運動容量と筋タンパク質代謝応答の関係性から見た 至適運動条件の探索

名古屋工業大学 小笠原 理 紀

Relationship Between Resistance Exercise Volume and Muscle Protein Metabolism

by

Riki Ogasawara
Nagoya Institute of Technology

ABSTRACT

Resistance exercise volume is known as an important factor to stimulate muscle protein synthesis (MPS) and the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling is considered to be involved in the mechanisms. However, the effects of relatively high-volume resistance exercise on mTORC1 signaling and MPS remain unclear. Thus, the purpose of this study was to investigate the relationship between resistance exercise volume and MPS using animal model of resistance exercise. Male Sprague-Dawley rats aged 11 weeks were subjected to resistance exercise, and gastrocnemius samples were obtained 6 h after performing 1, 3, 5, 10, or 20 sets of resistance exercise. Significant increase in p70S6K phosphorylation, a marker of mTORC1 activity, after resistance exercise was observed in all of exercise conditions tested, and the phosphorylation degree gradually increased with increasing number of resistance exercise sets. On the other hand, although resistance exercise increased MPS gradually with increasing sets of resistance exercise, the increase in MPS reached a plateau after 5 sets of resistance exercise, and no further increase in MPS was observed in response to additional resistance exercise sets. Therefore, the increase in MPS

with increasing resistance exercise volume may be saturated independent of p70S6K phosphorylation.

要旨

レジスタンス運動において、運動量は筋タンパ ク質合成 (MPS) を増加させるための重要な変 数であることが知られている。また、MPS の増 加は主に mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルの活性化を介していると考 えられている. しかし、運動量を過剰に増加させ たときの mTORC1 の活性化や MPS の増加に関 しては知られていない、本研究では、動物レジス タンス運動モデルを用いて運動量と mTORC1 活 性化、MPS 増加の関係性について検討した。若 齢 Sprague-Dawley 系雄ラットに対して電気刺激 による最大等尺性収縮10回を1,3,5,10もし くは20セット実施し、6時間後に腓腹筋を採取 した. mTORC1 活性マーカーである p70S6K の リン酸化はセット数の増加とともに亢進したが. MPS の増加は5セットで頭打ちになり、10,20 セット行ってもさらに増加することはなかった. 以上から、運動量の増加に伴って、mTORC1シ グナルとは無関係に MPS は頭打ちになると考え られる.

緒言

骨格筋量は筋タンパク質の合成(MPS)と分解(MPB)のバランスによって決定される。通常、我々の MPS と MPB のバランスは一日の中で食後の MPS 過多と空腹時の MPB 過多を繰り返しダイナミックに変動するが、一日全体でみると両者のバランスがとれているため、骨格筋量は通常の生活を送っている限りほとんど変化しない。一方、レジスタンス運動は MPS を 24-48 時間にわたって増加させる 1)。この時、MPB も増加す

ることが報告されているが、MPS に比べると少なく、MPS が MPB を上回る $^{1)}$. したがって、レジスタンス運動を日常生活にプラスして定期的に実施すると、次第に筋タンパク質の蓄積が起こり、骨格筋量が増加する。

レジスタンス運動によって MPS を増加させる ためには、運動量(発揮張力 × 収縮回数もしく は収縮時間)が重要な変数であることがわかって いる $^{2,3)}$. 例えば、レジスタンス運動を 1 セット 実施するよりも 3 セット実施するほうが MPS の 増加が大きい $^{2)}$. しかし、それよりもさらに運動量を増やしていくと MPS がどのように変化して いくのかは知られていない。

レジスタンス運動による MPS の増加は、タンパク質キナーゼ mechanistic target of rapamycin (mTOR) を中心としたタンパク質複合体 mTOR complex 1 (mTORC1) の活性化を介して生じることが知られている 4). 先行研究において、レジスタンス運動を実施したときの mTORC1 活性マーカーである p70S6K のリン酸化も MPS 同様に運動量依存的(1 セット < 3 セット < 5 セット)であることが報告されている 2,5). したがって、運動量の増加に伴う MPS の増加は mTORC1 の活性化を介していると考えられるが、MPS と同様により運動量の多いレジスタンス運動を実施したときにどのように変化するかは知られていない。

運動,特に持久性運動のようなタイプの筋収縮は mTORC1 を抑制する regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) や AMP-activated protein kinase (AMPK) を増加させることが知られている $^{6,7)}$. したがって,mTORC1 の活性化と MPS の増加は運動量の増加に伴って次

第に停滞し、その後は低下する可能性が考えられる。そこで本研究では、運動量の増加が mTOR シグナルと MPS に及ぼす影響について明らかにし、至適な運動量条件について探索することを目的とした。

1. 実験方法

1. 1 実験動物

11 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットを用いた. ラットは 22-24℃に保たれた飼育室において 12 時間ごとの明暗サイクル環境下で個別に飼育した. 飲料水および実験動物用固形飼料 (CE-2, 日本クレア) は自由摂食とした. 本実験は名古屋工業大学が定める動物実験規定に従い, 名古屋工業大学動物実験委員会の審査・承認を経て実施した.

1. 2 筋収縮方法

12時間の一晩絶食後、イソフルランによる吸 入麻酔下にて各ラットの下腿部を毛剃りし. アル コール綿で拭いた. その後, ラットは俯せの状態 にて右足をフットプレートに足関節角度90°で 固定した. 筋収縮は. 表面電極 (ビトロード V. 日本光電) を用いてラット腓腹筋を経皮的に電気 刺激することで誘発した.表面電極は10 mm× 5 mm にカットし、電気刺激装置 (SEN-3401, 日 本光電) とアイソレータ (SS104J, 日本光電) に 接続した. 電気刺激による筋収縮3秒10回(収 縮間7秒)を1セットとし、1、3、5、10もしく は20セット行った(セット間3分, 各n=4). 電 気刺激は100 Hz にて行い、電圧は最大筋収縮ト ルクが発揮されるように調節した. 右脚腓腹筋を 電気刺激し、左脚腓腹筋をコントロールとした. 5セットを用いたプロトコルによって mTORC1 の活性化、MPS の増加、さらに長期効果として 筋肥大を観察した⁴⁾.

1. 3 ウェスタンブロッティング

凍結筋サンプルを, ビーズ破砕機 (μT-12. TAITEC) を用いてパウダー化した. パウダー 化した筋サンプルは、低温のホモジナイズバッ ファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, and HaltTM protease and phosphatase inhibitor cocktail [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MAI) を用いて氷上でホモジナイズし た. 遠心分離 (10,000×g, 10 分, 4℃) 後に上 清を回収し、タンパク質濃度を測定した. その後 サンプルバッファー (Cell Signaling Technology) と混合した後、95℃で5分間加熱した、5-20% gradient SDS-PAGE gel を用いてタンパク質を 電気泳動によって分離し、PVDFメンブレンに 転写した. 転写後は室温で RAPIDBLOCK TM SOLUTION (AMRESCO) を用いて5分間ブ ロッキングした後,一次抗体 (phospho-Akt Ser473, phospho-p70S6K Thr389, phosphor-4E-BP1 Thr37/46, phosphor-AMPK Thr172, REDD1) $\sim 4^{\circ}$ C で一晩反応させた. その後, 室温で2次抗体を1 時間反応させ、化学発光試薬を用いて目的タンパ ク質を検出した.

1. 4 筋タンパク質合成

SUnSET 法を用いて筋タンパク質合成の測定を行った $^{8)}$. 筋サンプル採取の 15 分前に $0.04~\mu$ mol puromycin/g body wt を腹腔内に投与した. 採取後はホモジナイズした後に遠心分離($2,000\times$ g, 3 分,4 $^{\circ}$)し,上清を回収した.その後は抗ピューロマイシン抗体を用いてウェスタンブロッティングと同様の手順を実施した.

1. 5 統計解析

条件間の差は Benjamini-Hochberg 法を用いた 多重比較検定を行った. データは平均値 ± 標準 誤差で示し, 統計的有意水準は 5% 未満とした.

2. 結果

2. 1 筋タンパク質合成

すべての条件で筋収縮によって筋タンパク質合成 (MPS) が増加した. その増加の程度は5セットまでは増加したが,5セット,10セット,20セット後の MPS の増加において違いは観察されなかった (図 1).

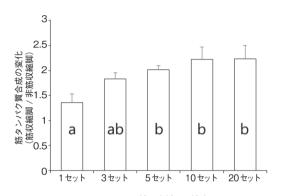


図1 セット数の増加に伴う 筋タンパク質合成 (MPS) の変化 アルファベットの違いは筋収縮によるMPSの増加が条件間で異なることを意味する

2. 2 mTOR シグナル

mTORC1 の下流にある p70S6K のリン酸化は すべてのセット条件で増加した. さらに, その増加の程度はセットの増加とともに増加した(図2). 一方, p70S6K と同様に mTORC1 の下流に

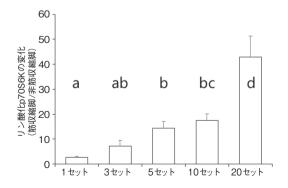


図2 セット数の増加に伴うリン酸化p70S6Kの変化 アルファベットの違いは筋収縮によるリン酸化p70S6Kの増加 が条件間で異なることを意味する

ある 4E-BP1 のリン酸化は、1 セットと 3 セット 条件では増加せず、5 セット、10 セット、20 セット ト条件で増加した。ただし、5 セット、10 セット、20 セット後の増加において条件間での違いは観察されなかった(図 3).

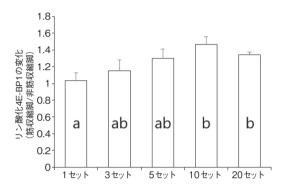


図3 セット数の増加に伴うリン酸化4E-BP1の変化 アルファベットの違いは筋収縮によるリン酸化4E-BP1の増加が 条件間で異なることを意味する

2. 3 mTOR シグナル抑制因子

AMPK のリン酸化はすべての条件でレジスタンス運動によって変化しなかった(図 4). 一方, REDD1 は1セット条件以外で増加し, さらにその程度は3セット条件に比べ5セット,10セット,20セット条件で大きかった. しかし,5セット,10セット,20セット後の変化において条件間で違いは観察されなかった(図 5).

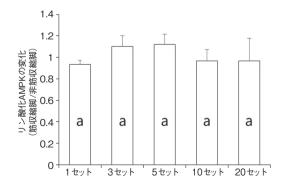


図4 セット数の増加に伴うリン酸化AMPKの変化 アルファベットの違いは筋収縮によるリン酸化AMPKの増加が 条件間で異なることを意味する

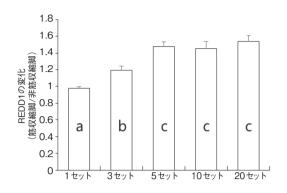


図5 セット数の増加に伴うREDD1の変化 アルファベットの違いは筋収縮によるREDD1の増加が条件間 で異なることを意味する

3. 考察

レジスタンス運動を実施する際,運動量(発揮張力×収縮回数もしくは収縮時間)はmTORC1の活性化やMPS増加において重要な変数であることが知られている^{2,3,5)}. ラットのレジスタンス運動モデルを用いた本研究においても,運動量の増加に伴いmTORの活性化とMPS増加が大きく観察され,先行研究と一致していた.一方,これまで未検討であった,さらに運動量を増加させた場合,mTORC1の活性マーカーであるp70S6Kのリン酸化はさらに増加したが,MPSの増加は顕打ちになった.

p70S6K のリン酸化は mTORC1 活性の主要なマーカーであり、レジスタンス運動によって増加することが数多く報告されている $^{2-5)}$. 先行研究においては p70S6K のリン酸化と MPS や筋肥大において有意な相関関係が認められたことが数多く報告されている $^{2,9)}$. レジスタンス運動を 3 セット行った場合に p70S6K のリン酸化や MPS の増加が 1 セットよりも大きく観察されたことも報告されている $^{2)}$. しかし、本研究においても 2 セットまでは 2 しかし、本研究においても 3 セットまでは 2 しかし、本研究においても 3 セット数の増加とともに増加したものの、 3 10、 3 20 セットと運動量を増やした際、 5 セットと比べて

p70S6K リン酸化の増加は観察されたが、MPS の増加は観察されなかった。したがって、運動量の多いレジスタンス運動を実施した場合、必ずしもp70S6K のリン酸化の亢進が MPS の増加には結びつくわけではないと考えられる。現時点でそのメカニズムは不明であるが、最近はレジスタンス運動による MPS の増加が p70S6K のリン酸化とは独立して生じることが複数報告されている 4,10,111. 以上から、レジスタンス運動による MPS の増加は運動量の増加に伴って増加するものの、途中で頭打ちになり、レジスタンス運動の効果の獲得効率が低下すると考えられる。また、そのメカニズムは p70S6K のリン酸化とは独立したメカニズムであると考えられる。

本研究では、mTORC1の活性マーカーとして p70S6K のリン酸化だけでなく、4E-BP1 のリン 酸化の測定を行った。ともに mTORC1 によって リン酸化される因子ではあるが、結果として運動 量の増加に対する応答は異なるものであった。 す なわち p70S6K のリン酸化は運動量の増加に伴っ て 20 セットまで増加したものの、4E-BP1 のリン 酸化の増加は 5-10 セットで頭打ちになり、MPS の変化と類似したものであった. p70S6K と 4E-BP1 のリン酸化反応が異なるメカニズムの詳細は 不明だが、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン に対する感受性の違い 12) や筋収縮に対する応答 性の違いが報告されており13),本研究の結果も 両者は mTORC1 に異なる制御を受けているとい う先行研究の結果を支持するものであった。 今後 は両者の不一致や MPS との関係性を詳細に検討 していく必要がある.

先行研究において、REDD1の発現量は p70S6Kのリン酸化レベルに影響を及ぼすことが報告されている $^{14)}$. 具体的には、筋収縮による p70S6K リン酸化の増加に影響を及ぼすのではなく、REDD1 欠損によって安静時の p70S6K リン酸化レベルが亢進したことが報告されてい

る. 本研究においては、複数セットのレジスタ ンス運動によって REDD1 の発現量が増加したも のの、p70S6Kのリン酸化はセット数の増加とと もに増加し続けた. したがって, レジスタンス 運動による REDD1 増加のレジスタンス運動によ る p70S6K リン酸化調節における役割は、非常 に小さい可能性が考えられる. 一方. 本研究で はmTORC1の抑制因子としてAMPKの検討も 行った. しかし、AMPK のリン酸化に関して条 件間で有意な違いは観察されなかった. これは. AMPK のリン酸化のピークは運動直後であり 7), 本研究における6時間後では安静時に戻っていた ためであろうと考えられる. この点は今後の研究 課題としたいが、いずれにしても p70S6K のリン 酸化はセット数の増加とともに増加し続けたた め、mTORC1を介したp70S6Kのリン酸化に対 する AMPK の影響は非常に限られたものである 可能性が考えられる.

本研究では、レジスタンス運動 6 時間後の骨格筋について解析を行った。これは、我々が用いたモデルでの MPS のピークが 6 時間後であるからである 4)。しかし、MPS はレジスタンス運動によって運動中に低下し、運動終了後から増加しはじめ、24-48 時間程度安静時を上回った状態が持続する 1,4,13)。したがって、今後はレジスタンス運動直後や 24 時間後など、異なる時間帯での観察がより厳密にレジスタンス運動の効果を判定する上で必要になってくる。さらに、MPS だけでなく、MPB の変化を考慮することでより至適なレジスタンス運動の条件について明らかにすることができると考えられる。

本研究は実験動物を対象としたものであるため、単純にセット数をヒトに置き換えて考えることは難しい。しかしながら、ヒトにおいても本研究において観察された運動量の増加に伴う MPSの頭打ち現象は存在すると考えらえられる。ヒトにおいて過度なセット数の実験を実施することは

困難であるが、本研究で観察された MPS の頭打ち現象のメカニズムを解明し、ヒトにおいても至適な条件について検討することができれば、レジスタンス運動の効果を最適化していく手法の開発が進んでいくと考えられる。

4. 結 論

レジスタンス運動の運動量を増加させると、mTORC1の主要な活性マーカーであるp70S6Kのリン酸化は亢進し続けるものの、MPSの増加は頭打ちになり、レジスタンス運動効果の獲得効率が減少することが示唆された。今後はより多くの時間帯での観察や、MPSが停滞したメカニズムの解明が必要である。

謝辞

本研究に対し助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり多大なご助力をいただきました東京大学の石井直方教授、日本体育大学の中里浩一教授に深く感謝いたします。

文 献

- Phillips S.M., Tipton K.D., Aarsland A., Wolf S.E., Wolfe R.R., Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans, *Am. J. Physiol.*, 273: E99-107 (1997)
- 2) Burd N.A., Holwerda A.M., Selby K.C., West D.W., Staples A.W., Cain N.E., Cashaback J.G., Potvin J.R., Baker S.K., Phillips S.M., Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men, J. Physiol., 588: 3119-3130 (2010)
- 3) Burd N.A., Andrews R.J., West D.W., Little J.P., Cochran A.J., Hector A.J., Cashaback J.G., Gibala M.J., Potvin J.R., Baker S.K., Phillips S.M., Muscle time under tension during resistance exercise stimulates differential muscle protein sub-fractional synthetic responses in men, *J. Physiol.*, 590: 351-362 (2012)

- 4) Ogasawara R., Fujita S., Hornberger T.A., Kitaoka Y., Makanae Y., Nakazato K., Naokata I., The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise, *Sci. Rep.*, 6: 31142 (2016)
- 5) Terzis G., Spengos K., Mascher H., Georgiadis G., Manta P., Blomstrand E., The degree of p70 S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 110: 835-843 (2010)
- Murakami T., Hasegawa K., Yoshinaga M., Rapid induction of REDD1 expression by endurance exercise in rat skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405: 615-619 (2011)
- Ogasawara R., Sato K., Matsutani K., Nakazato K., Fujita S., The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle, Am. J. Physiol. Endcocrinol. Metab., 306: E1155-1162 (2014)
- Goodman C.A., Mabrey D.M., Frey J.W., Miu M.H., Schmidt E.K., Pierre P., Hornberger TA., Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique, FASEB J., 25: 1028-1039 (2011)
- Baar K. and Esser K., Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise, Am. J. Physiol., 276:

- C120-127 (1999)
- 10) Philp A., Schenk S., Perez-Schindler J., Hamilton D.L., Breen L., Laverone E., Jeromson S., Phillips S.M., Baar K., Rapamycin does not prevent increases in myofibrillar or mitochondrial protein synthesis following endurance exercise. *J. Physiol.*, 593: 4275-4284 (2015)
- 11) West D.W., Baehr L.M., Marcotte G.R., Chason C.M., Tolento L., Gomes A.V., Bodine S.C., Baar K., Acute resistance exercise activates rapamycinsensitive and -insensitive mechanisms that control translational activity and capacity in skeletal muscle, *J. Physiol.*, 594: 453-468 (2016)
- 12) Thoreen C.C., Kang S.A., Chang J.W., Liu Q., Zhang J., Gao Y., Reichling L.J., Sim T., Sabatini D.M., Gray N.S., An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycinresistant functions of mTORC1, *J. Biol. Chem.*, 284: 8023-8032 (2009)
- 13) Dreyer H.C., Fujita S., Cadenas J.G., Chinkes D.L., Volpi E., Rasmussen B.B., Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle, *J. Physiol.*, 576: 613-624 (2006)
- 14) Gordon B.S., Steiner J.L., Lang C.H., Jefferson L.S., Kimball S.R., Reduced REDD1 expression contributes to activation of mTORC1 following electrically induced muscle contraction, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 307: E703-711 (2014)