

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580134

研究課題名（和文） 骨格筋萎縮における抗ストレスアミノ酸の検索とその作用機構

研究課題名（英文） Anti-stress amino acids and its mechanisms in muscle atrophy

研究代表者

長澤 孝志 (NAGASAWA TAKASHI)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80189117

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う骨格筋の萎縮は、運動能力を妨げ生活の質の低下につながる。骨格筋の萎縮は酸化ストレスなど多くの因子が関与している。本研究では、これらの因子に対して抑制的に働くようなアミノ酸（抗ストレスアミノ酸）を検索、萎縮への影響を検討した。タウリンには効果がなかったがシトルリン、トリプトファンには骨格筋タンパク質の分解を抑制する作用があることが示され、特にシトルリンについては持続的な作用が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Muscle atrophy in aging causes decreased QOL. In this study, suppression of muscle atrophy with decrease in protein degradation and increase in protein synthesis by amino acids named anti-stress amino acids. Taurine had no effects on muscle protein turnover, however citrulline and tryptophan showed to suppress muscle atrophy. In particular, citrulline had unique effects on muscle protein turnover.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：アミノ酸、骨格筋、タンパク質分解、タンパク質合成、シトルリン、リジン、トリプトファン

1. 研究開始当初の背景

(1) 健康社会の問題点

高齢化社会においては、死ぬまで健康でいること（Healthy dying）が望まれている。そのためには動けるからだが必要であるが、加齢や疾病は筋肉量の減少（筋萎縮）を誘発し、健康な生活を脅かす。筋萎縮の抑制には筋肉タンパク質の合成を促進し、分解を減少させることが必要である。しかし、このバランスに対する生活習慣からの対処は運動し

か実践されていない。毎日食べる食事による萎縮抑制も重要であり、その機構の解明と調節物質の検索が医療費抑制、社会の活性化にとり重要なポイントとなる。

(2) 骨格筋量の調節

骨格筋タンパク質の合成に関しては、摂取アミノ酸、特にロイシンが主に mTOR を活性化し、翻訳因子の開始因子 4E (eIF4E) とその関連因子の活性化を調節するが示されて

いる。分解はユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系、およびカルパイン、カスパーゼ3によると現在は考えられているが、ロイシンなどの調節機構は明確ではない (Nagasawa ら 2005, 2007)。長澤らの研究 (Sugawara et al. 2007, 2008) では、低栄養状態においてはユビキチン-プロテアソーム系よりもむしろオートファジー-リソソーム系がロイシンで調節されることを明らかにした。しかし他のアミノ酸による調節は明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨格筋タンパク質の合成の促進と分解の抑制に対しロイシンが有効であることは明らかだが、他のアミノ酸については不明であるので、アミノ酸の抗ストレス作用を分解抑制、合成促進作用の側面から検索を行う。また抗ストレス性アミノ酸の作用機構を、各種モデル動物を用いて明らかにする。

また本研究では萎縮モデルを用いて酸化ストレスを実験動物に負荷し、酸化ストレスとアミノ酸の関係も検討する。酸化ストレスの関与は抗酸化性のタウリンも効果が現れると予想できる。さらに抗酸化物質の添加が相乗的な作用を示す可能性が期待できる。一方、低栄養などの栄養ストレスでは抗酸化性のアミノ酸や抗酸化物質の作用は弱く、むしろ分岐鎖アミノ酸やオートファジー形成抑制性アミノ酸による分解抑制が重要となると考える。

これらの研究の結果は、疾病や栄養状態ごとの適切なバランスのアミノ酸のサプリメントを通じて、筋萎縮の予防、軽減が可能となり、高齢化社会における医療費削減、活動増加につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には3~4週齢のWistar系雄ラット(日本エスエルシー)を用いた。ラットは室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50\pm 10\%$ 、午前6時から午後6時を明とする明暗サイクルで飼育した。

① アミノ酸の検索

AIN93Gの20%カゼイン食で1週間飼育した上記ラットを18時間絶食させ、体重100g当たり生理食塩水に溶解させたタウリン40mg、シトルリン100mg、リジン114mg、トリプトファン18.5mgまたはグリシン94mgをラットの胃内に強制経口投与した。投与3時間後にと殺解剖し、長指伸筋とヒラメ筋および腓腹筋を摘出した。

② 長期摂取

10%カゼイン食にシトルリンあるいはロイシンを1%添加した食餌をラットに18日間継続的に摂取させた。最終日にと殺解剖し

て筋肉を摘出した。

③ 尾部懸垂

10%カゼイン食あるいは1%ロイシン添加食、1%シトルリン添加食を1週間給与したラットの尾部を可動式の針金でケージ上部から吊るし、後肢が接地しないようにした。この状態で7日間飼育した。最終日にヒラメ筋を摘出した。また、7日間の尾部懸垂後尾部懸垂を外し重力を再負荷し、そこでアミノ酸添加食を給与し、7日後に筋肉を摘出する実験も行った。

(2) 骨格筋タンパク質の分解速度の測定

骨格筋の過半を占め、運動に必要な筋原線維タンパク質の分解速度を長指伸筋あるいはヒラメ筋からの非代謝性アミノ酸である3-メチルヒスチジン (MeHis) の放出速度から測定した。摘出した筋肉切片を生理的緩衝液中で2時間インキュベーションし、筋肉切片から放出されたMeHisの濃度から分解速度を測定した。MeHisは酸、熱安定性フルオレスカミン誘導体のHPLCによる分離で定量した。

(3) 血漿アミノ酸濃度

ラットから採血した血液から血漿を分離し、除タンパク質の後にアミノ酸濃度をアミノ酸自動分析計で測定した。MeHisはo-フルアルデヒドを用いたHPLCで定量した。

(4) 骨格筋のタンパク質分解系

プロテアソームの活性は蛍光合成基質を用いて測定した。ユビキチンリガーゼであるAtrogin-1とMuRF-1およびGAPDHの遺伝子発現は、腓腹筋からAGPC法でRNAを抽出し、ノーザンブロットにより測定した。オートファジーの律速段階であるLC-3のタンパク質発現は、抗LC-3抗体を用いたウエスタンブロットで測定した。

(5) 骨格筋のタンパク質合成系

タンパク質合成の翻訳段階の因子である4E-BP1およびその上流のAktのリン酸化は、抗4E-BP1および抗Akt抗体を用いてレギュラーサイズのゲルを用いたウエスタンブロットで検出して分離したリン酸化タンパク質のバンドから解析した。

(6) 過酸化脂質の定量

骨格筋の過酸化脂質は、Uchiyamaらの方法によりTBARS法で測定した。

4. 研究成果

(1) 抗ストレスアミノ酸の検索

① 低栄養ストレス

我々はすでにロイシン、リジン、メチオニンに骨格筋タンパク質の分解抑制作用があ

ることを明らかにしている。ロイシンについては、詳細な検討を行い、摂取後すぐにタンパク質合成の翻訳段階の活性化が起こり、合成が促進され、3時間後程度にオートファジー活性の低下により分解が抑制されることを明らかにした。しかし、この他のアミノ酸の中でトリプトファンは明確な結果が得られていなかった。またタンパク質を構成していないアミノ酸の作用も示されていなかった。そこで本研究ではタウリン (Tau)、シトルリン (Cit)、リジン (Lys)、クレアチン (Cre) について経口摂取のあとの分解と合成の変化を解析した。

18 時間絶食させたラットにこれらのアミノ酸を経口的に摂取させ、3時間後の長指伸筋からの MeHis の放出速度はシトルリンとリジンのみ有意に低下した。(図1) ヒラメ筋においても同様の結果が得られた。

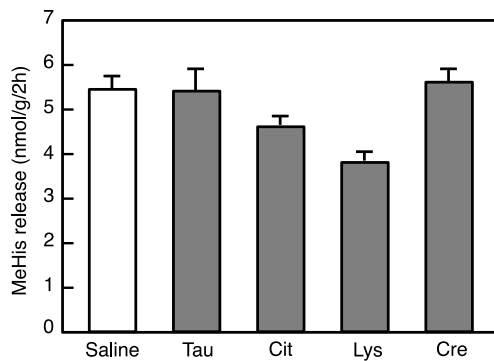


図1 タウリン、シトルリン、リジン、クレアチンの経口摂取3時間後の骨格筋タンパク質分解速度

抗酸化性が期待されたタウリンとエネルギー産生に関与するクレアチンには効果が認められなかったが、シトルリンにも分解抑制作用があることが初めて明らかになった。そこで次にシトルリンの合成に及ぼす影響を解析した。その結果、シトルリンの経口投与により翻訳段階の制御因子である4E-BP1とS6K1のリン酸化には変化が認められなかったことから、シトルリンは合成には影響を与えないことが示唆された。以上より、シトルリンが骨格筋のタンパク質分解が亢進しているときの抗ストレスアミノ酸アミノ酸として作用することが考えられた。

② 廃用性筋萎縮

より厳しい骨格筋萎縮モデルとして、廃用性筋萎縮モデルである尾部懸垂モデルを用いて、抗ストレスアミノ酸の検討を行った。10%カゼイン食で飼育しているラットに7日間の尾部懸垂を施し、1%ロイシンあるいはシトルリン添加食の効果を調べた。その結果、

尾部懸垂により顕著な後肢筋重量の減少、MeHis 放出速度の増加、プロテアソーム活性、ユビキチンリガーゼの遺伝子発現の増加、4E-BP1 リン酸化の減少、過酸化脂質量の増加が認められ、尾部懸垂が骨格筋タンパク質の分解を促進し、合成を抑制することで筋萎縮を起こすことが明らかになった。しかし、ロイシンあるいはシトルリン添加食の効果は認められなかった。一方、尾部懸垂後の再負荷実験においては、ロイシン添加食による骨格筋重量の回復促進とタンパク質合成の促進が認められたが、分解抑制は明確ではなかった(図2)。これらのアミノ酸は回復期に効果がある可能性が考えられた。

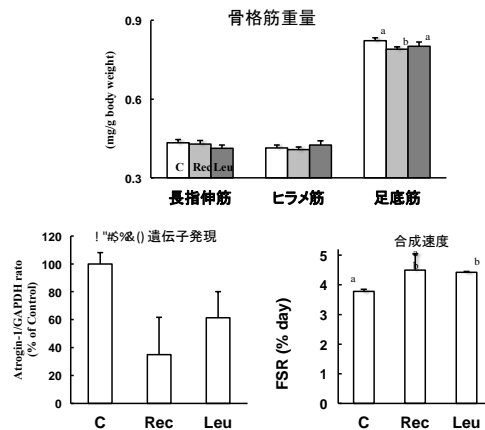


図2 尾部懸垂解除後の骨格筋重量と骨格筋タンパク質の合成、分解

(2) シトルリンの骨格筋タンパク質分解抑制作用機構

シトルリンの骨格筋タンパク質分解抑制機構を明らかにするために、まず投与後の経時変化を調べた。図3に示すように、投与2時間後には有意に投与前に比べ長指伸筋からの MeHis 放出速度が低下し、それは4時間後まで維持されていた。このとき、血漿のシ

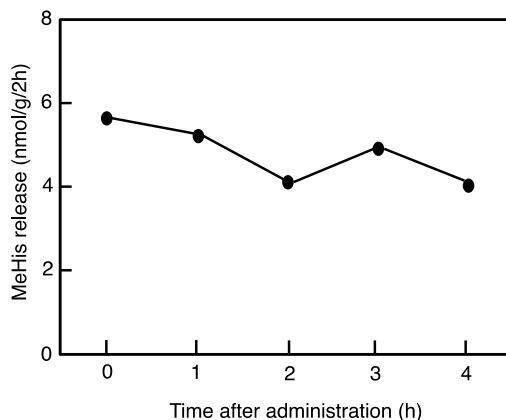


図3 シトルリン投与後の骨格筋タンパク質分解速度の経時変化

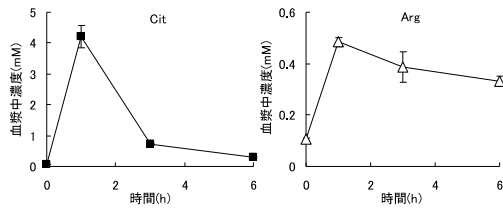


図4 シトルリン投与後の血漿シトルリン、アルギニン濃度

トルリン濃度も投与直後から増加したが、興味深いことにアルギニン濃度も増加し、シトルリン濃度が低下した後でもアルギニン濃度が高いレベルで維持されていた(図4)。

この結果は、アルギニンは経口投与するとかなりの割合で消化管と肝臓で代謝されるが、シトルリンは末梢組織での代謝が中心となることが示唆されるものである。しかし、本実験からは骨格筋タンパク質の分解抑制のシグナルとして働くアミノ酸がシトルリンなのかアルギニンなのか明確にはできなかった。

骨格筋タンパク質の分解の初期段階に作用するパインの活性は、シトルリン投与後に有意な変化は示さなかった。オートファジーの律速因子である LC3 は、シトルリン投与直後から活性型の割合の減少傾向が認められた(図5)。ユビキチン-プロテアソーム系の律速となるユビキチンリガーゼ (Atrogin-1, MuRF-1) の遺伝子発現は、シトルリン投与後の経時的な変化は認められなかった。以上より、シトルリンの骨格筋タンパク質分解抑制にはオートファジー-リソソーム系が関与していることが示唆された。

骨格筋の 4E-BP1 (図5 のリン酸化とその上流のシグナル因子である Akt のリン酸化は、シトルリン投与後に増加傾向を示したが、その他の因子では大きな変化は認められなかった。分解の制御因子の経時変化と異なるパターンを示したことから、両者の制御機構は異なるものであると考えられる。

(3) シトルリンの長期摂食

シトルリンあるいはロイシン添加食の摂取による体重には変化が無かったが、無添加食に比べると体重が増加する傾向が認められた。アミノ酸添加食は腓腹筋重量を増加させ、このとき骨格筋タンパク質の分解速度は

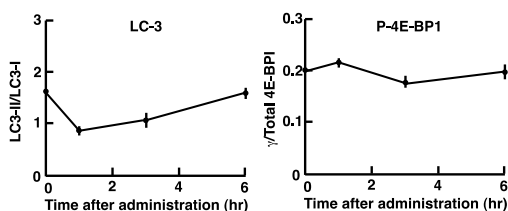


図5 シトルリン投与後の活性型LC3と4E-BP1の変化

有意に減少した。シトルリンの効果はロイシンとほとんど同程度であった。これらの結果は、シトルリンの添加食がロイシンと同程度に低栄養ストレスによる骨格筋萎縮を抑制できる抗ストレスアミノ酸である可能性を示唆している。

シトルリンは、タンパク質合成に利用されないアミノ酸であり、また尿素サイクル、NOサイクルの重要なメンバーでもある。シトルリンが骨格筋タンパク質の代謝を調節することが本研究で明らかになったが、その機構、作用する実態などさらに検討する必要がある。

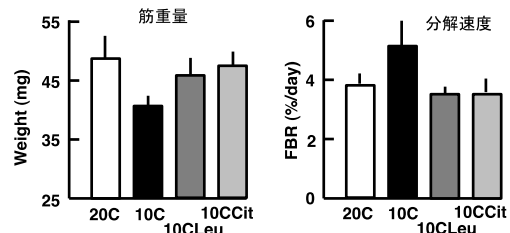


図6 シトルリンの長期投与によるヒラメ筋重量と骨格筋タンパク質の分解速度

(4) トリプトファン投与の骨格筋、肝臓の合成と分解に及ぼす作用

トリプトファンは抗ストレスアミノ酸として古くから知られているアミノ酸である

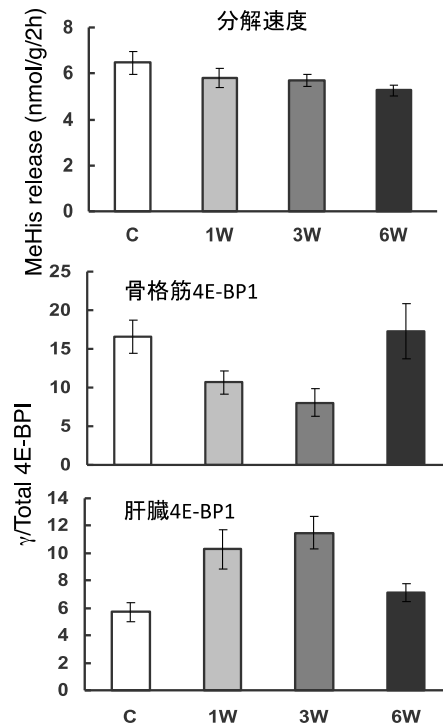


図7 トリプトファン投与1時間後(1W)、3時間後(3W)、6時間後(6W)の骨格筋と肝臓タンパク質の分解と合成:

が、骨格筋タンパク質の代謝回転に及ぼす影響は不明であった。20%カゼイン食に含まれるトリプトファンと同じ量をラットに投与したところ、MeHis 放出速度は6時後に減少傾向が、4E-BP1 のリン酸化は3時間後に顕著な減少が示された。これらの結果は、骨格筋においては合成も分解も抑制され、かつその経時変化はロイシンなどよりかなり遅いことが明らかになった(図7)。一方、肝臓では4E-BP1 のリン酸化が投与3時間後に有意に増加した。トリプトファンは骨格筋に対しては抗ストレスアミノ酸として作用しないが、肝臓においてはタンパク質代謝の観点からは抗ストレスアミノ酸として作用する可能性が考えられた。

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)

①T. Sugawara, Y. Ito, N. Nishizawa, H. Suzuki, H. Kobayashi, T. Nagasawa
Measurement of the rate of myofibrillar protein degradation using the arteriovenous difference in plasma 3-methylhistidine concentration of rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 査読あり 55, 2009, pp381-384

[学会発表] (計7件)

①富樫拓也, 伊藤芳明, 長澤孝志. トリプトファンの摂取によるラット骨格筋タンパク質の分解と合成の変化. 第5回日本アミノ酸学会学術大会, 2011年11月, 愛知県, 名古屋大学

②平井佑佳, 伊藤芳明, 森田匡彦, 森下幸治, 長澤孝志. 経口摂取したシトルリンの骨格筋タンパク質分解と合成の調節機構 第65回日本栄養・食糧学会大会, 2011年5月, 東京都, お茶の水女子大学.

③熊谷弘太, 伊藤芳明, 長澤孝志. 尾部懸垂による筋萎縮と回復時におけるロイシンの効果. 日本アミノ酸学会第4回学術大会, 2010年9月, 栃木県, ホテルサンシャイン鬼怒川.

④平井佑佳, 伊藤芳明, 森田匡彦, 森下幸治, 長澤孝志. シトルリンの経口摂取による骨格筋タンパク質分解の抑制. 第64回日本栄養・食糧学会大会, 2010年5月, 徳島県, アステイ徳島.

⑤平井佑佳, 伊藤芳明, 長澤孝志. タウリンおよびシトルリンの骨格筋タンパク質分解に対する作用. 第43回日本栄養・食糧学会東北支部大会, 2009年11月, 青森県, 青森保健大学.

⑥熊谷弘太, 伊藤芳明, 長澤孝志. 尾部懸垂による筋萎縮に対するロイシンの効果. 日本アミノ酸学会第3回学術大会, 2009年9月, 京都府, 京都府立大学.

⑦長澤孝志. アミノ酸による骨格筋タンパク質の分解抑制. 第57回日本栄養・食糧学会中部支部大会, 2009年6月, 愛知県, 愛知教育大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 孝志 (NAGASAWA TAKASHI)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 80189117