

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：33909

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350823

研究課題名(和文)ロイシン感受性の運動栄養学的理解

研究課題名(英文) immobilization of skeletal muscle increases mTORC1 signaling and LAT1 expression both at stretched and shortened positions but only increases protein synthesis at stretched position

研究代表者

村上 太郎 (Murakami, Taro)

至学館大学・健康科学部・教授

研究者番号：10252305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉は使わないと萎縮する。その理由として、筋肉に張力がかからないと、たんぱく質の合成が低下することが考えられている。ラットの下肢筋を伸長位(張力がかかる)もしくは短縮位(張力がかからない)で固定し、たんぱく質合成率を測定した。いずれの様式で不動化された筋肉でも、3日程度でたんぱく質合成シグナル(mTORC1活性)とアミノ酸輸送体(LAT1)の発現の増大が起きたが、実際のたんぱく質合成率は伸長位で不動化された筋肉のみで見られた。ロイシンを投与してたんぱく質合成を誘導すると、いずれの様式で不動化された筋肉でも増大した。筋肉に張力がかからないと、食間のたんぱく質合成が低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigate whether a decrease in amino acid requirement in the muscle by immobilization with casting would inactivate the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling and decrease the leucine transporter (LAT1) expression. Both the mTORC1 signaling and the expression of LAT1 are activated in both immobilized muscles at shortened and stretched positions, even the extents are larger in the latter. However, muscle protein synthesis at fasted-state is only increased in a stretched muscle but not in a shortened muscle. Branched chain amino acids administration increases muscle protein synthesis in both shortened and stretched muscles. These findings suggest that the activation of mTORC1 signaling and induction of leucine transporter in the immobilized muscle at shortened position could not contribute to the protein synthesis. A decrease in atrophy in immobilized muscle at stretched position would due to be an increase in protein synthesis during preabsorptive state.

研究分野：運動栄養学

キーワード：アミノ酸輸送体 mTORC1 SUnSET ロイシン ギブス固定

1. 研究開始当初の背景

私たちの体を構成するたんぱく質は、常に合成と分解の流れのなかに存在し、生理状態に応じてその量と質を保っている。筋肉をギプス固定などで不動化すると萎縮するが、その理由としてたんぱく質の合成に比べて分解が促進することが知られている。細胞内のたんぱく質合成を調節する因子として mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) が知られている。mTORC1 は栄養 (e.g. ロイシン) や運動の情報を細胞内で統合し、基質である eIF4E binding protein 1 (4EBP1) や S6 protein kinase 1 (S6K1) などリン酸化することをとおして、たんぱく質合成の翻訳段階を活性化する。申請者らは運動によって筋肉のたんぱく質需要を増大させると mTORC1 の活性化とともに、ロイシンを細胞内へ輸送するためのアミノ酸輸送体 (L-type amino acid transporter, LAT1) の発現が増大することを明らかにしてきた。このことは、反対に筋肉を不動化させて萎縮を誘導させると、mTORC1 経路の活性やロイシン輸送体の発現が低下することを示唆している。すなわち、筋肉で mTORC1 経路の活性やロイシン輸送体の発現が低下すると、栄養素 (ロイシン) によるたんぱく質合成の誘導が減弱される可能性が考えられる。また、短縮位で不動化された筋肉は伸長位で不動化された筋肉に比べて萎縮の程度が大きくなることが知られており、短縮位で不動化された筋肉の mTORC1 経路の活性やロイシン輸送体の発現の低下の程度は、伸長位で固定された筋肉に比べて大きくなる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの下肢をギプスによって不動化することによって、(1) mTORC1 経路が不活性化されるとともに LAT1 の発現が低下するか否か、(2) mTORC1 経路の不活性化と LAT1 の発現の低下に不動化の様式が関係しているか否か、(3) mTORC1 経路の不活性化と LAT1 の発現が低下した状況において、ロイシンによるたんぱく質合成の誘導が減弱されるか否か、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 除神経による下肢筋の不動化が mTORC1 経路の活性と LAT1 の発現に及ぼす影響

7週齢のSD系雄ラット15匹を用いた。ラットをコントロール群と除神経群に分け、除神経群のラットの左脚にイソフルラン麻酔下に坐骨神経切除術を施し、1、2、3および7日後に屠殺して両脚の腓腹筋と前脛骨筋を摘出した。筋肉の4EBP1とS6K1のリン酸化をウェスタンブロット法で、LAT1とCD98のmRNAの発現量をqPCR法でそれぞれ定量した。

(2) ギプス固定による下肢筋の不動化が mTORC1 経路の活性と LAT1 の発現に及ぼす影響

10週齢のSD系雄ラット48匹を用いた。ラットをコントロール群とギプス固定群に分け、ギプス固定群のラットの左脚をイソフルラン麻酔下に石膏テープを用いて足関節が最大底屈位、もしくは最大背屈位となるように固定した。固定後、1、3および7日後にラットを屠殺し、両脚の腓腹筋と前脛骨筋を摘出した。測定項目は上記のとおりである。

(3) ロイシンがギプス固定化の筋肉におけるたんぱく質合成に及ぼす影響

10週齢のSD系雄ラット20匹を用いた。ラットを生理食塩水群とBCAA群に分け、全てのラットの足関節を上記方法で底屈位で固定した。固定3日後に、BCAA群のラットに24時間の絶食の後、BCAA溶液(135 mg/kg BW, leu:Ile:Val = 2:1:1, 8.1 g/100 ml saline)を経口投与し、1および3時間後に屠殺して両側の腓腹筋と前脛骨筋を摘出した。生理食塩水群のラットには、同様の手順で生理食塩水を投与した。屠殺の10分前にすべてのラットの下大静脈より puromycin (40 μmol/kg BW) を投与した。筋肉の4EBP1とS6K1のリン酸化をウェスタンブロット法で定量した。筋肉のたんぱく質合成率を、抗ピューロマイシン抗体を用いたウェスタンブロット法でピューロマイシンの翻訳途中のペプチド鎖への取り込み率を定量することで求めた(SUnSET法)。

4. 研究成果

(1) 除神経により腓腹筋と前脛骨筋の mTORC1 経路のリン酸化とロイシン輸送体の発現が増大した

腓腹筋の重量は、除神経3日以降に有意に低値を示した。前脛骨筋の重量は、除神経7日後に有意に低値を示した。腓腹筋の4EBP1のリン酸化は、除神経2日後に有意に高値を示した。腓腹筋のS6K1のリン酸化は、除神経2日および7日後に有意に高値を示した。腓腹筋のLAT1 mRNAの発現は、除神経2、3および7日後に有意に増大した。腓腹筋のCD98 mRNAの発現は、除神経7日後に有意に増大した。前脛骨筋の4EBP1のリン酸化は、除神経2および3日後に有意に増大した。前脛骨筋のS6K1のリン酸化は、除神経2および7日後に有意に増大した。前脛骨筋のLAT1 mRNAの発現は、除神経2、3および7日後に有意に増大した。前脛骨筋のCD98 mRNAの発現は、除神経1および2日後に有意に増大した。

以上の結果をまとめると、坐骨神経の除神経によって下肢筋が萎縮する過程で、mTORC1 経路の活性化とロイシン輸送体の発現が増大することが明らかになった。

(2) ギプスで腓腹筋と前脛骨筋を固定すると mTORC1 経路のリン酸化とロイシン輸送体の発現が増大した

除神経による筋肉のmTORC1経路の活性化とロイシン輸送体の発現の増大が、除神経術による外科的侵襲や神経切断の影響である可能性を排除する目的で、すなわち、筋肉の不動態化によってmTORC1経路のリン酸化とロイシン輸送体の発現が増大するか否かを明らかにするために、ラットの足関節が最大底屈となる角度でギプスで固定した。すなわち、腓腹筋は短縮位で、前脛骨筋は伸長位で固定した。

腓腹筋の重量は、固定3および7日後に有意に低値を示した。前脛骨筋の重量は固定7日後までの間に変化しなかった。腓腹筋の4EBP1のリン酸化は、固定3(1.3倍)および7日後(1.7倍)に有意に増大した。腓腹筋のS6K1のリン酸化は、固定7日後(2.5倍)に有意に増大した。腓腹筋のLAT1 mRNAの発現は、固定3(4.8倍)および7日後(3.1倍)に有意に増大した。腓腹筋のCD98 mRNAの発現は固定7日後までの間に変化しなかった。

前脛骨筋の4EBP1のリン酸化は、固定3(2.1倍)および7日後(2.1倍)に有意に増大した。前脛骨筋のS6K1のリン酸化は、固定3(4.4倍)および7日後(4.1倍)に有意に増大した。前脛骨筋のLAT1 mRNAの発現は、固定2(~5倍)、3(~12倍)および7日後(~6倍)に有意に増大した。前脛骨筋のCD98 mRNAの発現は、固定3日後(~2倍)に有意に増大した。

以上の結果をまとめると、短縮位で固定された腓腹筋は伸長位で固定された前脛骨筋に比べて萎縮しやすいこと、いずれの筋肉においてもmTORC1経路の活性化とロイシン輸送体の発現の増大がおこるが、その程度は伸長位で固定され萎縮しなかった前脛骨筋で大きいこと、が明らかになった。しかし、腓腹筋と前脛骨筋ではそもそも筋肉が異なるため、上記の結果が固定の様式(短縮位か伸長位)によるものか筋肉そのものの特性(e.g. 筋線維組成、神経支配)によるものかは不明である。そこで、足関節を背屈位で固定し、同様の分析をした。すなわち、腓腹筋は伸長位で、前脛骨筋は短縮位で固定した。

腓腹筋の重量は、固定7日後に有意に低下した。前脛骨筋の重量は固定3および7日後に有意に低下した。腓腹筋の4EBP1のリン酸化は、固定3(~1.8倍)および7日後(~2.0倍)に有意に増大した。腓腹筋のS6K1のリン酸化は、固定3(~7.0倍)および7日後(3.3倍)に有意に増大した。腓腹筋のLAT1 mRNAの発現は、固定3日後(~22.8倍)に有意に増大した。腓腹筋のCD98 mRNAの発現は、固定7日後までの間に変化しなかった。

前脛骨筋の4EBP1のリン酸化は、固定1日後にいったん低下し(0.4倍)、固定3(1.9倍)および7日後(3.1倍)に増大した。前脛骨筋のS6K1のリン酸化は、固定3(3.1倍)および7日後(3.2倍)に増大した。前脛骨筋のLAT1

mRNAの発現は、固定3日後(7.1倍)に有意に増大した。前脛骨筋のCD98 mRNAの発現は、固定3(5.1倍)および7日後(1.5倍)に有意に増大した。

以上2つの実験結果をまとめると、短縮位で固定された筋肉は伸長位で固定された筋肉に比べて萎縮しやすいこと、固定の様式にかかわらず筋肉が不動態化されるとmTORC1経路の活性化とロイシン輸送体の発現の増大が起こること、その程度は伸長位で固定された筋肉で大きいこと、が明らかになった。

(3)伸長位で固定された筋肉のmTORC1経路の活性化やロイシン輸送体の発現の増大は、食間のたんぱく質合成の増大と関係している

ギプス固定による筋肉のmTORC1経路の活性化やロイシン輸送体の発現の増大が、栄養素に対するたんぱく質合成の感受性を増大させるか否かを明らかにするために、足関節を底屈位で固定したラットにBCAAを投与して1および3時間後にたんぱく質合成率を測定した。

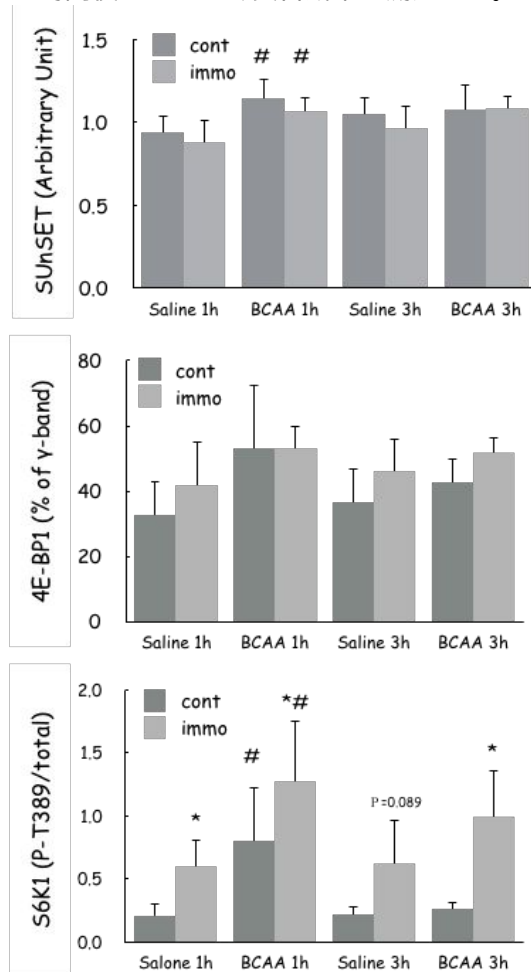


Fig. 1. BCAA induces protein synthesis of casted gastrocnemius muscle at shortened position.

短縮位で固定された腓腹筋では、分散分析の結果から固定脚の4EBP1のリン酸化はコントロール脚に比べて高値を示す傾向を示した(P=0.06, Fig. 1)。BCAA投与1時間群では、両脚の4EBP1のリン酸化とともにsaline投与1時

間群よりも高値を示した。腓腹筋のsaline投与1時間群の固定脚のS6K1のリン酸化は、コントロール脚に比べて有意に高値を示した。腓腹筋のBCAA投与1時間群の両脚のS6K1のリン酸化は、いずれもsaline投与1時間群に比べて有意に高値を示した (Fig. 1)。また、固定脚のリン酸化はコントロール脚に比べて有意に高値を示した。saline投与3時間群の固定脚のS6K1のリン酸化は、コントロール脚に比べて高値を示し、BCAA投与3時間群ではコントロール脚に比べて有意に高値を示した。saline投与群とBCAA投与群との間に差は見られなかった。saline投与1時間群のたんぱく質合成率は、固定脚とコントロール脚との間に差は見られなかった。BCAA投与1時間群の両脚のたんぱく質合成は、いずれもsaline投与1時間群に比べて有意に高値を示した (Fig. 1)。saline投与3時間群およびBCAA投与3時間群のたんぱく質合成は、固定脚とコントロール脚の間に差は見られなかった。また、saline投与群とBCAA投与群の間にも差は見られなかった。

以上の結果から、短縮位で固定された腓腹筋では食間にmTORC1経路が活性化されるが、たんぱく質合成率は増大しないこと、BCAA投与によって固定脚とコントロール脚の両脚でmTORC1経路がもとの値に対して比例的に活性化されること、BCAAによるたんぱく質合成の増大は固定脚とコントロール脚とで同程度であり、固定脚で誘導されたmTORC1経路の活性化がたんぱく質合成に貢献しないことが明らかになった。

伸長位で固定された前脛骨筋では、saline投与1時間群の固定脚の4EBP1のリン酸化は、コントロール脚に比べて有意に高値を示した (Fig. 2)。BCAA投与1時間群の両脚の4EBP1のリン酸化は、いずれもsaline投与1時間群に比べて有意に高値を示した。また、固定脚のリン酸化はコントロール脚に比べて有意に高値を示した。salineおよびBCAA投与3時間群の固定脚の4EBP1のリン酸化は、それぞれコントロール脚に比べて有意に高値を示した。saline投与群とBCAA投与群との間に差は見られなかった。saline投与1時間群の固定脚のS6K1のリン酸化は、コントロール脚に比べて有意に高値を示した (Fig. 2)。BCAA投与1時間群の両脚のS6K1のリン酸化は、それぞれsaline投与1時間群に比べて有意に高値を示した。また、固定脚のリン酸化はコントロール脚に比べて有意に高値を示した。salineおよびBCAA投与3時間群の固定脚のS6K1のリン酸化は、それぞれコントロール脚に比べて有意に高値を示した。saline投与群とBCAA群との間に差は見られなかった。

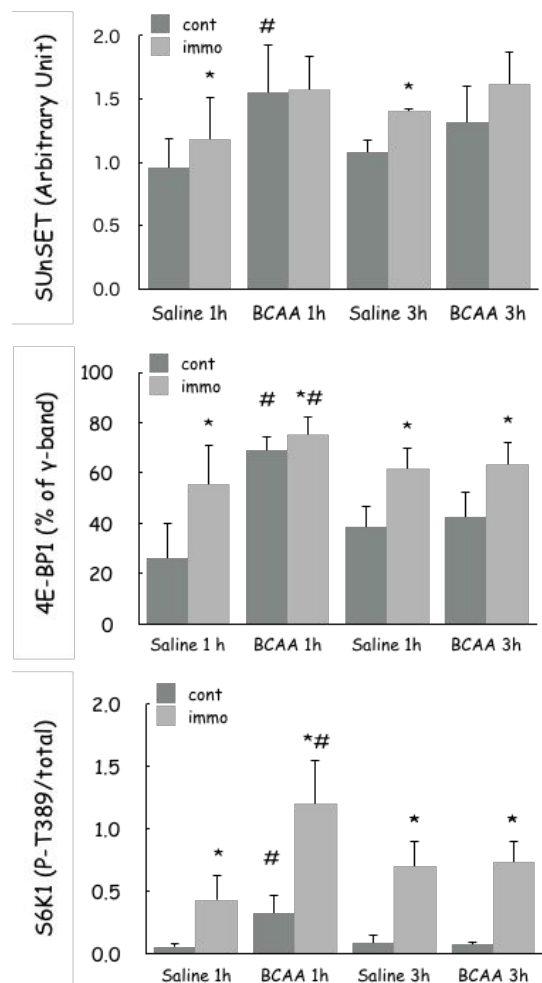


Fig. 2. BCAA induces protein synthesis of casted tibia anterior muscle at stretched position.

saline投与1時間群の固定脚のたんぱく質合成率は、コントロール脚に比べて有意に高値を示した (Fig. 2)。BCAA投与1時間群のコントロール脚のたんぱく質合成率は、saline投与1時間群に比べて有意に高値を示したが、固定脚とコントロール脚との間に差は見られなかった。saline投与3時間群の固定脚のたんぱく質合成率は、コントロール脚に比べて有意に高値を示した。BCAA投与3時間群のたんぱく質合成率は、固定脚とコントロール脚の間に差は見られなかった。saline投与群とBCAA投与群との間に差は見られなかった。

以上の結果から、伸長位で固定された前脛骨筋では食間にmTORC1経路が活性化されるとともに、たんぱく質の合成率が増大すること、BCAA投与によって固定脚とコントロール脚の両脚でmTORC1経路がもとの値に対して比例的に活性化されること、BCAAによるたんぱく質合成率の増大は固定脚とコントロール脚との間で同程度であり、固定脚で誘導されたmTORC1経路活性化がたんぱく質合成率に貢献しないことが明らかになった。

全ての研究の結果をまとめると、筋肉が不動化されると短縮位と伸長位の様式にかかわらず、mTORC1経路が活性化される、筋肉が

不動化されると短縮位と伸長位の様式にかかわらず、ロイシン輸送体の発現が増大する、伸長位で不動化された筋肉では、mTORC1 経路の活性化とロイシン輸送体の発現がより増大する、短縮位と伸長位のいずれの様式で不動化された筋肉でも、不動化によって活性化された mTORC1 経路はロイシンによってさらに増大する、伸長位で不動化された筋肉は食間のたんぱく質合成が増大するが、短縮位で不動化された筋肉では増大しない、短縮位と伸長位のいずれの様式で不動化された筋肉でも、ロイシンによってたんぱく質合成が増大するが、mTORC1 経路の活性化ほど増大しない、ことが明らかになった。すなわち、伸長位で不動化された筋肉で萎縮が緩やかになる機序として、mTORC1 経路の活性化やロイシン輸送体の発現の増大をとおして食間のたんぱく質合成が増大する可能性が考えられた。一方で、食後のたんぱく質合成は不動化の様式にかかわらず増大することから、mTORC1 経路の活性化やロイシン輸送体の発現増大が関与していない可能性が考えられた。不動化によって筋肉が萎縮する過程で mTORC1 経路の活性化やロイシン輸送体の発現が増大することは、筋肉が急激に萎縮するのを防ぐための、恒常性維持機構の一つであると思われる。

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)

1. Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. Itoh, Y., Murakami, T., Mori, T., Agata, N., Kimura, N., Inoue-Miyazu, M., Hayakawa, K., Hirano, T., Sokabe, M. and Kawakami, K. *Muscle and Nerve*. 55: 243-253, 2017 (査読有)

2. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. Ishikawa, T., Kitaura, Y., Kadota, Y., Morishita, Y., Ota, M., Yamanaka, F., Xu, M., Ikawa, M., Inoue, N., Kawano, F., Nakai, N., Murakami, T., Miura, S., Hatazawa, Y., Kamei, Y., and Shimomura, Y. *Sci Rep*. 7:39825, 2017 (審査有) doi: 10.1038/srep39825.

3. 村上太郎, 石原健吾, 松元圭太郎, 岡村浩嗣, 矢口友理, 小野智子, 藤井久雄, 橋場直彦. 広告や学術情報をとおして健康科学系の女子大学生に認識される特定保健用食品の保健用途. *日本栄養・食糧学会誌*, 68: 73-81, 2015 (査読有)

4. 松元圭太郎, 村上太郎, 石原健吾, 岡村浩嗣, 矢口友理, 小野智子, 藤井久雄, 橋場直彦. 健康科学系女子大学生における特定保健用食品の食用油の利用実態. *日本栄養・食*

糧学会誌, 68: 233-241, 2015 (査読有)

5. Endurance exercise induces REDD1 expression and transiently decreases mTORC1 signaling in rat skeletal muscle. Hayasaka, M., Tsunekawa, H., Yoshinaga, M. and Murakami, T. *Physiol. Rep.* 2: e12254, 2014 (査読有)

6. Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice. Itoh, Y., Hayakawa, K., Mori, T., Agata, N., Inoue-Miyazu, M., Murakami, T., Sokabe, M. and Kawakami, K. *Physiol. Rep.* 2: e12185, 2014 (査読有) doi: 10.14814/phy2.12185.

7. Endurance exercise induces REDD1 expression and transiently decreases mTORC1 signaling in rat skeletal muscle. Hayasaka, M., Tsunekawa, H., Yoshinaga, M. and Murakami, T. *Physiol. Rep.* 2: e12254, 2014 (査読有) doi: 10.14814/phy2.12254.

[雑誌論文](計8件)

1. 村上太郎. 運動選手とサプリメント. 第13回日本未病システム学会栄養部会研究大会. 2016年7月30日. 「愛知みずほ大学(名古屋市)」.(招待講演)

2. 村上太郎. 筋肉たんぱく質の恒常性における食事と運動の役割. 村上太郎. 日本体力医学会東海地方会20周年記念事業. 2016年3月13日. 「中京大学(名古屋市)」.(招待講演)

3. REDD1 transiently attenuates mTORC1 signaling during and after the exercise in rat muscle. Murakami, T., Hayasaka, M., Tsunekawa, H. and Yoshinaga, M. 12th Asian Congress of Nutrition, May16, 2015, 「Pacifico Yokohama (Yokohama)」(ポスター発表)

4. Endurance exercise induces REDD1 expression in rat skeletal muscle. Murakami, T., Hayasaka, M., Tsunekawa, H. and Yoshinaga, M. *Cell Symposia, Exercise Metabolism*, July 12, 2015 「Amsterdam (The Netherlands)」 (ポスター発表)

5. A role of amino acid transporters for protein homeostasis during and after exercise in muscle. Murakami, T. *Inchon Asian Games International Sport Science Congress*, August 21 2014, 「Inchon, (Korea)」(招待講演)

〔学会発表〕(計10件)

1. 村上太郎 .並進運動,角運動 .Physics in Biology and Medicine. 生命科学に必要な物理学の基礎(首我部正博編). 東京. 共立出版. p30-58. 2015 (翻訳書)

2. 村上太郎 .タンパク質代謝. ニュー生理学(宮村實晴編). 東京. 真興交易医学出版部. p16-24. 2015 (著書)

〔図書〕(計2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

村上 太郎 (Murakami, Taro)
至学館大学・健康科学部・教授
研究者番号：10252305

(2)研究分担者

恒川 春香 (Tsunekawa, Haruka)
至学館大学・健康科学部・助手
研究者番号：60723822

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()