

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11553

研究課題名(和文) 飢餓ストレスを利用した骨格筋細胞のタンパク質合成促進経路の活性化

研究課題名(英文) Activation of protein synthesis signaling pathway in skeletal muscle cells by starvation stress

研究代表者

中井 直也 (Nakai, Naoya)

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：90324508

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)：一時的な栄養素飢餓後の栄養素の再補充が骨格筋細胞のタンパク質合成促進シグナルに及ぼす影響について検討した。培養細胞レベルでは、培地中の分岐鎖アミノ酸やグルコースを除き、骨格筋細胞を一時的に飢餓状態にした後、栄養素を再補充するとタンパク質合成促進シグナルが増強した。一方、マウス個体においては長時間の絶食は栄養素再補充による骨格筋タンパク質合成促進シグナルを減弱させた。すなわち、骨格筋タンパク質合成の促進には適切な飢餓ストレスが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨格筋量の維持・増進のためには栄養素の一時的な飢餓によるタンパク質分解が重要であることを明らかにした点で社会的意義がある。すなわち、運動や栄養摂取によるタンパク質合成の活性化のみに注目するのではなく、適切な飢餓(空腹時間)を設けることが重要であることを示した。また、培養細胞に対する栄養素の一時的飢餓と再補充の効果は、個体とは異なっていた。生体では一時的飢餓による生体反応は、神経系や内分泌系により複雑に調節されている可能性を示した点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The effect of nutrient supplementation after starvation on protein synthesis signaling pathway in skeletal muscle cells was investigated. In skeletal muscle cell culture, protein synthesis signaling pathways were enhanced by the re-addition of nutrients after starvation of branched-chain amino acids or glucose. On the other hand, in mice, prolonged starvation diminished the protein synthesis signaling pathway in skeletal muscle induced by the re-addition of nutrients. These results suggest that appropriate starvation stress is important for the activation of skeletal muscle protein synthesis.

研究分野：運動栄養学

キーワード：タンパク質合成 タンパク質分解 飢餓 栄養素再補充 骨格筋

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢や運動不足による骨格筋の萎縮や虚弱は、生活習慣病などの代謝性疾患の罹患率を高めることは明らかである。前例のない高齢化社会を迎える我が国においては、一刻も早く骨格筋量の維持・増進のメカニズムを解明し、ヒトへの応用を実現する必要がある。

骨格筋量の維持・増進のためには、タンパク質分解を抑制し、タンパク質合成を上昇させることが重要であると考えられてきた。しかし、タンパク質分解の減弱化は種々の筋疾患の原因となることが報告されている。細胞内の主要なタンパク質分解系には、オートファジー・リソソーム系と、ユビキチン・プロテアソーム系が存在し、それぞれ約 30%と 70%の割合で不要なタンパク質を分解している。ヒトは毎日 60~80 g のタンパク質を摂取しているが、体内では 160~200 g のタンパク質を合成している。このことは、細胞内で分解されたタンパク質由来のアミノ酸の多くをリサイクルしていることを示している。

オートファジー関連遺伝子である Atg7 を欠損したマウスでは、筋萎縮が起こることが示されている (Masiero et al, Cell Metab 2009)。また、サルコペニアの原因の一つとして筋サテライト細胞のオートファジー機能低下が報告されている (Garcia-Prat et al, Nature 2016)。すなわち、オートファジーは骨格筋の量および機能に深く関連しており、タンパク質合成を高めるためにはタンパク質分解を活性化する必要がある可能性を示唆している。

申請者はこれまでに、培養骨格筋細胞モデルを確立し、アミノ酸やメカニカルストレスがタンパク質合成促進経路を活性化することを報告してきた。さらに、予備的検討において飢餓ストレスは骨格筋細胞のタンパク質分解を高めるが、その後の栄養素の再補充によってタンパク質合成促進経路を強く活性化することを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、培養骨格筋細胞および個体に対する飢餓ストレスおよびその後の栄養素の再補充がタンパク質合成促進経路に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞実験

マウス筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞を対象とした。分化誘導 4 日目の筋管細胞を実験に供した。C2C12 細胞は分化を誘導すると、隣接する細胞が融合し、多核の筋管細胞を形成する。十分に分化した筋管細胞は収縮関連タンパク質を発現し、個体の骨格筋細胞に類似の特徴を獲得する。筋管細胞の培養液を分岐鎖アミノ酸 (BCAA) を含まない DMEM 培地に変更し、異なる時間 (15 分~16 時間) 培養後、BCAA (最終濃度、バリン:ロイシン:イソロイシン = 1:2:1 mM) を添加し、45 分後に細胞を回収した。同様に、グルコースを含まない DMEM 培地に変更し、24 時間の培養後、グルコースを添加して 30 分後に細胞を回収した。それぞれの細胞において、タンパク質合成促進シグナルの指標となる p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化を western blot 法で解析した。

(2) メタボローム解析

分化誘導 4 日目の C2C12 細胞を対象に、メタボローム解析を行い、グルコース飢餓と再補充による細胞内代謝物の変動について解析した。さらに、変動が認められた代謝物を C2C12 細胞に添加し、p70S6K のリン酸化に及ぼす影響について解析した。

(3) 動物実験

8 週齢の C57BL/6J 雄マウスを対象とした。マウスを 2, 6, 12 時間絶食の 3 群に分け、さらにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 投与群とグルコース・BCAA 混合液投与群に分けた。それぞれの絶食時間後に PBS もしくはグルコース・BCAA 混合液を経口投与し、30 分後に血液、骨格筋を採取した。骨格筋のタンパク質合成促進経路への影響は、p70S6K の下流に存在する ribosomal protein S6 (rpS6) のリン酸化を western blot 法で解析した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞実験

BCAA 飢餓後に BCAA を再添加すると p70S6K のリン酸化が上昇した (図 1)。最も再補充効果が高い BCAA 飢餓時間は 6 時間であった。また、24 時間のグルコース飢餓 (NG 群) は p70S6K のリン酸化を有意に低下させた (図 2)。グルコースを再添加すると、グルコースを含む HG 群に比して NG 群で有意に p70S6K のリン酸化が上昇した。しかし、グルコース飢餓時にタンパク質分解系であるオートファジー・リソソーム系を阻害すると、グルコース再補充の効果が一部抑制された。一方、ユビキチン・プロテアソーム系を阻害してもグルコース再補充効果には影響が認められなかった。以上の結果より、BCAA の再補充効果には適切な飢餓時間が存在することが示唆された。また、グルコースの再補充効果の発現には、グルコース飢餓によるオートファジーの活性化が一部関与していることが示唆された。

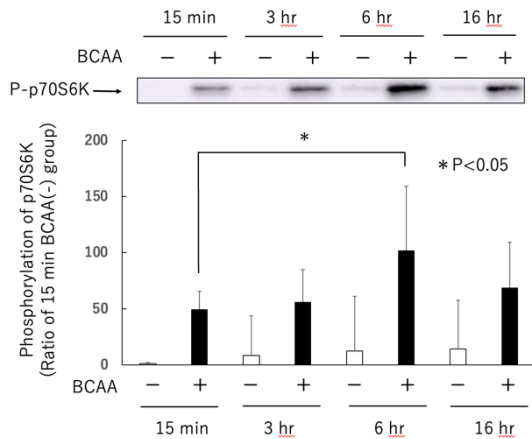


図1. BCAA 飢餓時間が BCAA 再補充によるタンパク質合成促進経路の活性化に及ぼす影響

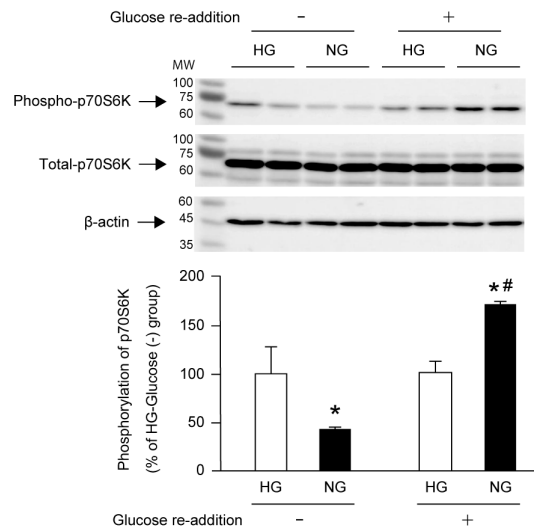


図2. グルコース再添加がタンパク質合成促進経路の活性化に及ぼす影響

(2) メタボローム解析

メタボローム解析の結果、約 200 種類の中間代謝物質を同定した。さらに、グルコース飢餓時およびその後のグルコース再補充に対する p70S6K のリン酸化の変化と同様の変化を示す中間代謝物質を複数同定した。そのうちクエン酸回路の重要な中間代謝物質である α -ketoglutarate (AKG) について添加実験を行った。その結果、24 時間のグルコース飢餓後 (NG 群) に AKG を添加しても p70S6K のリン酸化には影響を及ぼさなかった。一方、AKG の前駆物質である細胞透過性の dimethyl- α -ketoglutarate (DMKG) を添加すると p70S6K のリン酸化が有意に上昇した。DMKG は細胞に取り込まれると速やかに AKG に変換されることが報告されている。以上の結果は、タンパク質合成シグナルである p70S6K のリン酸化は、解糖系に加えてクエン酸回路の代謝変動による調節を受けている可能性を示唆している。

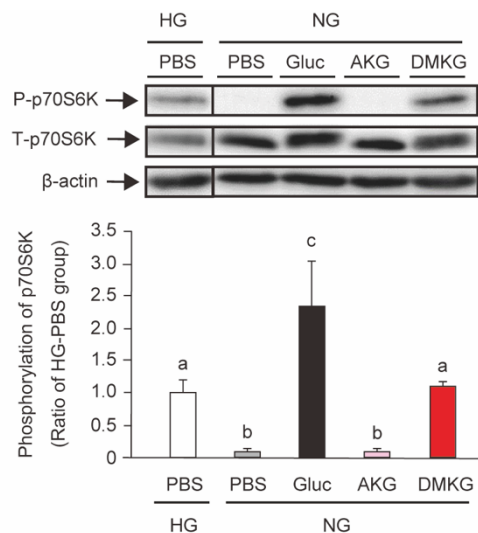


図3. AKG および DMKG がタンパク質合成促進経路の活性化に及ぼす影響

(3) 動物実験

2 および 6 時間絶食群と比べて、12 時間絶食群では、体重および血糖値が有意に低値を示した。グルコース・BCAA 混合液の投与は、絶食時間に関わらず PBS 投与群に比べて血糖値および血漿 BCAA 濃度を上昇させたが、12 時間絶食群で最も高値を示した。すべての絶食時間で血漿インスリン濃度はグルコース・BCAA 混合液の投与により有意に増加したが、絶食時間による有意な差は見られなかった。前脛骨筋を対象として、タンパク質合成促進シグナルである rpS6 のリン酸化を解析した。その結果、2 および 6 時間絶食群ではグルコース・BCAA 混合液投与により有意に上昇したが、12 時間絶食群においては有意な差は認められなかった。以上の結果より、長時間の絶食は栄養素再補充による骨格筋タンパク質合成促進シグナルを減弱させる可能性が示唆された。その要因としてインスリン作用の低下が考えられた。

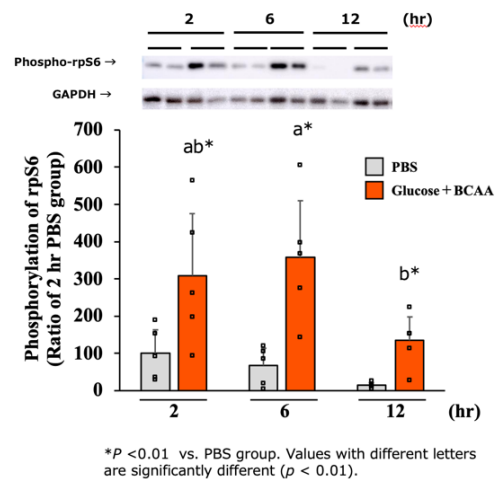


図4. 絶食時間が栄養素投与によるタンパク質合成促進経路の活性化に及ぼす影響

研究期間を通じて、培養細胞レベルでは飢餓ストレス後の栄養素再補充によるタンパク質合成の増強作用とそのメカニズムの一部を明らかにすることができた。一方、個体においては飢餓ストレスの程度によってタンパク質合成促進経路への影響が異なることが認められた。個体におけるタンパク質代謝は、内分泌系により複雑に調節されていることが示唆された。しかしその後の検討により単回の絶食ではなく、比較的長時間の絶食を繰り返すことにより個体におけるタンパク質代謝が適応し、骨格筋量を維持できる結果を得ており、そのメカニズムについてさらに検討を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeuchi N, Higashida K, Li X, Nakai N.	4. 巻 48(9)
2. 論文標題 Glucose enhances catecholamine-stimulated lipolysis via increased glycerol-3-phosphate synthesis in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 6269-6276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-021-06617-1	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 Higashida K, Inoue S, Takeuchi N, Ato S, Ogasawara R, Nakai N.	4. 巻 91-92
2. 論文標題 Basal and resistance exercise-induced increase in protein synthesis is impaired in skeletal muscle of iron-deficient rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2021.111389	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 Nakai N, Iida N, Kitai S, Shimomura Y, Kitaura Y, Higashida K.	4. 巻 86(5)
2. 論文標題 BDK knockout skeletal muscle satellite cells exhibit enhanced protein translation initiation signal in response to BCAA in vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem.	6. 最初と最後の頁 610-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac021	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 Higashida Kazuhiko, Inoue Sachika, Nakai Naoya	4. 巻 531
2. 論文標題 Iron deficiency attenuates protein synthesis stimulated by branched-chain amino acids and insulin in myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 112 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.041	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 Nakai Naoya, Kitai Saki, Iida Noriko, Inoue Sachika, Higashida Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Autophagy under glucose starvation enhances protein translation initiation in response to re addition of glucose in C2C12 myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2149 ~ 2156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12970	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 Fujii T, Sonou T, Nakai N, Okamura K	4. 巻 4
2. 論文標題 Effect of a high fat and high protein diet on exercise-induced skeletal muscle hypertrophy in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Nutr.	6. 最初と最後の頁 29-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14302/issn2379-7835.ijj-19-3011	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 Higashida K, Takeuchi N, Inoue S, Hashimoto T, Nakai N	4. 巻 21
2. 論文標題 Iron deficiency attenuates catecholamine stimulated lipolysis via downregulation of lipolysis related proteins and glucose utilization in 3T3 L1 adipocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Med Rep.	6. 最初と最後の頁 1383-1389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.10929	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 Nakai N, Kitai S, Iida N, Inoue S, Nakata K, Murakami T, Higashida K	4. 巻 66
2. 論文標題 Induction of autophagy and changes in cellular metabolism in glucose starved C2C12 myotubes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 41-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.66.41	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井直也、竹内のどか、吉井梨花子、東田一彦
2. 発表標題 グルコース飢餓後の -ケトグルタル酸添加は骨格筋細胞のタンパク質合成シグナルを活性化する
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東田一彦、竹内のどか、阿藤聡、小笠原理紀、中井直也
2. 発表標題 鉄欠乏は筋収縮による骨格筋タンパク質合成を低下させる
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉井 梨花子、東田一彦、中井直也
2. 発表標題 絶食後の栄養素の再補充が骨格筋タンパク質合成に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井直也
2. 発表標題 mTORC1を介した骨格筋タンパク質代謝の調節
3. 学会等名 スポーツ栄養学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内のどか、東田一彦、中井直也
2. 発表標題 脂肪分解時の中性脂肪再合成におけるグルコース代謝の検討
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井直也、北井彩貴、飯田典子、井上祥花、東田一彦
2. 発表標題 グルコース飢餓後のグルコース再補充は骨格筋細胞のタンパク質合成シグナルを増強する
3. 学会等名 日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Exercise nutrition lab 滋賀県立大学 運動栄養学研究室ホームページ https://naoyanakai.wixsite.com/ex-nutrition</p>
--

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
---------	---------