

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350813

研究課題名(和文) 低エネルギーストレスとメカニカルストレスに対する骨格筋の適応機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the adaptive mechanism to the mechanical and low energy stresses in skeletal muscle

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞におけるタンパク質合成はmTORとAMPKによって拮抗的に調節されているとされている。本研究では、骨格筋培養細胞を対象として、伸展刺激によるメカニカルストレスと低エネルギーストレスがmTOR/p70S6K経路とAMPK経路に及ぼす影響を検討した。伸展刺激によるメカニカルストレスはmTOR経路とAMPK経路をともに活性化し、ある種の生理的刺激下では両者の拮抗的調節は行われていないことが認められた。しかし、薬理的なAMPK活性の調節はメカニカルストレスによるmTOR経路の活性化に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cellular protein synthesis is believed to be antagonistically regulated by mTOR and AMPK signaling pathways. In the present study, we examined the relationship between mTOR/p70S6K and AMPK in response to mechanical stretch. Phosphorylation of p70S6K and AMPK were concomitantly increased by mechanical stretch. Stimulation of the mTOR pathway by adding leucine and insulin increased the phosphorylation of p70S6K without inactivation of AMPK. In contrast, pharmacological inhibition of AMPK by the addition of compound C enhanced the phosphorylation of p70S6K in response to mechanical stretch. Activation of AMPK by the addition AICAR reduced the phosphorylation of p70S6K in response to mechanical stretch. In conclusion, crosstalk between mTOR and AMPK signaling was not tightly regulated in response to physiological stimuli, such as mechanical stress and/or nutrients. However, pharmacological activation or inactivation of AMPK affected the mTOR/p70S6K signaling pathway.

研究分野：運動栄養学

キーワード：メカニカルストレス 骨格筋 タンパク質合成

1. 研究開始当初の背景

適切な身体運動が生体に対して様々な効果をもたらすことは良く知られている。例えば、有酸素運動は糖・脂質代謝の改善を促し、持久的体力を向上させる。一方、レジスタンス運動は、筋タンパク質の合成を高め、骨格筋量の維持増進に効果的である。すなわち異なる運動様式に対して骨格筋は異なる適応反応を呈する。

運動に伴う筋収縮のシグナルは ATP の消費による低エネルギー刺激とメカニカルな刺激の二種類に大別できる。低エネルギーストレスは AMPK/PGC-1 α シグナル経路を活性化し、メカニカルストレスは Akt/mTORC1 経路を活性化する。近年、AMPK (AMP-activated protein kinase) と mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) が拮抗的に働き、酸化エネルギー産生能と骨格筋サイズを調節していることが報告されている。すなわち、低強度長時間運動では細胞内のエネルギー状態が負となることによって AMPK が活性化される。AMPK の活性化は mTORC1 経路を抑制することによりタンパク質合成を低下させる。一方、mTORC1 経路を抑制すると骨格筋が萎縮するとともに AMPK の活性化が起こり、ミトコンドリアの酸化リン酸化能が亢進する。このような AMPK と mTORC1 の拮抗的調節作用によって、一種類の運動様式ではミトコンドリアの酸化エネルギー産生能の亢進とタンパク質合成上昇による筋肥大を同時に誘導することは困難であると考えられる。しかし、ヒトを対象とした研究では、ある種の運動時には AMPK と mTORC1 が同時に活性化されるとの報告もあり、検討の余地が残る。

2. 研究の目的

本研究では運動が生体に及ぼす複雑な刺激を簡略化し、メカニカルストレスと低エネルギーストレスが及ぼす影響を検討するため、培養骨格筋細胞の収縮モデルを採用する。当モデルによって、メカニカルストレスに対する mTORC1 および AMPK 経路の細胞内情報伝達に関わるタンパク質を解析し、両者の拮抗的調節作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

対象にはマウス筋芽由来の培養細胞である C2C12 細胞を用いた。増殖用培地は 10% ウシ胎児血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM であり、分化誘導培地は 2% ウマ血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む DMEM である。C2C12 細胞は、分化誘導培地で培養すると、細胞同士が融合し、多核の筋管細胞へ分化する。

(2) C2C12 細胞に対する伸展刺激

C2C12 細胞をフィブロネクチンでコーティングしたシリコン製のチャンパー上で培養した。増殖用培地にて約 90% コンフルエントまで培養し、その後、分化誘導培地でさらに 4 日間培養した。細胞伸展刺激装置 (Strex 社製) を用いて、1 Hz の頻度で一軸方向に 15% の伸展度で伸展刺激を負荷した。

(3) C2C12 に対する電気刺激

C2C12 細胞を 6 well plate で培養した。増殖および分化は伸展刺激と同様に行った。細胞電気刺激装置 (ION Optix 社製) を用いて 1 Hz および 50 Hz の頻度で 15 V の電気刺激を負荷した。

(4) Western blot 法による解析

刺激後の細胞は、Phosphate-buffered saline (PBS) でリンスし、PIPA buffer で回収した。可溶化したタンパク質の濃度を BCA assay 法により測定し、等量のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した。4、over night で一次抗体と反応後、二次抗体と反応させ、化学発光法で目的のタンパク質を検出した。目的のタンパク質発現量は Image J で数値化した。

(5) 統計処理

データは平均 \pm 標準偏差で示した。一元配置および二元配置の分散分析後、各群間の差の検定は Scheffe テストで行った。P < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激が p70 S6 kinase および AMP-activated protein kinase α に及ぼす影響

p70 S6 kinase (p70S6K) のスレオニン 389 残基 (T389) のリン酸化はキナーゼ活性を上昇させることが報告されている。T389 のリン酸化上昇は、細胞内におけるタンパク質翻訳開始促進シグナルとなることから、タンパク質合成の指標となる。伸展刺激が p70S6K に及

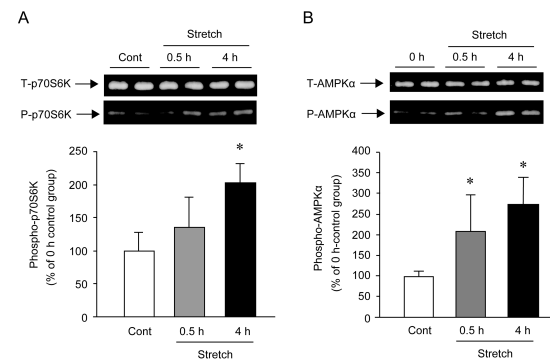


図 1. 伸展刺激が p70S6K (A) および AMPK (B) のリン酸化に及ぼす影響

*Significantly different from control (Cont) cells (P < 0.05).

ばす影響を検討したところ、30 分間では有意なリン酸化の上昇は認められなかったが、4 時間の伸展刺激では約 2 倍に上昇した (図 1 A)。酵素の総量である Total p70S6K の発現量には変化が認められなかった。

細胞内が低エネルギーストレスにさらされると、AMP-activated protein kinase α (AMPK α) のスレオニン 172 残基のリン酸化が上昇することが知られている。30 分および 4 時間の伸展刺激とともに AMPK α のリン酸化を有意に上昇させた (図 1 B)。酵素の総量である Total AMPK α の発現量には変化が認められなかった。

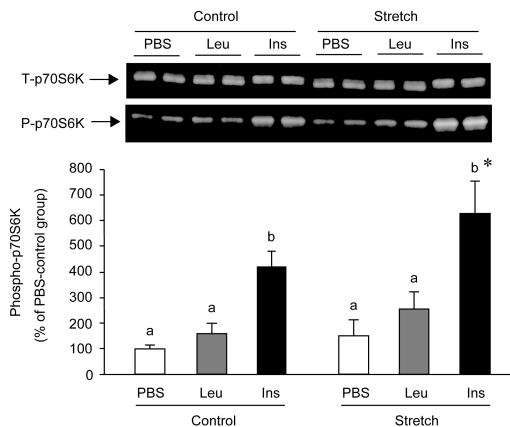


図 2 . ロイシンおよびインスリンが p70S6K のリン酸化に及ぼす影響

*Significantly different from control cells in same treatment groups ($P < 0.05$). Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

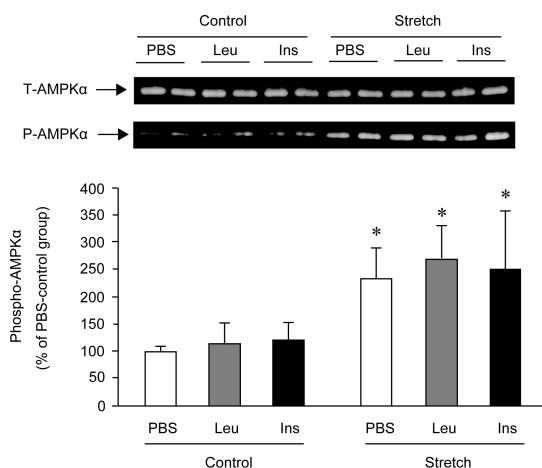


図 3 . ロイシンおよびインスリンが AMPK α のリン酸化に及ぼす影響

*Significantly different from control cells in same treatment groups ($P < 0.05$).

(2) ロイシンおよびインスリンが p70S6K および AMPK α のリン酸化に及ぼす影響
ロイシンとインスリンが mTOR/p70S6K 経路を刺激することは良く知られている。そこ

で、伸展刺激後にロイシンおよびインスリンを添加し、p70S6K と AMPK α に及ぼす影響を検討した。その結果、インスリン刺激により p70S6K のリン酸化が有意に上昇し、その上昇は伸展刺激を負荷した細胞で有意に高かった (図 2)。ロイシンの添加はリン酸化を上昇させる傾向はあったが、有意ではなかった。AMPK α のリン酸化はロイシンおよびインスリンを添加しても伸展刺激群で高値を維持していた (図 3)。

(3) Compound C が p70S6K および AMPK α に及ぼす影響

Compound C (CC) は AMPK α の阻害剤として良く用いられる。細胞に CC を添加し、伸展刺激の影響を検討した。その結果、CC 添加をおこなった群では伸展刺激による p70S6K のリン酸化が非添加群に比して有意に高値を示した。AMPK α のリン酸化は CC 添加により低下する傾向が認められたが有意ではなかった。

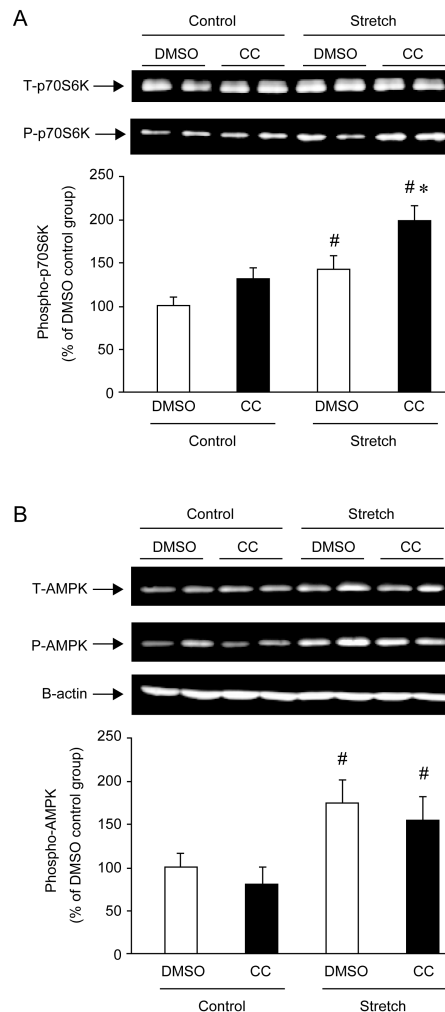


図 4 . Compound C が p70S6K (A) および

AMPK α (B) のリン酸化に及ぼす影響

*Significantly different from DMSO cells in same treatment groups ($P < 0.05$).

#Significantly different from control cells ($P < 0.05$).

(4) AICAR が p70S6K および AMPK α に及ぼす影響

AICAR は最も良く知られた AMPK α の活性化剤である。細胞を予め AICAR で処理すると伸展刺激による p70S6K のリン酸化の上昇が完全に抑制された。AICAR は伸展刺激と同程度に AMPK α のリン酸化を上昇させ、AICAR 添加群に伸展刺激を加えると AMPK α のリン酸化はさらに上昇した。

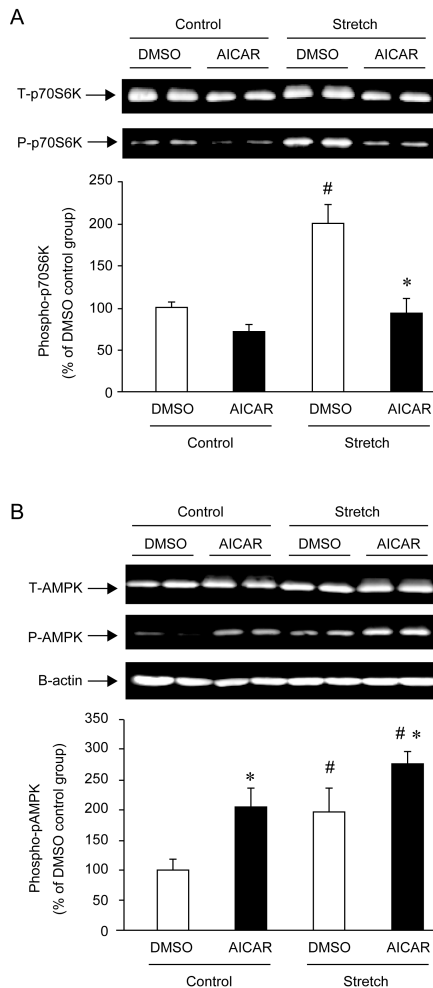


図5 . AICAR が p70S6K (A)および AMPK α (B) のリン酸化に及ぼす影響
*Significantly different from DMSO cells in same treatment groups (P<0.05).
#Significantly different from control cells (P<0.05).

(5) 電気刺激が p70S6K のリン酸化に及ぼす影響

低頻度長時間の刺激 (1Hz, 15V, 3 ms duration) を2時間もしくは24時間行ったが、タンパク質合成促進作用の指標となる p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化には変化は認められなかった。また、2時間の低頻度刺激後に骨格筋に強縮を起こす頻度である 50 Hz (15V, 1 ms duration) の刺激を30分負荷した場合でも、p70S6K のリン酸化には変動がなかった。一方、24時間の低頻度刺激後にグルコースお

よび分岐鎖アミノ酸ロイシンを添加すると、電気刺激の有無に関わらず、p70S6K のリン酸化が有意に上昇した。ロイシンのみの添加ではリン酸化は上昇しなかった。培地中のグルコース濃度を測定したところ、培地交換時には 100 mg/dl であったが、24時間後には大きく (~10 mg/dl) 低下していた。

本研究の結果より、骨格筋培養細胞に対する伸展刺激は、p70S6K と AMPK α のリン酸化を同時に上昇させることが明らかとなった。さらに、ロイシンとインスリンは AMPK α のリン酸化が上昇している場合であっても p70S6K のリン酸化を上昇させる。すなわち、mTORC1 と AMPK の拮抗的調節はメカニカルストレスやホルモン等による生理的刺激下では厳密に行われていないことが示唆された。

一方、薬理的に AMPK の活性を変動させるとメカニカルストレスに対する mTOR/p70S6K 経路の反応に影響が及ぶ。すなわち、AMPK α の阻害剤である CC で細胞を前処理するとメカニカルストレスによる p70S6K のリン酸化が増強された。さらに、AMPK α を AICAR で活性化するとメカニカルストレスによる効果が抑制された。

電気刺激による検討では、グルコースが枯渇した低エネルギーの条件では、ロイシンおよび電気刺激誘導性のメカニカルストレスによるタンパク質合成促進シグナルは上昇しないことが明らかとなった。

以上のことから、mTOR と AMPK による細胞機能の調節は単純に拮抗的に行われているのではなく、刺激の種類や頻度、強度などによってさらに高次的に調節されていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- Kawano, F., Nimura, K., Ishino, S., Nakai, N., Nakata, K. and Ohira, Y. Differences in histone modifications between slow- and fast-twitch muscle of adult rats and following overload, denervation, or valproic acid administration. *J. Appl. Physiol.* 119(10): 1042-1052, 2015. doi: 10.1152/jappphysiol.00289.2015.
- Nakai, N., Kawano, F. and Nakata, K. Mechanical stretch activates mammalian target of rapamycin and AMP-activated protein kinase pathways in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 406(1-2): 285-292, 2015. doi: 10.1007/s11010-015-2446-7.
- Fujita, R., Kawano, F., Ohira, T., Nakai, N., Shibaguchi, S., Nishimoto, N. and Ohira, Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody (MR16-1) promotes muscle regeneration via modulation of gene expressions in infiltrated

macrophages. Biochem. Biophys. Acta.
1840(10): 3170-3180, 2014.
doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.014.
Nakai, N., Fujita, R., Kawano, F., Takahashi,
K., Ohira, T., Shibaguchi, T., Nakata, K. and
Ohira, Y.
Retardation of C2C12 myoblast cell
proliferation by exposure to low-temperature
atmospheric plasma. J. Physiol. Sci. 64(5):
365-375, 2014.
doi: 10.1007/s12576-014-0328-5.

〔学会発表〕(計4件)

Naoya Nakai, Fuminori Kawano, Taro
Murakami, Ken Nakata
Leucine administration following
mechanical stimuli enhances activation of
translational initiation in skeletal muscle
cells.
12th Asian Congress of Nutrition
May 14-18, 2015, Yokohama, Japan
中井 直也、河野 史倫
伸展刺激と分岐鎖アミノ酸ロイシンによる
タンパク質合成促進作用
第 69 回 日本体力医学会大会
2014 年 9 月 19-21 日 長崎県・長崎市
中井 直也、河野 史倫、中田 研
メカニカルストレスはロイシンによるタ
ンパク質合成促進作用を増強する
第 68 回 日本栄養・食糧学会大会
2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日 北海道・札
幌市
中井 直也、河野 史倫
細胞内低エネルギーストレスおよびメカ
ニカルストレスが骨格筋培養細胞に及ぼ
す影響
第 68 回 日本体力医学会大会
2013 年 9 月 21-23 日 東京都・千代田区

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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