

研究ノート

ロイシンと食事の摂取は、骨格筋の
mTORC1 活性化に効果的である吉村 亮二*, 荒木 光, 野村 秀一
(長崎国際大学 健康管理学部 健康栄養学科、*連絡対応著者)Ingestion of Both Leucine and Diet is Effective in Activating
mTORC1 in Skeletal MuscleRyoji YOSHIMURA, Hikaru ARAKI and Shuichi NOMURA
(Department of Health and Nutrition, Faculty of Health Management,
Nagasaki International University, *Corresponding author)

Abstract

Leucine is known to stimulate protein synthesis by enhancing mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity. However, previous studies on leucine mediated activation of mTORC1 were performed in food-deprived animals or in animals fed with diets high in leucine. In addition, there are no reports on the effect of diet on leucine mediated mTORC1 activation. Thus, we aimed to evaluate the effect of ingestion of diet, alone or in combination with leucine administration, on leucine mediated activation of mTORC1. To do this, mTORC1 activation was studied in mice which were fed with the diet after administration of leucine and compared with controls which were fed only the diet. Leucine was administered at 1.35 mg/g body weight in the leucine groups. Food intake was similar in the control and leucine groups. One hour post ingestion of the diet, the leucine administered groups showed an increase in the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) and 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1), both of which are mTORC1 substrates. Moreover, at 5 hours after ingestion of the diet, the leucine groups showed phosphorylation of 4EBP1 and S6K1 at a level significantly higher than that seen after 1 hour. These results suggest that leucine mediated mTORC1 activation cannot be reproduced with ingestion of diet alone, and that mTORC1 activation by leucine ingestion is enhanced 5 hours after ingestion of the diet.

Key words

Leucine, mTORC1, skeletal muscle, diet

要 旨

ロイシンは mTORC1 を活性化し、筋タンパク質合成を促進することが知られている。しかし、これまでの研究は空腹時あるいは高ロイシン食を継続的に摂取した条件で行われており、ロイシンの mTORC1 活性化への食事の影響は報告されていない。そこで、本研究では、ロイシン摂取後に食事を摂取した場合、ロイシンによる mTORC1 の活性化は認められるか、あるいは食事摂取のみでも同等の mTORC1 活性が誘導されるかを明らかにすることを目的とした。マウスへロイシンを 1.35mg/g 体重で経口投与し、食事を摂食させた。摂食量はコントロール群とロイシン群で差はなかった。mTORC1 の基質である 4EBP1 と S6K1 のリン酸化は、食事開始 1 時間においてロイシン群で増加し、さらに、食事開始 5 時間では最も高値を示していた。これらの結果から、ロイシンによる mTORC1 活性化は、食事のみでは同様の作用を示すことができず、食事開始 5 時間で大きく活性化されることが明らかとなった。

キーワード

ロイシン、mTORC1、骨格筋、食事

I はじめに

食事に含まれるタンパク質、アミノ酸の第一の栄養学的機能は、体タンパク質合成の基質となることである。一方、分岐鎖アミノ酸やアルギニンをはじめとするアミノ酸は転写・翻訳、ホルモン分泌などを調節する生体機能調節因子としても作用する¹⁾。特に、分岐鎖アミノ酸であるロイシンは筋タンパク質合成を促進することがラット^{2, 3)}、ブタ⁴⁻⁸⁾、ヒト^{9, 10)}において報告されている。ロイシンによる筋タンパク質合成促進作用は、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) というセリン/スレオニンキナーゼが eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4EBP1) や 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) をリン酸化することにより生じている⁵⁾。

翻訳の開始段階では、eIF4E が mRNA のキャップ構造へリクルートされ、次に、eIF4E を足場として eIF4G が結合する¹¹⁻¹³⁾。この段階は、翻訳を開始させる重要なものであり、4EBP1 により調節されている。4EBP1 は、eIF4G と競合して eIF4E に結合し、翻訳を抑制する。4EBP1 の eIF4E との結合能力は、mTORC1 によりリン酸化されることで低下し、これにより翻訳開始が促進される。一方、S6K1 は mTORC1 によりリン酸化されることで活性化する。活性化した S6K1 は、ribosomal protein S6 や、eIF4A のヘリカーゼ活性を増加させる eIF4B などリン酸化することにより翻訳を促進する¹⁴⁾。

上記のようにロイシンは mTORC1 を活性化し、筋タンパク質合成を促進することが数多く報告されている。しかし、それらの研究は空腹時あるいは高ロイシン食を継続的に摂取した条件で行われており、実生活においてロイシンのみを空腹時に摂取することはなく、また、高ロイシン食を継続的に摂取することも少ない。さらに、ロイシン摂取による mTORC1 活性化、筋タンパク質合成促進作用に対する食事の影響は報告されておらず、食事性タンパク質が

4EBP1 のリン酸化と筋タンパク質合成を促進することのみ報告されている¹⁵⁾。つまり、ロイシン摂取後に食事を摂取した場合、ロイシンの mTORC1 活性化作用は認められるか、あるいは食事摂取のみでも、ロイシンと食事の摂取と同等の mTORC1 活性化が誘導されるかは明らかになっていない。そこで、本研究では、ロイシン摂取後に食事を摂取させ、ロイシン摂取による mTORC1 活性化作用への食事の影響について検討した。

II 方法

1. 実験動物および飼育、解剖条件

実験動物は、7 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本エスエルシー株、静岡) を用いた。マウスは木製チップの床敷きの入ったプラスチックケージで単飼した。動物は、温度 22 ± 3 °C、湿度 55 ± 7 %、12 時間ごとの明暗サイクル (明期 7 : 00-19 : 00、暗期 19 : 00-7 : 00) の環境下で飼育し、水道水を自由飲水させた。飼料は、米国立栄養研究所により発表されたげっ歯類の実験動物用飼料の標準組成である AIN93G 組成の飼料を用いた (Table 1)¹⁶⁾。3 日間の予備飼育期間中、飼料は自由摂取させた。4 日目からはロイシン経口投与後の飼料摂取開始時刻を極力同時にするため、明期開始時刻 (7 : 00) から絶食させ、暗期開始 2 時間後 (21 : 00) に水道水を 10 μ l/g 体重で経口投与し、その後の暗期 10 時間は飼料を自由摂取させた。5 日目からは水道水の代わりにビークルである 0.2% キサンタンガム生理食塩水を経口投与した。8 日目の暗期開始 2 時間後に 0.2% キサンタンガム生理食塩水あるいはロイシン溶液 (1.35mg/10 μ l/g 体重) を経口投与し、飼料を自由摂取させた。摂取量は経口投与 1、3、5 時間後に測定し、各時間において各群の 3 匹ずつを頸椎脱臼し、足底筋を採取した。足底筋は採取直後に生理食塩水で洗い、液体窒素により瞬間凍結し、分析まで -80 °C で保存した。

本研究は、長崎国際大学健康管理学部研究等

Table 1 Composition of the AIN93G diet

Ingredient	g/kg diet
Cornstarch	397.486
Casein	200
Maltodextrin	132
Sucrose	100
Soybean oil	70
Cellulose	50
Mineral mix	35
Vitamin mix	10
L-Cystine	3
Choline bitartrate	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014

倫理委員会及び動物実験委員会にて承認を得た後に実施した（承認番号 17A05）。動物実験は、長崎国際大学動物実験に関する規程を順守して行った。

2. 総タンパク質抽出

足底筋は10倍容のホモジナイズ緩衝液【20 mM N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) pH 7.4、100mM 塩化カリウム、0.2mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、2 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、1 mM ジチオスレイトール (DTT)、50mM ふっ化ナトリウム、50mM β -グリセロリン酸、0.1mM ふっ化フェニルメチルスルホン、1 mM ベンズアミジン、0.5mM オルトバナジン (V) 酸ナトリウム】を用いて、ビーズ式破砕機でホモジナイズした。その後、4°C 10,000×g で10分間遠心分離した。上清の総タンパク質濃度は、タカラバイオ社の TaKaRa Bradford Protein Assay Kit を用いて測定した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質抽出液の総タンパク質濃度をホモジナイズバッファーで 6 mg/ml に調整し、6 × サンプルバッファー【0.35M トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン pH 6.8、10% SDS、

30%グリセロール、9.3% ジチオスレイトール、0.012%プロモフェノールブルー】を1×になるように1：5の割合で混合した。その後、100°C で5分間加熱処理後、氷冷した。電気泳動は、15%ポリアクリルアミドゲル (4EBP1)、10%ポリアクリルアミドゲル (S6K1) を用い、1 ウェルあたり15 μ g/3 μ l (4EBP1)、30 μ g/6 μ l (S6K1) をアプライして行った。

4. Western blotting

電気泳動後、タンパク質をメルクミリポア社製のポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜) に転写した。4EBP1 は分子量が15–20kDa であるため 0.2 μ m の PVDF 膜を使用し、S6K1 は 70 kDa であるため 0.45 μ m の PVDF 膜を用いた。転写後、PVDF 膜は、5%スキムミルク/0.1% Tween 20-トリス緩衝生理食塩水 (TBST) でブロッキングし、TBST で5分×3回洗浄した。その後、Cell Signaling Technology 社の抗 4EBP1 抗体 (#9644)、抗 pS6K1 抗体 (Thr 389; #9234) を5%ウシ血清アルブミン/TBST で1：1,000の割合になるように希釈し、室温で PVDF 膜と反応させた。TBST で5分×3回洗浄し、Cell Signaling Technology 社のペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を5%スキムミルク/TBST で1：2,000の割合になるように希釈し、室温で PVDF 膜と反応させた。TBST

で5分×3回洗浄し、ナカライテスク社の化学発光検出試薬(ケミルミワン Super)を用いて標的タンパク質を検出した。検出器はバイオラッド社のChemiDoc XRS Plusシステムを用いて行った。次に総S6K1を検出するため、pS6K1を検出したPVDF膜をTBSTで5分×2回洗浄し、ストリッピング緩衝液【6M グアニジン塩酸塩、0.2%ノニドット P40、10mM ジチオスレイトール、20mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン pH 7.5】¹⁷⁾で5分×2回洗浄することで抗体をPVDF膜から除去した。さらにTBSTで3分×4回洗浄し、ブロッキングから再度行った。その際、抗総S6K1抗体(#2708)はCell Signaling Technology社製のものを使用した。検出された標的タンパク質のバンドの定量は、バイオラッド社のImage Lab 5.2.1により行った。

5. 統計解析

測定値はすべて平均値±標準誤差(SE)で示した。2群間の有意差検定は、スチューデントの*t*検定により行い、群内の比較はTukeyの多重比較検定を用いた。すべての検定は、5%未

満の危険率で有意とみなした。統計処理は、オーエムエス出版のStatcel4を用いて行った。

III 結 果

1. 摂食量

経口投与後の摂食量は、食事開始1時間、3時間、5時間においてコントロール群とロイシン群の間に有意な差は認められなかった(図1)。一方、コントロール群、ロイシン群の両群において摂食量は食事開始1時間、3時間、5時間と時間の経過とともに増加していた。

2. 4EBP1、S6K1のリン酸化量

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において4EBP1は、リン酸の程度により α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームに分離される。もっとも高度にリン酸化された4EBP1が、 γ フォームであり、もっとも高分子量の位置に検出される。3つのアイソフォームのうち γ フォームのみが、eIF4Eとの結合能力を失っている。そのため、本研究では4EBP1のリン酸化を総4EBP1に対する γ フォームの割合で示した。

図2Aに示したように、食事開始1時間にお

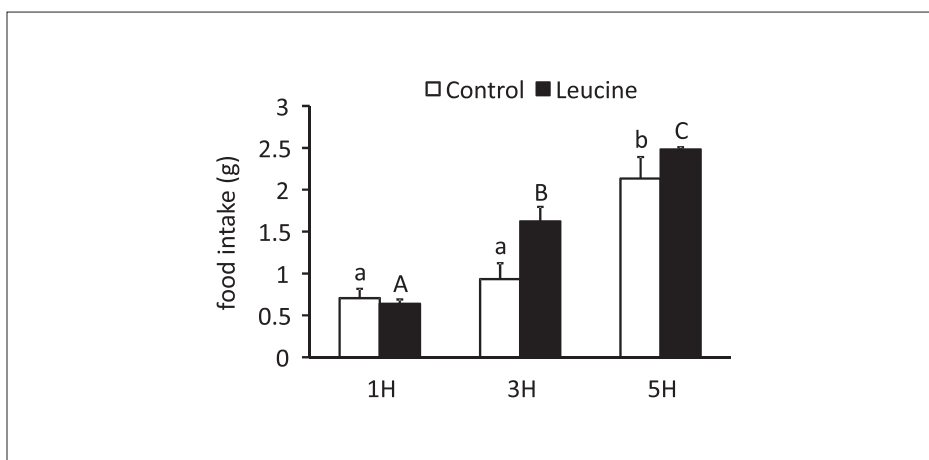


Figure 1

Average food intake of mice fed AIN93G diet after leucine administration is shown. At any given time, the food intake was similar between the control and leucine groups. However, across different time points, food intake varied within the same group (for a given group, values marked with different letter indicate significant difference, $P < 0.05$; * indicates significantly different from the control, $P < 0.05$; data are expressed as mean \pm SE for $n = 3$).

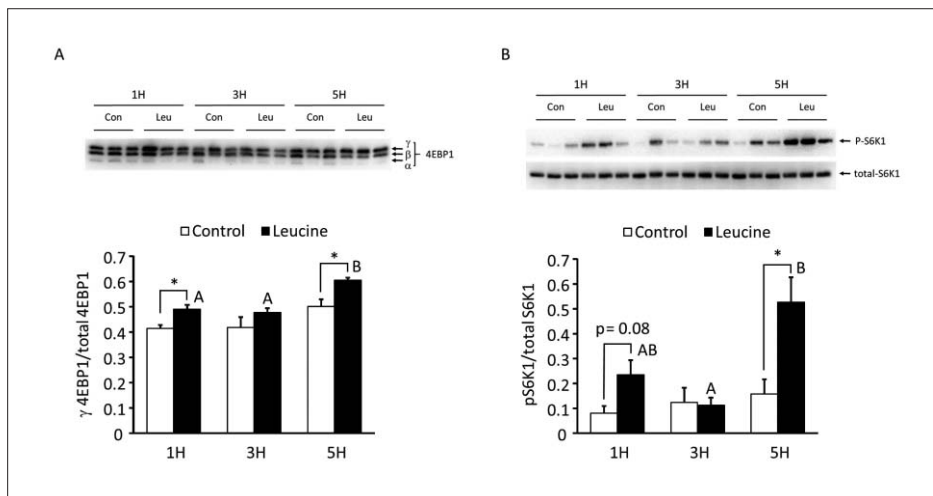


Figure 2
Change in the phosphorylation of 4EBP1 (A) and S6K1 at Thr389 (B) in plantaris muscle of mice fed AIN93G diet after vehicle or leucine administration. 4EBP1 is resolved electrophoretically into multiple bands on SDS-polyacrylamide gels. The most highly phosphorylated form, i.e., the γ -form, exhibits the slowest mobility. Across different time points, although the phosphorylation of both 4EBP1 and S6K1 in leucine group changed, those in control group did not change significantly. Values with different letter cases differ significantly within groups ($P < 0.05$). * indicates significantly different from the control group, $P < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SE for $n = 3$.

ける 4EBP1 のリン酸化は、食事のみを摂取したコントロール群と比べ、ロイシンと食事を摂取したロイシン群で有意に増加していた。一方、食事開始 3 時間における 4EBP1 のリン酸化には、コントロール群とロイシン群に差は認められなかった。しかし、食事開始 5 時間では、コントロール群と比較し、ロイシン群の 4EBP1 のリン酸化は有意に増加した。次に、各群において食事開始 1、3、5 時間の 4EBP1 のリン酸化を比較したところ、コントロール群では変化は認められなかった。しかし、ロイシン群では食事開始 1、3 時間と比べ、食事開始 5 時間で 4EBP1 のリン酸化は有意に増加していた。

S6K1 のリン酸化は、食事開始 1 時間ではコントロール群と比較してロイシン群で増加傾向を示していた ($P = 0.08$) (図 2 B)。一方、食事開始 3 時間での S6K1 のリン酸化は、コントロール群とロイシン群で差は認められなかった。しかし、食事開始 5 時間では、コントロール群と比べロイシン群の S6K1 のリン酸化は、有意に

増加した。次に、コントロール群において食事開始 1 時間、3 時間、5 時間の S6K1 のリン酸化を比較したところ、有意な変化は認められなかった。一方、ロイシン群では食事開始 1 時間と比較すると、食事開始 3 時間の S6K1 のリン酸化は低値を示し、食事開始 5 時間では高値を示していたが、有意な変化ではなかった。しかし、食事開始 3 時間と比べ、食事開始 5 時間では S6K1 のリン酸化は有意に増加していた。

以上の結果から、空腹時において食事のみの摂取に比べロイシンと食事の摂取は 4EBP1 と S6K1 のリン酸化を増加させることが明らかとなった。さらに、その増加作用は、食事開始からの時間により変化するが、食事開始 5 時間でさらに増加することが示された。

IV 考 察

本研究において我々は、ロイシン摂取後に食事を摂取した場合、ロイシンの mTORC1 活性化作用は認められるか、あるいは食事摂取のみ

でも同等の mTORC1 活性化が誘導されるかを明らかにするため、マウスへロイシンを経口投与し、AIN93G 組成の食事を摂取させた。その結果、ロイシン摂取による mTORC1 活性化作用は、食事開始からの時間により変化するが、ロイシン摂取後に食事を摂取しても観察され、食事のみでは同様の作用を示すことはできないことが明らかとなった。

経口投与後の摂食量は、時間の経過とともに増加したが、コントロール群とロイシン群で差はなかった (図 1)。しかし、食事開始 1 時間ではロイシン群の 4EBP1 のリン酸化は、コントロール群と比べ有意に増加し、S6K1 も増加傾向を示していた (図 2 A、B)。一方、食事開始 3 時間においては食事開始 1 時間で見られていた 4EBP1 の有意差は認められなくなり、S6K1 のリン酸化も低下していた。これまでの研究により空腹時のラットへロイシンのみを摂取させた場合、mTORC1 の基質である 4EBP1 と S6K1 のリン酸化は、30分あるいは 1 時間で最大となり、ロイシン摂取 3 時間以降は基底レベルに戻ることが示されている^{18, 19)}。また、ブタにロイシンを単独で静脈投与すると 4EBP1、S6K1 のリン酸化やタンパク質合成率は、ロイシン投与後 1 時間で増加するが、イソロイシンやバリンなどいくつかの血中アミノ酸濃度は低下し、さらに、ロイシン投与後 2 時間では 4EBP1、S6K1 のリン酸化や筋タンパク質合成率が低下することが報告されている⁴⁾。これらの結果から、ロイシンにより mTORC1 が活性化され、タンパク質合成が強力に促進されるとタンパク質の基質であるアミノ酸が欠乏し、ロイシン摂取後 3 時間程度では mTORC1 が阻害されると考えられる。実際に、アミノ酸欠乏状態では mTORC1 の活性が低下していることが多く報告されている²⁰⁻²²⁾。

一方、食事開始 5 時間において、我々は、ロイシン群で 4EBP1 と S6K1 のリン酸化の増加を再び検出した。ブタにロイシンを単独で静脈投与するとイソロイシンやバリンなどの血中ア

ミノ酸濃度が低下するのに対し、血中アミノ酸濃度が低下しないようにロイシンと同時に他のアミノ酸を静脈投与した場合、4EBP1 のリン酸化、筋タンパク質合成率を高く維持できることが示されている⁸⁾。このことから、食事開始 5 時間で見られたロイシン群の 4EBP1 と S6K1 のリン酸化の増加は、継続的な食事により mTORC1 の再活性化に必要な十分な量のタンパク質が消化・吸収され、アミノ酸が補給されることで生じたと考えられる。

これらのことを総合して考えると、ロイシンの単独摂取に比べ、ロイシンと食事を同時に摂取することによりロイシン以外のアミノ酸も補給され、mTORC1 はより活性化されると考えられる。さらに、体内のアミノ酸が増加している食後にロイシンを摂取することで mTORC1 の活性を維持することができ、タンパク質合成をより促進することができると推測される。つまり、実生活においてサプリメントとしてロイシンを摂取後に食事を摂取することは、mTORC1 の活性化を促進し、運動パフォーマンス向上のための筋肉増強や、サルコペニアの予防・改善などに有効であることが示唆される。しかし、本研究は、タンパク質合成率あるいはタンパク質合成量は測定できておらず、5 時間という筋タンパク質代謝に対しては短時間での実験であり、さらにロイシンも単回摂取である。そのため、ヒトの実生活において筋タンパク質量増加に効果的であるかはさらになる研究が必要である。

参考文献

- 1) Wu, G. (2009) 'Amino acids: metabolism, functions, and nutrition.' *Amino Acids*, 37(1): PP. 1-17.
- 2) Anthony, J. C., A. K. Reiter, T. G. Anthony, S. J. Crozier, et al. (2002) 'Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation.' *Diabetes*, 51(4): PP. 928-936.

- 3) Crozier, S. J., S. R. Kimball, S. W. Emmert, J. C. Anthony, et al. (2005) 'Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle.' *J Nutr*, 135(3): PP. 376-382.
- 4) Escobar, J., J. W. Frank, A. Suryawan, H. V. Nguyen, et al. (2005) 'Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation.' *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(5): PP. E914-921.
- 5) Suryawan, A., A. S. Jeyapalan, R. A. Orellana, F. A. Wilson, et al. (2008) 'Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation.' *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4): PP. E868-875.
- 6) Murgas Torrazza, R., A. Suryawan, M. C. Gazzaneo, R. A. Orellana, et al. (2010) 'Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation.' *J Nutr*, 140(12): PP. 2145-2152.
- 7) Yin, Y., K. Yao, Z. Liu, M. Gong, et al. (2010) 'Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs.' *Amino Acids*, 39(5): PP. 1477-1486.
- 8) Escobar, J., J. W. Frank, A. Suryawan, H. V. Nguyen, et al. (2007) 'Amino acid availability and age affect the leucine stimulation of protein synthesis and eIF4F formation in muscle.' *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(6): PP. E1615-1621.
- 9) Rieu, I., M. Balage, C. Sornet, C. Giraudet, et al. (2006) 'Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia.' *J Physiol*, 575(Pt 1): PP. 305-315.
- 10) Koopman, R., A. J. Wagenmakers, R. J. Manders, A. H. Zorenc, et al. (2005) 'Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects.' *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(4): PP. E645-653.
- 11) Sonenberg, N. & A. G. Hinnebusch (2009) 'Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.' *Cell*, 136(4): PP. 731-745.
- 12) Roux, P. P. & I. Topisirovic (2012) 'Regulation of mRNA translation by signaling pathways.' *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(11): a012252.
- 13) Chen, J., J. Choi, S. E. O'Leary, A. Prabhakar, et al. (2016) 'The molecular choreography of protein synthesis: translational control, regulation, and pathways.' *Q Rev Biophys*, 49: e11.
- 14) Magnuson, B., B. Ekim & D. C. Fingar (2012) 'Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks.' *Biochem J*, 441(1): PP. 1-21.
- 15) Yoshizawa, F., S. R. Kimball, T. C. Vary & L. S. Jefferson (1998) 'Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver.' *Am J Physiol*, 275(5 Pt 1): PP. E814-820.
- 16) Reeves, P. G., F. H. Nielsen & G. C. Fahey, Jr. (1993) 'AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.' *J Nutr*, 123(11): PP. 1939-1951.
- 17) Yeung, Y. G. & E. R. Stanley (2009) 'A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing.' *Anal Biochem*, 389(1): PP. 89-91.
- 18) Shimizu, N., N. Yoshikawa, N. Ito, T. Maruyama, et al. (2011) 'Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle.' *Cell Metab*, 13(2): PP. 170-182.
- 19) Yoshizawa, F., H. Sekizawa, S. Hirayama, A. Hatakeyama, et al. (2001) 'Time course of leucine-induced 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation in the liver and skeletal muscle of rats.' *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 47(4): PP. 311-315.
- 20) Rocco, M., J. L. Bos & F. J. Zwartkruis (2006) 'Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids.' *Oncogene*, 25(5): PP. 657-664.
- 21) Nicklin, P., P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, et al. (2009) 'Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy.' *Cell*, 136(3): PP. 521-534.
- 22) Broer, S. & A. Broer (2017) 'Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms.' *Biochem J*, 474(12): PP. 1935-1963.