

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06369

研究課題名(和文) 栄養生理学的手法によるmTORを介した鶏骨格筋量の制御

研究課題名(英文) Regulation of mTOR in chicken skeletal muscle by nutritional and physiological conditions

研究代表者

中島 一喜 (Nakashima, Kazuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：70370583

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)：本研究は、鶏培養骨格筋細胞ならびに肉用鶏ヒナを用いて、ホルモン、成長因子ならびに栄養素がmTOR complex 1ならびに2 (mTORC1・mTORC2) 活性に及ぼす影響を調べた。その結果、インスリン、IGF-I、アミノ酸ならびにクロロゲン酸よりmTORC1活性は促進し、インスリンならびにIGF-IはmTORC2活性も促進した。また、タンパク質栄養によりmTORC1活性は制御されており、特に、アルギニンがmTORC1活性を促進し、鶏骨格筋タンパク質代謝に影響を及ぼすことが明らかになった。以上の結果は、鶏骨格筋において、mTORC1ならびにmTORC2の制御因子は異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、鶏骨格筋においてmTORを栄養生理学的に制御し、骨格筋量の増加の可能性を検討することを目的とし、栄養生理学的手法で鶏骨格筋のmTORを活性化することは可能であり、特に、アミノ酸(アルギニン)でmTORならびにタンパク質代謝が制御されていることを明らかにした学術的意義は大きい。また、家畜飼養の観点から、飼料中タンパク質含量の改変によるmTORを介した鶏骨格筋タンパク質代謝の制御が可能であり、鶏肉生産の増加への貢献が見込まれることから社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mTOR is a central regulator of protein metabolism in cells. mTOR kinase assembles into two distinct complexes, mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2) which differ in their composition, substrates, functions. Skeletal muscle mass is maintained by the balance between the rate of protein synthesis and protein degradation. Protein synthesis in skeletal muscle is crucially controlled by mTOR signaling. However, in chicken skeletal muscles, the regulation of mTOR signaling by hormones, growth factors and nutrients remains unclear. Here, we showed that mTORC1 was stimulated by insulin, IGF-I, amino acids and chlorogenic acid, on the other hand, mTORC2 is stimulated by insulin and IGF-I but not the other nutrients in chick skeletal muscle cultures. mTORC1 but not mTORC2 was also stimulated by arginine and lysine. These results indicate that mTORC1 and mTORC2 is differently regulated by hormones, growth factors and nutrients in chicken skeletal muscles.

研究分野：家畜栄養生化学

キーワード：mTORC1 mTORC2 骨格筋 鶏 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

畜産における最大の目的はタンパク質の生産であり、正味のタンパク質生産量はタンパク質の合成量と分解量の差である。骨格筋におけるタンパク質合成と分解の制御が可能になれば、正味のタンパク質生産量が増加し、効率的な食肉生産技術の開発につながる。したがって、骨格筋のタンパク質の合成と分解の制御機構を明らかにすることは、畜産において極めて重要な研究である。しかしながら、これまで、骨格筋におけるタンパク質代謝の研究は、タンパク質合成ならびに分解について、それぞれ独立した制御機構について検討されてきた。

Mechanistic target of rapamycin (mTOR)は、セリン・スレオニンプロテインキナーゼで、タンパク質合成の翻訳段階に関与する p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K)ならびに eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP)をリン酸化し、タンパク質合成を促進する。また、インスリン、IGF-I などの成長因子により、mTOR 活性は増加し、アミノ酸、特にロイシンでも mTOR 活性は増加する。

mTOR は mTORC1 (mTOR Complex 1)ならびに mTORC2 (mTOR Complex 2)の2種類のシグナル複合体が存在し、タンパク質合成促進には、mTORC1 が関与し、タンパク質分解抑制には mTORC1 と mTORC2 が関与していると考えられるが、骨格筋におけるタンパク質代謝に対する mTORC1 と mTORC2 の制御機構の違いについては、十分に明らかにされていない。また、骨格筋のタンパク質代謝に対する mTORC1 と mTORC2 の栄養生理学的制御の違いについても十分に検討されていない。

申請者は、骨格筋タンパク質分解に対しては両複合体とも関与していることを明らかにしている[1]。タンパク質分解経路の一つであるオートファジーも mTOR により制御されていることが明らかにされているが、申請者らは、鶏培養骨格筋細胞を用いて、mTOR がオートファジーと同時に、もう一つのタンパク質分解経路のエピキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 発現にも関与していることを明らかにした[1]。これらのことから、mTOR を栄養生理学的に制御することにより、鶏骨格筋のタンパク質合成促進ならびに分解抑制を同時に調節でき、骨格筋量を増加させることが可能であると本研究課題の着想に至った。

畜産分野における mTOR の制御をターゲットにした研究は少なく、特に、これら2つの複合体の調節の違いによる骨格筋タンパク質代謝制御による食肉生産の増加の可能性を明らかにすることは、重要な研究課題である。

2. 研究の目的

本研究は、mTORC1 ならびに mTORC2 の両方を栄養生理学的に制御し、鶏骨格筋のタンパク質代謝の同化作用を誘発し、骨格筋量の増加を目指すものであり、独自性と創造性を兼ね備えた研究である。そこで、鶏骨格筋において、栄養生理学的手法による mTORC1 ならびに mTORC2 を介したタンパク質代謝制御機構を解明し、これらの知見の鶏肉生産への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鶏培養骨格筋細胞の mTORC1 ならびに mTORC2 活性を制御する因子(ホルモン・成長因子・栄養素)の検索

これまで mTOR は、インスリン、IGF-I、アミノ酸により活性化されることが明らかにされている。申請者は、鶏培養骨格筋細胞を用いて、インスリン、IGF-I、アミノ酸が鶏骨格筋のタンパク質分解(オートファジーならびにエピキチン-プロテアソーム系)を抑制することを明らかにした[2]。しかしながら、鶏骨格筋において mTOR 制御機構については十分に検討されていない。そこで、鶏骨格筋において、mTOR を制御する因子について、ホルモン、成長因子ならびに栄養素が mTOR 活性にどのような影響を及ぼすのかを鶏培養骨格筋細胞を用いて検討した。

鶏骨格筋細胞は、鶏胚の大腿筋から採取した筋芽細胞を7日間培養し、筋管を形成させた。この細胞をインスリン、IGF-I を添加した培地、アミノ混合物添加培地、ビタミン混合物添加培地、グルコース添加培地、クロロゲン酸添加培地ならびに脂肪酸を添加した培地で培養した。mTORC1 ならびに mTORC2 のそれぞれの活性測定は、mTOR の標的タンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法により調べることが可能である。そこで、mTORC1 活性として、S6K1 と下流のタンパク質である S6 ribosomal protein (S6)および 4E-BP1 のリン酸化を調べ、mTORC2 活性としては、AKT と下流のタンパク質である Glycogen synthase kinase 3 (GSK3)のリン酸化を調べた。また、タンパク質合成を puromycin を用いた surface sensing of translation method (SUnSET 法)で測定した。また、タンパク質分解の指標として、エピキチン-プロテアソーム系の律速酵素である筋特異的エピキチンリガーゼのアトロジン-1 遺伝子発現ならびにオートファジーの指標である LC3 タンパク質の脂質化(LC3-II 量)を測定した。

(2) 鶏骨格筋における mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対するエネルギーならびにタンパク代謝の影響

鶏骨格筋において mTOR と代謝制御の関係については十分に検討されていない。そこで、鶏骨格筋において、mTOR 活性に対するエネルギー代謝とタンパク質代謝の関係を *in vitro* で調べるため、鶏培養骨格筋細胞を用いて検討した。また、肉用鶏ヒナの骨格筋の mTOR 活性に対するエネルギーとタンパク質代謝の影響を調べるため、飼料中エネルギーとタンパク質含量のことなる飼料の給与実験を行った。

鶏骨格筋細胞は、鶏胚の大腿筋から採取した筋芽細胞を7日間培養し、筋管を形成させた。この細胞に対するエネルギー代謝の影響を検討するため、細胞内エネルギー枯渇で活性化する AMP-activated Protein Kinase (AMPK) 活性を促進する 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) を添加した培地ならびにエネルギーとタンパク質代謝の両方の影響を検討するため無血清培地で培養した。

次に、肉用鶏(ブロイラーヒナ)に低エネルギー飼料または低タンパク質飼料を給与した飼養試験を行った。試験終了後、浅胸筋を採取し、mTORC1 ならびに mTORC2 のそれぞれの活性測定は、mTOR の標的タンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法にて測定した。また、血中アミノ酸濃度を HPLC を用いて測定した。

(3) 鶏骨格筋における mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対するアルギニンならびにリジンの影響

鶏骨格筋の mTOR 活性に対するアルギニンとリジンの影響を調べるため、鶏培養骨格筋細胞を用いて検討した。また、肉用鶏の骨格筋の mTOR 活性に対するアルギニンとリジンの影響を調べるため、飼料中リジン含量を変化させた飼料を給与した飼養実験を行った。

鶏骨格筋細胞は、鶏胚の大腿筋から採取した筋芽細胞を7日間培養し、筋管を形成させた。この細胞をアルギニンまたはリジン無添加または添加培地で培養した。

次に、肉用鶏(ブロイラーヒナ)に3水準の飼料中リジン含量を変化させた飼料を給与した飼養試験を行った。試験終了後、浅胸筋を採取し、mTORC1 ならびに mTORC2 のそれぞれの活性測定は、mTOR の標的タンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法にて測定した。また、血中アルギニンならびにリジン酸濃度を HPLC を用いて測定した。

以上、細胞培養実験ならびに飼養試験を通して、栄養生理学的制御による mTOR 活性と骨格筋タンパク質代謝との関係を調べた。

4. 研究成果

(1) 鶏培養骨格筋細胞の mTORC1 ならびに mTORC2 活性を制御する因子(ホルモン・成長因子・栄養素)の検索

インスリンならびに IGF-1 により S6K1、S6 および 4E-BP1 のリン酸化が増加し、また、AKT および GSK3 のリン酸化も増加した。アミノ酸により、S6K1、S6 および 4E-BP1 のリン酸化が増加したが、AKT および GSK3 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。グルコース、ビタミンおよび脂肪酸により、S6K1、S6、4E-BP1、AKT および GSK3 のリン酸化に変化は見られなかった。クロロゲン酸により S6K1、S6 および 4E-BP1 のリン酸化が増加したが、AKT および GSK3 のリン酸化に影響は見られなかった。これらの結果から、インスリンならびに IGF-1 は mTORC1 ならびに mTORC2 活性を増加させること、アミノ酸ならびにクロロゲン酸は mTORC1 を増加させるが、mTORC2 には影響を及ぼさないこと、グルコース、ビタミンおよび脂肪酸は mTORC1 ならびに mTORC2 に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、特に、インスリンは、mTORC1 ならびに mTORC2 を介して、鶏骨格筋細胞のタンパク質合成を促進することも明らかになった。他の因子ならびに栄養素ではタンパク質合成に影響は見られなかった。また、インスリン、IGF-1 およびアミノ酸は鶏骨格筋細胞において、アトロジン-1 発現ならびにオートファジーを抑制する(2)が、他の栄養素では影響は見られなかった。

(2) 鶏骨格筋における mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対するエネルギーならびにタンパク質代謝の影響

鶏培養骨格筋細胞を用いて、AMPK の活性化剤である AICAR を培地に添加した結果、mTORC1 活性は低下したが、mTORC2 活性には影響は見られなかった。また、AICAR によりタンパク質合成が低下した。次に、無血清培地による mTOR 活性に対する影響を調べた。その結果、mTORC1 ならびに mTORC2 活性は減少した。

肉用鶏ヒナにおいて、低タンパク質飼料給与により、mTORC1 活性は低下したが、mTORC2 活性には影響は見られなかった。一方、低エネルギー飼料給与による mTORC1 ならびに mTORC2 活性には影響は見られなかった。また、低タンパク質飼料給与により血中リジン濃度は増加し、血中アルギニン濃度は低下した。低エネルギー飼料給与では血中リジン濃度は増加したが、血中アルギニン濃度に差は見られなかった。これらの結果から、アルギニンならびにリジンが mTOR 活性に影響を及ぼすことが示唆された。

(3) 鶏骨格筋における mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対するアルギニンならびにリジンの影響
鶏培養骨格筋細胞において、アルギニンならびにリジンにより mTORC1 活性は増加したが、mTORC2 活性に影響は見られなかった。タンパク質合成に対するリジンならびにアルギニンの影響は見られなかったが、アトロジン-1 発現は、アルギニンでは低下し、リジンでは影響は見られなかった。

肉用鶏ヒナにおいて、低リジン飼料給与により、血中リジン濃度は減少し、アルギニン濃度は増加した。一方、骨格筋における mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対しては、低リジン飼料給与は見られなかった。高リジン飼料給与した肉用鶏ヒナの血中のリジン濃度は減少し、アルギニン濃度には差は見られなかった。鶏骨格筋の mTORC1 ならびに mTORC2 活性に対しては、高リジン飼料給与の影響は見られなかった。

以上の成果から、鶏骨格筋において、mTORC1 ならびに mTORC2 には、異なった栄養生理学的制御機構が存在し、特に、アルギニンにより、mTORC1 を介した鶏骨格筋のタンパク質代謝制御が可能なが明らかになった。

参考文献：

1. Kazuki Nakashima and Aiko Ishida. Regulation of Autophagy in Chick Skeletal Muscle: Effect of mTOR Inhibition. J. Poultry Sci., 57: 77-83, 2020
2. Kazuki Nakashima and Aiko Ishida. Regulation of Autophagy in Chick Myotubes: Effects of Insulin, Insulin-Like Growth Factor-I, and Amino Acids. J. Poultry Sci., 55: 257-262, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima Kazuki, Ishida Aiko	4. 巻 59
2. 論文標題 AMP-activated Protein Kinase Activation Suppresses Protein Synthesis and mTORC1 Signaling in Chick Myotube Cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 81 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0210021	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 Nakashima Kazuki, Ishida Aiko, Shimamoto Saki, Ijiri Daichi, Ohtsuka Akira	4. 巻 57
2. 論文標題 Insulin Stimulation of Protein Synthesis and mTOR Signaling in Chick Myotube Cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 205 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0190082	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------