

# リジンとその関連物質の骨格筋萎縮抑制

Suppression of skeletal muscle atrophy by lysine and lysine-related compounds

2017.3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(岩手大学)

佐藤 友紀

## 目次

第1章 緒論	- 9
第2章 C2C12 細胞における L-リジンのタンパク質分解抑制機構	
第1節 目的	- 17
第2節 方法	
1. C2C12 細胞の培養	- 17
2. 筋原線維タンパク質分解量の測定	- 19
3. タンパク質量の定量	- 23
4. Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 24
5. Northern blotting を用いた mRNA の検出	- 31
6. 統計処理	- 39
第3節 結果	
1. AMPK 活性化条件における筋原線維タンパク質分解量	- 41
2. AMPK 活性化条件におけるオートファジー活性	- 42
3. AMPK 活性化条件における UPS の活性	- 43
4. AMPK 活性化条件における Ser/ Thr kinase の活性	- 44
5. Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量	- 46
6. Akt 阻害条件におけるオートファジー活性	- 47
7. Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性	- 48
第4節 考察	- 49
第3章 C2C12 細胞のタンパク質代謝に L-リジン代謝産物が及ぼす効果	
第1節 目的	- 52
第2節 方法	

1. 細胞実験①Sac が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす作用とその機構	
1 - (1) C2C12 細胞の培養	- 52
1 - (2) 筋原線維タンパク質分解量の測定	- 52
1 - (3) Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 54
1 - (4) 細胞中の Lys 及び Sac 濃度の測定	- 55
2. 細胞実験②2-AA が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす効果	
2 - (1) C2C12 細胞の培養	- 56
2 - (2) 筋原線維タンパク質分解量の測定	- 56
2 - (3) Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 57
2 - (4) LC3-II flux assay を用いた 2-AA によるオートファジー抑制効果の評価	- 59
2 - (5) Northern blotting を用いた mRNA の検出	- 61
3. 細胞実験③Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果	
3 - (1) C2C12 細胞の培養	- 63
3 - (2) Western blotting による puromycin 標識タンパク質の検出	- 63
4. 細胞実験④Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果	
4 - (1) C2C12 細胞の培養	- 65
4 - (2) Western blotting による puromycin 標識タンパク質の検出	- 65
5. 統計処理	- 66
第3節 結果	
1. 細胞実験①	
1 - (1) Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量	- 67
1 - (2) Akt 阻害条件におけるオートファジー活性	- 68
1 - (3) Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性	- 69
1 - (4) 細胞中の Lys 濃度の経時変化	- 70
1 - (5) 細胞中の Sac 濃度の経時変化	- 70

2. 細胞実験②	
2- (1) 2-AA が筋原線維タンパク質分解に及ぼす効果の濃度依存性	- 71
2- (2) 2-AA がオートファジー活性に及ぼす効果の濃度依存性	- 72
2- (3) LC3-II flux に 2-AA が及ぼす効果	- 73
2- (4) UPS 活性に 2-AA が及ぼす効果	- 74
2- (5) オートファジーと Ser/Thr kinase に 2-AA が及ぼす効果の Lys,Pip,Ala との比較	- 75
3. 細胞実験③	
3- (1) Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす影響の濃度依存性	- 77
3- (2) Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果の他物質との比較	- 78
4. 細胞実験④	
4- (1) Lys、2-AA、Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果の比較	- 79
第4節 考察	- 80
第4章 食餌タンパク質量が Lys の骨格筋タンパク質分解抑制作用に及ぼす効果	
第1節 目的	- 83
第2節 方法	
1. 動物実験	- 83
2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定法	- 85
3. Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 89
4. Northern blotting を用いた mRNA の検出	- 92
5. 血漿中インスリン濃度の測定	- 93

6. 統計処理	- 93
第3節 結果	
1. 筋原線維タンパク質分解速度	- 94
2. オートファジー活性	- 96
3. UPS の活性	- 97
4. タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性	- 98
5. 血漿中インスリン濃度	- 100
第4節 考察	- 101
第5章 老化促進モデルマウスにおける L-リジンの抗サルコペニア効果	
第1節 目的	- 104
第2節 方法	
1. 動物実験	- 104
2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定法	- 106
3. 血漿中アミノ酸濃度の測定法	- 106
4. Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 106
5. qRT-PCR を用いた mRNA の定量	- 109
6. 統計処理	- 111
第3節 結果	
1. 体重と摂食量の推移	- 112
2. 体組成の推移	- 113
3. 解剖時体重と後肢筋重量	- 114
4. 臓器及び脂肪組織重量	- 116
5. 筋原線維タンパク質分解速度	- 117
6. 血漿中アミノ酸濃度 -	- 118

7. オートファジー活性	- 119
8. UPS の活性	- 120
9. タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性	- 122
10. Mul1 の mRNA 量	- 124
11. PGC-1 $\alpha$ の mRNA 量	- 125
第4節 考察	- 127
第6章 老化促進モデルマウスにおける L-リジンの抗脂肪肝効果	
第1節 目的	- 132
第2節 方法	
1. 動物実験	- 132
2. HE 染色	- 132
3. Oil red O 染色	- 136
4. 肝臓中 TG 及び TC 濃度の測定	- 137
5. 血漿中 TG 濃度の測定	- 138
6. Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 138
7. qRT-PCR を用いた mRNA の定量	- 142
8. 統計処理	- 144
第3節 結果	
1. 染色に供した肝臓切片の組織像	- 145
2. 肝臓中 TG 及び TC 濃度	- 146
3. 血漿中 TG 濃度	- 147
4. 血漿中グルコース濃度	- 147
5. 血漿中 ALT 及び AST 活性	- 148
6. 脂肪酸合成に関与する酵素の活性及び量	- 149

7. Akt、Erk、AMPK の活性	- 151
8. IR 近傍の分子量における Tyr リン酸化率	- 152
9. mTOR signaling の活性	- 153
10. 脂肪酸合成を制御に関与する遺伝子の mRNA 発現量	- 154
11. PGC-1 $\alpha$ のタンパク質量	- 155
12. PGC-1 $\alpha$ の mRNA 発現量	- 156
13. $\beta$ 酸化の制御に関わる遺伝子の mRNA 発現量	- 157
14. オートファジーの活性指標	- 159
15. UCP-2 のタンパク質量	- 160
第4節 考察	- 161
第7章 還元型コエンザイム Q10 による抗サルコペニア効果の検討	
第1節 目的	- 166
第2節 方法	
1. 細胞実験 QH が C2C12 筋管細胞における ROS とオートファジーに及ぼす効果	
1- (1) C2C12 筋芽細胞の継代培養	- 167
1- (2) C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化誘導	- 167
1- (3) QH の水溶化	- 167
1- (4) ROS の測定	- 168
1- (5) Western blotting を用いた過酸化水素誘導性オートファジーの評価	- 170
2. 動物実験①QH の摂取が成熟マウスの骨格筋に及ぼす効果	
2- (1) 筋原線維タンパク質の分解速度測定法	- 172
2- (2) Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 172
3. 動物実験②QH の摂取が老化促進モデルのサルコペニアに及ぼす効果	
3- (1) 筋原線維タンパク質の分解速度測定法	- 174

3- (2) Western blotting を用いたタンパク質の検出	- 174
4. 統計処理	- 174
第3節 結果	
1. 細胞実験	
1- (1) C2C12 細胞中の ROS 量	- 175
1- (2) 過酸化水素で誘導したオートファジーに対する QH の効果	- 177
2. 動物実験①	
2- (1) 体重の推移	- 178
2- (2) 総摂食量	- 178
2- (3) 体組成の推移	- 179
2- (4) 解剖時体重及び骨格筋重量	- 180
2- (5) 筋原線維タンパク質分解速度	- 181
2- (6) オートファジー活性	- 181
2- (7) UPS の活性	- 182
2- (8) タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性	- 183
3. 動物実験②	
3- (1) 体重及び摂食量の推移	- 184
3- (2) 総摂食量	- 185
3- (3) 体組成の推移	- 186
3- (4) 解剖時体重及び骨格筋重量	- 187
3- (5) 解剖時の臓器及び脂肪組織重量	- 189
3- (6) 筋原線維タンパク質分解速度	- 190
3- (7) オートファジー活性	- 191
3- (8) UPS の活性	- 192
第4節 考察	- 193



第 8 章 総合考察	- 197
要約	- 202
謝辞	- 204
引用文献	- 206

## 第1章 緒論

平成28年度の高齢化白書によると[1]、我が国の総人口は平成27年10月1日の時点で1億2,711万人であり、このうち65歳以上の高齢者の人口は3,392万人である。総人口に占める65歳以上の高齢者の割合、いわゆる高齢化率は26.7%と、既に4人に1人は高齢者という深刻な高齢化状況にある。さらに、平成27年度10月1日の時点での岩手県における高齢化率は30.5%[2]、国内で高齢化が最も深刻な秋田県においては34.6%[3]と、一部の東北地方においてはおよそ3人に1人は高齢者という一層深刻な状況にある。さらに、国立社会保障・人口問題研究所の推計によると[4]、平成72年には2.5人に1人は高齢者であり、加速度的に進む人口減少と併せて、現役世代1.3人が1人の高齢者を支える時代が到来する。

この超高齢者社会において、医療・介護費を最小限に抑え、労働者人口を確保するためには、介護による補助を必要とせず、活動的に生活可能な高齢者を増やし続ける必要がある。我が国の平均寿命は男性80.50歳、女性86.83歳であり、平成72年には男性84.19歳、女性90.93歳とさらに伸びる推計である[4]。健康寿命に関しては、平成22年において男性70.42歳、女性73.62歳と平均寿命に比べて著しく短く、第2次健康日本21においては「平均寿命の増加分を上回る程度に」健康寿命を延ばすことを目標に掲げている[4]。高齢者の健康寿命を延伸するためには、介護なしで自由に活動可能な肉体を保つことが不可欠であるが、その障壁となるのが「ロコモティブシンドローム（運動器症候群）」である。ロコモティブシンドロームとは、「運動器の障害のために、移動機能の低下を来した状態」と定義され[5]、深刻化すると活動意欲の低下や寝たきりを招く。また、ロコモティブシンドロームは、骨格筋、関節、骨など、運動器全般における障害を指すが、とりわけ骨格筋における加齢現象としては、サルコペニア（加齢性筋減弱症）がある。サルコペニアは、欧州老年医学会を中心とする欧州サルコペニア・ワーキンググループ（European Working Group on Sarcopenia in Older People : EWGSOP）により、「身体的な障害や生活の質の低下、及び死などの有害な転帰のリスクを伴うものであり、進行性かつ全身性の骨格筋量及び骨格筋力の低下を特徴とする症候群」と定

義されている[5]。また、EWGSOPは、骨格筋量の低下と骨格筋機能（筋力または歩行機能などの身体能力）の低下の両方の存在をサルコペニアの診断に用いることを推奨していることから、狭義には「骨格筋量の低下と、骨格筋機能の低下の両方がそろった状態」をサルコペニアと診断する[5]。

骨格筋の量は、一般的に骨格筋におけるタンパク質の合成と分解のバランスによって調節される。そのため、骨格筋量を適切に維持するためには、骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することが有効と考えられる。骨格筋タンパク質の合成は、運動[6]や、同化作用を持つ必須アミノ酸「L-leucine (Leu)」の摂取によって促進される[7]。しかし、加齢に伴いこれらの同化刺激に対する骨格筋の応答が鈍化する[8]。したがって、骨格筋タンパク質合成の促進は高齢者の筋肉量維持において重要ではあるが、必ずしも有効であるとは限らない。一方、骨格筋タンパク質の分解は、癌[9]、低栄養[10]、不活動（筋肉の不使用）[11]といった比較的高齢者が陥りやすい状態・疾病で増加することが知られている。

オートファジーは、骨格筋における主要なタンパク質分解システムの1つであり、隔離膜の形成、標的タンパク質の囲い込み、分解の場であるオートファゴソームの形成、リソソームとオートファゴソームの融合（オートリソソームの形成）、リソソーム中のプロテアーゼによる標的タンパク質の分解といった複数のステップから構成されるタンパク質分解システムである（Fig. 1-1）[12]。オートファジーが全タンパク質分解においてどの程度の割合を占めるかは、当然その条件によって異なるが、オートファジーが強く誘導される飢餓時においては全分解の50%程度を占めると考えられている[13]。オートファゴソームの活性指標としては、light chain 3 (LC3) -IIが最も良く使われている。LC3は、酵母で発見されたAtg8と呼ばれるオートファジー関連タンパク質の哺乳類ホモログであり、Atg4BによってC末端が切断され、グリシン残基が露出したLC3-Iと、C末端グリシンにホスファチジルエタノールアミンがアミド結合したLC3-IIとが存在する。このうち、LC3-IIがオートファゴソーム膜（内膜と外膜の両方）に局在し、オートファゴソームの数と正の相関をすることからオートファジーの活性指標として頻用されている。Wenzら[14]は、加齢マウスの骨格筋においてLC3-IIが

顕著に増加しており、オートファジーの抑制によってサルコペニアが改善することから、サルコペニア発症にはオートファジーの活性化を介した骨格筋タンパク質分解の亢進が関与する可能性を示唆している。

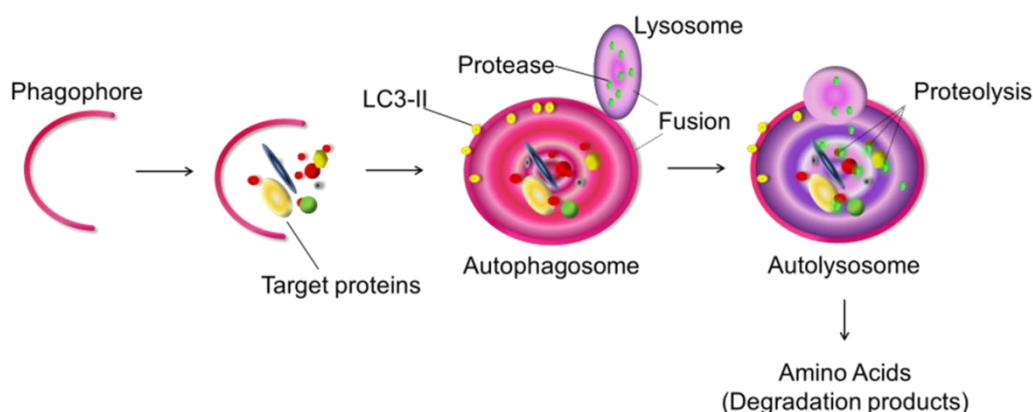


Fig. 1-1 オートファジーの概要

オートファジーは、選択性のないバルクなタンパク質分解システムと考えられてきたが、オートファジーには特定の基質を選択的に分解する機構が備わっていることが最近になって明らかになった。この基質選択性の高いオートファジーを「選択的オートファジー」といい、ミトコンドリアを選択的に排除するマイトファジー、脂肪滴の分解に働くリポファジー、ペルオキシソームを分解するペキソファジー、細菌を分解するゼノファジーなど、実に多様な選択的オートファジーが存在する。この選択的オートファジーの基質選択性に重要な役割を果たすのが p62/SQSTM1 (p62) である。p62 は、LC3 とユビキチンのそれぞれに対する結合ドメインを有し、ユビキチン化された標的を選択的にオートファゴソームに輸送するレセプター、ないしはオートファゴソーム形成部位に集めるアダプター分子としての働きをする[12]。ユビキチン化タンパク質をオートファゴソームにリクルートした p62 は標的とともに分解されることから、p62 は選択的オートファジーの指標として利用されている。Sakuma ら[15]は、加齢マウスの骨格筋線維で p62 の異常蓄積、すなわち選択的オートファジーの不全が生じる

ことを報告している。さらに Sakuma ら[15]は、選択的オートファジーの不全が生じた筋線維では萎縮の進行が顕著であることを示し、骨格筋における選択的オートファジーの不全が、サルコペニア発症に密接な関わりを持つ可能性を示唆している。

ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) は、オートファジーと並ぶ主要なタンパク質分解システムである。UPS では、ユビキチン活性化酵素 E1、ユビキチン結合酵素 E2、ユビキチンリガーゼ E3 による連続的な酵素反応によって標的タンパク質をポリユビキチン化し、26S プロテアソームがポリユビキチン鎖を認識して標的を分解する (Fig. 1-2) [16]。このうち、E3 が UPS の律速酵素であり、UPS の活性評価に用いられている。UPS は標的をポリユビキチン化して選択的に分解することから、異常化したタンパク質の選択的な排除機構と考えられている。ただし、凝集化したユビキチン化タンパク質はプロテアソームで分解することができず、選択的オートファジーによって分解されることが明らかとなっている。サルコペニア発症時における UPS については、活性化する[17]、不活化する[18]、変化しない[15]という報告が混在しており、サルコペニア発症と UPS の関与は明らかでない。

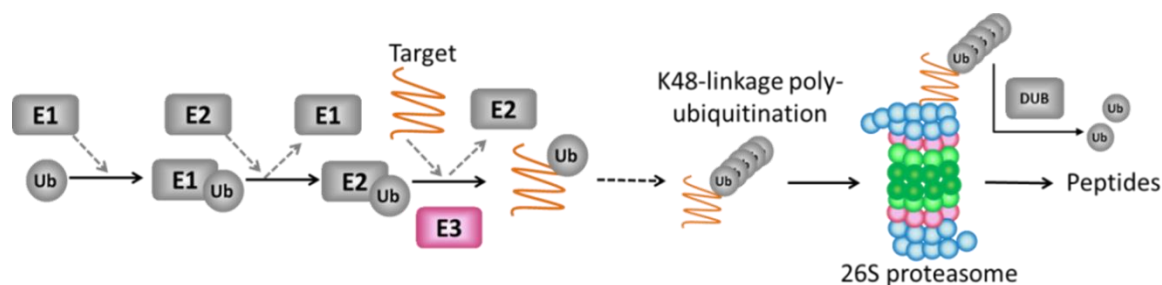


Fig. 1-2 UPS の概要

オートファジーや UPS といったタンパク質分解システムは、いくつかの Ser/Thr kinase によるリン酸化カスケードを介した活性調節及び転写制御によって制御される。例えば、unc-51-like kinase 1 (ULK1) は beclin-1 というオートファジーの誘導段階を制御するタンパク質をリン酸化することでオートファジーの誘導に働くが、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は ULK1 の Ser757 をリン酸化することでオートファジーを阻害する[19]。

一方で、mTORC1はUPSを活性化するという報告もある[20]。また、AMP-activated protein kinase (AMPK)は、TSC2やraptorのリン酸化を介したmTORC1の阻害と[21,22]、ULK1のSer317及びSer777リン酸化を介してオートファジーを誘導する[23]。また、AktはmTOR Ser2448のリン酸化、beclin-1 Ser234及びSer295のリン酸化、オートファジーやUPS関連遺伝子の転写制御に働くforkhead box O3 (FoxO3)のリン酸化などを介してオートファジーの阻害に寄与する[24,25]。したがって、骨格筋タンパク質分解を抑制する上では、これらのSer/Thr kinaseの活性を調節し、タンパク質分解システムの活性を負に制御することが重要と考えられる (Fig. 1-3)。

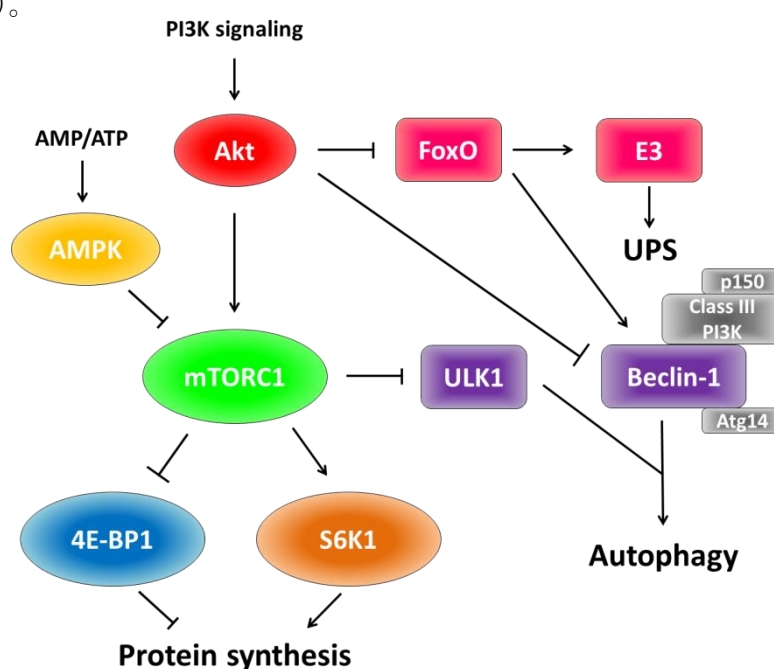


Fig. 1-3 Ser/ Thr kinase のリン酸化カスケードによるタンパク質分解制御機構の概要

骨格筋タンパク質の分解を評価する上では、タンパク質分解システムの活性や Ser/ Thr kinase の活性を評価するだけでなく、タンパク質の分解速度を測定することが極めて重要である。骨格筋タンパク質の分解速度を測る手法としては同位体標識したアミノ酸でタンパク質を標識し、標識アミノ酸の放出速度からタンパク質の分解速度を求める手法が用いられてきた。しかし、標識アミノ酸を用いた測定においては、標識アミノ酸がタンパク質合成に再利用される可能性を無視できない。3-methylhistidine (MeHis) は、筋原線維タンパク質の

主要な構成タンパク質であるアクチンとミオシンに特異的に含まれるアミノ酸であり、ミオシンとアクチンの特定のヒスチジン残基が S-アデノシルメチオニン由来のメチル基によって修飾され、生成される。MeHis は、ミオシンやアクチンの分解と共に放出され、対応する tRNA が存在しないためタンパク質合成には利用されずに、一部が肝臓でアセチル化されて、最終的には尿中に排泄される[26]。Nagasawa ら[27]は、血漿中の MeHis 濃度や、単離筋肉切片から放出された MeHis の量が筋原線維タンパク質の分解速度の指標となることを示し、Sato ら[28]はマウス横紋筋由来 C2C12 筋芽細胞を分化させた筋管細胞から培地に放出された MeHis の量が *in vivo* と同様に筋原線維タンパク質分解の指標となることを示した。

サルコペニアを予防する上では、筋肉量の維持に働く食品成分を高齢者食や介護食と組み合わせることが望ましい。上記に示したタンパク質分解システムや筋原線維タンパク質分解の抑制に働く食品成分としては、アミノ酸が挙げられる。アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基のほか、各アミノ酸に固有の側鎖を持つ有機化合物であり、生体内の構成単位でもある。必須アミノ酸である Leu は前述のように骨格筋タンパク質の合成を促進するが、Sugawara ら[29]は Leu の摂取がオートファジーによる筋原線維タンパク質分解を抑制することを見出した。さらに畠山[30]は、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸を絶食させたラットに対して個別に強制経口投与し、Leu の他に L-methionine (Met) や L-lysine (Lys) の摂取も筋原線維タンパク質の分解を抑制する可能性を示した。また、平井[31]はタンパク質非構成アミノ酸のうち、L-citrulline (Cit) に筋原線維タンパク質分解抑制作用を見出した。Sato ら[28]は、このうち Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用を検討し、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用はオートファジーの阻害を介した作用であり、Lys によるオートファジーの阻害機構には mTORC1 以外の因子が関与する可能性を示唆した[28]。

Lys は必須アミノ酸の 1 つであり、コメやトウモロコシ、小麦グルテンにおける制限アミノ酸として知られている。経口摂取された Lys は消化管より吸収され、saccharopine (Sac) 経路と pipecolic acid (Pip) 経路を経て、アセチル CoA に代謝される (Fig. 1-4) [32]。Leu の代謝産物である  $\alpha$ -ketoisocaproic acid (KIC) や  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) にも骨格筋タン

パク質の代謝を制御する機能が報告されており[33,34]、Lys のオートファジー抑制作用も Lys の代謝産物を介する効果である可能性は否定できない。実際、佐藤[35]は Lys の代謝産物である Sac にオートファジー抑制作用を見出している。しかし、Sac 以外の Lys 代謝産物が骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響は不明であり、Lys や Sac の作用機構も明らかではない。

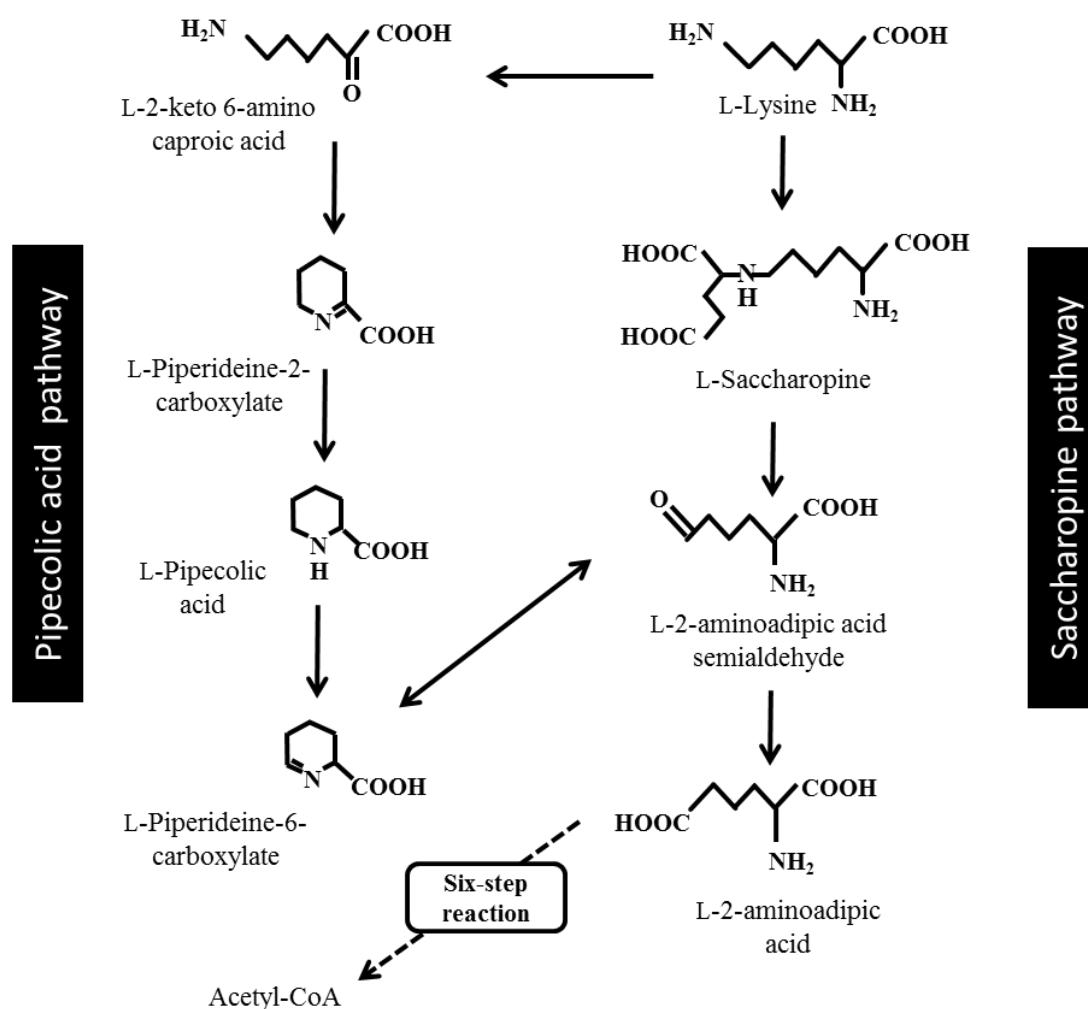


Fig. 1-4 哺乳類における Lys の代謝経路

そこで本研究では、マウス横紋筋由来 C2C12 細胞を用いて、Lys の代謝産物が骨格筋タンパク質代謝に及ぼす作用とその機構を解析し、さらにサルコペニアを発症することが報告されている老化促進モデルマウス Senescence Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) [36]を用いて Lys の抗サルコペニア効果を検討した。



第 2 章では、Lys のオートファジー抑制作用機構を解明するため、Akt の阻害剤や AMPK の活性化剤を用い、C2C12 筋管細胞において Lys によるオートファジー抑制がこれらの Ser/Thr kinase を介するかを検討した。

第 3 章では、オートファジー制御に働く Ser/Thr kinase の阻害剤を用い、Lys の代謝産物である Sac のオートファジー抑制作用機構を検討した。さらに、Lys の代謝産物のうち、L-2-aminoadipic acid (2-AA) と Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質代謝に及ぼす影響を評価した。

第 4 章では、Lys 添加食の摂取によるオートファジーの抑制効果と Ser/Thr kinase の活性化を若齢ラットで評価し、併せて Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用が十分な食餌タンパク質を摂取している条件でも認められるかを確認した。

第 5 章では、SAMP8 を用いて Lys による抗サルコペニア効果を評価し、併せてタンパク質分解システムを中心に、サルコペニアの発症機構についても検討を行った。

第 6 章では、サルコペニアと関連することが知られている非アルコール性脂肪肝を発症する SAMP8 の肝臓脂質代謝に対して、Lys の摂取が及ぼす効果とその機構を検討した。

そして第 7 章では、アミノ酸以外にサルコペニアの予防に有効な食品成分を探索し、Lys との併用による抗サルコペニア効果を評価した。

## 第2章 C2C12 筋管細胞における L-リジンのタンパク質分解抑制機構 [37]

## 第1節 目的

佐藤[35]は Lys を絶食ラットに強制経口投与し、Lys の強制経口投与が筋原線維タンパク質の分解を抑制することを見出し、その作用がオートファジーの抑制を介することを示唆した。さらに、Lys によるオートファジー抑制機構を明らかにするため、C2C12 筋管細胞を Lys で処理した結果、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の活性化が認められた[35]。mTOR はオートファジーの抑制に働くため[38]、Lys は mTOR 経路の活性化を介してオートファジーの抑制に働く可能性が示唆された。しかし、mTOR の阻害剤である rapamycin で C2C12 筋管細胞を処理した際、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用は打ち消されなかった。このことから、Lys は mTOR 以外のオートファジー制御因子を介してその抑制に働くと推察された。オートファジーの制御因子としては AMPK[23]と Akt[24]が知られている。そこで、本章では AMPK 活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribo nucleoside (AICAR) と、Akt 阻害剤である Akt 1/2 kinase inhibitor (Akti) を用い、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用と AMPK 及び Akt との関連性を評価することを目的として実験を行った。

## 第2節 方法

## 1. C2C12 細胞の培養

1977年に Yaffe と Saxell が樹立したマウス骨格筋由来 C2 細胞をもとに、Blau らが樹立した C2 細胞株の亜種である C2C12 細胞を用いた [39]。骨格筋の細胞株としては、L6 細胞や C2C12 細胞が一般的に使用されているが、C2C12 細胞はシグナル伝達経路の解析や筋収縮に関する研究で広く利用されている[10,39]。本実験で使用した C2C12 細胞は、東洋大学生命科学部応用生物科学科の根建拓教授からご供与いただいた。

## (1) C2C12 筋芽細胞の継代培養

C2C12 筋芽細胞の継代培養は下記の試薬を用い、10cm dish (FastGene, 日本ジェネティクス: 東京) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で維持されたインキュベーター内で行った。試薬として下記を用いた。

• Penicillin and streptomycin solution 1000 倍濃縮液 (P/S 1000 倍濃縮液)

…Penicillin G 1.40 g と Streptomycin 2.79 g を純水 20 mL に溶解し、メンブレンフィルター (0.45 μm、アドバンテック株式会社: 東京) でろ過滅菌し、-20°C で保存した。

• PBS (-)

…塩化ナトリウム 8.0 g、塩化カリウム 0.2 g、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物、リン酸二水素カリウム 0.2 g を純水に溶解し、1000 mL にした。その後、121°C で 20 分間オートクレーブした。

• Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) +10% (v/v) 牛胎児血清 (FBS)

…DMEM 粉末 (グルコース 1000 mg/L 含有、Sigma : USA) 5.0 g、炭酸水素ナトリウム 1.85 g を純水に溶解し、450 mL にした。その後、クリーンベンチ内で抗生物質として P/S 1000 倍濃縮液を 500 μL 加え、メンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) でろ過滅菌後、滅菌済みの非動化 FBS (BioWest : French) 50 mL を加え、4°C で保存した。

• 0.25% trypsin+0.02% EDTA

…Trypsin (Invitrogen : USA) 0.625 g、EDTA 0.05 g を 250mL の PBS (-) に溶解し、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌し、4°C で保存した。

(明記していないものは、特級試薬、和光純薬工業株式会社)

C2C12 筋芽細胞を DMEM+10% FBS で培養し、サブコンフルエントまで増殖させた後、PBS (-) で細胞表面を洗浄した。PBS (-) をアスピレーターで除去後、0.25% Trypsin+0.02% EDTA を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 分間インキュベートして細胞を剥離した。剥離確認

後、DMEM+10% FBS を加え、ピペッティングで細胞を懸濁し、細胞懸濁液とした。この細胞懸濁液 1mL を新しい 10cm dish に分注し、9mL の DMEM+10% FBS を加えた。細胞が dish 内に均一になるよう軽く振とうし、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

## (2) C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化誘導

C2C12 筋芽細胞は低血清培養により筋管細胞へと分化する[39]。試薬は下記を用いた。

・ DMEM+2% (v/v) ウマ血清 (HS)

…DMEM 粉末 (グルコース 1000 mg/L 含有、Sigma) 5.0 g、炭酸水素ナトリウム 1.85 g を純水に溶解し、490 mL にした。その後、クリーンベンチ内で P/S 1000 倍濃縮液を 500  $\mu$ L 加え、メンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) でろ過滅菌後、滅菌済みの非動化 HS (Invitrogen) 10 mL を加え、4°C で保存した。

継代培養と同様に C2C12 細胞をサブコンフルエントまで増殖させ、細胞懸濁液を調製した。Dish 中の細胞数が  $5 \times 10^5$  cells となるように細胞懸濁液を 6cm dish に分注し、dish 内の総培地量が 3mL となるように DMEM+10%FBS を加えて CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。サブコンフルエントまで増殖させた後、培地を DMEM+2% HS に交換し、6 または 7 日間培養することで筋管細胞への分化を誘導した。分化誘導期間中、培地交換は約 24 時間ごとに行い、顕微鏡観察下で十分な筋管形成を確認した細胞を筋管細胞として実験に用いた。

## 2. 筋原線維タンパク質分解量の測定

筋原線維タンパク質分解量は筋管細胞から培地中への放出された 3-methylhistidine (MeHis) を HPLC で測定する方法により評価した[28]。試薬は下記を用いた。

- DMEM based balanced salt solution (DBSS) 10 倍濃縮液

…硝酸鉄 (III) 九水和物, 99.9% (一般試薬、和光純薬株式会社) 1 mg、塩化カリウム 4 g、塩化ナトリウム 64 g、りん酸二水素ナトリウム二水和物 1.42 g、グルコース 10 g を約 700 mL の純水に溶解し、これを Solution I とした。次に、塩化カルシウム二水和物 2.65 g を約 100 mL の純水に溶解し、これを Solution II とした。硫酸マグネシウム七水和物 2 g を約 100 mL の純水に溶解し、これを Solution III とした。Solution I、II、III を混合し、純水で 1000 mL にフィルアップした後、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌し、4°C で保存した。

- 1 M 2- [4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES)

…HEPES (同仁化学研究所株式会社 : 熊本) 11.91 g を約 40 mL の純水で溶解し、pH を 7.4 に調整後、純水で 50 mL にし、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌後、4°C で保存した。

- 100×MEM Vitamin mix (Sigma)

- グロブリン不含ウシ血清アルブミン (BSA)

- Starvation medium

…DBSS 10 倍濃縮液 100 mL、1 M HEPES 20 mL、100×MEM Vitamin mix (Sigma) 10 mL、BSA 1 g を混合、溶解し、純水で 1000 mL にした。その後、クリーンベンチ内において P/S 1000 倍濃縮液 1 mL を加え、メンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) でろ過滅菌し、4°C で保存した。

- Lys solution 10 倍濃縮液

…L-Lys-HCl (味の素株式会社 : 東京) 1.825 g を約 90 mL の純水で溶解し、100 mL にした。その後、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌後、4°C で保存した。

- 10 mM lys contained starvation medium

…DBSS 10 倍濃縮液 100 mL、1 M HEPES 20 mL、100×MEM Vitamin mix (Sigma) 10 mL、

グロブリン不含 BSA 1 g、Lys solution 10 倍濃縮液 100 mL を混合、溶解し、純水で 1000 mL にした。その後、クリーンベンチ内において P/S 1000 倍濃縮液 1 mL を加え、メンブレンフィルター（アドバンテック株式会社）を用いてろ過滅菌し、4°C で保存した。

- RIPA lysis buffer solution

…ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton) 5 mL、デオキシコール酸 (DOC) 5 g、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.5 g、トリスヒドロキシアミノメタン (Tris, Sigma) 3.0285 g、塩化ナトリウム 4.383 g、オルトバナジン (V) 酸ナトリウム 0.046 g、EDTA・2Na 0.930 g を純水で溶解し、pH を 7.4 に調整した後、純水で 500 mL にした。

- AICAR250 倍濃縮液

…44 mg の AICAR (Cell signaling technology) を純水に溶かし、250 mM とした。

- Akti 906 倍濃縮液

…5 mg の Akti (Sigma) を 1 mL の DMSO で溶解し、9.06 mM とした。

- 20% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA)

…TCA 20 g に純水を加えて溶解し、全量を 100 mL にした。

- ジエチルエーテル

- 濃塩酸

- 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH12.0)

…ホウ酸 1.235 g に純水約 40 mL を加え、さらに 1 M 水酸化ナトリウムを加えながらホウ酸を完全に溶解させ、pH を 12.0 に調整した後、純水を加えて全量を 100 mL にした。

- OPA 試薬

…*o*-フタルアルデヒド (OPA、生化学用、和光純薬株式会社) 25 mg を試験管にとり、メタノール 0.5 mL を加えて溶解させ、これに 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH12.0) 1.5 mL と 2-メルカプトエタノール 25  $\mu$ L を加えて攪拌し、アルミホイルで遮光保存した。

- 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)

…酢酸ナトリウム三水和物 6.804 g を約 900 mL の純水に溶解し、酢酸を用いて pH を 5.0

に調整した後、純水を加えて全量を 1000 mL とし、褐色ビン中に保存した。

- ・ 80%(v/v)アセトニトリル溶液

アセトニトリル (Sigma) 800mL と純水 200mL を混合した。

(明記していないものは、特級試薬、和光純薬工業株式会社)

筋管細胞への分化誘導後、dish を PBS (－) で 2 回洗浄した後、Starvation medium、また、10 mM lysine contained starvation medium を 1 mL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 4 時間培養した。Medium を加えると同時に、AICAR で処理する場合には終濃度 1mM になるように AICAR250 倍濃縮液を添加し、Akti で処理する場合には終濃度 10 μM になるように Akti 906 倍濃縮液を添加した。4 時間後、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター内から取り出し、培地をすべて回収し、-80°C で保存した。また、培地を除去したプレート 1 枚当たり 250 μL の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。その後、かき取った細胞を含む RIPA lysis buffer solution を 1.5 mL 容遠心チューブ内にすべて回収し、4°C、18,000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 100 μL を回収し、-80°C で保存した。上清はプレート中のタンパク質量の定量に用いた。

回収した培地 300 μL と氷冷した 20% (w/v) TCA 300 μL を混合し、4°C で 1 晩静置した。翌日、4°C、18,000×g で 20 分間遠心分離し、上清 400 μL と純水 100 μL をフタ付き試験管に入れた。ジエチルエーテル約 3 mL をドラフト内で加え、フタを閉めた後に攪拌機 (RECIPRO SHAKER SR-1N、タイテック株式会社：埼玉) で 3 分間振とうし、1,250×g で 1 分間遠心分離し、ジエチルエーテル層と水層に分離させ、上層のジエチルエーテル層をパスツールピペットで除去した。このジエチルエーテルを用いた TCA 抽出を計 3 回行い、最終的に残存した微量のジエチルエーテルを湯煎にかけて気化させ、五酸化二リン (和光一級、和光純薬株式会社) が入ったデシケーター内で減圧乾燥させた。乾燥物に純水を 60 μL 加え、そのうち 50 μL を 0.6 mL 容エッペンチューブに分注した。この溶液 50 μL に OPA 試薬 25 μL を加えて混合し、HPLC に 5 μL 注入した。標準液は 3-メチル-L-ヒスチジン (SIGMA) を 2.64 nmol/mL に溶解

したものを用いた。ポンプは、PU-2089（日本分光株式会社：東京）、カラムは LiChrospher 100RP-18e4×250 nm（5 μm）Merck：Germany）を使用した。カラム温度は、40℃、検出は FP-920（日本分光株式会社：東京）を使用した。検出波長は励起波長 340 nm、蛍光波長は 455 nm とした。移動相の流速は 1.5 mL/min で、移動相はアセトニトリル溶液と 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）を 11.2：88.8 の比率で混合したものを用いて 15 分送液した。

### 3. タンパク質量の定量

サンプル中のタンパク質の定量は、Lowry 法変法 [41] に基づいて行った。

試薬として以下のものを用いた。

- ・ A 液

…炭酸ナトリウム 10 g、水酸化ナトリウム 2.0 g、酒石酸ナトリウム二水和物 0.93 g、SDS 5.0 g を純水で溶解し、全量を 500 mL にした。

- ・ B 液

…硫酸銅五水和物 8 g を純水で溶解し、全量を 200 mL とした。

- ・ C 液

…A 液と B 液を 100：1 の割合で混合し、調製した。

- ・ D 液

…2 M フェノール試薬を純水で 2 倍希釈した。

（明記していない試薬は、特級試薬、和光純薬工業株式会社）

上清を純水で 50 倍希釈し、この希釈液 1 mL に C 液 3 mL を加えてよく攪拌し、15 分間静置した。その後、D 液を加えて直ちに攪拌し、30 分間静置した後、750 nm における吸光度を分光光度計 UV-mini1240（株式会社島津製作所：京都）で測定した。盲検には純水を、標準液には牛血清アルブミン（BSA、FractionV 96%、Sigma）を 100 μg/mL に希釈して用い



た。

#### 4. Western blotting を用いたタンパク質の検出

オートファジーの活性指標である LC3-II やオートファジーの制御に働く Ser/ Thr kinase の total 及びリン酸化フォームを western blotting で検出した。

##### (1) SDS-PAGE 用試料の調製

下記の試薬を用いた。

- DMEM+0.1% (w/v) BSA

…DMEM 粉末 (グルコース 1000 mg/L 含有、Sigma) 5.0 g、炭酸水素ナトリウム 1.85 g、グロブリン不含 BSA 0.5 g を純水に溶解し、500 mL にした。その後、クリーンベンチ内で抗生物質として P/S 1000 倍濃縮液を 500  $\mu$ L 加え、メンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) でろ過滅菌し、4°C で保存した。

- RIPA lysis buffer solution

- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 溶液 1000 倍濃縮液

…PMSF 69.7 mg をエタノール 2 mL に溶解し、-20°C で保存した。使用時には 1 倍の濃度になるように RIPA lysis buffer solution に添加した。

- Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液

…Leupeptin 5 mg と Pepstatin A 5 mg をエタノール 5 mL に溶解し、-20°C で保存した。使用時には 1 倍の濃度になるように RIPA lysis buffer solution に添加した。

- Laemmli buffer 4 倍濃縮液

…Tris 1.525 g、SDS 4.0 g を 20 mL 程度の純水に溶解し、pH を 6.8 に調整した。それにグリセロール 20 mL を加え、純水で 49 mL にフィルアップした。その後、2-メルカプトエタノール 2 mL を加え、少量のブロモフェノールブルーを加えて攪拌した。

- Lys solution 10 倍濃縮液
- AICAR250 倍濃縮液
- Akti906 倍濃縮液

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1%BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1%BSA に交換し、AICAR (終濃度 1 mM) または Akti (終濃度 10  $\mu$ M) を培地に添加した。AICAR または Akti 添加 30 分後、Lys solution 10 倍濃縮液を終濃度 10mM になるように培地に添加した。Lys solution 10 倍濃縮液添加 30 分後にアスピレーターで培地を除去し、dish 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。その後、かき取った細胞を含む RIPA lysis buffer solution を 1.5 mL 容遠心チューブ内にすべて回収し、4 $^{\circ}$ C、18,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 150  $\mu$ L を別の 1.5 mL 容遠心チューブにとり、Laemmli buffer 4 倍濃縮液 50  $\mu$ L を加え、よく攪拌した後、ブロックヒーター (HDB-1N、アズワン株式会社:大阪) 中で 95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱し、放冷後、-80 $^{\circ}$ C で保存し、これを電気泳動用試料とした。また、遠心分離後の上清中のタンパク質量をタンパク質量の測定を第 2 章-第 2 節-3 の方法で測定し、サンプル中のタンパク質濃度を算出した。

## (2) SDS-PAGE

試薬として以下のものを用いた。

- 分離ゲル用緩衝液 (A 液)

…SDS (生化学用、和光純薬株式会社) 2.0 g、Tris (分子生物学用、和光純薬株式会社) 90.9 g を純水に溶解し、1 M 塩酸で pH を 8.8 に調整後、全量を 500 mL とし、4 $^{\circ}$ C で保存した。

- 濃縮ゲル用緩衝液 (B 液)

…SDS 2.0 g、Tris 30.3 g を純水に溶解し、1 M 塩酸で pH を 6.8 に調整後、全量を 500 mL とし、4°C で保存した。

- 30% (w/v) アクリルアミド混合液 (C 液)

…アクリルアミド (電気泳動用、和光純薬株式会社) 145 g と *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (電気泳動用、和光純薬株式会社) 5 g に純水約 400 mL 加えて溶解し、純水で全量を 500 mL とした後、4°C で保存した。

- 濃縮ゲル溶液

…B 液 50 mL と C 液 25 mL を純水約 100 mL 加えて攪拌し、純水で全量を 200 mL にした。

- *N,N,N,N*-テトラメチレンジアミン (TEMED)

- 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS、電気泳動用、和光純薬株式会社)

…APS 0.1 g を 1 mL の純水に溶解した。

- 2-プロパノール

- 電気泳動用緩衝液 10 倍濃縮液

…Tris (分子生物学用、和光純薬株式会社) 30.3 g、グリシン 144.1 g、SDS 10 g に純水を加えて溶解し、全量を 1000 mL にした。

- 電気泳動用緩衝液

…電気泳動用緩衝液 10 倍濃縮液を純水で 10 倍に希釈した。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

Akt、AMPK、S6K1、 $\beta$ -actin の検出には 10% ポリアクリルアミドの分離ゲルを、LC3 及び 4E-BP1 の検出には 15% ポリアクリルアミドの分離ゲルを用いた。10% ポリアクリルアミドゲルは、A 液 3 mL、C 液 4 mL、純水 5 mL、10% APS 45  $\mu$ L、TEMED 15  $\mu$ L を混合して作成した。15% ポリアクリルアミドゲルは、A 液 6 mL、C 液 12 mL、純水 6 mL、10% APS 90  $\mu$ L、TEMED 30  $\mu$ L を混合した。ゲル板 (160 mm  $\times$  100 mm、1t) の間に気泡が入らない

ようにゲルを注ぎ、コーム下 1 cm の位置まで注ぎ入れた。その後、ただちに 400  $\mu$ L の 2-プロパノールを重層し、室温で静置して重合させた。分離ゲルを重合させた後、重層していた 2-プロパノールを取り除き、濃縮ゲル溶液 9 mL に 10% APS 54  $\mu$ L と TEMED 36  $\mu$ L を加えた溶液を分離ゲルの上に静かに注いだ後にコームを差し込み、室温で 30 分静置し、ゲルが重合した後にコームを外し、4E-BP1 以外の検出時には電気泳動装置 BE-260 型（バイオクラフト株式会社：東京）に、4E-BP1 の検出時には電気泳動装置 BE-120 型（バイオクラフト株式会社）にゲル板をセットした。各ウェルでタンパク質量が一定となるようにサンプルをそれぞれアプライした。サンプルのアプライ後、リアルパワーBP-5 型（バイオクラフト株式会社）を用いてゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で電気泳動を行った。

### (3) タンク式 western blotting

4E-BP1 の検出は転写効率の高いタンク式 western blotting を用いた。下記の試薬を用いた。

- ・転写用緩衝液 10 倍濃縮液

…*N*-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸（CAPS）（同仁化学研究所株式会社）22.13 g を純水に溶解し、2 M 水酸化ナトリウム溶液で pH を 11.0 に調整した後、純水で 1000 mL にし、4°C で保存した。

- ・転写用緩衝液

…転写用緩衝液 10 倍濃縮液 300 mL、メタノール 300 mL、純水 2400 mL を混合した。

- ・TBS10 倍濃縮液

…Tris（分子生物学用、和光純薬株式会社）12.11 g、塩化ナトリウム 29.23 g、EDTA・2Na 3.72 g を純水で溶解し、濃塩酸を用いて pH を 7.2 に調整した後、純水で 1000 mL にした。

（明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社）

電気泳動終了後、速やかに分離ゲルを取り出し、転写用緩衝液で 15 分以上振とうした

PVDF 膜 (Immobilon-P、EMD Millipore corporation : USA) および転写用ろ紙 (アトー株式会社 : 東京) と共に転写緩衝液を入れたタンク式プロットティング装置 (BE-350W 型、バイオクラフト株式会社) にセット後、リアルパワーBP-5 型 (バイオクラフト株式会社) を用いて 50V の定電圧で 45 分間転写を行った。

#### (4) セミドライ式 western blotting

4E-BP1 以外のタンパク質の検出にはセミドライ式 western blotting を用いた。下記の試薬を用いた。

##### ・セミドライ式転写用緩衝液

…Tris (分子生物学用、和光純薬株式会社) 1.5 g、グリシン 7.2 g、SDS 0.1 g を約 400 mL の純水に溶解し、純水で 500 mL にした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

電気泳動後、速やかにゲル板から外したゲルを、転写用ろ紙 (アトー株式会社) 及びセミドライ式転写用緩衝液で 10 分以上振とうした PVDF 膜と共に、セミドライ式転写装置 (AE-6678、アトー株式会社) にセットし、PVDF 膜の面積  $1\text{cm}^2$  あたり 1.5 mA の定電流で 1 時間転写した。ただし、LC3 を検出する場合には転写時間を 45 分間とした。

#### (5) 目的タンパク質の検出

下記の試薬を用いた。

##### ・TBS10 倍濃縮液

…Tris 12.11 g、塩化ナトリウム 29.23 g、EDTA・2Na 3.72 g を純水で溶解し、濃塩酸を用いて pH を 7.2 に調整した後、純水で 1000 mL にした。

##### ・TBS-T

…ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Tween20、化学用、和光純薬株式会社) 1 g に、TBS10 倍濃縮液 100 mL を純水で 1000 mL にした溶液を加え、よく攪拌した。

・ブロッキング溶液

…スキムミルク (生化学用、和光純薬株式会社) 1 g に TBS-T 20 mL を加え、溶解した。

・一次抗体希釈液

…TBS10 倍濃縮液 10 mL に純水で 10 倍希釈した Tween20 1mL と、純水で 10% (w/v) に調製したアジ化ナトリウム溶液 100  $\mu$ L をそれぞれ加えた。さらに約 70 mL の純水を加えた上で、5 g の BSA を加えて溶解した。溶解後、純水で 100 mL にフィルアップし、4°C で保存した。

・抗 4E-BP1 抗体溶液

…抗 4E-BP1 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz : USA) 25  $\mu$ L に一次抗体希釈液を 20 mL 加え、溶解した。

・抗 phospho-p70 S6K1 抗体溶液

…抗 Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) 抗体 (Cell Signaling Technology : USA) を 1 次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 S6K1 抗体溶液

…抗 S6K1 抗体 (Stressgen) を TBS-T で 250 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 LC3 抗体溶液

…抗 LC3B 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 phospho (Ser473) -Akt 抗体溶液

…抗 phospho-Akt 抗体 (Santa Cruz) を一次抗体希釈液で 500 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 phospho (Thr308) -Akt 抗体 (Cell signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 Akt 抗体溶液

…抗 Akt 抗体 (Santa Cruz) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 phospho-AMPK 抗体溶液

…抗 phospho (Thr172) -AMPK 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 AMPK 抗体溶液

…抗 AMPK 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗  $\beta$ -actin 抗体溶液

…抗  $\beta$ -actin 抗体 (Novus Biologicals : USA) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

・抗 rabbit 二次抗体溶液 (4E-BP1、LC3、S6K1、Akt、phospho-Akt の検出に用いた)

…ペルオキシオダーゼ (HRP) 標識抗 Rabbit IgG (Stressgen : Canada) 2 $\mu$ L を TBS-T 20 mL に加え、溶解した。

・抗 mouse 二次抗体溶液 (phospho-S6K1、AMPK、phospho-AMPK、 $\beta$ -actin の検出に用いた)

…HRP 標識抗 mouse IgG (Stressgen) 2  $\mu$ L を TBS-T 20 mL に加え、溶解した。

・検出試薬 A 液

…Tris 1.214 g、*p*-クマル酸 (ナカライテスク株式会社 : 京都) 6.5 mg、ルミノール 88.6 mg を純水に溶解し、濃塩酸で pH8.5 に調整した後、純水で全量を 100 mL にした。

・検出試薬 B 液

…Tris 1.214 g を純水に溶解し、30% (v/v) 過酸化水素 40  $\mu$ L を加えた後、濃塩酸で pH8.5 に調整後、純水で全量を 100 mL にした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

転写後、PVDF 膜を TBS-T ですすぎ、ブロッキング溶液に浸して室温で 1 時間振とうした。次いで、PVDF 膜を TBS-T で洗浄した後に各一次抗体溶液に浸し、4°C で 1 晩反応させた。反応後、PVDF 膜を TBS-T ですすいだ後、二次抗体溶液で PVDF 膜を室温で 1 時間振とうし、反応させた。反応終了後、TBS-T で 2 回すすいだ後、新しい TBS-T で 3 回膜を洗浄した。洗浄後、膜全体に均一になるように検出試薬 A 液と検出試薬 B 液を 1 mL を混合した溶液に両面ともそれぞれ一分間反応させた。反応後、膜を取り出し、ポリエチレン製の透明な袋の中にパッキングした。検出には ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用い、Image J (アメリカ国立衛生研究所: USA) を用いてバンドを定量した。

## 5. Northern blotting を用いた mRNA の検出

### (1) C2C12 筋管細胞からの total RNA の抽出

APGC 法[42]により、C2C12 筋管細胞より total RNA を抽出した。RNA 分解酵素 (RNase) による分解を避けるため、本実験で使用する試薬の調製と total RNA の抽出においては、121°C で 20 分間オートクレーブした器具を使用した。試薬は下記を用いた。

- DMEM+0.1% BSA
- AICAR250 倍濃縮液
- Lys solution 10 倍濃縮液
- Denaturing solution (Sol D)

…4M グアニジンチオシアン酸塩、0.5% *N*-ラウロイルサルコシンとなるようにそれぞれを純水に溶解し、1M クエン酸ナトリウム (pH7.0) 水溶液を 2.5 mL 加え、その後純水で 100mL にフィルアップした。この溶液 50 mL に対して 350  $\mu$ L の 2-メルカプトエタノールを加え、使用した。

- 2M 酢酸ナトリウム (pH7.4)

…27.2g の酢酸ナトリウム 3 水和物に 20 mL の純水を加えた。その後、約 80 mL の酢酸を



加えて酢酸ナトリウムを溶解させ、pH4.0 となるまで酢酸を加えた。pH 調整後、純水で 100 mL にフィルアップし、121°C で 20 分間オートクレーブした。

- 水飽和フェノール

…500 g のフェノール結晶に 0.5 g の 8-キリノールを加え、オートクレーブ済みの純水をフェノール結晶が浸る程度に加えた。これを 50°C に加温してフェノールを溶解し、攪拌後に静置した。水層とフェノール層に分離後、上層を取り除き、さらに純水を加え、同様の操作を 2 度繰り返し、フェノールの水置換を行った。調製後、褐色ビン中に 4°C で保存した。

- クロロホルム：イソアミルアルコール混合液

…クロロホルムとイソアミルアルコールが 49:1 (v/v) となるように混合した。

- 2-プロパノール

- 75% (v/v) エタノール

…エタノールをオートクレーブ済みの純水で希釈し、75%にした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1% BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1% BSA に交換し、終濃度が 1 mM になるように AICAR を培地に添加した。AICAR 添加 30 分後、Lys solution 10 倍濃縮液を終濃度 10 mM になるように培地に添加した。Lys solution 10 倍濃縮液添加 30 分後または 4 時間後にアスピレーターで培地を除去し、各プレートに 800  $\mu$ L の Sol D を加えて dish 全体に行き渡らせ、ピペッティングして細胞を溶解した。この細胞溶解液 800 $\mu$ L を 2 mL 容遠心チューブに移し、2 M 酢酸ナトリウム (pH4.0) 80  $\mu$ L、水飽和フェノール 800  $\mu$ L、クロロホルム：イソアミルアルコール混合液 (49 : 1) 160  $\mu$ L を加え、よく攪拌した後、4°C で 15 分間静置した。4°C、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、RNA が溶解している上層約 800  $\mu$ L を新しい 2 mL 容遠心チューブに回収した。上層と等量の 2-プロパノールを加え、混合後した後、-20°C で 1 晩静置した。次に、4°C、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、沈殿を得た。Sol D 300  $\mu$ L を加えて沈殿を溶解し、1.5 mL 容遠心チューブ

に移した。2-プロパノール 300  $\mu\text{L}$  を加えて混合後、4°C、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して上清を取り除き、沈殿を得た。次に、75%エタノール 300  $\mu\text{L}$  を加え、混合後、4°C、8,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿から減圧乾燥によりエタノールを揮発させた後、沈殿に純水 50  $\mu\text{L}$  を加えて溶解し、この溶液を total RNA 溶液とし、-20°Cで保存した。

## (2) RNA の定量

Total RNA 溶液中の RNA 濃度を分光光度計 (UV2600、島津製作所) で測定した。抽出した total RNA 溶液を純水で 50 倍希釈し、260 nm と 280 nm の 2 波長を測定し、total RNA 濃度と溶液の純度を調べた。

## (3) Northern blotting

Northern blotting とは、組織中で発現している特定の mRNA を、その cDNA を用いて検出する方法である。本研究では、電気泳動とメンブレンへの RNA の転写を行った後、DIG 標識した cDNA を用いてハイブリダイゼーションを行い、DIG 発光検出キットにより cDNA を検出して筋特異的 ubiquitin-ligase E3 である atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 量を評価した。

### a. 電気泳動用サンプルの調製

試薬として以下のものを用いた。

- ・ MOPS 溶液 10 倍濃縮液

…3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS、同仁化学研究所株式会社) 20.93 g、酢酸ナトリウム 3.40 g、EDTA $\cdot$ 2Na (同仁化学研究所株式会社) 1.86 g を純水に溶解し、1 M NaOH 溶液で pH7.0 に調整した後、純水で全量を 500 mL にした。その後、121°C、20 分間オートクレーブし、遮光して室温で保存した。

- ・ 電気泳動用マスターミックス

…1 サンプルにつき、Table 2-2 のように試薬を必要量混合した。

Table 2-2 電気泳動用マスターミックスの組成

試薬	容量 (μL)
ホルムアミド(和光一般)	3.5
ホルムアルデヒド	10
MOPS 溶液 10 倍濃縮液	2
純水	4.5

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

1.5 mL 容遠心チューブに RNA を 10 μg 含む total RNA 溶液を入れ、真空遠心乾燥機 (TAITEC CENTRIFUGAL CONCENTRATOR VC-36S、ローター: 36-A、TAITEC FREEZE TRAP VA-800F、タイテック株式会社) を用いて 2,000 rpm で 30 分間乾燥させた。その後、電気泳動用マスターミックス 20 μL に乾燥させた RNA を溶解した。55°C の恒温槽で、15 分間インキュベートして RNA を変性させた後、直ちに氷中で 2 分間冷却した。泳動前に泳動用色素 2 μL を添加し、泳動用サンプルとした。

#### b. 1.2% アガロースゲルの作製と電気泳動

試薬として以下のものを用いた。

- Agarose S (株式会社ニッポンジーン: 東京)
- エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液 10 倍濃縮液

…10 mg/mL EtBr 液を滅菌した純水で 10 倍に希釈し、1 mg/mL とした。

- MOPS 溶液

…MOPS 溶液 10 倍濃縮液を純水で 10 倍希釈した。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

Agarose S 0.48 g、MOPS 溶液 10 倍濃縮液 4 mL、純水 34 mL を混合した後、電子レンジで数分間加熱してアガロースを完全に溶解した。60°C程度まで冷却し、EtBr 溶液 10 倍濃縮液 2  $\mu$ L、ホルムアルデヒド 2.2 mL を添加し、ゲルメーカーに流し込んでコームをセットして室温で固めた。泳動は緩衝液（MOPS 溶液）を用い、100 V で電気泳動を行った。

c. トランスファー

試薬として以下のものを用いた。

・ SSC 20 倍濃縮液 (pH7.0)

…塩化ナトリウム 175.32 g、クエン酸ナトリウム 88.24 g を約 900 mL の純水に溶解し、1 M 塩酸で pH7.0 に調整後、純水で全量を 1000 mL にした。

・ SSC 10 倍濃縮液 (pH7.0)

…SSC 20 倍濃縮液 (pH7.0) を純水で 2 倍希釈した。

・ 1 M リン酸ナトリウム (pH7.0)

…1 M リン酸二ナトリウム溶液 57.7 mL と 1 M リン酸一ナトリウム溶液 42.3 mL を混合し、作製した。

・ 50 mM NaOH-10 mM NaCl

…10 M NaOH 500  $\mu$ L と 5 M NaCl 200  $\mu$ L に純水を加えて全量を 100 mL にした。

・ 100 mM Tris-HCl (pH7.0)

…1 M Tris (pH7.0) 10 mL に純水を加え、全量を 100 mL にした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

電気泳動終了後、ゲルの必要部分を純水の入った容器に入れて 5 分間振とうし、さらに 50 mM NaOH-10 mM NaCl で 15 分間振とうした。その後、SSC 10 倍濃縮液で 30 分間振とうした。

この間にメンブレン (BioTrace, Biodyne, and UltraBind Transfer Membranes, Pall Corporation : USA) 1枚とろ紙 (FILTER PAPER、アドバンテック東洋株式会社) 2枚をゲルと同じ大きさに切り、さらにろ紙2枚を転写用の容器と同じ大きさに切った。メンブレンを純水で5分間振とうした後に、SSC 10倍濃縮液で10分間振とうした。容器にガラス板を敷き、その上にSSC 10倍濃縮液に浸したろ紙2枚を重ねて置き、裏返したゲル、メンブレン、SSC 10倍濃縮液に浸したろ紙2枚を順に重ね、四方をラップで囲った。その上にペーパータオルとガラス板を載せ、重しを載せて10時間以上静置し、転写を行った。転写終了後、メンブレンをSSC 2倍濃縮液に浸し、UVライトを照射してRNAの転写を確認した。メンブレンを風乾させ、UV Crosslinker 254 nm M005-170-0 (UVP : California) を用いてUVを照射し (表面  $0.15 \text{ J/cm}^2 \times 2$  回、裏面  $0.15 \text{ J/cm}^2 \times 1$  回)、メンブレンにRNAを固定した。

#### d. ハイブリダイゼーション

下記の試薬を用いた。

- 10% SDS 溶液 (pH7.2)

…SDS (生化学用) 20 g を滅菌処理した純水に溶解し、1 M HCl 溶液で pH7.2 に調整後、オートクレーブ済みの純水を加え、全量を 200 mL とした。

- DIG 標識された MuRF1, atrogin-1, GAPDH プローブ

- High SDS Hybridization Buffer

…下記の試薬、溶液をメディウムビンにとり、121°C、20分間オートクレーブし、ホルムアミド (和光1級) 50 mL を加え、混合した。組成は Table2-3 に示した。

Table 2-3 High SDS Hybridization Buffer の組成

試薬	容量
SDS (生化学用、和光純薬株式会社)	7 g
SSC20 倍濃縮液	25 mL
ブロッキング試薬(Roche Diagnostic Corporation:USA)	2 g
1 M リン酸ナトリウム(pH7.0)	5 mL
<i>N</i> -lauroyl sarcosine (ISN Biomedicals)	0.1 g
純水	20 mL

- ・ SSC 2 倍濃縮液 + 0.1% SDS

…SSC 20 倍濃縮液 40 mL と 10% SDS 溶液 4 mL を混合し、純水を加えて全量を 400 mL にした。

- ・ SSC0.1 倍濃縮液 + 0.1% SDS

…SSC 20 倍濃縮液 2 mL と 10% SDS 溶液 4 mL を混合し、純水を加えて全量を 400 mL にした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

RNA を固定したメンブレンを SSC2 倍濃縮液で再び湿らせ、50°C に加温しておいた High SDS Hybridization Buffer に浸し、50°C で 2 時間インキュベーションした。その後、68°C で加温しておいたプローブ液にメンブレンを浸し、50°C で 1 晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、プローブを回収し、メンブレンを SSC2 倍濃縮液で 10 分間×2 回振とうし、68°C に加温しておいた SSC0.1 倍濃縮液 + 0.1% SDS で 15 分間、68°C で 2 回インキュベートした。

#### e. 検出

下記の試薬を用いた。

- ・ Genius buffer 1

…100 nM マレイン酸、150 mM 塩化ナトリウムとなるようにそれぞれを純水で溶解し、1 M NaOH で pH を 7.5 に調整した。

- Genius buffer 2

…Genius buffer 1 100 mL に 1% ブロッキング試薬 (Roche Diagnostic Corporation) 1 g を加え、121°C で 20 分間オートクレーブした。

- 10% Tween20

…10 g の Tween20 を純水に溶解し、100 mL とした。

- Genius buffer 1+0.3% Tween20

…Genius buffer 1 40 mL に、10% Tween 1.2 mL を加え、混合した。

- アルカリフォスファターゼ標識 DIG 抗体 Fab フラグメント (Roche Diagnostic Corporation)

- Genius buffer 3 (CDP-star assay buffer)

…0.1 M Tris-HCl、0.1 M 塩化ナトリウム、0.05 M 塩化マグネシウムとなるように純水に溶解し、1 M NaOH で pH を 9.5 に調整した。

- CDP-Star (New England Biolabs, USA)

- Stripping Buffer

…50% ホルムアミド (和光 1 級)、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、1% SDS になるように混合した。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

ハイブリダイゼーション及び洗浄が終了した後、Genius buffer 1 でメンブレンを 1 分間平衡化し、10 mL の Genius buffer 2 で 30 分間振とうし、Genius buffer 2 にその 1/10,000 量のアルカリフォスファターゼ標識ジゴキシゲニン抗体を加えてさらに 30 分間振とうした。抗体を含む溶液を捨て、Genius buffer 1+0.3% Tween20 で 15 分間×2 回振とうした。Genius buffer 1+0.3% Tween20 を捨て、Genius buffer 3 で 5 分間振とうした後、CDP-Star を Genius buffer 3 で 200 倍に希釈した溶液にメンブレンを 5 分間浸した。その後、メンブレンをポリエチレン製の透明な袋の中にパッキングし、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて検出を行い、Image

J (アメリカ国立衛生研究所) を用いてバンドを定量した。

検出が終了したメンブレンは、純水で十分にすすいだ後、ストリッピングによってプローブをはがし、別のプローブで同様の操作を行うか、SSC2 倍濃縮液中でパッキングし、4°Cで保存した。

#### (4) ストリッピング

下記の試薬を用いた。

- 10% SDS

…SDS (生化学用) 10 g を純水に溶解し、全量を 100 mL にした。

- 1 M Tris-HCl (pH8.0)

…Tris 60.55 g を約 400 mL の純水に溶解し、濃 HCl で pH を 8.0 に調整した後、純水を加えて全量を 500 mL にした。

- Stripping solution

…ホルムアミド (和光 1 級) 50 mL、1 M Tris-HCl (pH8.0) 5 mL、10% SDS 10 mL、純水 35 mL を混合し、全量を 100 mL とした。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

68°Cに加熱しておいた Stripping solution にメンブレンを浸し、68°Cで 30 分間インキュベートした。この操作を計 2 回繰り返す、メンブレンを純水で 10 分間振とう後、さらに SSC2 倍濃縮液で 10 分間振とうした。

#### 6. 統計処理

本実験で測定して得られた結果は平均値と標準誤差で示した。統計処理は GraphPad InStat Software Ver.3.0a (USA) を使用し、異なる群間の有意差を一元配置の分散分析 (ANOVA) で



求め、群間に有意差が認められた場合には Turkey の多重検定を行い、有意差を検討した。また、2群間の検定においては unpaired *t*-test を行い、増減の傾向を評価した。

## 第3節 結果

まず AICAR を用い、AMPK を活性化させた実験の結果を以下に示す。C2C12 筋管細胞に対し、DMSO で前処理し、アミノ酸処理をしない群を C、AICAR で前処理し、アミノ酸処理をしない群を Ac、DMSO で前処理し、10 mM Leu で処理した群を L、AICAR で前処理し、10 mM Leu で処理した群を AcL、DMSO で前処理し、10 mM Lys で処理した群を K、AICAR で前処理し、10 mM Lys で処理した群を AcK として示した。

## 1. AMPK 活性化条件における筋原線維タンパク質分解量

C2C12 筋管細胞から培地中へ放出された MeHis より評価した筋原線維タンパク質分解量を Fig. 2-1 に示した。筋原線維タンパク質分解量は C と比較して K で顕著な低値を示した。K と比較し、AcK は有意な高値を示したが、Ac と比較して AcK は 40%程度低かった。したがって、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用には、AMPK は一部関与するものの、AMPK 以外の因子が寄与すると考えられた。

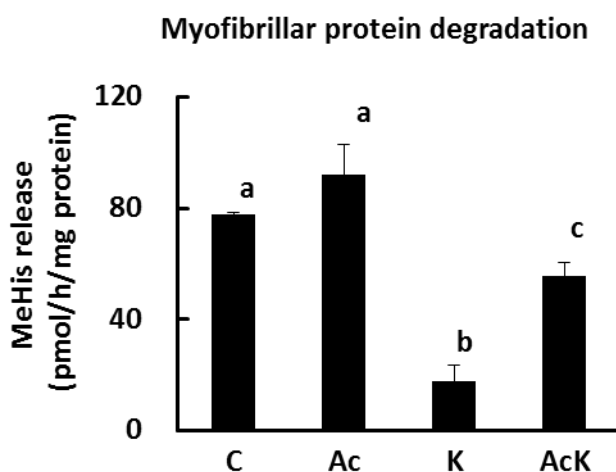


Fig. 2-1 AMPK 活性化条件における筋原線維タンパク質分解量

値は平均±標準誤差 (n=4)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ac : AICAR 処理、K : 10 mM Lys 処理、AcK : AICAR と Lys の共処理

## 2. AMPK 活性化条件におけるオートファジー活性

LC3-II より評価したオートファジー活性を Fig. 2-2 に示した。オートファジー活性は C と Ac の間に差はなく、L および K は C と比較して 30% 程度の低値を示した。L と AcL の間に差はなく、K と AcK の間にも差はなかった。この結果から、Lys によるオートファジー抑制作用に、AMPK は関与しないと考えられた。

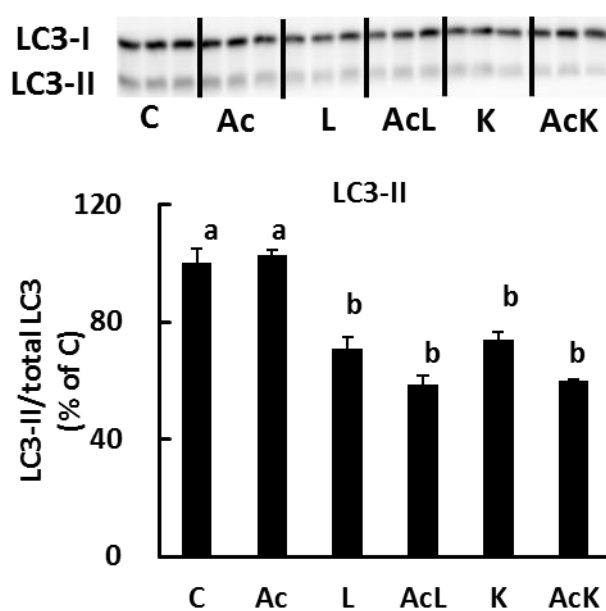


Fig. 2-2 AMPK 活性化条件におけるオートファジー活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ac : AICAR 処理、L : 10 mM Leu 処理、AcL : AICAR と Leu の共処理、K : 10 mM Lys 処理、AcK : AICAR と Lys の共処理

## 3. AMPK 活性化条件におけるユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) の活性

MuRF1 及び atrogin-1 の mRNA 量から評価した UPS の活性を Fig. 2-3 に示した。なお、A には MuRF1 の、B には atrogin-1 の mRNA 量をそれぞれ示した。

MuRF1 の mRNA 発現量は、C、Ac、K の 3 群間で差はなかったが、AcK は Lys 処理 30 分後と 4 時間のいずれにおいても MuRF1 の mRNA 発現量が他の 3 群と比較して顕著に多かった (Fig. 2-3A)。Atrogin-1 の mRNA 発現量は、C、Ac、K の 3 群間で差はなかったが、AcK は Lys 処理 30 分後と 4 時間のいずれにおいても atrogin-1 の mRNA 発現量が他の 3 群と比較して顕著に多かった (Fig. 2-3B)。これらの結果から、Lys と AICAR の共処理によって UPS の活性化が生じ、筋原線維タンパク質分解の亢進に寄与したと推察された。

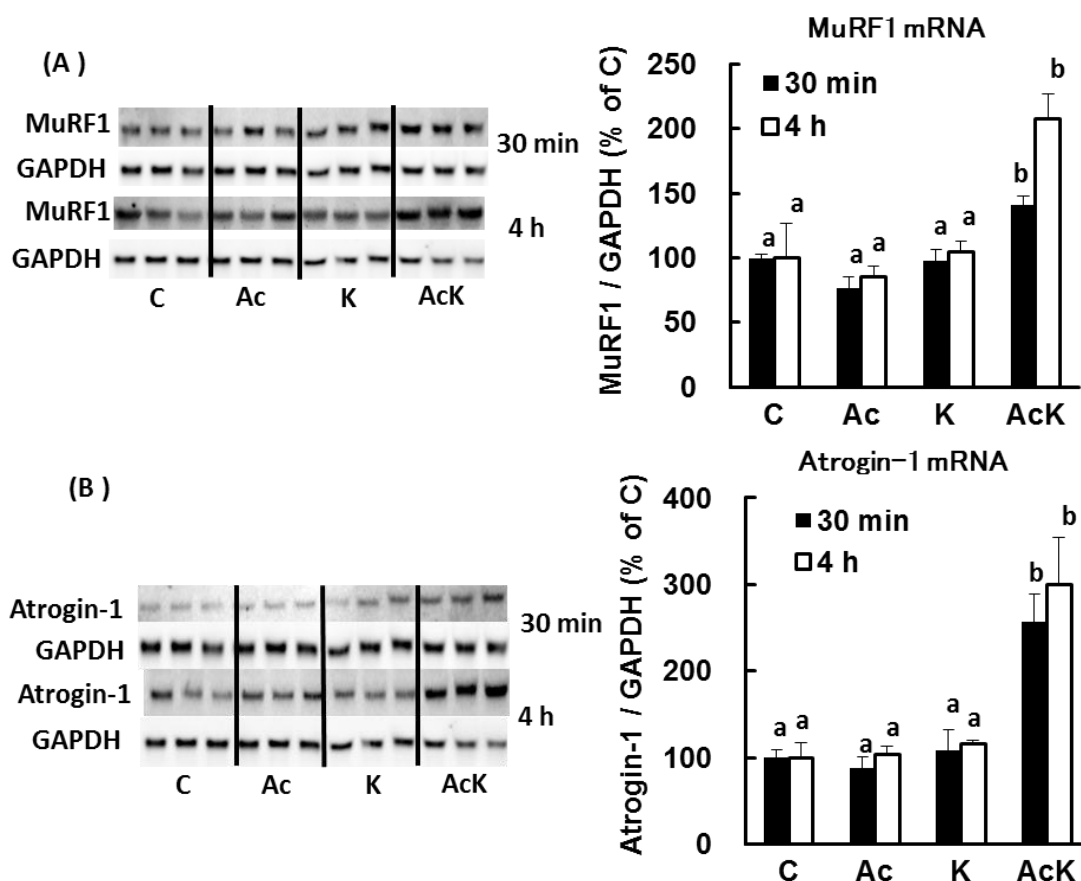


Fig. 2-3 AMPK 活性化条件における UPS の活性

A : MuRF1 mRNA、B : Atrogin-1 mRNA 黒 : 30 分処理後、白 : 4 時間処理後

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ac : AICAR 処理、K : 10 mM Lys 処理、AcK : AICAR と Lys の共処理

#### 4. AMPK 活性化条件における Ser/ Thr kinase の活性

タンパク質代謝の制御に働く Ser/ Thr kinase の活性を、それぞれのリン酸化率から評価し、Fig. 2-4 に示した。なお、A には代表的なバンドを、B には AMPK の活性を、C には 4E-BP1 の活性を、D には Akt の活性をそれぞれ示した。

AMPK の活性は C と比較して AICAR を添加した Ac、AcL、AcK のいずれにおいても顕著な高値を示した。AMPK の活性は C と比較して L または K で 40% 程度の低値を示したが、L と比較して AcL は顕著な高値を示し、K と比較して AcK は顕著な高値をそれぞれ示した (Fig. 2-4B)。4E-BP1 の活性は C と比較して Ac で有意な低値を示した。L 及び K における 4E-BP1 の活性はいずれも C と比較して高値を示したが、AcL は L と比較して 10% 程度の低値を示し、AcK は K と比較して 10% 程度の低値をそれぞれ示した。4E-BP1 の活性は L と比較して K で有意な低値を示した (Fig. 2-4C)。Akt 活性は C と Ac の間に差はなかった。Akt の活性は C と比較して L、AcL、K、AcK でそれぞれ顕著な高値を示し、L と AcL、K と AcK の間に差はなかった (Fig. 2-4D)。以上の結果から、AICAR は C2C12 筋管細胞における AMPK 活性化を誘導するが、AMPK の活性化による影響を Akt 活性は受けないと考えられた。

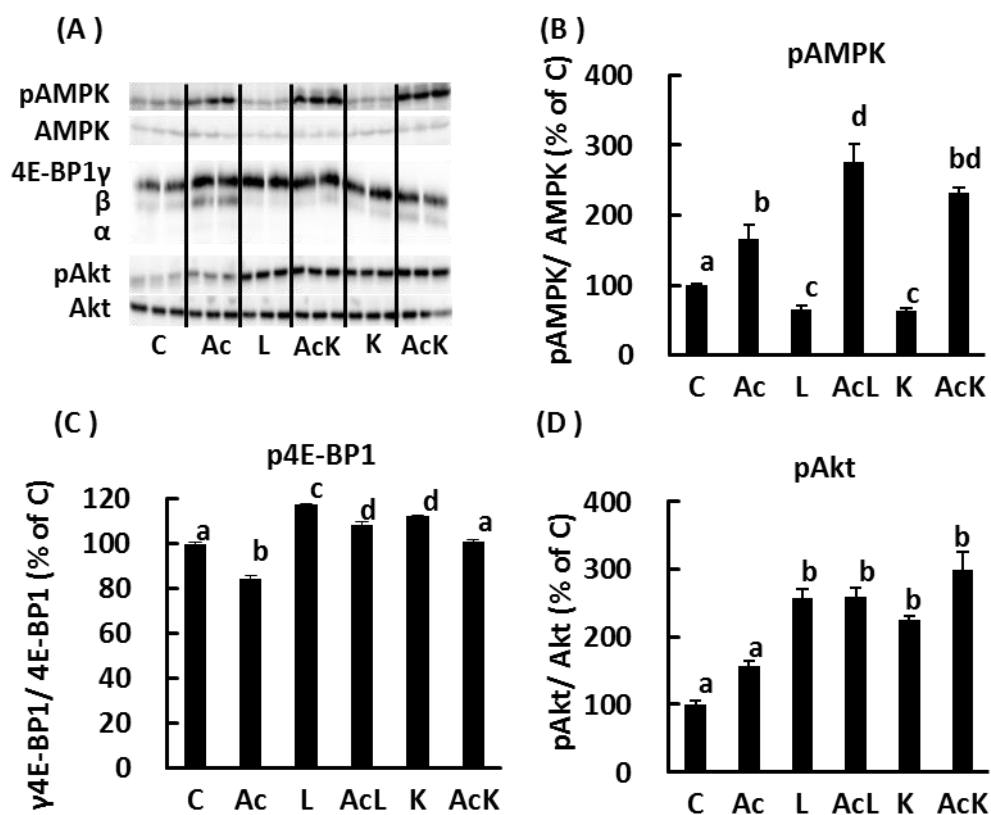


Fig. 2-4 AMPK 活性化条件における Ser/Thr kinase の活性

A : 代表的なバンド、B : AMPK の活性、C : 4E-BP1 の活性、D : Akt の活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ac : AICAR 処理、L : 10 mM Leu 処理、AcL : AICAR と Leu の共処理、K : 10 mM Lys 処理、AcK : AICAR と Lys の共処理

次に Akti を用い、Akt を阻害した実験の結果を以下に示す。C2C12 筋管細胞に対し、DMSO で前処理し、アミノ酸処理をしない群を C、Akti で前処理し、アミノ酸処理をしない群を Ai、DMSO で前処理し、10 mM Leu で処理した群を AiL、Akti で前処理し、10 mM Leu で処理した群を AiL、DMSO で前処理し、10 mM Lys で処理した群を K、Akti で前処理し、10 mM Lys で処理した群を AiK として示した。

### 5. Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量

Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量を Fig. 2-5 に示した。筋原線維タンパク質分解量は C と Ai の間に差はなく、C と比較して K で 50% 程度の低値を示した。AiK は K と比較して筋原線維タンパク質分解量は顕著に高く、Ai と AiK の間に差はなかった。この結果から、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用は、Akt を介する可能性が示唆された。

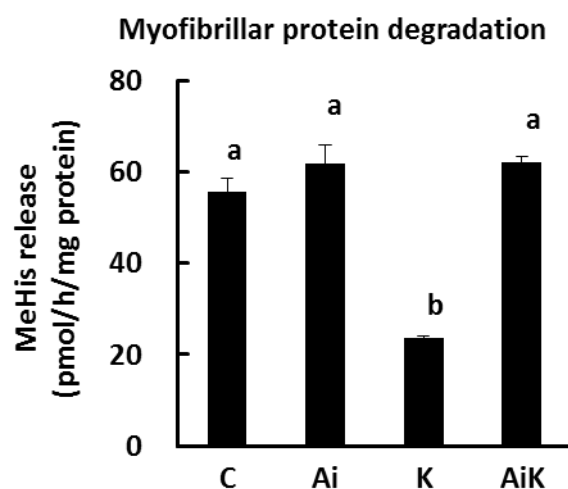


Fig. 2-5 Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量

値は平均±標準誤差 (n=4)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ai : Akti 処理、K : 10 mM Lys 処理、AiK : Akti と Lys の共処理

## 6. Akt 阻害条件におけるオートファジー活性

Akt 阻害条件におけるオートファジーの活性を Fig. 2-6 に示した。オートファジーの活性は C と比較して Ai で有意に高値を示した。C と比較して L 及び K は 20% 程度の低値を示したが、AiL は L と比較して顕著に高く、AiK は K と比較して顕著に高かった。また、Ai と比較して AiL 及び AiK はそれぞれ有意に高値を示した。この結果から、Lys によるオートファジー抑制作用は、Akt を介する可能性が示唆された。

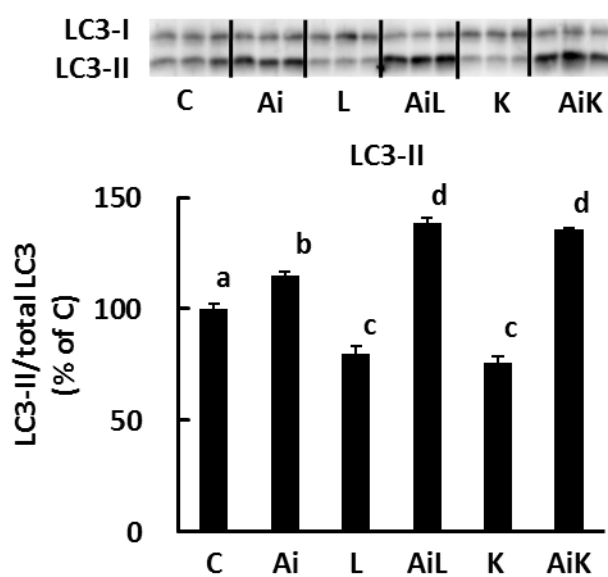


Fig. 2-6 Akt 阻害条件におけるオートファジー活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ai : Akti 処理、L : 10 mM Leu 処理、AiL : Akt と Leu の共処理、K : 10 mM Lys 処理、AiK : Akti と Lys の共処理



## 7. Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性

Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性を Fig. 2-7 に示した。なお、A には代表的なバンドを、B には Akt 活性を、C には 4E-BP1 活性を、D には AMPK 活性をそれぞれ示した。

Akt の活性は C と比較して L 及び K で顕著に高値を示した。Ai、AiL、AiK においては pAkt のバンドは認められず、Akt の活性は Akti によって阻害されたことが示唆された (Fig. 2-7B)。4E-BP1 の活性は C と比較して L 及び K で 50% 程度の高値を示した。4E-BP1 の活性は C と比較して Ai で有意な低値を、L と比較して AiL で 50% 程度の低値を、K と比較して AiK で 60% 程度の低値をそれぞれ示した。したがって、Akt の阻害は下流の mTOR に影響したと考えられる (Fig. 2-7C)。AMPK の活性は C と比較して L 及び K で有意に低値を示した。4E-BP1 の活性は C と Ai で差はなく、L と比較して AiL で有意な低値を、K と比較して AiK で有意な低値を示した (Fig. 2-7D)。

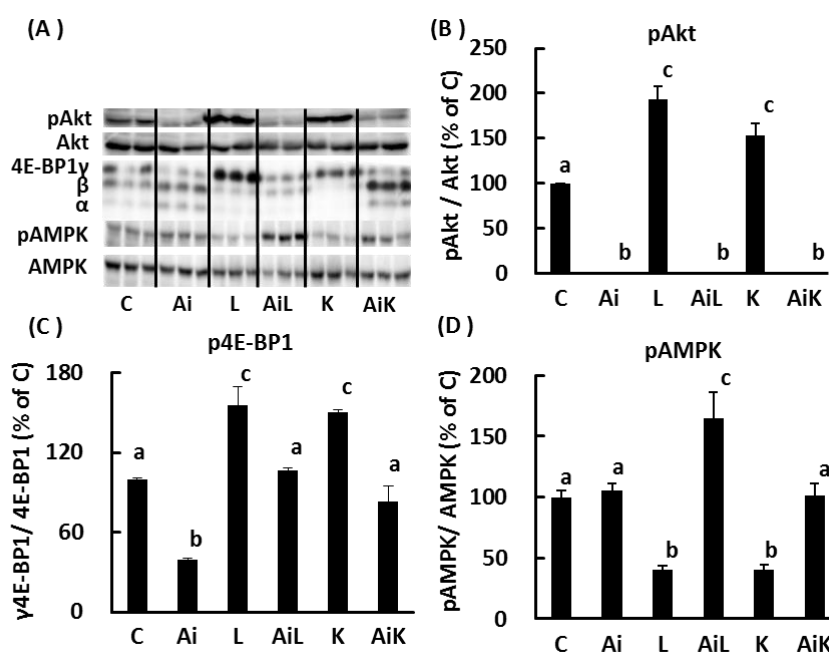


Fig. 2-7 Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性

A : 代表的なバンド、B : Akt 活性、C : 4E-BP1 活性、D : AMPK 活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

C : 処理なし、Ai : Akti 処理、L : 10 mM Leu 処理、AiL : Akt と Leu の共処理、K : 10 mM Lys 処理、AiK : Akti と Lys の共処理

## 第3節 考察

これまでに Lys の摂取が筋原線維タンパク質分解を抑制し、その作用はオートファジーの阻害を介する可能性を示唆してきた[28]。オートファジーの制御に働く Ser/Thr kinase としては mTOR、AMPK、Akt が知られている[20-24]。このうち、mTOR については mTOR 阻害剤である rapamycin を用いた実験より、Lys によるオートファジー抑制作用に一部関与するものの、mTOR 以外の制御因子が Lys のオートファジー抑制作用においてより重要である可能性を示した[28]。そこで、Lys によるオートファジー抑制作用における AMPK と Akt の関与をそれぞれ評価した。

まず、AMPK の活性化剤である AICAR を用い、Lys による AMPK 抑制効果を打ち消した条件下で Lys が C2C12 筋管細胞のオートファジーに及ぼす影響を評価した。その結果、Lys によるオートファジー阻害効果は AMPK が活性化した条件でも認められた (Fig. 2-2)。また、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制効果は、AICAR によって一部打ち消されたが (Fig. 2-1)、AICAR 単独処理と比較すると Lys による筋原線維タンパク質分解抑制効果は残存しており、AICAR によって Lys の筋原線維タンパク質分解抑制作用の一部が打ち消されたのは、UPS の活性化による作用であると考えられた (Fig. 2-3)。Lys と AICAR を併用することで UPS が活性化する機構は不明であるが、少なくとも Lys によるオートファジー抑制作用に AMPK は無関係であると考えられた。また、Lys による UPS 抑制効果は動物の骨格筋と C2C12 筋管細胞のいずれにおいても認められないことから、Lys の筋原線維タンパク質分解抑制効果に関しても AMPK の関与はないと推察される。一方、Leu は AMPK の抑制を介して骨格筋タンパク質代謝を制御することが報告されているが[43]、Leu によるオートファジー抑制作用も AMPK 活性化による影響を受けなかった (Fig. 2-2)。したがって、少なくとも本実験の結果から言えば、Leu のオートファジー抑制作用に関しても AMPK は無関係であると考えられる。

AMPK は mTOR の上流に位置し、mTOR の活性を阻害する[21,22]。本実験においても、AICAR により mTOR 下流の 4E-BP1 のリン酸化は減少し、mTOR の不活化が示唆された。同様に、Leu や Lys によって上昇した 4E-BP1 のリン酸化も AICAR によって有意に減少した。

mTOR 経路はタンパク質の翻訳段階を制御し、タンパク質合成を調節することから、Leu や Lys が骨格筋タンパク質合成に及ぼす効果に関していえば、AMPK が関与する可能性も考えられる。また、本実験では、AICAR で AMPK を活性化した場合、Akt の活性に有意な変化は認められなかったため、少なくとも C2C12 筋管細胞において Akt は AMPK の上流に位置するか、あるいは Akt とは独立した経路に位置すると考えられる。

Akt はオートファジーの抑制に働く制御因子であり、Akt は Lys によって活性化されることを C2C12 筋管細胞において確認している[28]。そこで、Akt の阻害剤である Akti を用い、Lys による Akt 活性化効果を打ち消した条件下で Lys が C2C12 筋管細胞のオートファジーに及ぼす影響を評価した。その結果、Lys によるオートファジー抑制作用は Akt 阻害条件で完全に打ち消された (Fig. 2-6)。同様に、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用も Akt 阻害条件において完全に打ち消された (Fig. 2-5)。これらの結果より、Lys によるオートファジー阻害効果と筋原線維タンパク質分解抑制作用は、主に Akt の活性化を介した作用であると考えられた。Zhao らは[24]、mTOR と Akt のどちらが筋管細胞における主要なオートファジー制御因子であるかを検討し、mTOR よりも Akt の方がオートファジーの制御において中心的な役割を果たすことを示している。また、mTOR によるオートファジー抑制は主に ULK1 のリン酸化を介した機構によるが[23]、Akt によるオートファジー抑制機構は mTOR 活性化を介した ULK1 のリン酸化[44]、beclin-1 のリン酸化[25]、転写因子 FoxO のリン酸化を介したオートファジー関連遺伝子の転写調節[24]など多岐に渡る。こうした報告も、Lys によるオートファジー抑制作用において Akt が中心的な役割を果たす可能性を支持する。Leu もオートファジーの抑制に働くことが知られており、本実験においても Leu によるオートファジー抑制作用が確認された (Figs. 2-2, 2-6)。この Leu によるオートファジー抑制作用も Lys と同様に Akt の阻害によって完全に打ち消された (Fig. 2-6)。Leu が骨格筋の Akt を活性化するという報告は複数存在し[45-47]、Leu は mTOR 以外の制御因子を介して骨格筋タンパク質分解を制御する可能性も指摘されている[10]。そのため、Leu も Lys と同様に Akt の活性化を介してオートファジーの抑制に働く可能性が考えられる。

Akt は mTOR の上流に位置することが知られているが、本実験において Akt 阻害時には mTOR 下流の 4E-BP1 の活性が低下し、Lys による 4E-BP1 のリン酸化上昇効果も一部抑えられた (Fig. 2-7-C)。したがって、Lys による Akt の活性化は下流の mTOR の活性化を促すことでタンパク質合成を促進し、mTOR を介したオートファジーの抑制にも寄与すると考えられる。また、AMPK の活性は Akt 単独処理による影響は受けなかったが、Lys や Leu による AMPK の活性阻害効果は Akt 阻害時に打ち消された (Fig. 2-7-D)。そのため、AMPK と Akt は直接的に上流・下流の位置関係にあるわけではないが、Akt 活性化による C2C12 筋管細胞内の代謝変化が AMPK の活性阻害を招いた可能性がある。以上のことから、Lys による Akt 活性化は、オートファジーの制御において中心的な役割を果たすだけでなく、mTOR の活性化や AMPK の抑制といった作用においても重要な機能を持つと考えられる。

Lys が C2C12 筋管細胞において Akt の活性化に寄与する機構としては、「アミノ酸受容体」の存在が挙げられる。例えば、L-arginine (Arg) は CASTOR という Arg 感知タンパク質を介して、Leu は Sestrin1/2 という Leu 感知タンパク質を介して、それぞれ mTOR を活性化する[48]。Arg と Leu に関しては、こうした「アミノ酸センシング」の機構が明らかになりつつあるが、その他のアミノ酸については不明である。そのため、Lys を感知し、Akt をはじめとする Ser/Thr kinase を活性化する機構が存在する可能性がある。こうした個別のアミノ酸に対応した受容体が発見できれば、個々のアミノ酸の生理機能をより正確に解明し、アミノ酸機能の最大化を実現できる可能性は高いと考えられる。

## 第3章 C2C12細胞のタンパク質代謝にL-リジン代謝産物が及ぼす効果 [52,53]

## 第1節 目的

Lys を経口摂取した場合、Lys は主に肝臓で代謝され、種々の代謝産物を生じる[49-51]。Leu は骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することが知られているが、その代謝産物である  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) にも同様の効果が報告されている[34]。Lys の経口摂取時には血漿中や骨格筋中においても L-saccharopine (Sac) や L-2-aminoadipic acid (2-AA)、L-pipecolic acid (Pip) といった Lys の代謝産物が増加する [54,55]。第2章において、Lys が Akt を介して C2C12 筋管細胞のオートファジー抑制に働くことを示唆したが、Lys の代謝産物が骨格筋細胞に及ぼす効果は明らかでない。そこで本研究では、Lys の代謝産物である Sac、2-AA、Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解や合成に及ぼす影響を評価することを目的として実験を行った。

## 第2節 方法

## 1. 細胞実験① Sac が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす作用とその機構

## 1 - (1) C2C12 細胞の培養

C2C12 細胞の継代培養及び筋管細胞への分化誘導は第2章 - 第2節 - 1 と同様に行った。

## 1 - (2) 筋原線維タンパク質分解量の測定

下記の試薬を用いた。

- ・ DBSS 10 倍濃縮液
- ・ 1M HEPES
- ・ Starvation medium
- ・ Lys solution 10 倍濃縮液

- 10 mM Lys contained starvation medium
- Sac suspending solution 90 倍濃縮液
- …Sac (Sigma) を終濃度 900 mM となるように純水 1 mL に懸濁した。
- 10 mM Sac contained starvation medium
- …Sac の終濃度が 10 mM となるように starvation medium に溶解した。
- RIPA lysis buffer solution
- Akti 906 倍濃縮液
- 20% (w/v) TCA
- ジエチルエーテル
- 濃塩酸
- 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH12.0)
- OPA 試薬
- 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)
- 80%(v/v)アセトニトリル溶液

筋管細胞への分化誘導後、dish を 3 mL の PBS (－) で 2 回洗浄した後、Starvation medium、10 mM Lys contained starvation medium、10 mM Sac contained starvation medium を 1 mL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間培養した。Medium を加えると同時に、終濃度 10 μM になるように Akti 906 倍濃縮液を添加した。4 時間後、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター内から取り出し、培地をすべて回収して－80°C で保存した。また、培地を除去したプレート 1 枚当たり 250 μL の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。その後、かき取った細胞を含む RIPA lysis buffer solution を 1.5 mL 容遠心チューブ内にすべて回収し、4°C、18,000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 100 μL を回収し、－80°C で保存した。上清はプレート中のタンパク質量の定量に用いた。タンパク質の定量は第 2 章 - 第 2 節 - 3 と同様に行った。

## 1 - (3) Western blotting を用いたタンパク質の検出

オートファジーの活性指標である LC3-II やオートファジーの制御に働く Ser/ Thr kinase の total 及びリン酸化フォームを western blotting で検出した。

## a. SDS-PAGE 用試料の調製

試薬は下記を用いた。

- DMEM+0.1% BSA
- RIPA lysis buffer solution
- PMSF 溶液 1000 倍濃縮液
- Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液
- Laemmli buffer 4 倍濃縮液
- Lys solution 10 倍濃縮液
- Sac suspending solution 90 倍濃縮液

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1%BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1%BSA に交換し、Akti (終濃度 10  $\mu$ M) を培地に添加した。Akti 添加 30 分後、Lys solution 10 倍濃縮液または Sac suspending solution 90 倍濃縮液を終濃度 10mM になるように培地に添加した。添加 30 分後にアスピレーターで培地を除去し、dish 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。以降の操作は第2章 - 第2節-4 - (1) と同様に行った。

## b. SDS-PAGE

第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同じ試薬を用い、同様に行った。

c. タンク式 western blotting

4E-BP1 の検出は転写効率の高いタンク式 western blotting を用いた。第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同じ試薬を用い、同様に行った。

d. セミドライ式 western blotting

4E-BP1 以外のタンパク質の検出にはセミドライ式 western blotting を用いた。第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同じ試薬を用い、同様に行った。

e. 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

1 - (4) 細胞中の Lys 及び Sac 濃度の測定

細胞中の Lys 及び Sac 濃度の測定は、OPA 誘導体を逆相系カラムで分離する方法を用いた。下記の試薬を用いた。

- DMEM+0.1% BSA
- RIPA lysis buffer solution
- Laemmli buffer 4 倍濃縮液
- Lys solution 10 倍濃縮液
- Sac suspending solution 90 倍濃縮液
- 70% 過塩素酸
- OPA 試薬
- 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)



- ・ 80%(v/v)アセトニトリル溶液

筋管細胞への分化誘導後、dish を 3 mL の PBS (－) で 2 回洗浄した後、Starvation medium、10 mM Lys contained starvation medium、10 mM Sac contained starvation medium を 1 mL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 0~4 時間培養した。培養後、dish を 3 mL の PBS (－) で 2 回洗浄し、培地を除去したプレート 1 枚当たり 250 μL の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。その後、かき取った細胞を含む RIPA lysis buffer solution を 1.5 mL 容遠心チューブ内にすべて回収し、4°C、18,000×g で 10 分間遠心分離して上清を回収した。この上清 100 μL に 70%過塩素酸 5 μL を加えて混合し、4°C で 1 時間静置した。その後、4°C、18,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を純水で 1,000 倍希釈した溶液 100 μL に OPA 試薬 25 μL を加え、HPLC に 5 μL 注入した。ポンプ及びカラム、カラム温度、検出装置、検出波長は第 2 章 - 第 2 節 - 2 と同様であり、移動相は酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) と 80%(v/v)アセトニトリル溶液を用いた。標準液は L-Lys-HCl (味の素株式会社) を 2.66 μM に溶解したものと、L-Sac (Sigma) を 5.0 nM に溶解したものをそれぞれ用いた。

## 2. 細胞実験② 2-AA が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす効果

### 2 - (1) C2C12 細胞の培養

C2C12 細胞の継代培養及び筋管細胞への分化誘導は第 2 章 - 第 2 節 - 1 と同様に行った。

### 2 - (2) 筋原線維タンパク質分解量の測定

下記の試薬を用いた。

- ・ DBSS 10 倍濃縮液
- ・ 1M HEPES
- ・ Starvation medium

- Lys solution 10 倍濃縮液
  - 10 mM Lys contained starvation medium
  - 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液
- …2-AA (Sigma) を終濃度 20 mM となるように DMSO に懸濁した。
- RIPA lysis buffer solution
  - 20% (w/v) TCA
  - ジエチルエーテル
  - 濃塩酸
  - 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH12.0)
  - OPA 試薬
  - 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)
  - 80%(v/v)アセトニトリル溶液

筋管細胞への分化誘導後、dish を 3 mL の PBS (－) で 2 回洗浄した後、Starvation medium、10 mM Lys contained starvation medium、2-AA の終濃度が 50、100、1000  $\mu$ M となるように 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液を添加した starvation medium を 1 mL 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間培養した。4 時間後、プレートを CO<sub>2</sub> インキュベーター内から取り出し、培地をすべて回収して－80°Cで保存した。また、培地を除去したプレート 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。その後、かき取った細胞を含む RIPA lysis buffer solution を 1.5 mL 容遠心チューブ内にすべて回収し、4°C、18,000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清 100  $\mu$ L を回収し、－80°Cで保存した。上清はプレート中のタンパク質量の定量に用いた。タンパク質の定量は第 2 章 - 第 2 節 - 3 と同様に行った。

## 2 - (3) Western blotting を用いたタンパク質の検出

オートファジーの活性指標である LC3-II やオートファジーの制御に働く Ser/ Thr kinase の total 及びリン酸化フォームを western blotting で検出した。

#### a. SDS-PAGE 用試料の調製

試薬は下記を用いた。

- DMEM+0.1% BSA
  - RIPA lysis buffer solution
  - PMSF 溶液 1000 倍濃縮液
  - Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液
  - Laemmli buffer 4 倍濃縮液
  - Lys solution 10 倍濃縮液
  - Alanine (Ala) solution 10 倍濃縮液
- …L-Ala (味の素株式会社) 0.89 g を約 90 mL の純水で溶解し、100 mL にした。その後、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌後、4°C で保存した。
- 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液
  - Pip suspending solution 200 倍濃縮液
- …Pip (Sigma) を終濃度 20 mM となるように DMSO に懸濁した。

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1%BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1%BSA に交換し、Lys solution 10 倍濃縮液を終濃度 10mM になるように、または 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液を終濃度 50、100、1000  $\mu$ M になるように培地に添加した。添加 30 分後にアスピレーターで培地を除去し、dish 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。以降の操作は

第2章 - 第2節-4 - (1) と同様に行った。

b. SDS-PAGE

第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同じ試薬を用い、同様に行った。

c. タンク式 western blotting

4E-BP1 の検出は転写効率の高いタンク式 western blotting を用いた。第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同じ試薬を用い、同様に行った。

d. セミドライ式 western blotting

4E-BP1 以外のタンパク質の検出にはセミドライ式 western blotting を用いた。第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同じ試薬を用い、同様に行った。

e. 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

2 - (4) LC3-II flux assay を用いた 2-AA によるオートファジー抑制効果の評価

オートファゴソームの膜に局在する LC3-II はオートファゴソームの数と相関することから、オートファジーの活性指標として最もよく用いられている。しかし、必ずしも LC3-II の増加がオートファジーの誘導を意味するとは限らない。例えば、オートファジーが不全を起こした時、LC3-II は増加する。これはオートファゴソーム内膜に局在する LC3-II が分解されずに蓄積するためである。LC3-II の増加がオートファジーの活性化と不全のどちらによるものかを判断する手法として、LC3-II flux assay がある[12]。この手法は、リソソーム中のプロテアーゼ活性を E-64d や pepstatin A といった阻害剤で抑え、阻害剤非添加の群と LC3-II の蓄積量を比較することで、オートファジーによるタンパク質分解量を間接的に測るものである。本

実験ではリソソームプロテアーゼ阻害剤として E-64d と pepstatin A のミクスチャーを用い、2-AA による LC3-II の減少がオートファジーの抑制に起因するかを評価した。

#### a. SDS-PAGE 用試料の調製

試薬は下記を用いた。

- DMEM+0.1% BSA
- RIPA lysis buffer solution
- PMSF 溶液 1000 倍濃縮液
- Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液
- Laemmli buffer 4 倍濃縮液
- Lys solution 10 倍濃縮液
- 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液
- 10 mM E-64d solution

…5.4 mg の E-64d を DMSO 1.6 mL で溶解した。

- 100 mM pepstatin A solution

…25 mg の pepstatin A を DMSO 3.6 mL で溶解した。

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1% BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1% BSA に交換し、E-64d の終濃度が 29  $\mu\text{M}$ 、pepstatin A の終濃度が 15  $\mu\text{M}$  となるように各溶液を培地に添加し、30 分間培養した。その後、Lys の終濃度が 10 mM、または 2-AA の終濃度が 100  $\mu\text{M}$  となるように各溶液を培地中に添加した。30 分後にアスピレーターで培地を除去し、dish 1 枚当たり 250  $\mu\text{L}$  の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。以降の操作は第 2 章 - 第 2 節 - 4 - (1) と同様に行った。

b. SDS-PAGE

第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同じ試薬を用い、同様に行った。

c. セミドライ式 western blotting

セミドライ式 western blotting を用い、LC3 と  $\beta$ -actin を検出した。第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同じ試薬を用い、同様に行った。

d. 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

2 - (5) Northern blotting を用いた mRNA の検出

2-AA が UPS に及ぼす影響を評価するため、northern blotting を用いて筋特異的ユビキチンリガーゼ E3 である MuRF1 と atrogin-1 の mRNA を検出した。

a. C2C12 筋管細胞からの total RNA の抽出

APGC 法[42]を用いて、筋管へと分化させた C2C12 細胞より total RNA を抽出した。試薬の調製と total RNA の抽出においては、121°C で 20 分間オートクレーブした器具を使用した。試薬は下記を用いた。

- DMEM+0.1%BSA
- 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液
- Sol D
- 2M 酢酸ナトリウム (pH7.4)
- 水飽和フェノール

- ・クロロホルム：イソアミルアルコール混合液
- ・2-プロパノール
- ・75%エタノール

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

筋管細胞への分化誘導後、培地を DMEM+0.1% BSA に交換し、6 時間培養した。その後、培地を新しい DMEM+0.1% BSA に交換し、終濃度 100  $\mu\text{M}$  となるように 2-AA 懸濁液を添加した。対照区には、2-AA の溶媒である DMSO を添加した。2-AA または DMSO を添加した 30 分後、アスピレーターで培地を除去し、各プレートに 800  $\mu\text{L}$  の Sol D を加えて dish 全体に行き渡らせ、ピペッティングして細胞を溶解した。以降の操作は、第 2 章 - 第 2 節 - 5 - (1) と同様に行った。

#### b. RNA の定量

第 2 章 - 第 2 節 - 5 - (2) と同じ試薬を用い、同様に行った。

#### c. Northern blotting

第 2 章 - 第 2 節 - 5 - (3) と同じ試薬を用い、同様に行った。

#### d. ストリッピング

第 2 章 - 第 2 節 - 5 - (4) と同じ試薬を用い、同様に行った。

### 3. 細胞実験③Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果

アミノヌクレオシド系抗生物質である puromycin はアミノアシル tRNA の 3'末端に類似した構造を有している。そのため、puromycin はリボソームの A サイトに侵入し、伸長するポリペプチド鎖に結合する。高濃度の puromycin はタンパク質の合成阻害に働くが、1  $\mu\text{M}$  以下

の低濃度で処理するとタンパク質合成を阻害することなく伸長するポリペプチド鎖に puromycin が結合する。こうしてポリペプチド鎖へと取り込まれた puromycin (puromycin 標識タンパク質) を、抗 puromycin 抗体を用いた western blotting によって検出し、新規に合成されたタンパク質を検出する方法を surface sensing of translation (SUnSET) 法と呼ぶ[56]。

本実験では、SUnSET 法を用いて、C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に Lys が及ぼす効果を評価した。

### 3 - (1) C2C12 細胞の培養

C2C12 細胞の継代培養及び筋管細胞への分化誘導は第2章 - 第2節 - 1 と同じ試薬を用い、同様に行った。

### 3 - (2) Western blotting による puromycin 標識タンパク質の検出

Western blotting を用いて puromycin で標識されたタンパク質を検出し、タンパク質の合成速度を求めた。

#### a. SDS-PAGE 用試料の調製

下記の試薬を用いた。

- ・ DMEM+2% HS
  - ・ Lys solution 10 倍濃縮液
  - ・ Leu solution 10 倍濃縮液
  - ・ L-alanine (Ala) solution 10 倍濃縮液
  - ・ 100  $\mu$ M インスリン溶液
- …bovine insulin (Sigma) 20 mg に対して 3 mM の塩酸を 31.41 mL の割合で混合し、クリーンベンチ内でメンブレンフィルター (アドバンテック株式会社) を用いてろ過滅菌し、4°C



で保存した。

- 300  $\mu$ M puromycin solution
- …1.6 mg の puromycin (Sigma) を 1 mL の純水に溶解した。
- RIPA lysis buffer solution
- PMSF 溶液 1000 倍濃縮液
- Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液
- Laemmli buffer 4 倍濃縮液

筋管細胞への分化後、培地を新しい DMEM+2% HS に交換した。培地交換後、Lys の終濃度が 0 mM、2.5 mM、5 mM、10 mM となるように、Lys solution 10 倍濃縮液を培地中に添加した。また、Lys で処理するプレートとは別に、終濃度が 10 mM となるように、Leu solution 10 倍濃縮液または Ala solution 10 倍濃縮液を、終濃度が 100 nM となるように 100  $\mu$ M インスリン溶液をそれぞれ培地中に添加した。Lys、Leu、Ala、またはインスリンを添加した 10 分後、終濃度が 1  $\mu$ M となるように 300  $\mu$ M puromycin solution を培地中に添加した。Puromycin を添加した 20 分後に培地をアスピレーターで除去し、3 mL の PBS (-) でプレートを洗浄した後、dish 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。以降の操作は第2章 - 第2節 - 4 - (1) と同様に行った。

#### b. SDS-PAGE

第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同じ試薬を用い、同様に行った。なお、10%アクリルアミドゲルを用いた。

#### c. タンク式 western blotting

下記の試薬を用い、転写時間を2時間としたほかは、第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同じ試薬を用い、同様に行った。なお、二次抗体には抗 mouse 二次抗体溶液を用いた。

- ・抗 puromycin 抗体溶液

…抗 puromycin 抗体 (EMD Millipore corporation) を一次抗体希釈液で 25,000 倍希釈し、4°C で保存した。

d. 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

4. 細胞実験④Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果

SUnSET 法を用い、Lys、2-AA、Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす影響を評価した。

4 - (1) C2C12 細胞の培養

C2C12 細胞の継代培養及び筋管細胞への分化誘導は第2章 - 第2節 - 1 と同じ試薬を用い、同様に行った。

4 - (2) Western blotting による puromycin 標識タンパク質の検出

a. SDS-PAGE 用試料の調製

下記の試薬を用いた。

- ・ Lys solution 10 倍濃縮液
- ・ 2-AA suspending solution 200 倍濃縮液
- ・ Pip suspending solution 200 倍濃縮液
- ・ 300  $\mu$ M puromycin solution

- RIPA lysis buffer solution
- PMSF 溶液 1000 倍濃縮液
- Leupeptin/pepstatin A mixture 500 倍濃縮液
- Laemmli buffer 4 倍濃縮液

筋管細胞への分化後、培地を新しい DMEM+2% HS に交換した。培地交換後、終濃度が 100  $\mu\text{M}$  となるように、Lys solution 10 倍濃縮液、2-AA suspending solution 200 倍濃縮液、または Pip suspending solution 200 倍濃縮液を培地中に添加した。Lys、2-AA、または Pip を添加した 10 分後、終濃度が 1  $\mu\text{M}$  となるように 300  $\mu\text{M}$  puromycin solution を培地中に添加した。以降の操作は第3章 - 第2節 - 3 - (2) と同様に行った。

#### b. SDS-PAGE

第3章 - 第2節 - 4 - (3) と同じ試薬を用い、同様に行った。

#### c. タンク式 western blotting

第3章 - 第2節 - 4 - (4) と同じ試薬を用い、同様に行った。

#### d. 目的タンパク質の検出

第3章 - 第2節 - 4 - (5) と同じ試薬を用い、同様に行った。

### 5. 統計処理

第2章 - 第2節 - 6 と同様に行った。

## 第4節 結果

## 1. 細胞実験①

C2C12 筋管細胞に対し、DMSO で前処理し、アミノ酸処理をしない群を C、Akti で前処理し、Lys または Sac 処理をしない群を Ai、DMSO で前処理し、10 mM Lys で処理した群を K、Akti で前処理し、10 mM Lys で処理した群を AiK、DMSO で前処理し、10 mM Sac で処理した群を S、Akti で前処理し、10 mM Sac で処理した群を AiS として示した。

## 1 - (1) Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量

Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量を Fig. 3-1 に示した。筋原線維タンパク質分解量は、C と比較して K で 50% 程度の、S で 20% 程度の低値を示し、K と比較して S は有意な高値を示した。K 及び S による筋原線維タンパク質分解抑制作用は Akt の阻害によって打ち消された。C と Ai の間に差はなかった。この結果から、Sac も C2C12 筋管細胞における筋原線維タンパク質分解の抑制に働き、その作用は Lys と同じく Akt を介する可能性が示された。

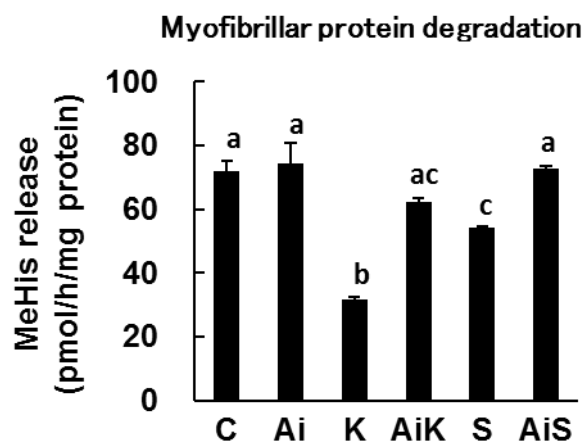


Fig. 3-1 Akt 阻害条件における筋原線維タンパク質分解量

値は平均±標準誤差 (n=4)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 1- (2) Akt 阻害条件におけるオートファジー活性

Akt 阻害条件におけるオートファジーの活性を Fig. 3-2 に示した。オートファジーの活性は C と比較して K 及び S で 20%程度の低値を示したが、Lys 及び Sac によるオートファジー抑制効果は Akt の阻害によって打ち消された。オートファジーの活性は C と比較して Ai で有意に高く、Ai は AiK 及び AiS と差はなかった。この結果から、Sac も C2C12 筋管細胞におけるオートファジーの抑制に働き、その作用は Lys と同様に Akt を介すると考えられた。

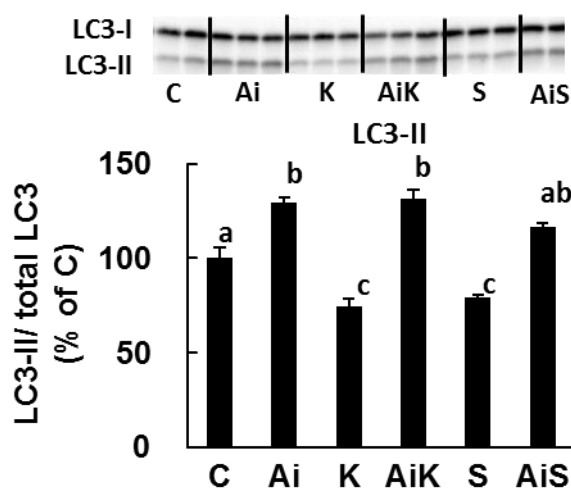


Fig. 3-2 Akt 阻害条件におけるオートファジー活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 1- (3) Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性

Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性を Fig. 3-3 に示した。なお、A には Akt の活性を、B には 4E-BP1 の活性をそれぞれ示した。

Akt の活性は C と比較して K 及び S で顕著な高値を示した。Ai、AiK、AiS においては pAkt が検出されなかったことから、Akt の活性は Akti によって阻害されたと考えられた (Fig. 3-3B)。4E-BP1 の活性は C と比較して K 及び S で有意な高値を示した。4E-BP1 のリン酸化率は、C と比較し、Ai は有意な低値を示し、Ai と AiS 間に差はなかった (Fig. 3-3B)。一方、AiK は K と比較して有意な低値を示したが、AiS と比較して有意に 4E-BP1 のリン酸化率が高かった。したがって、Sac による mTOR 経路の活性化作用は Akt を介すると考えられた。

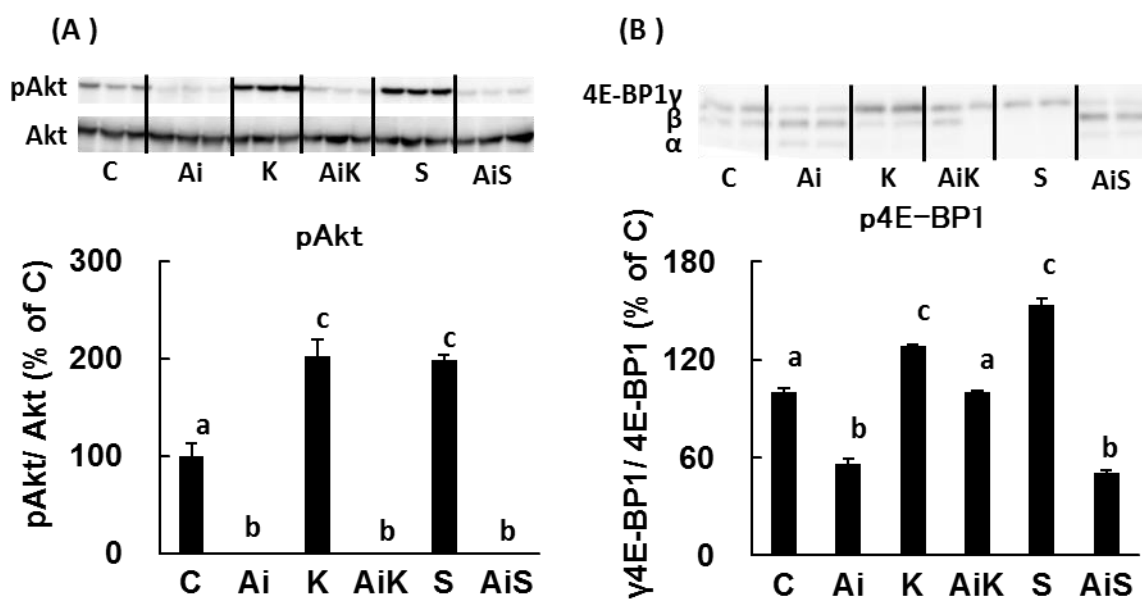


Fig. 3-3 Akt 阻害条件における Ser/ Thr kinase の活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 1- (4) 細胞中の Lys 濃度の経時変化

細胞中の Lys 濃度の経時変化を Fig. 3-4 に示した。Lys 濃度は Lys の添加で顕著に増加し、添加4時間後まで高値を保った。一方、Sac の添加による Lys 濃度の増加は認められなかった。

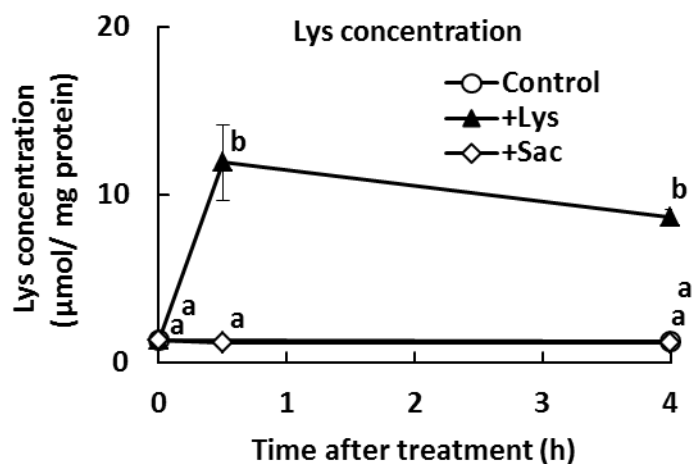


Fig. 3-4 細胞中の Lys 濃度

○ : 処理なし、▲ : Lys 添加群、◇ : Sac 添加群

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 1- (5) 細胞中の Sac 濃度の経時変化

C2C12 筋管細胞中の Sac 濃度の経時変化を Fig. 3-5 に示した。細胞中の Sac 濃度は Sac 添加群で顕著に高値を示したが、Lys の添加による Sac の増加は認められなかった。

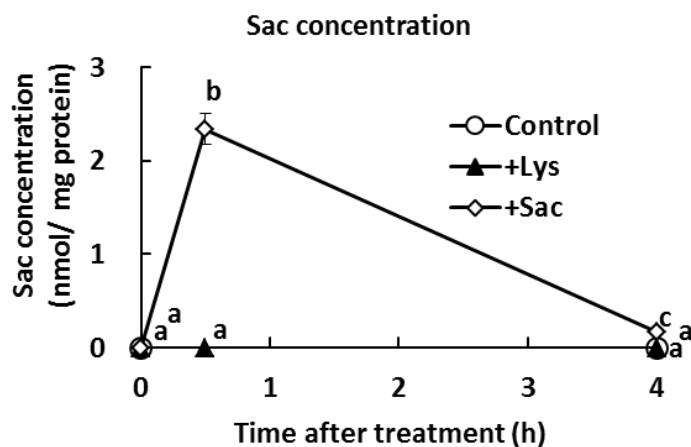


Fig. 3-5 細胞中の Sac 濃度

○ : 処理なし、▲ : Lys 添加群、◇ : Sac 添加群

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2. 細胞実験②

2-AA や Pip、Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす効果を評価した細胞実験②の結果を以下に示す。

## 2- (1) 2-AA が筋原線維タンパク質分解に及ぼす効果の濃度依存性

50、100、1000  $\mu\text{M}$  の 2-AA を添加した培地で培養した際の筋原線維タンパク質分解量を Fig. 3-6 に示した。筋原線維タンパク質の分解量は無処理の Control 群と比較して 2-AA の溶媒である DMSO や 50  $\mu\text{M}$  の 2-AA による影響を受けなかったが、100  $\mu\text{M}$  により 30%程度、1000  $\mu\text{M}$  の 2-AA により 40%程度抑制された。したがって、2-AA は 100  $\mu\text{M}$  という Lys と比較して低い濃度で C2C12 筋管細胞における筋原線維タンパク質分解の抑制に寄与すると考えられた。

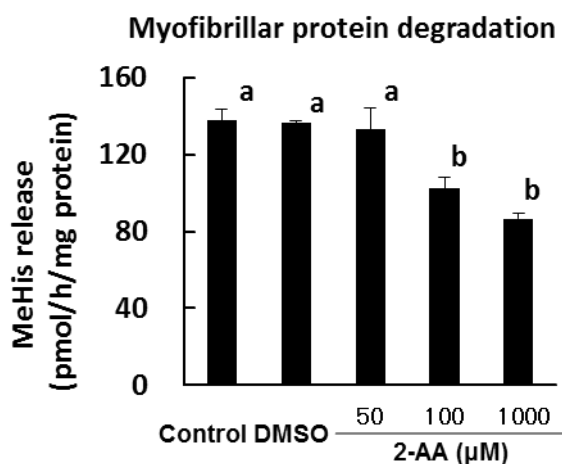


Fig. 3-6 2-AA 処理時の筋原線維タンパク質分解量

値は平均 $\pm$ 標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。



## 2- (2) 2-AA がオートファジー活性に及ぼす効果の濃度依存性

50、100、1000  $\mu\text{M}$  の 2-AA を添加した培地で培養した際のオートファジー活性を Fig. 3-7 に示した。オートファジー活性は無処理の Control 群と比較して 2-AA の溶媒である DMSO や 50  $\mu\text{M}$  の 2-AA による影響を受けなかったが、100  $\mu\text{M}$  の 2-AA により 20%程度、1000  $\mu\text{M}$  の 2-AA により 30%程度抑制された。したがって、2-AA は 100  $\mu\text{M}$  という Lys と比較して低い濃度で C2C12 筋管細胞におけるオートファジーの抑制に寄与すると考えられた。

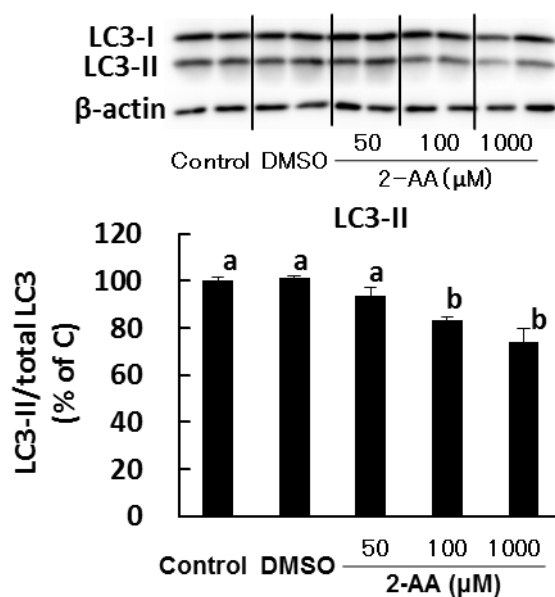


Fig. 3-7 2-AA 処理時の筋原線維タンパク質分解速度

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 2- (3) LC3-II flux に 2-AA が及ぼす効果

LC3-II flux とは、リソソーム中のプロテアーゼ活性を E-64d や pepstatin A といった阻害剤で抑え、阻害剤非添加の群と LC3-II の蓄積量を比較することで、オートファジーによるタンパク質分解量を間接的に測定したものである。2-AA で C2C12 筋管細胞を処理した際の LC3-II flux を Fig. 3-8 に示した。E-64d と pepstatin A (inhibitors) により Lys も 2-AA も添加しない群では LC3-II の顕著な蓄積が認められた。一方、Lys や 2-AA を添加した群でも inhibitors による LC3-II の増加傾向が見られたが、その蓄積は Lys も 2-AA も添加せず inhibitors で処理した群と比較して有意な低値を示した。したがって、オートファジーによる分解量は 10 mM の Lys や 100  $\mu$ M の 2-AA によって抑制されたと考えられる。

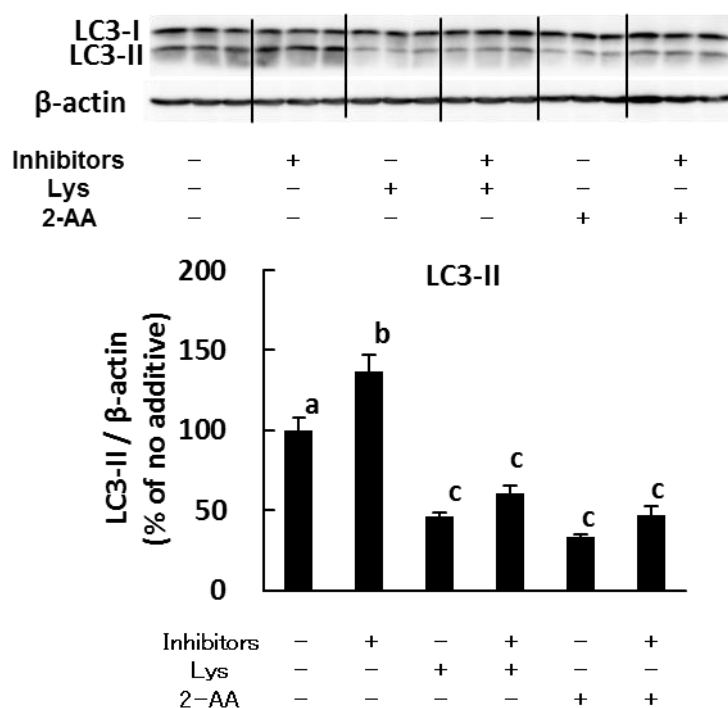


Fig. 3-8 2-AA 処理時の C2C12 筋管細胞における LC3-II flux

値は平均 $\pm$ 標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (4) UPS 活性に 2-AA が及ぼす効果

2-AA で C2C12 筋管細胞を処理した際の筋特異的ユビキチンリガーゼ E3 の mRNA 発現量を Fig. 3-9 に示した。MuRF1 と atrogen-1 のいずれに対しても 2-AA による効果は認められなかった。

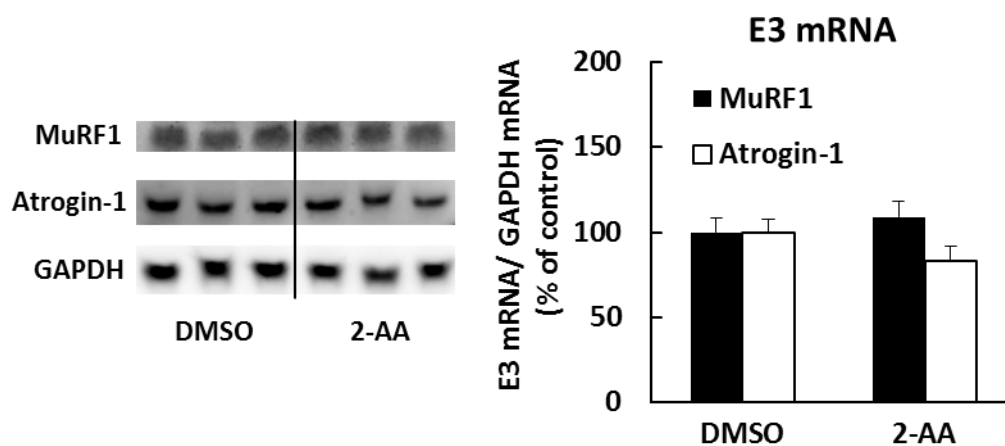


Fig. 3-9 2-AA 処理時の C2C12 筋管細胞における筋特異的ユビキチンリガーゼ E3 の mRNA

黒：MuRF1、白：atrogen-1

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

2- (5) オートファジーと Ser/ Thr kinase に 2-AA が及ぼす効果の Lys、Pip、Ala との比較  
2-AA で C2C12 筋管細胞を処理した際のオートファジー及びその制御に働く Ser/ Thr kinase  
の活性を Fig. 3-10 に示した。なお、A には代表的なバンドを示し、B にはオートファジーの、  
C には Akt の、D には S6K1 の、E には 4E-BP1 の、F には AMPK の活性をそれぞれ示した。

オートファジーの活性は 100  $\mu$ M 2-AA の添加により 20%程度減少したが、100  $\mu$ M の Pip、  
Lys、Ala による影響は認められなかった (Fig. 3-10B)。したがって、2-AA によるオートフ  
ァジー抑制作用は Pip や Lys、Ala では効果が認められない濃度でも有効であると考えられた。  
Akt の活性は 100  $\mu$ M の 2-AA、Pip、Lys によって有意に増加し、Ala による効果は認められ  
なかった (Fig. 3-10C)。S6K1 の活性は 100  $\mu$ M の 2-AA、Pip、Lys によって有意に増加し、  
Ala による効果は認められなかった (Fig. 3-10D)。このうち、Pip は特に顕著に S6K1 の活性  
を上昇させた。S6K1 はタンパク質翻訳段階の制御に働くことから、Pip は C2C12 筋管細胞の  
タンパク質合成促進に寄与する可能性が考えられた。4E-BP1 の活性は 100  $\mu$ M の 2-AA、Pip、  
Lys によって有意に増加し、Ala による効果は認められなかった (Fig. 3-10E)。AMPK の活  
性は 100  $\mu$ M の 2-AA によって有意に減少し、100  $\mu$ M の Pip、Lys、Ala による効果は認められ  
なかった (Fig. 3-10F)。

したがって、2-AA による AMPK 抑制作用は Pip や Lys、Ala では効果が認められない濃度  
でも有効であると考えられた。

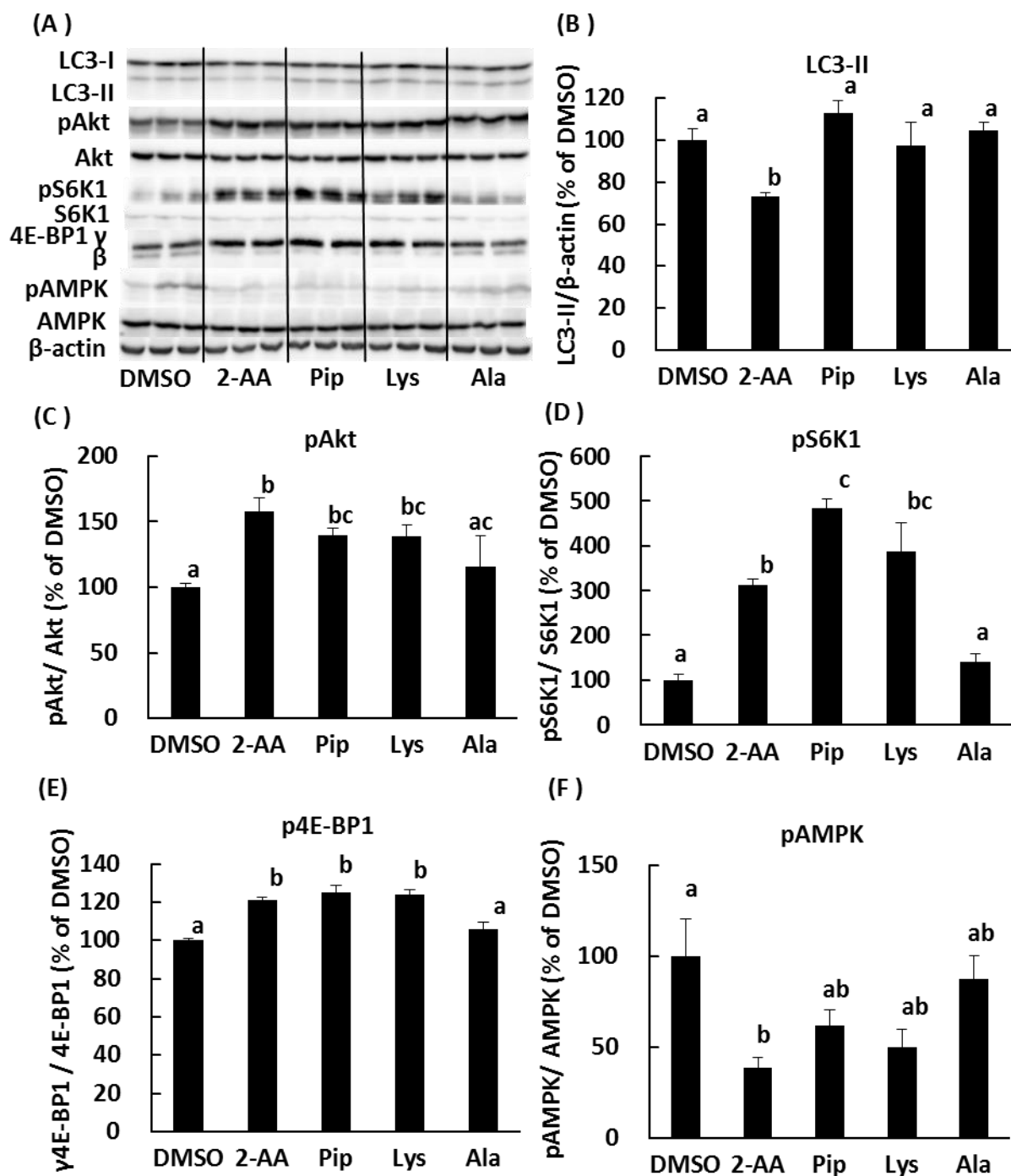


Fig. 3-10 オートファジーとその制御に働く Ser/ Thr kinase の活性

A : 代表的なバンド、B : オートファジーの活性、C : Akt の活性、D : S6K1 の活性、

E : 4E-BP1 の活性、F : AMPK 活性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 3. 細胞実験③

Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果について評価した細胞実験③の結果を以下に示す。

## 3- (1) Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす影響の濃度依存性

SUnSET 法で評価した 0、0.25、5、10 mM Lys 処理時における C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度を Fig. 3-11 に示した。Puromycin 標識ペプチドから評価したタンパク質合成速度は Lys の処理濃度依存的に増加し、0 mM Lys で処理した群と比較して 5 mM 及び 10 mM Lys で処理した群では有意に増加した。

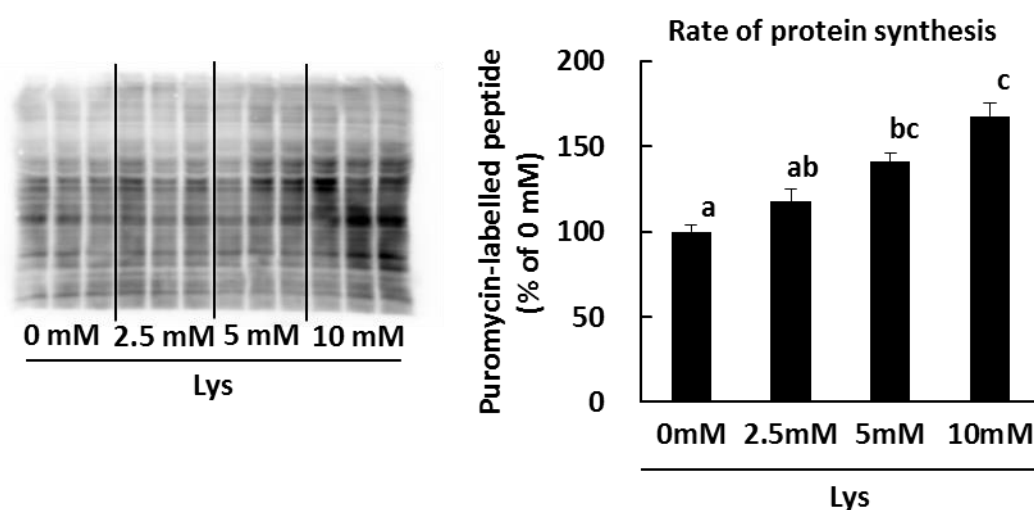


Fig. 3-11 Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす影響の濃度依存性

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 3- (2) Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果の他物質との比較

SUnSET 法で評価した 10 mM Lys、10 mM Leu、10 mM Ala、100 nM インスリン処理時における C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度を Fig. 3-12 に示した。なお、A には Lys、Leu、インスリンによる効果を示し、B には Lys と Ala による効果をそれぞれ示した。

Puromycin 標識ペプチドから評価したタンパク質合成速度は処理を施さないコントロール群と比較して Lys、Leu、インスリンで処理した群で 50%程度増加した (Fig. 3-12A)。Puromycin 標識ペプチドから評価したタンパク質合成速度は処理を施さないコントロール群と比較して Lys で処理した群では増加したが、Ala で処理した群では増加が認められなかった (Fig. 3-12B)。

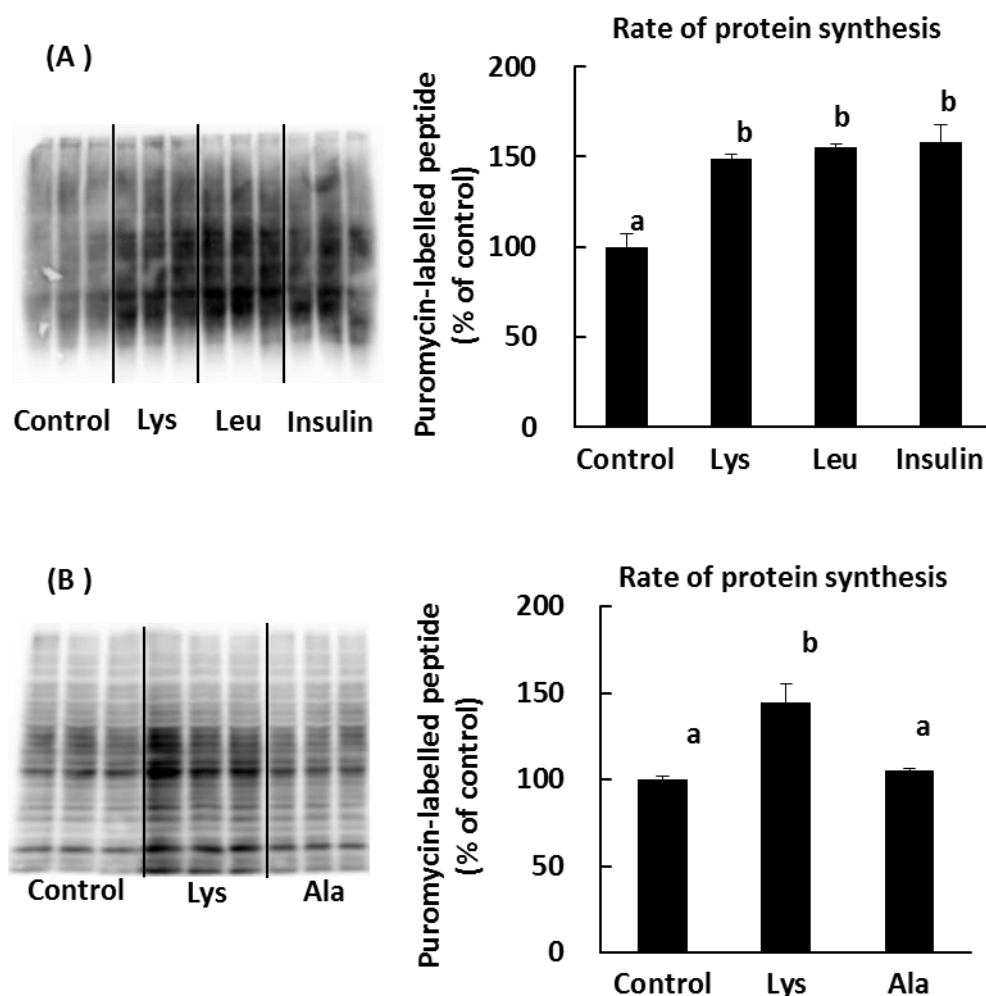


Fig. 3-12 Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果の他の物質との比較

A : Lys、Leu、インスリンによる効果の比較、B : Lys と Ala による効果の比較

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 4. 細胞実験④

## 4- (1) Lys、2-AA、Pip が C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に及ぼす効果の比較

SUnSET 法で評価した 100  $\mu$ M Lys、100  $\mu$ M 2-AA、100  $\mu$ M Pip 処理時における C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度を Fig. 3-13 に示した。Puromycin 標識ペプチドから評価したタンパク質合成速度は 2-AA と Pip の溶媒である DMSO を添加したコントロール群と比較して 100  $\mu$ M の Pip で処理した群で 40%程度増加した。一方、DMSO を添加した群と比較して 100  $\mu$ M の Lys または 2-AA で処理した群では効果は認められなかった。

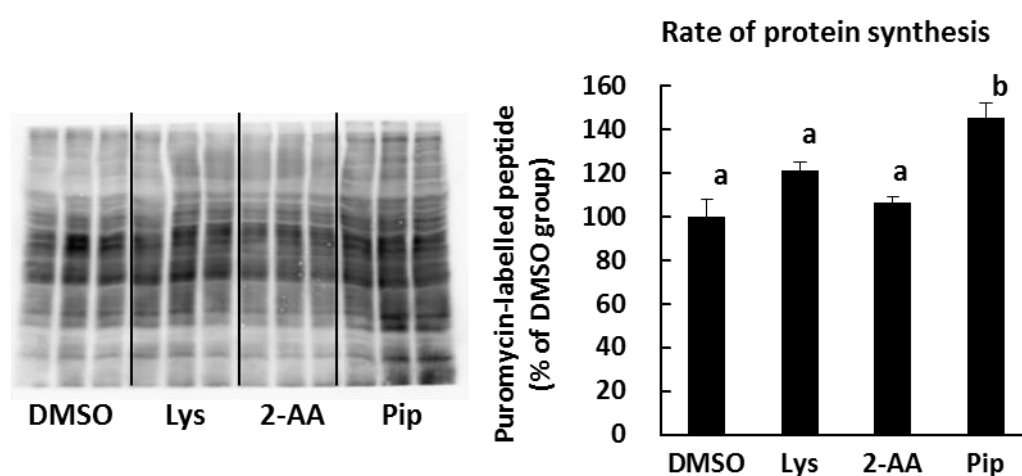


Fig. 3-13 C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に対する Lys、2-AA、Pip の効果の比較

値は平均±標準誤差 (n=3)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 第4節 考察

Lys は Sac 経路と Pip 経路の2通りの経路で代謝されるが、脳以外の組織においては Sac 経路を主要な経路として Lys が代謝される[57]。私は修士研究において[35]、Sac が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす作用について検討し、Sac は C2C12 筋管細胞において、Lys と同様に筋原線維タンパク質分解とオートファジー活性を抑制し、Akt/ mTOR 経路を活性化する可能性を見出した。第2章において、Lys は主に Akt の活性化を介してオートファジーの抑制に働くことを示唆したことから、Lys の代謝産物である Sac も Lys と同様に Akt を介した経路でオートファジーの抑制に働く可能性が考えられた。そこで、本章では Akt 活性阻害条件における Sac のオートファジーへの効果を検討した。その結果、Akt の活性阻害によって Sac によるオートファジー抑制作用と筋原線維タンパク質分解抑制作用は、完全に打ち消された (Fig. 3-1, 3-2)。以上のことから、Lys の代謝産物である Sac も、Lys と同様の Akt を介した経路によってオートファジーの抑制に働くことと推察された。

上述のように、Lys の代謝産物である Sac にもオートファジー抑制作用を見出し、その作用機序についても一部示したが、等モル条件での作用を Lys と比較した場合、Sac による筋原線維タンパク質分解抑制作用は 40%程度弱いものであった (Fig. 3-1)。また、Lys 摂取時に骨格筋中で Sac 濃度が上昇することは報告されているものの、Lys の代謝によって生じた Sac は直ちに代謝され、組織中にはほとんど留まらないことが知られている[58]。C2C12 筋管細胞においても Sac の代謝酵素が機能しているという前提の上であるが、C2C12 筋管細胞に Sac を添加した際、細胞中の Sac 濃度が急速に減少した結果も、Sac の代謝が極めて早いことを支持する (Fig. 3-5)。そのため、Lys の摂取による筋原線維タンパク質分解抑制作用において、Sac が担う役割は量・質のいずれにおいても比較的少ない可能性がある。

Sac は L-2-アミノアジピン酸セミアルデヒドを経て 2-AA へと代謝される。そこで、次に 2-AA が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす作用を評価した。Lys が C2C12 筋管細胞のタンパク質分解に及ぼす影響を 2-AA と比較したところ、100  $\mu$ M の 2-AA は 10 mM の Lys と同程度に筋原線維タンパク質分解とオートファジーの活性を抑えることが示唆された (Figs.

3-6, 3-7)。すなわち、2-AA は Lys よりも低濃度で骨格筋タンパク質分解に寄与する可能性が考えられた。2-AA で C2C12 筋管細胞を処理した際、Akt 活性と AMPK 活性に対する作用は等モルの Lys や Pip、Ala と比較して強い傾向が認められた (Fig. 3-10)。したがって、Akt もしくは AMPK のようなオートファジー制御に働く Ser/ Thr kinase の活性制御に働く閾値が 2-AA では低い可能性がある。

2-AA が Ser/ Thr kinase の活性に及ぼす影響を Lys や Lys の代謝産物と比較する過程で、Lys の Pip 経路における代謝産物である Pip が S6K1 を 2-AA や Lys よりも強く活性化する可能性が示唆された (Fig. 3-10)。S6K1 は mTOR の下流に位置する Ser/ Thr kinase であり、タンパク質翻訳段階の制御において重要な役割を果たすことが知られている[59]。したがって、Pip は 2-AA や Lys よりも強力に骨格筋タンパク質の合成を促進する可能性が考えられた。しかし、骨格筋タンパク質の合成速度に及ぼす影響については、Lys の代謝産物はもちろん、Lys 自体の効果を検討した例がなかった。

そこで、SUnSET 法[56]を用い、C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度に Lys が及ぼす作用を評価した。その結果、Lys は濃度依存的に C2C12 筋管細胞のタンパク質合成速度を高め、その作用には一部特異性があると考えられた (Figs. 3-6, 3-7)。この結果を受け、Pip、Lys、2-AA 間で S6K1 活性化の差が認められた 100  $\mu$ M に処理濃度を統一し、C2C12 筋管細胞におけるタンパク質合成速度を SUnSET 法で評価した。その結果、100  $\mu$ M の 2-AA 及び Lys によるタンパク質合成促進効果は認められなかったが、100  $\mu$ M の Pip によるタンパク質合成促進効果が認められた (Fig. 3-7)。したがって、Pip は Lys よりも低濃度で骨格筋タンパク質の合成を促進する可能性がある。しかしながら、Pip を主要な代謝産物とする Pip 経路は脳で活発であり、骨格筋においてはそれほど活発に機能していない[49-51]。実際、Lys 添加食を摂取したブロイラーの骨格筋や Lys を腹腔内投与したマウスの血中 Pip 濃度は他の代謝産物よりも低い傾向にある[54,55]。そのため、Lys の摂取による骨格筋タンパク質合成促進効果は、比較的高用量の Lys を摂取し、十分な量の Pip が骨格筋を刺激する条件で発揮される可能性が高いと考えられる。具体的には、67 mg Lys/ 100 g BW の Lys 投与によって血漿中の Pip 濃度が 15  $\mu$ M と

なることが報告されているため、血漿中の Pip 濃度が 100  $\mu\text{M}$  を上回るためには 450 mg Lys/100 g BW 程度の Lys 摂取量が必要と考えられる。

第2章においては、Lys による Ser/Thr kinase 制御機構について「アミノ酸受容体」の関与を示唆した。しかし、Sac や 2-AA、Pip はアミノ酸ではなくアミノ酸の代謝産物であり、分子構造も Lys とは異なる。特に、Pip は、カルボキシル基以外では Lys との共通構造が存在しない。Leu は Sestrin1/2 に感知されることで mTOR を活性化するが、Leu の代謝産物である KIC や HMB も mTOR を活性化することが報告されている[33,34]。KIC は Leu と同様にイソブチル基を有するが、HMB はカルボキシル基以外に Leu との共通構造を持たない。カルボキシル基を有する Ala では mTOR の活性化が認められなかったことから (Fig. 3-10)、カルボキシル基が mTOR 活性の引き金になる可能性も低いと考えられる。したがって、アミノ酸代謝産物が Ser/Thr kinase の活性調節に働く機構は、Sestrin1/2 や CASTOR といったアミノ酸感知タンパク質によっては議論できない。Met は protein phosphatase 2A (PP2A) をメチル化してオートファジーを阻害し、アミノ酸充足のシグナルとして機能することが報告されている[60]。しかし、この機序はメチル基の供与体として機能する Met 特有のものである。Leu の代謝産物である HMB や KIC を含め、アミノ酸の代謝産物がどのようにして細胞に感知され、代謝を変化されるかについては今後詳細な検討が必要である。

## 第4章 食餌タンパク質量がLysの骨格筋タンパク質分解抑制作用に及ぼす効果 [61]

## 第1節 目的

これまでに、私は絶食時におけるLysの強制経口投与はラットの筋原線維タンパク質の分解を抑え[62]、骨格筋培養細胞においてはAktを介したオートファジーの抑制により筋原線維タンパク質分解の抑制に寄与することを示してきた。しかし、より生理的な条件、例えばLys添加食を摂取した場合にAktの活性化やオートファジーの抑制が認められるかどうかは不明であった。さらに、Lysはタンパク質構成アミノ酸であるため、十分な食餌タンパク質、つまり食餌アミノ酸の供給がある場合にも骨格筋タンパク質の分解抑制作用が期待できるかどうかも分かっていない。そこで、本章では、十分なタンパク質量を摂取可能な20%カゼイン食と、食餌タンパク質が若干不足する10%カゼイン食にそれぞれLysを添加してラットに与え、骨格筋タンパク質分解とその制御に働くシグナル伝達経路の活性を評価、比較することを目的として実験を行った。

## 第2節 方法

## 1. 動物実験

実験動物として、3週齢のWistar系雄性ラット（30~50g、日本エスエルシー株式会社：静岡）を用いた。ラットは個別のステンレスケージに入れ、室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、午前6時から午後6時までの12時間明暗サイクルで計15日間飼育した。水は水道水を自由飲水させた。飼育1日目は固形飼料（マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料CE-2、日本クレア株式会社：東京）、その後、AIN-93G組成[63]の20%カゼイン飼料（Table 2-1、20C）を計13日間供与した。飼育0~2日目は20%カゼイン飼料を24時間自由摂食させ、飼育2~5日目は12時間（9:00-21:00）のみ、6~8日目は9時間（9:00-18:00）のみ、9~12日目は6時間（9:00-15:00）のみ摂食させた。13日目は9:00-15:00に20%カゼイン食を与えた後、18時間絶食させた。絶食後、Table 5-1に示した実験飼料のうちいずれかを1時間与え

た。Lys の添加量は 20%カゼイン食に添加した場合は 30%カゼイン食に含まれる Lys 量に相当するように、10%カゼイン食に添加した場合は 20%カゼイン食に含まれる Lys 量に相当するように添加した[63]。実験食の供与終了後に 3 時間絶食させ、屠殺した。

Table 5-1 実験飼料の組成

Component	Group / g/ kg diet			
	20C	20CK	10C	10CK
カゼイン <sup>a</sup>	200	200	100	100
シスチン <sup>b</sup>	3	3	3	3
重酒石酸コリン <sup>c</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5
ビタミン混合 <sup>a</sup>	10	10	10	10
ミネラル混合 <sup>a</sup>	35	35	35	35
セルロース <sup>a</sup>	50	50	50	50
大豆油 <sup>c</sup>	70	70	70	70
ショ糖 <sup>c</sup>	100	100	100	100
コーンスターチ <sup>a</sup>	529.5	523	629.5	623
Lysine-HCl <sup>c</sup>	0	6.5	0	6.5
Total	1000	1000	1000	1000

a : オリエンタル酵母工業株式会社 : 東京

b : 和光純薬株式会社

c : 味の素株式会社

ラットはジエチルエーテル麻酔下で開腹後、下大静脈から採血した後に屠殺した。屠殺後、速やかに長指伸筋 (extensor digitorum longus : EDL) とヒラメ筋 (soleus muscle) を単離し、直ちに 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> を通気した Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (KRB 緩衝液、pH7.4) に浸し、筋原線維タンパク質分解速度の測定のため 2 時間インキュベートした。血液はヘパリン処理した試験管にいれ、1,600×g、4℃で 15 分間遠心分離し、血漿を分離した。また、腓腹筋と前脛骨筋を摘出し、重量測定の後、液体窒素でただちに凍結させた。血漿と摘出した骨格筋

は、分析するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定法

屠殺後速やかに摘出した EDL 及びヒラメ筋を、生理的な緩衝液中で一定時間 95%  $\text{O}_2$ -5% $\text{CO}_2$  通気下  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションし、放出された MeHis から筋原線維タンパク質の分解速度を評価した[27]。

### (1) 単離筋肉切片のインキュベーション

下記の試薬を用いた。

#### Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (KRB 緩衝液、pH7.4)

- 310 mM 塩化ナトリウム

…塩化ナトリウム 1.8 g を純水に溶解し、100 mL にした。

- 26 mM グルコース

…グルコース 0.468 g を純水に溶解し、100 mL にした。

- 155 mM 塩化カリウム

…塩化カリウム 0.575 g を純水に溶解し、50 mL にした。

- 110 mM 塩化カルシウム

…塩化カルシウム二水和物 0.805 g を純水に溶解し、50 mL にした。

- 115 mM 硫酸マグネシウム

…硫酸マグネシウム七水和物 1.905 g を純水に溶解し、50 mL にした。

- 155 mM リン酸二水素カリウム

…リン酸二水素カリウム 1.055 g を純水に溶解し、50 mL にした。

- 155 mM 炭酸水素ナトリウム

…炭酸水素ナトリウム 0.65 g を純水に溶解し、50 mL にした。

・シクロヘキシミド (Sigma)

(明記していないものは、特級試薬、和光純薬工業株式会社)

Table 5-2 KRB 緩衝液 (pH7.4) の組成

試薬名	試薬濃度 (mM)	容量 (mL)	終濃度 (mM)
塩化ナトリウム	310	50	120
グルコース	26	50	10
塩化カリウム	155	4	4.8
塩化カルシウム	110	3	2.5
硫酸マグネシウム	115	1	0.9
リン酸二水素カリウム	155	1	1.2
炭酸水素ナトリウム	155	21	25

Table5-2 に示した溶液を上から順に混合し、KRB 緩衝液 (全量 130 mL) としたうえで、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを 0.5 mM となるように 18.29 mg 加えた後、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> を 3-5 分間通気し、pH を 7.4 に調整した。

屠殺後速やかに摘出した単離筋肉切片を、恒温槽 (タイテック株式会社) を用いて 37°C に保温した KRB 緩衝液 2 mL 中に浸し、単離筋肉切片からの MeHis の放出が安定するまで 30 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション開始 15 分後に 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> を通気し、30 分後に筋肉切片を新たな KRB 緩衝液 2 mL 中に移し、さらに 2 時間インキュベーションした。なお、インキュベーションの間は、15 分おきに緩衝液中に 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> を通気した。2 時間のインキュベーション終了後、筋肉切片を緩衝液から取り出し、重量を測定

した。緩衝液は分析時まで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## (2) KRB 緩衝液中の MeHis の測定

KRB 緩衝液中の MeHis 濃度の定量は、フルオレスカミン誘導体を逆相系カラムで分離するプレカラム法[27]により行った。試薬として、以下のものを用いた。

- 70% 過塩素酸

- 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH12.2)

…ホウ酸 2.47 g に純水約 40 mL を加え、さらに 1 M 水酸化ナトリウムを加えながらホウ酸を溶解し、pH を 12.2 に調整した後、純水を加えて全量を 100 mL にした。

- フルオレスカミン溶液

…フルオレスカミン (東京化成工業株式会社：東京) 2.0 mg を HPLC 用アセトニトリル (Sigma) 1 mL に溶解した。

- 0.5 M MOPS/3 M 水酸化ナトリウム

…MOPS (Sigma) 105 mg に 3 M 水酸化ナトリウムを加えて溶解し、全量を 1 mL にした。

- 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5)

…リン酸二水素ナトリウム二水和物 2.136 g とリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 2.256 g に純水約 900 mL を加えて溶解し、pH を確認した後、純水を加えて全量を 1000 mL とし、褐色ビン中に保存した。

- 80% (v/v) アセトニトリル溶液

- 5.53  $\mu\text{M}$  ヒスチジノール溶液

…L-ヒスチジノール (Sigma) 3.6 mg を純水 10 mL に溶解し、1.68 mM とし、これを $-20^{\circ}\text{C}$ で一次保存した。これをさらに純水で 100 倍希釈して 16.6 mM として $4^{\circ}\text{C}$ で保存し、使用時に 3 倍希釈して用いた。

- 322 nM MeHis



…MeHis (Sigma) 45 mg を純水 100 mL に溶解し、2.26 mM として $-20^{\circ}\text{C}$ で一保存した。これをさらに純水で 190 倍希釈して、13.9 mM で保存し、使用時にはこれを純水で 41 倍に希釈して用いた。

(明記していない試薬は、特級試薬、和光純薬工業株式会社)

単離筋肉切片をインキュベーションした緩衝液 140  $\mu\text{L}$ 、5.53 mM ヒスチジノール溶液 8  $\mu\text{L}$  と 70%過塩素酸 4  $\mu\text{L}$  を加えて良く混合した後、18,000 $\times$ g、 $4^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心分離した。その上清 100  $\mu\text{L}$  に 125  $\mu\text{L}$  の 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH12.2) を加え、ボルテックスミキサーで攪拌しながら 100  $\mu\text{L}$  のフルオレスカミン溶液を加えた。5 分間暗所で放置した後、70%過塩素酸 10  $\mu\text{L}$  を加え、 $80^{\circ}\text{C}$ に設定したブロックヒーター (Dry blockbath AL-500、サイニクス株式会社：東京) で 1 時間加熱した。加熱後、暗所で放冷し、0.5 M MOPS/3 M 水酸化ナトリウムを 40  $\mu\text{L}$  加えた。ユニバーサル pH 試験紙で pH が 8.6-8.8 になっているかを確認した後、HPLC に 10  $\mu\text{L}$  を注入した。ポンプは LC10ATV、オートインジェクターは SIL-10ADVP、検出器は分光蛍光検出器 FP-10AXL (いずれも、島津製作所) を使用した。カラムは、Mightysil RP-18 GP 250 $\times$ 4.6 mm (5  $\mu\text{m}$ ) を、ガードカラムは Mightysil RP-18 GP 5 $\times$ 4.6 mm (5  $\mu\text{m}$ ) (関東化学株式会社：東京) を使用した。カラム温度は  $40^{\circ}\text{C}$ 、検出波長は励起波長を 360 nm、蛍光波長を 485 nm とした。移動相の流速は 1.5 mL/min とし、80%アセトニトリル溶液と 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液を測定開始から 0-5.5 分までは 28:72 の割合で送液し、20 分までの間に 80:20 まで 80%アセトニトリル溶液の割合を増加させ、さらに 20 分以降からは 100:0 で送液し、23 分まで 100:0 を維持した。23-35 分は 28:72 の比で送液した。標準液は 322 nM の MeHis を用い、MeHis とヒスチジノールのそれぞれのピークの面積比から試料中の MeHis 濃度を算出した。クロマトグラムのデータ解析には、LabSolutions (島津製作所) を用いた。

### (3) 血漿中の MeHis の測定

血漿中の MeHis 濃度は、OPA 誘導体を逆相系カラムで分離する方法で測定した。

試薬として以下のものを用いた。なお、試薬の調整は第2章 - 第2節 - と同様に行った。

- 20% (w/v) TCA
- ジエチルエーテル
- 濃塩酸
- 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH12.0)
- OPA 試薬
- 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)

(明記していないものは、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

血漿 100  $\mu\text{L}$  に氷冷した 20% TCA 100  $\mu\text{L}$  を加えて混合し、4 $^{\circ}\text{C}$  で 1 晩放置した。翌日、8,000  $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心分離し、上清 100  $\mu\text{L}$  をフタ付き試験管 (16 $\times$ 100 m/m) にとり、純水 0.4 mL を加えた。さらに、ジエチルエーテル 2 mL を加え、攪拌機 (RECIPRO SHAKER SR-1N、タイテック株式会社) で 3 分間振とうし、1,300  $\times g$  で 1 分間遠心分離し、ジエチルエーテル層と水層に分離させ、ジエチルエーテル層を、パスツールピペットを用いて除去した。このジエチルエーテルを用いた TCA 抽出を計 3 回行い、最終的に残存した微量のジエチルエーテルを湯煎にかけて気化させ、五酸化ニリン (和光一級、和光純薬株式会社) が入ったデシケータ内で 1 晩減圧乾燥させた。血液中の MeHis の一部は *N*-アセチル-3-メチルヒスチジンとなっているため[64]、乾燥させた試料に純水 100  $\mu\text{L}$  と濃塩酸 100  $\mu\text{L}$  を加え、110 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間加水分解し、脱アセチル化した。最後に試料を五酸化ニリンと水酸化ナトリウムが入ったデシケータ内で減圧乾燥させた。この試料を純水 100  $\mu\text{L}$  で溶解し、その溶液 50  $\mu\text{L}$  に OPA 試薬 25  $\mu\text{L}$  を加え、HPLC に 5  $\mu\text{L}$  注入した。標準液、ポンプ、カラムは第2章 - 第2節 - と同じものを用い、同様の条件で行った。

### 3. Western blotting を用いたタンパク質の検出

オートファジーの活性指標である LC3-II やユビキチン化タンパク質、Ser/ Thr kinase の total 及びリン酸化フォームを western blotting で検出した。

#### (1) SDS-PAGE 用試料の調製

試薬は下記を用いた。

- PMSF1000 倍濃縮液

- ホモジナイズ用保存液

…*O,O'*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA、東京化成工業株式会社) 0.761 g、HEPES (同仁化学研究所株式会社) 4.76 g、フッ化ナトリウム 2.1 g、塩化カリウム 7.46 g、EDTA 0.074 g、β-グリセロリン酸ナトリウム n 水和物 10.8 g に純水を約 900 mL 加えて溶解し、pH を 7.4 に調整後、全量を 1000 mL にし、4°C で保存した。

- ホモジナイズ用緩衝液

…ホモジナイズ用保存液 50 mL あたり、PMSF 溶液 50 μL、ベンズアミジン塩酸塩 n 水和物 7.5 mg、*o*-バナジン酸ナトリウム 4.6 mg、ジチオスレイトール 7.7 mg を加えて溶解し、ホモジナイズ緩衝液とした。

- Laemmli buffer 2 倍濃縮液

…Tris 0.7625 g、SDS 2.0 g を 20 mL 程度の純水に溶解し、pH を 6.8 に調整した。それにグリセロール 20 mL を加え、純水で 49 mL にフィルアップした。その後、2-メルカプトエタノール 1 mL を加え、少量のプロモフェノールブルーを加えてよく攪拌した。

(明記していないものは、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

腓腹筋約 100 mg に、その 7 倍量の氷冷したホモジナイズ緩衝液を加え、氷冷しながらポリロンホモジナイザー (Kinematica GmbH Steinhofhalde : Switzerland) でホモジナイズした。このホモジネート溶液を 8,000×g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清 100 μL に Laemmli

buffer 2 倍濃縮液を 100  $\mu$ L 加え、混和後、ブロックヒーター (HDB-1N、アズワン) 中で 95°C、5 分間加熱し、SDS-PAGE サンプルとした。ホモジネートの遠心分離上清 200  $\mu$ L をブロックヒーターで 95°C、10 分間加熱し、放冷後、8,000 $\times$ g、4°C で 30 分間遠心分離した。この上清 100  $\mu$ L に Laemmli buffer 2 倍濃縮液 100  $\mu$ L を加え、混和後にブロックヒーターで 95°C、5 分間加熱し、4E-BP1 検出用の SDS-PAGE サンプルとした。

## (2) SDS-PAGE

LC3, S6K1, 4E-BP1, Akt, AMPK, eIF2 $\alpha$  を検出する場合には、第2章 - 第2節 - と同様の方法で行った。ユビキチン化タンパク質を検出する場合には 10% ポリアクリルアミドゲルを用い、第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同様の方法で行った。

## (3) タンク式 western blotting

4E-BP1 及びユビキチン化タンパク質を検出する場合には、タンク式ウェスタンブロットティングを用いた。4E-BP1 を検出する場合には第2章 - 第2節 - と同様の方法で行い、ユビキチン化タンパク質を検出する場合には転写時間を 3 時間とした上で第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同様の方法で行った。試薬として第2章 - 第2節 - 4 - (4) で用いたものに加え、下記の試薬を用いた。

### ・抗ユビキチン抗体溶液

…抗ユビキチンポリクローナル抗体 (Stressgen) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈した。

## (4) セミドライ式 western blotting

4E-BP1 とユビキチン化タンパク質以外を検出する場合にはセミドライ式ウェスタンブロットティングを用いた。方法は第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同様に行った。試薬として第2章 - 第2節 - 4 - (4) で用いたものに加え、下記の試薬を用いた。

- ・抗 phospho-eukaryotic translation initiation factor 2a (eIF2 $\alpha$ ) 抗体溶液
- …抗 phospho-eIF2 $\alpha$  抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈した。

#### (5) 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

### 4. Northern blotting を用いた mRNA の検出

筋特異的 ubiquitin-ligase E3 である atrogen-1 と MuRF1 の mRNA を Northern blotting を用いて検出した。RNase による RNA の分解を避けるために、用いた純水とチップはすべて 121°C、20 分間のオートクレーブ処理によって加圧滅菌したものを用いた。

#### (1) 骨格筋組織中からの total RNA の抽出

第2章 - 第2節 - と同様の試薬を用いた。腓腹筋約 100 mg に Sol D を 2 mL 加え、腓腹筋が凍結したままの状態を氷冷しながらホモジナイズし、2つの 2 mL 容プラスチックチューブにそれぞれ 800  $\mu$ L ずつ移した。次に、それぞれのチューブに 2 M 酢酸ナトリウム (pH4.0) 80  $\mu$ L、水飽和フェノール 800  $\mu$ L、クロロホルム：イソアミルアルコール混合液 (49 : 1) 160  $\mu$ L を加え、よく攪拌した後、4°C で 15 分間静置した。4°C、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、RNA が溶解している上層約 800  $\mu$ L を新しい 2 mL 容チューブに回収した。上層と等量の 2-プロパノールを加え、混合した後、-20°C で 1 晩静置した。次に、4°C、8,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、沈殿を得た。Sol D 300  $\mu$ L を 1 つ目のチューブに加えて沈殿を溶解し、この溶液を 2 つ目のチューブに移して沈殿をさらに溶解し、1.5 mL 容プラスチックチューブに移した。以降の操作は第2章 - 第2節 - と同様に行った。

#### (2) RNA の定量

第2章 - 第2節 - 5 - (2) と同様に行った。

(3) Northern blotting

第2章 - 第2節 - 5 - (3) と同様に行った。

(4) ストリッピング

第2章 - 第2節 - 5 - (4) と同様に行った。

6. 血漿中インスリン濃度の測定

酵素免疫測定法によるラットインスリン測定キット(株式会社森永生化学研究所:神奈川)を用い、プロトコルに従って測定した。

7. 統計処理

第2章 - 第2節 - 6 と同様に行った。

## 第3節 結果

20%カゼイン食を与えた群を 20C、Lys 添加 20%カゼイン食を与えた群を 20CK、10%カゼイン食を与えた群を 10C、Lys 添加 10%カゼイン食を与えた群を 10CK として示した。

## 1. 筋原線維タンパク質分解速度

単離筋肉切片から KRB 緩衝液中への MeHis 放出量より算出した筋原線維タンパク質分解速度を Fig. 4-1 に示した。また、血漿中の MeHis 濃度を Fig. 4-2 に示した。

筋原線維タンパク質分解速度は、EDL 及びヒラメ筋のいずれにおいても、20C と比較して 10C で 60%程度の高値を示した。20CK は 20C との差はなかったが、10CK は 10C と比較し、EDL では 40%程度の低値を、ヒラメ筋では 20%程度の減少傾向を示した。

血漿中 MeHis 濃度も筋原線維タンパク質分解速度と同様に、20C と比較して 10C で 30%程度の高値を示した。また、20CK は 20C との差はなかったが、10CK は 10C と比較し、20%程度の減少傾向が見られた。

以上の結果から、第 1 に 20%カゼイン食と比較して、10%カゼイン食の摂取は絶食によって亢進した筋原線維タンパク質分解を十分に抑えることはできないことが示唆された。第 2 に、20%カゼイン食に Lys を添加しても筋原線維タンパク質分解速度は抑制されないが、10%カゼイン食に Lys を添加することによって、20%カゼイン食と同程度に筋原線維タンパク質分解を抑制できる可能性が示された。

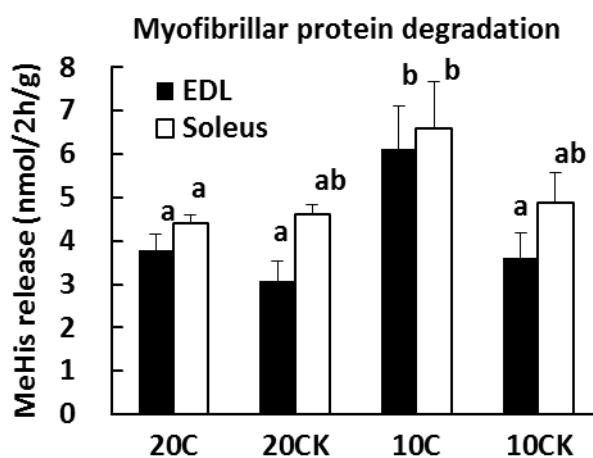


Fig. 4-1 筋原線維タンパク質分解速度

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

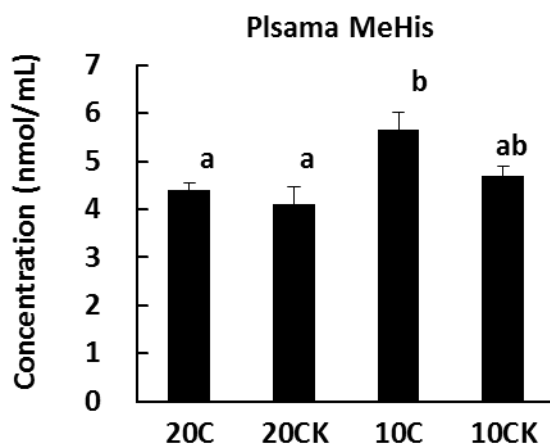


Fig. 4-2 血漿中 MeHis 濃度

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 2. オートファジーの活性

LC3-IIの量から評価したオートファジーの活性を Fig. 4-3 に示した。20C と比較して 10C で 50%程度の高値を示した。オートファジーの活性は、20CK は 20C との差はなかったが、10CK は 10C と比較し、40%程度の減少傾向を示した。

この結果から、筋原線維タンパク質分解速度と同様に、20%カゼイン食と比較して、10%カゼイン食の摂取は絶食によって亢進したオートファジーを十分に抑えることはできず、併せて、20%カゼイン食に Lys を添加してもオートファジーは抑制されないが、10%カゼイン食に Lys を添加することによって、20%カゼイン食と同程度にオートファジーを抑制できる可能性が示された。

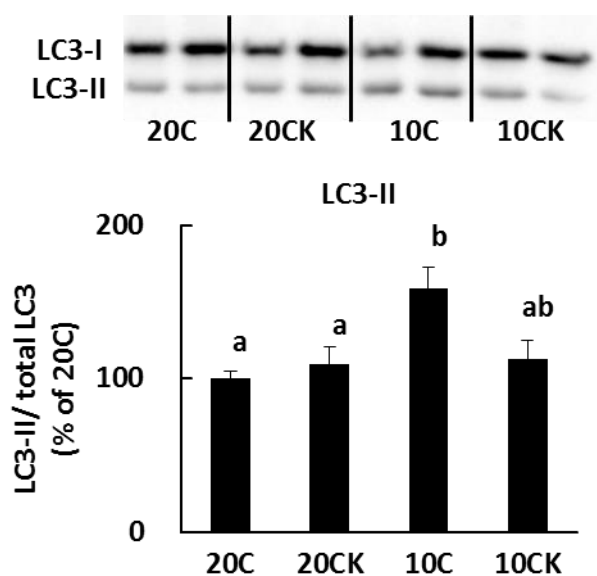


Fig. 4-3 LC3-II 量から評価したオートファジー活性

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 3. UPS の活性

ユビキチン化タンパク質量は 20C と比較して 10C で有意な増加が認められた (Fig. 4-4)。一方、ユビキチン化タンパク質と筋特異的ユビキチンリガーゼのいずれにおいても Lys による抑制効果は認められなかった (Fig. 4-5)。

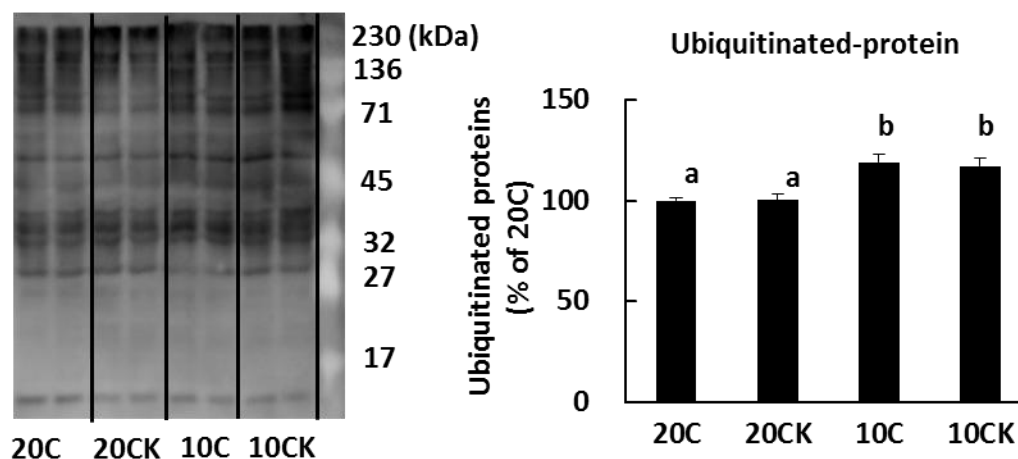


Fig. 4-4 ユビキチン化タンパク質

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

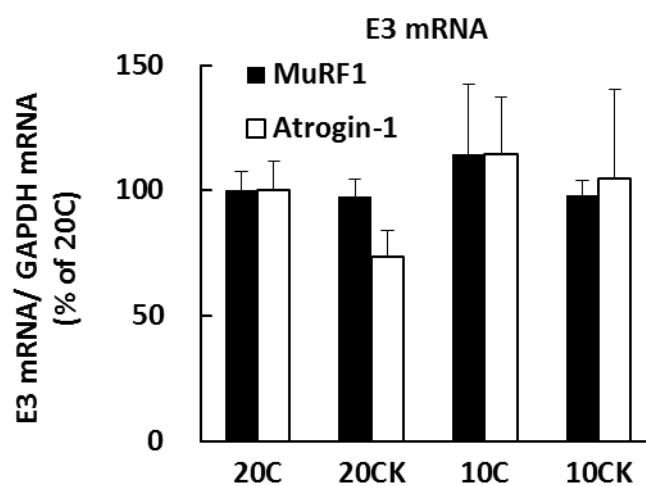


Fig. 4-5 筋特異的ユビキチンリガーゼの mRNA 量

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 4. タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性

タンパク質代謝の制御に働く Ser/ Thr kinase のリン酸化率を Fig.4-6 に示した。なお、Aには代表的なプロットを、Bには Akt、Cには 4E-BP1、Dには S6K1、Eには eIF2 $\alpha$  のリン酸化率をそれぞれ示した。

Akt のリン酸化率は Ser、Thr とともに 20C と比較して 10C で変化は認められなかったが、10C と比較し、10CK で Thr の 40%程度のリン酸化の上昇が認められ、Ser のリン酸化にも似た挙動が見られた。20C と 20CK の間に差は認められなかった (Fig. 4-6B)。4E-BP1 のリン酸化率は 20C と比較して 10C で 20%程度の低値を示したが、10C と比較して 10CK では有意なリン酸化の増加が認められた。20C と 20CK の間に差は認められなかった (Fig. 4-6C)。S6K1 のリン酸化率は 4 群間で有意差はなかった。しかし、10C と比較して 10CK ではリン酸化率の増加傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs 10C) が見られた (Fig. 4-6D)。eIF2 $\alpha$  のリン酸化率は 4 群間で有意差はなかったが、20C と比較して 20CK ではリン酸化率の減少傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.03$  vs 20C) が見られた (Fig. 4-6E)。

以上の結果から、20%カゼイン食と比較して、10%カゼイン食の摂取による mTOR 経路の活性化作用は弱い一方で、Akt や eIF2 $\alpha$  の活性に差はないことが示唆された。また、20%カゼイン食に Lys を添加しても Akt や mTOR 経路に活性に影響しないが、10%カゼイン食に Lys を添加することで Akt 及び mTOR 経路の活性化が促進されると考えられた。

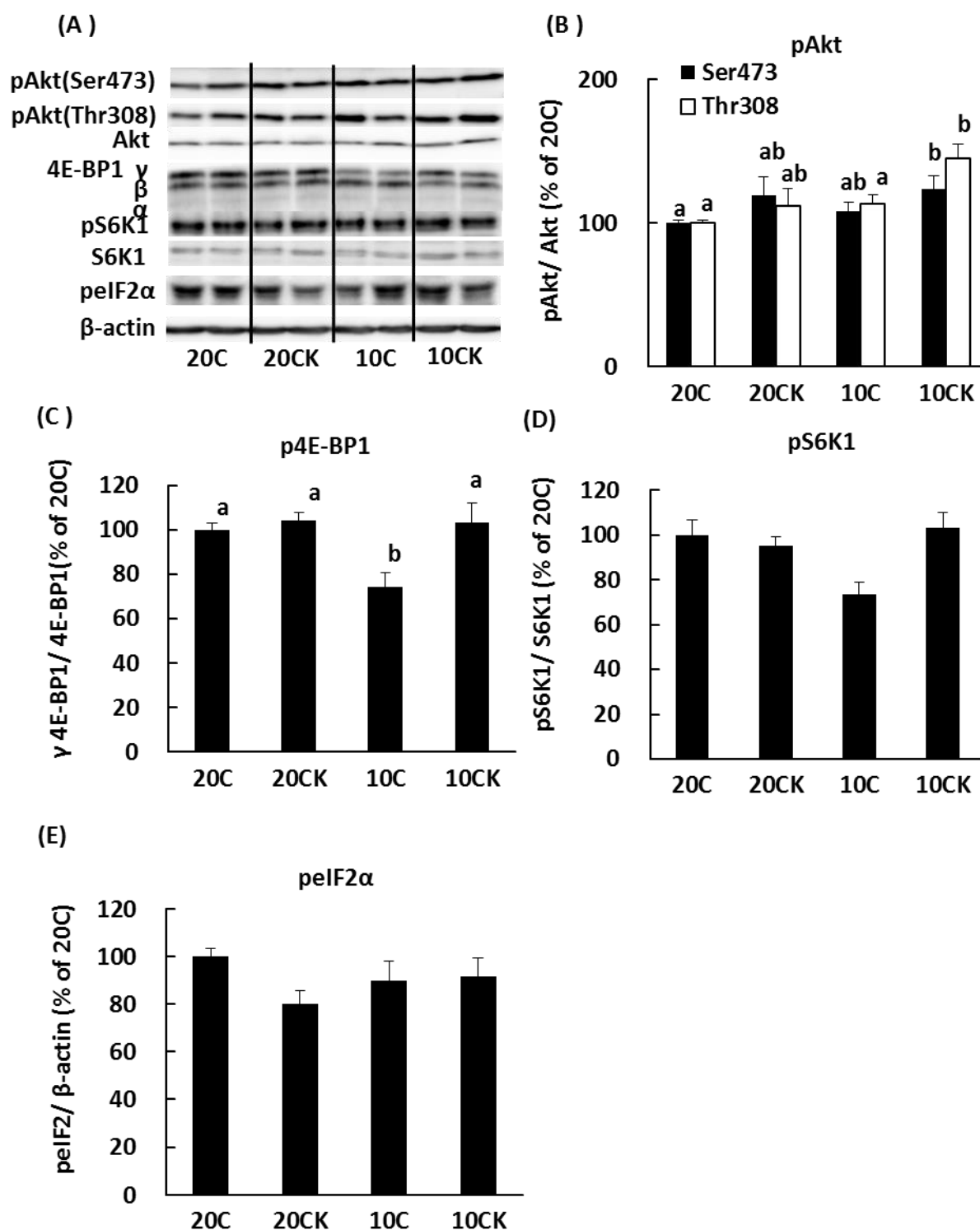


Fig. 4-6 タンパク質代謝の制御に働く Ser/ Thr kinase のリン酸化率  
 値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 5. 血漿中インスリン濃度

血漿中のインスリン濃度を Fig. 4-7 に示した。血漿中のインスリン濃度は4群間で差はなかった。

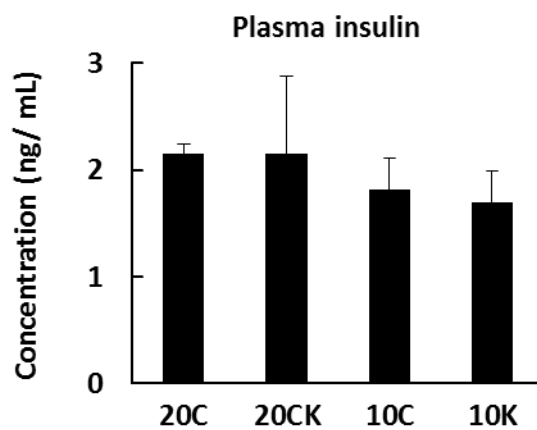


Fig. 4-7 血漿中インスリン濃度

値は平均±標準誤差 (n=5)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 第4節 考察

本実験では、十分なタンパク質量を摂取できる食餌として 20%カゼイン食を、食餌タンパク質が不足する食餌として 10%カゼイン食を用い、それぞれの食餌に Lys を添加した場合の効果を検討した。筋原線維タンパク質の分解速度は 20%カゼイン食を摂取した群と比較して 10%カゼイン食を摂取した群で有意に高く、血漿中の MeHis 濃度も同様の結果であった (Figs. 4-1,4-2)。また、オートファジーの活性指標である LC3-II や、ユビキチン化タンパク質の量も 20%カゼイン食を摂取した群と比較して 10%カゼイン食を摂取した群で有意に高かった (Figs. 4-3, 4-4)。したがって、10%カゼイン食の摂取は絶食によって亢進した筋原線維タンパク質分解を抑えるには不十分であり、10%カゼイン食摂取時の骨格筋におけるオートファジー及び UPS の活性は 20%カゼイン食の摂取時に比べて高いと考えられた。20%カゼイン食に Lys を添加しても筋原線維タンパク質分解速度に変化はなかったが、10%カゼイン食に Lys を添加した場合、筋原線維タンパク質分解速度とオートファジー活性の抑制効果が認められた (Figs. 4-1,4-2,4-3)。したがって、Lys は食餌タンパク質量が充足した条件では骨格筋タンパク質分解抑制作用を示さないが、食餌タンパク質量が不足し、骨格筋タンパク質分解が亢進しているような条件においてはオートファジーの阻害を介して筋原線維タンパク質分解を抑制すると考えられた。

同様の結果は、タンパク質分解システムの活性制御に働く Ser/ Thr kinase の活性にも認められた。mTOR の下流に位置する 4E-BP1 の活性は 20%カゼイン食を摂取した群と比較して 10%カゼイン食を摂取した群で有意に低値を示し、S6K1 においても似た挙動が確認された (Fig. 4-6C、D)。20%カゼイン食に Lys を添加した場合には 4E-BP1 や S6K1 の活性に変化はなかったが、10%カゼイン食に Lys を添加した場合には 4E-BP1 と S6K1 の活性は増加した (Fig. 4-6C、D)。また、mTOR の上流に位置する Akt の活性は 20%カゼイン食を摂取したラットの骨格筋と 10%カゼイン食を摂取したラットの骨格筋との間に差はなかったが、10%カゼイン食に Lys を添加した食餌を摂取したラットの骨格筋では添加しない群 (10C) と比較して有意に Akt

活性が高かった (Fig. 4-6B)。したがって、オートファジーの制御に働く Ser/ Thr kinase の活性が、10%カゼイン食への Lys の添加によって上昇し、オートファジーを介した筋原線維タンパク質分解が抑えられたと考えられる。10%カゼイン食に Lys を添加したことで Akt の活性が上昇した理由としては、Lys 以外の食餌アミノ酸が少ないことが要因の1つに数えられる。例えば、血漿中の分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid : BCAA) 濃度の増大がインスリン抵抗性を招くという説が提唱されている[65]。BCAA とは Leu、valine、isoleucine のことである。本実験においては血漿中インスリン濃度 (Fig. 4-7) や、20C と 10C 間での Akt 活性に差がなかったため (Fig. 4-6B)、20%カゼイン食摂取時と比較して 10%カゼイン食の摂取でインスリン感受性に改善が生じていたかは不明であるが、10%カゼイン食では BCAA をはじめ、Lys 以外のアミノ酸が少なかったことでインスリンシグナルの感受性が改善しており、Lys による Akt 活性促進が生じた可能性は否定できない。

アミノ酸欠乏を含めたストレス条件下においては GCN2 を介した eIF2 $\alpha$  のリン酸化によって、タンパク質合成は負に制御される[66]。本実験においても、20%カゼイン食と比較して、10%カゼイン食の摂取時には eIF2 $\alpha$  のリン酸化亢進によるタンパク質合成の不活化が生じている可能性が考えられたが、eIF2 $\alpha$  のリン酸化量は 20C と 10C 間で差はなかった (Fig. 4-6E)。したがって、本実験条件においては、eIF2 $\alpha$  を介した翻訳段階の制御は Lys による作用に関与しないと考えられる。

本実験より、Lys による骨格筋タンパク質分解抑制作用は、食餌タンパク質が充足した状態においては発揮できず、低タンパク質食に添加することで発揮される可能性が示された。入院時の高齢者は低タンパク質状態に陥ることが知られており[67]、食事タンパク質が不足した状態が続くと、サルコペニアの進展に繋がる[5,68]。したがって、食餌タンパク質が不足する場合に効果的に骨格筋タンパク質分解を抑制する Lys は、サルコペニアを緩和する上で有効であると考えられる。また、第2章及び第3章において、Lys やその代謝産物は、飢餓・低栄養の培養条件において、主に Akt の活性を介してオートファジーによる筋原線維タンパク質分解を抑制することを示唆した。ラットを用いた本実験においても、Lys による Akt の活性上

昇とオートファジーの抑制効果は認められ、*in vitro* で示唆された機構が *in vivo* においても機能していると推察された。



## 第 5 章 老化促進モデルマウスにおける L-リジンの抗サルコペニア効果 [69]

## 第 1 節 目的

第 4 章において、低タンパク質食への Lys の添加はオートファジーの阻害を介した筋原線維タンパク質分解抑制に働くことを示唆した。しかし、加齢に伴って全身の代謝は変化することが知られており[14,15,70,71]、若齢や成熟時に認められた Lys の効果が加齢時に再現できるとは限らない。そのため、Lys の摂取がサルコペニアの緩和に有効であるかを確認するためには、老化モデルを用いた検討が必須である。老化促進モデルマウスである Senescence Accelerated Mouse Prone (SAMP) は、AKR/J 系統から派生した促進老化・短寿命を示すマウス系統であり、老化研究において用いられている[72]。そこで本研究では、SAMP 系統のうち、サルコペニアを発症する可能性が示されている老化促進モデル SAMP8[36]を用い、Lys の摂取による抗サルコペニア効果を検討することを目的として実験を行った。

## 第 2 節 方法

## 1. 動物実験

実験動物として、いずれも 15 週齢で雄性の SAMP8 (27~35g、日本エスエルシー株式会社) と Senescence Accelerated Mouse Resistant 1 (SAMR1、31~35g、日本エスエルシー株式会社) を用いた。SAMR1 は、老化促進モデルである SAMP8 の対照区として利用される正常老化マウスである。なお、SAMP8 と SAMR1 の購入に際して、日本エスエルシーを通じて SAM マウス利用に関する同意書を SAM 研究協議会に提出した。15 週齢から 28 週齢までの間、SAMP8 と SAMR1 はいずれも 6 頭ずつプラスチックケージ (KY ケージ-2、227×340×148mm、日本クレア株式会社) に入れ、室温 22±1℃、湿度 50±10%、明期を午前 6 時から午後 6 時までとする 12 時間明暗サイクルで飼育した。水は水道水を自由飲水させ、固形飼料 (マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料 CE-2、日本クレア株式会社) を自由摂食させた。28 週齢に到達した時点ですべての動物をステンレスケージに移し、SAMP8 を体重が等しくなる

ように4群に分け、SAMP8の各群とSAMR1に対してTable 5-1に示した実験飼料のいずれかを36週齢までの2か月間供与した。実験飼料を供与した2か月間、2週間に1度高感度体組成計であるEchoMRI（日立アロカメディカル：東京）を用いて無麻酔のまま除脂肪体重と体脂肪量を測定した。なお、30週齢以降、SAMR1の摂食量をSAMP8に合わせた。

Table 5-1 実験飼料の組成

Component	g / kg diet				
	R	P	LK	K	L
カゼイン <sup>a</sup>	140	140	140	140	140
シスチン <sup>b</sup>	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
重酒石酸コリン <sup>c</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ビタミン混合 <sup>a</sup>	10	10	10	10	10
ミネラル混合 <sup>a</sup>	35	35	35	35	35
セルロース <sup>a</sup>	50	50	50	50	50
大豆油 <sup>c</sup>	40	40	40	40	40
ショ糖 <sup>c</sup>	100	100	100	100	100
コーンスターチ <sup>a</sup>	620.7	620.7	605.7	590.7	590.7
L-lysine-HCl <sup>b</sup>	0	0	15	30	0
L-leucine <sup>b</sup>	0	0	0	0	30
Total	1000	1000	1000	1000	1000

a：オリエンタル酵母工業株式会社：東京

b：和光純薬株式会社

c：味の素株式会社

36週齢に到達して3日目の22:00より12時間絶食し、その後各実験飼料を1時間与えた。1時間の摂食終了後、3時間絶食させた後にジエチルエーテル麻酔下で開腹後、下大静脈から採血した後に屠殺した。屠殺後、速やかにEDLとヒラメ筋を単離し、直ちにKRB緩衝液(pH7.4)1 mL中に浸し、筋原線維タンパク質分解速度の測定のため第4章 - 第2節 - 1と同様にインキュベートした。血液はヘパリン処理した1.5 mL容遠心チューブにいれ、3,000×g、4°Cで10分間遠心分離し、血漿を分離した。また、腓腹筋と前脛骨筋、肝臓、腎臓、精巣周囲脂肪、

腸間膜脂肪を摘出し、重量測定の後、腓腹筋と肝臓、腎臓は液体窒素で直ちに凍結した。血漿、骨格筋及び肝臓は、分析するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定法

第4章 - 第2節 - 2と同様に行った。

## 3. 血漿中アミノ酸濃度の測定法

血漿中のアミノ酸濃度を測定するため、全自動アミノ酸分析装置を用いて血漿中のアミノ酸濃度を求めた。試薬として以下のものを用いた。

・3%(v/v)スルホサリチル酸

…5-スルホサリチル酸二水和物（生化学用、和光純薬工業株式会社）300 mgを純水に溶解し全量を10 mLにした。

血漿100  $\mu\text{L}$ に氷冷した3%スルホサリチル酸を100  $\mu\text{L}$ 加え、ボルテックスミキサーで攪拌してから、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩放置した。 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $18,000\times g$ で15分間遠心分離し、上清を0.45  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター（アドバンテック株式会社）で濾過した。この試料を、JLC-500/V全自動アミノ酸分析機（日本電子株式会社：東京）により分析した。標準液は、アミノ酸混合標準液AN-II型及び、B型（和光純薬工業株式会社）に2.39 mMアスパラギン水溶液（和光純薬工業株式会社）、2.44 mMグルタミン水溶液（和光純薬工業株式会社）、2.42 mMトリプトファン（半井工業株式会社：京都）をそれぞれ1 mLずつ25 mL容メスフラスコにとり、試料緩衝液を用いてフィルアップした。

## 4. Western blotting を用いたタンパク質の検出

オートファジーの活性指標であるLC3-IIやユビキチン化タンパク質、タンパク質代謝の制

御に働く Ser/ Thr kinase のリン酸化フォームを western blotting で検出した。

(1) SDS-PAGE 用試料の調製

第4章 - 第2節 - 3 - (1) と同様に行った。

(2) SDS-PAGE

第4章 - 第2節 - 3 - (2) と同様に行った。

(3) タンク式 western blotting

4E-BP1、ユビキチン化タンパク質、mTOR 及び pmTOR を検出する場合には、タンク式 western blotting を用いた。4E-BP1 を検出する場合には第2章 - 第2節 - 3 - (3) と同様の方法で行い、それ以外を検出する場合には転写時間を3時間とした上で第2章 - 第2節 - 3 - (3) と同様の方法で行った。

(4) セミドライ式 western blotting

4E-BP1、ユビキチン化タンパク質、mTOR 及び pmTOR 以外を検出場合には、セミドライ式 western blotting を用い、第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同様に行った。

(5) 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。なお、下記の一次抗体と対応する二次抗体（抗体名右の括弧内に示した）をそれぞれ用いた。K48 結合型ポリユビキチンを検出する場合、二次抗体は使用しなかった。

- ・抗 LC3 抗体溶液 (rabbit)
- ・抗 4E-BP1 抗体溶液 (rabbit)

- ・抗 S6K1 抗体溶液 (rabbit)

- ・抗 phospho-S6K1 抗体溶液 (mouse)

- ・抗 AMPK 抗体溶液 (mouse)

- ・抗 phospho-AMPK 抗体溶液 (mouse)

- ・抗 mTOR 抗体溶液 (rabbit)

…抗 mTOR 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 phospho-mTOR 抗体溶液 (rabbit)

…抗 phospho-mTOR 抗体 (Ser2448、Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 beclin-1 抗体溶液 (rabbit)

…抗 beclin-1 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 p62 抗体溶液 (rabbit)

…抗 p62 抗体 (Cell signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 GAPDH 抗体溶液 (rabbit)

…抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗ユビキチン抗体溶液 (rabbit)

…抗ユビキチン抗体 (Enzo life science : USA) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 K48 結合型ポリユビキチン抗体溶液 (HRP-conjugated のため、二次抗体の使用なし)

…抗 K48 結合型ポリユビキチン抗体 (HRP-conjugated、Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

## 5. Quantitative reverse transcriptional PCR (qRT-PCR)を用いた mRNA の定量

筋特異的 ubiquitin-ligase E3 及び、ミトファジーを制御する Mul1、ミトコンドリア新生等に制御に働く PGC-1 $\alpha$  の mRNA 量は、qRT-PCR を用いて定量した。

## (1) 骨格筋組織中からの total RNA の抽出

第4章 - 第2節 - 5 - (1) と同様に行った。

## (2) RNA の定量

第4章 - 第2節 - 5 - (2) と同様に行った。

## (3) 逆転写反応

逆転写反応は PrimeScript RT Master Mix (TAKARA BIO : 滋賀)を用い、推奨されたプロトコルに従って行った。第5章 - 第2節 - 5 - (1) で抽出した total RNA を用いた。

氷上で total RNA が 500 ng となるように PCR 反应用マイクロチューブに分注し、Table 5-2 に示す容量で試薬を分注し、ピペッティングで混合した。

Table 5-2 逆転写反応溶液の組成

試薬	容量( $\mu$ L)
5 $\times$ Prime Script RT Master Mix	2
Total RNA	x
Rnase free dH <sub>2</sub> O	10-(2+x)

37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベーションして逆転写させた後、95 $^{\circ}$ Cのブロックヒーターで5秒間処理して酵素を失活させた。反応終了後、サンプルを純水で10倍に希釈してqRT-PCR用cDNAサンプルとして-20 $^{\circ}$ Cで使用時まで保存した。

## (4) qRT-PCR

Thermal Cycler Dice Real Time System Single TP-850 (TAKARA BIO) を用いた。インターカレート剤として、SYBR Premix Ex Taq (TAKARA BIO) を用い、推奨されたプロトコルに従って行った。

操作はすべて氷上で行い、Table 5-3 のように予め調製したプライマーと RNase free dH<sub>2</sub>O を混合し、マスターミックスを調製した。

Table 5-3 qRT-PCR 用マスターミックスの組成

試薬	容量(μL)
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
RNase free dH <sub>2</sub> O	9.5

その後、8 連チューブに cDNA サンプルを 2 μL ずつ分注し、調製済みのマスターミックスを 10.5 μL ずつ分注した。最後に、SYBR Premix Ex Taq を 12.5 μL 加えてピペッティングで混合し、軽く遠心して反応液をチューブの底に集めた上で Thermal Cycler にセットし、Table 5-4 に示した条件の下、PCR 反応を行った。

Table 5-4 Thermal profile

Pattern	Cycle	Temperature (°C)	Hold time (sec)	Data collection
Hold	1	95	30	
2-step PCR	40	95	5	
		60	30	✓
		95	15	
Dissociation	1	60	30	
		95	15	✓

なお、cDNA の代わりに RNase free dH<sub>2</sub>O を用いたものを盲検とし、スタンダードには逆転写反応後に希釈していない cDNA を 2~128 倍に希釈して検量線を作成し、融解曲線が単一のピークとなるように条件を設定した。解析には、Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Software ver. 5.11B for TP-850、TAKARA BIO) を用い、Ct 値の算出には 2nd Derivative Maximum 法を用いた。Table 5-5 に示したプライマーを用い、GAPDH を housekeeping gene として atrogen-1、MuRF1、Mull1、myostatin、PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量を定量した。なお、atrogen-1 と MuRF1 用のプライマーの配列は徳島大学医学部二川健教授よりご教示いただいた。他のプライマーは、Primer3Plus (Software ver. 2.4.0、Whitehead Institute for Biomedical Research : USA) を用いて設計し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG : 京都) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) で相同性を確認した。

Table 5-5 qRT-PCR 用プライマーの配列

Primer		Sequence
mouse Atrogen-1	Forward	5'-GGCGGACGGCTGGAA-3'
	Reverse	5'-CAGATTCTCCTTACTGTATACCTCCTTGT-3'
mouse MuRF1	Forward	5'-ACGAGAAGAAGAGCGAGCTG-3'
	Reverse	5'-CTTGGCACTTGAGAGGAAGG-3'
mouse Mull1	Forward	5'-GATCGGTGAACTGGTCCTGG-3'
	Reverse	5'-TTCCAGAGCCGGACACTAGA-3'
mouse Myostatin	Forward	5'-TGGCCATGATCTTGCTGTAA-3'
	Reverse	5'-CCAAAGGCTTCAAATCGAC-3'
mouse PGC-1 $\alpha$	Forward	5'-CGGAAATCATATCCAACCAG-3'
	Reverse	5'-TGAGAACCGCTAGCAAGTTTG-3'
mouse GAPDH	Forward	5'-GAACGGATTTGGCCGTATTG-3'
	Reverse	5'-AATGAAGGGGTCGTTGATGG-3'

## 6. 統計処理

第2章 - 第2節-6と同様に行った。



## 第3節 結果

結果は、SAMR1をR、コントロール食を与えたSAMP8をP、1.5% Lys添加食を与えたSAMP8をLK、3.0% Lys添加食を与えたSAMP8をK、3.0% Leu添加食を与えたSAMP8をLとして示した。

## 1. 体重と摂食量の推移

28週齢から36週齢までの体重をFig. 5-1に、摂食量の推移をFig. 5-2にそれぞれ示した。体重は一貫してRがPと比較して有意に重かった。28週齢から29週齢の摂食量はRがPと比較して多く、全群で摂食量を合わせた30週齢以降は群間で差はなかった。

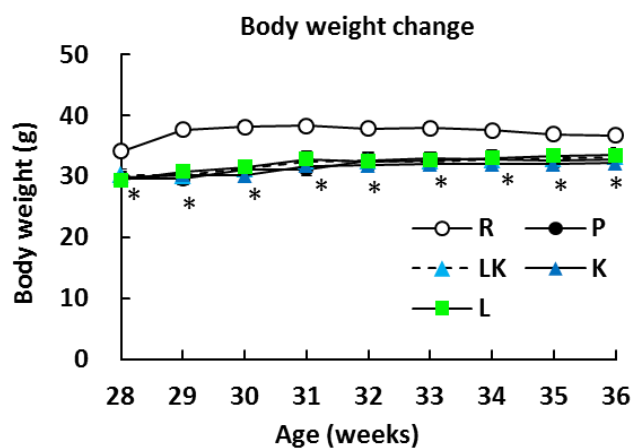


Fig. 5-1 飼育期間中の体重推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

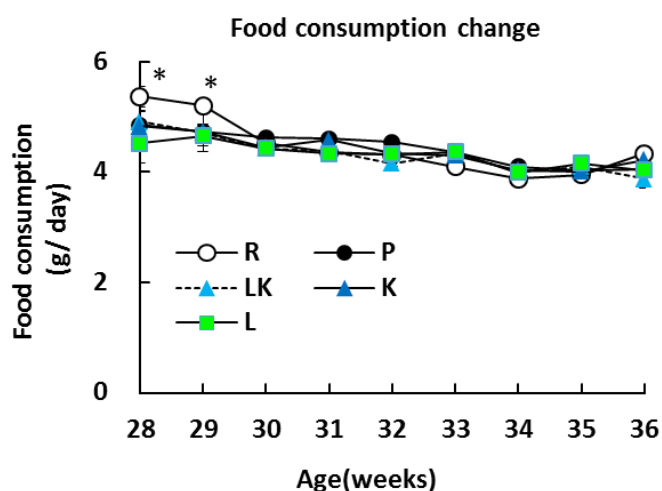


Fig. 5-2 飼育期間中の摂食量推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

2. 体組成の推移

28週齢から36週齢まで2週間に一度測定した除脂肪体重を Fig. 5-3 に、体脂肪率を Fig. 5-4 にそれぞれ示した。除脂肪体重は群分けから屠殺まで一貫してRがPより有意に重かった。一方、LK、K、Lは30週齢時においてRと有意な差はなかった。また、体脂肪率は群分けから屠殺まで一貫してRがPより有意に高かった。Kは、30週齢から36週齢までの間、Pより有意な低値を示し続けた。

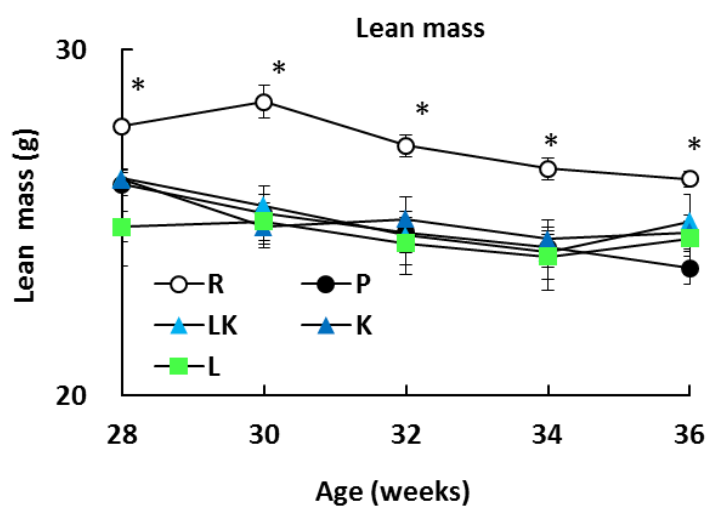


Fig. 5-3 飼育期間中の除脂肪体重の推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。\* : P との間に有意差 (p<0.05) あり。

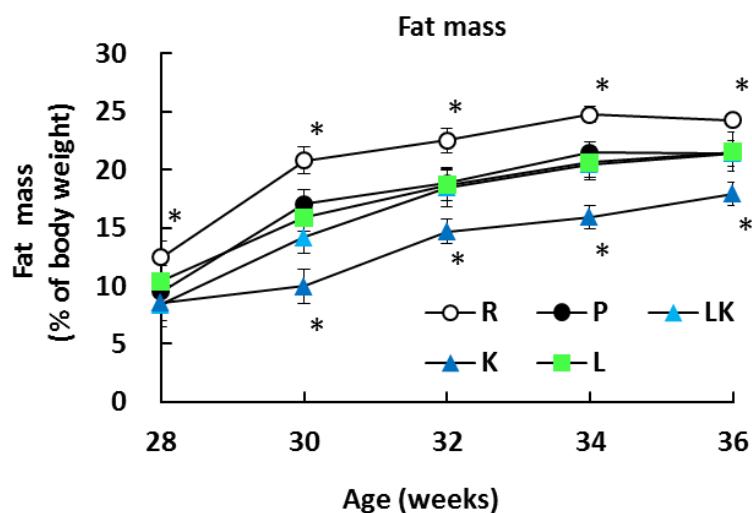


Fig. 5-3 飼育期間中の体脂肪率の推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。\* : P との間に有意差 (p<0.05) あり。

### 3. 解剖時体重と後肢筋重量

解剖時体重と後肢筋重量を Fig. 5-4 に示した。なお、A には体重を、B には EDL、C にはヒラメ筋、D には前脛骨筋、E には腓腹筋、F には足底筋の重量それぞれ示した。

解剖時体重は R と比較して、P、LK、K、L のいずれも 10%程度有意に軽く、P、LK、K、L の 4 群間で有意差はなかった (Fig. 5-4A)。EDL の重量は、R と比較して P で 20%程度有意に軽かったが、LK、K、L は R と比較して有意差はなかった (Fig. 5-4B)。ヒラメ筋の重量は、R と比較して P で 40%程度、LK で 30%程度有意に軽かったが、K 及び L は R と比較して有意差はなく、P と比較して 20%程度重い傾向があった (Fig. 5-4C)。前脛骨筋の重量は、R と比較して P で 15%程度有意に軽かったが、LK、K、L は R と比較して有意差はなく、P と比較してそれぞれ 6%、11%、12%重い傾向があった (Fig. 5-4D)。腓腹筋の重量は R と比較して P で 35%、LK で 20%、K で 25%、L で 20%程度いずれも有意に軽かったが、L では P より重い傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs P) が認められた (Fig. 5-4E)。足底筋の重量は R と比較して P、LK、K、L のいずれも有意に軽かった (Fig. 5-4F)。

以上の結果から、SAMR1 と比較して SAMP8 の骨格筋重量は明らかに低い、Lys を摂取することで EDL、ヒラメ筋、前脛骨筋における萎縮が緩和されると考えられた。

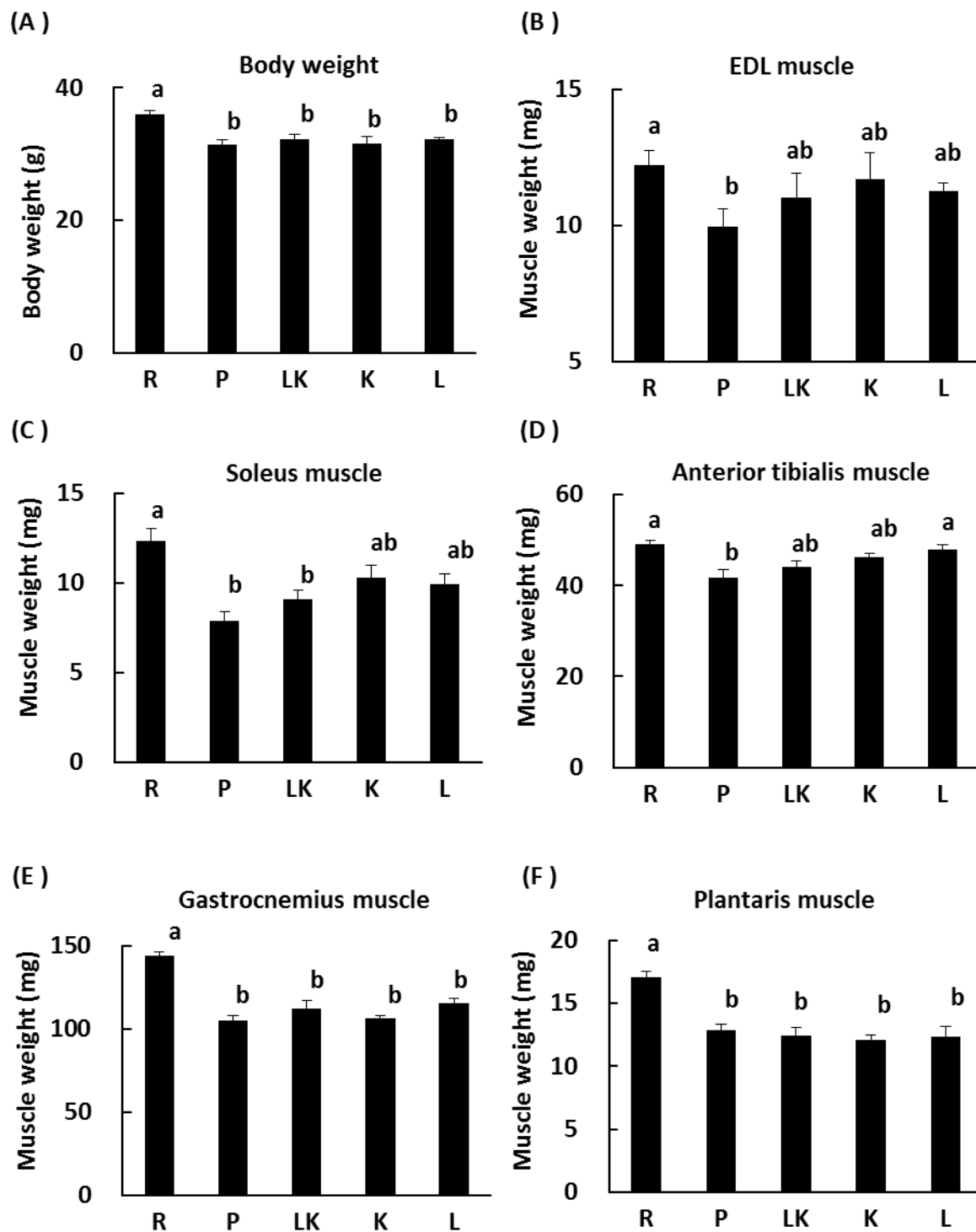


Fig. 5-4 解剖時体重及び筋重量

A : 体重、B : EDL 重量、C : ヒラメ筋重量、D : 前脛骨筋重量、E : 腓腹筋重量、F : 足底筋重量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 4. 臓器及び脂肪組織重量

解剖時に摘出した臓器及び脂肪組織の重量を Fig. 5-5 に示した。なお、A には肝臓の、B には腎臓の、C には精巣周囲脂肪の、D には腸間膜脂肪の重量をそれぞれ示した。

肝臓重量は群間で差はなかった (Fig. 5-5A)。腎臓重量は P と比較し、K で有意に重かった (Fig. 5-5B)。精巣周囲脂肪の重量は R と比較し、P、LK、K、L でそれぞれ有意に軽かった (Fig. 5-5C)。また、K は P と比較して軽い傾向があった (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs P)。体脂肪率は加齢依存的に増加していることから、Lys の摂取は SAMP8 における精巣周囲脂肪の蓄積を抑制する可能性が考えられた。腸間膜脂肪の重量は R と比較し、P、LK、K、L でそれぞれ有意に軽かった (Fig. 5-5D)。

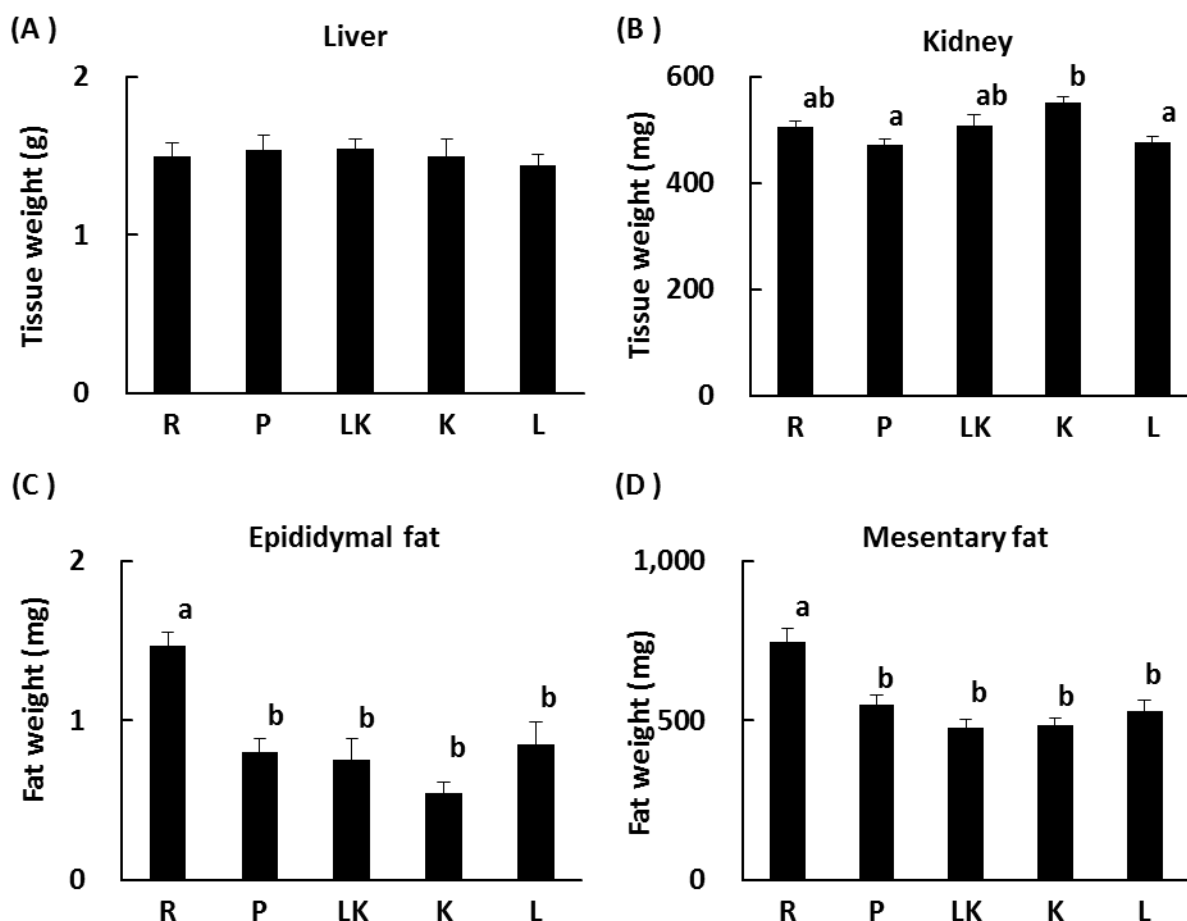


Fig. 5-5 解剖時臓器及び脂肪組織重量

A : 肝臓重量、B : 腎臓重量、C : 精巣周囲脂肪重量、D : 腸間膜脂肪重量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 5. 筋原線維タンパク質分解速度

単離筋肉切片から KRB 緩衝液中への MeHis 放出量より算出した筋原線維タンパク質分解速度を Fig. 5-6 に示した。

EDL の筋原線維タンパク質分解速度は R と比較して P で顕著な高値を示したが、P と比較して LK、K、L は顕著な低値を示した。LK、K、L は R との有意差がなかった。

ヒラメ筋の筋原線維タンパク質分解速度は R と比較して P で 60%程度の高値を示したが、P と比較して K 及び L は 50%程度の有意な低値を示した。LK、K、L は R との有意差がなかった。

以上の結果より、SAMP8 の EDL 及びヒラメ筋においては、SAMR1 と比較して、筋原線維タンパク質の分解が亢進しており、Lys や Leu の摂取は SAMP8 における筋原線維タンパク質分解の抑制に働くことが示唆された。

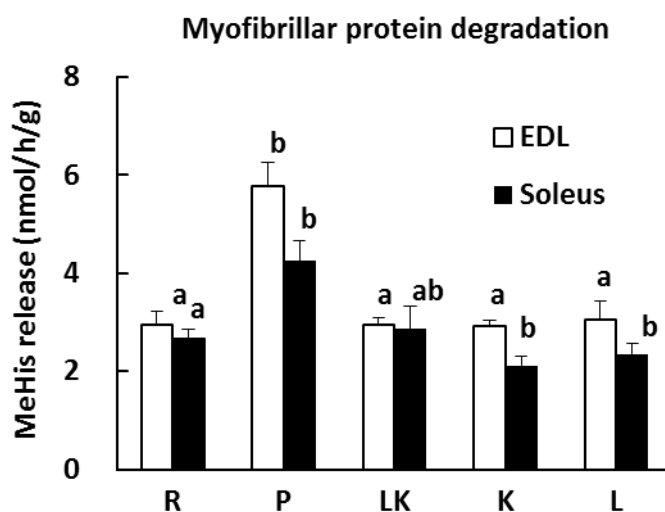


Fig. 5-6 単離筋肉切片における筋原線維タンパク質の分解速度

白：EDL、黒：ヒラメ筋

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 6. 血漿中アミノ酸濃度

濃度を測定した血漿中アミノ酸のうち、いずれかの群間で差が見られたものを抜粋して Fig. 5-7 に示した。A には Lys、B には Leu、C には Met、D には Gly の血漿中濃度を示した。

血漿中 Lys 濃度は R と P の間に差はなく、R、P、L と比較して LK 及び K は顕著な高値を示した。LK と K の間に有意差はなかったが、平均値として LK より K の方が高かった (Fig. 5-7A)。血漿中 Leu 濃度は R、P、LK、K 間で差はなかったが、L は R、P、LK、K と比較して顕著な高値を示した (Fig. 5-7B)。血漿中 Met 濃度は R と比較して P、LK、K で高値を示した。L は R、P、LK、K との間に有意差はなかった (Fig. 5-7C)。血漿中 Gly 濃度は R と比較して P、LK、K、L でそれぞれ 35% 程度有意に低値を示した (Fig. 5-7D)。Met が SAMP8 の血漿で増加し、Met 代謝においてメチル基の供与に参与する Gly が減少していたことから、SAMP8 においては Met 代謝が不全を生じている可能性が考えられた。

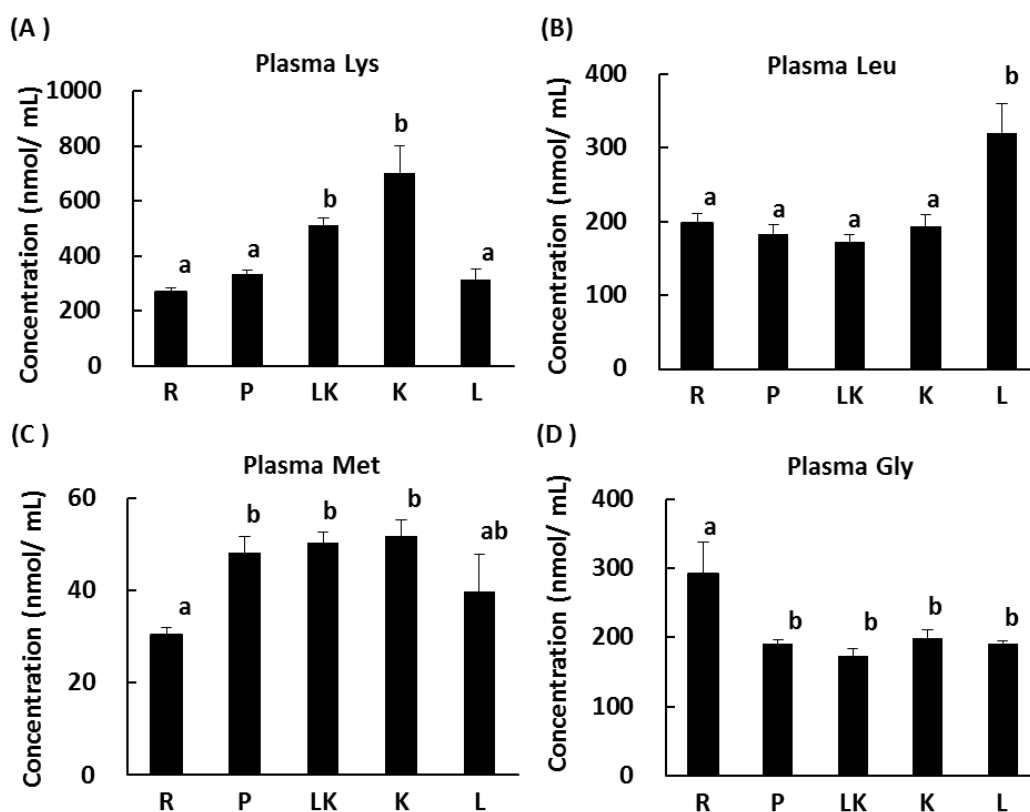


Fig. 5-7 群間で差が見られた血漿中アミノ酸濃度

A : 血漿中 Lys 濃度、B : 血漿中 Leu 濃度、C : 血漿中 Met 濃度、D : 血漿中 Gly 濃度

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 7. オートファジー活性

オートファジーの活性指標である LC3-II、beclin-1、p62 を Fig. 5-7 に示した。なお、A には代表的なバンドを、B には LC3-II を、C には beclin-1 を、D には p62 を示した。

LC3-II は R と比較して P で顕著な高値を示したが、P と比較して K は有意な低値を示した。LK、K、L は R と有意な差はなかった (Fig. 5-7B)。Beclin-1 は R と比較して P、LK、K でそれぞれ 35% 程度有意な高値を示した。R と比較して L は有意な差はなかった (Fig. 5-7C)。p62 は R 及びと比較して P、LK、K で 35% 程度、50% 程度、50% 程度それぞれ有意な高値を示した。R と比較して L は有意な差はなかった (Fig. 5-7D)。

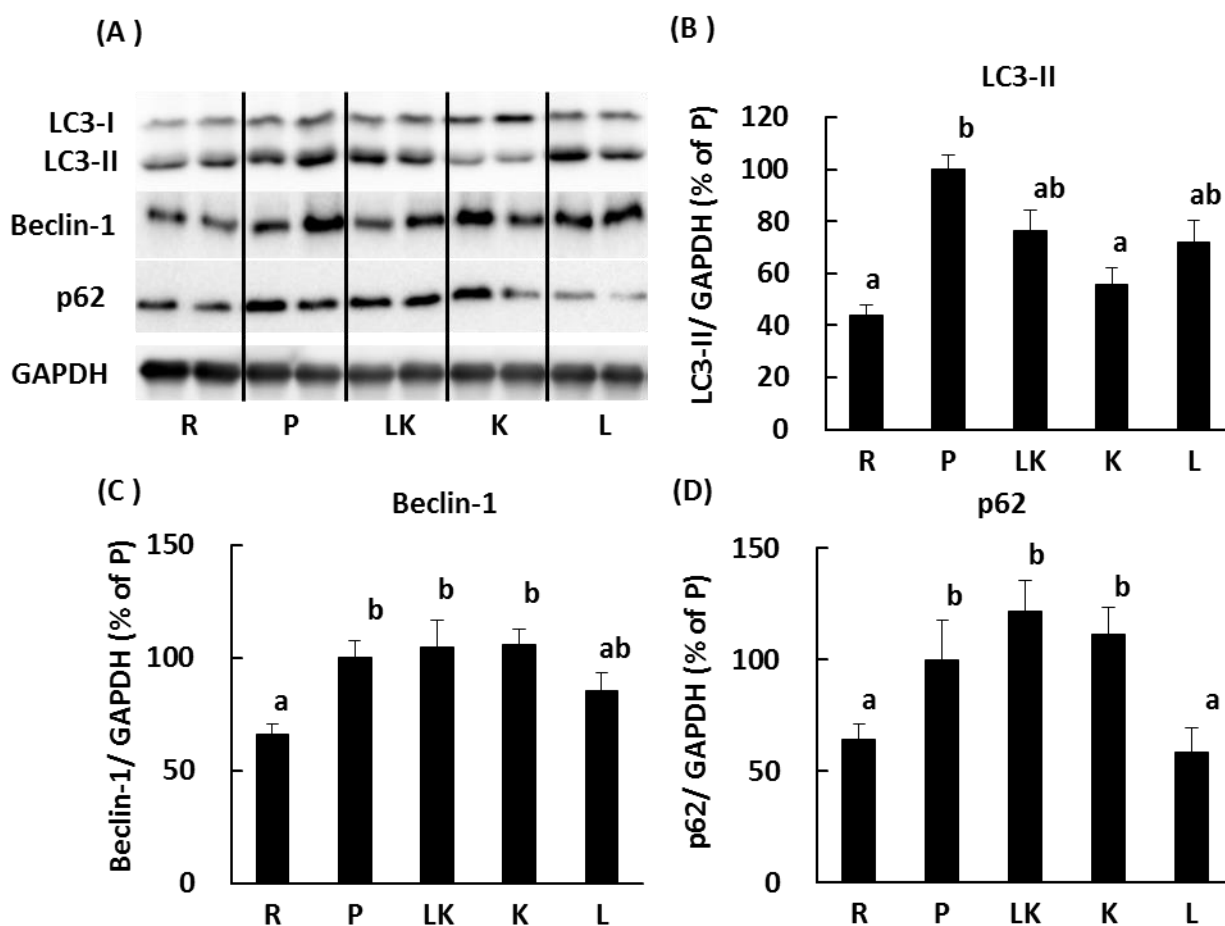


Fig. 5-7 骨格筋におけるオートファジーの活性指標

A : 代表的なバンド、B : LC3-II、C : beclin-1、D : p62

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 8. UPS の活性

K48 特異的ポリユビキチン化タンパク質及び非選択的ユビキチン化タンパク質を Fig. 5-8 に示し、A には K48 特異的ポリユビキチン化タンパク質の代表的なバンドを、B には非選択的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンドを、C には定量値をそれぞれ示した。また、筋特異的ユビキチンリガーゼ E3 の mRNA 量を Fig. 5-9 にそれぞれ示した。

ユビキチン化タンパク質の量はいずれも群間で有意差はなかった。筋特異的ユビキチンリガーゼ E3 である atrogin-1 の mRNA 発現量は R と比較して P、LK、K、L で顕著な低値を示し、P、LK、K、L の 4 群間で差はなかった。MuRF1 の mRNA 発現量も atrogin-1 と同様の挙動を示した。

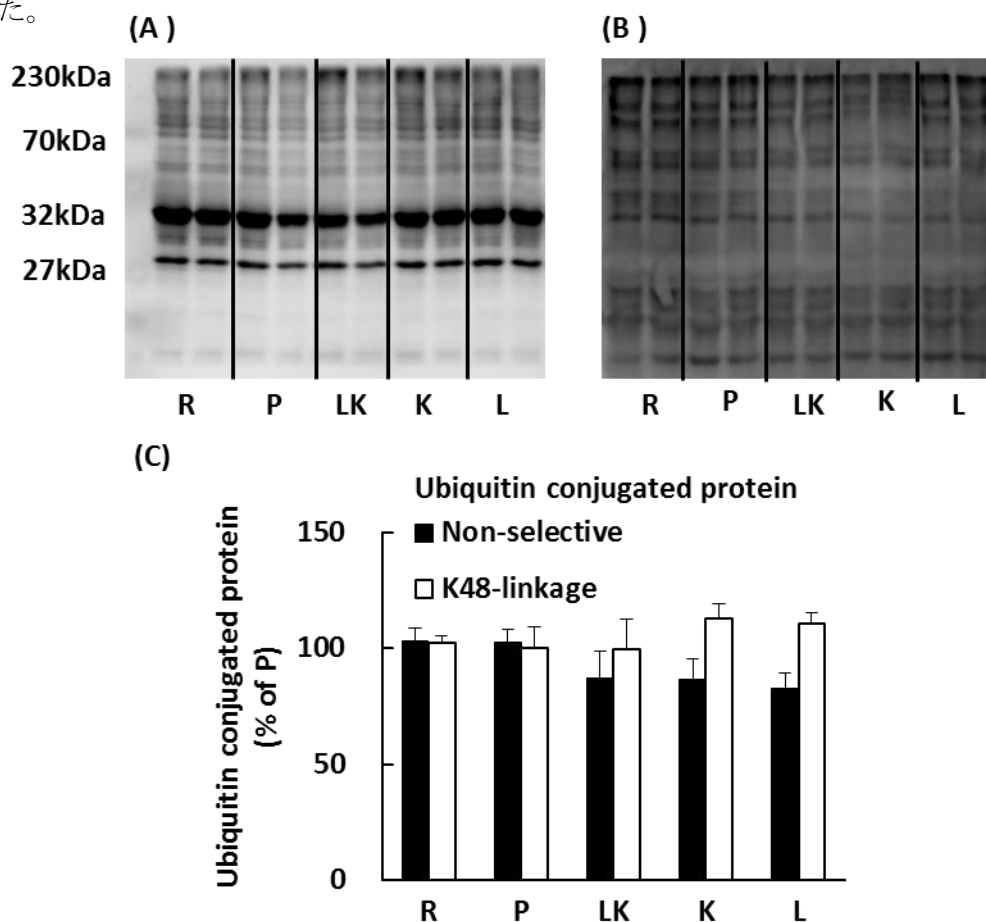


Fig. 5-8 骨格筋におけるユビキチン化タンパク質

A : K48 特異的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンド、B : 非選択的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンド、C : ユビキチン化タンパク質量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

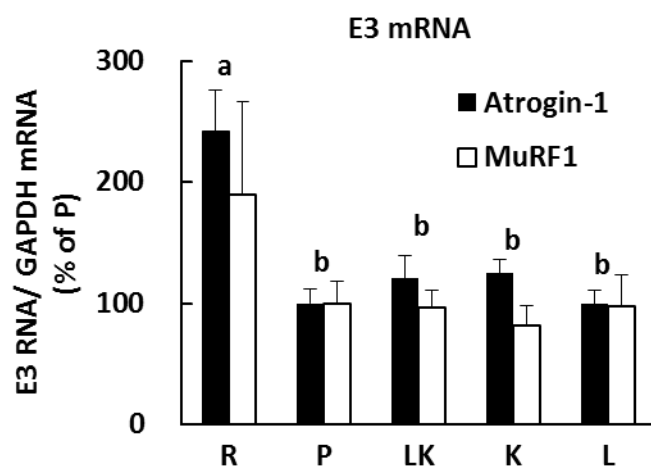


Fig. 5-9 骨格筋における筋特異的 E3 mRNA 発現量

黒 : atrogin-1、白 : MuRF1

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 9. タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性

タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase のリン酸化率を Fig.5-10 に示した。なお、A には代表的なプロットを、B には Akt、C には mTOR、D には 4E-BP1、E には S6K1、F には AMPK のリン酸化率をそれぞれ示した。Akt の活性は R と比較して顕著な低値を示した。LK と L は R と比較して有意差はなく、K は P と比較して有意な高値を示し、R との差はなかった (Fig. 5-10B)。mTOR の活性は R と比較して P、LK、K、L でそれぞれ 30%程度有意な低値を示し (Fig. 5-10C)、mTOR 下流の 4E-BP1 の活性は R と比較して P、LK、K、L でそれぞれ 20%程度の有意な低値を示した (Fig. 5-10D)。4E-BP1 と同じく mTOR の下流に位置する S6K1 の活性は R と比較して P で 70%程度、LK で 50%程度、K で 60%程度、L で 60%程度それぞれ有意な低値を示した (Fig. 5-10E)。AMPK の活性は R と比較して P で 90%程度の有意な低値を示した。LK、K、L は R と比較して有意差はなく、P と比較して高い傾向 (unpaired *t*-test : LK :  $p=0.009$  vs P、K :  $p=0.07$  vs P、L :  $p=0.005$  vs P) が見られた (Fig. 5-10F)。

以上の結果から、SAMP8 の骨格筋においては Akt、mTOR 経路、及び AMPK の不活性化が生じているが、Lys の摂取により Akt と AMPK の活性が増加することが示唆された。AMPK はむしろオートファジーの亢進に寄与することから、Lys によるオートファジー抑制作用には Akt の活性化が関与していると考えられる。

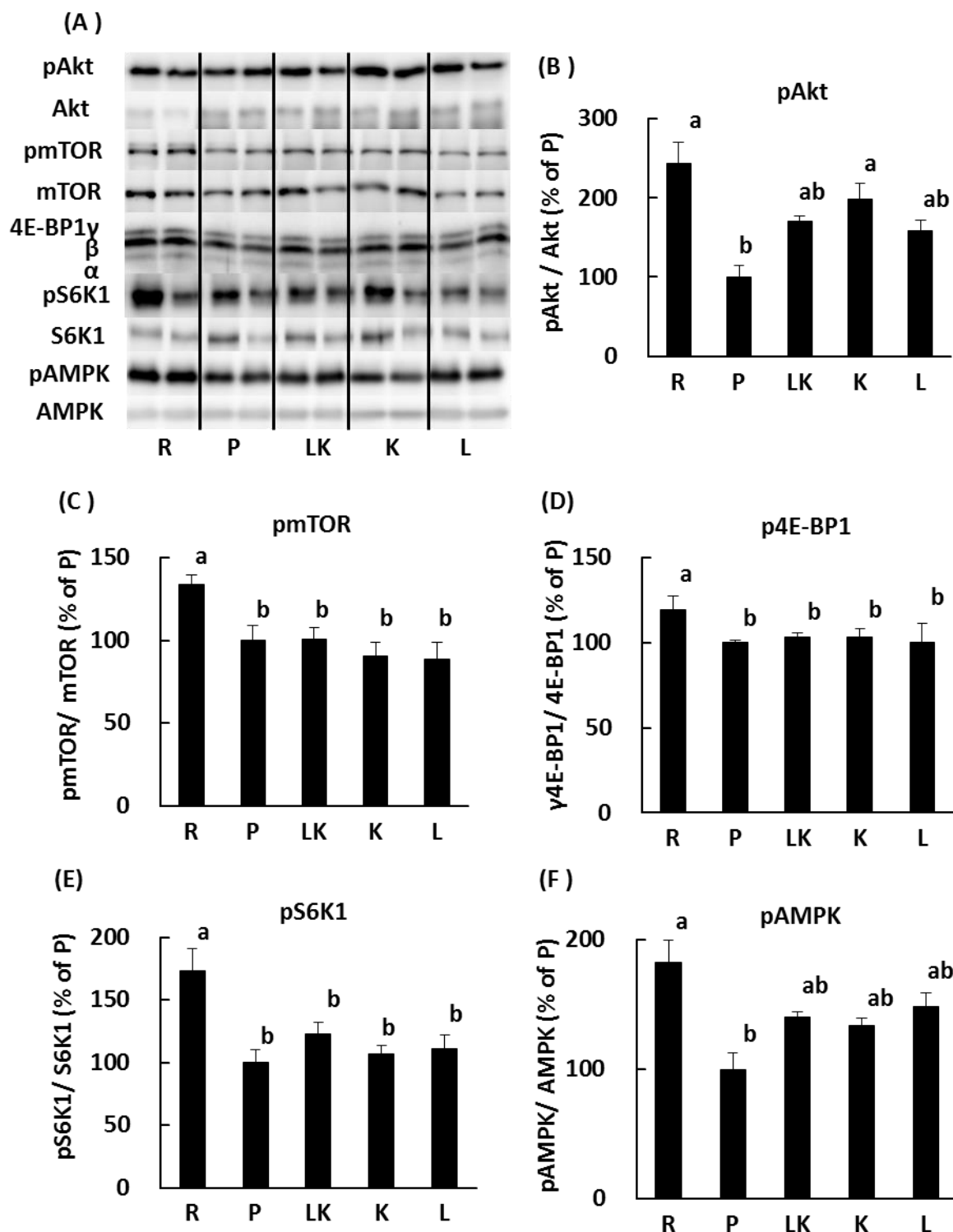


Fig. 5-10 タンパク質代謝を制御する Ser/Thr kinase の骨格筋における活性

A : 代表的なバンド、B : Akt 活性、C : mTOR 活性、D : 4E-BP1 活性、E : S6K1 活性、

F : AMPK の活性

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 10. Mul1 の mRNA 発現量

Mul1 の mRNA 発現量を Fig. 5-11 に示した。Mul1 の mRNA 発現量は R と比較して P、LK、K、L で顕著な低値を示した。P、LK、K、L の 4 群間で差はなかった。Mul1 はミトファジーの制御に働く ubiquitin-ligase E3 であることから[73]、SAMP8 の骨格筋においては、SAMR1 と比較して、Mul1 の減少によるミトファジーの不全が生じている可能性が示された。

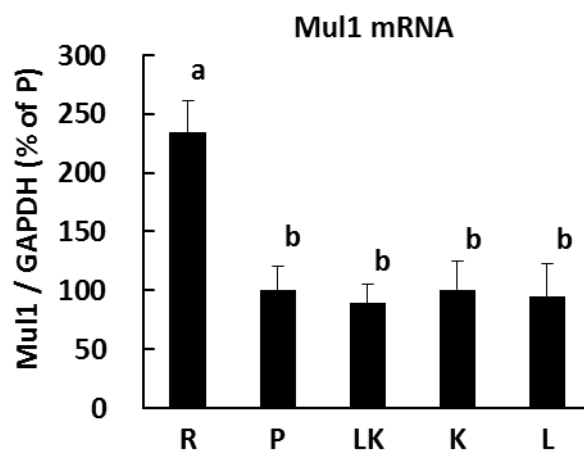


Fig. 5-11 骨格筋における Mul1 mRNA 発現量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

11. PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量

PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量を Fig. 5-12 に示した。PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量は R と比較して P で少ない傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs R) が見られ、P と比較して K で顕著に多かった。LK 及び L は P と比較して差はなかった。PGC-1 $\alpha$  はミトコンドリア新生やオートファジーの抑制に働くことから[14, 74]、SAMP8 の骨格筋では、SAMR1 と比較して PGC-1 $\alpha$  の減少を介したミトコンドリア量の減少やオートファジーの亢進が生じている可能性が考えられた。

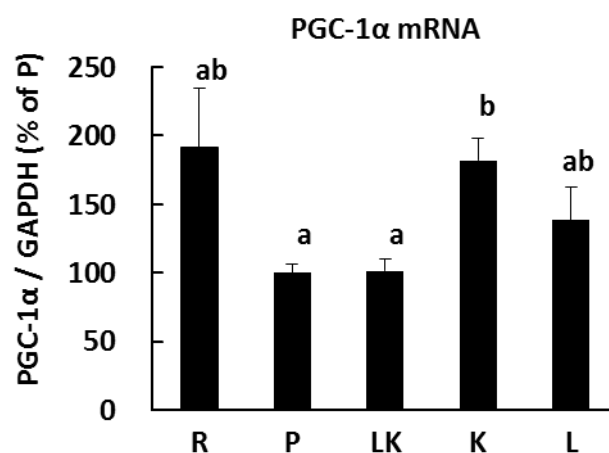


Fig. 5-12 骨格筋における PGC-1 $\alpha$  mRNA 発現量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 第 4 節 考察

老化促進モデルである SAMP8 は、現在 8 系統ある SAMP 系統の中でも、加齢依存的な筋肉の減少、すなわちサルコペニアを発症することが報告されている[36]。本実験においても、加齢依存的な除脂肪体重の減少が通常食を摂取した SAMP8(P)において認められた (Fig. 5-3)。また、本実験で摘出したすべての後肢筋重量は、正常モデルである SAMR1 と比較して通常食を摂取した SAMP8 で有意な低値を示した (Fig. 5-4B-F)。除脂肪体重の推移を見ると、群分け開始時の 28 週齢の時点で SAMR1 と比較して SAMP8 が有意に低かった。したがって、SAMR1 と SAMP8 間における骨格筋重量の差は群分け開始時からあった除脂肪体重の差を反映している可能性も否定できない。しかし、2 か月間の間に通常食を摂取した SAMP8 の除脂肪体重が有意に減少したことを考えると、SAMR1 と SAMP8 の骨格筋重量の差には SAMP8 で生じたサルコペニアの影響があると推察される。また、SAMR1 の除脂肪体重は 30 週齢から 36 週齢にかけて減少する傾向が見られたが、これは 30 週齢以降に SAMR1 の摂食量を SAMP8 に合わせた結果であると推察される。一方、1.5% Lys 添加食 (LK)、3.0% Lys 添加食 (K)、3.0% Leu 添加食を摂取した SAMP8 では除脂肪体重の有意な減少は認められず (Fig. 5-3)、EDL と前脛骨筋の重量は SAMR1 と比較して有意な差はなかった (Fig. 5-4)。また、ヒラメ筋重量は 3.0% Lys 添加食と 3.0% Leu 添加食を摂取した群で SAMR1 と比較して有意な差はなかった (Fig. 5-4)。これらの結果から、Lys 及び Leu の摂取は SAMP8 で生じるサルコペニアの緩和に働いたと考えられた。

筋原線維タンパク質の分解速度は、EDL とヒラメ筋のいずれにおいても、SAMR1 と比較して通常食を摂取した SAMP8 で有意に高い値を示した (Fig. 5-6)。したがって、SAMP8 の骨格筋では筋原線維タンパク質分解が亢進した状態にあると考えられる。この結果を受け、主要なタンパク質分解システムであるオートファジーと UPS の活性をそれぞれ評価した。オートファジーの活性指標である LC3-II と、オートファジーの誘導段階に関わる beclin-1 の量は SAMR1 と比較して通常食を摂取した SAMP8 で顕著に増加しており、SAMP8 の骨格筋ではオートファジーによるタンパク質分解が亢進していると考えられた。一方、UPS の律速酵

素である MuRF1 と atrogin-1 の mRNA 発現量を定量したが、SAMR1 と比較して、SAMP8 の骨格筋における発現量の上昇は認められなかった。また、ユビキチン化タンパク質量も SAMR1 と SAMP8 の間で差はなく、プロテアソームの主な分解標的である K48 結合型ポリユビキチン化タンパク質[75]も群間で差はなかった (Fig. 5-8)。以上の結果から、SAMP8 の骨格筋では UPS の活性は生じておらず、オートファジーを介した筋原線維タンパク質分解の亢進が生じていると考えられた。Wenz ら[14]は、自然老化マウスの骨格筋において、オートファジーの活性化が生じることを報告しており、本実験の結果はこの報告と一致する。3.0% Lys 添加食の摂取により、SAMP8 の骨格筋で亢進したオートファジーの活性と筋原線維タンパク質分解速度は顕著に抑えられ、1.5% Lys 添加食や 3.0% Leu 添加食を摂取した SAMP8 においても、オートファジー活性の有意な抑制は認められなかったが、筋原線維タンパク質分解の抑制が認められた。したがって、Lys と Leu の摂取は SAMP8 において亢進した筋原線維タンパク質の分解を抑えることでサルコペニアの緩和に寄与したと考えられる。1.5% Lys 添加食と 3.0% Leu 添加食の摂取によって筋原線維タンパク質分解の抑制が認められたにも関わらず、オートファジー活性の有意な抑制が認められなかった原因としてはいくつかの可能性が考えられる。第一に、筋原線維タンパク質分解を測定した骨格筋とオートファジー活性を評価した骨格筋の違いによるものである。筋原線維タンパク質分解速度は、単離した EDL、またはヒラメ筋を用いて測定された。一方、western blotting で LC3 や beclin-1 を検出する場合のサンプルには腓腹筋を用いた。食品成分に対する応答は骨格筋の種類ごとに異なるということが報告されているため[62]、実験に用いた骨格筋の差異が影響した可能性も考えられる。第二に、筋原線維タンパク質分解の抑制が見られるタイミングと、オートファジー活性の抑制が見られるタイミングとの間にタイムラグがある可能性が挙げられる。オートファジーの活性指標である LC3-II はオートファゴソームの内膜と外膜に局在するため、オートファゴソームの数と相関する。また、オートファゴソームはオートリソソームになり、標的タンパク質の分解後、消失し、LC3-II は LC3-I に変換される[12]。したがって、仮に LC3-II が高値を示していたとしてもその時点では標的タンパク質はオートファゴソーム内部に包含されており、



分解されるには至っていないと考えられる。そのため、本実験では実験食摂取3時間後に解剖を行っているが、それ以前のタイミングでは1.5% Lys や3.0% Leu 添加食を摂取した群でLC3-IIの減少が起こっており、その結果が摂取3時間後の筋原線維タンパク質分解に反映された可能性もある。Lysは経口摂取3時間後に血漿中濃度上昇のピークを迎えるが、Leuは経口摂取後30分程度で濃度上昇のピークを迎える[62, 76]。したがって、LeuがLysよりも早い段階でオートファジーの抑制に寄与した可能性は高いと考えられる。また、3.0% Lys 添加食を摂取したSAMP8の血漿中Lys濃度は1.5% Lys 添加食を摂取したSAMP8の血漿中Lys濃度よりも高い傾向にあったため (Fig. 5-7)、今回の実験条件において3.0% Lys 添加食を摂取した群でのみLC3-IIの抑制が認められたのは、高用量のLysを摂取したことで血漿中Lys濃度が高く維持され、オートファジー抑制作用が長期化したことに起因する可能性もある。実際、私は修士研究において[35]、Lysの摂取による筋原線維タンパク質分解抑制作用には濃度依存性があり、一定用量以下のLysの摂取は筋原線維タンパク質分解の抑制に寄与しないことを明らかにしている。オートファジーによる単位時間当たりのタンパク質分解量を正確に知るには、第3章で行ったLC3-II flux assayを*in vivo*で行う必要があり、今後の課題である。

SAMP8の骨格筋におけるオートファジー活性化機構とLysによるその抑制機構を明らかにするため、オートファジーの制御に働くSer/Thr kinaseの活性を評価した。その結果、SAMR1と比較し、Akt及びmTOR経路に加え、AMPKの有意な活性低下が通常食を摂取したSAMP8の骨格筋で認められた (Fig. 5-10F)。AMPKはむしろオートファジーの活性化に働くことから[23]、SAMP8の骨格筋におけるオートファジーの活性化はAktとmTOR経路の不活性化によるものと考えられる。このうち、Aktについては3.0% Lys 添加食を摂取したSAMP8の骨格筋で活性化が認められた。この結果はLC3-IIと一致しており、第2章より、LysはAktを介してオートファジーの抑制に働くと考えられることから[24]、3.0% Lys 添加食の摂取はSAMP8の骨格筋におけるAktの活性化を促し、活性化したAktを介したオートファジーの抑制によって筋原線維タンパク質分解を抑えると推察された。一方、mTORはAktの下流に位置することが知られているが[24]、3.0% Lys 添加食を摂取したSAMP8の骨格筋において

mTOR の活性化は認められなかった。mTOR の活性化が認められなかった原因としては、AMPK による mTOR の活性阻害による影響が考えられる。通常食を摂取した SAMP8 の骨格筋では SAMR1 と比較して AMPK の活性が顕著に低下していたが、AMPK の活性は Lys や Leu の摂取により改善する傾向が見られた。したがって、活性回復した AMPK による阻害を mTOR が受けたため、3.0% Lys 添加食を摂取した SAMP8 の骨格筋で mTOR の活性化が認められなかったと考えられる。なお、本実験では絶食後に実験食を与え、食品成分に対する骨格筋の応答を評価している。加齢時において、mTOR の活性は絶食時には高く維持されるものの[77]、食事に対する応答は鈍化することがヒトとマウスで報告されている[78,79]。そのため、SAMR1 と比較した場合、SAMP8 の骨格筋における mTOR の食餌への応答は、自然老化時における応答と類似した状態にあると推察される。

AMPK の活性低下は自然老化動物でも報告がなされている[80]。AMPK の活性が低下すると、ミトコンドリア新生の制御に関わる PGC-1 $\alpha$  が減少し、ミトコンドリアの量や質が低下することが指摘されている[74,81]。通常食を摂取した SAMP8 の骨格筋においても、SAMR1 と比較して PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量が少ない傾向にあった (Fig. 5-12)。また、ミトコンドリア機能の異常はサルコペニアを招き[82,83]、骨格筋における PGC-1 $\alpha$  の過剰発現はサルコペニアを抑えることが知られている[14]。そのため、AMPK の活性低下や PGC-1 $\alpha$  の減少に起因するミトコンドリア機能の低下は、サルコペニアの発症において極めて重要な意味を持つ可能性がある。Lys と Leu のいずれにおいても PGC-1 $\alpha$  の調節に働くという報告は存在し[84,85]、本実験においては3.0% Lys 添加食の摂取によって PGC-1 $\alpha$  mRNA 量は有意に増加し、3.0% Leu 添加食の摂取によっても増加する傾向が認められた。そのため、Lys や Leu は SAMP8 の骨格筋における PGC-1 $\alpha$  の減少を抑制、または増加を促し、ミトコンドリアの量や機能の改善に寄与した可能性が考えられる。また、PGC-1 $\alpha$  は加齢マウスの骨格筋で生じたオートファジーを抑制し、サルコペニアを緩和することが報告されている[14]。したがって、Lys によるオートファジー抑制作用は SAMP8 の骨格筋においては、Ser/Thr kinase だけではなく、PGC-1 $\alpha$  の維持、または増加を介する可能性もある。

Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用は主にオートファジーを介する可能性を示したが、筋原線維タンパク質の分解に働くオートファジーは、エネルギー供給を目的として、非選択的に基質を分解する「非選択的オートファジー」であると考えられる。本研究では、損傷を受けたミトコンドリアや異常タンパク質の除去に働く「選択的オートファジー」についても解析を行った。p62 は従来オートファジーの単純な基質と考えられてきたが、必ずしも飢餓応答性のオートファジーとその挙動が一致しないこと、LC3 とユビキチンの双方に対する結合ドメインを有し、ユビキチン化された異常タンパク質の目印となるため、現在では「選択的オートファジーの基質」と考えられている。SAMP8 の骨格筋では、SAMR1 と比較して p62 が蓄積していた (Fig. 5-7D)。この結果より、SAMP8 の骨格筋では選択的オートファジーの不全が生じており、損傷したミトコンドリアや異常化・凝集したタンパク質が蓄積していると考えられる。損傷したミトコンドリアの除去に働く選択的オートファジーを、マイトファジーと呼ぶが、Mul1 はマイトファジーの制御に働く ubiquitin-ligase E3 である[73]。SAMP8 の骨格筋における Mul1 の mRNA 量を定量した結果、SAMP8 の骨格筋では、SAMR1 と比較して、Mul1 の mRNA 発現量が顕著に減少していた。したがって、SAMP8 の骨格筋では、特にマイトファジーを介した異常ミトコンドリアの除去機能が減弱していると考えられる。異常化したミトコンドリアは過酸化水素の発生源となり[86]、酸化ストレスやそれに伴う骨格筋タンパク質分解亢進を招く[87,88]。また、抗酸化酵素のノックアウトは骨格筋萎縮を招くことも知られている[89]。したがって、サルコペニアを予防するためには選択的オートファジー、特にマイトファジーの機能を正常に保ち、細胞内の恒常性を維持すること、あるいは、過剰となった酸化ストレスを消去することが重要であると考えられる。一方、Lys や Leu の摂取による Mul1 の mRNA 発現量に対する効果は認められず (Fig. 5-11)、p62 に対しても Lys による効果はなかった (Fig. 5-7D)。Leu を摂取した SAMP8 の骨格筋では p62 の蓄積が改善されていたが (Fig. 5-7D)、Mul1 mRNA への影響はなかったため (Fig. 5-11)、Leu の摂取がマイトファジーをはじめとする選択的オートファジーの改善に寄与したとは言い切れない。マイトファジーの制御に働く ubiquitin-ligase E3 としては Parkin が知られている[90]。そのた

め、Leuの摂取がParkinの発現量に及ぼす影響を検討することでLeuによるミトファジーへの影響をより正確に議論できると考えられる。

以上より、LysはAktまたはPGC-1 $\alpha$ を介してSAMP8の骨格筋における非選択的オートファジーの抑制に働き、サルコペニアの緩和に寄与したと考えられる。しかし、サルコペニアの予防効果と呼ぶには不十分な効果であるため、抗酸化やミトコンドリアの保護に働く食品成分と組み合わせて摂取することでより効果的にサルコペニアを予防できると推察される。

## 第6章 老化促進モデルマウスにおけるL-リジンの抗脂肪肝効果

### 第1節 目的

加齢は骨格筋においてはサルコペニアを招き、肝臓では非アルコール性脂肪肝のリスクファクターとなることが知られている[70,71]。近年、非アルコール性脂肪肝がサルコペニアと相関することが報告されており[91]、第5章でサルコペニアモデルとして用いた SAMP8 は高脂肪食の摂取なしに非アルコール性脂肪肝も発症する[92,93]。一方で Lys は、高脂肪食の摂取によって誘導された成熟マウスの脂肪肝を、強力に抑えることが報告されている[85]。したがって、Lys は SAMP8 で生じる非アルコール性脂肪肝の予防に働き、脂肪肝の予防がサルコペニアの緩和に影響した可能性も考えられる。そこで、本章では SAMP8 で生じる非アルコール性脂肪肝に Lys が及ぼす効果を検討することを目的として実験を行った。

### 第2節 方法

#### 1. 動物実験

本章における動物は第5章と同一のものを用いた。したがって、実験動物、飼育条件、解剖条件は第5章と同じである。

#### 2. Haematoxylin & eosin 染色 (HE 染色)

HE 染色では、塩基性色素である Haematoxylin と酸性色素である Eosin を用いて、組織切片を染色する。Haematoxylin は、核酸のリン酸基に結合し、核を青紫色に染色する[94]。一方、Eosin はタンパク質のアミノ基に結合し、主に細胞質を赤く染色する[94]。本実験は共同獣医学科解剖学研究室山本欣郎教授のご指導により行った。

##### (1) パラフィン包埋切片の作製

HE 染色を行う目的は組織像を確認することであり、パラフィン包埋切片は凍結切片に比べ、

明瞭な像を観察することができる。下記の試薬を用いた。

- ・10%中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4、組織固定用、和光純薬株式会社)

- ・エタノール (70%、80%、90%、95%、100%)

…各濃度 (v/v) になるようにエタノールを純水で希釈した。

- ・キシレン

- ・パラフィン

…ティシュー・テック パラフィンワックス II26 (サクラファインテックジャパン株式会社：東京) を 60°C で溶解した。

- ・卵白グリセリン

…卵白をよく泡立て、10枚重ねのガーゼでろ過した。これに等重量のグリセリンを加え、使用時まで4°Cで保存した。

第5章 - 第2節 - 1において採取した肝小葉の一部を厚さ5 mm程度の切片にスライスし、氷冷した10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して4°Cで保存した。1晩以上浸漬した固定組織を、Table 6-1に示したように徐々にエタノールの濃度を高くしながら脱水した後、エタノールをキシレンで置換する透徹処理を行った。

Table 6-1 脱水及び透徹の行程

作業内容	試薬	処理時間
脱水	70% (v/v) エタノール	5 h
	80% (v/v) エタノール	5 h
	90% (v/v) エタノール	1 晩
	95% (v/v) エタノール	3 h
	95% (v/v) エタノール	3 h
	100% (v/v) エタノール	1 晩
透徹	キシレン	15 min
	キシレン	15 min
	キシレン	15 min

透徹が終了した組織を 60°C に恒温したパラフィンに浸した。組織中にパラフィンを浸透させた後、パラフィンに沈めた状態で室温に戻し、パラフィンを固めてパラフィンブロックとした。

パラフィン包埋した組織をマイクローム (LEICA SM 2000R、Leica : ドイツ) で 5  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した。作成した切片は 40°C に恒温した純水上で伸展させ、剥離防止剤である卵白グリセリンで覆膜したスライドガラスに貼付した。

## (2) HE 染色

下記の試薬を用いた。

### ・ Haematoxylin 染色液

…純水 50 mL に Haematoxylin (MERCK : ドイツ) 1 g を加え、加熱して溶解させ、さらに純水を加えて 1000 mL とした。これにヨウ素酸塩ナトリウム 0.2 g、硫酸アンモニウムアルミニウム 12 水和物 50 g を加えて溶解させた。さらに、クエン酸 1 g とトリクロロアセトアルデヒド 1 水和物 (抱水クラロール) 50 g を加えて溶解させた。

### ・ Eosin 染色液

…EosinY (MERCK) 1 g とエリスロシン (MERCK) を 0.1 g 秤量し、100 mL の純水に溶解させた。これに 300 mL の 80% エタノールと 0.1 mL の酢酸を加えた。

### ・ キシレン

### ・ エタノール

### ・ 封入剤 (MGK-S、松浪硝子工業株式会社 : 大阪)

(明記していない試薬は、特級試薬、和光純薬工業株式会社)

切片を貼付したスライドガラスをキシレンに浸漬し、パラフィンを除いた。その後、徐々に濃度を下げながらエタノールにスライドガラスを浸漬し、親水化した。その後、水道水で

水洗した後、純水に浸し、続いて Haematoxylin 染色液に浸漬した。水道水で水洗して色出しをした後、Eosin 染色液に浸漬した。染色後、徐々に濃度を上げながらエタノールにスライドガラスを浸漬し、脱水した。脱水後、キシレンに浸漬し、透徹した。透徹後、スライドガラスに封入剤を滴下し、カバーガラスで切片を封入した。上記作業の工程及び処理時間は、Table 6-2 に示した。

Table 6-2 HE 染色の工程

作業内容	試薬	処理時間
脱パラフィン	キシレン	5 min
	キシレン	5 min
	100% (v/v) エタノール	5 min
	100% (v/v) エタノール	5 min
親水化	95% (v/v) エタノール	5 min
	90% (v/v) エタノール	5 min
	80% (v/v) エタノール	5 min
	70% (v/v) エタノール	5 min
水洗	水道水 (流水)	5 min
染色①	Haematoxylin 染色液	10 min
色出し	水道水 (流水)	20 min
染色②	Eosin 染色液	1.5 min
	70% (v/v) エタノール	3 sec
	80% (v/v) エタノール	5 min
	90% (v/v) エタノール	5 min
	95% (v/v) エタノール	5 min
脱水	100% (v/v) エタノール	5 min
	100% (v/v) エタノール	5 min
	キシレン	5 min
	キシレン	5 min
	キシレン	5 min

### (3) 観察及び撮影

正立顕微鏡 (Nikon ECLIPSE80i、株式会社ニコン：東京) を用いて 200 倍の倍率で観察を



行い、撮影した。

### 3. Oil red O 染色

#### (1) 凍結切片の作製

Oil Red O は親油性の赤色色素であり、脂肪滴を赤く染色する。Oil Red O で脂肪滴を赤く染色し、肝臓組織における脂質量を評価するため、Oil Red O 染色を行った。下記の試薬を用いた。

- 0.01 M PBS

…リン酸二水素ナトリウム 0.45 g、リン酸水素二ナトリウム 1.28 g、塩化ナトリウム 8 g、を純水に溶解し、全量を 1000 mL とした。

- 30% (v/v) ショ糖溶液

…ショ糖 30 g を 100 mL の 0.01 M PBS に溶解し、氷上で冷却した。

- コンパウンド (O.C.T. compound、サクラファインテック株式会社：東京)

第5章 - 第2節 - 2 - (1) で固定した組織を使用した。固定組織を 0.01M PBS 中で 10 分×3 回、4°C の恒温槽において振とうした。洗浄後、30% ショ糖溶液に組織を入れ、組織が完全に沈むまで 4°C で 1 晩振とうした。組織に付着したショ糖溶液を拭き取った。アルミホイルで作成した型にコンパウンドを少量入れ、その上に組織を置いた後に組織を覆うようにコンパウンドを足した。室温で 30 分間放置し、組織をコンパウンドになじませた後、-80°C で凍結した。

凍結した組織を -20°C に設定したクリオスタット (LEICA CM1860、Leica) で 8 μm の厚さに薄切し、スライドガラス (76×26 mm) に貼付した。

#### (2) Oil red O 染色

下記の試薬を用いた。

- Haematoxylin 染色液

- Oil Red O 染色液

…10.3 g の Oil Red O (Sigma) に 100 mL の 2-プロパノールを加え、10 分間混和し、これを Oil Red O 保存液とした。その後、Oil Red O 保存液と純水を 6:4 の割合で混合し、10 分間攪拌の後、30 分間静置したものをろ過した。

凍結切片を貼付したスライドガラスを 30 秒間流水で洗浄した後、純水に 1 分間浸漬した。その後、Oil Red O 染色液で 15 分間染色し、再び純水に 1 分間浸した。水洗後、haematoxylin 染色液で 5 分間染色し、20 分間水道水で水洗して色出しを行った。染色後、透徹後、スライドガラスに封入剤を滴下し、カバーガラスで切片を封入した。

### (3) 観察及び撮影

正立顕微鏡 (Nikon ECLIPSE80i、株式会社ニコン) を用いて 200 倍の倍率で観察を行い、撮影した。

## 4. 肝臓中 TG 及び TC 濃度の測定

### (1) 肝臓組織からの脂質抽出法

約 200 g の肝臓を 30 mL 容遠心管 (オークリッジ遠心管 3119、Nalgene : 東京) に入れ、氷冷したクロロホルム : メタノール混合液を 4 mL 加えた。ダイヤル 4 に設定したポリトロンホモジナイザー (Kinematica) で 10 秒程度ホモジナイズし、その後、4°C、12,500×g で 20 分間遠心分離し、上清を 100 mL 容分液漏斗に移した。残った沈殿に氷冷したクロロホルム : メタノール混合液を加え、同様の操作を繰り返した。得られた上清に 2 mL の 0.88% (w/v) 水溶液を加えて転倒混和し、2 層に分離するまで室温で静置した。下層を 10 mL 容メスフラスコに回収し、クロロホルムで 10 mL にフィルアップした。これを肝臓脂質抽出液とし、蓋付き試験管に入れて 4°C で保存した。

## (2) 肝臓中のトリグリセリド (TG) 及び総コレステロール (TC) の定量

TG の定量は酵素法 (GPO・DAOS 法) による TG 測定用キット (トリグリセライド E-テストワコー) を、TC の定量はコレステロールオキシダーゼ-DAOS 法による TC 測定用キット (コレステロール E-テストワコー) を用いて行った。なお、肝臓脂質抽出液の溶媒であるクロロホルムは酵素反応を阻害する可能性があるため、抽出液を 80°C に恒温したブロックヒーターで加熱して揮発させ、乾固物を 2-プロパノールに溶解したうえで測定に供した。

TG の測定においては、肝臓脂質抽出液 100  $\mu$ L を乾固させた後、100  $\mu$ L の 2-プロパノールに溶解し、TC の測定においては、肝臓脂質抽出液 500  $\mu$ L を乾固させた後、50  $\mu$ L の 2-プロパノールに溶解した。2-プロパノールに溶解した抽出液 10  $\mu$ L に発色試薬 1.5 mL を加え、37°C で 5 分間静置した。その後、波長 600 nm における吸光度を測定した。TG 定量におけるスタンダードにはキット中の基準液 (トリオレイン 300 mg/ dL) を使い、ブランクは抽出液を加えずに同様の操作を行った。TC 定量におけるスタンダードにはキット内の標準液 (200 mg/ dL) を使い、ブランクは抽出液を加えずに同様の操作を行った。

## 5. 血漿中 TG 濃度の測定

酵素法 (GPO・DAOS 法) による TG 測定用キット (トリグリセライド E-テストワコー) を用いて行った。

血漿 10  $\mu$ L に発色試薬 1.5 mL を加え、37°C で 5 分間静置した。その後、波長 600 nm における吸光度を測定した。スタンダードにはキット中の基準液 (トリオレイン 300 mg/ dL) を使い、ブランクは血漿を加えずに同様の操作を行った。

## 6. Western blotting を用いたタンパク質の検出

脂肪酸合成酵素やそのリン酸化フォーム、オートファジー関連因子及び PGC-1 $\alpha$  を western blotting で検出した。

## (1) SDS-PAGE 用試料の調製

下記の試薬を用いた。

## • Tissue homogenizing buffer solution

…HEPES（同仁化学研究所株式会社）5.96 g、オルトバナジン（V）酸ナトリウム 0.92 g、ニリン酸ナトリウム 10 水和物 2.23 g、フッ化ナトリウム 2.10 g、EDTA 0.37 g、TritonX-100 10g を純粋で溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.6 に調整した後、500 mL にフィルアップして 4°C で保存した。

## • 1000×PMSF

## • 500×leupeptin/ pepstatin A mixture

## • Laemmli buffer 4 倍濃縮液

肝臓組織約 200 mg を試験管に取り、10 倍量の tissue homogenizing buffer solution を加え、ダイヤルを 4 に設定したポルトロンホモジナイザー（Kinematica）で氷冷しながらホモジナイズした。ホモジネートを 1.5 mL 容遠心チューブに移し、4°C、14,000×g の条件で 10 分間遠心分離した。上清 150 μL を別の 1.5 mL 容遠心チューブにとり、Laemmli buffer 4 倍濃縮液 50 μL を加え、よく攪拌した後、ブロックヒーター（HDB-1N、アズワン株式会社）中で 95°C、5 分間加熱し、放冷後、-80°C で保存し、これを電気泳動用試料とした。また、遠心分離後の上清中のタンパク質量をタンパク質量の測定を第 2 章-第 2 節-3 の方法で測定し、サンプル中のタンパク質濃度を算出した。

## (2) SDS-PAGE

操作は第 4 章-第 2 節-4- (2) と同様に行った。ただし、ACC、pACC、FAS、PGC-1α、mTOR、pmTOR、ユビキチン化タンパク質を検出する場合には 8% アクリルアミドゲルを、Erk、p-Erk、

p62 を検出する場合には 10% アクリルアミドゲルを用いた。

### (3) タンク式 western blotting

4E-BP1、ユビキチン化タンパク質、mTOR、pmTOR、fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、p-ACC を検出する場合には、タンク式 western blotting を用いた。

4E-BP1 を検出する場合には第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同様の方法で行い、それ以外を検出する場合には転写時間を3時間とした上で第2章 - 第2節 - 4 - (3) と同様の方法で行った。

### (4) セミドライ式 western blotting

4E-BP1、ユビキチン化タンパク質、mTOR、pmTOR、FAS、ACC、pACC 以外を検出する場合には、セミドライ式 western blotting を用い、第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同様に行った。

### (5) 目的タンパク質の検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。なお、下記の一次抗体と対応する二次抗体（抗体名右の括弧内に示した）をそれぞれ用いた。

- ・抗 ACC 抗体溶液 (rabbit)

…抗 ACC 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 phospho-ACC 抗体溶液 (rabbit)

…抗 phospho-ACC 抗体 (Ser79、Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗 FAS 抗体溶液 (rabbit)

…抗 FAS 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存

した。

- ・抗 Akt 抗体溶液 (mouse)
- ・抗 phospho-Akt 抗体溶液 (Ser473) (rabbit)
- ・抗 phospho-Akt 抗体溶液 (Thr308) (rabbit)
- …抗 phospho-Akt 抗体 (Thr308、Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°Cで保存した。
- ・抗 Extracellular signal-regulated kinase (Erk) 抗体溶液 (mouse)
- …抗 Erk 抗体 (BD Bioscience : USA) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°Cで保存した。
- ・抗 phospho-Erk 抗体溶液 (rabbit)
- …抗 phospho-Erk 抗体 (Thr202/ Tyr204、Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°Cで保存した。
- ・抗 AMPK 抗体溶液 (mouse)
- ・抗 phospho-AMPK 抗体溶液 (mouse)
- ・抗 phospho-Tyr (pY) 抗体溶液 (mouse)
- …抗 pY 抗体 (Transduction Laboratories : USA) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈した。
- ・抗インスリン受容体 (IR) 抗体溶液 (rabbit)
- …抗 IR $\beta$  抗体 (Santa Cruz) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°Cで保存した。
- ・抗 mTOR 抗体溶液 (rabbit)
- ・抗 phospho-mTOR 抗体溶液 (rabbit)
- ・抗 S6K1 抗体溶液 (rabbit)
- ・抗 phospho-S6K1 抗体溶液 (mouse)
- ・抗 4E-BP1 抗体溶液 (rabbit)
- ・抗 PGC-1 $\alpha$  抗体溶液 (mouse)
- …抗 PGC-1 $\alpha$  抗体 (Melk millipore) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°Cで保存した。
- ・抗 uncoupling protein (UCP) -2 抗体溶液 (rabbit)

…抗 UCP-2 抗体 (Cell Signaling Technology) を一次抗体希釈液で 1,000 倍希釈し、4°C で保存した。

- ・抗  $\beta$ -actin 抗体溶液 (mouse)

## 7. qRT-PCR を用いた mRNA の定量

脂肪酸合成または  $\beta$  酸化に関わる因子の mRNA 発現量を qRT-PCR で定量した。

### (1) 肝臓組織からの total RNA の抽出

第4章 - 第2節 - 5 - (1) と同様の試薬に加え、下記の試薬を用いた。

- ・ 4M 塩化リチウム

…塩化リチウム 33.9 g を純水に溶解し、200 mL にフィルアップした。

- ・ 10 mM Tris/ 1 mM EDTA/ 0.5% SDS

…1 M Tris-HCl (pH 7.5) 1 mL、250 mM EDTA 0.4 mL、10% (w/v) SDS 5 mL を約 90 mL の純水に加えて混合し、純水を用いて 100 mL にフィルアップ後、オートクレーブで滅菌した。

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

肝臓組織約 100 g を試験管に入れ、1 mL の Sol D を加え、ダイヤル 4 に設定したポリトロ  
ンホモジナイザー (Kinematica) で氷冷しながらホモジナイズした。ホモジネート 800  $\mu$ L を  
2 mL 容遠心チューブに移し、2 M 酢酸ナトリウム (pH4.0) 80  $\mu$ L、水飽和フェノール 800  $\mu$ L、  
クロロホルム : イソアミルアルコール混合液 (49 : 1) 160  $\mu$ L を加え、よく攪拌した後、4°C  
で 15 分間静置した。4°C、14,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、RNA が溶解している上層約 800  $\mu$ L  
(水層) を新しい 2 mL 容遠心チューブに回収した。上層と等量の 2-プロパノールを加え、混  
合後した後、-20°C で 10 分以上静置した。次に、4°C、14,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、沈  
殿を得た。4M 塩化リチウム 200  $\mu$ L を加え、ピペッティングで沈殿を溶解した後、4°C、14,000

×g で10分間遠心分離した。沈殿を10 mM Tris/ 1 mM EDTA/ 0.5% SDS 200 μL に溶解した後、クロロホルム：イソアミルアルコール混合液（49：1）200 μL を加えて混合し、4℃、14,000 ×g で10分間遠心分離した。沈殿に2-プロパノール 200 μL と2 M 酢酸ナトリウム（pH4.0）20 μL を加えて混合し、4℃、14,000 ×g で10分間遠心分離した。この2回目の2-プロパノールによる沈殿の操作以降は第4章 - 第2節 - 5 - （1）と同様に行った。

## (2) RNA の定量

第2章 - 第2節 - 5 - （2）と同様に行った。

## (3) 逆転写反応

第5章 - 第2節 - 5 - （3）と同様に行った。

## (4) qRT-PCR

第5章 - 第2節 - 5 - （4）と同様に行った。ただし、プライマーはTable 6-3 に示したものをを用い、18S ribosomal RNA (18S) を housekeeping gene として PGC-1 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、FGF21、CPT-1a、ACO、SREBP-1c、FAS の mRNA 発現量を定量した。FGF21 用のプライマーの配列は東京大学清水誠助教にご供与頂いた。

Table 6-3 qRT-PCR 用プライマーの配列

Primer		Sequence
mouse PGC-1 $\alpha$	Forward	5'-CGGAAATCATATCCAACCAG-3'
	Reverse	5'-TGAGAACCGCTAGCAAGTTTG-3'
mouse PPAR $\alpha$	Forward	5'-CCCTGTTTGTGGCTGCTATAATTT-3'
	Reverse	5'-GGGAAGAGGAAGGTGTCATCTG-3'
mouse FGF21	Forward	5'-CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACAG-3'
	Reverse	5'-AAGCTGCAGGCCTCAGGAT-3'
mouse CPT-1a	Forward	5'-CTCCGCCTGAGCCATGAAG-3'
	Reverse	5'-CACCAGTGATGATGCCATTCT-3'



mouse ACO	Forward	5'-GCACCATTGCCATTCGATACA-3'
	Reverse	5'-CCACTGCTGTGAGAATAGCCGT-3'
mouse SREBP-1c	Forward	5'-GATCAAAGAGGAGCCAGTGC-3'
	Reverse	5'-TAGATGGTGGCTGCTGAGTG-3'
mouse FAS	Forward	5'-GGGTTCTAGCCAGCAGAGTC-3'
	Reverse	5'-TCAGCCACTTGAGTGTCTC-3'
18S	Forward	5'-GGTTGATCCTGCCAGGTAGC-3'
	Reverse	5'-GCGACCAAAGGAACCATAAC-3'

---

## 8. 統計処理

第 2 章 - 第 2 節 - 6 と同様に行った。

## 第3節 結果

SAMR1 を R、通常食を与えた SAMP8 を P、1.5% Lys 添加食を与えた SAMP8 を LK、3.0% Lys 添加食を与えた SAMP8 を K、3.0% Leu 添加食を与えた SAMP8 を L として示した。

## 1. 染色に供した肝臓切片の組織像

染色に供した肝臓の組織像を Fig. 6-1 に示した。なお、A には HE 染色時の組織像を、B には Oil Red O 染色時の組織像をそれぞれ示した。HE 染色では白点として確認される脂肪滴が、Oil Red O 染色では赤い点で示される脂肪滴が R と比較して P で顕著に多かったが、P と比較して LK、K、L では脂肪滴の蓄積が著しく抑えられた。

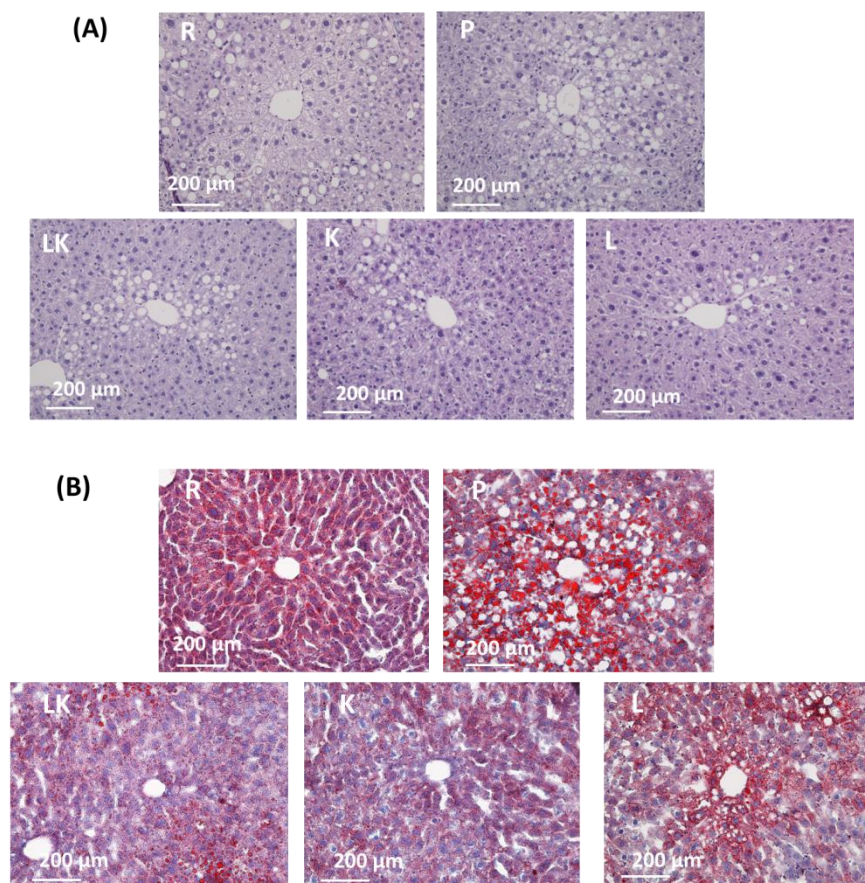


Fig. 6-1 染色した肝臓切片の組織像

A : HE 染色した肝臓、B : Oil Red O 染色した肝臓

スケールバー : 200 μm

## 2. 肝臓中 TG 及び TC 濃度

肝臓中の TG 及び TC 濃度を Fig. 6-2 に示した。なお、A には TG 濃度を示し、B には TC 濃度をそれぞれ示した。TG は R と比較して P で増加傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.09$  vs R) が認められ、P と比較して LK では減少傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.06$  vs P) が、K 及び L では顕著な減少が見られた。TC は R と P 間で有意差はなく、P と比較して LK、K、L で顕著な減少が認められた。LK、K、L の肝臓 TC 濃度は、R と有意差がなかった。

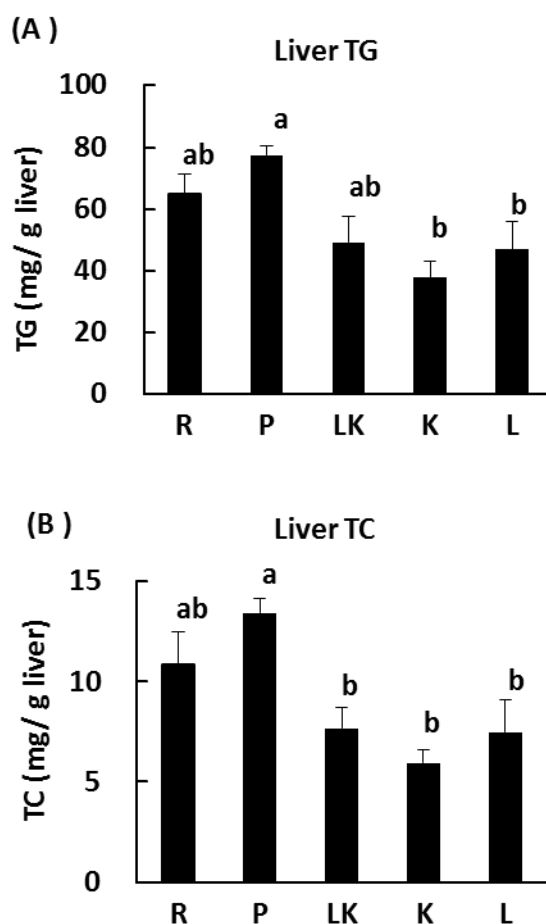


Fig. 6-2 肝臓中の TG 及び TC 濃度

A : 肝臓中 TG 濃度、B : 肝臓中 TC 濃度

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 3. 血漿中 TG 濃度

血漿中 TG 濃度を Fig. 6-3 に示した。血漿中 TG 濃度は R と P 間で有意差はなかったが、P と比較して LK では減少傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.0009$  vs P) が、K 及び L では P と比較して 40% 程度の有意な減少がそれぞれ認められた。LK、K、L は R と比較して有意差はなかった。

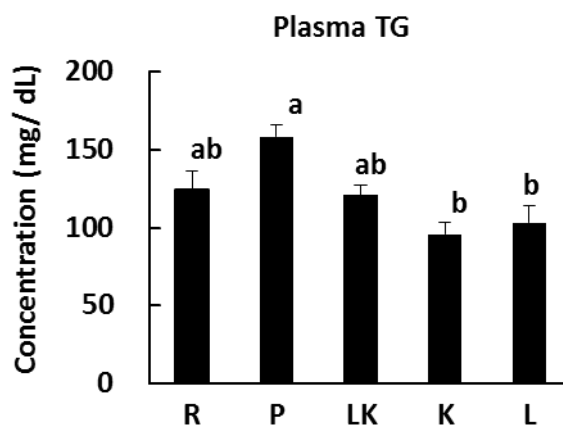


Fig. 6-3 血漿中 TG 濃度

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 4. 血漿中グルコース濃度

血漿中グルコース濃度を Fig. 6-4 に示した。血漿中グルコース濃度は R と比較して P で 30% 程度の有意な高値を示した。LK、K、L は R または P のいずれと比較しても有意差はなかった。

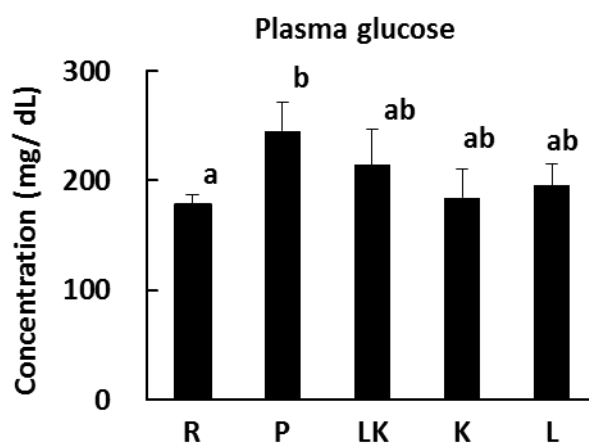


Fig. 6-4 血漿中グルコース濃度

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 5. 血漿中 ALT 及び AST 活性

血漿中の ALT 及び AST 活性を Fig. 6-5 に示した。なお、A には ALT 活性を示し、B には AST 活性をそれぞれ示した。血漿中の ALT 活性は R と比較して P で 35%程度有意に高く、P と比較して LK と K では減少傾向が見られた (unpaired *t*-test : LK :  $p=0.04$  vs P、K :  $p=0.04$  vs P)。ALT は肝障害の指標であることから、SAMP8 の肝臓では肝障害が生じているが、Lys の摂取によって SAMP8 で生じる肝障害が緩和されると考えられた。一方、血漿中の AST 活性は群間で差はなかった。

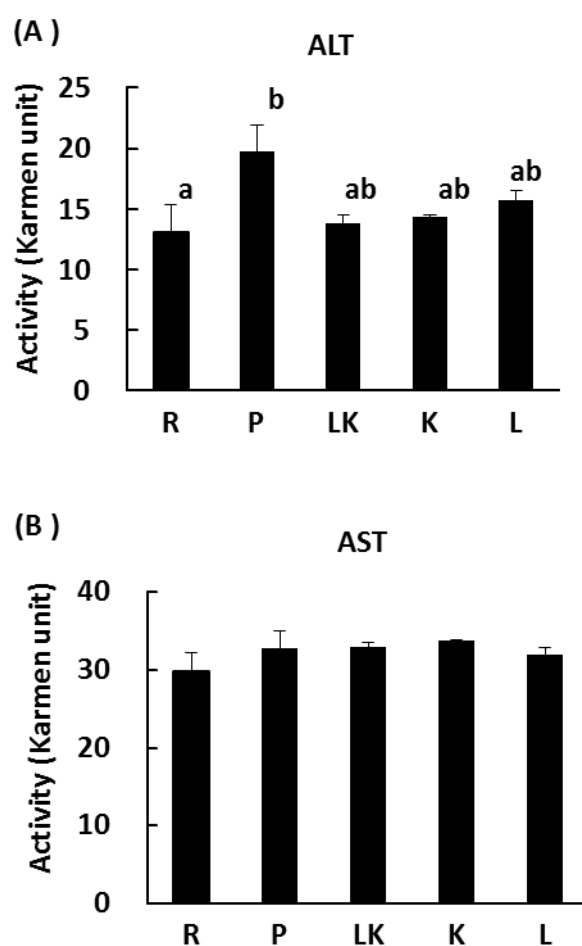


Fig. 6-5 血漿中 ALT 及び AST 活性

A : 血漿中 ALT 活性、B : 血漿中 AST 活性

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 6. 脂肪酸合成に関与する酵素の活性及び量

脂肪酸合成に関与する酵素の活性及び量を Fig. 6-6 に示した。なお、A には代表的なバンドを示し、B には ACC のリン酸化率から求めた活性を、C にはリン酸化 ACC の量を、D には ACC の量を、E には FAS の量をそれぞれ示した。ACC のリン酸化率は群間で差はなかったが (Fig. 6-6B)、 $\beta$ -actin で補正したリン酸化 ACC 量は R と比較して P 及び L で有意な低値を示した (Fig. 6-6C)。また、リン酸化 ACC 量は、LK 及び K においては R との差はなく、P 及び L と比較して有意な高値を示した。ACC 量は R と比較して P 及び L で有意な低値を示し、LK 及び K においては R との差はなく、P 及び L と比較して有意な高値を示した (Fig. 6-6D)。FAS 量は群間で有意差はなかったが、R と比較し、P で少ない傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs R) が見られた (Fig. 6-6E)。

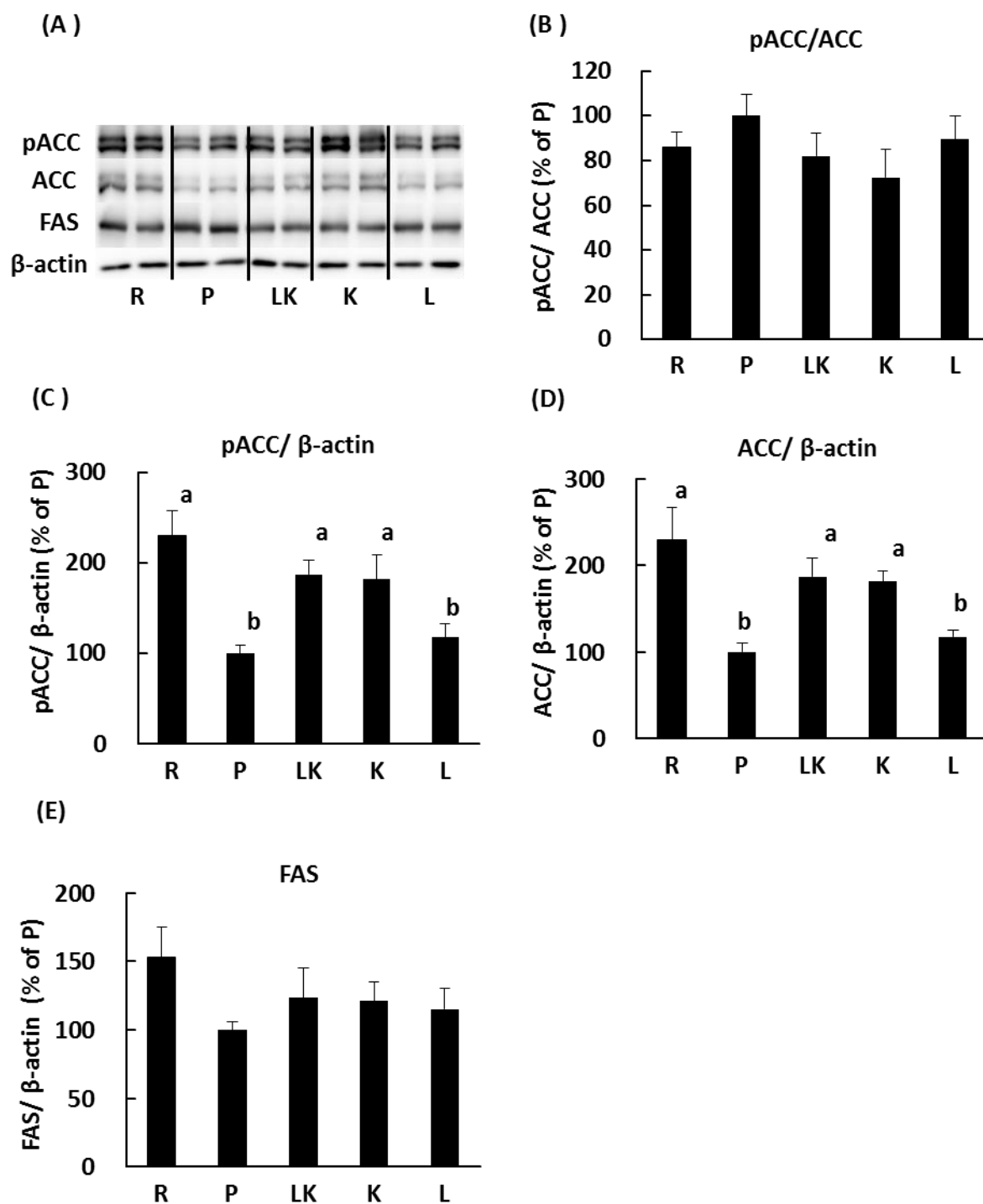


Fig. 6-6 肝臓における脂肪酸合成に関与する酵素の活性及び量

A : 代表的なバンド、B : ACC のリン酸化率、C : pACC 量、D : ACC 量、E : FAS 量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p < 0.05$ ) あり。

## 7. Akt、Erk、AMPK の活性

Akt、Erk、AMPK を Fig. 6-7 に示した。Akt、Erk、AMPK の活性はそれぞれのリン酸化率から求めた。なお、A には代表的なバンドを示し、B には Akt の、C には Erk の、D には AMPK のリン酸化率をそれぞれ示した。Akt のリン酸化率は Ser 残基及び Thr 残基のいずれにおいても R と比較して P で有意に低値を示し、LK、K、L は P と比較して有意に高く R との差はなかった (Fig. 6-7B)。Erk のリン酸化率は R と比較して P で有意に低値を示し、LK、K、L は P と比較して有意に高く R との差はなかった (Fig. 6-7C)。AMPK のリン酸化率は群間で差はなかった (Fig. 6-7D)。以上の結果から、Lys の摂取は SAMP8 の肝臓で生じる Akt 及び Erk の活性低下を顕著に抑えると考えられた。

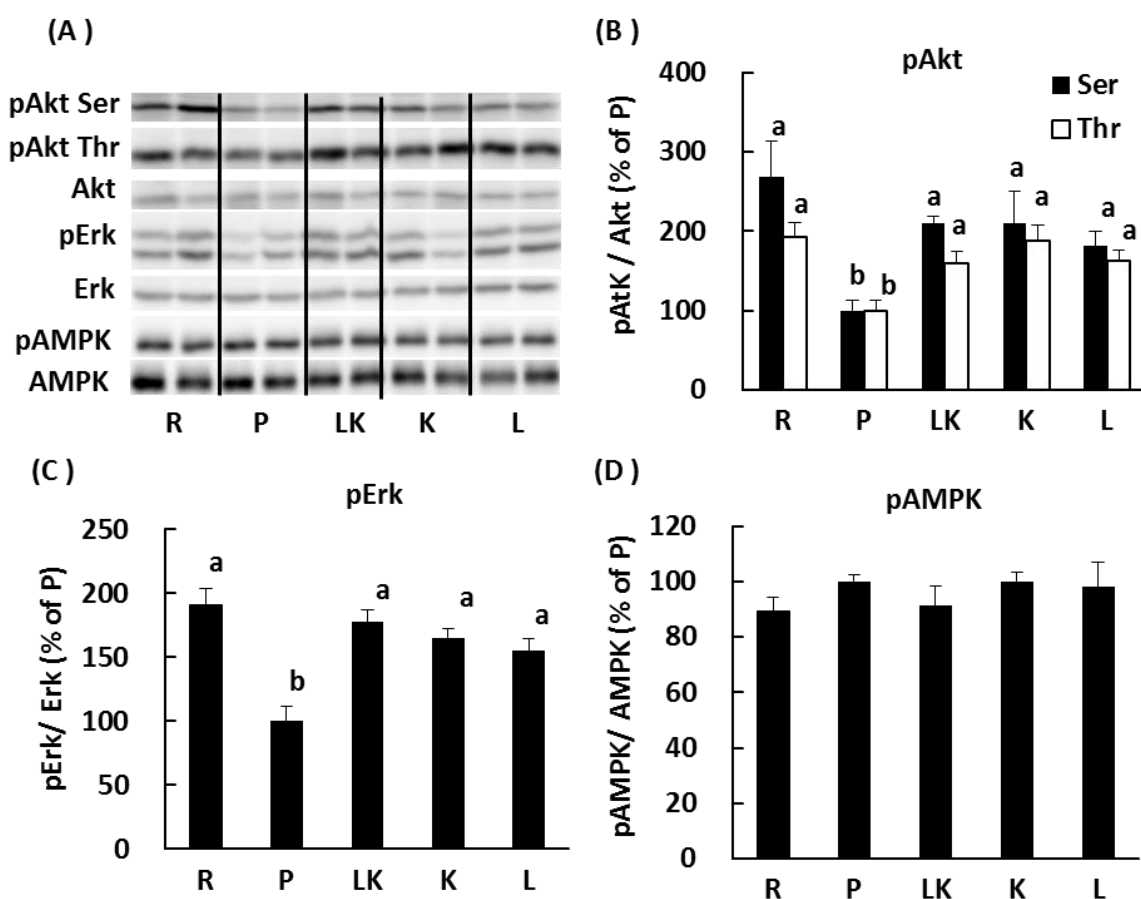


Fig. 6-7 肝臓における Akt、Erk、AMPK の活性

A : 代表的なバンド、B : Akt のリン酸化率 (黒 : Ser 残基、白 : Thr 残基)、

C : Erk のリン酸化率、D : AMPK のリン酸化率

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 8. IR 近傍の分子量における Tyr リン酸化率

インスリン受容体 (IR) とその近傍の分子量のリン酸化 Tyr (pY) の量比から算出した IR のリン酸化率を Fig. 6-8 に示した。IR のリン酸化率は R と比較して P で有意に低値を示したが、LK、K、L は R と有意差がなかった。この結果から、Lys の摂取によって SAMP8 の肝臓におけるインスリン感受性が改善する可能性が示唆された。

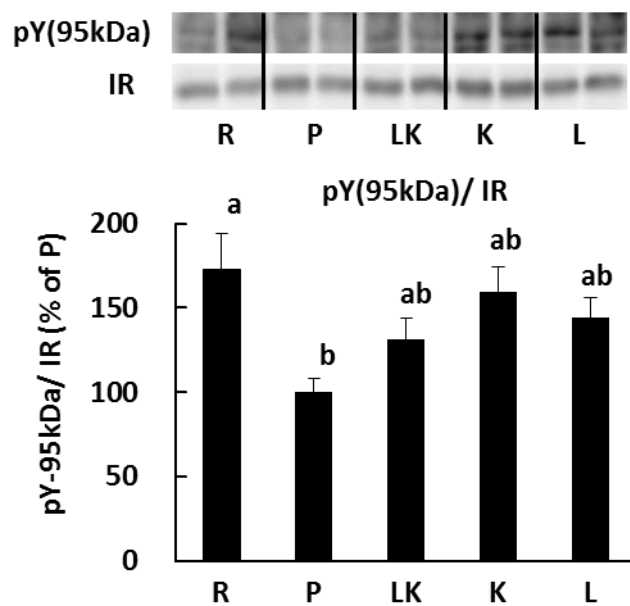


Fig. 6-8 肝臓における IR のリン酸化率

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 9. mTOR signaling の活性

mTOR signaling の活性を Fig. 6-9 に示した。mTOR signaling の活性は、mTOR 及びその下流の S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化率から評価した。なお、A には代表的なバンドを、B には mTOR の、C には S6K1 の、D には 4E-BP1 のリン酸化率をそれぞれ示した。mTOR、S6K1、4E-BP1 のリン酸化率は群間で差はなく、Lys による抗脂肪肝効果には mTOR 経路は関与しないと考えられた (Fig. 6-9)。

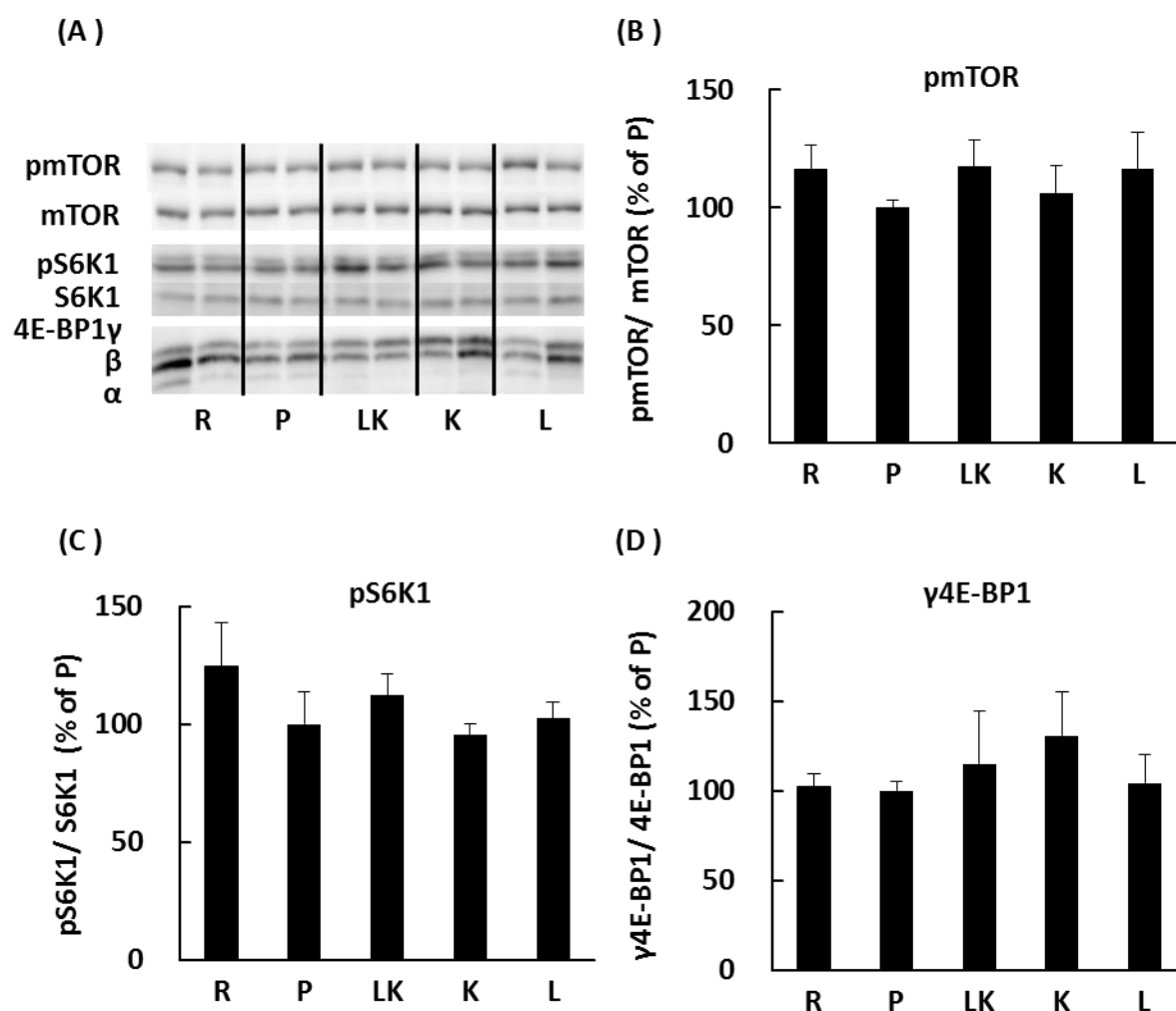


Fig. 6-9 肝臓における mTOR signaling の活性

A : 代表的なバンド、B : mTOR のリン酸化率、C : S6K1 のリン酸化率、D : 4E-BP1 のリン酸化率

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 10. 脂肪酸合成の制御に関与する遺伝子の mRNA 発現量

脂肪酸合成を制御する SREBP-1c と FAS の mRNA 量を Fig. 6-10 に示した。なお、A には SREBP-1c の mRNA 量を、B には FAS の mRNA 量をそれぞれ示した。SREBP-1c の mRNA 量は群間で有意差はなかったが、P と比較し、LK、または K で多い傾向が見られた (Fig. 6-10A、unpaired *t*-test : LK :  $p=0.04$  vs P、K :  $p=0.09$  vs P)。また、FAS の mRNA 量は群間で有意差はなかったが、P と比較し、LK、または K で多い傾向が見られた (Fig. 6-10B、unpaired *t*-test : LK :  $p=0.04$  vs P、K :  $p=0.004$  vs P)。これらの結果から、Lys による抗脂肪肝効果には脂肪酸合成の抑制は関与しないと考えられた。

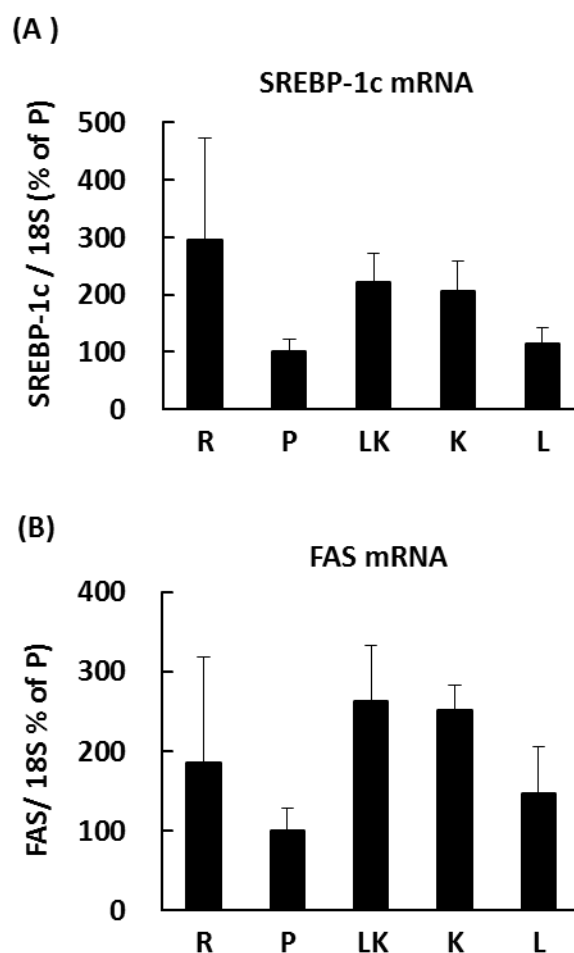


Fig. 6-10 肝臓における脂肪酸合成を制御する因子の mRNA 発現量

A : SREBP-1c の mRNA 発現量、B : FAS の mRNA 発現量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

11. PGC-1 $\alpha$  のタンパク質量

PGC-1 $\alpha$  のタンパク質量を Fig. 6-10 に示した。PGC-1 $\alpha$  のタンパク質量は R と比較して P で有意な低値を示した。LK、K、L は R と比較して有意差はなく、P と比較して 30%程度多い傾向が見られた (unpaired *t*-test : LK :  $p=0.06$  vs P、K :  $p=0.02$  vs P、L :  $p=0.005$  vs P)。PGC-1 $\alpha$  はミトコンドリア新生やエネルギー代謝の制御に関与することが知られているため[14]、SAMP8 の肝臓では PGC-1 $\alpha$  の減少によるミトコンドリア量や機能の減少が生じており、Lys は PGC-1 $\alpha$  の維持・増加を介して肝臓のミトコンドリア機能を保護している可能性が考えられた。

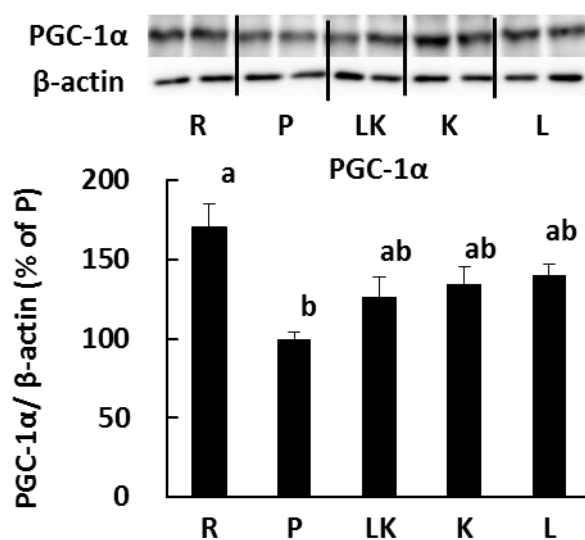


Fig. 6-11 肝臓における PGC-1 $\alpha$  のタンパク質量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

12. PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量

PGC-1 $\alpha$  の mRNA 量を Fig. 6-12 に示した。PGC-1 $\alpha$  の mRNA 量は R と P の間に有意差はなかったが、P と比較して LK で 100%程度、L で 70%程度多い傾向があり (unpaired *t*-test : LK :  $p=0.08$ 、L :  $p=0.10$ )、K は顕著に多く、P と比較して 160%程度の増加が認められた。この結果から、Lys の摂取は肝臓における PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量を増加させ、肝臓における脂質代謝を制御していると考えられた。

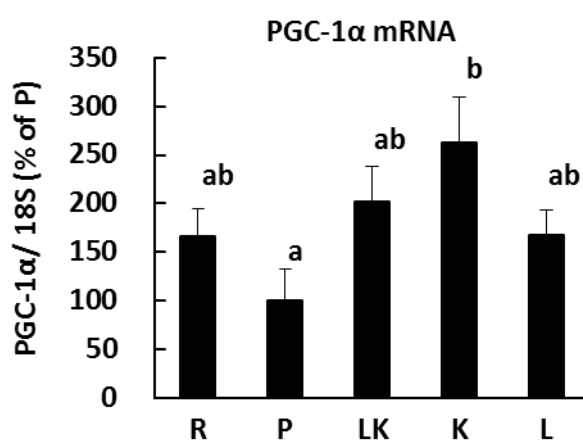


Fig. 6-12 肝臓における PGC-1 $\alpha$  の mRNA 量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

13.  $\beta$  酸化の制御に関わる遺伝子の mRNA 発現量

$\beta$  酸化の制御に関わる CPT-1a、ACO、PPAR $\alpha$ 、FGF21 の mRNA 発現量を Fig. 6-13 に示した。なお、A には CPT-1a の、B には ACO の、C には PPAR $\alpha$  の、D には FGF21 の mRNA 発現量をそれぞれ示した。CPT-1a の mRNA 発現量は R と P 間で差はなかった。LK は P と比較して CPT-1a の mRNA 発現量が多い傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.08$  vs P) があり、K は P と比較して顕著な高値を示した (Fig. 6-13A)。したがって、Lys の摂取は濃度依存的に肝臓における CPT-1a の mRNA 発現を亢進すると考えられた。一方、ACO の mRNA 発現量は群間で差はなかったが、Lys の摂取によって増加する挙動が見られた (Fig. 6-13B)。PPAR $\alpha$  の mRNA 発現量は群間で有意差はなかったが、R と比較して P で 60%程度少ない傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.09$  vs R) があり、LK と K は P よりもそれぞれ 100%、120%程度多い傾向がそれぞれ認められた (unpaired *t*-test : Fig. 6-13C、LK :  $p=0.01$  vs P、K :  $p=0.05$  vs P)。したがって、Lys による抗脂肪肝効果には、PPAR $\alpha$  の mRNA 発現制御も関与する可能性が考えられた。FGF21 の mRNA 発現量は群間で差はなかった (Fig. 6-13D)。

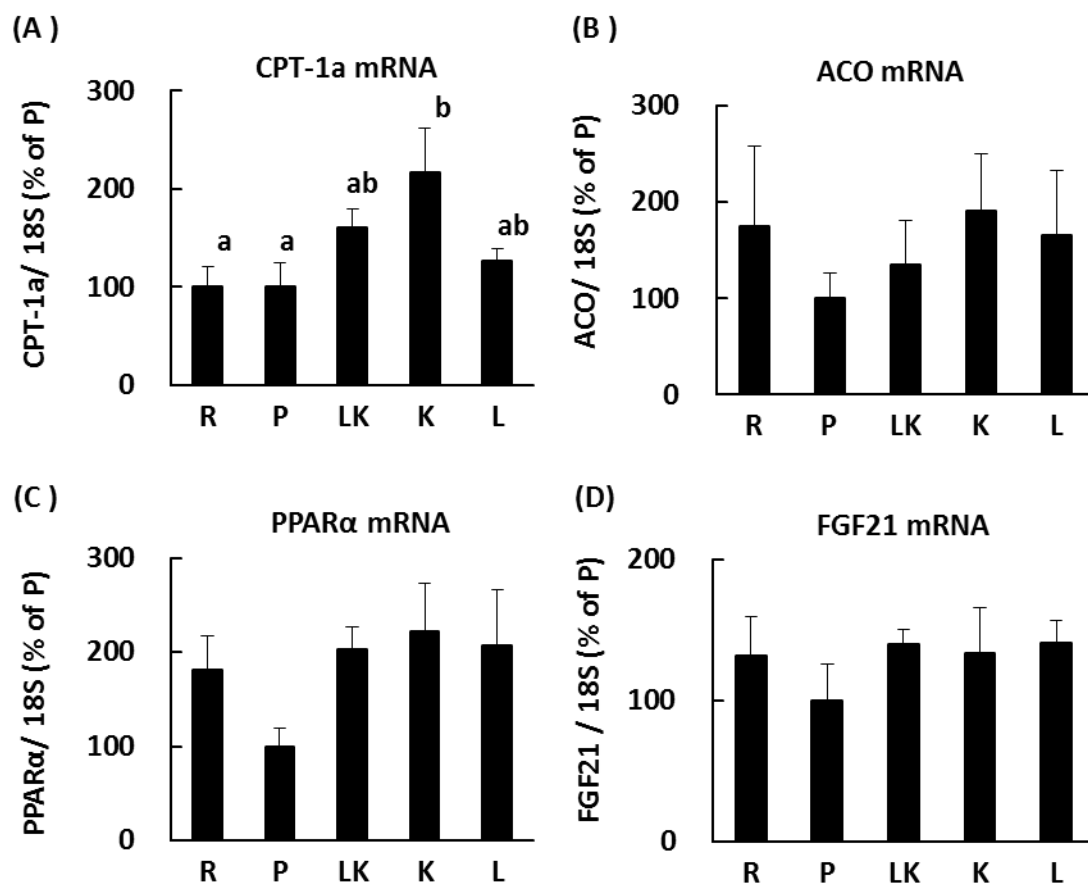


Fig. 6-13 肝臓における $\beta$ 酸化の制御に関わる遺伝子の mRNA 発現量

A : CPT-1a、B : ACO、C : PPAR $\alpha$ 、D : FGF21

値は平均 $\pm$ 標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

14. オートファジーの活性指標

オートファジーの活性指標を Fig. 6-14 に示した。なお、A には代表的なバンドを、B には LC3、C には beclin-1、D には p62 の結果をそれぞれ示した。

LC3-II は SAMR1 と比較して SAMP8 の肝臓で有意に高値を示し、Lys や Leu 摂取による効果は認められなかった。また、total LC3 量は群間で差はなかったが、P と比較して LK、K、L でそれぞれ多い傾向が見られた。Beclin-1 は群間で差はなかった。Beclin-1 の増加が P で認められなかったことを考慮すると、SAMP8 の肝臓では beclin-1 に依存しない経路でオートファジーの亢進が生じているか、オートファジーの不全が生じていると考えられた。p62 は R と比較して P で高値を示したが、LK は R との有意差はなく、K 及び L は P と比較して有意な低値を示した。したがって、Lys は濃度依存的に SAMP8 の肝臓における選択的オートファジーの改善に寄与したと考えられる。

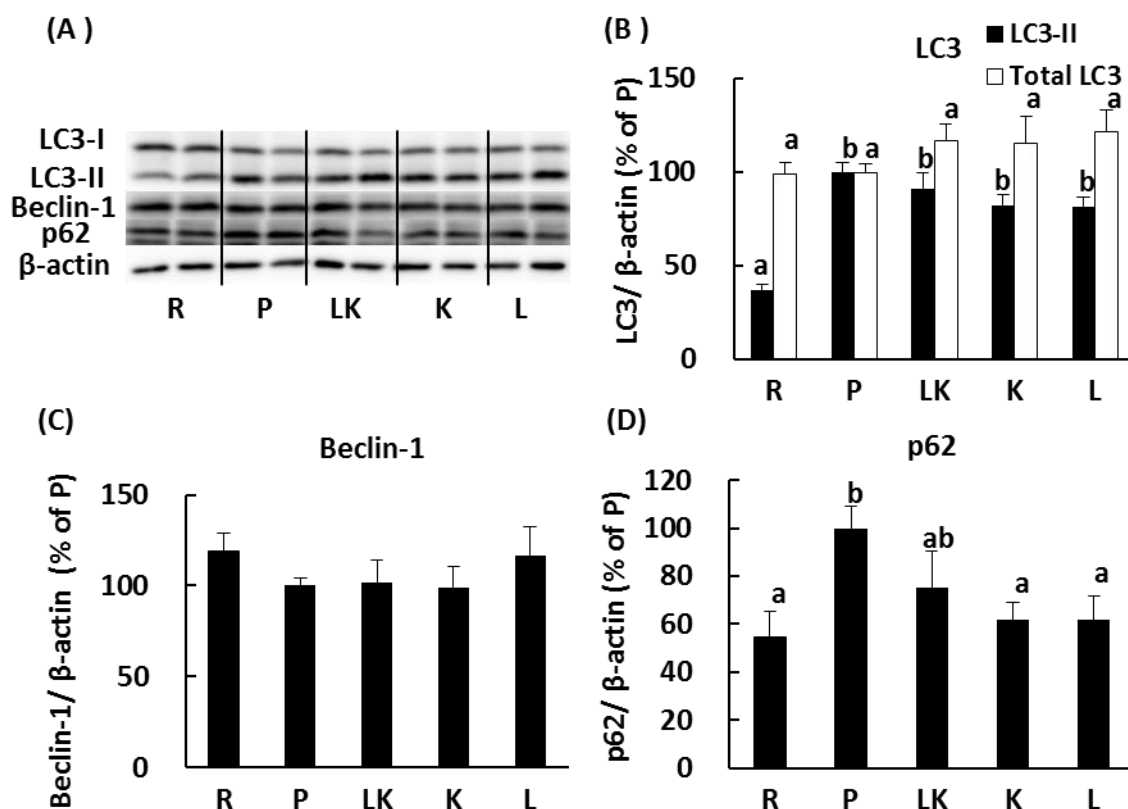


Fig. 6-14 オートファジーの活性指標

A : 代表的なバンド、B : LC3、C : beclin-1、D : p62

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 15. UCP-2 のタンパク質量

肝臓における UCP-2 のタンパク質量を Fig. 6-15 に示した。UCP-2 は群間で有意差はなかったが、R と比較して P で 35% 程度低い傾向 (unpaired *t*-test :  $p=0.10$  vs R) が見られた。したがって、SAMP8 の肝臓では、SAMR1 と比較して、UCP-2 の減少によるエネルギーの散逸が減少しており、Lys の摂取は UCP-2 に影響しないと考えられた。

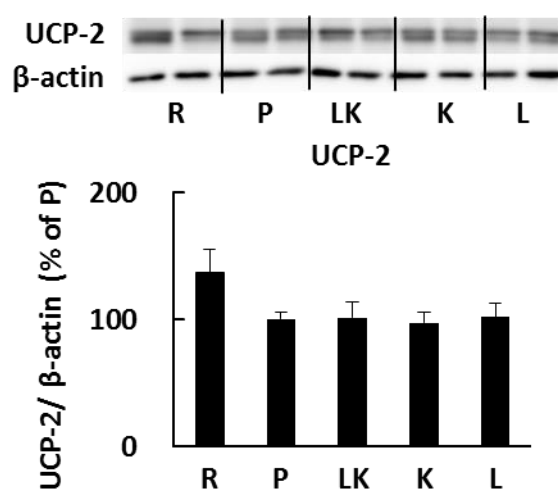


Fig. 6-15 UCP-2 のタンパク質量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。

## 第 4 節 考察

一般的にサルコペニアには、一次性（原発性）サルコペニアと二次性サルコペニアの 2 通りの分類がある[5]。一次性サルコペニアとは、加齢以外の原因がない場合に生じるサルコペニアであり、二次性サルコペニアとは、寝たきりをはじめとする活動性の低下、臓器の不全、炎症性疾患、悪性腫瘍、内分泌疾患、吸収不良、タンパク質の摂取量不足など、加齢以外を原因とする可能性が高いサルコペニアである。特に、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はサルコペニアとよく相関することから（肝硬変患者におけるサルコペニアの合併頻度は 40~70%である[5]）、二次性サルコペニアの要因と考えられており[91]、さらに加齢は NAFLD のリスクファクターとなることが知られている[70,71]。他方で、骨格筋量の減少は脂質代謝を悪化させるため[95]、サルコペニアの進行が NAFLD を招くという仮説もある。いずれにせよ、サルコペニアの予防を試みる上では、NAFLD の予防も重要であると考えられる。本研究では、老化促進モデル SAMP8 を、サルコペニアを呈するモデルとして用いたが、SAMP8 は非アルコール性脂肪肝を発症することも報告されている[92,93]。本実験において、SAMP8 の肝臓切片を HE 染色及び Oil Red O 染色に供したところ、脂肪滴の顕著な蓄積が認められた (Fig. 6-1)。さらに、肝臓中の TG 及び TC 量を測定した結果、SAMP8 の肝臓において TG と TC が蓄積しており (Fig. 6-2)、肝障害の指標である ALT 活性は、SAMR1 と比較して、通常食を摂取した SAMP8 で有意な高値を示した (Fig. 6-5)。したがって、SAMP8 では高脂肪食やアルコールの摂取なしに脂肪肝を発症し、それに伴う肝障害が生じると考えられた。

Lys の過剰摂取は Arg 取込みの競合阻害によってオロト酸の生合成を亢進し、肝臓への脂肪蓄積を招くことが知られているが[96]、適量の Lys はむしろ脂肪肝の緩和に働くことが報告されている[85]。同様に、Leu の摂取も脂肪肝の緩和に寄与する可能性が示唆されている[85]。1.5%及び 3.0% Lys 添加食を摂取した SAMP8 では、肝臓切片における脂肪滴の蓄積が顕著に抑えられ (Fig. 6-1)、通常食を摂取した SAMP8 と比較して、肝臓中の TG 及び TC 量も減少、または減少傾向が認められた (Fig. 6-2)。また、3.0% Leu 添加食を摂取した SAMP8 においても 3.0% Lys 添加食と同様の効果が認められた (Figs. 6-1,6-2)。したがって、Lys 及び Leu の摂

取は、加齢時に生じる非アルコール性脂肪肝の予防に働くと考えられる。

Lysによる抗脂肪肝効果の作用機序について詳しく解析した例はない。そこで、Lysによる抗脂肪肝効果の作用機序を、SAMP8において解析した。脂肪酸合成に関与するFASやSREBP-1c[97]のmRNA発現量はLysやLeuの摂取によって減少しなかった(Fig. 6-10)。また、アセチルCoAをマロニルCoAに変換する反応を触媒するACC[98]のリン酸化率にもLysやLeuによる影響は認められなかった(Fig. 6-6B)。さらに、脂肪酸合成を制御するmTOR経路[99]の活性も群間で差は認められなかった(Fig. 6-9)。したがって、LysやLeuによる抗脂肪肝効果は、脂肪酸合成の抑制を介した効果ではないと考えられた。一方、 $\beta$ 酸化の制御に働くPGC-1 $\alpha$ [100,101]やCPT-1 $\alpha$ [101]のmRNA発現量は、通常食を摂取したSAMP8と比較して、3.0% Lys添加食の摂取によって有意に高値を示し、1.5% Lys添加食を摂取したSAMP8でも増加傾向が認められた(Figs. 6-12,6-13A)。同様に、 $\beta$ 酸化を制御するPPAR $\alpha$ [102]やACO[103]のmRNA発現量もPGC-1 $\alpha$ やCPT-1 $\alpha$ と同じ挙動が認められた(Fig. 6-13B,C)。一方、PPAR $\alpha$ によって制御され、肝臓脂質代謝制御において中心的な役割を果たすFGF21[104]のmRNA発現量に群間で差はなかった(Fig. 6-13D)。したがって、Lysは肝臓における $\beta$ 酸化を亢進、もしくは高いレベルに維持し、脂肪肝の予防に寄与したと考えられる。小林ら[85]は、Lysの摂取は肝臓におけるAMPK活性を上昇させることでPGC-1 $\alpha$ を増加することを示唆している。しかし、本研究ではLysの摂取によるAMPKの活性化は認められなかった(Fig. 6-7D)。本実験ではLys添加食摂取3時間後に解剖し、組織を摘出している。そのため、Lys摂取1時間後など、本実験とは異なるタイミングにおいては、LysによるAMPKの活性化が生じている可能性も考えられる。一方、3.0% Leu添加食を摂取したSAMP8の肝臓においては、PGC-1 $\alpha$ の増加傾向は認められたものの(Figs. 6-11,6-12)、 $\beta$ 酸化関連遺伝子のmRNA発現量に有意な増加は認められなかった(Fig. 6-13)。そのため、LeuはLysとは異なる機序でSAMP8における脂肪肝の予防に寄与した可能性がある。

本実験では、肝臓における脱共役タンパク質UCP-2の量について評価を行った。UCPは、ミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として散逸する

機能を持っている[105]。UCPのうち、UCP-1は褐色脂肪組織に、UCP-3は褐色脂肪組織と特に骨格筋に高発現しており、UCP-2は白色脂肪組織や肝臓を含む様々な組織でほぼユビキタスに発現している[105]。Lysによる抗脂肪肝効果とUCPの関与を明らかにするため、肝臓におけるUCP-2の量を評価したが、LysによるUCP-2の上方制御は認められなかった(Fig. 6-15)。したがって、Lysによる抗脂肪肝効果には、UCP-2を介したエネルギーの散逸は関与しないと考えられる。一方で、UCP-2のタンパク質量はSAMR1と比較して通常食を摂取したSAMP8で低い傾向が認められた。そのため、SAMP8の肝臓ではUCP-2を介したエネルギーの散逸機能が低下しており、脂肪肝の進展に寄与している可能性が考えられた。

脂肪肝の発症時にはインスリン抵抗性に伴うインスリン経路の活性低下が生じる[106]。Aktはインスリン経路において中心的な役割を果たすSer/Thr kinaseであり、肝臓におけるAkt活性は、SAMR1と比較して、通常食を摂取したSAMP8で顕著な低値を示した(Fig. 6-7B)。さらに、インスリン経路を構成するErkの活性(Fig. 6-7C)やIR近傍のTyrリン酸化量(Fig. 6-8)も、Aktと同様の結果であった。一方、LysまたはLeuを摂取したSAMP8の肝臓におけるIR近傍のTyrリン酸化量、Akt及びErkの活性は、通常食を摂取したSAMP8と比較して有意な高値を示し、SAMR1との差も認められなかった(Figs. 6-7, 6-8)。第5章より、血漿中インスリン濃度は、P、LK、K、Lの4群間で差がなかったことを考慮すると、Lys及びLeuの摂取によりインスリンの感受性が改善した可能性が考えられる。AktはACCやSREBP-1cといった脂肪酸合成関連因子の遺伝子発現を促進させる[107]。SAMR1と比較し、通常食を摂取したSAMP8の肝臓ではtotal ACC量とリン酸化ACC量が減少しており、LysやLeuを摂取した群ではSAMR1との差はなかった(Fig. 6-6C,D)。さらに、同様の挙動がSREBP-1cやFASのmRNA発現量においても認められた(Fig. 6-10)。したがって、SAMP8の肝臓ではインスリン経路の活性低下が生じており、それに伴って脂肪酸合成関連因子の転写が抑えられた状態にあるが、LysやLeuを摂取することでインスリン感受性が高まり、Aktを介した脂肪酸合成関連因子の転写が維持されたと推察される。また、血漿中のグルコース濃度は、SAMR1と比較して、通常食を摂取したSAMP8で有意に高値を示していたが、LysやLeuの摂取によ

り血漿中グルコース濃度は減少する傾向が認められた (Fig. 6-4)。そのため、肝臓におけるインスリン感受性の改善は全身の血糖調節にも寄与したと考えられる。

複数のケト原生アミノ酸の同時摂取は高脂肪食誘導性の脂肪肝の予防に働くことが報告されている[108]。しかし、SAMP8 において食餌に添加したアミノ酸以外に、血漿中のケト原生アミノ酸濃度の増加は認められなかった。したがって、Lys 及び Leu 添加食の摂取による抗脂肪肝効果は、食餌に添加した Lys や Leu、またはその代謝関連物質による作用であると考えられた。Lys の代謝関連物質としてはカルニチンが脂質代謝の制御に働くことが知られている。カルニチンは Lys と Met から生合成され、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内へ輸送する際のキャリアとして機能する。さらに、カルニチンは 3T3-L1 脂肪細胞において、CPT-1a や ACO の mRNA 発現量を増やし、 $\beta$  酸化を促進することが知られている[109]。肝細胞の脂質代謝に対するカルニチンの効果は不明であるが、肝細胞においてもカルニチンが  $\beta$  酸化を亢進する機能を有していれば、Lys 摂取時の抗脂肪肝効果がカルニチンに依存する可能性も否定できない。また、カルニチン以外の Lys の代謝関連物質による脂質代謝制御機能性についての報告はないため、Lys 代謝関連物質が脂質代謝に及ぼす影響についても評価する必要がある。また、Met も脂質代謝の制御に働くが[85]、Lys 摂取時の血漿中 Met 濃度に変化はなかった (Fig. 5-7C)。また、Met による脂質代謝の制御は Lys よりも弱いことが示唆されている[85]。そのため、Lys の摂取による抗脂肪肝効果において Met の関与は否定できないものの、中心的な機能を果たす可能性は低いと考えられる。

また、第5章において、SAMP8 の血漿中 Met 濃度が SAMR1 と比較して有意に高値であることを確認している。本研究では Met 代謝産物の測定はしていないが、高 Met 血症は生体内の Met 代謝が一部不全を起こしている可能性を示唆する。Met 代謝が滞ると、血漿中で Met やその代謝産物である S-adenosylmethionine が増加し、老化[110]やリポファジーの不全[111]を招く。また、通常食を摂取した SAMP8 の肝臓では SAMR1 と比較して p62 の蓄積が認められており、併せて beclin-1 の増加は認められない一方で LC3-II の蓄積が見られた (Fig. 6-14)。そのため、SAMP8 では Met 代謝の不全が生じており、蓄積した Met や S-adenosylmethionine

によって PP2A がメチル化され、肝臓におけるリポファジーの不全が生じている可能性も考えられる。一方で、Lys や Leu を摂取した SAMP8 の肝臓では p62 の蓄積が抑えられた。ケト原生アミノ酸の摂取はリポファジーを亢進することが報告されており[108]、total の LC3 量も Lys や Leu の摂取で増加する挙動があったことから (Fig. 6-14B)、Lys や Leu による抗脂肪肝効果はリポファジーの亢進を介する可能性も考えられる。AMPK はオートファジーの亢進に働くため、Lys によるリポファジーの亢進作用には PGC-1 $\alpha$  と同様に AMPK が関与する可能性がある。Lys や Leu による抗脂肪肝効果とリポファジーの関与を明らかにするためには、蛍光免疫染色を用いて、脂肪滴へのオートファゴソームの局在が Lys や Leu の摂取時に増加しているかを確認する必要がある。

以上より、Lys や Leu の摂取は  $\beta$  酸化やリポファジーの亢進によって SAMP8 で生じる脂肪肝を抑える可能性が示された。SAMP8 はサルコペニアと非アルコール性脂肪肝を併発するため、SAMP8 で生じるサルコペニアは脂肪肝を発端とする二次性サルコペニアであり、Lys や Leu の摂取で脂肪肝を抑えたことがサルコペニアの緩和につながった可能性もある。SAMP8 のサルコペニアに Lys の摂取が及ぼす効果が直接的なものであるか、間接的なものであるかを明らかにするためには、脂肪肝を発症しない一次性サルコペニアモデルにおいて抗サルコペニア作用を検討することが必要と考えられる。あるいは、NAFLD 誘導性のサルコペニアには、血中のインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor 1 : IGF-1) の減少が関与する可能性が指摘されているため[112]、IGF-1 を測定することによって SAMP8 で生じるサルコペニアが二次性のものであるかを間接的に評価できる可能性はある。

## 第7章 還元型コエンザイム Q10 による抗サルコペニア効果の検討

## 第1節 目的

第5章において Lys の抗サルコペニア効果を、第6章において Lys の非アルコール性脂肪肝予防効果を SAMP8 でそれぞれ見出した。しかし、第5章において、Lys 添加食を摂取した SAMP8 ではサルコペニアの緩和効果が見られたものの、正常モデルである SAMR1 の骨格筋重量とは明瞭な差があり、サルコペニアの予防と呼ぶには十分な効果ではなかった。サルコペニアの発症機構は未だ解明されていないが、酸化ストレスやミトコンドリアの機能不全、細胞内品質管理システムの破綻が関与する可能性が指摘されている[15,82,83,87-89]。実際、第5章においては SAMP8 の骨格筋における p62 の蓄積や Mul1 及び PGC-1 $\alpha$  の減少が認められた。したがって、異常化したミトコンドリアを選択的に排除するか、あるいはミトコンドリアで生じる活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を消去する試みがサルコペニア予防に有効である可能性がある。

コエンザイム Q10 は、脂溶性の補酵素で、酸化型である ubiquinone-10 (酸化型コエンザイム Q10、QO) は4つの置換基を持つベンゾキノンで、置換基のうち1つは長い疎水性の側鎖である。この側鎖はコエンザイム Q10 の場合、10個のイソプレノイド単位から成り、脂質膜に溶け込ませる役割を担っている。QO はミトコンドリアの電子伝達系において、電子のキャリアとして機能し、1度に1~2個の電子をやり取りする[108]。そして、QO が完全に還元されると、ubiquinol-10 (還元型コエンザイム Q10、QH) となる。QH は、QO と比較して抗酸化性に優れ[113]、経口摂取で骨格筋のミトコンドリアへ移行することが報告されている[114]。さらに、生体内の QH は加齢依存的に減少し[115]、QH の摂取は老化促進モデルマウス SAMP1 における老化現象の軽減に寄与することも示唆されている[116]。そこで、本章では、QH の経口摂取による抗サルコペニア効果を QO と比較し、さらに Lys と組み合わせた場合の効果を検討することを目的として実験を行った。

## 第2節 方法

## 1. 細胞実験 QH が C2C12 筋管細胞における ROS とオートファジーに及ぼす効果

QH は経口摂取後に骨格筋のミトコンドリアへ移行することは報告されているが、骨格筋細胞内における抗酸化性を評価した研究例はない。そこで、酸化ストレスを惹起した骨格筋培養細胞株における QH の抗酸化能を評価した。培養細胞として、C2C12 細胞を用いた。なお、第2章と第3章で使用していた C2C12 細胞に継代数増加による分化効率の低下が認められたため、本章では ATCC (American Type Culture Collection : USA) より購入した C2C12 細胞を用いた。

## 1 - (1) C2C12 筋芽細胞の継代培養

第2章 - 第2節 - 1 - (1) と同様に行った。

## 1 - (2) C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化誘導

6cm dish においては第2章 - 第2節 - 1 - (2) と同様に行った。ただし、播種時の細胞数は  $9 \times 10^5$  とし、分化誘導期間は4日間とした。

低自家蛍光の 24well plate (lumox multiwell 24、SARSTEDT : Germany) で分化誘導を行う場合には、各ウェルあたりの細胞数が  $1.0 \times 10^5$  となるように播種し、サブコンフルエントまで増殖させた後に培地を DMEM+2% HS に交換し、4日間分化誘導を行った。この間、培地は24時間ごとに交換した。

## 1 - (3) QH の水溶化

QH は親水性が極めて低く、有機溶媒に溶かしたとしても培地などに添加した場合にはただちに析出し、細胞内にはほとんど取り込まれない。そのため、乳化剤を用いて QH と QO を水溶化した[116]。なお、水溶化のプロトコールは株式会社カネカ (大阪) より提供頂いた。

下記の試薬を用いた。



- ・ HCO-60 (日光ケミカル：東京)
- ・ QH 原末 (株式会社カネカ)
- ・ QO 原末 (株式会社カネカ)
- ・ グリセロール

(明記していない試薬は、試薬特級、和光純薬工業株式会社)

HCO-60 1 g を秤量し、50 mL 用の遠心管に入れ、これを 60°C で加温し、融解した。HCO-60 が完全に融解した後、QH または QO のいずれかを 0.2 g 加え、加温しながら混和した。混和後、0.8 g のグリセロールを加え、加温しながら完全に均一になるまで混和した(可溶化原液)。60°C で加温した純水 1 mL が入った 15 mL 容遠心管に 1 g の可溶化原液を加え、その後 60°C で加温した純水 15 mL を 7 mL 添加し、加温しながら完全に溶解するまで混和した。すべて溶解したことを確認し、10 mL にメスアップした(水溶化 QH、水溶化 QO)。なお、実験のコントロールとして用いる vehicle は QH や QO の代わりにグリセロールを用いて調製した。

#### 1 - (4) 活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の測定

C2C12 筋管細胞における QH の抗酸化性を評価するため、細胞浸透性蛍光プローブである 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いた実験を行った。DCFH-DA は細胞内に浸透した後、細胞内のエステラーゼにより脱アセチル化され、非蛍光型の 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) になる。DCFH は、細胞内の ROS によって酸化され、強く蛍光する 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) へ変化する。そのため、DCF 由来の蛍光強度が細胞内 ROS の指標となる。

下記の試薬を用いた。

- ・ DMEM+0.1%BSA

- ・水溶化 QO
- ・水溶化 QH
- ・Vehicle
- ・PBS (－)
- ・DCF-DA100 倍濃縮液

…DCF-DA (Sigma) 4.87 mg を 1 mL の DMSO で溶解し、これを PBS (－) で 10 倍希釈した。

- ・0.003% (v/v) 過酸化水素含有 PBS (－)

…30% (v/v) 過酸化水素を PBS (－) で 1000 倍希釈した。

低自家蛍光の 24well plate (lumox multiwell 24、SARSTEDT) に C2C12 筋芽細胞を播種し、サブコンフルエントまで増殖させた後、筋管細胞への分化誘導を行った。C2C12 筋芽細胞から筋管細胞への分化期間の 3 日目に、終濃度が 10  $\mu\text{M}$  となるように培地中 (DMEM+2%HS) に水溶化 QO または水溶化 QH を添加し、37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間培養した。また、対照区として水溶化 QO や水溶化 QH と等量の vehicle を添加する群を設けた。24 時間培養した後 (分化期間 4 日目)、培地を DMEM+0.1%BSA に交換し、培地 500  $\mu\text{L}$  あたり 5  $\mu\text{L}$  の DCF-DA100 倍濃縮液を添加し、37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 45 分間培養した。その後、培地 500  $\mu\text{L}$  あたり 25  $\mu\text{L}$  の 0.003%過酸化水素含有 PBS (－) を加え (終濃度 250  $\mu\text{M}$ )、37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 30 分～24 時間培養した。このとき、過酸化水素で処理しない群に対しては過酸化水素液と等量の PBS (－) を添加した。過酸化水素添加から 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、24 時間後のタイミングで、plate をプレートリーダーにセットし、励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm における蛍光強度を測定し、細胞内 ROS 量を算出した。ROS 量を算出する際には、DCF-DA を加えていないウェルの蛍光強度をサンプルの蛍光強度から差し引きした。

## 1 - (5) Western blotting を用いた過酸化水素誘導性オートファジーの評価

オートファジーは Ser/ Thr kinase を介したシグナル伝達の他に、ROS によっても活性が制御されることが知られており、過酸化水素はオートファジーを惹起する[88]。そこで、過酸化水素処理によって C2C12 筋管細胞におけるオートファジーを誘導し、QH の添加が及ぼす影響を評価した。なお、オートファジーの活性評価は、western blotting による LC3-II の検出により行った。

## a. SDS-PAGE 用試料の調製

6 cm dish に C2C12 筋芽細胞を播種し、サブコンフルエントまで増殖させた後、筋管細胞への分化誘導を行った。C2C12 筋芽細胞から筋管細胞への分化期間の3日目に、終濃度が 10  $\mu$ M または 20  $\mu$ M になるように培地 (DMEM+2% HS) 3 mL あたり 25  $\mu$ L の水溶化 QH を添加し、24 時間培養した。4 日目に培地を DMEM+0.1%BSA に交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 45 分間培養した。45 分後、終濃度が 250  $\mu$ M になるように過酸化水素液を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間培養した。過酸化水素添加の 30 分後、培地をアスピレーターで除去し、dish 1 枚当たり 250  $\mu$ L の RIPA lysis buffer solution を氷上で加え、セルスクレイパーで細胞をかき取った。以降の操作は、第2章 - 第2節 - 4 - (1) と同様に行った。

## b. SDS-PAGE

第2章 - 第2節 - 4 - (2) と同様に行った。

## c. セミドライ式 western blotting

第2章 - 第2節 - 4 - (4) と同様に行った。

## d. 検出

第2章 - 第2節 - 4 - (5) と同様に行った。

## 2. 動物実験①QHの摂取が成熟マウスの骨格筋に及ぼす効果

加齢条件下にない成熟マウスの骨格筋に QH が及ぼす影響を評価するため、正常マウスを用いた実験を行った。実験動物として、10 週齢の ICR 系雄性マウス（38~40 g、日本エスエルシー株式会社）を用いた。マウスは個別のステンレスケージに入れ、室温  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間明暗サイクルで計 2 か月間飼育した。水は水道水を自由飲水させた。飼育 1 日目は固形飼料（マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料 CE-2、日本クレア株式会社）を与え、2 日目と 3 日目は AIN-93M 組成 [60] の 14% カゼイン飼料 (Table 7-3、C) を自由摂食させた。4 日目より体重が等しくなるように 2 群に分け、Table 7-3 に組成を示した実験飼料 (Table 7-3) のいずれかを 2 か月間自由摂食させた。QH を原末のまま食餌に混ぜると酸化され、QO に変換されてしまう。そこで、動物実験においてはデキストリンで表面をコーティングし、光と空気に対して安定に加工した QH（安定型、30%QH 含有、株式会社カネカ）を用いた。

Table 7-3 ICR マウスに与える実験食の組成

Component	g/kg diet	
	C	QH
カゼイン <sup>a</sup>	140	140
シスチン <sup>b</sup>	1.8	1.8
重酒石酸コリン <sup>c</sup>	2.5	2.5
ビタミン混合 <sup>a</sup>	10	10
ミネラル混合 <sup>a</sup>	35	35
セルロース <sup>a</sup>	50	50
大豆油 <sup>c</sup>	40	40
ショ糖 <sup>c</sup>	100	100

コーンスターチ <sup>a</sup>	620.7	610.7
QH (安定型) <sup>d</sup>	0	10
Total	1000	1000

a : オリエンタル酵母工業株式会社

b : 和光純薬株式会社

c : 味の素株式会社

d : 株式会社カネカ

飼育期間中は2週間に1度、EhoMRI (日本アロカメディカル) を用いて無麻酔のまま除脂肪体重と体脂肪量を測定した。実験飼料の供与開始から2か月後、前日から12時間絶食させた後、Table 7-3 に示した各実験食を1時間のみ与え、摂食終了後に3時間絶食させ、屠殺した。屠殺は、ジエチルエーテル麻酔下で開腹後、下大静脈から採血した後に行った。屠殺後、速やかにEDLとヒラメ筋を単離し、直ちにKRB緩衝液(pH7.4) 1 mL中に浸し、筋原線維タンパク質分解速度の測定のため第4章 - 第2節 - 1と同様にインキュベートした。血液はヘパリン処理した1.5 mL容遠心チューブに入れ、3,000×g、4°Cで10分間遠心分離し、血漿を分離した。また、腓腹筋と前脛骨筋を摘出し、重量測定の後、液体窒素で直ちに凍結させた。摘出した骨格筋は、分析するまで-80°Cで保存した。

## 2 - (1) 筋原線維タンパク質の分解速度測定法

第5章 - 第2節 - 2と同様に行った。

## 2 - (2) Western blotting を用いたタンパク質の検出

第5章 - 第2節 - 4と同様にLC3-II、ユビキチン化タンパク質、Ser/Thr kinaseを検出した。

## 3. 動物実験②QHの摂取が老化促進モデルのサルコペニアに及ぼす効果

QHの抗サルコペニア効果を検討するため、SAMP8を用いた実験を行った。実験動物として、いずれも15週齢で雄性のSAMP8(27~32g、日本エスエルシー株式会社)とSAMR1(31~36g、日本エスエルシー株式会社)を用いた。SAMP8とSAMR1の購入に際して、日本エスエルシーを通じてSAMマウス利用に関する同意書をSAM研究協議会に提出した。15週齢から24週齢までの間、SAMP8とSAMR1は6頭ずつプラスチックケージ(KYケージ-2、227×340×148mm、日本クレア株式会社)に入れ、室温22±1℃、湿度50±10%、午前6時から午後6時までの12時間明暗サイクルで飼育した。水は水道水を自由飲水させ、固形飼料(マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料CE-2、日本クレア株式会社)を自由摂食させた。24週齢に到達した時点ですべての動物をステンレスケージに移し、SAMP8を体重が等しくなるように5群に分け、SAMP8の各群とSAMR1に対してTable 7-4に示した実験飼料のいずれか(R、P、K、QO、QH、QK)を42週齢までの4か月半の間供与した。なお、QH含有率が30%のQH(安定型)と異なり、QOは原末を用いているため、QOとQHで添加量が異なるが、コエンザイムQ10としての添加量は等しい。実験飼料を供与した4か月間、2週間に1度EchoMRI(日立アロカメディカル)を用いて除脂肪体重と体脂肪量を測定した。

Table 7-4 SAMR1 及び SAMP8 に与える実験食の組成

Component	g / kg diet					
	R	P	K	QO	QH	QK
カゼイン <sup>a</sup>	140	140	140	140	140	140
シスチン <sup>b</sup>	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
重酒石酸コリン <sup>c</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ビタミン混合 <sup>a</sup>	10	10	10	10	10	10
ミネラル混合 <sup>a</sup>	35	35	35	35	35	35
セルロース <sup>a</sup>	50	50	50	50	50	50
大豆油 <sup>c</sup>	40	40	40	40	40	40
ショ糖 <sup>c</sup>	100	100	100	100	100	100
コーンスターチ <sup>a</sup>	620.7	620.7	605.7	617.7	607.7	595.7
L-lysine-HCl <sup>b</sup>	0	0	15	0	0	15

QO 粉末 <sup>d</sup>	0	0	0	3	0	0
QH (安定型) <sup>d</sup>	0	0	0	0	10	10
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000

a : オリエンタル酵母工業株式会社

b : 和光純薬株式会社

c : 味の素株式会社

d : 株式会社カネカ

### 3 - (1) 筋原線維タンパク質の分解速度測定法

第5章 - 第2節 - 2と同様に行った。

### 3 - (2) Western blotting を用いたタンパク質の検出

第6章 - 第2節 - 4と同様に LC3-II、beclin-1、p62、ユビキチン化タンパク質、GAPDH を検出した。

## 4. 統計処理

第2章 - 第2節 - 6と同様に行った。

## 第2節 結果

### 1. 細胞実験

結果は、過酸化水素処理をしない群を C、過酸化水素単独処理群を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、過酸化水素と vehicle で処理した群を vehicle、過酸化水素と QO で処理した群を QO、過酸化水素と 10 μM QH で処理した群を QH、過酸化水素と 20 μM QH で処理した群を HQH として示した。

#### 1- (1) C2C12 細胞中の ROS 量

DCF-DA を用いて評価した細胞内 ROS 量を Fig. 7-1 に示した。なお、A には過酸化水素添加 30 分後の、B には 1 時間後の、C には 2 時間後の、D には 3 時間後の、E には 4 時間後の、F には 24 時間後の ROS 量をそれぞれ示した。無処理の群と比較して、過酸化水素処理 30 分から 3 時間後に顕著な ROS の増加がそれぞれ認められた (Fig. 7-1A-D)。4 時間以降では過酸化水素処理群と無処理の群で差はなかったが、これは無処理の群においても無血清培養によって ROS が生じたためと考えられる (Fig. 7-1E,F)。一方、QH は、過酸化水素単独処理群と比較して、すべての処理時間で ROS を顕著に抑制した (Fig. 7-1)。QO や溶媒による効果は認められなかった。以上の結果より、QH 特異的な ROS 消去能が認められた。



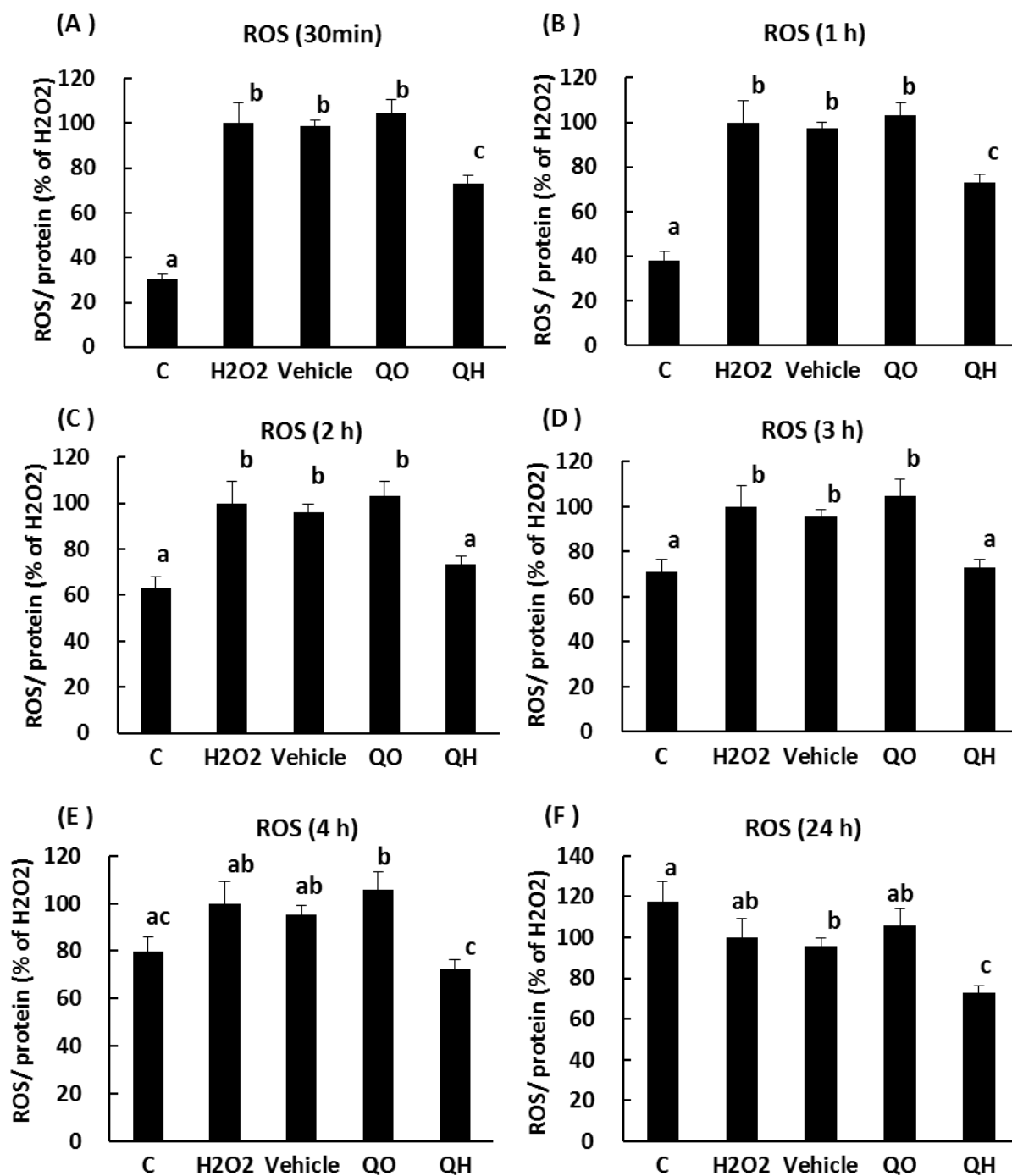


Fig. 7-1 C2C12 筋管細胞内の ROS 量

A : 過酸化水素添加 30 分後、B : 過酸化水素添加 1 時間後、C : 過酸化水素添加 2 時間後、D :

過酸化水素添加 3 時間後、E : 過酸化水素添加 4 時間後、F : 過酸化水素添加 24 時間後

値は平均±標準誤差 (n=4)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 1- (2) 過酸化水素で誘導したオートファジーに対する QH の効果

過酸化水素による ROS の誘導が最も顕著であった過酸化水素曝露 30 分後の C2C12 筋管細胞におけるオートファジー活性を Fig. 7-2 に示した。オートファジーの活性は過酸化水素処理によって 30%程度有意に増加した。10  $\mu$ M QH は過酸化水素によって誘導されたオートファジーを抑制しなかったが、20  $\mu$ M QH はオートファジーを 20%程度有意に抑制した。この結果より、過酸化水素の添加によってオートファジーが誘導されるが、20  $\mu$ M の QH 処理によって誘導されたオートファジーが抑えられると考えられた。一方、10  $\mu$ M の QH 処理によっては、過酸化水素によって誘導されたオートファジーを抑えることが出来ない可能性が示された。

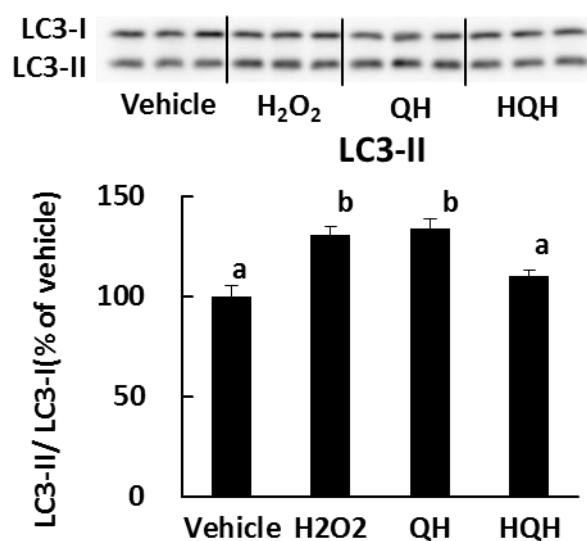


Fig. 7-2 過酸化水素曝露条件における C2C12 筋管細胞のオートファジー活性

値は平均±標準誤差 (n=4)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2. 動物実験①

結果は、コントロール食を与えた ICR を C、QH 添加食を与えた ICR を QH として示した。

## 2- (1) 体重の推移

飼育期間中における体重の推移を Fig. 7-2 に示した。体重は群間で差はなかったが、QH で高い傾向が見られた。

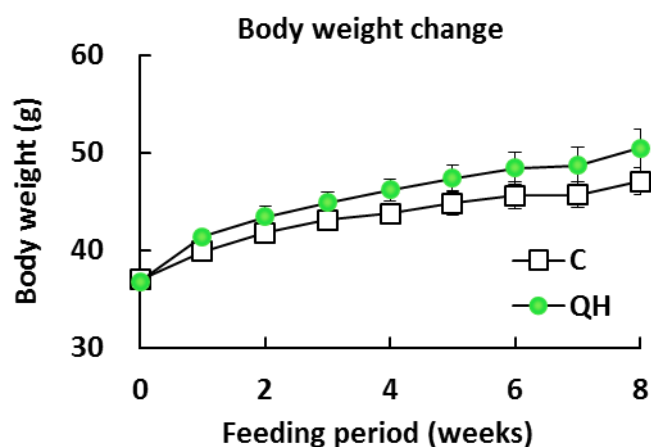


Fig. 7-2 飼育期間中の体重の推移

値は平均±標準誤差 (n=6)。

## 2- (2) 総摂食量

飼育期間中の総摂食量を Fig. 7-3 に示した。総摂食量は C と比較して QH が有意に多く、QH による摂食亢進作用が見出された。

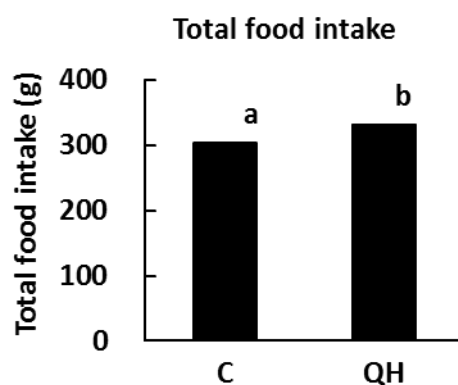


Fig. 7-3 飼育期間中の総摂食量

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (3) 体組成の推移

飼育期間中の除脂肪体重と体脂肪率の推移を Fig. 7-4 に示した。なお、A には除脂肪体重の推移を、B には体脂肪率の推移をそれぞれ示した。飼育期間中の除脂肪体重と体脂肪率に群間で差はなかったが、いずれも QH で高い傾向が見られた (Fig. 7-4)。

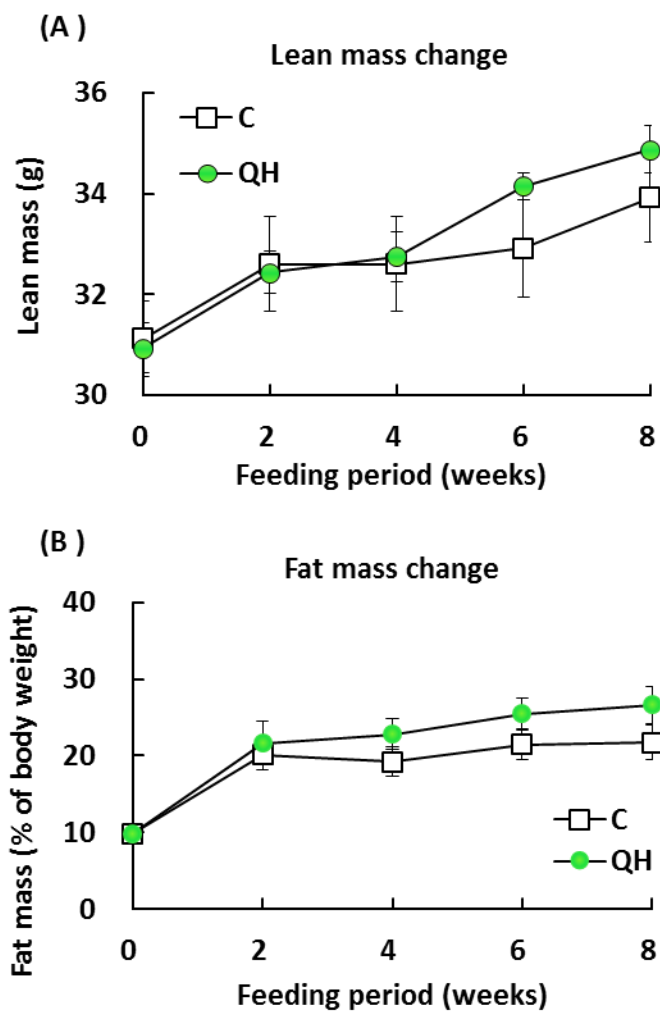


Fig. 7-4 飼育期間中の体組成の推移

A : 除脂肪体重推移、B : 体脂肪率推移

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (4) 解剖時体重及び骨格筋重量

解剖時体重及び骨格筋重量を Fig. 7-5 に示した。解剖時体重及び本実験で摘出したすべての後肢筋重量は群間で差はなかった (Fig. 7-5)。

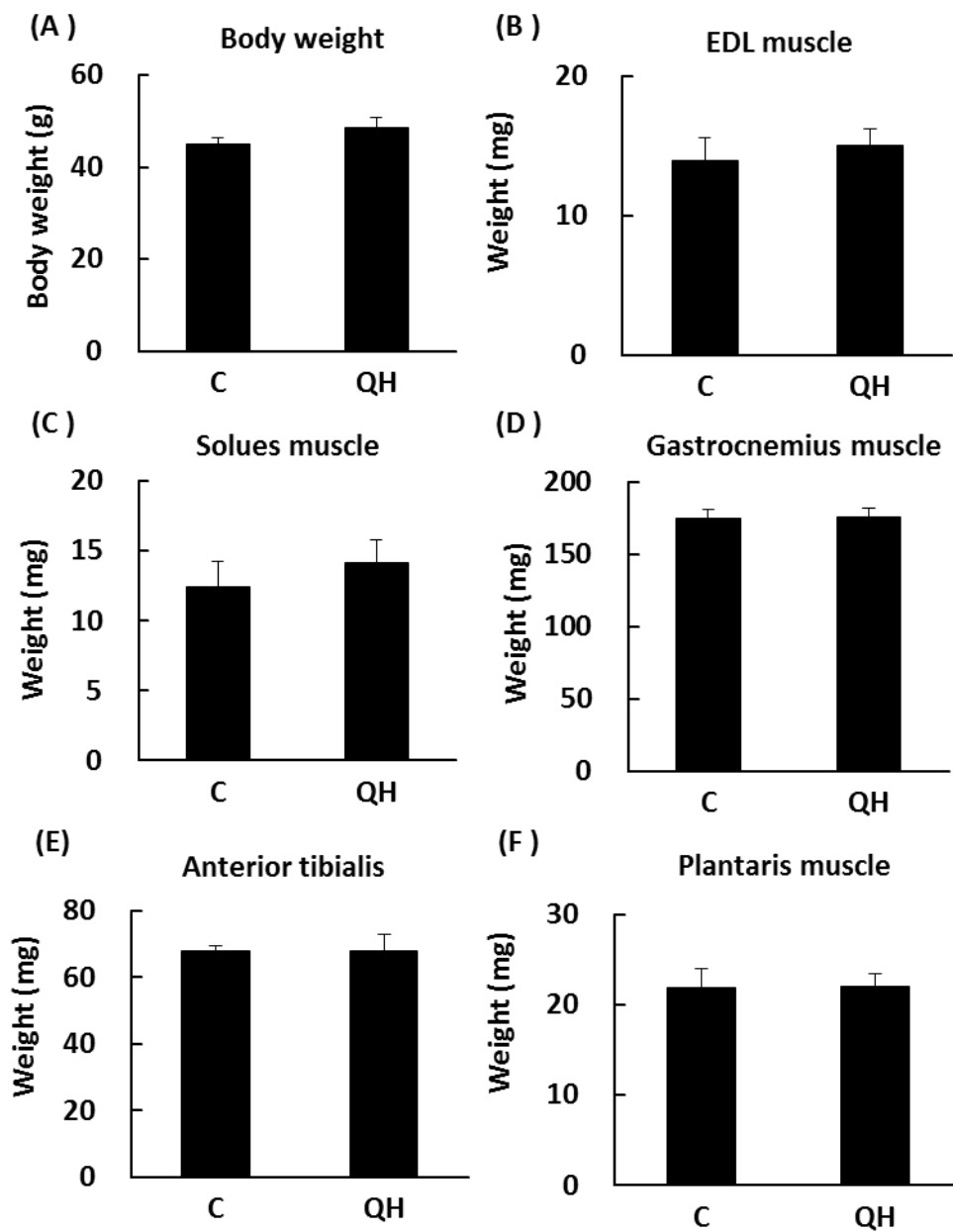


Fig. 7-5 解剖時体重及び筋重量

A : 体重、B : EDL 重量、C : ヒラメ筋重量、D : 腓腹筋重量、E : 前脛骨筋重量、

F : 足底筋重量

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (5) 筋原線維タンパク質分解速度

単離した長指伸筋及びヒラメ筋における筋原線維タンパク質分解速度を Fig. 7-5 に示した。

筋原線維タンパク質分解速度は長指伸筋とヒラメ筋のいずれにおいても群間で差はなかった。

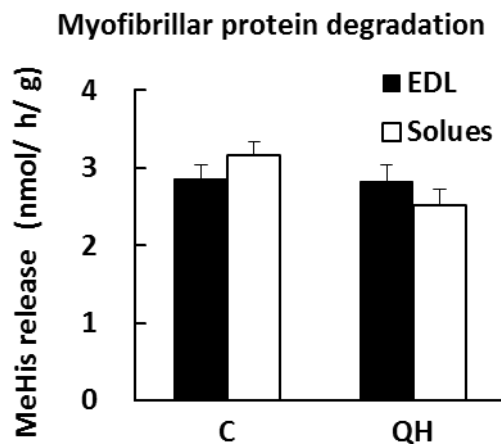


Fig. 7-6 筋原線維タンパク質分解速度

黒：長指伸筋、白：ヒラメ筋

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (6) オートファジー活性

LC3-II から評価したオートファジーの活性を Fig. 7-6 に示した。オートファジーの活性は群間で差がなく、QH は成熟動物が摂取しても骨格筋のオートファジー制御に寄与しないと考えられた。

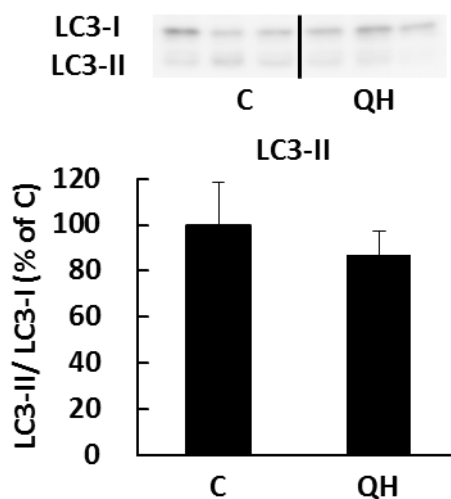


Fig. 7-7 骨格筋におけるオートファジーの活性

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (7) UPS の活性

ユビキチン化タンパク質量を Fig. 7-8 にユビキチン化タンパク質量を示した。なお、A には K48 特異的に結合したポリユビキチンタンパク質を、B にはユビキチン化タンパク質をそれぞれ示した。K48 特異的に結合したポリユビキチン化タンパク質量、及びユビキチン化タンパク質量は群間に差はなく、QH の摂取は成熟動物の骨格筋における UPS 活性に影響しないと考えられた。

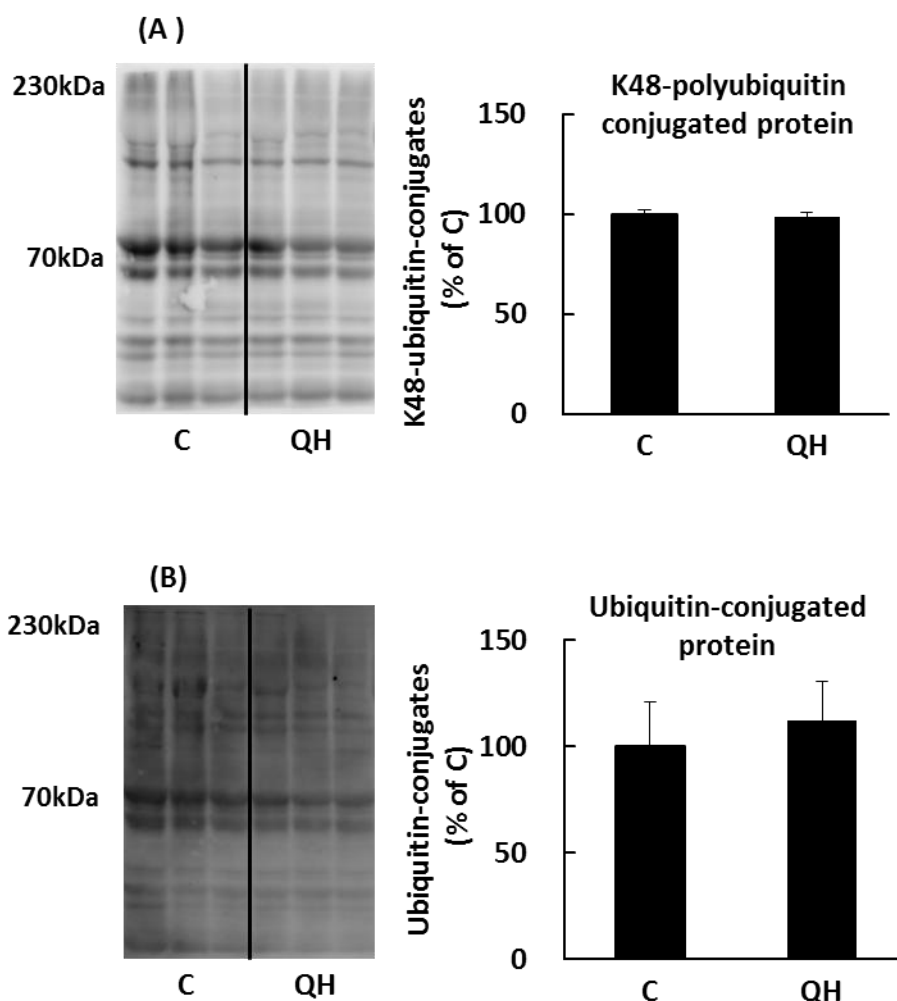


Fig. 7-8 骨格筋におけるユビキチン化タンパク質

A : K48 特異的に結合したポリユビキチン化タンパク質、B : ユビキチン化タンパク質

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 2- (8) タンパク質代謝を制御する Ser/ Thr kinase の活性

Akt、mTOR、4E-BP1、AMPK のリン酸化率から求めた活性を Fig. 7-8 に示した。なお、A には Akt の、B には mTOR の、C には 4E-BP1 の、D には AMPK の活性をそれぞれ示した。

QH の摂取はいずれの Ser/ Thr kinase の活性にも影響しなかった。

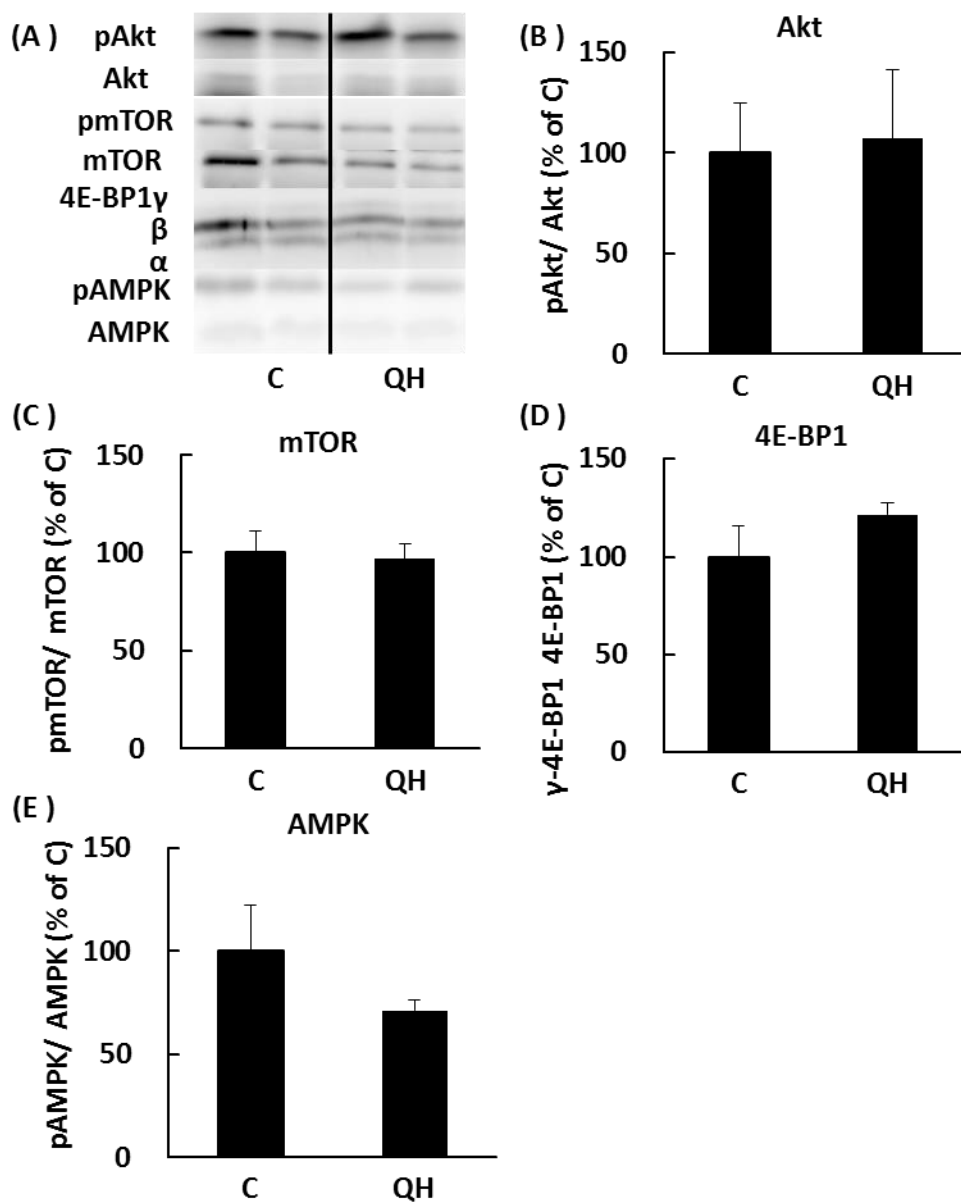


Fig. 7-9 骨格筋における Ser/ Thr kinase の活性

A : 代表的なバンド、B : Akt 活性、C : mTOR 活性、D : 4E-BP1 活性、E : AMPK 活性

値は平均±標準誤差 (n=6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。



## 3. 動物実験②

結果は、SAMR1をR、コントロール食を与えたSAMP8をP、QO添加食を与えたSAMP8をQO、QH添加食を与えたSAMP8をQH、Lys添加食を与えたSAMP8をK、QH及びLys添加食を与えたSAMP8をQHKとして示した。

## 3- (1) 体重及び摂食量の推移

飼育期間中における体重の推移を Fig. 7-10 に示した。SAMR1 と比較して通常食を摂取した SAMP8 は一貫して有意に体重が軽かった。また、QH を摂取した SAMP8 の体重は、34 週齢以降、通常食を摂取した SAMP8 と比較して有意に重かった。

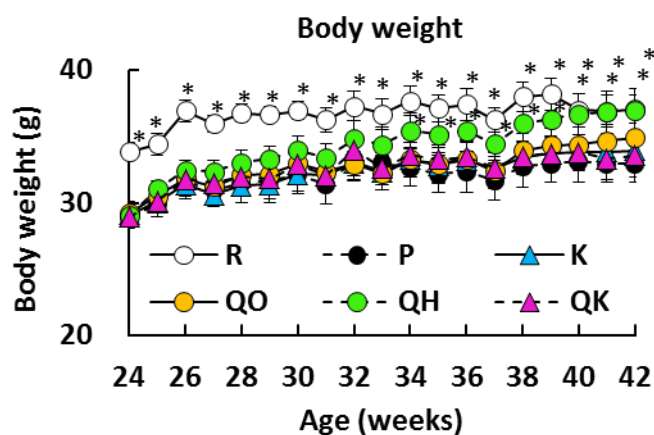


Fig. 7-10 体重の推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。

## 3- (2) 総摂食量

群分けを開始した24週齢と、解剖を行った42週齢時の7日間における総摂食量を Fig. 7-11 に示した。

24週齢においては、SAMR1と比較して通常食を摂取したSAMP8の総摂食量は2%程度有意に少なく、1.5% Lys 添加食を摂取したSAMP8の総摂食量は通常食を摂取したSAMP8よりさらに5%程度少なかった。一方、QOまたはQHを添加した食餌を摂取したSAMP8の総摂食量はSAMR1と差がなかった。1.5% Lys とQHを添加した食餌を摂取したSAMP8の総摂食量は通常食を摂取したSAMP8と差がなかった。24週齢の総摂食量と比較して、42週齢における総摂食量はすべての群で有意に減少した。42週齢においては、SAMR1と通常食を摂取したSAMP8の間に差はなく、1.5% Lys 添加食を摂取したSAMP8の総摂食量は通常食を摂取したSAMP8に比べ、有意に少なかった。42週齢においても、QOまたはQHを添加した食餌を摂取したSAMP8の総摂食量はSAMR1や通常食を摂取したSAMP8よりいずれも10%程度有意に多かった。一方、1.5% Lys とQHを添加した食餌を摂取したSAMP8の総摂食量は通常食を摂取したSAMP8よりむしろ6%程度少なかった。したがって、QOまたはQHの摂取は摂食量の維持に寄与すると考えられた。

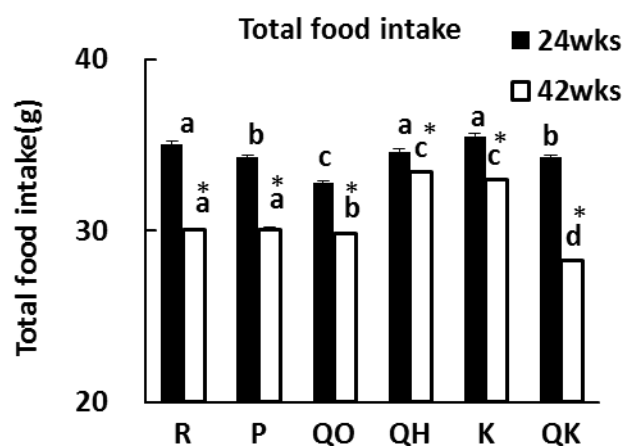


Fig. 7-11 24 週齢と 42 週齢時における総摂食量

黒：24 週齢時の総摂食量、白：42 週齢時の総摂食量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。アスタリスク (\*)

は、同一群内で24 週齢時と42 週齢時の間に有意差 (p<0.05) があつたことを示す。

## 3- (3) 体組成の推移

飼育期間における除脂肪体重と体脂肪率の推移を Fig. 7-12 に示した。なお、A には除脂肪体重の推移を、B には体脂肪率の推移を示した。SAMR1 の除脂肪体重は 24 週齢から 42 週齢まで一貫して通常食を摂取した SAMP8 より有意に重く、P、K、QO、QH、QK の 4 群間で差はなかった。体脂肪率は 28 週齢と 30 週齢の時点で SAMR1 が通常食を摂取した SAMP8 より有意に高く、40 週齢と 42 週齢の時点で QH 添加食を摂取した SAMP8 が通常食を摂取した SAMP8 より有意に高かった。したがって、QH の摂取は SAMP8 における体脂肪率を増加させる可能性が考えられた。

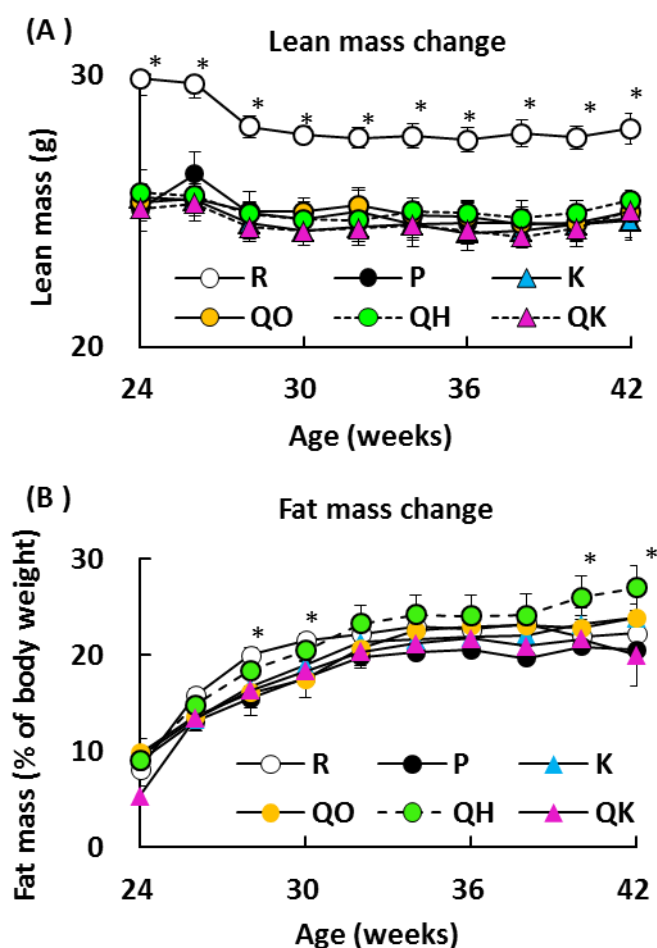


Fig. 7-12 体組成の推移

A : 除脂肪体重の推移、B : 体脂肪率の推移

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。

アスタリスク (\*) は、同一週齢時に P との間有意差 ( $p < 0.05$ ) があったことを示す。

## 3- (4) 解剖時体重及び骨格筋重量

解剖時の体重及び骨格筋重量を Fig. 7-13 に示した。なお、A には体重を、B には長指伸筋の、C にはヒラメ筋の、D には腓腹筋の、E には前脛骨筋の、F には足底筋の重量をそれぞれ示した。体重は群間で有意な差はなかった (Fig. 7-13A)。長指伸筋の重量は R と比較して P、K、QO、QH、QK でいずれも 20% 程度の有意な低値を示し、P、K、QO、QH、QK の 5 群間で差はなかった (Fig. 7-13B)。ヒラメ筋の重量は R と比較して P で 50% 程度の有意な低値を示した。一方、R と比較して K、QO、QH、QK は有意に低値を示したが、P と比較してそれぞれ重い傾向が認められた (Fig. 7-13C、unpaired *t*-test : K :  $p=0.03$  vs P、QO :  $p=0.10$  vs P、QH :  $p=0.03$  vs P、QK :  $p=0.01$  vs P)。腓腹筋重量は R と比較して P と K と QO で 25% 程度、QH で 20% 程度、QK で 30% 程度の有意な低値を示した (Fig. 7-13D)。また、QH は P と比較して重い傾向が認められた (unpaired *t*-test :  $p=0.10$  vs P)。前脛骨筋重量は R と比較して P で 25% 程度、K で 20% 程度、QO で 20% 程度、QK で 20% 程度の有意な低値を示した (Fig. 7-13E)。また、R と比較して QH は 15% 程度の有意な低値を示したが、P と比較して重い傾向が認められた (unpaired *t*-test :  $p=0.03$  vs P)。足底筋重量は、R と比較して、P で 35% 程度、K で 30% 程度、QO で 40% 程度、QH で 25% 程度、QK で 35% 程度の有意な低値を示し、P、K、QO、QH、QK の 5 群間で差はなかった (Fig. 7-13F)。

以上の結果から Lys や QO の摂取は SAMP8 におけるヒラメ筋の萎縮の緩和に寄与し、QH の摂取はヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋における萎縮の緩和に寄与すると考えられた。

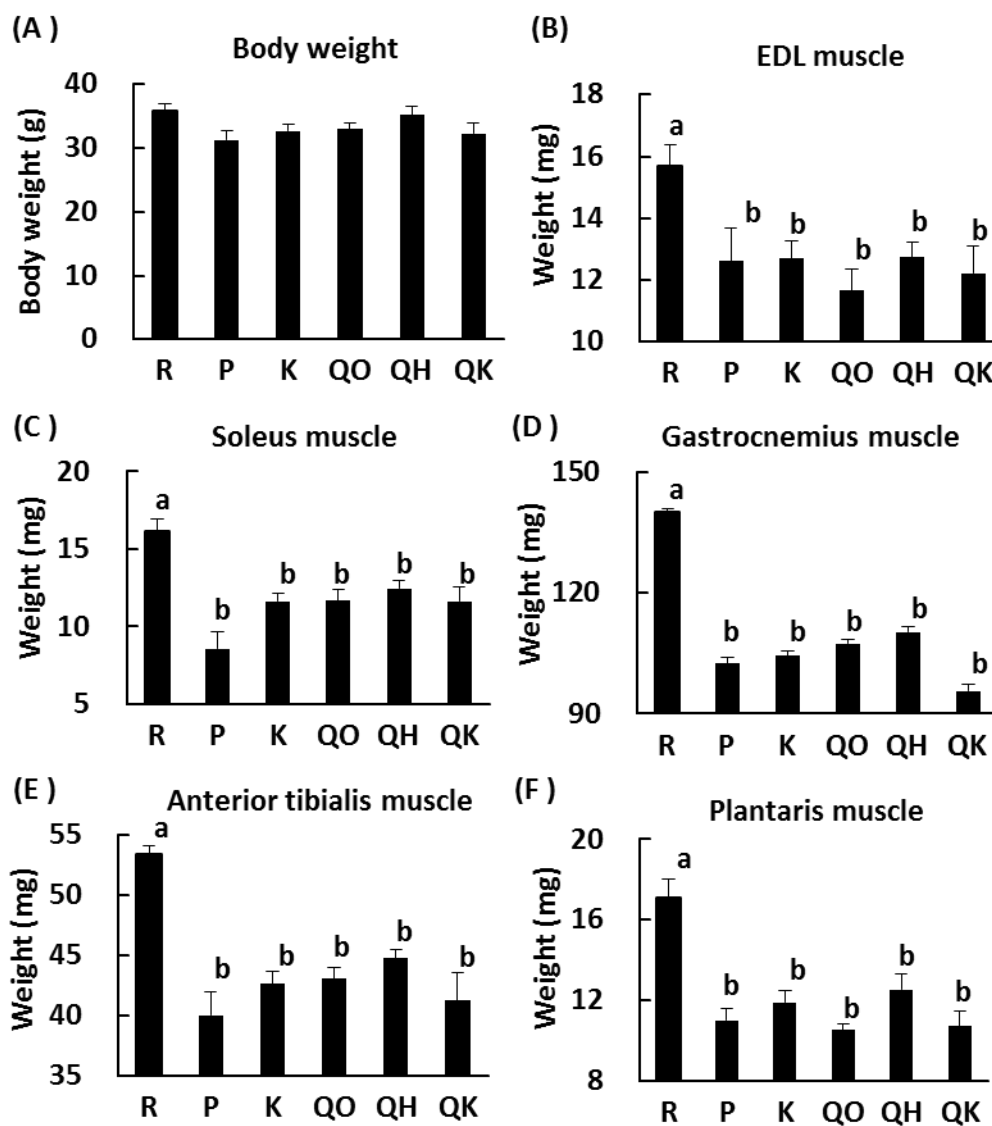


Fig. 7-13 解剖時体重及び骨格筋重量

A : 解剖時体重、B : EDL 重量、C : ヒラメ筋重量、D : 腓腹筋重量、E : 前脛骨筋重量、F : 足底筋重量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 (p<0.05) あり。

## 3- (5) 解剖時の臓器及び脂肪組織重量

Fig. 7-14 に解剖時の肝臓、腎臓、精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪の重量を示した。なお、A には肝臓重量を、B には腎臓重量を、C には精巣周囲脂肪重量を、D には腎臓周囲脂肪重量を示した。解剖時の臓器及び脂肪組織重量はいずれも群間に差はなかった (Fig. 7-14)。

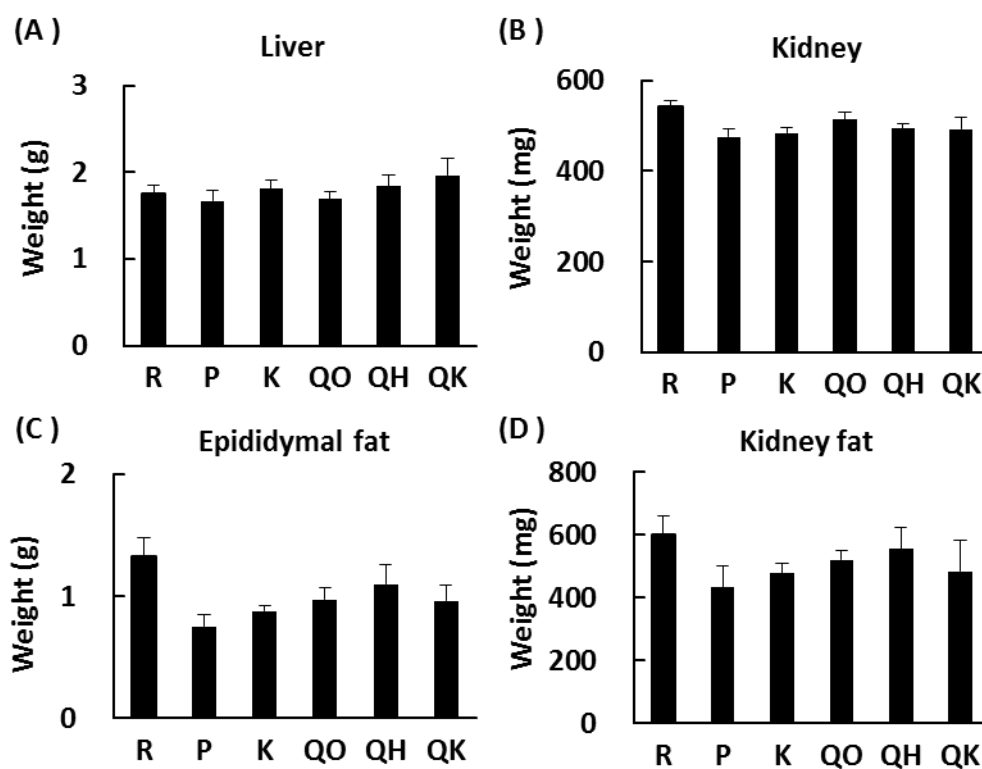


Fig. 7-14 解剖時の臓器及び脂肪組織重量

A : 肝臓重量、B : 腎臓重量、C : 精巣周囲脂肪重量、D : 腎臓周囲脂肪重量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。

## 3- (6) 筋原線維タンパク質分解速度

単離筋肉切片より放出されたMeHis量から算出した、筋原線維タンパク質の分解速度をFig. 7-15に示した。

EDLにおける筋原線維タンパク質の分解速度は、Rと比較してPで高い傾向が認められ(unpaired *t*-test:  $p=0.01$  vs R)、KはPと比較して低い傾向が認められた(unpaired *t*-test:  $p=0.10$  vs P)。一方、QHはR及びKと比較して有意な高値を示し、QKはRとの差がなかった。

ヒラメ筋における筋原線維タンパク質の分解速度は、Rと比較してPで有意に高値を示したが、Pと比較してKで有意な低値を示した。QO及びQHはPと比較して差はなかったが、QKはPと比較して有意に低値を示した。

以上の結果から、SAMR1と比較してSAMP8の骨格筋では筋原線維タンパク質分解が亢進しており、Lysの摂取は筋原線維タンパク質分解の抑制に寄与するが、QOやQHによる筋原線維タンパク質分解抑制作用はないと考えられた。

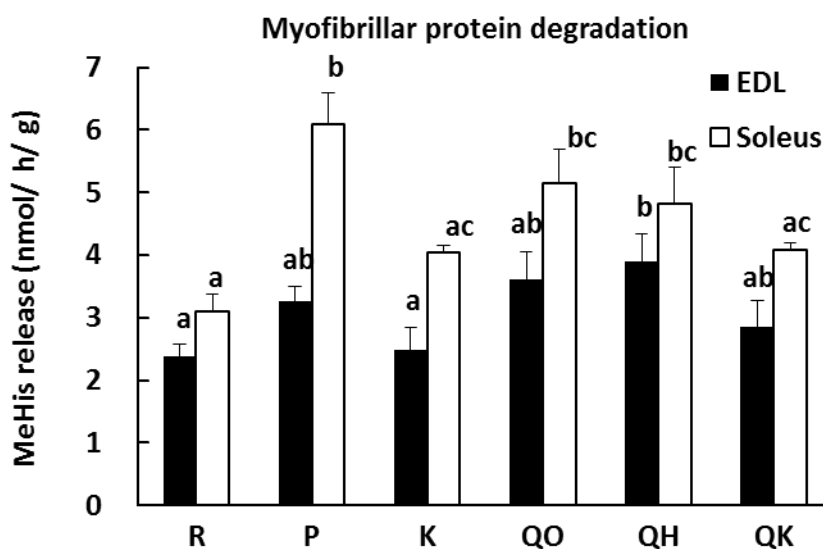


Fig. 7-15 単離筋肉切片における筋原線維タンパク質分解速度

黒：EDL、白：ヒラメ筋

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。異なる記号間で有意差 ( $p<0.05$ ) あり。

## 3- (7) オートファジー活性

オートファジーの活性指標となる LC3-II/I、beclin-1、p62 を Fig. 7-16 に示した。なお、A には LC3-II を、B には beclin-1 を、C には p62 をそれぞれ示した。

LC3-II/I は群間で有意差はなかったが、R と比較して P で 30%程度 (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs R)、QO で 20%程度 (unpaired *t*-test :  $p=0.08$  vs R)、QH で 30%程度 (unpaired *t*-test :  $p=0.06$  vs R) の高い傾向があったが、K 及び QK は R との差はなかった。Beclin-1 は R と比較して P で 35%程度高い傾向を示した (unpaired *t*-test :  $p=0.04$  vs R)。p62 は群間で有意差はなかったが、R と比較して P で 40%程度高い傾向を示した (unpaired *t*-test :  $p=0.05$  vs R)。また、P と比較して QH (unpaired *t*-test :  $p=0.10$  vs P) で 45%程度低い傾向が認められた。

以上の結果より、QO 及び QH の摂取は凝集タンパク質の蓄積や選択的オートファジー不全の改善に寄与する可能性が示唆された。

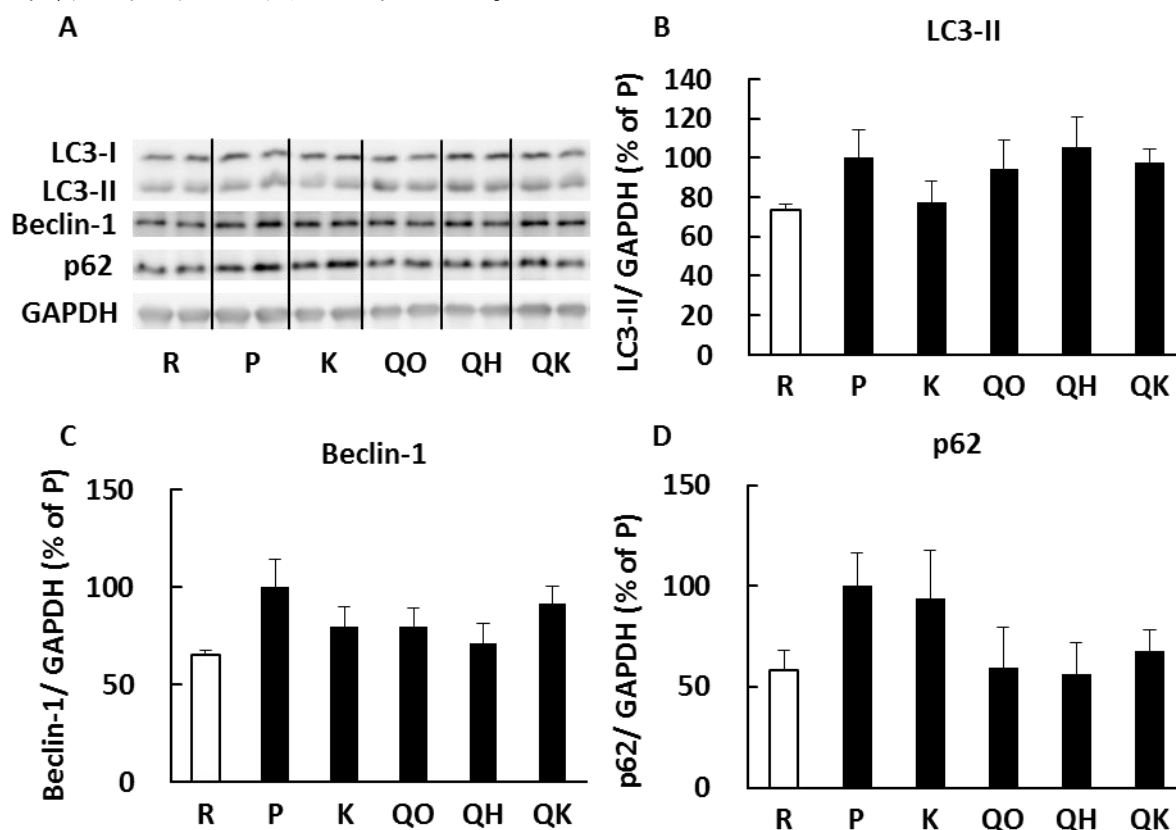


Fig. 7-16 オートファジーの活性指標

A : 代表的なバンド、B : LC3-II、C : beclin-1、D : p62

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。



## 3- (8) UPS の活性

K48 特異的ポリユビキチン化タンパク質及び非選択的ユビキチン化タンパク質を Fig. 7-17 に示し、A には K48 特異的ポリユビキチン化タンパク質の代表的なバンドを、B には非選択的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンドを、C には定量値をそれぞれ示した。いずれも、群間で差がなかった。

以上の結果より、QO 及び QH の摂取は UPS の活性には影響しない可能性が考えられた。

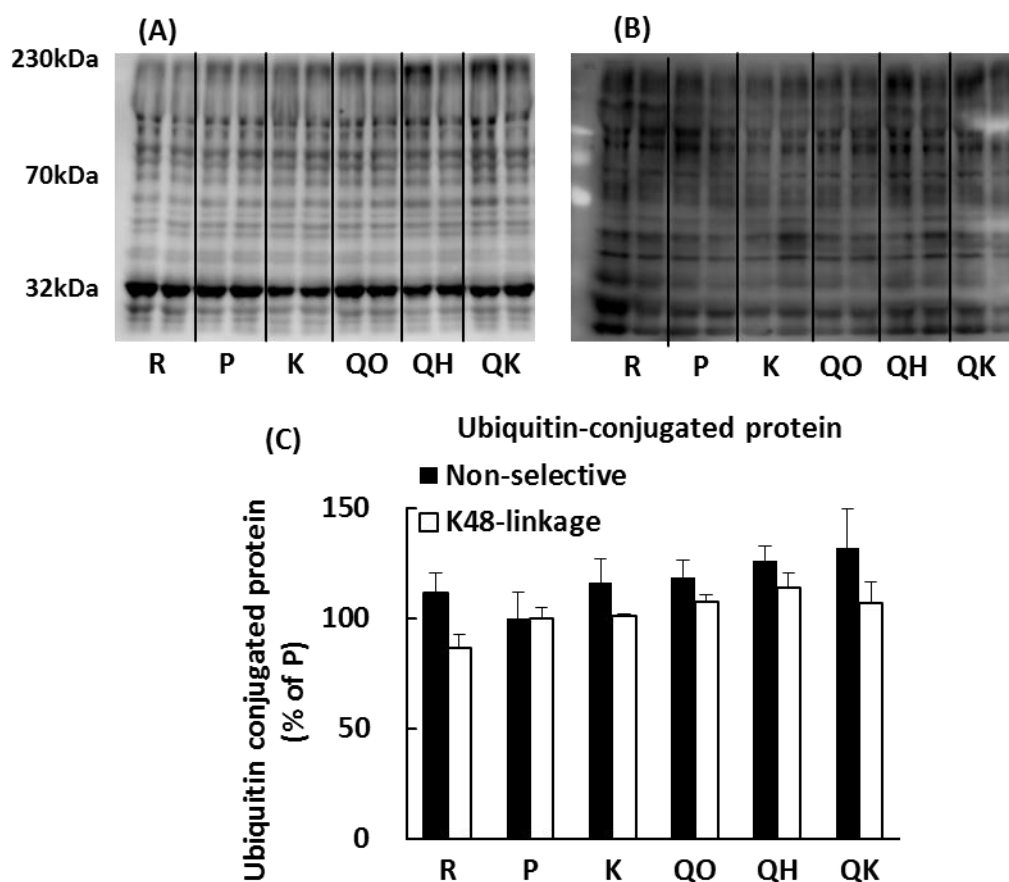


Fig. 7-17 ユビキチン化タンパク質量

A : K48 特異的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンド、B : 非選択的ユビキチン化タンパク質の代表的なバンド、C : ユビキチン化タンパク質量

値は平均±標準誤差 (n=5~6)。

## 第4節 考察

本章においては、まず骨格筋における QH の抗酸化能を評価するため、C2C12 筋管細胞を過酸化水素で曝露することで ROS を惹起し、QH による ROS 消去能を評価した。過酸化水素処理により、C2C12 筋管細胞内の ROS は増加した (Fig. 7-1)。過酸化水素による ROS の誘導効果は過酸化水素処理 30 分から 3 時間後にかけて継続したが、4 時間以降は過酸化水素処理をしない群との差がなくなった。これは、血清飢餓培養によっても ROS が誘導されたためと考えられる[84]。一方、QH を添加した群では、過酸化水素で処理した群と比較して、いずれの時間においても ROS が有意に低値、または低い傾向にあった (Fig. 7-1)。さらに、過酸化水素の添加なしに 24 時間培養した群と比較しても ROS は有意に低く (Fig. 7-1)、QH は過酸化水素によって惹起した ROS だけではなく、血清飢餓培養によって誘導する ROS も抑制することが示された。一方、過酸化水素によって誘導したオートファジーを抑えるには 10  $\mu$ M の QH では不十分であり、オートファジーを抑制するためには比較的高用量の QH が必要であることが示唆された (Fig. 7-2)。

次に、成熟マウスの骨格筋に対する QH 摂取の効果を評価するため、ICR マウスに QH 添加食を 2 か月間与えた。しかし、通常食を与えた群と比較して QH 摂取による体重や骨格筋重量への効果は認められず (Fig. 7-5)、筋原線維タンパク質分解速度やタンパク質分解システムの活性に及ぼす効果も確認されなかった (Figs. 7-6,7-7,7-8)。同様に、タンパク質分解システムの制御に働く Ser/Thr kinase の活性にも、QH 摂取による効果は見られなかった (Fig. 7-9)。したがって、成熟マウスの食餌に QH を添加しても、骨格筋重量やタンパク質分解システムに影響はないと考えられた。しかし、QH の摂取は加齢条件において顕著である報告があることから[116]、続く SAMP8 を用いた実験へ移行した。

老化促進モデルである SAMP8 に対しては、通常食、1.5%Lys 添加食、0.3%QO 添加食、1%安定型 QH (QH 添加率として 0.3%)、1.5%Lys+1%安定型 QH 添加食のいずれかを 4 か月半与えた。飼育期間中に興味深い結果が得られたのは、特に QH 添加食を与えた SAMP8 であった。

通常食を摂取させた SAMP8 では、SAMR1 と比較して、体重、24 週齢での総摂食量、除脂肪体重が下回っていたが、QH 添加食を摂取させたところ、体重及び摂食量の増加が認められ、除脂肪体重も P、K、QO、QH、QK の 5 群のうち、有意差はなかったが、QH が最も高値を示した。さらに、興味深いのは摂食量の変化であった。QO と QH を除く 4 群では 24 週齢時の摂食量と比較して 42 週齢での摂食量が顕著に減少していた。しかし、QO または QH 添加食を与えた SAMP8 では摂食量の減少が明らかに抑えられた。ICR マウスを用いた実験 2 においても、QH 添加による摂食亢進は確認されている (Fig. 7-3)。したがって、コエンザイム Q10 は、酸化型・還元型の別に関係なく、摂食亢進に働く可能性がある。SAMR1 は摂食量が減少を始めたタイミングと体脂肪率が頭打ちになったタイミングが一致することから、SAMR1 における摂食量の減少は代謝調節に伴うものであると考えられる。一方で、SAMP8 においては体重や体脂肪率の伸びが SAMR1 に比べて明らかに劣っているにも関わらず、摂食量は加齢依存的に減少した。したがって、SAMP8 においては加齢に伴う食欲の減退が生じている可能性があり、コエンザイムは加齢に伴う食欲の減退を抑制したと考えられる。加齢に伴う食欲の減退はサルコペニアの一因としても捉えられており、身体機能の衰えによる食欲の減退が栄養不良による筋萎縮を誘発し、さらに身体機能が衰えるという悪循環が特に問題視されている[5]。したがって、コエンザイム Q10 の摂取は加齢に伴う摂食量の減退を予防するという側面において、サルコペニア予防に有効であると考えられる。実際、QH 添加食を摂取した SAMP8 においてはヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋において通常食を摂取した SAMP8 と比較して重量が重い傾向が見られた。なお、コエンザイム Q10 の摂取によって摂食量が増加すると報告例はなく、本研究において新規に見出された機能と推察される。本研究において新規に見出されたコエンザイム Q10 の摂食亢進作用の分子メカニズムは不明であるため、今後詳細な検討が必要である。一方、QH による摂食亢進効果は Lys との併用によって打ち消された (Fig. 7-11)。そのため、食品成分の組み合わせによっては QH 及び QO の摂食亢進効果は消去されると考えられる。

一方で、精巣周囲脂肪や腎臓周囲脂肪の重量に群間で有意差はなかったが、QH の摂取によ

る体脂肪率の増加が認められた (Fig. 7-12B)。したがって、QH の摂取は食欲減退やサルコペニアの緩和には有効な可能性がある一方で、食餌性肥満を誘発する可能性がある。一方、SAMP8 においては加齢依存的に腓リパーゼの活性が低下し、腸管における脂質吸収能が低下することが報告されている [117,118]。したがって、加齢が進行して痩身へと向かう段階においては、QH の摂取による体脂肪率の上昇が寿命等に対して有益に働く可能性も否定できない。

オートファジーの活性指標である LC3-II と、オートファジーの誘導段階に関わる beclin-1 は R と比較して P で高い傾向にあり、選択的オートファジーの指標である p62 は R と比較して P で蓄積する傾向が認められた (Fig. 7-16)。したがって、第6章と同様に、第7章で用いた SAMP8 の骨格筋においても非選択的オートファジーの活性化による筋原線維タンパク質分解の亢進と選択的オートファジーの不全による凝集タンパク質の蓄積が生じていたと推察される。実際、筋原線維タンパク質の分解速度は R と比較して P で高値を示した (Fig. 7-15)。一方、QH 及び QO の骨格筋における p62 は P と比較して低い傾向が認められた。本実験は QH がミトコンドリアで生じた ROS の消去に働き、ミトコンドリアを保護することで異常化したミトコンドリアの蓄積を防ぐ可能性を期待して行ったが、p62 の蓄積が QO でも改善されていたことを考えると、抗酸化性とは別の機構によって、コエンザイム Q10 は SAMP8 の骨格筋における p62 の蓄積を緩和したと考えられる。コエンザイム Q10 による p62 の蓄積改善作用の機構を明らかにするためには、今後の詳しい検討が必要である。他方で LC3-II に関しては、QO 及び QH 摂取による効果は認められず、Lys と QH の併用による効果もなかった。実験 1 より、酸化ストレスによって誘導したオートファジーを QH が抑制するためには、比較的高濃度の処理が必要であることが示唆されている (Fig. 7-2)。したがって、本実験においては骨格筋への QH 移行量がオートファジーの抑制に働く閾値に達していなかったと推察される。

また、プロテアソームの分解標的となる K48 結合型ユビキチン化タンパク質量と非選択的ユビキチン化タンパク質量は、第5章と同様に R と P の間に差はなく、Lys や QH、Lys と QH の併用による効果は認められなかった (Fig. 7-17)。したがって、第5章で考察したよう

に、SAMR1と比較して、SAMP8の骨格筋においてはUPSの活性化は生じておらず、LysやQHによるUPS活性への効果もないと推察された。

以上より、QHの摂取はSAMP8で低下する食欲を亢進し、筋肉量の維持に寄与する可能性が示されたが、Lysとの併用による相加的・相乗的な抗サルコペニア効果はないと考えられた。

## 第 8 章 総合考察

歩く、走る、物を掴むといった日常的な動作を行う上で、骨格筋が重要な組織であることは言うまでもないことである。しかし、加齢に伴い、骨格筋量は減少し、それと並行して身体機能は衰える。加齢に伴う身体機能の衰えを防ぐため、骨格筋量の維持に向けた研究は世界中で推進されており、我が国でも、内閣府の「戦略的イノベーション創造プログラム (SIP)」における重要課題に据えられている[119]。

骨格筋量の制御に寄与する食品成分として最も研究が進んでいるのは、必須アミノ酸である Leu である。Leu は骨格筋タンパク質の合成を促進し、分解を抑制することが明らかとなっており、その詳しい分子メカニズムも近年解明に近付いている。また、Arg も骨格筋タンパク質代謝を制御するアミノ酸として研究が進められており、Leu と同様に詳しい分子メカニズムが明らかになりつつある。しかしながら、Leu と Arg 以外のアミノ酸に関しては、骨格筋タンパク質代謝への作用や、その分子メカニズムについて不明な点が多く存在している。

私は、修士研究において[35]、必須アミノ酸である Lys がラットとマウス横紋筋由来 C2C12 筋管細胞における筋原線維タンパク質分解を抑制することを世界ではじめて明らかにした。そして本研究において、Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用は、Akt の活性化を介したオートファジーの阻害を介する可能性を示し、さらに Lys の代謝産物も骨格筋タンパク質代謝を制御することを示唆した (Fig. 8-1)。Lys による骨格筋タンパク質代謝の制御機構を、代謝産物を絡めて明らかにした例は、世界初である。

さらに本研究では、サルコペニアを呈する老化促進モデルマウス SAMP8 を用い、Lys の摂取が、加齢が進行し、全身の代謝が変化した条件でも骨格筋タンパク質分解の抑制、ひいてはサルコペニアの緩和に寄与することを示した。SAMP8 はごく最近になってサルコペニアモデルとして利用され始めたため、SAMP8 の骨格筋タンパク質代謝について評価した例自体が極めて少ないが、Lys の摂取、もしくはアミノ酸の摂取が SAMP8 の骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響を評価した研究は世界中においても初めてである。また、加齢条件下においても

抗サルコペニア作用が認められたことから、Lys の摂取はサルコペニアの緩和に有効である可能性がある。また、SAMP8 の骨格筋においては UPS の活性化は生じていない一方で、オートファジーの亢進と筋原線維タンパク質分解の増加が認められた。これらの結果は、自然老化マウスを用いた Wenz ら[14]や、Sakuma ら[15]の研究と一致している。したがって、サルコペニアの進行においては、UPS よりもオートファジーの制御が重要であり、オートファジーの制御に働く食品成分の摂取がサルコペニアの予防に有効な可能性がある。

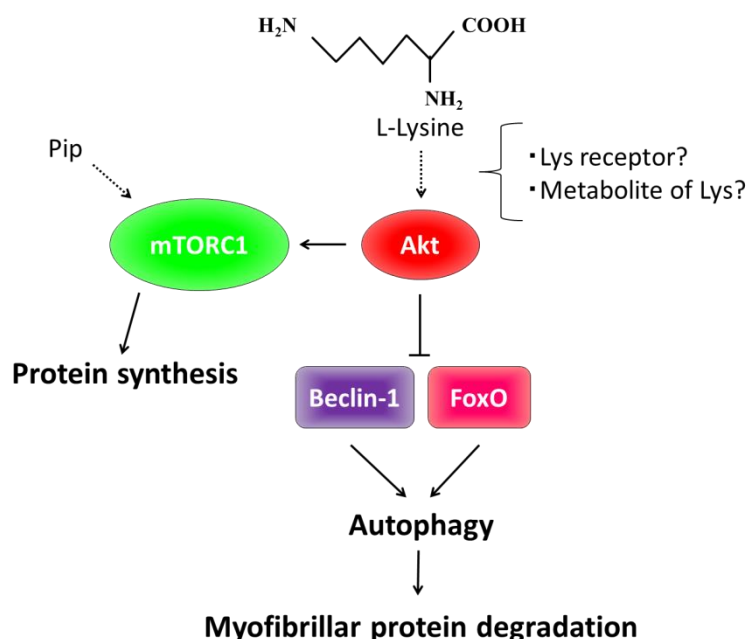


Fig. 8-1 Lys の骨格筋タンパク質代謝制御機構の概略

さらに本研究では、Lys の骨格筋タンパク質代謝に及ぼす影響だけではなく、老化促進モデル SAMP8 で生じる非アルコール性脂肪肝への効果も見出し、その作用機序についても一部を解明した。非アルコール性脂肪肝はサルコペニアの引き金となることが示唆されているが、食品成分の抗サルコペニア効果を骨格筋以外の組織を含めて評価した例はほとんどない。

今後の主な課題としては、第 1 に Lys 経口摂取時における骨格筋中の Lys 代謝産物の濃度を LC/MS を用いて測定することが挙げられる。Watanabe ら[51]は、ブロイラーに Lys を摂取

させ、骨格筋において Sac や 2-AA、Pip といった Lys の代謝産物が増加することを明らかにしている。しかし、鳥類と哺乳類とではアミノ酸代謝が異なる可能性があり、ヒトやマウス、ラットが Lys を経口摂取した際に上記の Lys 代謝産物が骨格筋中で増加するとは限らない。したがって、Lys 経口摂取時における哺乳類の骨格筋中 Lys 代謝産物濃度を定量し、本研究で評価した Lys の代謝産物が実際に Lys の摂取で増加しているかを評価する必要がある。

第 2 の課題としては、自然老化時の Lys や QH の効果が不明であるという点が挙げられる。本研究でサルコペニアモデルとして用いた SAMP8 はあくまで老化促進モデルであり、自然老化動物ではない。さらに、SAMP8 において促進老化の原因となる遺伝子も特定されておらず [68]、SAMP8 で生じる形質が自然老化と必ずしも一致しない可能性がある。したがって、SAMP8 はサルコペニアを呈するものの、自然に老化した場合とは異なる代謝条件下にある可能性も否定できない。そのため、自然老化させたマウスやラットに Lys や QH を与え、SAMP8 と同様の結果が得られるか検討することが必要である。

第 3 の課題としては、オートファジーや UPS 以外のタンパク質分解システムの評価を、行っていないことが挙げられる。例えば、カルパイン系は、骨格筋においてアクチンやミオシンは分解しないが、収縮成分のアンカーとして機能するタイチンやネブリンといった細胞骨格タンパク質を分解する [120]。また、アポトーシスによるミトコンドリアの分解などもサルコペニアと関与する可能性が示唆されている [121]。したがって、今後は加齢時の骨格筋におけるカルパイン系及びアポトーシスの活性を評価し、Lys や QH による効果やその機構を明らかにすることが重要である。

第 4 の課題としては、新たに理想的な食品成分の組み合わせを検討する必要がある。本研究では、QH による摂食亢進効果が Lys と組み合わせることによって損なわれてしまい (Fig. 7-11)、SAMP8 におけるサルコペニアに対しても顕著な効果は認められなかった (Fig. 7-13)。そのため、互いの効果を打ち消さずに相加的・相乗的にサルコペニアの緩和に働く食品成分の組み合わせを探索することが課題である。

第 5 の課題として、筋力を評価することが重要であると考えられる。サルコペニアの診断



基準は、「筋肉量の低下」と「筋力の低下」の「両方」が生じることであり[5]、骨格筋量の維持だけでは「サルコペニアの予防」とは言えない。したがって、Lys や QH の摂取が加齢時の筋力低下に及ぼす効果を評価する必要がある。

また、これまでに Lys や QH の効果を運動と併用した例はない。高齢者が強度の高い運動を継続することは現実的ではないが、ウォーキングをはじめとする軽度の運動は継続が容易であり、身体機能の維持に有効である[5]。そのため、老化モデル動物等において自発運動をはじめとする負荷の少ない運動と Lys や QH の摂取を組み合わせることでより効果的にサルコペニアを緩和できる可能性もある。

Lys は、小麦グルテンやトウモロコシ、コメといった作物における制限アミノ酸であることから、その栄養学的な価値は古くから注目を集めていた。一方、Leu や Arg といったアミノ酸と比較して、Lys の機能性を評価した研究は非常に少ない。したがって、Lys の骨格筋タンパク質代謝に対する機能性を、代謝産物を含め、細胞から動物までの実験で評価した本研究は、Lys の学術的・栄養学的価値の向上に貢献するものであると考えられる。

以上より、Lys の摂取はサルコペニアや非アルコール性脂肪肝をはじめとする代謝異常の予防に有効である可能性があり、今後の詳細な作用機構の解明やヒトに対する臨床応用などによって、介護食（スマイルケア食[122]）や病院食、健康機能性食品への利用が期待される。アミノ酸の必要量に着目すると、高齢者における必須アミノ酸の必要量は成人と同じとすることが推奨されている[123]。成人の必須アミノ酸の必要量としては、総必須アミノ酸量として 1 日 0.184 g/ kg BW であり、体重 50kg であれば 9.4 g の必須アミノ酸を摂取する必要がある。また、2015 年版の日本人の食事摂取基準[124]では、70 歳以上の高齢者におけるタンパク質の 1 日あたりの推定必要量は 0.85 g/ kg BW と成人の必要量である 0.72 g/ kg BW よりも多い。高齢者の骨格筋において同化抵抗性が生じることを考慮すると、サルコペニアを予防するためには最低でもこれらの基準を満たすか、個人によっては上回る必要があると考えられる。しかし、加齢に伴って咀嚼・嚥下障害、口腔内の虚弱（オーラルフレイル）が生じるため、成人と同等のタンパク質を通常の食事から摂取することが困難となる場合もある。また、

加齢による食欲の減退によっても、通常の食事からタンパク質やアミノ酸の要求量を満たすことが困難になる恐れもある。こうした側面から、Lys や Leu など、抗サルコペニア効果を発揮するアミノ酸の摂取や食事への添加は、高齢者の生活の質を維持する上で重要と考えられる。

高齢化や人口減少が深刻化する昨今では、高齢者の健康寿命を延ばし、高齢者が生涯現役で活躍できる社会づくりが重要である。本研究がその一助となることを、心より願う。

## 要約

## 【第2章】

C2C12 筋管細胞においては、Lys は AMPK の不活化ではなく、Akt の活性化を主に介したオートファジーの抑制により筋原線維タンパク質分解を抑制することを示唆した。

## 【第3章】

実験1より、Sac は Lys と同様に Akt の活性化を介したオートファジーの抑制により、C2C12 筋管細胞における筋原線維タンパク質分解を抑制することを示唆した。

実験2より、2-AA は Lys よりも低濃度で C2C12 筋管細胞におけるオートファジーを介した筋原線維タンパク質分解を抑制する可能性を示した。

実験3より、Lys は C2C12 筋管細胞におけるタンパク質合成速度を濃度依存的に向上し、その作用には特異性がある可能性が示された。

実験4より、Pip は Lys よりも低濃度で骨格筋タンパク質合成の促進に寄与することを示唆した。

## 【第4章】

Lys による筋原線維タンパク質分解抑制作用は、食餌タンパク質が若干不足する条件において顕著であり、食餌タンパク質が充足した場合に摂取しても筋原線維タンパク質の分解抑制効果は生じない可能性を示した。

## 【第5章】

老化促進モデルマウス SAMP8 では加齢依存的な除脂肪体重の減少、非選択的オートファジーを介した筋原線維タンパク質分解の亢進、選択的オートファジーの不全が生じており、Lys の摂取は、非選択的オートファジーの阻害を介した筋原線維タンパク質分解の抑制によってサルコペニアの緩和に寄与することを示唆した。

## 【第6章】

老化促進モデルマウス SAMP8 はサルコペニアだけではなく、非アルコール性脂肪肝も併発するが、Lys の摂取は PGC-1 $\alpha$  や CPT-1a といった  $\beta$  酸化に関わる遺伝子の発現を亢進、また

は維持することによって SAMP8 で生じる脂肪肝を緩和することを示唆した。

#### 【第7章】

実験1より、QHはC2C12筋管細胞におけるROSの消去に寄与することを示した。

実験2より、QHは成熟ICRマウスにおいて骨格筋タンパク質分解の抑制には寄与しない一方で、摂食亢進に働くことを示唆した。

実験3より、QHはSAMP8における食欲減退を顕著に抑え、加齢に伴って減少する骨格筋量の維持に寄与する可能性を示した。

以上より、Lysとその代謝産物は骨格筋タンパク質の合成促進や分解抑制に寄与し、老化促進モデルマウスSAMP8によるLysの摂取はサルコペニアの緩和だけではなく、非アルコール性脂肪肝の予防にも有効である可能性を示した。さらに、QHは加齢時における食欲の減退を強く抑えるがLysとの同時摂取による相加的・相乗的な効果はないことを見出した。

併せて、本研究ではSAMP8の骨格筋において自然老化時の骨格筋における報告と類似したタンパク質分解システムの変化を認めたため、SAMP8は抗サルコペニア研究において有力なサルコペニアモデルとなる可能性がある。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多岐に渡る助言を頂き、相談に乗ってくださった、栄養化学研究室教授の長澤孝志先生に厚く御礼申し上げます。常にご多忙の中でも長澤先生にご指導いただけたおかげで本研究を推進できたと感じております。誠にありがとうございました。

栄養化学研究室准教授の伊藤芳明先生には、特に細胞実験やメカニズムの解析を行う上で、適切で親身なアドバイスを頂きました。実験の進め方、物事の捉え方で悩んでいるとき、常に相談に乗って下さいました。心より感謝申し上げます。

帯広畜産大学教授の福島道広先生には、骨格筋タンパク質代謝だけではなく、応用面や肝臓脂質代謝についても多くの助言を頂きました。誠にありがとうございます。

岩手大学農学部共同獣医学科教授の山本欣郎先生には、親身かつ丁寧に組織学的手法をご教授いただきました。誠にありがとうございます。C2C12細胞をご供与くださいました、東洋大学教授の根建拓先生に御礼申し上げます。また、本研究においてqRT-PCRを行うにあたり、MuRF1とatrogin-1のプライマー配列をご教授いただいた徳島大学教授の二川健先生、FGF21のプライマー配列をご教授いただいた東京大学助教の清水誠先生に御礼申し上げます。

第7章においてコエンザイムQ10の抗サルコペニア効果を評価するにあたり、素材提供、実験条件の調整、可溶化プロトコルの提供をしてくださった株式会社カネカ主任の宮越洋様に御礼申し上げます。

また、信州大学教授の樋口京一先生、東北大学准教授の都築毅先生、東京工科大学助教の本間太郎先生、当研究室修士課程修了生である沼倉正くんにはSAMP8を用いた実験を計画するにあたり様々な情報をいただきました。心より感謝します。

併せて、新潟大学教授の門脇基二先生、宇都宮大学教授の吉澤史昭先生、弘前大学准教授の前多隼人先生には様々なご助言をいただきました。感謝申し上げます。

本研究に対して研究助成を頂きました岩手大学学生プロジェクト、笹川科学研究助成、日本学術振興会に厚く御礼申し上げます。

私が研究室に配属されてから実験動物の飼育法や実験手法を指導して下さいました熊谷

弘太さん、平井佑佳さん、田中淳哉さん、伊藤珠姫さん、佐藤麻衣さんに感謝申し上げます。

卒業生・修了生をはじめ、栄養化学研究室に在籍している修士課程の谷地由佳さん、佐々木航平くん、佐藤由佳さん、戸田圭介くん、藤嶋拓巳くん、佐々木祐哉くん、村松菜緒さん、永見萌さんには最も苦しい時期を支えてもらいました。特に、祐哉くんと村松さんからは教わることもたくさんありました。本当にありがとうございます。心から感謝しています。

研究室を盛り上げ、研究室行事のサポートをしてくれた学部4年生の蒲原百合絵さん、駒ヶ嶺薫平くん、今野雅生くん、田代絢子さん、千葉麻衣子さん、林奈津美さん、前田大佑くんに感謝申し上げます。新たに配属された学部3年生6名に対しては、今後の活躍を期待しています。

本研究に対して最も貢献し、犠牲となった Wistar ラット、SAMR1、SAMP8、ICR マウスの全てに哀悼の意を表すとともに感謝申し上げます。

最後に、長きにわたる学生生活を、身を削り支えてくれた両親と兄、祖母、松田奈夕さん、親戚や多くの友人、研究を進めるきっかけをくださった遠藤章先生、能美佳央先生、故人である2人の祖父に心より感謝申し上げます。

2017年 佐藤友紀

## 引用文献

- [1] 平成 28 年版高齢化白書（概要版）

[http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/gaiyou/28pdf\\_indexg.html](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/gaiyou/28pdf_indexg.html)

- [2] 岩手県の高齢化率

<http://www.pref.iwate.jp/fukushi/koureisha/torikumi/042652.html>

- [3] 秋田県の高齢者数、高齢者世帯数

<http://www.pref.akita.lg.jp/www/contents/1408954352849/index.html>

- [4] 平成 26 年版厚生労働白書

<http://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/14/>

- [5] 小川純人 (2016) サルコペニア 診断と治療の ABC pp12-93、株式会社医学社、大坂

- [6] Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS (2005) Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem* **280**:7570–7580

- [7] Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **130**:2413–2419

- [8] Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, Sheffield-Moore M, Volpi E, Rasmussen BB (2008) Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol* **104**:1452–1461

- [9] Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DH, Goldberg AL (1995) Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol* **268**:E996–E1006

- [10] Mordier S, Deval C, Béchet D, Tassa A, Ferrara M (2000) Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* **275**:29900–29906

- [11] Mukai R, Horikawa H, Fujikura Y, Kawamura T, Nemoto H, Nikawa T, Terao J (2012) Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice. *PLoS One* **7**:e45048
- [12] 水島昇、吉森保 (2012) オートファジー 生命を支える細胞の自己分解システム pp3-217、株式会社化学同人、京都
- [13] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**:425–434
- [14] Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT (2009) Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:20405–20410
- [15] Sakuma K, Kinoshita M, Ito Y, Aizawa M, Aoi W, Yamaguchi A (2016) p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **7**:204–212
- [16] 田中啓二、大隅良典 (2007) ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー 作動機構と病態生理 pp1134-1135、共立出版株式会社、東京
- [17] Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL, Ulfhake B (2010) Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* **285**:39597–395608
- [18] Edström E, Altun M, Hägglund M, Ulfhake B (2006) Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol Ser A* **61**:663–674
- [19] Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* **15**:741–750
- [20] Zhang Y, Nicholatos J, Dreier JR, Ricoult SJ, Widenmaier SB, Hotamisligil GS, Kwiatkowski DJ, Manning BD (2014) Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1.



- Nature* **513**:440-443
- [21] Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**:577–590
- [22] Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**:214–226
- [23] Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**:132–141
- [24] Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**:472–483
- [25] Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B (2012) Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* **338**:956–959
- [26] Young VR, Munro HN (1978) N<sup>ε</sup>-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Fed Proc* **37**:2291–2300
- [27] Nagasawa T, Yoshizawa F, Nishizawa N (1996) Plasma N<sup>ε</sup>-methylhistidine concentration is a sensitive index of myofibrillar protein degradation during starvation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**:501–502
- [28] Sato T, Ito Y, Nedachi T, Nagasawa T (2014) Lysine suppresses protein degradation through autophagic-lysosomal system in C2C12 myotubes. *Mol Cell Biochem* **391**:37–46
- [29] Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T (2009) Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids* **37**:609–616
- [30] 畠山敦 (2002) 摂食アミノ酸による骨格筋タンパク質の分解抑制機構. 岩手大学大学農学研究科修士論文
- [31] 平井佑佳 (2009) シトルリンによる骨格筋タンパク質分解抑制作用. 岩手大学農学部卒

## 業論文

- [32] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2015) Attenuation of autophagic-proteolysis in C2C12 cells by saccharopine. *Mol Cell Biochem* **410**:93–100
- [33] Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Van Horn CG, Hutson SM, Davis TA (2010) Leucine and alpha-ketoisocaproic acid, but not norleucine, stimulate skeletal muscle protein synthesis in neonatal pigs. *J Nutr* **140**:1418–1424
- [34] Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, Loughna P, Churchward-Venne TA, Breen L, Phillips SM, Etheridge T, Rathmacher JA, Smith K, Szewczyk NJ, Atherton PJ (2013) Effects of leucine and its metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol* **591**:2911–2923
- [35] 佐藤友紀 (2013) リジンの摂取による骨格筋タンパク質の合成と分解の調節メカニズム. 岩手大学大学院農学研究科修士論文
- [36] Guo AY, Leung KS, Siu PM, Qin JH, Chow SK, Qin L, Li CY, Cheung WH (2015) Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8). *Exp Anim* **64**:425–433
- [37] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2014) Lysine suppresses myofibrillar protein degradation by regulating the autophagic-lysosomal system through phosphorylation of Akt in C2C12 cells. *Springerplus* **3**:584
- [38] Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**:1287–1295
- [39] 秋山徹、河府和義 (2008) 細胞・培地活用ハンドブック pp312-313、株式会社羊土社、東京
- [40] Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M (2008) Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *American Journal of Physiology* **295**:E1191–E1204

- [41] Markwell MA, Hass SM, Biober LL, Tolbert NE (1987) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206–210
- [42] Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156–159
- [43] Saha AK, Xu XJ, Lawson E, Deoliveira R, Brandon AE, Kraegen EW, Ruderman NB (2010) Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* **59**:2426–2434
- [44] Mammucari C, Schiaffino S, Sandri M (2008) Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* **4**:524–526
- [45] Herningtyas EH, Okimura Y, Handayaningsih AE, Yamamoto D, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K (2008) Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim Biophys Acta* **1780**:1115–1120
- [46] Ribeiro CB, Christofolletti DC, Pezolato VA, de Cássia Marqueti Durigan R, Prestes J, Tibana RA, Pereira EC, de Sousa Neto IV, Durigan JL, da Silva CA. (2015) Leucine minimizes denervation-induced skeletal muscle atrophy of rats through akt/mtor signaling pathways. *Front Physiol* **6**:73
- [47] Girón MD, Vílchez JD, Salto R, Manzano M, Sevillano N, Campos N, Argilés JM, Rueda R, López-Pedrosa JM (2016) Conversion of leucine to  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate by  $\alpha$ -keto isocaproate dioxygenase is required for a potent stimulation of protein synthesis in L6 rat myotubes. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **7**:68–78
- [48] Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA, Gygi MP, Shen K, Wyant GA, Wang T, Harper JW, Gygi SP, Sabatini DM (2016) The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway. *Cell* **165**:153–164
- [49] Gattrell SK, Berg LE, Barnard JT, Grimmett JG, Barnes KM, Blemings KP (2013) Tissue

- distribution of indices of lysine catabolism in growing swine. *J Anim Sci* **91**:238–247
- [50] Pink DB, Gatrell SK, Elango R, Turchinsky J, Kiess AS, Blemings KP, Dixon WT, Ball RO (2011) Lysine  $\alpha$ -ketoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase, is subject to substrate inhibition in pig liver. *Nutr Res* **31**:544–554
- [51] Papes F, Kemper EL, Cord-Neto G, Langone F, Arruda P (1999) Lysine degradation through the saccharopine pathway in mammals: involvement of both bifunctional and monofunctional lysine-degrading enzymes in mouse. *Biochem J* **344**:555–563
- [52] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2015) Attenuation of autophagic-proteolysis in C2C12 cells by saccharopine. *Mol Cell Biochem* **410**:93–100
- [53] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2016) Regulatory effects of the L-lysine metabolites, L-2-aminoadipic acid and L-pipecolic acid, on protein turnover in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem In press*
- [54] Watanabe G, Kobayashi H, Shibata M, Kubota M, Kadowaki M, Fujimura S (2015) Regulation of free glutamate content in meat by dietary lysine in broilers. *Anim Sci J* **86**:435–442
- [55] Pena IA, Marques LA, Laranjeira AB, Yunes JA, Eberlin MN, Arruda P (2016) Simultaneous detection of lysine metabolites by a single LC-MS/MS method: monitoring lysine degradation in mouse plasma. *Springerplus* **5**:172
- [56] Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P (2009) SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* **6**:275–277
- [57] Broquist HP (1991) Lysine-pipecolic acid metabolic relationships in microbes and mammals. *Annu Rev Nutr* **11**:435–448
- [58] Hallen A, Jamie JF, Cooper AJ (2013) Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of recent discoveries. *Amino Acids* **45**:1249–1272
- [59] Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M (2005) Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR

- effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* **7**:286–294
- [60] Laxman S, Sutter BM, Tu BP (2014) Methionine is a signal of amino acid sufficiency that inhibits autophagy through the methylation of PP2A. *Autophagy* **10**:386–387
- [61] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2015) Dietary L-lysine suppresses autophagic proteolysis and stimulates Akt/mTOR signaling in the skeletal muscle of rats fed a low-protein diet. *J Agric Food Chem* **63**:8192–8198
- [62] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2013) Regulation of skeletal muscle protein degradation and synthesis by oral administration of lysine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **59**:412–419
- [63] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC 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**:1939–1951
- [64] Young VR, Munro HN (1978) N<sup>ε</sup>-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Fed Proc* **37**:2291–2300
- [65] Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* **9**:311–326
- [66] Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, McGrath BC, Cavener DR, McNurlan MA, Wek RC (2004) Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J Biol Chem* **279**:36553–36561
- [67] Sullivan DH, Sun S, Walls RC (1999) Protein-energy undernutrition among elderly hospitalized patients: a prospective study. *JAMA* **281**:2013–2019
- [68] 荒井秀典 (2015) 別冊・医学のあゆみ サルコペニア - 成因と対策 pp5–117、医歯薬出版

株式会社、東京

- [69] Sato T, Ito Y, Nagasawa T (2016) L-Lysine suppresses myofibrillar protein degradation and autophagy in skeletal muscles of senescence-accelerated mouse prone 8. *Biogerontology* **18**:85–95
- [70] Gupte AA, Liu JZ, Ren Y, Minze LJ, Wiles JR, Collins AR, Lyon CJ, Pratico D, Finegold MJ, Wong ST, Webb P, Baxter JD, Moore DD, Hsueh WA (2010) Rosiglitazone attenuates age- and diet-associated nonalcoholic steatohepatitis in male low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Hepatology* **52**:2001–2011
- [71] Fontana L, Zhao E, Amir M, Dong H, Tanaka K, Czaja MJ (2013) Aging promotes the development of diet-induced murine steatohepatitis but not steatosis. *Hepatology* **57**:995–1004
- [72] Takeda T (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* **20**:105–110
- [73] Li J, Qi W, Chen G, Feng D, Liu J, Ma B, Zhou C, Mu C, Zhang W, Chen Q, Zhu Y (2015) Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy. *Autophagy* **11**:1216–1229
- [74] Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta* **1813**:1269–1278
- [75] Newton K, Matsumoto ML, Wertz IE, Kirkpatrick DS, Lill JR, Tan J, Dugger D, Gordon N, Sidhu SS, Fellouse FA, Komuves L, French DM, Ferrando RE, Lam C, Compaan D, Yu C, Bosanac I, Hymowitz SG, Kelley RF, Dixit VM (2008) Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* **134**:668–678
- [76] 貴戸武利 (2001) ロイシンの摂食による骨格筋タンパク質分解の調節. 岩手大学大学院農学研究科修士論文
- [77] White Z, White RB, McMahon C, Grounds MD, Shavlakadze T (2016) High mTORC1 signaling is maintained, while protein degradation pathways are perturbed in old murine skeletal muscles in the fasted state. *Int J Biochem Cell Biol* **78**:10–21

- [78] Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, Wackerhage H, Taylor PM, Rennie MJ (2005) Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* **19**:422–424
- [79] Chalil S, Pierre N, Bakker AD, Manders RJ, Pletsers A, Francaux M, Klein-Nulend J, Jaspers RT, Deldicque L (2015) Aging related ER stress is not responsible for anabolic resistance in mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **468**:702–707
- [80] Bujak AL, Blümer RM, Marcinko K, Fullerton MD, Kemp BE, Steinberg GR (2014) Reduced skeletal muscle AMPK and mitochondrial markers do not promote age-induced insulin resistance. *J Appl Physiol* **117**:171–179
- [81] Reznick RM, Shulman GI (2006) The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol* **574**:33–39
- [82] Bua EA, McKiernan SH, Wanagat J, McKenzie D, Aiken JM (2008) Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J Appl Physiol* **92**:2617–2624
- [83] Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM (2011) Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J* **15**:322–332
- [84] Sun X, Zemel MB (2009) Leucine modulation of mitochondrial mass and oxygen consumption in skeletal muscle cells and adipocytes. *Nutr Metab* **6**:26
- [85] 小林久峰、平林由理、上田剛郎、村上仁志 (2011) アミノ酸でやせる？ リジンの糖・脂質代謝調節. *アミノ酸研究* **5**:33–37
- [86] Oyewole AO, Birch-Machin MA (2015) Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J* **29**:4766–4771
- [87] Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB (2003) Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**:C806–C812

- [88] Rahman M, Mofarrahi M, Kristof AS, Nkengfac B, Harel S, Hussain SN (2014) Reactive oxygen species regulation of autophagy in skeletal muscles. *Antioxid Redox Signal* **20**:443–459
- [89] Sakellariou GK, Pye D, Vasilaki A, Zibrik L, Palomero J, Kabayo T, McArdle F, Van Remmen H, Richardson A, Tidball JG, McArdle A, Jackson MJ (2011) Role of superoxide-nitric oxide interactions in the accelerated age-related loss of muscle mass in mice lacking Cu,Zn superoxide dismutase. *Aging Cell* **10**:749–760
- [90] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**:119–131
- [91] Lee YH, Jung KS, Kim SU, Yoon HJ, Yun YJ, Lee BW, Kang ES, Han KH, Lee HC, Cha BS (2015) Sarcopaenia is associated with NAFLD independently of obesity and insulin resistance: Nationwide surveys (KNHANES 2008-2011). *J Hepatol* **63**:486–493
- [92] Ye X, Meeker HC, Kozlowski PB, Wegiel J, Wang KC, Imaki H, Carp RI (2004) Pathological changes in the liver of a senescence accelerated mouse strain (SAMP8): a mouse model for the study of liver diseases. *Histol Histopathol* **19**:1141–1151
- [93] Liu HW, Chan YC, Wang MF, Wei CC, Chang SJ (2015) Dietary (-)-Epigallocatechin-3-gallate Supplementation Counteracts Aging-Associated Skeletal Muscle Insulin Resistance and Fatty Liver in Senescence-Accelerated Mouse. *J Agric Food Chem* **63**:8407–8417
- [94] 高田邦昭、斎藤尚亮、川上速人 (2006) 染色・バイオイメージング実験ハンドブック pp78-81、株式会社羊土社、東京
- [95] Moon JS, Yoon JS, Won KC, Lee HW (2013) The role of skeletal muscle in development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Diabetes Metab J* **37**:278–285
- [96] Ulman EA, Ifft KH, Kari FW, Visek WJ (1981) Fatty liver of growing rats fed excess lysine and its prevention by adenine or allopurinol. *Lipids* **16**:393–396
- [97] Foretz M, Guichard C, Ferré P, Foufelle F (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is



- a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:12737–12742
- [98] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108**:1167–1174
- [99] Bakan I, Laplante M (2012) Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr Opin Lipidol* **23**:226–234
- [100] Zhang Y, Ma K, Song S, Elam MB, Cook GA, Park EA (2004) Peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1 $\alpha$ ). *J Biol Chem* **279**:53963–53971
- [101] Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, Hori RT, Cook GA, Park EA (2010) Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR  $\gamma$  coactivator (PGC-1 $\alpha$ ) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol* **325**:54–63
- [102] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, Barquissau V, Régnier M, Lukowicz C, Benhamed F, Iroz A, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Cano P, Mselli-Lakhal L, Mithieux G, Rajas F, Lagarrigue S, Pineau T, Loiseau N, Postic C, Langin D, Wahli W, Guillou H (2016) Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* **65**:1202–1214
- [103] Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**:771–774
- [104] Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR $\alpha$  and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* **5**:426–437

- [105] Ricquier D1, Bouillaud F (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* **345**:161–179
- [106] Asai A, Chou PM, Bu HF, Wang X, Rao MS, Jiang A, DiDonato CJ, Tan XD (2014) Dissociation of hepatic insulin resistance from susceptibility of nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat and high-carbohydrate diet in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **306**:G496–G504
- [107] Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A (2005) PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**:6465–6481
- [108] Xu L, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagao K, Jinzu H, Noguchi Y, Maegawa H, Kanasaki K, Koya D (2013) Ketogenic essential amino acids replacement diet ameliorated hepatosteatosis with altering autophagy-associated molecules. *Biochim Biophys Acta* **1832**:1605–1612
- [109] Lee MS, Lee HJ, Lee HS, Kim Y (2006) L-carnitine stimulates lipolysis via induction of the lipolytic gene expression and suppression of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* **9**:468–473
- [110] Obata F, Miura M (2015) Enhancing S-adenosyl-methionine catabolism extends *Drosophila* lifespan. *Nat Commun* **6**:8332
- [111] Zubiete-Franco I, García-Rodríguez JL, Martínez-Uña M, Martínez-Lopez N, Woodhoo A, Juan VG, Beraza N, Lage-Medina S, Andrade F, Fernandez ML, Aldámiz-Echevarría L, Fernández-Ramos D, Falcon-Perez JM, Lopitz-Otsoa F, Fernandez-Tussy P, Barbier-Torres L, Luka Z, Wagner C, García-Monzón C, Lu SC, Aspichueta P, Mato JM, Martínez-Chantar ML, Varela-Rey M (2016) Methionine and S-adenosylmethionine levels are critical regulators of PP2A activity modulating lipophagy during steatosis. *J Hepatol* **64**:409–418
- [112] Cabrera D, Ruiz A, Cabello-Verrugio C, Brandan E, Estrada L, Pizarro M, Solis N, Torres J, Barrera F, Arrese M (2016) Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with

- Sarcopenia and Decreased Serum Insulin-Like Growth Factor-1. *Dig Dis Sci* **61**:3190–3198
- [113] Frei B, Kim MC, Ames BN (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4879–4883
- [114] Kwong LK, Kamzalov S, Rebrin I, Bayne AC, Jana CK, Morris P, Forster MJ, Sohal RS (2002) Effects of coenzyme Q(10) administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat. *Free Radic Biol Med* **33**:627–638
- [115] Kalén A, Appelkvist EL, Dallner G (1989) Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* **24**:579–584
- [116] Tian G, Sawashita J, Kubo H, Nishio SY, Hashimoto S, Suzuki N, Yoshimura H, Tsuruoka M, Wang Y, Liu Y, Luo H, Xu Z, Mori M, Kitano M, Hosoe K, Takeda T, Usami S, Higuchi K (2014) Ubiquinol-10 supplementation activates mitochondria functions to decelerate senescence in senescence-accelerated mice. *Antioxid Redox Signal* **20**:2606–2620
- [117] Yamamoto K, Kitano Y, Shuang E, Hatakeyama Y, Sakamoto Y, Honma T, Tsuduki T (2014) Decreased lipid absorption due to reduced pancreatic lipase activity in aging male mice. *Biogerontology* **15**:463–473
- [118] Yamamoto K, E S, Hatakeyama Y, Sakamoto Y, Tsuduki T (2015) High-fat diet intake from senescence inhibits the attenuation of cell functions and the degeneration of villi with aging in the small intestine, and inhibits the attenuation of lipid absorption ability in SAMP8 mice. *J Clin Biochem Nutr* **57**:204–211
- [119] 内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム <http://www8.cao.go.jp/cstp/gaiyo/sip/>
- [120] Huang J, Forsberg NE (1998) Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12100–12105
- [121] Marzetti E, Leeuwenburgh C (2006) Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol* **41**:1234–1238
- [122] 農林水産省 スマイルケア食 <http://www.maff.go.jp/j/shokusan/seizo/kaigo.html>

[123] 大畑秀穂 (2009) タンパク質・アミノ酸の必要量 WHO/FAO/UNU 合同専門協議会報告、  
pp113-114、医歯薬出版株式会社、東京

[124] 菱田明、佐々木敏 (2014) 日本人の食事摂取基準 2015 年版、pp378-379、第一出版株式  
会社、東京