

令和元年6月13日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07727

研究課題名(和文)メチオニンの骨格筋タンパク質代謝における経口投与と細胞に対する異なる作用の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of different effects of muscle protein metabolisms in oral administration and cultured cells by methionine

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Metをラットに経口的に投与するとMet代謝産物の血中濃度は増加したが、インスリンやグレリン濃度には変化はなかった。C2C12筋管細胞をMet処理したところ、分解の抑制は認められず、オートファジー活性も低下しなかった。Metの代謝産物でC2C12筋管細胞を処理したが、いずれも分解の抑制はしなかった。これらから、Metによる分解抑制はMetの代謝産物によるものではなことが示唆された。Ex vivoの系でMetの骨格筋タンパク質の分解速度に対する効果を検討したところ、速筋では分解抑制傾向が見られた。以上から、Metの骨格筋タンパク質代謝調節は速筋と遅筋で異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロイシンのタンパク質同化作用は多くの研究があるが、その他のアミノ酸については不明の点が多い。メチオニンはラットに対する作用と培養細胞に対する作用が異なることが明らかになり、その原因が骨格筋の種類による可能性が考えられるということは、加齢に伴う骨格筋萎縮防止を効果的に行うための基礎的知見になると考えられる。同化作用のあるアミノ酸の混合物が高齢化社会における動ける体作りに貢献する。

研究成果の概要(英文)：Oral administration of Met to rats increased blood levels of Met metabolites, but did not alter insulin levels or ghrelin levels. However, when C2C12 myotubes were treated with Met, no suppression of degradation was observed, and neither autophagy activity was reduced, but rather autophagy dysfunction was induced. The C2C12 myotubes were treated with metabolites of Met, but they did not suppress degradation. These results suggested that the suppression of muscle protein degradation by Met was not caused by the metabolites or hormones. We examined the effect of Met on the degradation rate of skeletal muscle protein in ex vivo. The degradation rate in fast twitch muscle protein was suppressed by Met. Therefore the regulation of skeletal muscle protein metabolism by Met may differ between fast and slow twitch muscles..

研究分野：栄養化学

キーワード：骨格筋タンパク質 タンパク質分解 アミノ酸 メチオニン オートファジー C2C12培養筋管細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）ロコモティブシンドローム

超高齢化社会を迎えるわが国において、年をとっても動ける体が社会の活力を維持する上で極めて重要である。加齢に伴い骨格筋量が減少し、運動能力の減退、いわゆるロコモティブシンドロームが起こる。これは筋虚弱（サルコペニア）と呼ばれ、移動の障害、骨折のリスク増加など大きな問題となる。さらに、サルコペニアの進展は活動量の減少だけではなく、疾病治癒の遅延を招き、医療費の増加の原因となる。そのためには骨格筋量の維持・増加が重要である。

（2）骨格筋萎縮抑制とアミノ酸

アミノ酸の中でも分岐鎖アミノ酸であるロイシン（Leu）に骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制する作用があることが明らかにされている。我々は Leu 以外にもリジン（Lys）やメチオニン（Met）が骨格筋タンパク質分解を抑制することを見出した。Lys についてはオートファジーの活性抑制を介した分解抑制機構を明らかにした^{①, ②}。しかし、Met については分解抑制機構の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

Met を経口的にラットに投与すると、骨格筋タンパク質（筋原線維タンパク質）の分解速度が低下するが、C2C12 筋管細胞では Met によるタンパク質分解抑制効果は認められなかった。本研究では、Met 摂取によって骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響を *in vivo* で再度確認するとともに、その際の Met や Met 代謝産物、ホルモンの血中濃度を詳細に検討し、ラットと培養筋細胞における Met のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

（1）Met 強制経口投与後の骨格筋タンパク質代謝の経時的変化

実験動物としては 3 週齢の Wistar 系雄ラットを 18 時間の絶食させた後に、体重 100 g 当たり Met (40.3 mg) を強制経口投与し、1 時間後、3 時間後、6 時間後のいずれかで屠殺した。

筋原線維タンパク質分解速度は、長指伸筋（速筋）とヒラメ筋（遅筋）を緩衝液中でインキュベーションし、放出された 3-メチルヒスチジン（MeHis）の量を HPLC で測定した。LC3-I と LC3-II、および Ser/Thr kinase の total 及びリン酸化フォームはウエスタンブロッティングにより評価を行った。筋特異的 ubiquitin-ligase E3 である atrogin-1 と MuRF1 の mRNA は qRT-PCR を用いて定量した。血清中アミノ酸濃度は全自動アミノ酸分析装置を用いて測定した。血清中のホモシステインは SBD-F 誘導体化後 HPLC で測定した。血清中のインスリン濃度とグレリン濃度は ELISA Kit を用いて測定した。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

(2) C2C12 筋管細胞における Met およびその代謝産物がタンパク質代謝に及ぼす効果

C2C12 筋芽細胞を筋管細胞への分化を誘導後、血清およびアミノ酸飢餓の状態に Met などの有無で培養し、その間に培地中へ放出された MeHis の量を HPLC で定量し分解速度を比較した。LC3-II および Ser /Thr kinase の total 及びリン酸化フォームをウエスタン・ブロッティングで検出した。C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に Met が及ぼす効果は SUnSET 法を用いて評価した。

(3) 単離筋肉切片を用いた *ex vivo* の Met の効果

ラット後肢筋から単離した長指伸筋とヒラメ筋をインスリン、Leu、Met 含有緩衝液中でインキュベーションし、分解速度とオートファジー活性を測定した。

4. 研究成果

(1) Met 強制経口投与後の骨格筋タンパク質代謝の経時的変化

Met (40.3 mg / 100 g 体重) 投与は投与 1 時間から 6 時間後まで筋原線維タンパク質の分解を抑制することが示された。LC3-II/LC3-I は Met 投与 1 時間、3 時間後に減少する挙動が認められたことから、Met の経口投与はオートファジーの抑制を介して筋原線維タンパク質分解抑制に寄与していることが示唆された。一方、「選択的オートファジーの基質」と考えられている p62、オートファジーの誘導段階を制御する Beclin-1 のタンパク質発現は、群間で有意差は認められなかった。一方、Met 投与時のユビキチン-プロテアソーム系の活性は減少せず、バルクのオートファジーを調節していることが考えられた。Akt の活性は Met 投与 3 時間後で有意な増加が認められたが、その下流の mTOR、S6K1、4E-BP1 の活性に群間で有意差は認められなかった。また、Met は投与 3 時間後において Akt の活性を増加させることが示唆された。したがって、Met 投与によるオートファジー抑制効果には Akt が関与していると考えられる。

血清中の Met 濃度は投与 1 時間後に最も高く、以降は投与時間依存的に減少した。Met 投与時に Met 代謝産物であるホモシステイン (Hcy) やシスタチオン (Cysta)、システイン

(Cys)、S-アデノシルメチオン (SAM) および S-アデノシルホモシステイン (SAH) 濃度も投与 1 時間後から顕著に増加した。血清中インスリン濃度と活性型グレリン濃度、非活性型グレリン濃度は、Met 投与による変化は認められなかった。

(2) C2C12 筋管細胞における Met およびその代謝産物がタンパク質代謝に及ぼす効果

対照群と比較して Leu、Lys 処理では減少が認められたが、Met では Con 群と差は認められなかった。また、オートファジー活性を示す LC3-II/LC3-I はアミノ酸無添加時と比較して Lys

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

あるいは Leu で減少したが、Met 処理時には減少はなかった。したがって、Met は C2C12 筋管細胞においてオートファジー活性を抑制しないことが示唆された。次いで LC3-II flux を確認した^③。Leu を添加した群でも阻害剤により LC3-II の増加する挙動が認められたが、その蓄積はアミノ酸無添加群と比較して顕著に少なかった。しかし、Met のみを添加した群ではアミノ酸と阻害剤の処理をしない群と比較して LC3-II 量が多く、その量は阻害剤を添加しても大きく変化しなかった (Fig. 1)。これは LC3-II を形成し、目的タンパク質をオートファジーによって分解しようとしているが、その分解ができていないことを示しており、Met は C2C12 筋管細胞においてオートファジー活性を抑制せず、むしろリソソームと融合して分解する段階を阻害し、オートファジーの不全を誘導している可能性が示唆された。Met 代謝産物が骨格筋タンパク質分解抑制効果を有しているか確認するために、LC3-II flux よりオートファジー抑制効果の有無について検討した。Met 代謝産物の一つである Cys で C2C12 筋管細胞を処理した場合、Met と同様に C2C12 筋管細胞においてオートファジー活性を抑制せず、むしろリソソームと融合して分解する段階を阻害し、オートファジーの不全を誘導している可能性が示唆された (Fig.2)。他の Met 代謝産物でも同様の結果が得られた。

C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度は Leu 群で増加傾向が認められたが Met 群では増加は認められなかった。したがって、Met は Leu などとは異なり、C2C12 筋管細胞においてタンパク質合成を促進しないことが示唆された。タンパク質代謝を制御する Ser/Thr kinase のうち、mTOR とその下流の 4E-BP1、mTOR の上流を制御している Akt のリン酸化率は Met で減少する挙動があり、タンパク質合成には培養細胞系では影響しないことが示された。

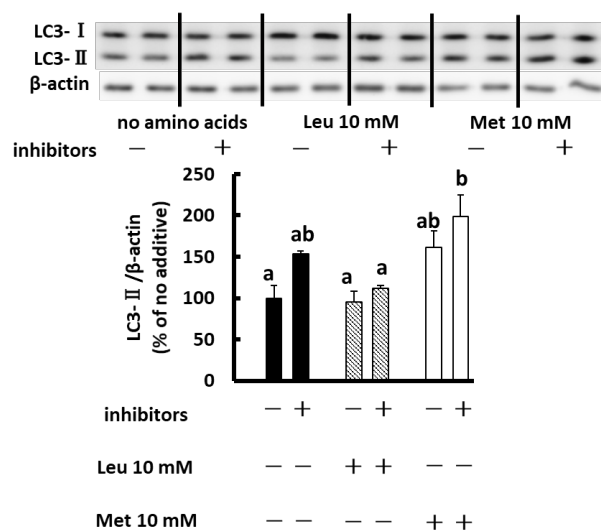


Fig. 1 Leu、Met 処理時の C2C12 筋管細胞における LC3-II flux

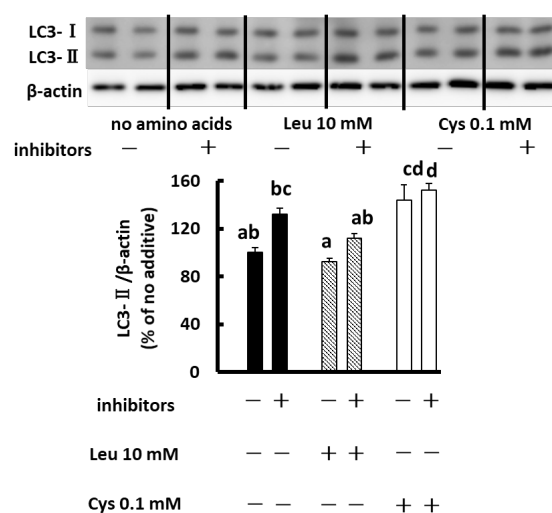


Fig. 2 Leu、Cys 処理時の C2C12 筋管細胞における LC3-II flux

(3) 単離筋肉切片を用いた *ex vivo* のメチオニンの効果

ヒラメ筋や長指伸筋を緩衝液中でインキュベーションし、放出されてきた MeHis 量から分解速度を求める *ex vivo* の方法を用いて、緩衝液に Met を添加して Met の分解抑制機構の検討を行った。しかし、単離筋肉切片から放出される MeHis 量に比べ、添加した Met は大過剰であり、そのままでは HPLC では Met の大きなピークにかぶるため MeHis を測定することはできなかった。そこで、陽イオン交換の固相抽出カラムである Inert Sep MC-1 を用いて Met などの中酸性アミノ酸を低濃度のピリジン水溶液で除き、固相抽出カラムに保持されている MeHis をやや濃い濃度のピリジン水溶液で溶出する方法で MeHis を単離した。ラットから摘出した長指伸筋とヒラメ筋を Met を含む緩衝液でインキュベーションしたところ、長指伸筋において 1mM Met 群で有意な減少が認められた (Fig. 3)。

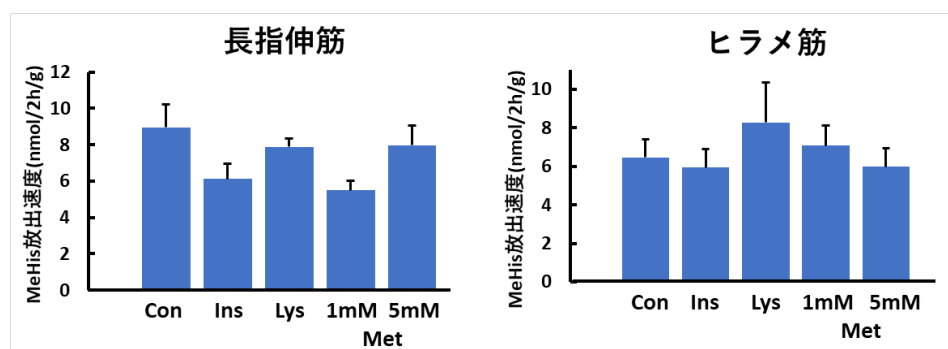


Fig. 3 Met 処理した長指伸筋とヒラメ筋からの MeHis 放出速度

以上より、*in vivo* で認められた Met の骨格筋タンパク質分解抑制作用が培養筋細胞で認められなかった理由のひとつに、速筋と遅筋という骨格筋の性質の違いが考えられる。加齢によるサルコペニアの発症において主に萎縮するのは速筋線維である^④。今後、筋肉の種類に対するタンパク質合成系、分解系の応答についてさらに検討する必要がある。

〈引用文献〉

- ① Sato T, Ito Y, Nedachi T, Nagasawa T (2014) Lysine suppresses protein degradation through the autophagic-lysosomal system in C2C12 myotubes. *Mol Cell Biochem* 391: 37-46.
- ② Sato T, Ito Y, Nagasawa T. (2016) Regulatory effects of the L-lysine metabolites, L-2-aminoadipic acid and L-pipecolic acid, on protein turnover in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem* 80: 2168-2175.
- ③ Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140 : 313-326.

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

④ Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S (2013) Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2191-2199.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕計1件

長澤孝志 (2018) アミノ酸による骨格筋タンパク質分解抑制機構に関する研究. *日本栄養・食糧学会誌* 71: 3-10. DOI, <https://doi.org/10.4327/jsnfs.71.3>（査読有）

〔学会発表〕計5件

- ① 長澤孝志. アミノ酸による骨格筋萎縮抑制. *日本外科代謝栄養学会第58回学術集会* (2019)
- ② 長澤孝志, 村松菜緒, 佐藤友紀, 山本欣郎, 伊藤芳明. 2型糖尿病モデルマウスにおけるリジン添加食による脂質代謝の調節. *日本アミノ酸学会第12回学術大会* (2018)
- ③ 佐々木祐哉, 伊藤芳明, 長澤孝志. メチオニン投与後の骨格筋タンパク質代謝の変化. *日本アミノ酸学会第11回学術大会* (2017)
- ④ 長澤孝志. アミノ酸による骨格筋タンパク質分解調節機構に関する研究. *第71回日本栄養・食糧学会大会* (2017)
- ⑤ 佐々木祐哉, 伊藤芳明, 長澤孝志. *In vivo* と *in vitro* におけるメチオニンによる骨格筋タンパク質分解抑制. *日本アミノ酸学会10周年記念大会* (2016)

〔図書〕計0件

〔産業財産権〕計0件

〔その他〕計0件

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし