

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780256

研究課題名（和文） アミノ酸による骨格筋タンパク質分解抑制シグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文） Signaling pathway in amino acids mediated suppression of muscle proteolysis

研究代表者

中島 一喜 (NAKASHIMA KAZUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・分子栄養研究チーム・主任研究員

研究者番号：70370583

研究成果の概要（和文）：

本研究は、骨格筋のタンパク質分解に対するアミノ酸の情報伝達経路を明らかにすることを目的とした。その結果、1)アミノ酸は、IGF-I と異なり AKT-FOXO 経路ではタンパク質分解を抑制しないこと、2)アミノ酸のロイシンはグルタミンが共存下では、アミノ酸トランスポーターを介した経路で骨格筋タンパク質分解を抑制するが、ロイシン単独では異なった経路で抑制することを明らかにした。以上の結果は、アミノ酸は様々な情報伝達経路を介して骨格筋のタンパク質分解を抑制していることを示している。

研究成果の概要（英文）：

The present study addressed the role of amino acids as a regulator of proteolysis in myotubes. Leucine and glutamine suppressed proteolysis, while also decreasing expression of atrogin-1 mRNA through the L- system amino acid transporter (LAT1). Amino acids did not activate AKT-FOXO signaling pathway, but inhibiting proteolysis. Thus, an important component of muscle proteolysis inhibition by leucine or amino acids, through LAT1 but not AKT-FOXO signaling pathway, is its ability to suppress muscle protein degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：アミノ酸、タンパク質分解、タンパク質分解関連遺伝子発現、筋肉細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

動物の成長の主体はタンパク質の蓄積である。動物は、体タンパク質の合成と分解を同時に行いながら体タンパク質を蓄積し、成長する。タンパク質の合成と分解の速度は種々の要因によって変化し、合成側に傾くと

成長し、分解側に傾くと体タンパク質が減少する。骨格筋は、体タンパク質全体の約45%を占める最大のタンパク質蓄積器官である。そのため、骨格筋におけるタンパク質代謝の調節機構を明らかにすることは、体タンパク質量の決定にきわめて重要である。一方、畜産における最大の目標は動物タンパク質生

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。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、効率的な畜産物生産技術開発につながる。

骨格筋は、高度に組織化されている一方で、他の組織と同様に生理的状态に敏感に反応して、恒常性の維持に貢献している。骨格筋のタンパク質代謝は、主にホルモンによって調節されていると考えられるが、アミノ酸もその調節に関与していることが報告されている (Buse et al. *J Clin Invest.* 1975. 56: 1250-1261)。以前より、分枝鎖アミノ酸は、タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することにより、タンパク質代謝を調節していることが知られていた。近年、この分枝鎖アミノ酸によるタンパク質合成の促進は翻訳段階で調節されていることが明らかにされた (Yoshizawa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. 313:417-422)。しかしながら、タンパク質分解を抑制する作用機構については十分に明らかにされていない。これらの研究の結果、アミノ酸はシグナル因子として骨格筋におけるタンパク質合成を促進することは明らかにされたが、タンパク質分解に対する作用は明らかにされていなかった。そこで、申請者らは培養筋肉細胞ならびに鶏ヒナを用いて、骨格筋タンパク質分解に対するアミノ酸の影響を調べ、アミノ酸が骨格筋タンパク質分解を遺伝子発現レベルで抑制することを明らかにした (Nakashima et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 336:660-666.)。この結果は、これまで主にホルモンによって調節されていると考えられていた骨格筋のタンパク質分解に、アミノ酸も関与していることを示している。しかしながら、アミノ酸がどのようなシグナル伝達経路で骨格筋タンパク質分解を抑制しているのかについては不明である。

そこで、骨格筋タンパク質分解に対するアミノ酸のシグナル因子としての機能を明らかにすることにより、アミノ酸による骨格筋タンパク質代謝制御技術と新たなアミノ酸栄養の確立の基礎となる研究となると考えられた。

## 2. 研究の目的

アミノ酸は体タンパク質の構成成分としてのほかに、細胞内や血漿に遊離アミノ酸として存在し、生体内で様々な役割を果たしている。近年、アミノ酸が遺伝子発現を調節するシグナル因子としてタンパク質合成を制御していることが明らかにされた。申請者らは培養筋肉細胞ならびに鶏ヒナを用いて、骨格筋タンパク質分解に対するアミノ酸の影響を調べ、アミノ酸が骨格筋タンパク質分解

を遺伝子発現レベルで抑制することを明らかにした。しかしながら、アミノ酸がどのようなシグナル伝達経路で骨格筋タンパク質分解を抑制しているのかについては不明である。

本研究は、アミノ酸による骨格筋タンパク質分解抑制シグナル因子としての機能を明らかにするため、新たな分子生物学的手法を駆使し、シグナル伝達経路を明らかにしようとするものである。これまでにアミノ酸によるタンパク質分解抑制シグナル伝達経路については明らかにされていない。しかし、アミノ酸によるタンパク質合成は、ホスホチリイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) → mammalian target of rapamycin (mTOR) → リボソームタンパク質 S6 キナーゼ (S6K1) シグナル伝達経路を経てタンパク質合成を促進することが示された (Kimball and Jefferson. *Am J Clin Nutr.* 2006. 83:500S-507S)。一方、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) によるタンパク質の代謝に対するシグナル伝達経路は、数多く研究されており、タンパク質合成に関しては、アミノ酸と異なるシグナル伝達経路を経て促進されることが明らかにされている。また、IGF-1 によるタンパク質分解抑制シグナル伝達経路は、IGF-1 によるタンパク質合成促進シグナル伝達経路と異なることが報告されている (Sandri et al. *Cell.* 2004. 117:399-412)。これらのことから、アミノ酸によるタンパク質分解抑制シグナル伝達経路は、アミノ酸によるタンパク質合成促進シグナル伝達経路と異なる可能性があり、また、IGF-1 によるタンパク質分解抑制シグナル伝達経路と異なる可能性もある。そこで、骨格筋タンパク質分解に対するアミノ酸のシグナル因子としての機能を明らかにすることを目的とし、古典的な阻害剤を用いた手法ならびに新たな分子生物学的手法 (RNA 干渉技術) を駆使し、これまで明らかにされているアミノ酸によるタンパク質合成シグナル伝達経路と IGF-1 によるタンパク質代謝制御と比較し、アミノ酸によるタンパク質分解抑制シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) アミノ酸による骨格筋タンパク質分解抑制作用の確認と各種阻害剤によるタンパク質分解抑制ならびにタンパク質分解関連遺伝子発現の解析

培養筋肉細胞 (初代鶏筋肉細胞ならびにマウス由来 C2C12 筋肉細胞株) を用いて、タンパク質分解に対するアミノ酸の影響を調べた。

鶏筋芽細胞は、13 日卵齢鶏胚大腿筋から得

イスパーゼを用い調製した。筋芽細胞は15%子牛血清を含むm-199培地で7日間培養を行ない、分化した筋管を形成させ、筋管細胞培養系として用いた。マウス由来のC2C12筋細胞株を用いた。この細胞は、10%牛胎児血清を含むDMEM培地で4日間培養した。その後、分化培地で3日間培養し、完全に筋管形成させた時点で筋管細胞培養系として用いた。

培養筋肉細胞を用いて、MEM培地のアミノ酸濃度を段階的(0倍、1倍、2倍)に変化させ、6または24時間培養した。培養後、培地を回収し、タンパク質分解の指標である培地中3-メチルヒスチジン濃度を測定した。3-メチルヒスチジンは体タンパク質の中でも最大量を占める骨格筋タンパク質のミオシンとアクチンに存在するアミノ酸で、タンパク質合成に再利用されず、骨格筋タンパク質の分解に伴って定量的に放出され、代謝されずに尿中に排泄される。そこで、尿中3-メチルヒスチジン濃度を測定することにより骨格筋タンパク質分解速度を測定することができ、同様に、血液中の3-メチルヒスチジン濃度も骨格筋タンパク質分解の指標となりうるということが明らかにされている。また、*in vitro*において、培養筋管細胞から培地へ放出される3-メチルヒスチジン量も骨格筋タンパク質分解の指標となりうるということが示されている(Thompson et al. J Cell Physiol. 1996. 166: 506-511)。

また、細胞からRNAを抽出し、筋肉細胞におけるタンパク質分解関連遺伝子発現(アトロジン-1)をリアルタイムPCR法により定量解析をおこなった。また、ウエスタンブロット法を用いて、インスリン様成長因子-1(IGF-I)のよるタンパク質分解抑制に関与するAktならびにFOXO3aタンパク質のリン酸化を確認した。ポジティブコントロールとしてIGF-I(100 ng/ml)を用い、タンパク質分解抑制シグナル経路についてアミノ酸と比較した。

次に、これまでに明らかにされているアミノ酸による代謝制御に関するシグナル伝達経路の各種阻害剤を用い、タンパク質分解抑制作用ならびにタンパク質分解関連遺伝子発現を指標にシグナル伝達経路を明らかにすることを目的として、システムL-アミノ酸トランスポーター阻害剤である2-aminobicyclo-(2, 2, 1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH)を用いて実験を行った。筋肉細胞はマウス由来のC2C12筋細胞株を用いた。C2C12筋芽細胞は定法に従い、低血清培地で分化を誘導し、筋管を形成させ、MEM培地のアミノ酸含量が0倍、1倍、2倍ならびにシステムL-アミノ酸トランスポーター阻害剤であるBCHを含む培地で、6時間培養した。その後、タンパク質分解関連遺伝子であるアトロジン-1発現量を測定した。ポジティブ

コントロールとして、IGF-I(100 ng/ml)を用いた。鶏胚由来の筋肉細胞は、15%子牛血清を含むm-199培地で7日間培養し、筋管形成させた時点で、ロイシン(Leu, 1 mM)またはグルタミン(Gln, 1 mM)ならびにシステムL-アミノ酸トランスポーター阻害剤であるBCHを含む Krebs-Henseleit-Hepes (0.1 % BSA)緩衝液で2時間培養した。その後、タンパク質関連遺伝子であるアトロジン-1発現量をリアルタイムPCR法にて測定した。

(2)アミノ酸によるタンパク質分解シグナル伝達経路に関与する遺伝子の発現抑制がタンパク質分解に及ぼす影響の検討

タンパク質分解抑制シグナル伝達経路に関与する遺伝子をRNA干渉技術を用いて遺伝子を発現抑制し、アミノ酸によるタンパク質分解抑制シグナル経路について調べた。

先の実験において、アミノ酸による骨格筋タンパク質分解はシステムL-アミノ酸トランスポーターを介して抑制する可能性が示唆されたのでL-アミノ酸トランスポーター(LAT1)遺伝子をRNA干渉技術で発現抑制する条件をC2C12ならびに鶏筋管細胞を用いて検討した。

マウスLAT1遺伝子のsiRNAプライマーを4種類購入(QIAGEN)し、HiPerFectトランスフェクション試薬(QIAGEN)を用いてC2C12筋管細胞へのsiRNA導入条件(濃度、時間の検討)はQIAGENの方法に準じて行った。

鶏筋管細胞へのsiRNA導入は、鶏LAT1遺伝子のsiRNAプライマーを8種類作成し、導入した。トランスフェクション試薬はHiPerFect(QIAGEN)、Lipofectamine 2000(Invitrogen)ならびにLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)トランスフェクション試薬を用いて行った。siRNA導入条件(濃度、時間の検討)はQIAGENまたはInvitrogenの方法に準じて行った。siRNAを導入24時間後に、細胞を回収し、LAT1遺伝子の発現の抑制をリアルタイムPCR法にて確認した。

次に、鶏筋管細胞を用いて、LAT1遺伝子の発現を抑制したsiRNAプライマーを含むLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)トランスフェクション試薬を用いて24時間培養した。その後、培地をロイシン(Leu, 1 mM)またはグルタミン(Gln, 1 mM)を含む Krebs-Henseleit-Hepes (0.1 % BSA)緩衝液で2時間培養した。培養後、細胞を回収し、リアルタイムPCR法にてLAT1ならびにアトロジン-1遺伝子発現を測定した。

#### 4. 研究成果

マウス由来のC2C12筋細胞株を用い、アミノ酸含量が0倍、1倍、2倍のMEM培地を作成し、ポジティブコントロールとして、IGF-I

(100 ng/ml)で6または24時間培養した。その結果、タンパク質分解の指標である培地への3-メチルヒスチジン放出量は培地のアミノ酸量が増加するに伴い減少した。タンパク質関連遺伝子であるアトロジン-1発現も同様に添加量に伴い減少した。AktならびにFOXO3aタンパク質のリン酸化はIGF-Iで検出されたが、アミノ酸添加ではAktならびにFOXO3aタンパク質のリン酸化は確認されなかった。以上の結果は、アミノ酸はIGF-Iと異なるシグナル伝達経路でタンパク質分解を抑制していることを示している。

次に、鶏胚由来の筋肉細胞を用い、ロイシン (Leu, 1 mM) またはグルタミン (Gln, 1 mM) ならびにシステム L-アミノ酸トランスポーター阻害剤 (BCH, 10 mM) をそれぞれ含む緩衝液で2時間培養した結果、タンパク質関連遺伝子であるアトロジン-1発現はLeu添加により減少したが、Glnでは影響は見られなかった。LeuとGln添加はより減少した。同時添加によりアトロジン-1発現の抑制効果は大きくなった。一方、BCH添加により、LeuとGlnの同時添加による抑制作用はキャンセルされたが、Leu単独の作用はキャンセルされなかった。以上の結果は、Glnとの共存下では、LeuはシステムL-アミノ酸トランスポーターを介した経路でアトロジン-1発現を抑制するが、Leu単独ではトランスポーター経由とは異なった経路でアトロジン-1発現を抑制することを示している。

鶏胚由来の筋肉細胞を用いて、システムL-アミノ酸トランスポーターLAT1 siRNAの導入実験を行った。8種類のLAT1 siRNAを設計し、HiPerFectトランスフェクション試薬を用いて導入を試みたが、LAT1遺伝子発現の抑制効果はみられなかった。また、Lipofectamine 2000トランスフェクション試薬を用いて、LAT1 siRNAの導入を試みたが、LAT1遺伝子発現の抑制効果はみられなかった。次に、Lipofectamine RNAiMAXを用いてLAT1 siRNAの導入を試みた結果、2種類のsiRNAがLAT1遺伝子発現の抑制を抑制した。

先のプライマーならびにトランスフェクション試薬の条件下で、siRNA干渉技術を用いてLAT1 siRNAを鶏胚由来の筋肉細胞を導入した。次にこのsiRNAを導入した細胞にロイシン (Leu, 1 mM)、グルタミン (Gln, 1 mM) または両方を含む緩衝液で2時間培養した結果、タンパク質関連遺伝子であるアトロジン-1発現はLeu添加により減少し、Glnでは影響は見られなかった。LeuとGlnの同時添加によりアトロジン-1発現の抑制効果は大きくなった。一方、LAT1 siRNAの導入によりアトロジン-1発現は減少し、LeuならびにGlnの影響はみられなかったが、LeuとGlnの共存下ではアトロジン-1発現は回復した。また、LAT1発現はLeu存在下で増加し、siRNAの導

入によるLAT1の発現抑制に対しては、アミノ酸の影響はみられなかった。以上の結果から、筋肉においてアミノ酸トランスポーターを介してアトロジン-1発現は制御されている可能性が示唆された。

一連の結果から、ロイシンを含む特定のアミノ酸には、骨格筋タンパク質分解抑制作用を有することが明らかとなり、アミノ酸はアミノ酸トランスポーターなど様々な情報伝達経路を介して、骨格筋のタンパク質分解関連遺伝子発現の抑制し、作用していることが明らかとなった。本研究では、アミノ酸によるタンパク質分解抑制経路にはこれまでに明らかにされている経路と異なる経路が存在することを初めて示した。

## 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)

中島一喜、石田藍子、勝俣昌也、アミノ酸による鶏ヒナの骨格筋タンパク質分解抑制、栄養生理研究会報、査読有、54巻、2010、33-43

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 一喜 (NAKASHIMA KAZUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・分子栄養研究チーム・主任研究員

研究者番号：70370583