

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05909

研究課題名(和文) シトルリンによるアミノ酸の骨格筋萎縮抑制作用の増強

研究課題名(英文) Stimulation of suppressing effects of muscle atrophy by citrulline

研究代表者

長澤 孝志 (Nagasawa, Takashi)

岩手大学・農学部・嘱託教授

研究者番号：80189117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会においては加齢に伴う骨格筋量の減少を抑制することが重要である。タンパク質を構成しないアミノ酸であるシトルリンをラットに投与すると骨格筋タンパク質の分解の抑制、合成の促進を示した。ところがロイシンなどとは異なり摘出筋肉や培養筋細胞ではその効果が認められなかった。シトルリンの代謝産物であるアルギニンにはラットではシトルリンの効果を増強したが、培養筋細胞では効果がなかった。しかし、培養細胞において、量は少なくとも多くのアミノ酸が存在している状態ではシトルリンの分解抑制、合成促進作用が示され、シトルリンの作用発現には他のアミノ酸の存在が重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

著しい高齢化社会を迎えた我が国において、社会の活力を維持するためには高齢者の活躍が必要である。加齢に伴う骨格筋量の減少がフレイル、ロコモティブシンドロームの原因となり、医療費、介護費の増大に繋がる。これらを防止するためには骨格筋量を維持する必要があり、適度な運動とタンパク質の摂取が重要である。本研究では、アミノ酸の一つであるシトルリンが骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することを見出し、この作用にはシトルリンだけではなく他の多くのアミノ酸の存在が重要であることを初めて示した。サプリメントなどでシトルリンを用いる場合の組成設計に重要な知見を与えた。

研究成果の概要(英文)：It is important to suppress the decrease in skeletal muscle mass associated with aging. When citrulline, an amino acid that does not constitute a protein, was administered to rats, it showed suppression of degradation of skeletal muscle protein and stimulation of synthesis. However, unlike leucine, the effect was not observed in the isolated muscle tissue and cultured muscle cells. Arginine, a metabolite of citrulline, enhanced the effect of citrulline in rats, but not in cultured muscle cells. However, in cultured cells, citrulline suppressed protein degradation and stimulated protein synthesis in the presence of many amino acids. Therefore, it is necessary to be the presence of other amino acids when citrulline stimulates muscle hypertrophy.

研究分野：栄養化学

キーワード：シトルリン タンパク質分解 タンパク質合成 骨格筋 アルギニン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2025年には200万人の要介護者が存在すると言われ、健康長寿の延伸がきわめて重要である。健康寿命の延伸においては、動ける体が重要な意味を持つ。骨格筋は加齢に伴いその量と力が減少するサルコペニアが起こる。適度な運動による物理的刺激は骨格筋量の増加を促すが、サルコペニア防止のもう一つの有効な手段が栄養学的なアプローチである。

タンパク質やアミノ酸、フラボノイド、カロテノイドなどいくつかの食品成分による萎縮抑制が報告されている。私たちを含め多くの報告でロイシン (Leu) は骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することを明らかにした (*Amino Acids* **37**: 609, 2009)。さらに、私たちはアミノ酸のリジン (Lys) にも強い骨格筋萎縮抑制作用があることを見出し (*SpringerPlus* **3**: 582, 2014)、この作用は加齢モデル動物でも確認された (*Biogerontology* **18**: 85, 2017)。また、メチオニン (Met) とシトルリン (Cit) にも骨格筋タンパク質分解抑制作用があることを示唆している。

Cit はタンパク質を構成するアミノ酸ではなく、哺乳動物では尿素回路のメンバーでもあり、アルギニン (Arg) から合成される。また、一酸化窒素合成においても Arg と Cit は密接な関係がある。Cit の骨格筋タンパク質合成促進、分解抑制作用の機構についてはほとんど明らかにされていない。Cit の作用が Cit そのものによるのか、代謝的に密接に関係する Arg などによるか解明すべき点が多い。

2. 研究の目的

本研究ではラットを用いた *in vivo* 実験と単離骨格筋切片を用いた *ex vivo* 実験、および培養骨格筋細胞を用いて Cit の骨格筋タンパク質分解抑制、合成促進に関わる作用機構を明らかにすることを目的とした。さらに Cit の代謝産物である Arg、あるいはその他のアミノ酸が関与するか、これらの実験系を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) ラットへの Cit の投与が骨格筋タンパク質分解・合成に及ぼす影響

本研究における全ての動物実験は、岩手大学動物実験委員会の承認を受け、岩手大学動物実験ガイドラインに準拠して実施した。

① 一晚絶食した5週齢のWistar系雄ラットに生理食塩水、シトルリン (Cit) 水溶液(150 mg / 100 g bw)、Arg 水溶液(149.2 mg / 100 g bw)、Cit+Arg 水溶液(Cit : 150 mg+ Arg : 149.2 mg / 100 g bw)をそれぞれ経口投与し、0、1、3、6時間後に屠殺解剖して血液と筋肉を採取した。筋原線維タンパク質分解の指標である3-メチルヒスチジン (MeHis) はHPLCを用いて、オートファジーマーカーであるLC3、翻訳活性を示すS6K1、4E-BP1はウエスタンブロット法で解析した。

② ①と同様の条件で、Cit 水溶液(150 mg / 100 g bw)、Arg 水溶液(149.2 mg / 100 g bw)、Cit+Arg 水溶液(Cit : 75 mg+ Arg : 74.6 mg / 100 g bw)をそれぞれ経口投与し、3時間後に屠殺解剖して血液と筋肉を採取した。

(2) ラット単離筋肉切片 (*ex vivo*) を用いた Cit の作用解析

① C2C12 培養筋管細胞を用いた Cit のタンパク質分解・合成に及ぼす影響

C2C12 筋芽細胞をコンフリエント直前まで培養した後に筋管細胞に分化させた。筋管細胞をアミノ酸フリー培地で Cit (10mM) を添加し、LC3-II の発現および S6K1、4E-BP1 のリン酸化をウエスタンブロットで確認した。

② ラット単離筋肉切片を用いたCitのタンパク質分解・合成に及ぼす影響

18時間絶食させた5週齢Wistar系ラットから長指伸筋とヒラメ筋を摘出し、10mM Citを含むKRB緩衝液中で30分あるいは1.5時間37°Cで培養した。LC3-II、MuRF1、Atrogin-1、およびS6K1、4E-BP1のリン酸化をウエスタンブロットで解析した。

(3) C2C12 筋管細胞を用いたCitの作用解析

(2)①と同様にC2C12培養筋管細胞を10mM Cit、Leu、Lysを含むアミノ酸フリー培地で2時間培養した。また10mM Citを含むDMEM培地で同様に培養した。培養後、LC3-IIの発現、S6K1、4E-BP1、Aktのリン酸化をウエスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

(1) ラットへのCitの同時投与が骨格筋タンパク質分解・合成に及ぼす影響

① Cit水溶液(150 mg / 100 g bw)、Arg水溶液(149.2 mg / 100 g bw)、Cit+Arg水溶液(Cit : 150 mg+ Arg : 149.2 mg / 100 g bw)の経口投与

CitとArgの同時投与3時間後と6時間後において、各アミノ酸単体で投与したときに比べて長指伸筋、ヒラメ筋からMeHisの放出速度、すなわち骨格筋タンパク質の分解が抑制された(図1)。S6K1のリン酸化は投与3時間後に、4E-BP1のリン酸化は投与6時間後に増加した。また、血中のArg濃度はCitとArg同時投与によって高く維持された。

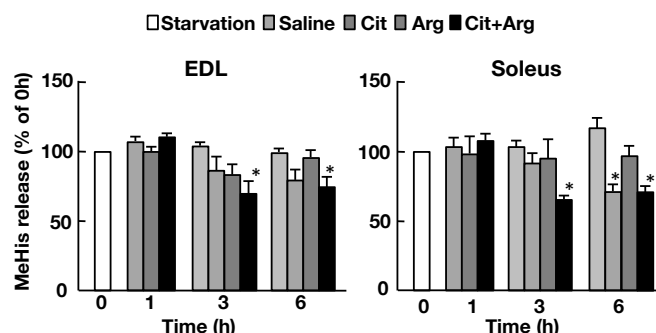


図1 CitとArgの同時投与によるラット骨格筋タンパク質分解の変化 *P>0.05 vs Saline

② Cit水溶液(150 mg / 100 g bw)、Arg水溶液(149.2 mg / 100 g bw)、Cit+Arg水溶液(Cit : 75 mg+ Arg : 74.6 mg / 100 g bw)の経口投与

長指伸筋、ヒラメ筋からのMeHisの放出速度、LC3-IIの発現はCitとArgの同時投与によって、抑制される傾向がみられた。S6K1と4E-BP1のリン酸化も同時投与により増加する傾向もみられた。以上より、CitとArgの同時投与によりCitやArg単体の投与よりも骨格筋萎縮抑制作用が高まる可能性が示唆された。

(2) ラット単離筋肉切片(ex vivo)を用いたシトルリンの作用解析

① C2C12培養筋管細胞を用いたシトルリンのタンパク質分解・合成に及ぼす影響

次にCitの作用機構を明らかにするために、C2C12培養筋管細胞をアミノ酸フリー培地でCitの影響を検討した。ところが、予想に反して、培地にCitを添加してもLC3-IIの発現は抑制されず、S6K1や4E-BP1のリン酸化も変化がなかった。今回用いた培養条件では、LysなどはLC3-IIの発現を顕著に抑制することを既に見出していることから(Mol Cell Biochem 391: 57, 2014)、C2C12筋管細胞においてはCitには骨格筋肥大作用がないというin vivoとは矛盾した結果となった。この原因としてC2C12培養筋管細胞は実際の筋

細胞とは異なる挙動を示す可能性を考え、より生理的な状態に近いラット単離筋肉切片を用いた *ex vivo* の解析を次に試みた。

② ラット単離筋肉切片を用いたシトルリンのタンパク質分解・合成に及ぼす影響

ラットから単離した白筋である長指伸筋および赤筋であるヒラメ筋を KRB 緩衝液中で Cit とともに 1.5 時間培養したところ、オートファジーマーカーの LC3-II の発現、ユビキチン-プロテアソーム系の律速である MuRF1 と Atrogin-1 の発現はいずれの筋肉においても Cit による抑制効果はなかった (図2)。また、S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化にも促進効果はなかった。したがって、*ex vivo* においても培養細胞と同様に Cit の骨格筋肥大効果を確認することはできなかった。そこで Cit の代謝関連アミノ酸である Arg と Cit の関係について、培養筋管細胞を用いて検討することにした。

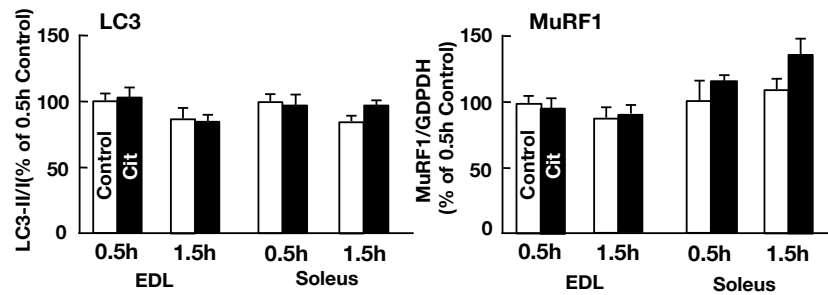


図2 Ex vivoにおけるCitによるLC3-IIとMuRF1の発現

(3) C2C12 筋管細胞を用いたシトルリンの作用解析

C2C12 筋管細胞をアミノ酸フリーの培地において Cit あるいは Leu, Lys とともに培養したところ、Leu, Lys 添加培地では LC3-II の発現が減少しタンパク質分解の抑制が認められたが、Cit では減少しなかった。また、S6K1 のリン酸化も Leu, Lys では増加したが、Cit では変化がなかった。ところが、C2C12 筋管細胞を必要最小限のアミノ酸が含まれる DMEM 培地で Cit とともに培養するとタンパク質分解マーカーの減少、合成マーカーの増加が認められた (図3)。そこで、Cit と Arg など他のアミノ酸を同時に添加して S6K1 やその上流の Akt のリン酸化を検討したところ、同時投与の効果は認められなかった。

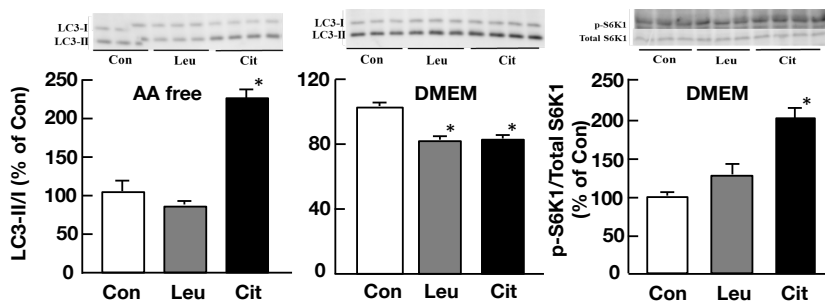


図3 C2C12筋管細胞におけるLeuとCitによるLC3-IIの発現とS6K1のリン酸化
*P>0.05 vs Saline

以上の結果から、Cit が骨格筋タンパク質の分解を抑制し、合成を促進するためには、代謝産物である Arg など特定のアミノ酸が必要ではなく、むしろその他の多くのアミノ酸の存在が必要であることをはじめて示唆し、これは *in vivo* の結果からも支持されると考えられた。一方、Arg にも骨格筋肥大作用があることが報告されており、本研究成果でも Cit と Arg のラットへの同時投与により両アミノ酸の血中濃度が高く維持されることから、多くのアミノ酸が存在している状況で Cit と Arg との相互作用がある可能性は否定できない。また Cit の作用は単独で骨格筋肥大作用がある Leu や Lys とは異なる作用機構である可能性があり、今

後、アミノ酸投与による骨格筋肥大作用はアミノ酸同士の相互作用を詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加賀 彩夏, 長澤 孝志, 伊藤 芳明
2. 発表標題 Ex vivo 実験法を用いたメチオニンの骨格筋萎縮抑制効果の検討
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第14回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加賀 彩夏, 長澤 孝志, 伊藤 芳明
2. 発表標題 アミノ酸による骨格筋タンパク質分解抑制作用の速筋と遅筋の相違
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会東北支部第54回支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長澤孝志
2. 発表標題 アミノ酸による骨格筋萎縮抑制
3. 学会等名 外科代謝栄養学会第56回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築瀬春香, 伊藤芳明, 長澤孝志
2. 発表標題 シトルリンとアルギニンの同時投与による骨格筋萎縮抑制
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第13回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagasawa, Takashi
2. 発表標題 Regulation of muscle protein degradation by dietary leucine and lysine
3. 学会等名 The 7th International Conference of Food Factors (ICoFF 2019) (招待講演) (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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------