

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500573
 研究課題名（和文） 筋肉のエネルギー状態が運動や摂食によるタンパク合成に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Modification of exercise and feeding-induced protein synthesis by energy status in rat skeletal muscle

研究代表者
 村上太郎（Murakami Taro）
 中京女子大学・健康科学部栄養科学科・教授
 研究者番号：10252305

研究成果の概要：筋肉は自らの栄養状態や張力を感じ適応してゆく可塑性を有しているが、筋肉内の栄養状態を変化させることによって運動や食事によるタンパク翻訳反応を増大させることができれば、より効率的かつ合理的な筋タンパク合成法を提案することが出来る。本研究では、絶食や運動によって筋肉が低エネルギー状態におかれた状況で食事を摂取するとタンパクの合成が大きくなるか否か、また、運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取することによって運動によるタンパク合成の低下やタンパク分解の促進を抑制できるか否かについて検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：運動栄養学、運動と代謝

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：骨格筋、タンパク質合成、エネルギー状態、BCAA、mTOR、4E-BP1、オートファジー、LC3

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の筋骨減弱症（サルコペニア・オステオペニア）の防止は喫緊に対応せねばならない重要課題の一つである。最近の運動栄養学研究によって、筋肉をはじめとした体タンパクの合成を効率よく増大させる方法として「運動＋運動直後の食事」が有効であることが明らかにされ、サルコペニア・オステオペニアを防ぐ方法としてのみならず運動選手の筋肉づ

くり法としても認識されつつある。この体づくり法の科学的根拠は、1) 運動によるタンパク質の同化作用、2) 食事によるタンパク質の同化作用、および、3) 体タンパク合成のためのタンパク源（アミノ酸）の供給、の3つの作用がタイミング良く組み合わせることによって、タンパク合成における翻訳段階の活性が高まることによる。

タンパク合成の翻訳段階を調節する細胞内情報伝達因子として mammalian target of

rapamycin (mTOR)が知られている (Hay and Sonenberg, *Genes Dev.* 18: 1926-1945, 2004)。mTOR はその下流に存在する p70S6kinase (p70^{S6K1}) や eukaryotic initiation factor (eIF)4E binding protein-1 (4EBP-1)をリン酸化し、翻訳開始段階を活性化する。運動は、protein kinase B (PKB)/Akt を介して mTOR を活性化することが報告されている (Atherton et al., *FASEB J.* 19: 786-788, 2005)。一方、食事はその中に含まれるタンパク質由来の分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acid: BCAA) が運動とは異なった未発見の経路を介して mTOR を活性化すること、また、食事摂取にともなって分泌されるインスリンが PKB/Akt 経路を介して mTOR を活性化することが知られている (Kimball and Jefferson, *J. Nutr.* 136: 227S-231S, 2006)。このように運動+直後の食事摂取の情報は、最終的に mTOR に集約され、タンパク合成の翻訳段階を活性化する。

ところで、筋肉は自らの栄養状態や張力を感受し適応してゆく可塑性を有しているが、筋肉内の栄養状態を変化させることによって運動や食事によるタンパク翻訳反応を増大させることができれば、より効率的かつ合理的な筋タンパク合成法を提案することが出来る。最近、筋肉内のエネルギー状態が運動やインスリンによるグルコースの取り込みやグリコーゲンの合成に影響を及ぼすことが明らかにされてきた。例えば、筋肉内のグリコーゲンが枯渇しているときには運動によるインスリン感受性の上昇が認められるが、筋肉内にグリコーゲンが充たされているときには認められない (Cartee et al., *Am. J. Physiol.* 258: E390-E393, 1990)。また、筋肉内のグリコーゲンが枯渇しているときには運動によって糖代謝活性化に関する遺伝子の発現が高まるのに対して、グリコーゲンが充たされているときにはそれらの遺伝子発現が起こらない (Pilegaard et al., *J Physiol.* 541: 261-71, 2002; Hansen et al., *J. Appl. Physiol.* 98: 93-99, 2005)。これらの現象がおこるメカニズムは未だ解明されていないが、筋肉細胞のエネルギー状態が低下した状況では、その後の運動や栄養摂取によって糖質の同化反応が大きくなることを示している。一般的に体内で各栄養素 (糖質・脂質・タンパク質) の同化反応と異化反応は同調することを考えると、筋肉細胞内のエネルギー状態が低下した状態での運動や摂食は、糖質だけでなくタンパク質の同化も増大させる可能性を示唆している。実際、申請者らはラットを用いた予備実験において、給餌後6時間もしくは24時間の時点でロイシンを経口投与したところ、骨格筋の 4EBP-1 のリン酸化は食後6時間に比べて24時間で約60%大きくなることを見いだ

した。

2. 研究の目的

本研究では (1) 筋肉内グリコーゲンが枯渇した状態 (筋肉が低エネルギー状態におかれた状況) で食事を摂ると、筋肉内にグリコーゲンが充たされているときに比べてタンパク合成反応が大きいかな否か? (2) 筋肉内のグリコーゲンが枯渇した状態 (筋肉が低エネルギー状態におかれた状況) での運動+直後の食事は、グリコーゲンが充たされているときに比べてタンパクの合成反応が大きいかな否か? (3) ラットにおけるレジスタンス運動モデルの構築 (4) 運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取することで骨格筋における運動中のタンパク質合成の低下を抑制できるかな否か? (5) 運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取することで肝臓における運動中のタンパク質分解を抑制できるかな否か?以上5つの仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

いずれの研究も SD 系の雄ラットを用いて実施した。研究 (1) では、ラットを1日2食制のミールフィーディングで2週間飼育した後、6, 24, もしくは48時間の絶食を負荷し、その直後に BCAA の中でもタンパク質の合成を増大させる作用を有するロイシンを経口投与した。投与1時間後にラットを屠殺し、腓腹筋と肝臓を摘出した。各組織のタンパク質合成を 4E-BP1 のリン酸化を指標にして検討した。研究 (2) では、ラットを1日2食制のミールフィーディングで2週間飼育したが、その期間中、暗期の最後の1時間にトレッドミルを用いて持久走 (26 m/min) を負荷した。実験最終日には、最後の給餌から3, 6, もしくは24時間の時点でラットに60分間の持久走 (26 m/min) を負荷し、運動直後にロイシンを経口投与した。投与1時間後にラットを屠殺し、腓腹筋を摘出した。腓腹筋のタンパク質合成を 4E-BP1 のリン酸化を指標にして検討した。研究 (3) では、ラットのレジスタンス運動モデルを構築するために、ラットにスクワット運動をさせるためのオペラントケージを作製した。ラットに、音と光の情報をもとにケージの側面に取り付けてあるレバーを押すことを学習させ、次第にレバーの設置位置を高くすることにより、スクワット運動を負荷した。また、ラットに重り入りのベストを着用させ、骨格筋への負荷を調節した。最終運動の49時間後にラットを屠殺し、ヒラメ筋、腓腹筋、および長指伸筋を採取し、各筋肉の重量を測定した。また、形態学的手法を用いて、ヒラメ筋と長

指伸筋の筋線維の横断面積を測定した。研究(4)および(5)では、ラットにトレッドミル走を負荷する30分前の時点でラットにBCAA混合液を経口投与し、60分間の持久運動(26 m/min)の直後にラットを屠殺して腓腹筋を摘出した。腓腹筋のタンパク質合成を4E-BP1のリン酸化を指標にして検討した(研究4)。研究(5)では、持久運動直後に肝臓を摘出し、タンパク質分解(オートファジー)の指標としてオートファゴゾームの数とLC3-IIタンパク質の発現を定量した。

4. 研究成果

(1) 筋肉内グリコーゲンが枯渇した状態(筋肉が低エネルギー状態におかれた状況)で食事を摂ると、筋肉内にグリコーゲンが充たされているときに比べてタンパク合成反応が大きいかな否か?

骨格筋のグリコーゲンが枯渇している時は、グリコーゲンが充たされている時に比べ、タンパク質合成が大きくなることが知られている。三大栄養素の異化・同化代謝は多くの場合同調して起こることを考えると、筋肉のタンパク質合成も筋グリコーゲン含量が減少している時に大きくなると考えられる。そこで本研究では、6、12、および24時間の絶食がロイシン投与により、筋肉と肝臓でのタンパク質合成反応を高めるか否かについて4E-BP1のリン酸化状態を指標とし検討した。その結果、腓腹筋、肝臓ともに4E-BP1の γ -formの比率は各絶食群においてロイシン投与群が最も高値を示した。しかし、ロイシン投与群では絶食時間の違いによる γ -formの比率に有意な差はみられず、これによりタンパク質合成反応が絶食時間の延長によって増大しない可能性が示唆された(図1)。

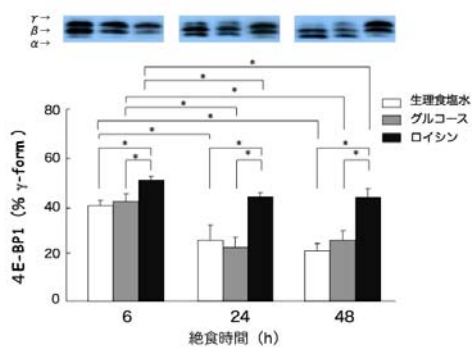


図1. 絶食時間の違いがロイシン投与による腓腹筋の4E-BP1のリン酸化に及ぼす影響

この結果は仮説と反するものであったが、その理由として、タンパク質の合成反応を測定したタイミングがロイシン投与1時間後の一時点であり、投与後における各組織のタンパク合成の大きさが結果に反映されていない可能性が考えられる。ロイシン投与後のタンパク合成を評価するためには、4E-BP1のリン酸化状態を経時的に定量し、

曲線下面積の大きさを比較する必要があると考えられる。

(2) 筋肉内のグリコーゲンが枯渇した状態(筋肉が低エネルギー状態におかれた状況)での運動+直後の食事は、グリコーゲンが充たされているときに比べてタンパクの合成反応が大きいかな否か?

絶食によって肝臓や筋肉が低栄養状態(あるいはタンパクの異化代謝が促進した状態)にさらされると、その後に摂取するロイシン(栄養素)によってより大きなタンパク合成が誘導される可能性が考えられる。そこで本研究では、絶食をしたラットにさらに持久運動を負荷して組織のエネルギー状態を低下させたところにロイシンを投与することによって、絶食時よりも大きなタンパク合成が導かれるかな否かを検証した。その結果、仮説に反して、ロイシンによる筋肉での4E-BP1のリン酸化は、絶食に運動を加えることによって増大せず、逆に減少した(図2)。

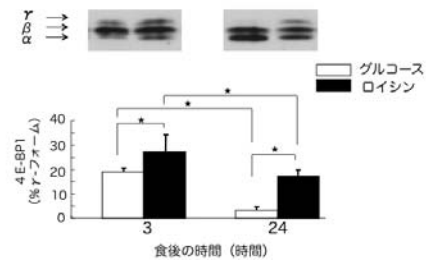


図2. 絶食と運動の組み合わせが腓腹筋のロイシン投与による4E-BP1のリン酸化に及ぼす影響

これまでの研究によると、運動中は持久運動もしくはレジスタンス運動に関係なく筋肉でのタンパク合成を低下させることが知られている。本研究では持久運動直後にロイシンを投与し、その1時間後にラットを屠殺したが、この時点では持久運動による翻訳段階の活性抑制作用が残存していた可能性が考えられる。したがって、研究1同様にロイシン投与後のタンパク合成を評価するためには、4E-BP1のリン酸化状態を経時的に定量し、曲線下面積の大きさを比較する必要があると考えられる。

(3) ラットにおけるレジスタンス運動モデルの構築

研究2の仮説を明らかにできなかった理由のひとつに、実験に用いた運動モデルが適切でなかった可能性が考えられる。すなわち、運動による骨格筋の肥大を評価するためには、持久運動モデルではなくレジスタンス運動モデルを用いる必要があったのではないかと考えられた。そこで本研究では、ラットにスク

ワット運動を学習させ、麻酔や電気刺激を用いないレジスタンス運動モデル系を構築することを目的とした。ラットに音と光の情報のもとに、オペラントケージの側面に取り付けてあるレバーを押すことを学習させ、次第にレバーの設置位置を高くすることにより、スクワット運動を負荷した。8週間のスクワットトレーニングによって、ラットの長指伸筋の重量が有意に増大した。

(4) 運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取することで骨格筋における運動中のタンパク質合成の低下を抑制できるか否か？

BCAA (特にロイシン) は 4E-BP1 をリン酸化して、翻訳段階を活性化することでタンパク質の合成を促進することが明らかにされている。骨格筋において、運動中はタンパク質の分解が促進し、合成が低下するが、BCAA を運動前に摂取しておけば BCAA が 4E-BP1 のリン酸化を介してタンパク質の合成を高め、運動中のタンパク質の合成低下を抑制しタンパク質合成促進のタイミングを早められる可能性がある。本研究ではこれを明らかにするため、BCAA を投与したラットに持久運動 (28 m/min, 90 min) を負荷し、運動直後に屠殺して腓腹筋を摘出、4E-BP1 のリン酸化状態を評価した。その結果 4E-BP1 γ -form と β -form の合計が全体に占める割合 (% $\gamma + \beta$ -form) は運動により低下したが、その割合は BCAA 投与で有意に減少した ($p < 0.05$) (図 3)。

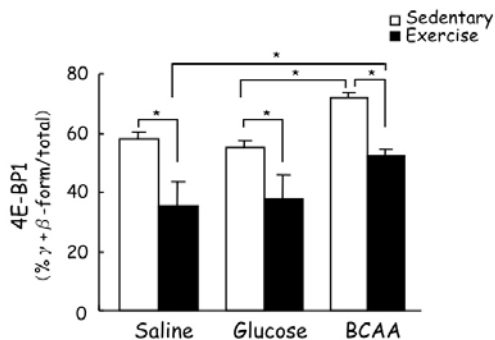


図3. 運動前のBCAA投与が腓腹筋における運動後の4E-BP1のリン酸化に及ぼす影響

以上の結果より、運動によりタンパク質の合成は低下するが、運動前に BCAA を摂取しておくことにより運動中のタンパク質合成低下が抑制でき、運動後に大きなタンパク質合成を誘導できる可能性が示唆された。

(5) 運動前に分岐鎖アミノ酸を摂取することで肝臓における運動中のタンパク質分解を抑制できるか否か？

運動時には骨格筋のエネルギー需要が著しく増大するため、全身に貯蔵されているエネルギー源の異化代謝経路が活性化される。肝臓においては、グリコーゲンの分解が高まるだけでなく、糖新生の材料である糖原性アミノ酸を得るために、タンパク質の分解も増大

する。また、このときの肝臓タンパク質の分解は、主にリソソーム系のタンパク分解系であるオートファジーによって起こることが知られている。一方、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は、肝臓のタンパク質合成を高め、反対に分解を抑制する作用を有すること、また、運動時に肝臓でよく酸化されることが知られている。そこで、本研究では、持久運動前の BCAA 摂取が、肝臓のオートファジーを抑制するか否かを明らかにすることを目的とした。電子顕微鏡を用いて肝臓のオートファゴソームの数を計測したところ、オートファゴソームは持久運動によって著しく増大することが明らかになった (図 4)。

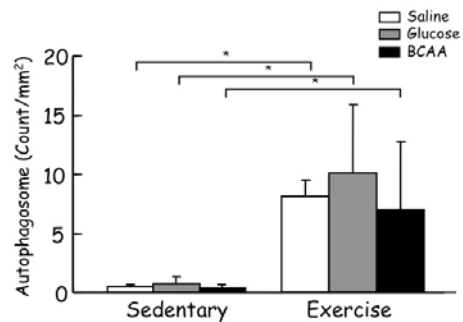


図4. 運動前のBCAA投与が肝臓のオートファゴソームに及ぼす影響

オートファゴソームの出現は、運動前の BCAA 投与によって低下する傾向にあったが、有意な差は認められなかった。肝臓における LC3 - II/LC3 - I 比は持久運動によって著しく増大した (図 5)。

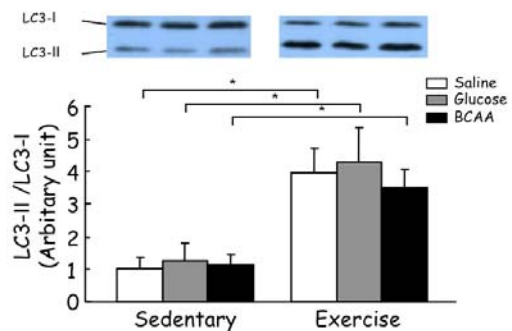


図5. 運動前のBCAA投与が肝臓のLC3-IIの発現に及ぼす影響

持久運動によって増大した LC3 - II/LC3 - I 比は、運動前の BCAA 投与によって低下する傾向にあったが有意な差は認められなかった。以上のことから、本実験で適用した強度の持久運動によって、肝臓のオートファジーが誘導されること、また、運動前の BCAA 摂取は肝臓における持久運動誘導性のオートファジーを抑制でき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 Gustavo Bajotto, Taro Murakami, Masaru Nagasaki, Yuzo Sato, and Yoshiharu Shimomura. Decreased enzyme activity and contents of hepatic branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex subunits in a rat model for type 2 diabetes. *Metabolism – Clinical and Experimental*, in press. 査読あり

② 吉永麻里子、村上太郎

持久運動前の分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 投与が肝臓および骨格筋グリコーゲン含量に及ぼす影響、中京女子大学研究紀要、41:59-64、2007 査読あり

③ 吉永麻里子、伊藤亜沙美、吉澤貴子、村上太郎

持久運動前の分岐鎖アミノ酸投与による筋肉における eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 のリン酸化の増大、中京女子大学研究紀要、42:79-86、2008、査読あり

[学会発表] (計 4 件)

① 村上太郎

分岐鎖アミノ酸が肝臓における持久運動誘発性のオートファジーに及ぼす影響、第64回日本体力医学会大会、2009年9月(演題登録済み)、新潟市

② 吉永麻里子、村上太郎

持久運動前の分岐鎖アミノ酸摂取が肝臓のオートファジーに及ぼす影響、第 63 回日本栄養食糧学会、2009年5月21日、長崎市

③ Taro Murakami, Ryoko Sakamoto, Saburo Sugiyama, Kazuhito Sakae, Akira Kitagawa, Tomoko Higuchi, Koichiro Hamada, Satoru Mori, Relationship between mood profiles and plasma tryptophan ratio during the competition period in elite female wrestler, *APS Integrative Biology of Exercise* 2008, Sept, 27, 2008, Hilton Head, SC, USA

④ 吉永麻里子、伊藤亜沙美、吉澤貴子、村上太郎

持久運動前の分岐鎖アミノ酸投与による筋肉における eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 のリン酸化の増大、第 62 回日本栄養食糧学会、2008年5月3日、

川越市

[図書] (計 2 件)

① 村上太郎

真興交易、身体トレーニングの科学 (宮村実晴編)、2009年、427ページ (セクション 11、運動トレーニングと骨格筋のタンパク質代謝、p336-343 を執筆)

② 村上太郎

中央法規出版、最新栄養学、2007年、204ページ (第 6 章 栄養素の代謝のうち p120 から p145 を執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上太郎 (MURAKAMI TARO)

中京女子大学・健康科学部・教授

研究者番号：10252305

(2) 研究分担者

吉永麻里子 (YOSHINAGA MARIKO)

中京女子大学・健康科学部・助手

研究者番号：20440646