

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33909

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500789

研究課題名(和文) 運動中から運動後にかけて認められる筋たんぱく質合成反応の切り替え調節の解明

研究課題名(英文) Blunting of protein synthesis during exercise in rat skeletal muscle

研究代表者

村上 太郎 (Murakami, Taro)

至学館大学・健康科学部・教授

研究者番号：10252305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： 私たちの体を構成している体たんぱく質は、絶えず合成と分解を繰り返しているが、その調節機序を明らかにできればサルコペニアの予防などに応用することができる。この研究では、運動中から運動後にかけた筋たんぱく質合成の動態を明らかにすることを目的とした。その結果、筋たんぱく質の合成は運動中には低下するが、運動後数時間経過すると元のレベルに戻る可能性が示唆された。一方で、空腹時に運動した場合、運動後に筋たんぱく質の合成は増大しない可能性も示唆され、運動による筋たんぱく質合成に栄養が関与していることが確認された。

研究成果の概要(英文)： Protein synthesis is suppressed in working skeletal muscle. Teleologically, it makes sense that the muscle stops an ATP-consuming building process to spare ATP for contractile activity in an emergency. At least so far two mechanisms have been proposed for blunting protein synthesis in working muscle. One of them is a story that AMPK inhibits mTORC1, which is arguably a master regulator of initiation step in protein translation. Another story is that Ca²⁺-dependent inactivation of eEF2, which regulates elongation step in it. Reports in the literature suggest that other factors rather than AMPK and/or eEF2 would be involved in the blunting of protein synthesis. We have shown that REDD1 might be also a candidate for blunting protein synthesis in working muscle. Understanding of these mechanisms may lead to development of new strategies and treatments not only for athletes but also for individuals with muscle-wasting conditions such as sarcopenia.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：たんぱく質合成 mTORC1 REDD1 4E-BP1 SUnSET

1. 研究開始当初の背景

一般に運動は筋たんぱく質の合成を増大させると言われているが、運動中と運動後ではたんぱく質の翻訳段階は正反対の調節を受けている。すなわち、運動中に翻訳段階は強力に抑制されるが、運動後に翻訳段階が活性化され運動中の抑制を凌駕する。これまでに、運動中から運動後にかけて認められる筋たんぱく質の翻訳活性の切り替えは主に mTOR によって調節されていることが報告されている。Bolster らは AMP activated protein kinase (AMPK) を薬理的に活性化すると mTOR が阻害されるという画期的な発見をし、それ以降、運動中に筋たんぱく質の合成が翻訳段階で抑制される機序として、運動による [AMP/ATP] 比の上昇 - AMPK の活性化 - mTOR 経路の不活性化 - 翻訳段階の抑制が広く信じられている (Atherton and Rennie, J. Physiol. 587: 1373-1374, 2009)。一方、Rose ら (J. Physiol. 587: 1547-1563, 2009) は筋肉特異的 AMPK 不活性マウスを用いた実験で、AMPK が機能しないマウスの骨格筋においても筋収縮によって mTOR 経路の不活性化が起こることを見いだした。このことは、AMPK とは異なった運動によって mTOR 経路を不活性化する因子が存在することを強く示唆している。運動時に mTOR を阻害する新たな調節因子を発見し、その調節機序を明らかにできれば、運動中から運動後の筋たんぱく質合成の増大を従来よりも速やか、かつより大きく誘導できる方法を開発することができる。

2. 研究の目的

低酸素ストレスによって誘導されるたんぱく質として発見された Regulated in DNA Damaging and Development 1 (REDD1) は、近年、mTOR 経路の上流に存在し、mTOR の働きを抑制することが明らかにされた。REDD1 は低酸素以外にも、ATP 欠乏、DNA 損傷、ER ストレス、グルココルチコイド、絶食などで誘導されることが知られており、以上の報告は REDD1 の発現が運動によって誘導される可能性を示している。さらに、REDD1 の特徴の 1 つとしてその半減期が 5 分未満と短時間であることが報告されており、代謝を短時間で切り替えるスイッチとして合理的なたんぱく質であることが考えられる。実際、我々はラットを用いた予備実験において、持久運動直後に腓腹筋で mTOR 経路の活性が低下すること、さらにそれに呼応するかたちで REDD1 の mRNA とたんぱく質の発現が著しく増大すること (それぞれ 7 および 3 倍) を見いだした。

そこで、本研究では、ラットに持久運動を負荷した後に下肢筋の REDD1 たんぱく質と

mRNA の発現量を継時的に観察し、運動によって誘導される REDD1 の発現の増大が運動後どの時点で元の発現レベルに戻るのか、また、それに呼応する形で mTORC1 経路の活性が増大するのか否かを検討し、運動後にたんぱく質の代謝が分解から合成へ切り替わる機序を明らかにすることを目的とした。また、mTORC1 はたんぱく質合成を調節している主要な因子であることから、持久運動によって筋肉のたんぱく質合成が誘導されるのか否かについても合わせて検討した。

3. 研究の方法

(1) 持久運動が運動後の比較的短時間における REDD1 の発現に及ぼす影響 (実験 1)

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット 27 匹を用いた。ラットを安静群 6 匹と運動群 21 匹に分けた。屠殺 16 時間前から絶食とし、運動群のラットに分速 28 m の速度で 60 分間の持久運動を負荷した。ラットを運動前、運動終了直後、運動終了後 30、および 60 分の時点でそれぞれ屠殺し、腓腹筋を摘出した。

(2) 持久運動が運動後 24 時間までの REDD1 の発現に及ぼす影響 (実験 2)

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット 60 匹を用いた。ラットを Puromycin 投与群 (30 匹) と非投与群 (30 匹) に分けた。屠殺 16 時間前から絶食とし、運動群のラットに分速 28 m の速度で 60 分間の持久運動を負荷した。ラットを運動前、運動終了直後、運動終了 1、3、6、12、および 24 時間の時点でそれぞれ屠殺し、腓腹筋を摘出した。Puromycin 投与群のラットには、屠殺の 10 分前に Puromycin (0.04 $\mu\text{mol/g}$) を下大静脈から投与した。

(3) 分析

腓腹筋の 4E-BP1 のリン酸化度 (% form) をウェスタンブロット法で測定し、mTORC1 の活性の指標とした。REDD1 の発現はウェスタンブロット法とリアルタイム PCR 法を用いて測定した。たんぱく質合成率は SUnSET 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 持久運動が運動後の比較的短時間における REDD1 の発現に及ぼす影響 (実験 1)

持久運動による腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化の低下

腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化を図 1 に示した。安静群と運動群を比較すると持久

運動によって4E-BP1 のリン酸化は有意に低値を示し、運動後 60 分まで続いた。

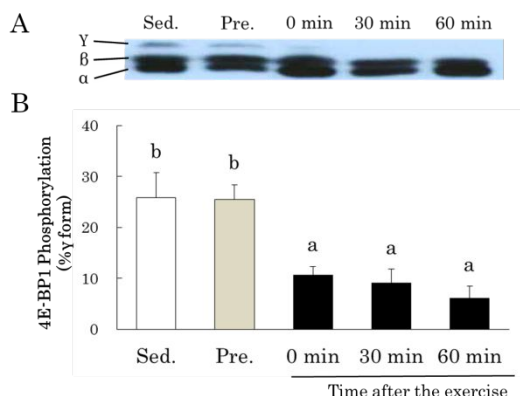


図 1. 持久運動による腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化度の推移。(A) 各群の代表的な 4E-BP1 のバンドを示した。(B) 4E-BP1 のリン酸化度を示した。4E-BP1 のリン酸化度合いは α 、 β 、および γ の 3 つのバンドのうちの α バンドの割合とした。値は各群の平均値 + 標準誤差で示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

持久運動による腓腹筋における REDD1 mRNA の発現の増大

腓腹筋における REDD1 mRNA の発現量を図 2 に示した。運動直後の REDD1 mRNA の発現量は運動前に比べて有意に高値を示し、時間経過に伴って漸減した。運動前群と安静群の間には有意な差は認められなかった。

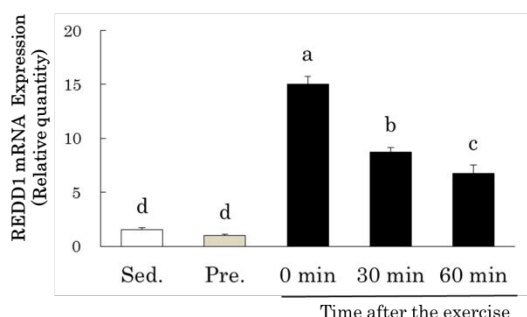


図 2. 持久運動による腓腹筋における REDD1 mRNA の発現量の推移。REDD1 mRNA の発現量を Pre 群を 1 とした時の相対的な値で示した。REDD1 mRNA の相対値は 18S rRNA 量を基準として算出した。値は各群の平均値 + 標準誤差を示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

持久運動による腓腹筋における REDD1 のたんぱく質の発現の増大

腓腹筋における REDD1 の発現量を図 3 に示した。運動直後の REDD1 たんぱく質の発現量は、運動前に比べて有意に増大した。増大した REDD1 たんぱく質の発現量は、運動後 60 分が経過しても運動前の発現レベルには戻らなかった。運動前群と安静群の間には有意な差は認められなかった。

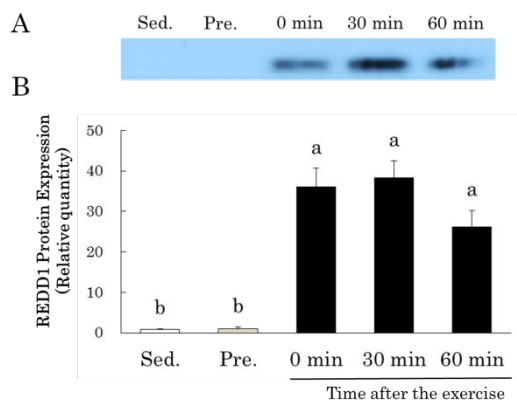


図 3. 持久運動による腓腹筋における REDD1 の発現量の推移。(A) 各群の代表的な REDD1 のバンドを示した。(B) REDD1 たんぱく質の発現量を Pre 群を 1 とした時の相対的な値で示した。値は各群の平均値 + 標準誤差を示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

(2) 持久運動が運動後 24 時間までの REDD1 の発現に及ぼす影響 (実験 2)

持久運動による腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化の低下とその後の回復

腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化を図 4 に示した。持久運動によって低下した 4E-BP1 のリン酸化は運動後 1 時間継続し、運動後 3 時間で運動前のレベルに戻った。運動前のレベルに戻った 4E-BP1 のリン酸化は運動後 24 時間まで変動しなかった。

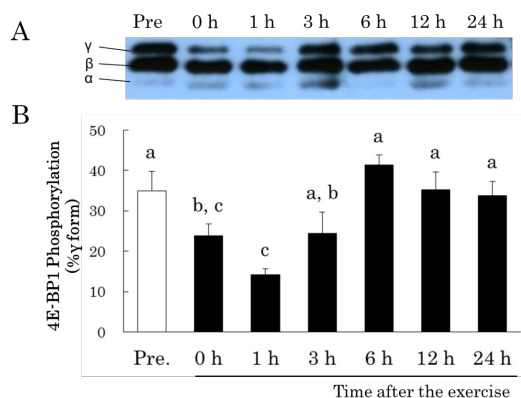


図 4. 持久運動による腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化度の推移。(A) 各群の代表的な 4E-BP1 のバンドを示した。(B) 4E-BP1 のリン酸化度を示した。4E-BP1 のリン酸化度合いは α 、 β 、および γ の 3 つのバンドのうちの α バンドの割合とした。値は各群の平均値 + 標準誤差で示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

持久運動による腓腹筋における REDD1 mRNA の発現の増大とその後の動態

腓腹筋における REDD1 mRNA の発現量を図 5 に示した。持久運動によって増大した REDD1 mRNA の発現量は時間経過に伴って漸減した。運動後 1 時間の時点では運動前と比べて有意

な差は認められなかったが、発現量は高い傾向を示した。REDD1 mRNA の発現量は運動後 3 時間で最も減少し、時間経過に伴って増大した。

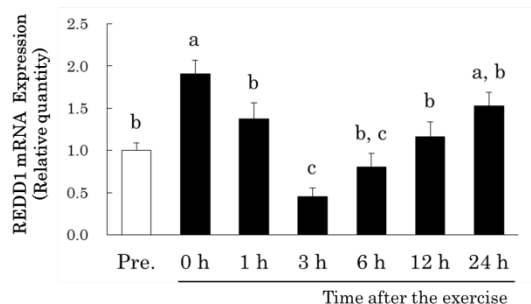


図 5. 持久運動による腓腹筋における REDD1 mRNA の発現量の推移。REDD1 mRNA の発現量を Pre 群を 1 とした時の相対的な値で示した。REDD1 mRNA の相対値は 18S rRNA 量を基準として算出した。値は各群の平均値 + 標準誤差を示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

持久運動による腓腹筋における REDD1 のたんぱく質の発現の増大とその後の回復

腓腹筋における REDD1 たんぱく質の発現量を図 6 に示した。持久運動によって増大した REDD1 たんぱく質の発現量は運動後 1 時間継続し、運動後 3 時間の時点で運動前の発現量に戻った。また、運動後 6 時間の時点で最も低い発現量となった。運動後 12 時間と 24 時間では運動前の発現量に戻った。

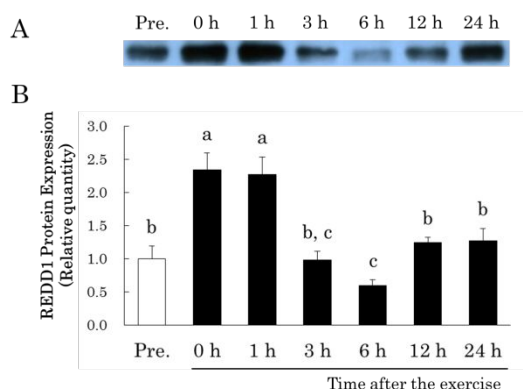


図 6. 持久運動による腓腹筋における REDD1 の発現量の推移。(A) 各群の代表的な REDD1 のバンドを示した。(B) REDD1 たんぱく質の発現量を Pre 群を 1 とした時の相対的な値で示した。値は各群の平均値 + 標準誤差を示した。また、異なるアルファベット間には有意差があることを示している。(p < 0.05)

持久運動による腓腹筋におけるたんぱく質合成率の変動

SUnSET 法によって腓腹筋におけるたんぱく質合成率を測定した結果、たんぱく質合成率は持久運動によって変動しなかった (図 7)。

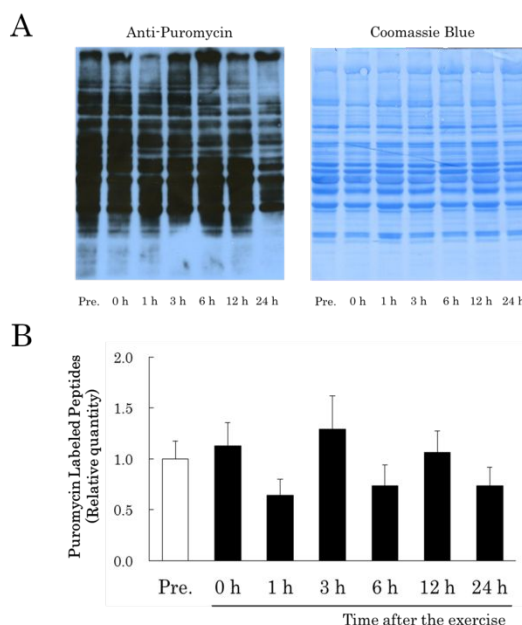


図 7. 持久運動による腓腹筋におけるたんぱく質合成率の変動。(A) 各群の代表的な Puromycin のバンドを示した。(B) たんぱく質合成率を Pre 群を 1 とした時の相対的な値で示した。値は各群の平均値 + 標準誤差を示した。異なるアルファベット間には有意差があることを示している。

(3) まとめ

本研究では、持久運動によって増大することが知られている REDD1 の発現が運動後どの時点で運動前の発現量に戻るのか、また、それに呼応して mTORC1 経路のリン酸化が増大し、たんぱく質合成が誘導されるのか否かについて検討した。

実験 1 では、持久運動によって腓腹筋の REDD1 の発現量は有意に増大した。持久運動によって増大した REDD1 の発現量は時間経過に伴って漸減したが、運動後 60 分の時点でも REDD1 たんぱく質と mRNA のどちらも運動前の発現レベルには戻らなかった。また、腓腹筋における 4E-BP1 のリン酸化は持久運動によって低下し、運動後 60 分間継続した。以上の結果から、腓腹筋では運動後 60 分が経過してもたんぱく質合成は抑制されている可能性が示唆された。

実験 2 では、実験 1 においてたんぱく質合成が増大に切り替わるタイミングを明らかにすることができなかったため、さらに運動後の観察時間を延長した。その結果、持久運動によって増大した REDD1 の発現量は時間経過に伴って漸減し、REDD1 mRNA では運動後 1 時間、REDD1 たんぱく質では運動後 3 時間の時点で運動前の発現レベルに戻った。持久運動によって低下した腓腹筋の 4E-BP1 のリン酸化は運動後 1 時間継続し、運動後 3 時間の時点で運動前のレベルに戻った。以上の結果より、持久運動によって発現が誘導された REDD1

による mTORC1 経路の活性の低下は、運動後 3 時間で運動前のレベルに戻る可能性が示唆された。

しかしながら、持久運動によって腓腹筋における運動直後の REDD1 の発現の誘導と 4E-BP1 のリン酸化の低下、運動後 3 時間の時点で REDD1 の発現量の低下と 4E-BP1 のリン酸化の増大が認められたにも関わらず、たんぱく質合成率は持久運動によって変動しなかった。この結果の乖離の要因として、絶食が考えられる。今回用いた実験モデルでは、代謝条件を揃えるためにラットに屠殺 16 時間前から絶食を負荷している。絶食はたんぱく質合成を低下させる大きな要因の 1 つである。運動によって mTORC1 情報伝達経路はたんぱく質合成を増大させる反応を示したが、体内にたんぱく質を合成するための材料 (アミノ酸) が不足していたために、実際のたんぱく質合成が起こらなかった可能性が考えられる。以上のことは、改めて、たんぱく質合成を効率よく増大させるには運動と食事の組み合わせが重要であることを物語っている。

以上の結果より、運動中から運動後に認められる骨格筋のたんぱく質合成反応の低下は、REDD1 の発現増大による mTORC1 経路の抑制によって起こること、また、運動がそれらに及ぼす影響は運動後数時間で消失するという 2 つの可能性が考えられた。しかし、mTORC1 経路の活性の変化が起こっていたにも関わらず、腓腹筋のたんぱく質合成率は持久運動によって変化しなかったことから、飢餓状態で運動しても筋肉のたんぱく質合成は誘導されない可能性が示唆された。

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 3 件)

1. 分岐鎖アミノ酸が運動による筋損傷や筋損傷からの回復に貢献する可能性. 村上太郎. 日本整形外科学会雑誌. 審査あり. 34: 1-7, 2014.

2. Induction of amino acid transporters expression by endurance exercise in rat skeletal muscle. Murakami, T. and Yoshinaga, M. Biochem. Biophys. Res. Commun. 審査あり、439: 449-452, 2013.

3. Regulatory mechanisms involved in blunting protein synthesis in working skeletal muscle. Murakami, T. J. Phys. Fitness. Sports Med. 審査あり、1: 163-165, 2012.

[学会発表](計 11 件)

1. 持久運動による骨格筋の REDD1 発現の増大と mTORC1 経路の抑制. 村上太郎、早坂美希、長谷川和哉、瀬戸口麻里子、石黒奈穂子. 第 68 回日本体力医学会大会. 東京. 2013. (口頭発表)

2. ロイシンが運動による筋損傷の予防や筋損傷からの回復に作用する可能性. 村上太郎. 第 39 回日本整形外科学会スポーツ医学学術集会. 名古屋市. 2013. (招待講演)

3. 持久運動による骨格筋の REDD1 発現の誘導と運動後の動態. 早坂美希、瀬戸口麻里子、石黒奈穂子、村上太郎. 第 67 回日本栄養食糧学会大会. 名古屋市. 2013. (口頭発表)

4. 持久運動による骨格筋のアミノ酸輸送体発現の誘導. 吉永麻里子、石黒奈穂子、村上太郎. 第 67 回日本栄養食糧学会大会. 名古屋市. 2013. (口頭発表)

5. Inactivity suppresses the expression of amino acid transporters in rat skeletal muscle. Murakami, T., Ishiguro, N., Yoshinaga, M. Experimental Biology 2013. Boston. 2013. (ポスター発表)

6. 持久運動とその後の不活動が骨格筋のアミノ酸輸送体の発現に及ぼす影響. 村上太郎、石黒奈穂子、吉永麻里子. 第 67 回日本体力医学会大会. 岐阜市. 2012. (口頭発表)

7. Endurance exercise induces autophagy associated with downregulation of mTORC1 signaling in rat liver. Murakami, T. and Yoshinaga, M. 15th International Biochemistry of Exercise Congress (IBEC). Stockholm. 2012. (ポスター発表)

8. 持久運動は骨格筋の REDD1 の発現を誘導することによって mTORC1 情報伝達経路を抑制する. 村上太郎. 第 66 回日本体力医学会大会. 下関市. 2011. (口頭発表)

9. Endurance exercise induces REDD1 expression in rat skeletal muscle. Murakami, T., Hasegawa, K., and Yoshinaga, M. "TOR, PI3K and Akt - 20 Years On" Conference. Basel. 2011. (ポスター発表)

10. 持久運動による腓腹筋における REDD1 発現の増大. 長谷川和哉、吉永麻里子、村上太郎

郎. 第 65 回日本栄養食糧学会大会. 東京.
2011. (口頭発表)

11. Exercise downregulates mTORC1 pathway through REDD1 expression in rat skeletal muscle. Murakami, T., Hasegawa, K., and Yoshinaga, M. ICCPB2011. Nagoya. 2011. (ポスター発表)

〔図書〕(計 3 件)

1. ドコサヘキサエン酸 (DHA) とエイコサペンタエン酸 (EPA).

村上太郎. サプリメントのほんとうソ (下村吉治編). 東京都. ナップ. p136-138. 2013.

2. アミノ酸系スポーツサプリメント ～アミノ酸やたんぱく質による筋肉たんぱく質合成の促進～. 村上太郎. 機能性アミノ酸・ペプチドの技術と市場. 東京都. シーエムシー出版. p12-21. 2012.

3. 運動と栄養. 村上太郎. イラスト運動生理学 (朝山正己編). 東京都. 東京教学社. p69-82. 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 太郎 (Murakami, Taro)
至学館大学・健康科学部・教授
研究者番号: 10252305

(2) 研究分担者

石黒 奈穂子 (Ishiguro, Nahoko)
至学館大学・健康科学部・助手
研究者番号: 10617260