

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K12721

研究課題名（和文）筋萎縮からの回復を促進するポリフェノールとタンパク質との相乗効果解明

研究課題名（英文）Synergistic effect of polyphenol and protein to promote recovery from muscle atrophy

研究代表者

向井 理恵（MUKAI, Rie）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・准教授

研究者番号：90547978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、筋萎縮からの筋肉回復に対するポリフェノールの効果を発揮する栄養素の要件としてタンパク質充足が必要か否かを明らかにすることを目的として研究を実施しました。私たちの研究結果ではフラボノイドが筋肉の回復に有益な効果を発揮するには、基本的な栄養素としてのタンパク質の充足が必要であることを明らかとしました。メカニズム解析として、タンパク質の利用効率の指標であるアミノ酸量やそのトランスポーターの発現を確認しましたが、それらにはポリフェノールの投与量に関連した結果は得られませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリフェノールの生理機能性研究では、ある条件下での効果に着目し研究を進めることが多い。一方、日常の食生活を基盤としたポリフェノールの機能性研究は疫学調査が中心であった。本課題はこれらの溝を埋めるべく、食に含まれる栄養素の違いによってポリフェノールの生理活性に変化がでることを明らかにしようとする試みであった。本申請課題の遂行により、ポリフェノールが食品成分として骨格筋萎縮に対する予防機能を発揮する要件として、タンパク質栄養の充足の重要性を示唆することができた。本成果は食生活における骨格筋維持に対する食品成分の役割を明らかにすることに繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）： It has been demonstrated that the synergistic effect of polyphenol and protein on muscle recovery from muscle atrophy. Our result indicated that satisfaction of protein as a basic nutrient was necessary for exerting beneficial effect of flavonoid on muscle recovery. However, the amount of free amino acid, and the gene expression of amino acid transporters in skeletal muscle were not regulated by polyphenol intake.

研究分野：機能性食品学

キーワード：フラボノイド ポリフェノール タンパク質 アミノ酸 骨格筋 筋萎縮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

寝たきりになる人口を減らすために、廃用性筋萎縮の予防・改善が望まれている。これまでに、筋量調節に有用な栄養素としてアミノ酸類が報告されているが、それを補助できる食品成分の探索は少なく、それら成分の作用機序の解明もいまだ十分ではなかった。

骨格筋を構成するタンパク質は、合成と分解が繰り返している。この筋合成と筋分解のバランスには、IGF-1 (インスリン様成長因子)シグナル経路が関与している。筋合成時には、IGF-1 が受容体に結合することで、その下流にある PI3K/Akt 経路が活性化し、その結果筋タンパク質合成が促進し、分解が抑制される。

申請者はすでにポリフェノールの一種であるポリフェノールが筋萎縮関連遺伝子を抑制し「廃用性筋萎縮を予防する」とことと IGF-1 経路を活性化して「廃用性筋萎縮からの回復を早める」ことを動物実験で見出した(J. Nat. Prod., 73. 1708-, 2010, PLoS One, 7, e45048-, 2012、日本栄養食糧学会大会 2014 年)。特に、廃用性筋萎縮からの骨格筋合成促進効果は、申請者が世界で初めて見出したポリフェノールの機能性である。これらのポリフェノールが効果を発揮する栄養組成の条件を突き止めることが食生活を通じた筋萎縮の予防に繋がると考え、この研究を計画した。

2. 研究の目的

ポリフェノールの骨格筋合成促進を証明した実験では、ポリフェノール未配合の群とポリフェノール群の摂餌量、体重には変化が無かった。これはポリフェノール摂取が骨格筋内タンパク質の代謝回転を変化させ、タンパク質やアミノ酸の利用効率を変化させた結果だと提案するものである。そこで、本研究では、タンパク質の供給量の違いや、タンパク質源を変化させた場合のポリフェノールによる骨格筋合成促進効果の解明と、窒素出納などのアミノ酸利用効率について明らかにすることを目的として課題を遂行した。

3. 研究の方法

(1) ポリフェノールの筋回復促進効果に対するタンパク質量の影響

関節固定具を用いて足首関節の不動化を 2 週間行う。この筋萎縮誘導期間に給餌するタンパク質源はカゼインとし、AIN-93G の組成に従って供給した。ポリフェノールの添加は行わなかった。これにより廃用性筋萎縮の状態にしたマウスを作製した。萎縮が十分に起こった時点で、固定具を解除し、飼料組成を変更した。飼料組成はタンパク質含量を AIN - 93G と同等、それより低いものを設定し、ポリフェノールの添加を行った。ポリフェノールの非添加群はそれぞれのタンパク質量で調整した飼料を与えた。固定具解除により骨格筋は回復期に入った。継続的に解剖を行った。

評価項目

ポリフェノールの効果用量の検討とその作用メカニズム解析。

骨格筋湿重量の変化をモニターすることで効果を確認した。

それぞれの飼育条件によって変化するタンパク質合成経路の探索は、メタボローム解析を用いて評価する。

アミノ酸出納に影響を及ぼすトランスポーター発現量の確認

(2) アミノ酸取り込み量の測定

骨格筋由来培養細胞 C2C12 を用いた検討を行った。細胞ヘトリチウムラベルしたアミノ酸を処理し、経過時間的な取り込み量を測定した。

4. 研究成果

(1) 各評価項目に対する成果

ポリフェノールの骨格筋回復について、雄ならびに雌のマウスを使って検討を行った。その結果、雌雄のいずれにおいてもポリフェノールの骨格筋回復促進効果を確認することができた。ポリフェノールの効果用量を検討した研究では、体重当たり 1 mg/kg 以上で効果を示すことを明らかにした。

これらの研究において作用メカニズムを確認したところ、骨格筋内の Akt のリン酸化が増加していることを明らかにした。この結果を受け骨格筋タンパク質合成に関連した経路として mTOR/Akt/P70S6K1 に関連した因子のリン酸化状態をウエスタンブロット法で確認した。その結果、ポリフェノールによって活性化する傾向が認められた。特に、萎縮がかかった場合に影響が強いことが示唆された。

このように骨格筋タンパク質の合成が促進されたことから、血中の成長因子 IGF-1 の濃度を測定したところ、ポリフェノール投与群で有意な高値であった。このことは、ポリフェノールが成長因子の分泌を活性化させていることを示唆している。さらに培養細胞を用いた検討では、ポリフェノールが mTOR/Akt/P70S6K1 を活性化させる濃度に有効濃度域があることを突き止めた。したがって、ポリフェノールの機能を発現するための受容システムが存在することが推察された。

骨格筋湿重量の変化をモニターすることで効果を確認したところ、タンパク質が充足している場合に骨格筋量の回復が維持されたが、タンパク質量が少ない場合にはそれが低下し

た。

それぞれの飼育条件によって変化するタンパク質合成経路の探索について、メタボローム解析を実施したところ、ポリフェノールの容量に依存した代謝物の変動は得られなかった。むしろ、低濃度側で変化する代謝物が多いことが分かった。骨格筋合成への寄与が考えられる分岐差アミノ酸については、ポリフェノールの影響を受けなかった。

アミノ酸出納に影響を及ぼすトランスポーター発現量の確認をリアルタイム PCR で行ったところ、ポリフェノールの投与によりその発現が低下することが分かった。

培養細胞を用いたアミノ酸取り込みの実験系構築に取り組んだ。しかしながら、安定した結果を得るに至らず、継続課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mukai Rie	4. 巻 82
2. 論文標題 Prenylation enhances the biological activity of dietary flavonoids by altering their bioavailability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 207 ~ 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1415750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mukai R, Horikawa H, Lin PY, Tsukumo N, Nikawa T, Kawamura T, Nemoto H, Terao J.	4. 巻 311
2. 論文標題 8-prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	6. 最初と最後の頁 R1022-R1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00521.2015	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 向井理恵	4. 巻 54
2. 論文標題 植物ポリフェノールによる筋萎縮予防の可能性	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本農芸化学会誌「化学と生物」	6. 最初と最後の頁 841-846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 向井理恵
2. 発表標題 食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会（例会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向井 理恵
2. 発表標題 フラボノイドのプレニル化による生体利用性の変化と機能性の増強
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部・第 23 回若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 向井理恵
2. 発表標題 食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高瀬貴仁、小林直之、井上孝司、土屋陽一、向井理恵
2. 発表標題 レモン果皮抽出物の筋委縮予防効果について
3. 学会等名 日本食品科学工学 第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中寛人、西海信、堤理恵、向井理恵
2. 発表標題 筋タンパク質合成時にプレニルナリンゲニンが引き起こす骨格筋内代謝物の変動
3. 学会等名 日本ポリフェノール学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Mukai, Hisao Nemoto, Junji Terao
2. 発表標題 Estrogenic activity of 8-prenylnaringenin improve skeletal muscle regeneration from disuse muscle atrophy by activating IGF-I/PI3K/Akt pathway
3. 学会等名 ICoFF2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahito Takase, Naoyuki Kobayashi, Takashi Inoue, Yoichi Tsuchiya, Rie Mukai
2. 発表標題 Preventive effect of dietary lemon peel extract containing eriocitrin on disuse muscle atrophy in denervated mice
3. 学会等名 ICoFF2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Okuyama, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro, Rie Mukai
2. 発表標題 Binding profile of quercetin and its derivatives to human serum albumin measured by multiplex drug-site mapping
3. 学会等名 ICPH2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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