

レジスタンストレーニングの継続に伴う 筋肥大応答の減弱メカニズムの解明

立命館大学 竹垣 淳也
(共同研究者) 立命館大学大学院 佐瀬 晃平

Mechanism for Attenuation of Muscle Hypertrophic Effect Per Exercise Sessions in Continuous Resistance Training

by

Junya Takegaki
*Research Organization of Science and Technology,
Ritsumeikan University*
Kohei Sase
Faculty of Sport and Health Science, Ritsumeikan University

ABSTRACT

Resistance exercise training is effective for muscle hypertrophy, but continuous training gradually attenuates the hypertrophic effect per exercise session. Inactivation of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1, which plays role in protein synthesis in skeletal muscle) after resistance exercise is involved in the mechanism. Meanwhile, mTORC1 accounts for not only muscle protein anabolic systems but also muscle protein catabolic systems. Here, we investigated the bouts dependent changes in the ubiquitin-proteasome system and autophagy-lysosome system related factors, which are main protein catabolic systems in skeletal muscle, after resistance exercise. Male Sprague-Dawley rats were resistance-exercised 10 bouts with interval of 48 hours between bouts. The resistance exercise consisted of 50 repetitions of maximal isometric contractions of the right gastrocnemius muscle, elicited by transcutaneous electrical

stimulation under anesthesia. Immediately (0h post-RE) and 3h (3h post-RE) after the 1st and 10th exercise bouts, muscle samples were collected. The left gastrocnemius muscles were served as internal control. At 0h post-RE, the expression of ubiquitinated proteins decreased despite the number of exercise bouts. At 3h post-RE, the expression of ubiquitinated proteins increased despite the number of exercise bouts. At 0h post-RE, the expression of LC3-II (an indicator of autophagosome formation) did not change at both number of exercise bouts. At 3h post-RE, the expression of LC3-II decreased despite the number of exercise bouts. These results suggest that the response of the ubiquitin-proteasome system and autophagy-lysosome system does not change in continuous resistance exercise training, and the changes in the response of protein catabolic systems is not involved in the blunting of muscle hypertrophic effect.

要 旨

レジスタンストレーニングは、骨格筋量を維持・増大させるが、トレーニングの継続に伴い、セッション当たりの筋肥大効果は減弱する。そのメカニズムとして、筋タンパク質合成に関わるmTOR複合体1 (mTORC1) の運動応答の鈍化が関与するとされている。一方でmTORC1は筋タンパク質分解系にも関与するが、その応答変化は不明である。この点を明らかにするため、本研究では10週齢の雄性SDラットに対して48時間毎にレジスタンス運動を実施し、1Bout目と10Bout目の終了直後と3時間後に対象筋を摘出し、各種解析を行った。ユビキチン化タンパク質の発現量は、Bout数に関わらず運動直後に減少し、3時間後に増加していた。オートファゴソーム形成の指標であるLC3-IIの発現量は、Bout数に関わらず運動終了3時間後に減少していた。以上のことから、レジスタンストレーニングの継続に伴い筋タンパク質分解系の応答は顕著には変化せず、筋肥大応答の鈍化メカニズムに関与しない可能性が示唆された。

緒 言

レジスタンストレーニングは、骨格筋肥大を惹起する有用な手段である。一方で、レジスタンストレーニングを長期的に実施すると、運動の繰り返しに伴い1セッション当たりの筋肥大効率が低減することが示されている^{1,2)}。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

骨格筋量は筋タンパク質の合成と分解のバランスによって変化する。レジスタンス運動を実施すると、一過性の合成・分解双方の活性化が生じるが、合成の活性化がより顕著であるため、結果として出納バランスが合成優位となり、筋内へタンパク質が蓄積される³⁾。このレジスタンス運動後の筋タンパク質合成の活性化には、mTOR複合体1 (mTORC1) が部分的に関与する^{4,5)}。一方で、先行研究により、レジスタンス運動後のmTORC1の活性化が、レジスタンス運動の繰り返しに伴い減弱することが報告されており⁶⁾、運動後の筋タンパク質合成シグナル応答減弱が、トレーニングの継続に伴う筋肥大応答の鈍化メカニズムの一端を担うと考えられている。

しかしながら、mTORC1は筋タンパク質の合成のみならず、分解にも関与することが知られて

いる。筋タンパク質の分解は、主にユビキチン・プロテアソーム系と、オートファジー・リソソーム系によって行われる。ユビキチン・プロテアソーム系では、被分解タンパク質がユビキチン化修飾によって標識化され、26Sプロテアソームによって分解される。この系では、特にミオシン重鎖・軽鎖といった、収縮関連タンパク質が分解されることが知られている⁷⁻⁹⁾。また、オートファジー・リソソーム系では、細胞の構成要素が隔離膜によって包囲され、オートファゴソームが形成された後、リソソームと融合することで分解が行われる¹⁰⁾。特に、mTORC1はオートファジーにおける隔離膜の形成を負に制御するULK1のSer757残基をリン酸化することが知られている¹¹⁾。また、レジスタンス運動直後には、細胞内のエネルギーセンサーであるAMPKの活性化が生じる¹²⁾。AMPKはmTORC1と相互に抑制し合う関係にあるが¹³⁾、一方でAMPKの活性化はユビキチンリガーゼの発現やオートファジーの活性化を惹起することが知られている^{14,15)}。このように、mTORC1の活性化応答の減弱は、筋タンパク質合成応答の低減のみならず、筋タンパク質分解系の活性化を生じる可能性がある。

以上のことから、本研究はレジスタンス運動の繰り返しに伴う筋タンパク質分解系の応答変化を検証することを目的とした。

1. 研究方法

1.1 研究デザイン

10週齢の雄性SDラット24匹を実験に用いた。動物は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ の環境で、12時間毎の明暗サイクル下で飼育され、摂餌および飲水は自由とした。ラットの右腓腹筋に対して48時間毎にレジスタンス運動を実施し、1セッション目および10セッション目終了直後と3時間後に、イソフルラン吸入麻酔下で放血屠殺により安楽死させ、腓腹筋を摘出した。なお、安楽死前は一晩絶食とした。

得られた筋サンプルは、解析を実施するまで -80°C で保存した。すべての実験は、立命館大学の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

1.2 レジスタンス運動プロトコル

レジスタンス運動は、先行研究に従い実施した¹⁶⁾。イソフルラン吸入麻酔下で、右下肢を剃毛し、露出させた皮膚をアルコールワイプで清拭した。ラットを腹臥位にし、右足を足底板に当て、足関節角度を 90° （底背屈 0° ）で固定した。その状態で、電気刺激装置（SEN-8203；日本光電、東京、日本）とアイソレーター（SS-104J；日本光電）に接続された電極（Vitrode V, Ag/AgCl；日本光電）を右下肢に貼付し、右腓腹筋を経皮的に電気刺激した。レジスタンス運動は最大等尺性収縮（3秒間の収縮+7秒間の弛緩）10回を、3分間のセット間休憩を設けて5セット実施することで行った。左腓腹筋は、同一個体内の対照として用いた。

1.3 ウェスタンブロッティング

腓腹筋サンプルを、プロテアーゼ阻害剤（cOmplete Mini protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, セントルイス, MO, USA）とフォスファターゼ阻害剤（Sigma-Aldrich）を含むRIPAバッファー（Cell Signaling Technology (CST), デンバー, MA, USA）にて可溶化し、 $10,000 \times \text{g}$ で10分間、 4°C で遠心分離した。上清のタンパク質濃度の測定後、 $3 \times \text{Blue Loading Buffer}$ （CST）とサンプルを混合し、 95°C で5分間加熱して変性させた。同量のタンパク質（ $10 \mu\text{g}$ ）を、TGXゲル（BioRad, ハーキュリーズ, CA, USA）またはm-PAGE（アトー株式会社、東京、日本）を用いて分離させ、PVDF膜へと転写した。転写後、PVDF膜をBullet Blocking One（ナカライテスク株式会社、京都、日本）によって5分間、室温でブロッキングし、その後、以下の1次抗体と一晚インキュベートした：Ubiquitin (#3936, CST),

Atrogin-1 (ab168372, Abcam, ケンブリッジ, UK), MuRF-1 (sc-398608, Santa Cruz, ダラス, TX, USA), LC3 (#2775, CST), p62/SQSTM (PM045, Medical & Biological Laboratory, 名古屋, 日本), phospho-ULK1 (Ser757, #14202, CST), phospho-ULK1 (Ser555, #5869, CST), phospho-ULK1 (Ser317, #12753, CST), total-ULK1 (#8054, CST). その後, PVDF膜を適切な2次抗体と室温で1時間インキュベートし, 発光基質 (Immobilon Forte Western HRP substrate, Millipore, CA, USA) を用いてバンドを可視化した. 検出はFUSIONケミルミイメージングシステム (エムエス機器, 大阪, 日本) を用いて行い, バンドの発光強度はImage Jソフトウェア (NIH, MD, USA) を用いて定量化した. また, ポンソーS染色により, レーン毎にアプライされたタンパク質量が同量であることを確認すると同時に, 定量化した値の標準化を行った.

1. 4 統計解析

統計解析は, GraphPad Prism (Ver. 8.0, Macintosh, GraphPad Software, CA, USA) を用いて行った. データは2元配置分散分析 (Exercise × Bout) を用いて解析し, 有意な交互作用が認められた際には, Sidakの多重比較検定を行った. すべての値は平均値 ± 標準誤差と個別値プロットにより示し, 有意水準は5%未満とした.

2. 研究結果

2. 1 ユビキチン・プロテアソーム系

レジスタンス運動直後, ユビキチン化タンパク質の発現量はBout数に関わらず運動によって減少していた (運動による負の主効果: $P < 0.001$, 図1A). Atrogin-1とMuRF-1の発現量に有意な変化は認められなかった (図1A). レジスタンス運動終了から3時間後, ユビキチン化タンパク質の発現量は, Bout数に関わらず運動によって増加

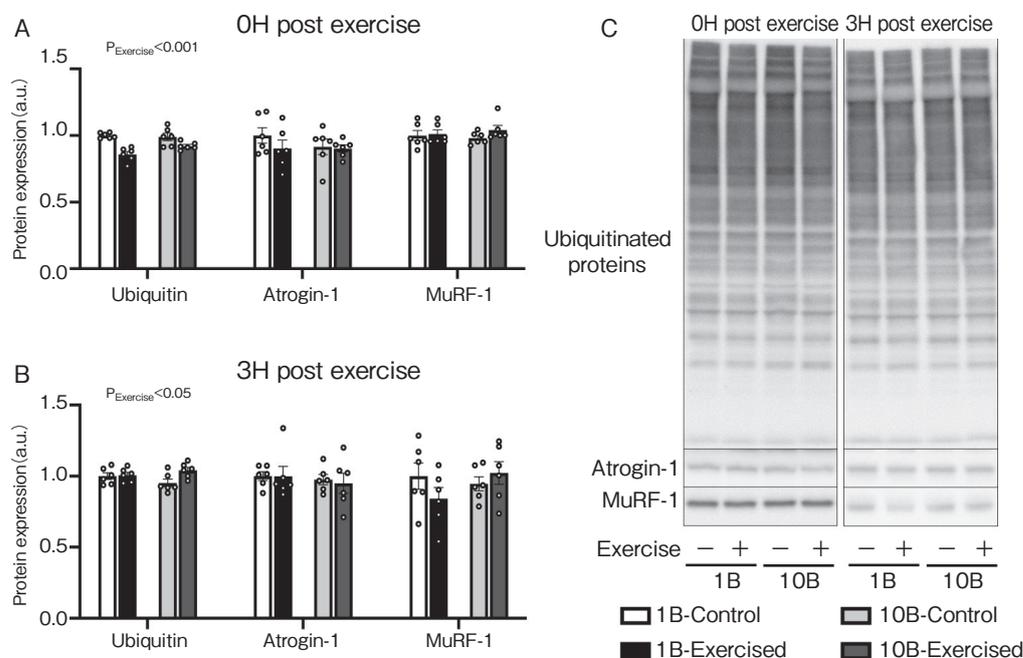


図1 ユビキチン・プロテアソーム系関連因子の発現変化
運動終了直後の各因子の発現 (A), 運動終了3時間後の各因子の発現 (B), 代表バンド (C).
データは各時点の1Bout目の対照脚との相対値で, 平均値 ± 標準誤差で示している.

していた（運動による正の主効果： $P < 0.05$, 図1B). Atrogin-1とMuRF-1の発現量に有意な変化は認められなかった（図1B).

2. 2 オートファジー・リソソーム系

レジスタンス運動直後, LC3-I・LC3-IIの発現量に有意な変化は認められなかった（図2A). LC3 II/I比は, Bout数に関わらず運動によって減少していた（運動による負の主効果： $P < 0.05$, 図2A). 一方で, p62の発現量は, 10Bout目において, 対照脚と比較して運動脚が有意に高値を示した（図2A). レジスタンス運動終了から3時間後, LC3-Iの発現量に有意な変化は認められなかった（図2B). LC3-IIおよびLC3 II/I比は, Bout数に関わらず運動によって減少していた（運動による負の主効果:いずれも $P < 0.01$, 図2B). 一方で, p62の発現量は, 10Bout目において, 対照脚と比較して運動脚が有意に高値を示した（図2B).

2. 3 ULK1の発現

レジスタンス運動直後, Ser757残基のリン酸化型ULK1タンパク質発現量は, 10Bout目において対照脚と比較して運動脚が有意に高値を示した（図3A). Ser555残基のリン酸化型ULK1タンパク質発現量は, 1Bout目・10Bout目いずれも, 対照脚と比較して運動脚が有意に高値を示した（図3A). Ser317残基のリン酸化型ULK1タンパク質およびULK1の総タンパク質発現量は, Bout数に関わらず運動によって増加していた（運動による正の主効果, それぞれ $P < 0.0001$ と $P < 0.001$, 図3A). レジスタンス運動終了から3時間後, Ser757残基のリン酸化型ULK1タンパク質発現量は, Bout数に関わらず運動によって増加していた（運動による正の主効果, $P < 0.05$, 図3B). Ser555残基のリン酸化型ULK1タンパク質発現量には, 有意な変化は認められなかった. Ser317残基のリン酸化ULK1型タンパク質発現量は, 1Bout目において対照脚と比較して運動脚で

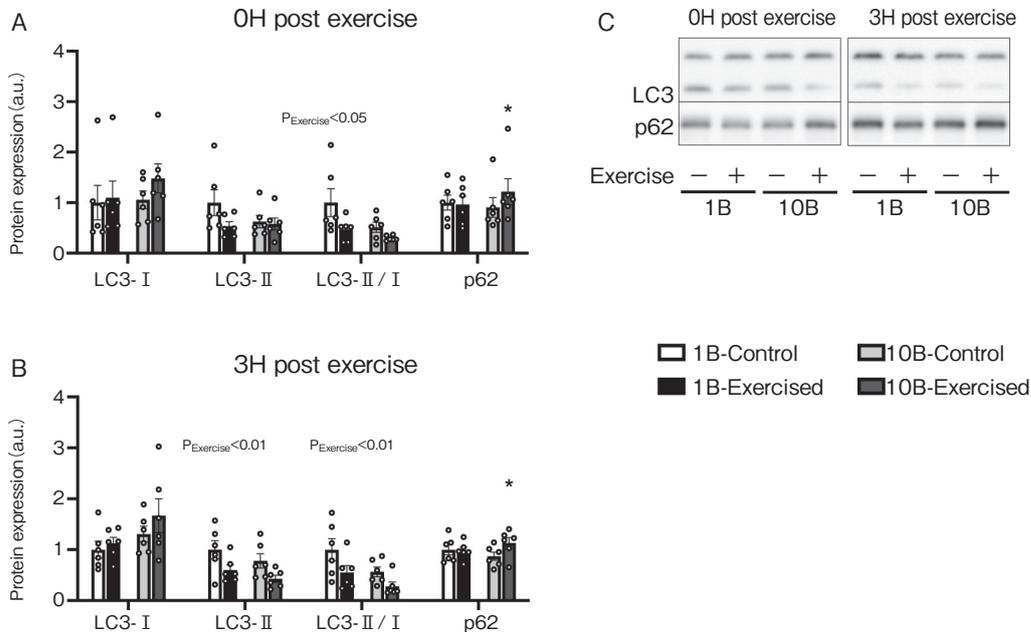


図2 オートファジー・リソソーム系関連因子の発現変化
運動終了直後の各因子の発現 (A), 運動終了3時間後の各因子の発現 (B), 代表バンド (C).
データは各時点の1Bout目の対照脚との相対値で, 平均値±標準誤差で示している. *は同 Bout数の対照脚との有意差を示している ($P < 0.05$).

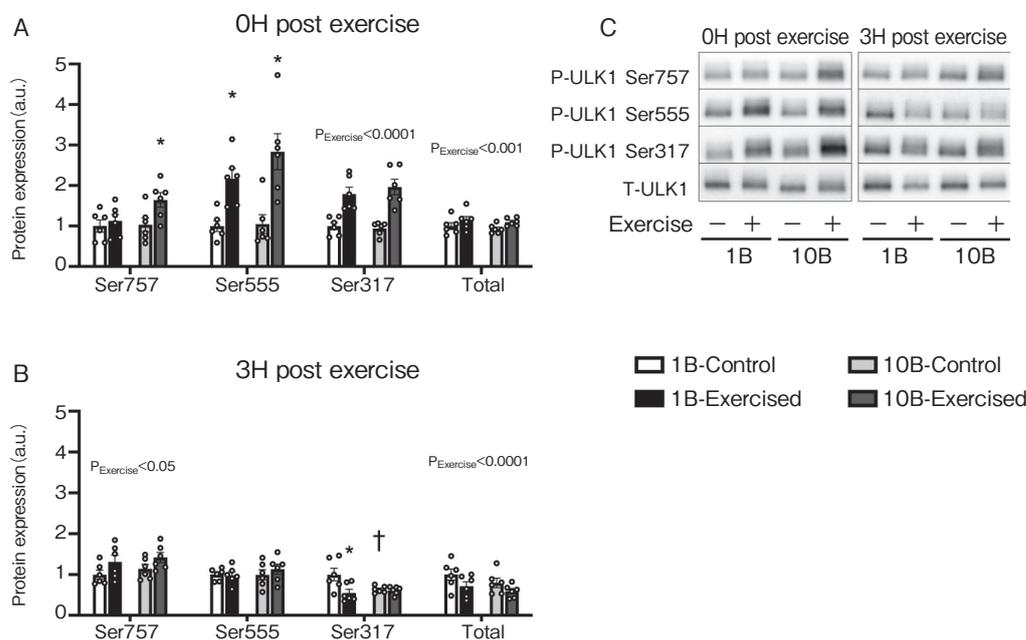


図3 ULK1の発現変化

運動終了直後のULK1のリン酸化型タンパク質および総タンパク質の発現 (A), 運動終了3時間後のULK1のリン酸化型タンパク質および総タンパク質の発現 (B), 代表バンド (C). データは各時点の1Bout目の対照脚との相対値で, 平均値±標準誤差で示している.

*は同 Bout数の対照脚との有意差, †は Bout数が異なる同条件の脚との有意差を示している (いずれも $P < 0.05$).

有意に低値を示し, さらに1Bout目の対照脚と比較して10Bout目の対照脚が有意に低値を示した (図3B). ULK1の総タンパク質発現量は, Bout数に関わらず運動により減少していた (運動による負の主効果, $P < 0.0001$, 図3B).

3. 考察

本研究は, レジスタンストレーニングの継続に伴う筋肥大応答の低減メカニズムの解明を目指して, 筋タンパク質分解系の応答変化について検討を行った. 本研究により得られた主な知見は以下の通りである: (1) レジスタンス運動の繰り返しの伴い, タンパク質のユビキチン化応答は変化しなかった, (2) レジスタンス運動の繰り返しの伴い, オートファゴソーム形成の応答は変化しなかった. 以上の結果から, レジスタンストレーニングの継続に伴う筋肥大応答の低減に対する筋タンパク質分解系の応答変化の貢献度は低いと考え

られる.

緒言で述べたmTORC1とAMPK, ユビキチン・プロテアソーム系の関連に加えて, ヒトを対象とした先行研究で, Mascherらはレジスタンス運動を繰り返し実施した場合に, 運動後のMuRF-1のmRNA発現量の増加が1回目と比較して2回目で減少することを報告している¹⁷⁾. また, 同報告内で, 運動誘発性の変化は認められないものの, Atrogin-1のmRNA発現量も1回目と比較して2回目で減少することが報告されている. このことから, 本研究においてもレジスタンス運動の繰り返しの伴い, ユビキチン・プロテアソーム系の応答変化が生じる可能性が考えられた. しかしながら, 本研究において, レジスタンス運動直後に骨格筋のユビキチン化タンパク質量は減少し, 3時間後には増加していたが, これらの変化に運動の繰り返しの伴う影響は認められなかった. ヒトを対象とした先行研究で, レジスタンス運動10分後/

90分後に、Atrogin-1・MuRF-1のmRNA発現量の増加は認められるものの、タンパク質レベルでは発現量の変化は生じないことが報告されている¹⁸⁾。本研究においても、Atrogin-1・MuRF-1はタンパク質レベルで発現変化を確認しており、いずれも有意な変化は認められていない。従って、少なくとも筋肥大を期待できる通常の強度のレジスタンス運動では、筋特異的ユビキチンリガーゼの変化はタンパク質レベルでは生じず、そのために運動の繰り返しに伴う変化も認められなかった可能性が考えられる。

ULK1は、オートファジーにおいて、隔離膜の形成を調整する因子である。特に、Ser757残基のリン酸化により隔離膜形成を抑制し¹¹⁾、Ser317残基のリン酸化により隔離膜形成を促進することが知られている¹⁵⁾。先述の通り、レジスタンス運動の繰り返しに伴い、運動誘発性のmTORC1の活性化は減弱する⁶⁾。従って、mTORC1の活性化減弱とともに、ULK1のSer757残基のリン酸化応答も抑制される可能性が考えられた。しかしながら、本研究においてSer757残基のリン酸化タンパク質発現は運動直後でむしろ運動の繰り返しに伴い増大していた。このことから、運動の繰り返しに伴うULK1を介したオートファジーの抑制の減弱は生じないことが示唆された。一方で、ULK1のSer317残基のリン酸化型タンパク質発現量は、運動3時間後での減少応答が運動の繰り返しに伴い得られなくなることが認められた。運動の繰り返しに伴い、ULK1のSer317残基の脱リン酸化応答の抑制による隔離膜形成の促進が生じる可能性が示唆された。しかしながら、1Bout目と10Bout目の運動脚を比較した場合には有意な差が認められないことから、実際の生理学的な影響の程度には議論の余地がある。今後より詳細な経時変化の検討等を行い、この点について明らかにしていきたい。

LC3-IIの発現量はオートファゴソーム量の指標

として広く用いられている¹⁹⁾。本研究ではLC3-IIの発現量にはレジスタンス運動の繰り返しに伴う変化は認められなかった。ヒトを対象とした先行研究で、単回のレジスタンス運動を行った後、LC3-IIの発現量は運動後24時間の間は減少することが報告されている。一方で、先述の通り隔離膜形成の制御因子であるULK1のリン酸化応答には、レジスタンス運動の繰り返しに伴う変化が認められた。これらの事実から、運動後少なくとも3時間後までは、レジスタンス運動の繰り返しに伴うオートファゴソーム分解の応答変化は生じないことが示唆される。一方で、p62の発現量は、運動直後・3時間後いずれも、10Bout目で増加が認められた。p62は選択的オートファジーのアダプタータンパク質であり、ミトコンドリアやポリユビキチン鎖の凝集体などをオートファジーによって選択的に分解することに用いられる。従って、レジスタンス運動の繰り返しに伴いp62の発現の増加が認められたことから、分解量そのものへの影響の有無に議論の余地は残るものの、分解対象の選択性は生じている可能性がある。

4. 結 論

以上のように、ユビキチン化タンパク質の発現量や、オートファゴソーム量に対してレジスタンス運動の繰り返しに伴う変化は認められなかった。このことから、レジスタンストレーニングの継続に伴う筋肥大応答の鈍化メカニズムに、運動の繰り返しに伴う分解系の応答変化は直接的に関与しない可能性が示唆された。一方で、p62発現量はレジスタンス運動の繰り返しに伴い増加することが明らかとなった。このことから、分解系の応答変化は筋の質的な変化に関与している可能性が示唆される。

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、本研究実施にあたり多大なご協力を頂いた立命館大学 藤田聡先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ogasawara R., Yasuda T., Ishii N., Abe T., Comparison of muscle hypertrophy following 6-month of continuous and periodic strength training, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **113**: 975-985 (2013)
- 2) Brook M.S., Wilkinson D.J., Mitchell W.K., Lund J.N., Szewczyk N.J., Greenhaff P.L., Smith K., Atherton P.J., Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling, *FASEB J.*, **29**: 4485-4496 (2015)
- 3) 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)
- 4) Ogasawara R., Fujita S., Hornberger T.A., Kitaoka Y., Makanae Y., Nakazato K., Ishii N., 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) 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 rapamycin-sensitive and -insensitive mechanisms that control translational activity and capacity in skeletal muscle, *J. Physiol.*, **594**: 453-468 (2016)
- 6) Takegaki J., Sase K., Fujita S., Repeated bouts of resistance exercise attenuate mitogen-activated protein-kinase signal responses in rat skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **520**: 73-79 (2019) .
- 7) Clarke B.A., Drujan D., Willis M.S., Murphy L.O., Corpina R.A., Burova E., Rakhilin S.V., Stitt T.N., Patterson C., Latres E., Glass D.J., The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle, *Cell Metab.*, **6**: 376-385 (2007)
- 8) Cohen S., Brault J.J., Gygi S.P., Glass D.J., Valenzuela D.M., Gartner C., Latres E., Goldberg A.L., During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation, *J. Cell Biol.*, **185**: 1083-1095 (2009)
- 9) Polge C., Heng A.E., Jarzaguet M., Ventadour S., Claustre A., Combaret L., Bechet D., Matondo M., Uttenweiler-Joseph S., Monsarrat B., Attaix D., Taillandier D., Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1, *FASEB J.*, **25**: 3790-3802 (2011)
- 10) Green D.R., Levine B., To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate, *Cell*, **157**: 65-75 (2014)
- 11) Chan E.Y., mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex, *Sci. Signal.*, **2**: 51 (2009)
- 12) 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. Endocrinol. Metab.*, **306**: E1155-E1162 (2014)
- 13) Ling N.X.Y., Kaczmarek A., Hoque A., Davie E., Ngoei K.R.W., Morrison K.R., Smiles W.J., Forte G.M., Wang T., Lie S., Dite T.A., Langendorf C.G., Scott J.W., Oakhill J.S., Petersen J., mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress, *Nat. Metab.*, **2**: 41-49 (2020)
- 14) Nakashima K., Yakabe Y., AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**: 1650-1656 (2007)
- 15) Mao K., Klionsky D.J., AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1, *Circ. Res.*, **108**: 787-788 (2011)
- 16) Ogasawara R., Sato K., Higashida K., Nakazato K., Fujita S., Ursolic acid stimulates mTORC1 signaling after resistance exercise in rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **305**: E760-E765 (2013)
- 17) Mascher H., Tannerstedt J., Brink-Elfegoun T., Ekblom B., Gustafsson T., Blomstrand E., Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **294**: E43-E51 (2008)

- 18) Takegaki J., Sase K., Yasuda J., Shindo D., Kato H., Toyoda S., Yamada T., Shinohara Y., Fujita S., The Effect of Leucine-Enriched Essential Amino Acid Supplementation on Anabolic and Catabolic Signaling in Human Skeletal Muscle after Acute Resistance Exercise: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Group Comparison Trial, *Nutrients*, 12: 2421 (2020)
- 19) Mizushima N., Yoshimori T., How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy*, 3: 542-545 (2007)