常に少ないと考えられる。

動物実験と並行して C2C12 筋管細胞を用いて、アルギニンによるタンパク質合成促進作用のシグナル伝達経路の探索を行った。C2C12 筋管細胞を mTORC1 阻害剤で処理するとアルギニンによる S6K1 のリン酸化の増加が消失したことから、アルギニンのタンパク質合成促進作用は mTORC1 経路を介することが示唆された (実験 9)。次に、AKT 経路、ERK 経路、AMPK の mTORC1 活性化への関与について調べたところ、アルギニン処理により AKT、AMPK のリン酸化状態は変化しなかったが、ERK1/2 のリン酸化が有意に増加したことから、ERK 経路の関与が示唆された (実験 10)。そこで、ERK1/2 の阻害剤で処理したところ、アルギニンによる ERK1/2 のリン酸化の増加は阻害されたが、S6K1 のリン酸化状態は影響を受けなかった (実験 11)。以上のことから、アルギニンのタンパク質合成促進作用に AKT 経路、ERK 経路および AMPK は関与しないことが示唆された。

アルギニンの代謝過程で生じるオルニチンおよびシトルリンがタンパク質合成に与える影響についても C2C12 筋管細胞を用いて調べたが、シトルリンおよびオルニチン処理では S6K1 のリン酸化の上昇が観察されなかったことから、アルギニンのタンパク質合成促進作用は、アルギニンの代謝物によるものではないことが示唆された (実験 12)。また、アルギニンから産生される NO の関与について、NO 合成酵素の阻害剤を用いて調べた結果、NO は関与しないことが示唆された (実験 13)。

アルギニンのシグナル分子としての骨格筋タンパク質合成促進作用



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木大輔、高見有希、佐藤祐介、豊島由香、吉澤史昭
2. 発表標題 マウスを用いたアルギニンの骨格筋タンパク質合成促進作用の評価
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼尾 圭一郎、Obeng Amuzuah Kodwo、牛尾 円、佐藤 祐介、吉澤 史昭
2. 発表標題 ロイシンのタンパク質合成促進刺激に対するラット骨格筋の応答と骨格筋におけるロイシンセンサー発現量との関係
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉澤史昭、高見有希、沼尾圭一郎、Obeng Kodwo、安宅なるみ、佐藤祐介
2. 発表標題 アルギニンの骨格筋タンパク質合成促進作用の解析
3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------