
摂食直後の組織タンパク質分解抑制因子の
検索と作用機構

課題番号 09660126

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 長澤孝志
(岩手大学農学部助教授)

はじめに

高齢化社会においてはいかに健康で長生きするかが重要である。健康ということは単に肉体的な健康だけではなく、精神的なものも含まれるが、精神的な健康を維持するうえでも、肉体的に健全な状態をできるだけ長く保つことが必要である。肉体的な健康ということは、疾病にかからない、速く回復すると言うことだけではなく、生物学的に避けて通ることのできない老化に対しても、それを受け入れつつ可能なかぎり健康でいることが重要と考える。老化は一般に記憶力や運動能力の減退が顕著に表れる。後者においては運動機能の低下が活動の低下につながり、結果的に社会における活動が少なくなり、記憶力の減退につながることも多い。したがって、高齢化社会においては活動できる運動能力の維持がきわめて重要である(1)。

運動能力には骨格筋量が密接に関係する。ガンや糖尿病、あるいは多くの感染症、火傷、術後などにおいては骨格筋量が顕著に減少する骨格筋の萎縮が認められる。骨格筋の萎縮は疾病による運動不足だけが原因ではなく、骨格筋タンパク質を分解し、アミノ酸から糖新生を行いグルコース供給をするという、骨格筋タンパク質をエネルギー源にする作用が大きな原因となっている。このようなときには一般にエネルギー補給が行われるが、疾病によっては、たとえばガンや敗血症では細胞からインターロイキンなどのサイトカインが放出され分解を促進する(2)。したがって、疾病における栄養不良や筋萎縮の抑制には、いかに骨格筋タンパク質の分解を抑制するかが鍵となる。

長期間の絶食もまた骨格筋量の減少を招く。Nishizawaら(3)はラットを絶食にした後に尿中に排泄された3-メチルヒスチジン(N τ -メチルヒスチジン; MeHis)の排泄量から骨格筋タンパク質の分解速度と合成速度の変化を測定した。MeHisは骨格筋タンパク質の60%以上を占める主要構成タンパク質であるミオシンとアクチンに特異的に含まれるアミノ酸で、タンパク質合成に再利用されず、アセチル化以外の代謝をヒトやラットでは受けずに尿中に定量的に排泄される。したがって、尿中に排泄されたMeHisは骨格筋(ミオシンとアクチン)の分解速度を反映する(4)。Nishizawaら(3)は絶食による直ちに合成速

度が減少し、1日程度遅れて分解速度が増加することを認めた。このような結果は他の研究者により報告されている(5)。一方、摂食と摂食の間、いわゆる食間の骨格筋タンパク質の代謝はほとんど研究されていない。それは、短時間の分解速度の変化を評価する系が無かったためである。

我々は血液中の3-メチルヒスチジン (MeHis) 濃度が筋肉 (筋原線維) タンパク質の分解の指標となることを見出した(6)。さらに、筋肉から筋肉切片を摘出し、これを生理的な緩衝液中でインキュベーションすることにより、緩衝液中に放出されたMeHis量から分解速度を求める方法も確立した(6)。これらの実験系を用いると摂食直後の分解速度の変化を評価することが可能である。そこで、マウスを用いて摂食直後の骨格筋タンパク質の合成と分解の変化について検討したところ(7)、予想通り、タンパク質合成は摂食直後に促進されることが示された。一方、分解は尿中に排泄されるMeHisの結果と異なり、摂食数時間後に顕著に抑制されることが明らかになった。すなわち、摂食が骨格筋タンパク質の合成と分解を短時間で制御していることが強く示唆されたことになる。このことは、疾病や老化に伴う骨格筋の萎縮において、食品の摂取がその防止にきわめて重要であることを示すものである。

以上の背景をふまえて、本研究では次の3点を中心に研究を実施した。

1) 摂食による骨格筋タンパク質の分解の抑制因子の検索

タンパク質の分解を制御する因子としてはインスリンやグルココルチコイドのようなホルモン、アミノ酸、カルシウム、インターロイキン-6などが知られている。摂食による分解の抑制はどの因子が関与しているか検討する。さらにこの因子の豪勢に及ぼす影響についても検討する。

2) 摂食によるタンパク質分解系の変動の解析

細胞内タンパク質の分解はリソソーム、カルパイン、ATP依存性の3つの経路が存在する。骨格筋タンパク質の分解には最近プロテアソームが関与していることが報告されているが、どの酵素系が摂食後の短期の分解を調節している

のか明らかにする。

3) 摂食タイミングと骨格筋タンパク質分解の変化

我々の今までの検討は全て、ラットやマウスに1日1回の食餌を与えた後の代謝回転の変化を検討したものである。ヒトのような1日3回の食事の摂取がこの合成の促進と分解の抑制にどのように影響するかについては全く不明である。この点について、ラットをモデルとして検討を行った。

研究組織

研究代表者： 長澤孝志（岩手大学農学部助教授）

研究経費

平成9年度	1,900千円
平成10年度	700千円
平成11年度	700千円
計	3,300千円

研究発表

(1) 学会誌等

Nagasawa, T., Hirano, J., Yoshizawa, F. and Nishizawa, N. (1998)
Myofibrillar protein catabolism is rapidly suppressed following protein feeding.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **62**, 1932-1937.

長澤孝志、平野順子、西澤直行（1988）
食餌タンパク質による摂食後の骨格筋タンパク質分解の抑制
必須アミノ酸研究, **151**, 4-9.

Yoshizawa, F., Kido, T., and Nagasawa, T. (1999)
Stimulative effect of dietary protein on the phosphorylation of p70 S6 kinase in the skeletal muscle and liver of food-deprived rats.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **63**, 1803-1805.

(2) 口頭発表

Nagasawa, T., Hirano, J., Yoshizawa, F., and Nishizawa, N. (1997)
An acute response of postprandial protein degradation in rat skeletal muscle.

16th International Congress of Nutrition, Montreal, Canada, August 29.

平野順子、長澤孝志、西澤直行 (1998)

食餌タンパク質による摂食直後の骨格筋タンパク質分解の抑制

第52回日本栄養・食糧学会大会、宜野湾、4月17日.

吉澤史昭、三浦豊、長澤孝志 (1999)

食餌再摂取及び絶食による蛋白質合成変化とEF-2量の関係

1999年度日本農芸化学会大会講演要旨, 174, 福岡, 3月30日.

貴戸武利、小田島ルミ子、平野順子、吉澤史昭、西澤直行、長澤孝志 (1999)

キビタンパク質摂取直後の骨格筋タンパク質の合成と分解

第53回日本栄養・食糧学会大会、東京、5月29日.

長澤孝志 (1999)

摂食後短時間で抑制される骨格筋タンパク質分解に及ぼす食餌因子

第163回必須アミノ酸研究協議会、市川、10月22日.

第1章 摂食による骨格筋タンパク質の分解の抑制因子の検索

1. 目的

1日6時間だけ食餌を摂取するように慣らしたマウスにおいて、摂食直後に合成の翻訳段階の指標となるポリソームが増加し、摂食3時間後から6時間後に分解の指標となる血漿MeHis濃度が著しく減少することを我々は認めた

(7)。すなわち、摂食により合成が促進され、それより少し遅れて分解が抑制されることが示された。このとき、この減少がマウスだけに起こるのか、また食餌のどの成分が分解や合成を調節しているかについては明らかではない。

合成の調節にはインスリンが強く関与していることが多くの研究結果から明らかになっている(8)。インスリンはタンパク質合成におけるシグナル伝達系に関与するタンパク質のリン酸化を刺激することが知られている。一方、インスリンは*in vivo*では細胞を用いた系のような効果が少ないことも報告されている。分解もインスリンが抑制することが知られているが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。インスリンは食餌を摂取すると、血糖値の増加によりきわめて短時間に分泌されることから、食餌のエネルギー（特に糖質）が合成と分解を調節する可能性が考えられる。

タンパク質の合成にはアミノ酸の供給が必須である。特に骨格筋においてはロイシンなどの分岐鎖アミノ酸がタンパク質合成を刺激することが知られている(9)。肝タンパク質の分解にはいくつかの調節アミノ酸（Phe, Leu, Glnなど）が関与していることがKadowakiら(10)により報告されているが、骨格筋タンパク質については明らかではない。しかし、食餌タンパク質由来のアミノ酸が骨格筋タンパク質の分解を制御している可能性も否定はできない。

本研究では以上の可能性を考慮し、まずラットにおいて摂食直後の骨格筋タンパク質の分解の抑制が起こるか検討した。さらに、この分解の抑制にどのような因子が関与しているか、すなわち、タンパク質あるいはエネルギーに依存するか検討を行い、調節因子の検索を行った。

2. 方法

動物の飼育

実験動物としてはSprague-Dawley系あるいはWistar系雄ラット、3週齢を日本クレアから購入し、室温22℃、湿度55%で午前6時から午後6時を明とする明暗交代下で飼育した。水は自由摂取とした。2～3日の予備飼育（ラット用固形飼料の給与）の後、20%カゼイン食を3日間自由摂取させ、その後午前10時から12時間、9時間、6時間と20%カゼイン食の摂食時間の短縮に約2週間かけて慣れさせた。実験最終日にラットに午前10時から1時間だけ試験食を摂取させた。

試験食摂取直前（18時間絶食、摂食後-1時間）、直後（摂食後0時間）、摂食3時間後、6時間後、12時間後にジエチルエーテル麻酔下、下大静脈より採血し、屠殺した。血液は血漿、または血清を得た。後肢筋からヒラメ筋と長指伸筋を摘出し、分解速度の測定に用いた。

ラットへのアミノ酸の静脈投与は次のように行った。350 μ M Gln、180 μ M Pro、170 μ M Leu、80 μ M His、70 μ M Trp、70 μ M Met混合した生理食塩水溶液をラット尾静脈から体重1kg当たり0.5ml投与した。投与前、投与10分後、1時間後、3時間後に屠殺し、上記と同様に血漿とヒラメ筋、長指伸筋を採取した。

骨格筋タンパク質の分解の評価

骨格筋タンパク質の分解は、血中MeHis濃度の変化とヒラメ筋および長指伸筋からのMeHisの放出速度から評価した。

血中MeHis濃度はNagasawaら(11)の方法により α -フタルアルデヒド誘導体のHPLCによる分離で定量した。トリクロロ酢酸で除タンパク質した血漿あるいは血清試料に α -フタルアルデヒド溶液を加え、HPLCに注入した。HPLCの装置はポンプはLC-10AS（島津製作所）、分光蛍光検出器は920FP（日本分光）、カラムはLichrospher 100RP18e（4.0 x 250 mm、Merck）を用い、40℃で分析した。移動相は50mM酢酸緩衝液pH5.0／アセトニトリル=11.2／

88.8を用いた。

単離筋肉切片からのMeHisの放出速度は次のように測定した。後肢筋から単離したヒラメ筋あるいは長指伸筋を1 mlの10mMグルコースを含むKrebs-Ringer重炭酸緩衝液に移し、30分間37°Cでインキュベーションした後に、新たな緩衝液に移し、2時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、筋肉切片を取り除き、緩衝液中のMeHis濃度を測定した。MeHis濃度はフルオレスカミンの酸、熱安定誘導体をHPLCで分析した(12)。

骨格筋タンパク質のポリソームプロファイルの測定

骨格筋タンパク質の合成速度を評価するためにポリソームプロファイルを解析した。一般に、骨格筋においては短期のタンパク質合成は翻訳段階で調節される。合成が活発なときにはmRNA上にリボソームが多く連なった状態(ポリソーム)となり、合成が低下したときには遊離のリボソーム(モノソーム)やサブユニットに解離したリボソームが増加する。この性質を利用し、骨格筋ホモジネートからポストミトコンドリア画分を調製し、これから遠心分離によりリボソーム画分を得て、密度勾配遠心分離でモノソームとポリソームを分離することが可能である。これを連続的にモニターするとポリソームの割合から、タンパク質合成速度を評価できる。ポリソームの解析方法はYoshizawaら(13)の方法に基づき行った。

p70 S6 kinaseの活性測定

タンパク質合成が活発なときには、シグナル伝達系のタンパク質であるp70 S6 kinase (p70S6 k) がリン酸化された活性型となる。そこで、活性型のp70S6 k量を測定することで、シグナル伝達系の側からタンパク質合成を評価した。

屠殺直後に摘出した後肢筋または肝臓を20 mM HEPES pH7.4緩衝液でホモジナイズし、10,000 ×g遠心分離の上清を得、これを7.5%ポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEで分離した。ゲルからタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、anti-p70S6 k polyclonal抗体 (Stress Gen Biotechnologies,

Canada) を用いて染色した。

血清ホルモン濃度の測定

血清中のインスリン濃度は栄研化学のインスリン測定RIAキットを用いて測定した。

血清中のコルチコステロン濃度はAmershamのコルチコステロン測定RIAキットを用いて測定した。

血清アミノ酸濃度

血清アミノ酸濃度はアミノ酸自動分析計（日本電子JCL500/V）を用いて測定した。

3. 結果および考察

無タンパク質食摂取直後の骨格筋タンパク質分解、合成の応答 (13,14,15)

ラットを18時間絶食させた後に1時間だけ20%カゼイン食あるいは無タンパク質食を与え、摂食前後の血清MeHis濃度の変化をFig. 1に示す。20%カゼイン食摂取3時間後には摂食直前（18時間絶食）に比べ有意にMeHis濃度が減少したが、12時間後には摂食直前のレベルに戻った。このとき、無タンパク質食を与えたラットでは摂食3時間後の抑制は観察されなかった。血清MeHis濃度は筋原線維タンパク質の分解速度の指標となることから(6)、ラットにおいてもマウス(7)と同様に20%カゼイン食により骨格筋タンパク質の分解が抑制された可能性が示唆された。しかし、血清MeHisには骨格筋以外由来のMeHisも含まれることと、MeHis濃度が筋肉からのMeHis放出速度と腎臓における尿への排泄速度の差により決定されることから、必ずしも血清MeHis濃度が分解を正確に反映しているわけではない。そこで、単離筋肉切片からのMeHis放出速度を測定して、直接筋肉タンパク質の分解速度を測定した (Fig. 2)。

赤筋であるヒラメ筋、白筋である長指伸筋ともに20%カゼイン食では摂食後3から6時間でMeHisの放出速度が摂食直前に比べ有意に抑制されたが、無タンパク質摂取では抑制は認められなかった。これは、血清MeHis濃度の変化と

一致したものである。したがって、筋肉の種類を問わず、タンパク質を含む食餌が骨格筋タンパク質の分解を抑制することが明らかとなった。Goodman and del Pilar Gomez (16)は4から24時間の再摂食が筋原線維タンパク質の分解を抑制することを示した。Botbol and Scornik(17)は3.5時間の再摂食で、マウス骨格筋のタンパク質分解が抑制されることを認めた。このように再摂食が骨格筋タンパク質の分解を抑制することは知られていたが、摂食後数時間でタンパク質を含む食餌のみが分解を抑制するということは本研究が初めて示したものである。

骨格筋のp70S6k活性はFig. 3に示すように摂食後直ちにリン酸化された高分子量のバンドが増加し、摂食9時間後には摂食前のレベルに戻ったことから、MeHisの放出速度が摂食後数時間後に減少するのに対して、p70S6k活性は摂食直後から活性化されることが明らかになった。一方、このような変化は無タンパク質食摂取では認められなかった。骨格筋で認められた20%カゼイン食投与によるp70S6kのリン酸化は肝臓でも認められた (Fig. 3)。

以上の結果は、先にマウスで示された摂食による短時間の骨格筋タンパク質合成の促進と、それに少し遅れて発現する分解の抑制が、ラットにおいても見られることを示したものである。さらに、これらの変化が摂取タンパク質に依存する可能性を示唆するものである。

インスリン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(8)。また、グルココルチコイドは分解を強く促進することが知られている(18)。今回の実験の結果がこれらのホルモンの分泌による可能性をみるために、血清インスリンおよびグルココルチコイド濃度を測定した (Fig. 4)。血清インスリン濃度は摂食直後から著しく上昇し、摂食3時間後には摂食前のレベルとなった。インスリンの分泌は糖質の摂取により活発になる。したがって、20%カゼイン食の摂取により血清インスリン濃度が上昇したのは主に食餌中の糖質によると考えられる。したがって、増加した血清インスリン濃度がタンパク質合成と分解を制御した可能性が考えられるが、無タンパク質摂取でもインスリン濃度はある程度増加すると考えられる。しかし、上記で示したように、無タンパク質食では分解の抑制は観察されない。さらに、インスリン濃度

の変化は合成の変化とは一致したが、分解の変化とは一致しなかったことから、摂食後の合成の促進、分解の抑制はインスリンで制御されているのではなく、かなりの部分を摂取タンパク質により制御されている可能性が示唆された。

一方、血清グルココルチコイド濃度は摂食後有意に低下するものの、12時間後までその後大きな変化はなかった。合成と分解の変化に一致していなかったことから、グルココルチコイドが摂食による合成促進、分解抑制に関与している可能性は少ないと考えられた。

タンパク質含量の異なる食餌を摂取した後の応答(15,19)

食餌タンパク質が摂食直後の骨格筋タンパク質の分解を制御しているとすれば、食餌中のタンパク質含量に依存した分解の抑制が起こると考えられる。そこで、本実験ではまず、摂取タンパク質を0、10、20、40%と変化させて摂食終了後3時間のヒラメ筋と長指伸筋からのMeHis放出速度を比較した (Fig. 5)。

無タンパク質食 (0%) を摂取したラットにおける両筋肉切片からのMeHis放出速度は摂食直前 (18時間絶食) とほとんど変わらなかったが、摂取タンパク質含量を増加させるに伴い、MeHis放出速度は減少し、ヒラメ筋では20%、40%、長指伸筋では40%タンパク質食で有意に放出速度が減少した。すなわち、摂取する食餌中のタンパク質含量の増加に伴い骨格筋タンパク質の分解も抑制されることが明らかとなった。

ところで、無タンパク質食を与えたラットの食餌摂取量は20%カゼイン食のその約60%であった。これは、一般的に無タンパク質食は自由摂取においても摂取量が少ないことに加え、20%カゼイン食を摂取していたラットが無タンパク質食を摂取することに慣れていなかったためと考えられる。逆に、無タンパク質食摂取では分解の促進が見られることから、無タンパク質食の応答が摂取エネルギーが少なかったためとも考えられる。そこで、摂取タンパク質量が同一でかつエネルギー量が80%、50%の食餌を、ラットに1時間だけ摂取させたときのヒラメ筋と長指伸筋からのMeHis放出速度を測定した (Fig. 6)。ど

これらの筋肉においても、エネルギー量が減少してもほぼ同一のMeHis放出速度の抑制が認められた。すなわち、摂食直後の分解の抑制には、摂取タンパク質量が強く関与していることが示された。

(3) アミノ酸食を投与した後の応答

摂食後の早い時間の骨格筋タンパク質の合成促進、分解抑制に摂取タンパク質が強く関与していることが明らかとなったので、次にタンパク質の何がこれらの調節をしているか検討した。肝臓においてはPheやLeu、Hisなどがタンパク質分解の調節アミノ酸であることが知られている(10)。また、骨格筋においてはLeuがタンパク質合成を促進し、分解を抑制すると言われている(9)。そこで、アミノ酸を摂取した場合にも分解の抑制が認められるか検討を行った。

ラットに、試験食として20%カゼイン食に含まれる必須アミノ酸、あるいはロイシンと等量の必須アミノ酸またはロイシンを窒素源とする飼料を1時間だけ与え、3時間後のMeHis放出速度を測定したところ、必須アミノ酸食とロイシン食はカゼイン食ほどではないが、摂食前や無タンパク質食に比べ、有意に遅かった (Fig. 7)。したがって、タンパク質の摂食による骨格筋タンパク質の分解抑制は、必須アミノ酸、特にロイシンによることが強く示唆された。このとき血液中のロイシンなどの濃度も摂食直後から上昇した。しかし、この実験ではデンプンなどを含む飼料としてアミノ酸を投与しており、摂食直後のインスリンの影響は無視できない。そこで、次にロイシンのみを単独で強制投与した。

ラットに1日の摂食タンパク質のロイシン量に等しくなるように、ロイシン懸濁液 (5.4ml/100ml) を体重100g当たり1ml胃内に強制投与し、経時的に長指伸筋からのMeHis放出速度を測定した (Fig. 8)。その結果、ロイシン投与30分後から分解の抑制が認められ、それは投与4時間後まで継続した。すなわち、経口的に摂取したロイシンが骨格筋タンパク質の分解を抑制することが明らかとなった。ロイシンの骨格筋タンパク質分解抑制作用は、*in vitro*の系(20,21) や継続的な静脈投与 (22) で明らかにされているが、経口的に投与したロイシンが分解を抑制するという知見は、はじめてのものである。

次にロイシンなどのアミノ酸の分解抑制効果をin vivoで明らかにする目的で、肝臓で示されている調節アミノ酸 (10) を尾静脈から投与して検討した。先の実験で経口的に投与したロイシンが分解抑制作用を示したので、直接静脈から投与した場合も分解を抑制すると予想されたが、ヒラメ筋、長指伸筋どちらの筋肉においても、投与前のMeHis放出速度とアミノ酸群の差は認められなかった (Fig. 9)。さらにこのとき、血清ロイシン濃度にも差はなかった (Fig. 9)。血清ロイシン濃度が上昇しなかったから、分解抑制効果が認められなかったと解釈されるが、アミノ酸は尾静脈から投与しているので、ごく短時間に (10分以内) 濃度は上昇したはずである。しかし、継続的な投与ではなく、1回投与なので、直ちに希釈されたと考えられる。先の実験と合わせて考えると、分解の抑制には継続的なアミノ酸 (ロイシン) 濃度の維持、あるいは高濃度のアミノ酸が必要なかもしれない。一方、合成は直ちに促進される (7) ことから、合成の促進と分解の抑制は全く異なる機構が存在していると考えられる。今後、これらの点を明らかにする必要がある。

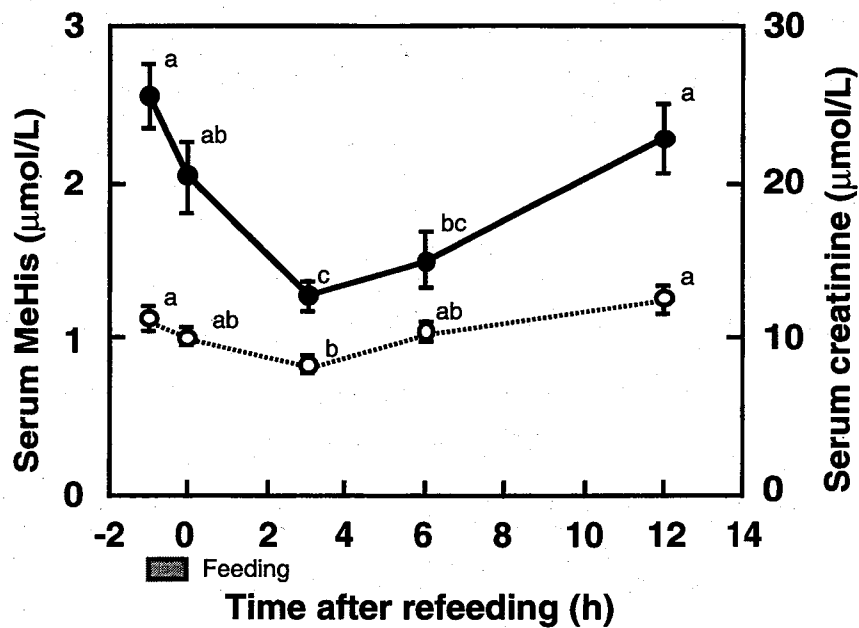


Fig. 1. Serum 3-methylhistidine (MeHis) and creatinine concentrations in rats before and after refeeding for 1h.

Closed circle shows MeHis concentration and open circle shows creatinine concentration. Values are means \pm SEM for 6 rats. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

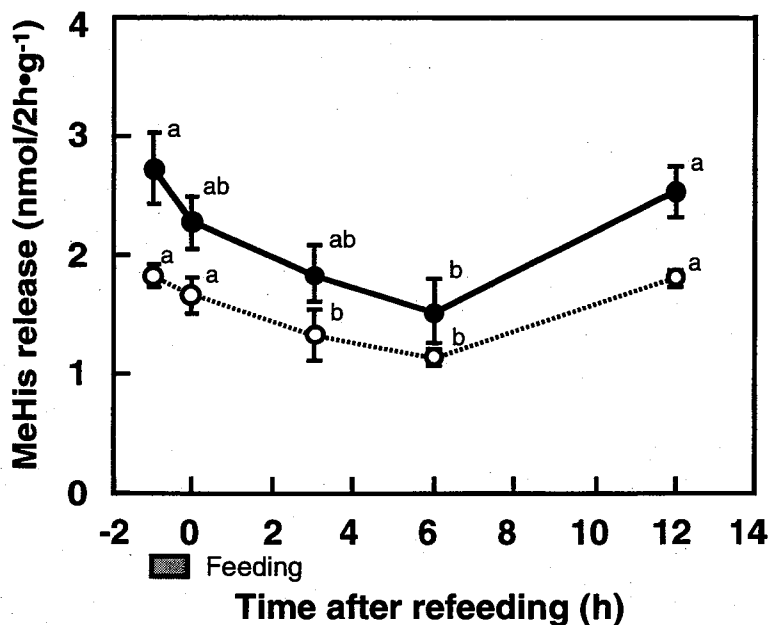


Fig. 2. Rates of 3-methylhistidine (MeHis) release from isolated soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscle.

Closed circle shows soleus muscle and open circle shows EDL muscle. Values are means \pm SEM for 6 rats. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

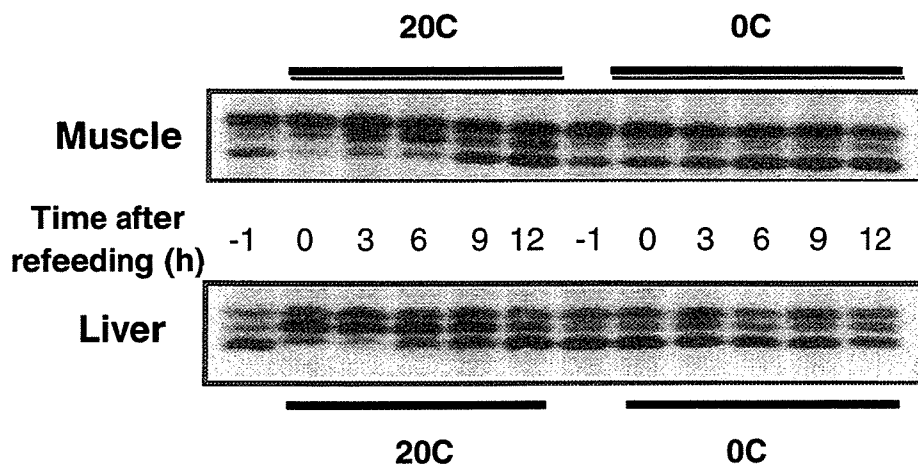


Fig. 3. Changes in the phosphorylation of p70S6K in skeletal muscle and liver after refeeding rats that had been starved for 18h.

Rats were starved for 18h and refeed on a 20% casein diet (20C) or a protein-free diet (0C).

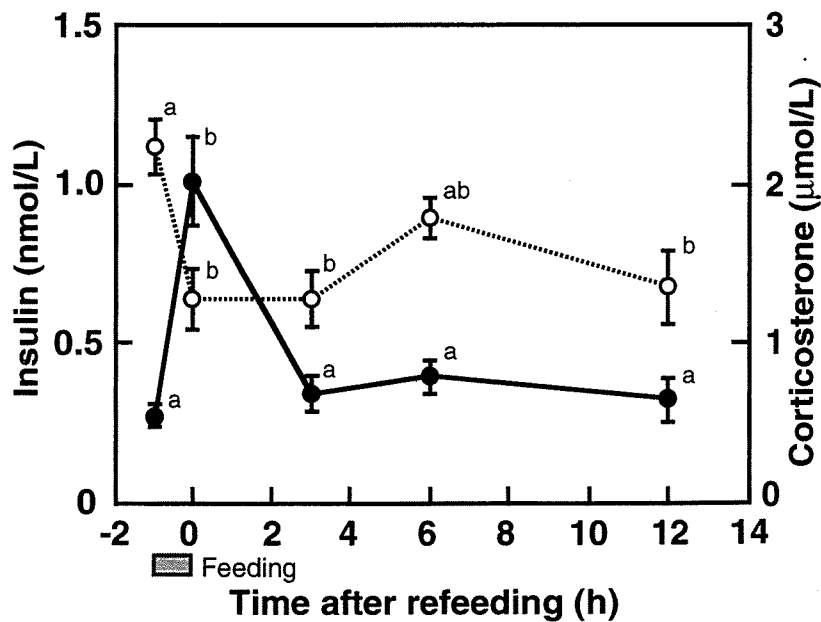


Fig. 4. Serum insulin and corticosterone concentration in rats before and after refeeding for 1h.

Closed circle shows insulin concentration and open circle shows corticosterone concentration. Rats were unfed for 18 h and refeed for 1 h. Values are means \pm SEM of 6 rats. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

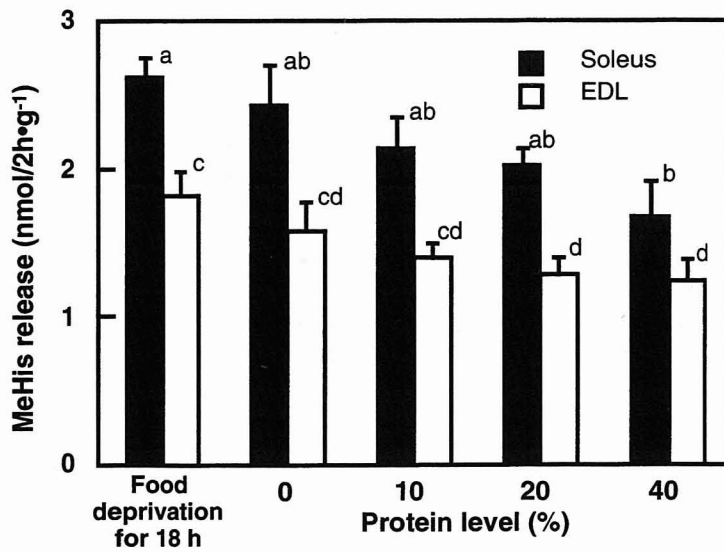


Fig. 5. Rates of 3-methylhistidine (MeHis) release from isolated soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscle of rats fed on a different level of dietary protein.

Rats were unfed for 21 h and refed a 0, 10, 20 or 40% casein diet for 1 h. Values are means \pm SEM for 6 rats. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

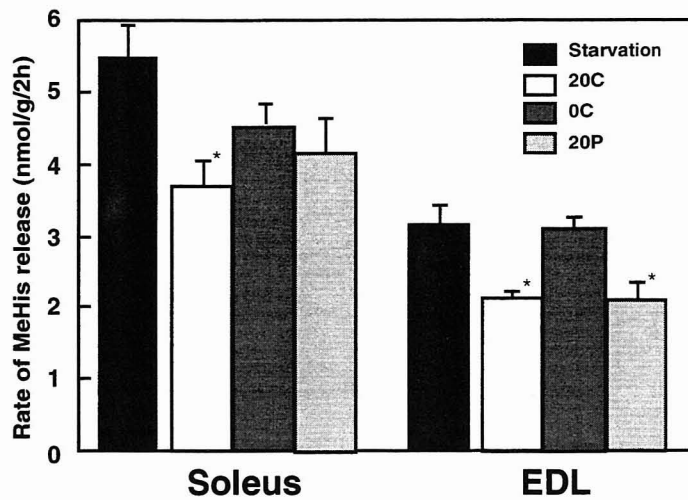


Fig. 6. Rates of 3-methylhistidine (MeHis) release from isolated soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscle of rats fed on 20% casein diet, protein free diet (0C), or 20% casein diet being the same amount of protein free diet (20P).

Rats were unfed for 18 h and refed the diet for 1 h. The rate of protein degradation was measured at 3 h after refeeding. Values are means \pm SEM for 6 rats. * $P < 0.05$ vs Starvation.

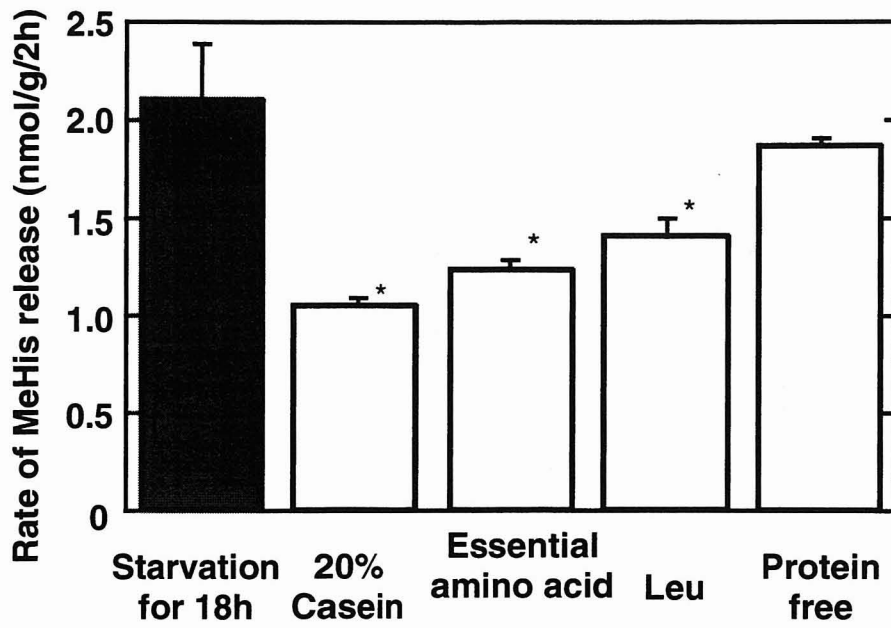


Fig. 7 Effects of dietary amino acids on muscle protein degradation. Each value is the mean \pm SE of 5 rats. *P<0.05 vs starved (prior to feeding) rats.

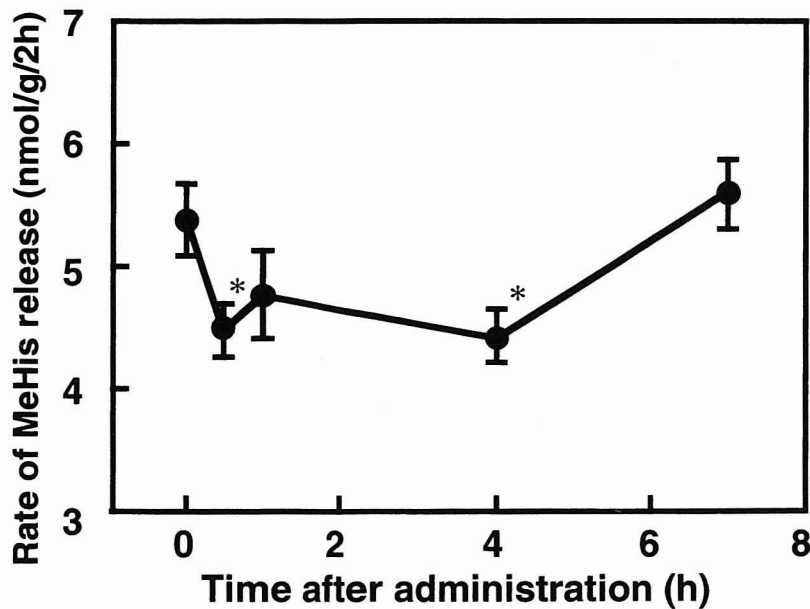


Fig. 8 Effects of force fed Leu on muscle protein degradation. Each value is the mean \pm SE of 6 rats. *P<0.05 vs starved (prior to feeding) rats.

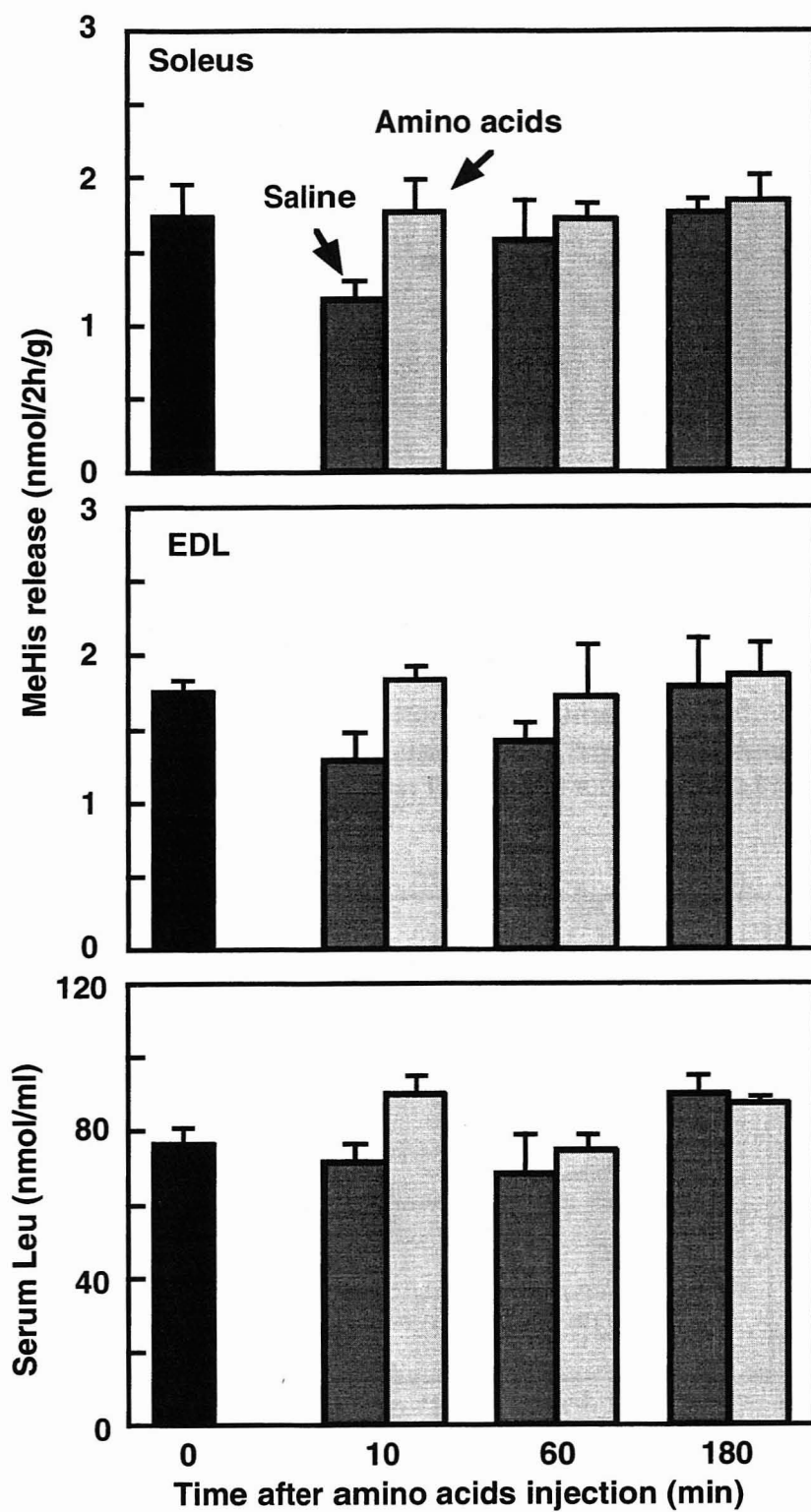


Fig. 9 Effects of amino acids injection on muscle protein degradation. Each value is the mean \pm SE of 6 rats.

第2章 摂食によるタンパク質分解系の変動の解析

1. 目的

細胞内タンパク質の分解機構は合成機構に比べあまり明らかになっていない。それは、タンパク質の分解に合成におけるDNAのような特異性が無いためである。タンパク質の分解はプロテアーゼにより行われることは疑いのないことであるが、実際にどのようなプロテアーゼが作用しているかについては未だに明確にはなっていない。

細胞内のタンパク質の分解はリソソーム内のカテプシンL、B、Hなどによる分解系、カルシウムにより活性化されるカルパインによる系、多機能のプロテアーゼ活性を有する高分子量のプロテアソームによる分解系が現在のところ存在することが明らかとなっている(23)。Goldbergのグループは絶食や糖尿病時にはプロテアソームによる分解系が活性化され、骨格筋タンパク質の分解が顕著に促進されることを示唆している(23)。一方、インスリンはリソソームの分解活性に関わるオートファゴソームの形成を阻害することが報告されている(24)。Huang and Forsberg(25)は筋原線維タンパク質の分解の第一段階はカルパインによるミオシン、アクチン線維の解離であることを提案している。このように、他の細胞内タンパク質以上に骨格筋においては分解系の同定が困難である。

摂食後の骨格筋タンパク質の分解抑制のメカニズムについてはどうであろうか。Wing and Goldberg(26)は絶食時にはATP依存性のユビキチン-プロテアソーム系の活性が他のタンパク質分解系に比べ活性化されることを示した。逆に言えば、摂食によりATP依存性のユビキチン-プロテアソーム系の活性が阻害され分解が抑制されることが予想される。一方、摂食直後にはインスリンの分泌が盛んになることから、インスリンによるオートファゴソームの形成阻害から(24)、リソソーム系のタンパク質分解活性が阻害されることも予想される。そこで、本研究では摂食直後の分解抑制に係わる酵素系の解析を目的に以下の実験を行った。

2. 方法

実験動物

実験には3週齢の雄Sprague-Dawley系ラットを用いた。前章と同様に、1日6時間の摂食にならした後に、実験最終日に1時間だけ20%カゼイン食を摂取させ、その前後に経時的にラットを屠殺し、ヒラメ筋と長指伸筋を得た。これらの筋肉は直ちに生理的緩衝液に浸し、30分間のインキュベーションの後に2時間37℃でインキュベーションした緩衝液中に放出されたMeHis濃度を測定した。

阻害剤を用いたタンパク質の分解系の解析

単離筋肉切片をインキュベーションするKrebs-Ringer重炭酸緩衝液中に10mMメチルアミンを加え、リソソームのpHを上昇させ、また、同緩衝液からカルシウムを除くことによりカルパイン活性を阻害した。右足の筋肉は阻害剤などを加えない緩衝液でMeHis放出速度を測定し、左足は阻害剤を加えた緩衝液でMeHis放出速度を測定した。両者の差がリソソームとカルパインによるタンパク質分解を表わすことになる。

タンパク質分解酵素活性

カテプシンL、B、およびHの活性はCbz-Phe-Arg-MCA（カテプシンL+B）、Cbz-Arg-Arg-MCA（カテプシンB）、Arg-MCA（カテプシンH）を基質とし、腓腹筋のホモジネートを粗酵素液として測定した（27）。

カルパイン活性はカゼインを基質として、カルシウムイオン存在、非存在下における基質の分解量の差から測定した（28）。

プロテアソーム活性はトリプシン様、キモトリプシン様、ペプチジルグルタミルペプチダーゼ活性を合成基質を用いて測定した（29）。

タンパク質量はMarkwellら（30）の方法で測定した。

ユビキチン化タンパク質の検出

26Sプロテアソームは細胞内に普遍的に存在する分子量86,000の熱安定性ポリペプチドであるユビキチンが結合したタンパク質を選択的に分解する。

近年、ATP、ユビキチン依存性のプロテアソームによる細胞内タンパク質分解が注目されている。本研究においても、筋肉タンパク質が摂食シグナルによりユビキチン化されるかどうか、ウエスタンブロットを用いてユビキチン化タンパク質の検出を試みた。

腓腹筋をプロテアソームの阻害剤であるMG132存在下、700×g、10分間遠心分離し、沈殿を筋原線維画分とし、上清の10,000×g上清を筋漿画分とした。これらを12%アクリルアミド濃度のSDS-PAGEで分離し、タンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗ユビキチン抗血清 (Sigma) で染色した。

3. 結果と考察

摂食後のタンパク質分解系の解析

Fig. 11に、単離筋肉切片をインキュベーションする緩衝液中にメチルアミンを加えてリソソーム系タンパク質分解活性を阻害したときの緩衝液中へのMeHis放出速度を示す。対照は阻害剤を加えていない緩衝液でインキュベーションしたものである。ヒラメ筋、長指伸筋ともに摂食後3および6時間で有意にMeHisの放出速度が減少した。メチルアミン添加によって、絶食群を含め影響は認められなかった。したがって、摂食後の骨格筋（筋原線維）タンパク質の分解の抑制はリソソーム系の分解抑制ではないと考えられた。さらに、絶食時においてもリソソーム系の阻害がほとんどかからなかったことから、タンパク質分解におけるリソソームの寄与は少ないものと考えられた。

上記の緩衝液からカルシウムを除いた緩衝液で単離筋肉切片をインキュベーションした結果がFig. 12である。両筋肉ともに、絶食時にはカルシウム非存在下インキュベーションした筋肉からのMeHis放出速度が、カルシウム存在下インキュベーションした場合より約30%少なかった。ところが、摂食3、6時間後では対照と阻害群では差が認められなかった。この結果は、絶食時にはカルパインがある程度分解に関与しているが、摂食によりカルパインによる分解が阻害されたことを示している。

一方、この系ではメチルアミンによるリソソーム系も阻害しているので、阻害群における残った分解はリソソーム、カルパイン以外の分解系によるものと推定される。現在のところ、この部分はプロテアソームによる分解と考えられる。この分解は絶食群に比べ、摂食によりわずかに減少する傾向はあるものの有意差はなかった。したがって、摂食による分解抑制にはプロテアソームの関与は少ないと考えられた。

タンパク質分解酵素活性の変化

リソソーム系のタンパク質分解酵素、カテプシンL、B、H活性は摂食による変化は認められなかった (Fig. 11)。リソソームによる分解は、リソソーム内のカテプシンL、B、Hなどのタンパク質分解酵素の発現とリソソームへの移動、および分解されるタンパク質を包む小胞であるオートファゴソームの形成が関係する。したがって、酵素活性だけを測定してもリソソームによる分解活性を評価することはできない。本実験の結果は、少なくとも摂食は酵素活性そのものには影響を与えないことを示している。

阻害剤を用いた単離筋肉切片からのMeHis放出速度から評価した分解速度では、カルパインが摂食後の分解抑制に関与している可能性が示唆された。一方、カルパイン活性は摂食後の変化がなかった (Fig. 12)。この結果は摂食シグナル、特にタンパク質によるシグナルがカルパインの発現そのものより、細胞内のカルシウムイオン濃度に関係する可能性が考えられる。しかし、これについてはさらに詳細な検討が必要である。

プロテアソーム活性についても摂食による影響は認められなかった (Fig. 13)。最近の研究では絶食 (26) などで顕著に骨格筋が萎縮する原因がATP-ユビキチン-依存性のプロテアソームによる分解の増加であることが示唆されている。これらの研究ではATP依存性の分解活性が増加するだけではなく、ユビキチンmRNAやプロテアソームサブユニットのmRNA発現量も増加していることが認められている。mRNAの発現が増えれば、翻訳段階における制御がないとすればタンパク質量も増加し、活性が上昇すると考えられる。本研究の結果によれば、摂食後のプロテアソーム各活性には顕

著な変化がなかったことから、摂食によるタンパク質シグナルはプロテアソームの発現には影響しないと考えられた。しかし、プロテアソームは非常に複雑な酵素であり、多くの調節段階を有していることから、さらに詳細な検討が必要である。

ユビキチン化タンパク質量の変化

絶食時の骨格筋タンパク質の分解の亢進時にはユビキチン化タンパク質も増加することが知られている(26)。そこで、本研究においてもウエスタンブロットにより骨格筋タンパク質のユビキチン化を検討した(Fig. 14)。摂食前後におけるユビキチン化タンパク質の顕著な増減は認められなかった。したがって、摂食によるタンパク質シグナルはユビキチン化酵素の活性には影響を与えないものと考えられた。

以上の結果から、第1章で示したように、ラットにおいてタンパク質を含む飼料を摂取した場合、タンパク質に関しては翻訳段階の活性化によりきわめて早い時期に促進されるのに対して、分解はATP-ユビキチン-依存性のプロテアソームの関係酵素の発現やユビキチン化の促進というよりも、カルシウムイオン濃度の低下などのカルパインの活性発現に必要な酵素以外の因子の変化により、数時間後に抑制されることが考えられた。

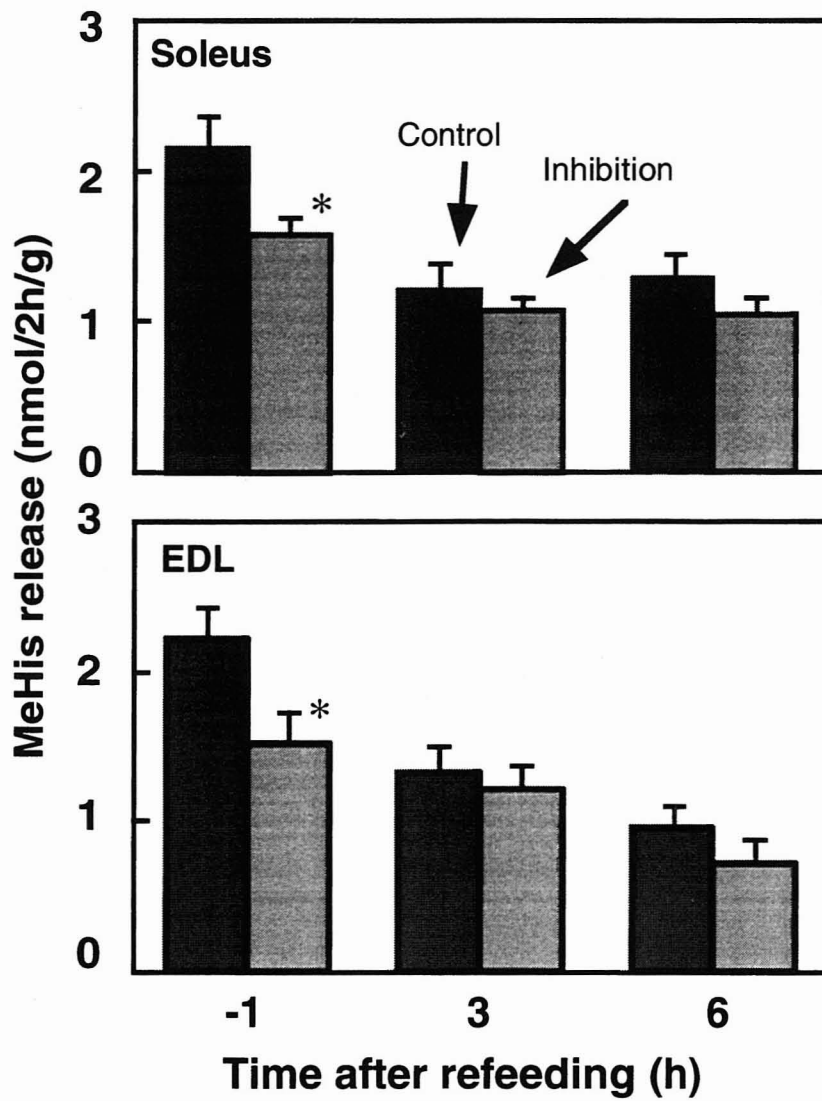


Fig. 10. Changes in 3-methylhistidine (MeHis) release from isolated muscle during inhibition of lysosomal and calcium dependent proteolysis. Each value is the mean \pm SE of 6 rats. *P<0.05 vs without inhibition.

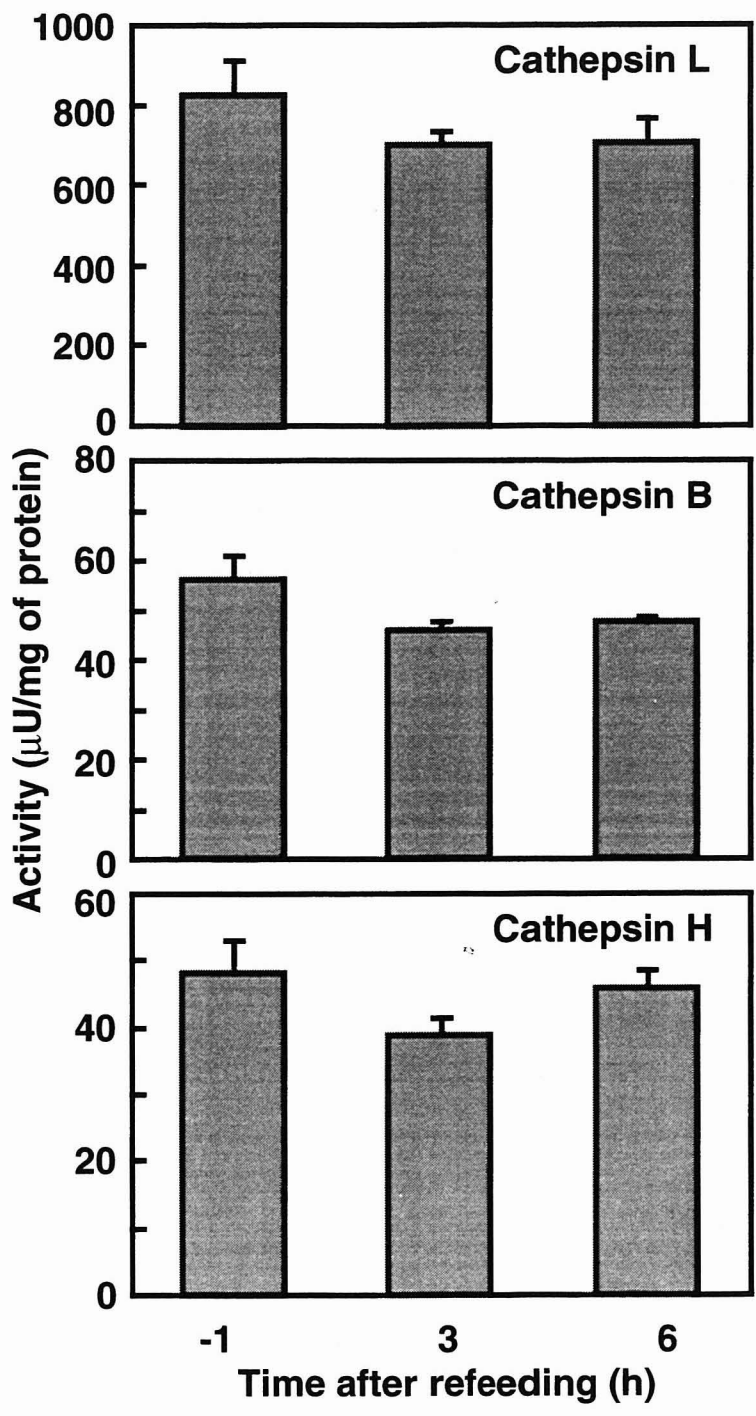


Fig. 11 Activities of lysosomal protease after refeeding.

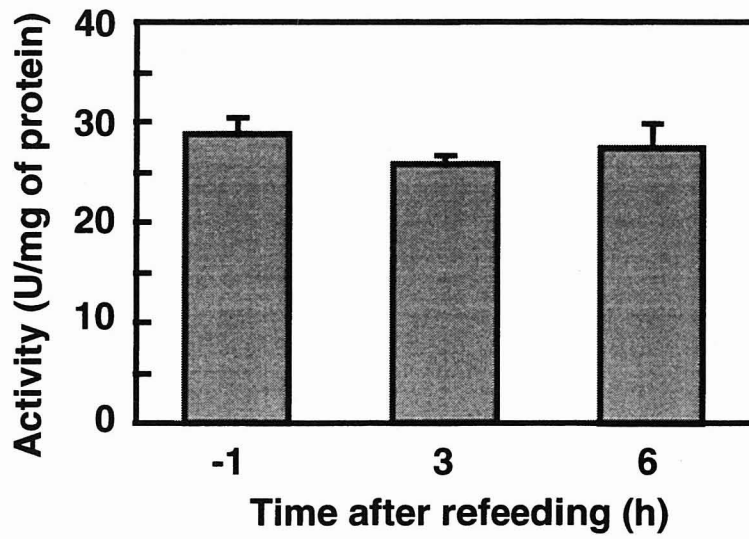


Fig. 12 Activities of calpain after refeeding.

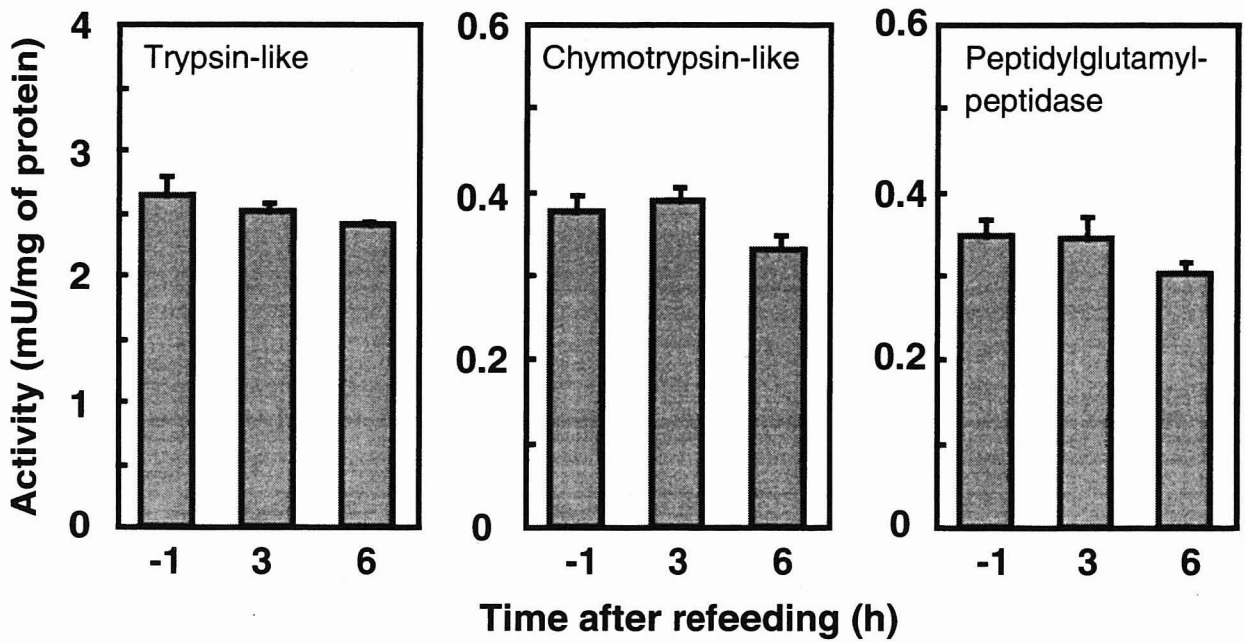


Fig. 13 Activities of proteasome after refeeding.

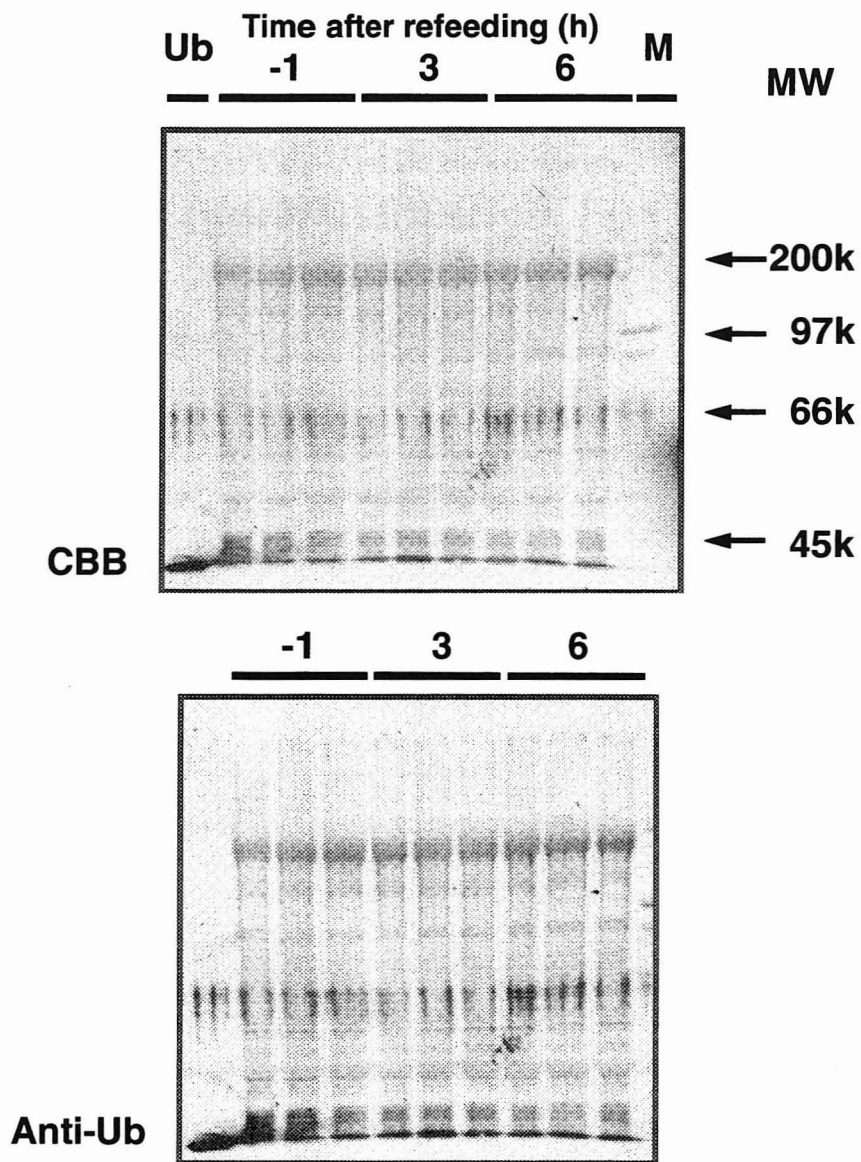


Fig. 14 Changes in ubiquitinated proteins after refeeding.

第3章 摂食タイミングと骨格筋タンパク質分解の変化

1. 目的

これまでの実験結果から、摂食後数時間で骨格筋タンパク質の分解が抑制されることが明らかとなった。しかし、摂食後12時間後には摂食前、すなわち絶食時の値に戻る。無タンパク質食の実験で示されたように、その後はさらに分解速度が増加してしまう。骨格筋の萎縮を抑制するためには分解速度の増加は避けるべきである。そこで、この実験では分解速度が増加する頃に再び摂食した場合にはどのような分解速度の変化を示すか検討を行った。

2. 方法

1日6時間だけ摂食するように慣らしたラットを18時間絶食後、1時間だけ20%カゼイン食を与えた。その後分解速度が増加する摂食後12時間後に再び1時間だけ20%カゼイン食を与えた。この間の血漿MeHis濃度を第1章と同様に測定した。また、再摂食を最初の摂食の6時間後にした実験も実施した。

3. 結果と考察

摂食12時間後に再摂食した場合、3～6時間で抑制された分解速度が、12時間後に上昇し、再摂食により全く同様の分解速度の抑制パターンを示した (Fig. 15)。これは極めて興味深い知見である。すなわち、適度の時間をおいた再摂食により分解速度を抑制できる可能性があるということである。

次に、再摂食を最初の摂食の6時間後にした (Fig. 15)。最初の摂食6時間後にはMeHisで示される筋原線維タンパク質の分解は最小値となっている。この時点で1時間だけ再摂食すると分解はそのままのレベルを維持した。

これらの結果を総合すると、ラットの場合、数回に分けた食餌の摂取により分解は最小値を維持できることが明らかとなった。このとき、食餌摂取により骨格筋タンパク質の合成は促進されるので、合成量と分解量の差で表される骨格筋タンパク質の蓄積量は正の値、すなわちネットの蓄積を示すことになると考えられる。このように、ラット、おそらくヒトの場合も食餌を分

けて食べることによりより合理的な骨格筋タンパク質の増加をはかっていると考えられる。また、骨格筋の萎縮や、スポーツ時などでは、食餌の摂取パターンを6時間ごとにするこゝで骨格筋の増加を可能にすることができよう。

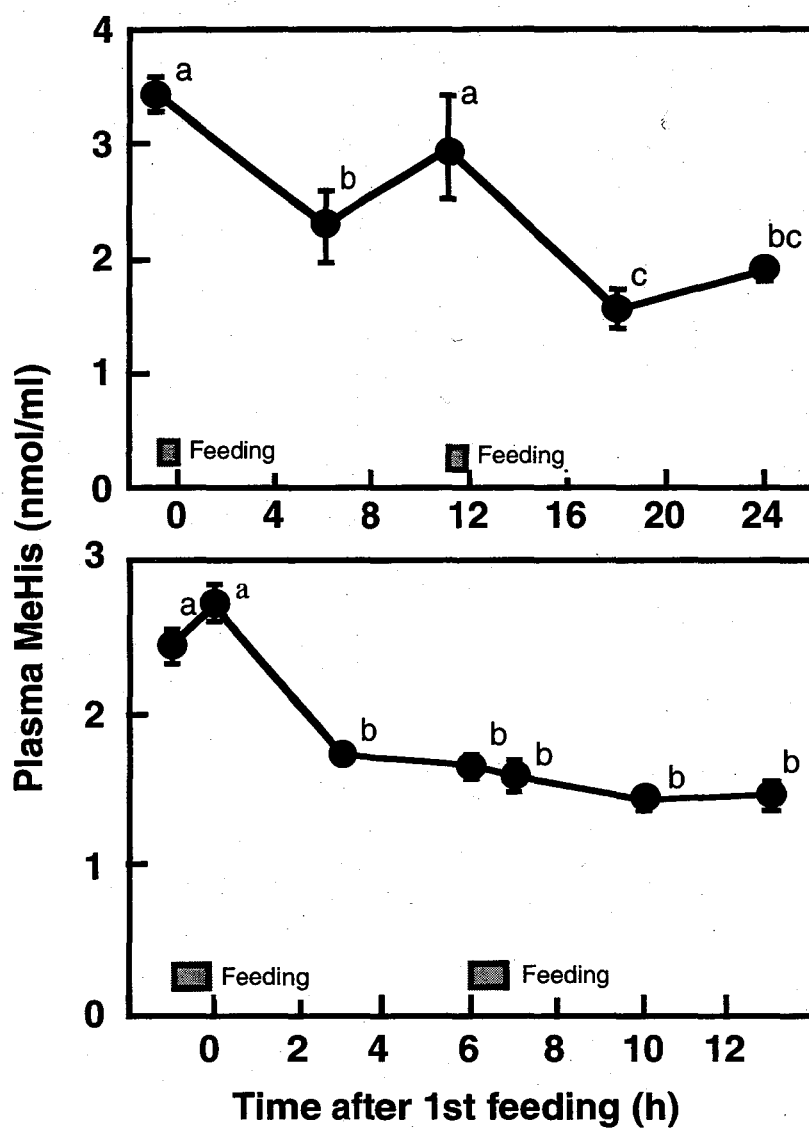


Fig. 15 Changes in plasma 3-methylhistidine (MeHis) concentration after repeated refeeding.

Values are means \pm SEM for 6 rats. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

参考文献

- (1) 柄澤昭秀, 高齢者の保健と医療, 早稲田大学出版部 (1998)
- (2) Goodman, M. N., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **205**, 182 (1994)
- (3) Nishizawa, N., Shimbo, M., Noguchi, T., Hareyama, S., and Funabiki, R., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2083 (1978)
- (4) 長澤孝志, 日本栄養・食糧学会誌, **48**, 347 (1997)
- (5) Li, J. B. and Goldberg, A. L., *Am. J. Physiol.*, **231**, 441 (1976)
- (6) Nagasawa, T., Yoshizawa, F., and Nishizawa, N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 501 (1996)
- (7) Yoshizawa, F., Nagasawa, T., Nishizawa, N., and Funabiki, R., *J. Nutr.*, **127**, 1156 (1997)
- (8) Baillie, A. G. S. and Garlick, P. J., *Am. J. Physiol.*, **262**, E1 (1992)
- (9) Funabiki, R., Yagasaki, K., Hara, H., Nyumura, N., Yoshizawa, F., and Saito, K., *J. Nutr. Biochem.*, **3**, 401 (1992)
- (10) Kadowaki, M., Poso, A. R., and Mortimore, G. E., *J. Biol. Chem.*, **267**, 22060 (1992)
- (11) Nagasawa, T., Sakai, T., and Onodera, R., *J. Chromatogr.*, **566**, 223 (1991)
- (12) Wassner, S. J., Schlitzer, J. L., and Li, J. B., *Anal. Biochem.*, **104**, 107 (1980)
- (13) Nagasawa, T., Hirano, J., Yoshizawa, F., and Nishizawa, N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1932 (1998)
- (14) Yoshizawa, F., Kido, T., and Nagasawa, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1803 (1999)
- (15) 長澤孝志, 平野順子, 西澤直行, 必須アミノ酸研究, **151**, 4 (1998)
- (16) Goodman, M. N. and del Pilar Gomez, M., *Am. J. Physiol.*, **253**, E52 (1987)
- (17) Botbol, V. and Scornik, O. A., *Am. J. Physiol.*, **273**, E1149 (1997)

- (18) Kayali, A. G., Young, V. R., and Goodman, M. N., *Am. J. Physiol.*, **252**, E621 (1987)
- (19) 長澤孝志, 貴戸武利, 畠山敦, 西澤直行, *必須アミノ酸研究*, **157**, 印刷中 (2000)
- (20) Tischler, M. E., Desautels, M., and Goldberg, A. L., *J. Biol. Chem.*, **257**, 1613 (1982)
- (21) Kimball, S. R., Shantz, L. M., Horetsky, R. L., and Jefferson, L. S., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11647 (1999)
- (22) Nair, K. S., Schwartz, R.G., and Welle, S., *Am. J. Physiol.*, **263**, E928 (1992)
- (23) Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E., and Goldberg, A. L., *J. Nutr.*, **129**, 227S (1999)
- (24) Rannels, D. E., Kao, R., and Morgan, H. E., *J. Biol. Chem.*, **250**, 1694 (1975)
- (25) Huang, J. and Forsberg, N. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12100 (1998)
- (26) Wing, S. S. and Goldberg, A. L., *Am. J. Physiol.*, **264**, E668 (1993)
- (27) Barrett, A. J. and Kitschke, H., *Methods Enzymol.*, **80**, 535 (1981)
- (28) Yoshimura, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kitahara, A., Hatanaka, M., and Murachi, T., *J. Biol. Chem.*, **258**, 8883 (1983)
- (29) Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, K., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A., *J. Biochem. (Tokyo)*, **115**, 257 (1994)
- (30) Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E., *Anal. Biochem.*, **87**, 206 (1978)