

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614002

研究課題名(和文) タンパク質合成に利用されないアミノ酸の骨格筋タンパク質合成と分解の調節

研究課題名(英文) Regulation of protein synthesis and degradation in skeletal muscle by amino acids which are not used for protein synthesis

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質合成に利用されないシトルリン処理したC2C12筋管細胞におけるタンパク質分解抑制は主にオートファジー/リソソーム系の活性減少によるものであった。また、4E-BP1のリン酸化も増加したことから、シトルリンはmTOR系に作用することが示唆された。またこのとき細胞内のアルギニン濃度は増加しなかったため、シトルリン単独で作用することが考えられた。

リジンの代謝産物であるサッカロピン処理したC2C12筋管細胞では、リジン同様にタンパク質分解が抑制され、オートファジー/リソソーム系が阻害された。この調節にはAkt/mTOR系が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of muscle protein synthesis and degradation by citrulline which is not used for protein synthesis were elucidated using C2C12 myotube cells. C2C12 cells treated with citrulline showed suppression of protein degradation through autophagy/lysosome proteolytic system. It is suggested that this suppression was regulated by mTOR. Intracellular arginine concentration was not increased by citrulline treatment, therefore the effects of citrulline may be due to citrulline itself. Saccharopine, a metabolite of lysine, suppressed protein degradation in C2C12 myotube cells by reduction of autophagy/lysosome proteolytic system. This suppression is considered to be regulated by Akt/mTOR.

研究分野：栄養化学

キーワード：骨格筋萎縮 タンパク質合成 タンパク質分解 シトルリン リジン サッカロピン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会において健康を維持することは、活力ある社会的な活動を行う上でも、また医療費の高騰を抑制するためにもきわめて重要である。このためには動けるからが必要である。筋肉活動が十分できない状態では、社会的活動も制限され、疾病に対する抵抗力の減退などが起こり、QOLの著しい低下を招くことから、加齢や疾病に伴う骨格筋量の減少抑制、維持が健康維持に重要な因子である。筋萎縮の抑制効果があるのが運動であるが、疾病時などでは運動はできず、もう一つの方法である栄養学的な筋萎縮抑制も大切であると考えられる。

(2) アミノ酸は、動物の成長にとって必要なマクロニュートリエントであるが、近年タンパク質代謝に関してアミノ酸はタンパク質合成の素材としての役割だけでなく、合成と分解の調節因子としても注目されるようになってきた。このように、アミノ酸を含む食餌成分による骨格筋萎縮抑制は、これからの高齢化社会においてきわめて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

(1) 食事タンパク質の摂取が骨格筋タンパク質の合成促進、分解抑制に重要であるがさらにこの作用が必須アミノ酸、特にロイシンにあることを私たちは示した(Nagasawa *et al.* 2002)。またロイシンはオートファジー/リソソーム系の不活性化により分解の低下によることを示した(Sugawara *et al.* 2009)。このような作用は、リジンとメチオニンにも見いだされた(長澤ら, 2000)。

シトルリンは尿素サイクルのメンバーであり、またNOサイクルのメンバーでもある。平成21年度からの科学研究費補助金により長澤は、シトルリンにも骨格筋タンパク質合成促進、分解抑制作用がある可能性を示唆した。シトルリンのようなタンパク質合成に利用さ

れないアミノ酸が、タンパク質合成や分解を制御するということは大変興味深い現象であるが、その機構、他のアミノ酸とのタンパク質代謝に対する相互作用などについては明らかにされていない。そこで、本研究ではシトルリンの骨格筋タンパク質の分解と合成に対する作用のメカニズムを明らかにするために、培養筋肉細胞であるマウス由来のC2C12筋管細胞を用いて検討を行うことを目的とした。また、シトルリンの*in vivo*における作用を明確にするために、廃用性筋萎縮モデルである尾部懸垂モデルラットにおける投与効果を確認することにした。

(2) アミノ酸はタンパク質合成の素材になる他、代謝され解糖系、クエン酸回路の代謝中間体に変換され、糖新生や脂肪酸合成などの素材としても使われる。ロイシンの代謝中間体である-ヒドロキシ-メチル酪酸にもロイシンと同様なタンパク質合成促進作用があることが知られている(Baptista *et al.* 2013)。-ヒドロキシ-メチル酪酸自体はタンパク質合成の素材にはならないが、タンパク質代謝を調節している。

私たちは、ロイシンの他にもリジンなどにも骨格筋タンパク質分解抑制作用があることを見出している(長澤ら, 2000)。そこで、本研究ではリジンの代謝産物であるサッカロピンに注目し、サッカロピンにリジン同様の骨格筋タンパク質分解抑制作用があるかC2C12筋管細胞を用いた検討を行うことも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養筋細胞

C2C12細胞は、東洋大学生命科学部応用生物科学科の根建拓教授からご供与いただいた。C2C12筋芽細胞懸濁液をDMEM+10% FBS培地を用いて2日間培養した。コンフルエント直前まで細胞が増殖した時点で培地を除去し、DMEM+2% HSを3 mL加え、6日間培養し、筋管

細胞への分化を誘導した。分化後、細胞を洗浄後、Starvation medium を 1 mL 加え、37、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 0~4 時間培養した。4 時間後、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター内から取り出し、培地をすべて回収し、-80 で保存した。培地については MeHis を *o*-フタルアルデヒド誘導体化して HPLC で定量した。

細胞中のアミノ酸濃度は、洗浄した細胞にスルホサリチル酸を 2% になるように加え、ホモジナイズした後に遠心分離し、上清をアミノ酸自動分析装置 (JLC500、日本電子、東京) で測定した。

ウェスタンブロットは、細胞をモジナイズし、遠心分離後 SDS-PAGE を行い PVDF 膜 (Hybond-P、GE Healthcare) にタンパク質を転写した後に一次抗体溶液と反応させた。一次抗体としては、LC3 antibody、phospho-Akt(Thr308) antibody、4E-BP1(R-113) antibody、Akt(B-1) antibody を用い、二次抗体としては HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG および HRP-conjugated goat anti-mouse IgG を用いた。二次抗体は ECL 試薬を用いて検出し、バンドは蛍光イメージアナライザーで定量化した。

#### (5) 尾部懸垂

実験動物として、3 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた (30~50 g、日本エスエルシー株式会社) 予備飼育後にラットを 20% カゼインシ食群、尾部懸垂 20% カゼインシ食群、尾部懸垂 1% シトルリン添加 20% カゼインシ食群の 3 群に分け、尾部懸垂を施した。尾部懸垂を施した状態で 7 日間、試験食で飼育した。最終日にラットの後肢からヒラメ筋と長指伸筋を摘出した。これらかの MeHis 放出速度はフルオレスカミン誘導体を HPLC で測定した。

### 4. 研究成果

(1) C2C12 筋管細胞における MeHis を用いたタンパク質分解速度の測定

C2C12 筋管細胞を血清・アミノ酸飢餓状態で 0~4 時間培養した後、培地中に放出された 3-メチルヒスチジン (MeHis) の量を *o*-フタルアルデヒド誘導体を HPLC で分離し測定した。血清・アミノ酸飢餓状態での培養時間が長くなるにつれて、培地中への MeHis の放出量が時間とともにほぼ直線的に増加した。したがって、細胞内のミオシンおよびアクチンが生理的に分解していると考えられ、培地への MeHis の放出速度がタンパク質の分解の指標となることが示唆された。

#### (2) C2C12 筋管細胞におけるシトルリンのタンパク質分解抑制

MeHis の放出速度を指標とした C2C12 筋管細胞の筋肉タンパク質分解速度の測定を実施したが、シトルリンを添加した場合に HPLC における MeHis のピークが未知のピークと重なり定量できなかった。

そこでオートファジー・リソソーム系の活性指標として、LC3-I (不活性型) に対する LC3-II (活性型) の比を測定した。シトルリン処理時間依存性が LC3 活性へ与える影響を図 1 に示した。シトルリン処理 0.5 時間から 3 時間で比較するとポジティブコントロールのロイシン 0.5 時間処理群、およびシトルリン 0.5

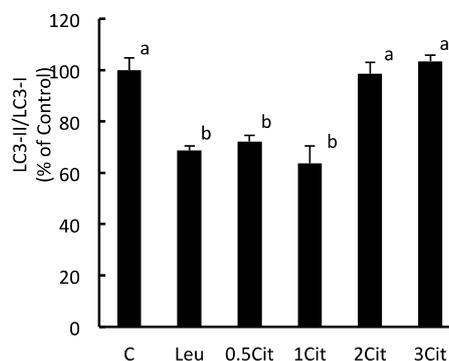


図 1 C2C12筋管細胞におけるシトルリン処理時間が LC3-II 発現に及ぼす影響  
C : DMEM + 0.1% BSAを加えて直ちにサンプリングした群  
Leu : 10mMロイシンを含む培地で30分培養した群  
0.5Cit : 10mMシトルリンを含む培地で30分培養した群  
1Cit : 10mMシトルリンを含む培地で1時間培養した群  
2Cit : 10mMシトルリンを含む培地で2時間培養した群  
3Cit : 10mMシトルリンを含む培地で3時間培養した群  
値は平均値±標準誤差 (n=3~4)。異なる記号間で有意差あり

時間処理群、1時間処理群で無添加のC群と比べ有意に低値を示した。したがって、シトルリンは処理30分と1時間後で有意にオートファジー・リソソーム系の活性を抑制することが示された。

次に ユビキチン・プロテアソーム系の活性をユビキチン化されたタンパク質から評価した。ミオシンとアクチンユビキチン化量には有意な変化はみられなかった。

LC3-II に対するシトルリンの濃度依存性を検討したところ、シトルリン処理濃度 5mM、10mM、20mM で有意に低値を示した。したがって、シトルリンはこれらの濃度でオートファジー・リソソーム系の活性を抑制することが示された。

以上の結果から、C2C12 筋管細胞においてもシトルリンは骨格筋タンパク質の分解を抑制し、さらにこの抑制は主にオートファジー/リソソーム系による可能性が強く示唆された。

## (2) C2C12 筋管細胞におけるシトルリンのタンパク質合成に及ぼす影響

タンパク質翻訳開始段階を制御する mTOR (mammalian target of rapamycin) の下流に位置する 4E-BP1 のリン酸化率を測定した。C 群と比較すると、ロイシン処理群、シトルリン 0.5 時間処理群、1 時間処理群で有意にリン酸化が促進された (図 2)。またシトルリンの濃度依存性をみたところ、5mM 以上でリン酸化の有意な促進が認められた。

以上より、C2C12 筋管細胞において、シトルリンはタンパク質合成の翻訳活性を一部促進すると考えられる。

これらの結果は、シトルリンが mTOR に作用して分解抑制と合成促進を促す作用があることを示唆している。

## (3) C2C12 筋管細胞におけるシトルリンの細胞内アミノ酸濃度に及ぼす影響

シトルリン処理後 15 分、30 分のアミノ酸濃度を測定した。その結果、細胞内濃度はシト

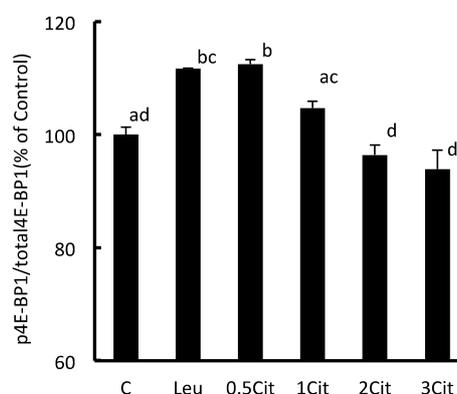


図2 C2C12細胞における4E-BP1のリン酸化に及ぼすシトルリン処理時間の影響  
記号は図1と同じ

ルリンで顕著に増加した。一方、シトルリンの代謝産物であるアルギニン濃度は変化がなかった。このことから、シトルリンの C2C12 筋管細胞タンパク質代謝に及ぼす作用は、アルギニンを介したものではなく、シトルリン単独の作用である可能性が示唆された。

## (4) C2C12 筋管細胞におけるアルギニンのタンパク質分解と合成に及ぼす影響

LC3-II の発現は、培養液中のアルギニン処理 3 時間まで差がなかったが、シトルリンでは 0.5 時間で有意に低下した (図 3)。

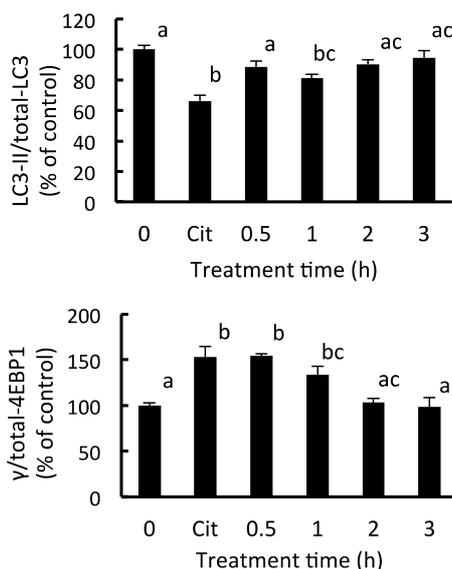


図3 C2C12細胞におけるアルギニン処理がLC3-IIの発現と4E-BP1のリン酸化に及ぼす影響

一方、Akt、4EBP1の活性化はアルギニン処理 0.5 から1時間で認められたことから(図3) タンパク質合成にはアルギニンが促進作用を示す可能性が示唆された。これらの結果は、アルギニンとシトルリンでは合成と分解の細胞内シグナル伝達が異なる可能性を示していると考えられる。

#### (5) 尾部懸垂ラットにおけるシトルリンの効果

ラットを7日間尾部懸垂したときの長指伸筋、ヒラメ筋、腓腹筋重量は、長指伸筋以外いずれも懸垂により顕著に減少した(図4)。尾部懸垂では抗重力筋であるヒラメ筋と腓腹筋が影響を受けると考えられる。しかし、シトルリンの給与による筋萎縮改善作用は認められなかった。また、長指伸筋とヒラメ筋からのMeHis放出速度にもシトルリン投与の影響は見られなかった(図4)。以上より、本実験系における尾部懸垂時では、シトルリンの投与により筋萎縮の抑制を防ぐことができないと考えられた。

また、クレアチンを0.5%添加した10%カゼイン食を給与した尾部懸垂モデルラットにおいても、筋萎縮改善効果は認められなかった。

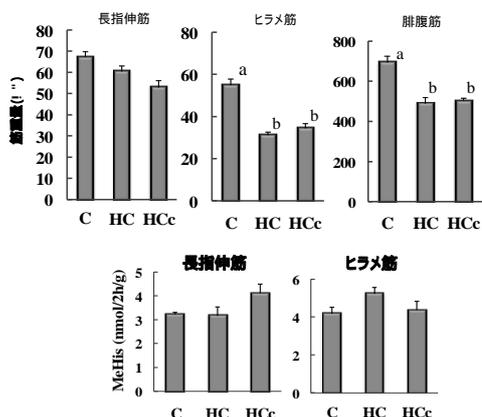


図4 シトルリン投与が尾部懸垂ラットの骨格筋重量と筋原線維タンパク質分解速度に及ぼす影響  
C: 無処理群, HC: 尾部懸垂群, HCc: シトルリン投与尾部懸垂群

#### (6) C2C12 筋管細胞におけるサッカロピンのタンパク質分解と合成に及ぼす影響

リジンの代謝産物であるサッカロピン自体はタンパク質合成には利用されない。そこでサッカロピンが骨格筋タンパク質の合成と分解を調節するかどうか C2C12 筋管細胞を用いて検討を行った。

10mM サッカロピンの処理により C2C12 筋管細胞からの MeHis の放出速度は有意に減少した。また LC3-II の発現もリジンと同様に低下することが示された(図5)。LC3の上流にあるAktのリン酸化はサッカロピン処理で増加しており、また4E-BP1のリン酸化も促進されていることから(図5) リジンと同様の機構でタンパク質分解を制御する可能性が考えられた。今後、他の代謝産物についてもさらに詳細に検討を行う必要がある。

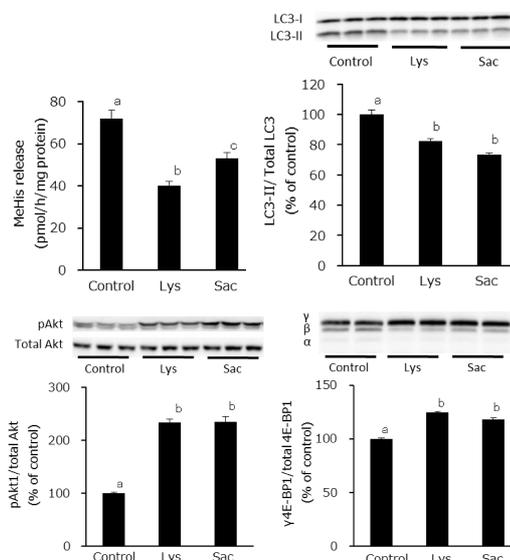


図5 C2C12細胞におけるサッカロピン処理がタンパク質分解速度、LC3-II発現、4E-BP1およびAktのリン酸化に及ぼす影響  
Lys: 10mMLys処理群, Sac: 10mMサッカロピン処理群

#### 引用文献

Baptista IL, Silva WJ, Artioli GG, Guilherme JP, Leal ML, Aoki MS, Miyabara EH, Moriscot AS, PLoS One 8:e76752 (2013)

Nagasawa T, Kido T, Yoshizawa F, Ito Y, Nishizawa N, J Nutr Biochem 13: 121-127 (2002)

Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa

T, Amino Acids 37: 609-616 (2009)

長澤孝志, 貴戸武利, 畠山敦, 西澤直行, 必須アミノ酸研究, No.157: 49-53 (2000)

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Sato T, Ito Y, Nagasawa T, Lysine suppresses myofibrillar protein degradation by regulating the autophagic-lysosomal system through phosphorylation of Akt in C2C12 cells.

SpringerPlus, 3: 584 (2014)

Sato T, Ito Y, Nedachi T, Nagasawa T, Lysine suppresses protein degradation through the autophagic-lysosomal system in C2C12 myotubes. Mol. Cell. Biochem. 391: 37-46 (2013)

Sato T, Ito Y, Nagasawa T, Regulation of skeletal muscle protein degradation and synthesis by oral administration of lysine in rats. J Nutr Sci Vitaminol 59: 412-419 (2013)

### 〔学会発表〕(計6件)

Sato T, Ito Y, Nagasawa T, Suppressive effect of lysine on autophagic-proteolysis through Akt/AMPK/mTOR signaling pathway in C2C12 cells. 12th Asian Congress of Nutrition Yokohama (2015)

伊藤朋恵, 佐藤友紀, 伊藤芳明, 長澤孝志, C2C12 筋管細胞を用いたシトルリンのタンパク質分解抑制機構の解析. 日本アミノ酸学会第8回学術大会 東京農業大学 (2014)

佐藤友紀, 伊藤芳明, 長澤孝志, C2C12 細胞においてリジンとサッカロピンは Akt を介してオートファジーを制御する. 日本アミノ酸学会第8回学術大会 東京農業大学 (2014)

長澤孝志, 食品成分と骨格筋タンパク質の合成、分解. 日本学術振興会レドックス・ライフイノベーション第170委員会

弘前大学 (2013)

佐藤友紀, 伊藤芳明, 長澤孝志, リジンとサッカロピンの C2C12 筋管細胞におけるタンパク質分解抑制作用の比較. 第67回日本栄養・食糧学会大会 名古屋大学 (2013)

長澤孝志, 阿部詩織, 伊藤芳明, シトルリンとアルギニンの経口投与による骨格筋タンパク質分解の変化. 日本アミノ酸学会第6回学術大会 千葉大学(2012)

### 〔図書〕

なし

### 〔産業財産権〕

なし

### 〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし