

---

栄養ストレスにおけるアミノ酸の筋肉タンパク質  
合成と分解に対する異なるレスポンス

---

18580110

平成18年度～19年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成20年6月

研究代表者 長澤孝志  
岩手大学農学部教授

## はしがき

高齢化社会においては、健康で活力のある生活を送ることが重要である。疾病や老化においては骨格筋の萎縮が認められ、疾病の治癒の遅延、活動の低下の原因となることから、骨格筋の萎縮をできるだけ抑制、維持し、あるいは肥大できるようにすることが重要であり、これが医療費負担の軽減、社会の活力の増加につながると考えられる。疾病や老化における筋萎縮は比較的長い時間をかけて起こることから、医薬品よりも毎日食べる食品による筋萎縮抑制が大切である。最近、アミノ酸やタンパク質が筋肥大、疲労回復などを目的としてサプリメントとして注目されているが、その学術的な裏付けは十分ではない。本研究では、低栄養などの栄養ストレスや、いわゆる「寝たきり」状態で起こる廃用性筋萎縮における、タンパク質、アミノ酸を中心とした食品成分による筋萎縮抑制機構を明らかにすると同時に、そのシグナルの合成と分解に対するクロストークを明らかにすることを目的とした。

サプリメントとしてのアミノ酸、タンパク質はその安全性からも消費者から受け入れられているが、そのメカニズムについては不明確の点も多い。しかも骨格筋タンパク質の分解の側面からの検討はほとんどなされていない。タンパク質量は合成量と分解量の差で決定されることから、分解の評価も極めて大切である。タンパク質合成量の増加には基質となるアミノ酸が十分供給されなくてはならず、低栄養状態では特定のアミノ酸の給与では効果が期待できない。一方、分解は基質が骨格筋タンパク質であることから、アミノ酸の供給による制限を受けないと考えられ、特定のアミノ酸で制御できる、すなわち低栄養においても分解は制御できる可能性が考えられる。

細胞内タンパク質の分解の制御は、ユビキチン-プロテアソーム系で行われているが、最近の国内外で多く報告されている。しかし、オートファジー-リソソーム系も調節機能があり、特にアミノ酸による調節では重要であることから、本研究ではこれらの点についても詳細に検討を行った。

本研究では次の3項目について研究を実施した。

1. 低栄養状態におけるロイシンの作用
2. 6時間ごとのロイシンの接触が合成と分解に及ぼす影響
3. 廃用性筋萎縮モデルにおけるロイシンの効果

研究組織

研究代表者 : 長澤孝志 (岩手大学農学部教授)

研究分担者 : 伊藤芳明 (岩手大学農学部准教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,300,000	0	2,300,000
平成 19 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究発表

(1) 雑誌論文

Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, and Nagasawa T. Supplementation with Dietary Leucine to a Protein-Deficient Diet Suppresses Myofibrillar Protein Degradation in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **53**: 552-555 (2007)

吉澤史昭、長澤孝志 代謝調節因子として注目される分岐鎖アミノ酸 *化学と生物* **45**: 203-210 (2007)

(2) 学会発表

菅原貴征ら 無タンパク質食の摂取は筋原線維タンパク質の分解を促進し、Leu はそれを阻害する 第 60 回日本栄養・食糧学会大会 2006 年 5 月 静岡県立大学

井口慎平ら 摂食タイミングによる骨格筋タンパク質の分解と合成の調節 平成 18 年度日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同支部大会 2006 年 11 月 北海道大学

井口慎平ら 複数回のロイシン投与と骨格筋タンパク質の合成、分解 2007 年度日本農芸化学会大会 2007 年 3 月 東京農業大学

菅原貴征ら ロイシン、タンパク質の摂食による筋タンパク質の合成と分解の変化 第 61 回日本栄養・食糧学会大会 2007 年 5 月 京都国際会館

長澤孝志ら 後肢固定による筋萎縮における酸化ストレスとロイシン、カテキンの効果 第15回生体パーオキシサイド研究会 2007年8月 勝山館(仙台市)

Sugawara T et al. Leucine attenuates myofibrillar protein degradation of rats fed on protein deficient diet. 10<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition 2007年9月台北国際会議場(台湾)

菅原貴征ら ロイシン投与による骨格筋萎縮抑制における筋タンパク質分解の役割 第1回に本アミノ酸学会学術講演会 2007年11月 東京大学

(3) 図書 なし

研究成果による産業財産権の出願・取得状況 なし

## 1. 低栄養状態におけるロイシンの作用

日本は猛烈なスピードで高齢化が進んでいる。活力のある社会を築くためには、高齢者が自立して生活する能力が必要である。寝たきりにならずに、社会的、経済的に自立するためには、体を十分に動かせることが必須条件である。老化は神経や筋肉の変質、また成長ホルモンなどの分泌減少が伴い、筋タンパク質の代謝回転が減衰し筋肉の量と強さの低下をもたらす。また、骨格筋は体重の40%を占める最大の組織であり、運動能力だけではなく体全体のタンパク質、アミノ酸代謝において大きな影響を持っていると考えられ、その量を保ち続けることが必要である。

我々は、絶食後のラットにロイシン（体重100gあたり135mg）を経口投与することで、筋原線維タンパク質の分解速度が顕著に減少することを示した。さらに、無タンパク質飼料、あるいは低タンパク質飼料（5%カゼイン飼料）にロイシンを添加することで、分解速度を抑制し筋重量の減少を抑えることを示した。しかし、骨格筋タンパク質の量は、タンパク質の分解だけではなく合成とのバランスで決まっている。そこで、ロイシンの継続摂取における合成の変化について検討した。

筋原線維タンパク質の分解速度を求める方法に、3-メチルヒスチジン（3-MeHis）を用いる方法がある。3-MeHisは筋原線維タンパク質のアクチンとミオシンに特異的に含まれており、筋肉の分解後、再合成に利用されず、アセチル化以外の代謝を受けないため、放出された3-MeHisの量を測定することで、分解速度を直接評価することができる。我々は、単離筋肉を生理的な緩衝液中でインキュベーションし、放出される3-MeHisを測定することで分解速度を評価してきたが、この方法では、用いる筋肉が薄くなければならず、成熟した動物においては分解速度を測定できないという欠点があった。そこで、新たな分解速度評価法として動静脈濃度差法を開発し、この測定法により動物の大きさに関係なく分解速度を測定することが可能になった。そこで、これまであまり研究が進んでいなかった、成熟ラットにおけるロイシン摂取の筋萎縮改善効果を検討した。

筋原線維タンパク質の分解は、カルパイン、ユビキチン-プロテアソーム系、リソソーム系などのタンパク質分解機構が存在している。いくつかの報告では、アミノ酸がタンパク質のユビキチン化に関わる酵素であるユビキチンリガーゼのmRNAの発現量を減少させることを示しているが詳しいメカニズムは不明であり、またロイシンの継続摂取による分解系の制御については報告がない。そこで4章では、各種タンパク質分解系の変化を調べ、ロイシン摂取による分解抑制機構の解明を目的とした。

## 1.1. ロイシンの継続摂取による骨格筋タンパク質合成速度の変化

### 1.1.1. 目的

骨格筋の量は、骨格筋タンパク質の合成と分解のバランスで決まる。したがって、骨格筋タンパク質の量を増やすためには、合成を促進することと分解を抑制することの両方が重要である。

我々は、ロイシンを継続的に摂取することにより、筋原線維タンパク質の分解が抑制されることを示し、かつ筋重量の減少を抑えることを示した。また、Yoshizawaら [ ] は、ロイシンの単回投与により、タンパク質の翻訳段階に関わる因子であるS6K1、4E-BP1の活性化が起こることを報告している。したがって、ロイシンの摂取は分解の抑制と同時に合成の促進を引き起こすため、筋肉量の維持、増加に効果的であると考えられる。

しかし、ロイシンの摂取によりタンパク質の翻訳因子が活性化したとしても、実際のタンパク質合成の材料となるアミノ酸（ロイシン以外）が不足しているため、実際のタンパク質合成は促進していない可能性がある。そこで本章では、実際にタンパク質合成が促進されているかどうかを、ラベルしたフェニルアラニンの大量投与方法により Fractional synthesis rate を測定して、骨格筋タンパク質の合成速度を評価した。

### 1.1.2. 方法

#### (1) 実験動物

実験動物は、4週齢の Wistar 系雄ラット（60～80g：日本エスエルシー株式会社：浜松）10匹を用いた。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時間の明暗サイクルで飼育した。予備飼育期間中は、1,2日に固形飼料（CE-2：日本クレア株式会社：東京）を、その後は体重が95～100g程度になるまで AIN-93G に準じた20%カゼイン飼料（20C）を自由摂食させた。水は水道水を自由摂取させた。予備飼育終了後、体重がほぼ等しくなるように2群にわけ、一方は無タンパク質食（PF）、もう一方はPFにロイシンを1.5%（20%カゼイン飼料中のロイシンに等しい）添加した食餌を1週間させた。解剖日は、ケタラール（三共エール薬品株式会社：東京）とセラクタール（Bayer：ドイツ）を100：16の割合で混合し、体重100gあたり1.88 mL腹腔内投与してラットを麻酔した。麻酔が効いてきたら、体重100gあたり50  $\mu\text{mol}$  の L-[ $^2\text{H}_5$ ]-フェニルアラニン（28.4 mg / mL）を尾静脈より投与した。30～40分後、開腹して下大静脈

からヘパリン処理した注射器で採血し、屠殺した。即座に腓腹筋を摘出し合成速度の測定に使用した。血液は、 $3,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で20分間遠心分離し、血漿を分離した。血漿は、分析するまで $-80^\circ C$ で保存した。飼料組成は表 1-1 に示す。

## (2) 骨格筋タンパク質合成速度の測定

本研究では、骨格筋タンパク質の合成速度を評価するため、ラベルしたフェニルアラニンの大量投与方法により Fractional synthesis rate (FSR) を測定した。

腓腹筋 100 mg に 10 倍量の 3.5% 過塩素酸水溶液を加え、氷冷しながら 30 秒間ホモジナイズした。 $8,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で15分間遠心分離して上清を他の容器に移し、沈殿に純水を 1mL 加えボルテックスで攪拌後、遠心分離して上清を移した。さらに、この工程をもう 1 回繰り返して沈殿を洗浄した。沈殿は五酸化二リンが入ったデシケータ内で乾燥させた後、6M の塩酸を 600 $\mu$ L 加え  $110^\circ C$ で24時間加熱して加水分解し、水酸化ナトリウム、五酸化二リンが入ったデシケータ内で乾燥させ、純水を 1mL 加え溶解した。上清サンプルは全量を、沈殿サンプルは 100 $\mu$ L を、陽イオン交換樹脂 (200-400 mesh DOWEX 50W-X8 : Bio-Rad : USA) で精製した。4 規定の水酸化アンモニウムで溶出し、濃硫酸と五酸化二リンが入ったデシケータ内で乾燥させ、アセトニトリルで溶解し、MTBSTFA 試薬を用いて誘導体化した。測定は GC-MS (QP2010 : 島津製作所 : 京都) で行った。FSR の算出は以下の式により求めた。

$$FSR = Sb \times 100 / Sa \times t$$

Sb は沈殿サンプル中、Sa は上清サンプル中のフェニルアラニンのエンリッチメントを示している。t は L-[ $^2H_3$ ]-フェニルアラニンの投与後から屠殺までの時間を表している。

## (3) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の測定

ロイシン添加食の摂食により、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度がどのように変化しているか確認した。分岐鎖アミノ酸濃度は HPLC で測定し、o-フタルアルデヒド (OPA) 誘導体を逆相系カラムで分離する方法を用いた。

### 1.1.3. 結果

#### (1) 骨格筋タンパク質合成速度の変化

無タンパク質食 (PF)、あるいは 1.5% のロイシンを添加した食餌 (Leu) を 1 週間摂食させたときにおける FSR の変化を図 1-1 に示した。ロイシン添加食の摂食において FSR が上昇する傾向はみられず、骨格筋タンパク質の合成速度は活性化していないと考えられる。

#### (2) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化

PF 食、あるいは Leu 食を 1 週間摂食させたときにおける血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化を図 1-2 に示した。バリンとイソロイシンの濃度がやや減少する傾向がみられたが、有意な差はなかった。さらにロイシンの濃度にも変化はみられず、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度には、両群間で大きな変化はみられなかった。



表 1-1 飼料組成

	PF	Leu	20C
$\alpha$ -コーンスターチ	732.5	717.5	529.5
カゼイン	0	0	200
シヨ糖	100	100	100
AIN-93G 塩混	35	35	35
AIN-93G ビタ混	10	10	10
大豆油	70	70	70
シスチン	0	0	3
コリン重酒石酸塩	2.5	2.5	2.5
セルロース	50	50	50
ロイシン	0	15	0
計	1000	1000	1000

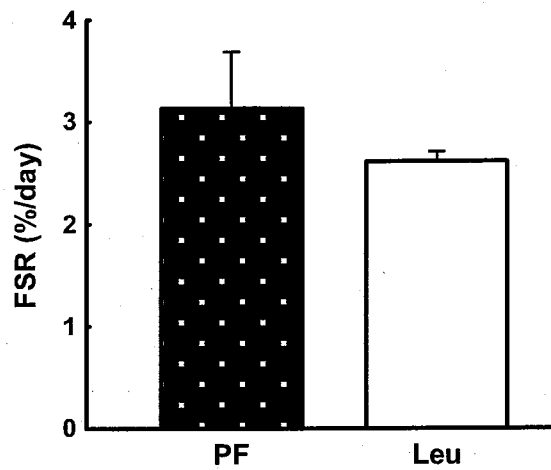


図 1-1 無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) の 1 週間摂食における FSR の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)

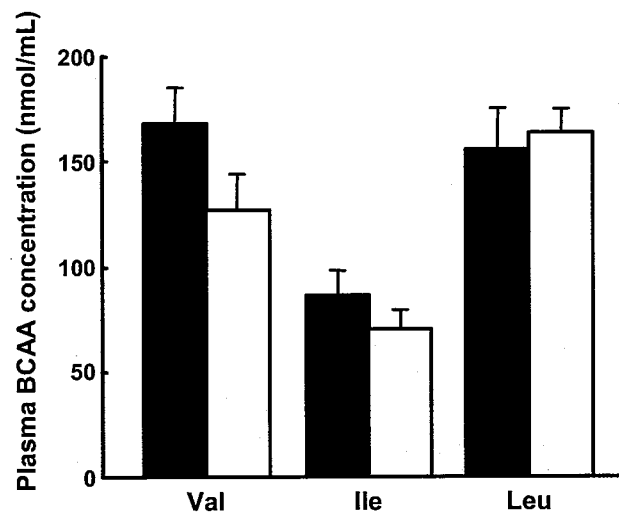


図 1-2 PF (■)、Leu (□) の 1 週間摂食における、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)

#### 1.1.4. 考察

ロイシン添加食の継続摂取により、FSR が上昇する傾向がみられないことから (図 2-1)、骨格筋タンパク質の合成速度は変化していないものと考えられる。

ロイシンの単独投与では、Anthony ら[Diabetes. 2002 51:928-36] は、健常、あるいは糖尿病のラットに、体重 100g あたり 135mg のロイシンを強制経口投与することにより、4E-BP1 や S6K1 の活性化だけではなく、合成速度が上昇することを示している。しかし、この実験は、ラットが 1 日に摂食する 20%カゼイン飼料中のロイシンを 1 度に与えている系であり、生理的な条件とは言えず、人間に応用するのは難しいと考えられる。さらに我々の予備実験では、この投与量では投与 30 分後で、通常の中ロイシン濃度の 10 倍以上となり、さらにバリンとイソロイシンの濃度が激減することを確認している。したがって、ロイシンの大量投与はアミノ酸アンバランスを引き起こし、インバランスを起こす可能性がある。

本章の実験では、血中のロイシン濃度に大きな変化はみられない (図 1-2)。骨格筋タンパク質の合成を促進するためには、ある程度のロイシン濃度の上昇が必要であるとされる。

### 1.2. 成熟ラットにおける、ロイシン添加食の継続摂取による筋タンパク質の合成と分解の変化。

#### 1.2.1. 目的

我々の実験の大部分は体重 100g 以下の若齢ラットにおける検討であった。本章では、若齢ラットのように成長著しい動物ではなく、成長がある程度穏やかになった成熟ラットにおける、ロイシン摂取による筋萎縮改善効果を筋タンパク質の合成と分解の両面から検討した。

成熟ラットにおける合成速度の測定に関しては、前章で用いた大量投与法を問題なく用いる事ができる。しかし、分解速度においてはいくつかの問題点が存在する。筋原線維タンパク質の分解速度を直接測定する方法として、単離筋切片からの 3-MeHis の放出速度を測定する方法がある。しかしこの方法では、単離筋切片が厚い場合は緩衝液に触れる筋肉層が少なくなり、3-MeHis 放出速度を過少評価することになるため、筋肉が薄いマウスや若いラットのような小さい動物でしか実験を行えない。したがって、成熟ラットのような大きい動物では、分解速度を単離筋切片から放出される 3-MeHis からは評価できない。

ここでは、成熟ラットにおいて分解速度を評価するために、動脈・静脈濃度差法（動静脈濃度差法）を用いた。動静脈濃度差法は体内でのアミノ酸代謝を、ある器官でのアミノ酸の出入りや器官相互での流れといった観点から、できるだけ *in vivo* の状態を追求するための方法である。あるアミノ酸の血中濃度は動脈血では体内のどこであっても同じであるが、静脈血では通過してきた器官の代謝を反映して様々に異なっているため、ある瞬間の動脈中と特定静脈中のアミノ酸濃度を同時に測定して差をとることにより、その器官での物質の出入りが判断できる。ある器官が単位時間に血液より摂取した物質質量 (Q) は、そこに流入する動脈血中のその物質の濃度 (CA) とそこから出てゆく静脈血中のその物質の濃度 (Cv) の差に血流量 (F) を乗じた値に等しい。

$$Q = (C_A - C_V) \times F$$

また、この方法は、動物が生きている状態での評価をすることができるため、単離筋を用いる実験よりも、より生理的な条件での分解速度の評価が可能であると考えられる。

## 1.2.2. 方法

### (1) 実験動物

実験動物は、9週齢の Wistar 系雄ラット（体重 200g 程度：日本エスエルシー株式会社：浜松）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 時間の明暗サイクルで飼育した。3 日間固形飼料（CE-2：日本クレア株式会社：東京）を与え、その後は体重が 220g 程度になるまで 20%カゼイン飼料を自由摂食させた。水は水道水を自由摂食させた。予備飼育終了後、体重がほぼ等しくなるように 2 群にわけ、一方は無タンパク質食 (PF)、もう一方は PF にロイシンを 1.5%添加した食餌 (Leu) を 1 週間させた。

### (2) 解剖方法

ケタラール（三共エール薬品株式会社：東京）とセラクター（Bayer：ドイツ）を 100：16 の割合で混合し、ラットの体重 100 g あたり 1.88mL 腹腔内投与してラットを麻酔した。麻酔が効いてきたら、体重 100g あたり  $50 \mu\text{mol}$  の L- $^2\text{H}_5$ -フェニルアラニン ( $28.4 \text{ mg / mL}$ ) を尾静脈より投与した。20 分後（投与から解剖終了までの時間が 40 分以内になるようにしている）前後の肢を固定し仰向けに寝かせ、バリカン（HAIR CLIPPER MODEL 2000AD：THRIVE：大阪）で大腿部周辺の毛を刈っ

た。大腿部の皮膚を筋肉を切らないように注意してはさみで切り、鉗子と先鈍の剪刀で筋肉層を開きわけ、皮膚からの 3-MeHis 流出による影響をなくすため、腹壁動脈を縫合糸（絹製縫合糸：夏目製作所：東京）で上下 2 箇所を結紮し血管を切断した。次に大腿動脈を露出させ、先鈍のピンセットで動脈、静脈をそれぞれ独立させ、プローブを掛けられるくらいの小さな間隙を作り、大腿動脈にプローブ（1RB Probe：Transonic Systemes Inc：USA）をかけ、血流量計（超音波血流量計 T-400 2チャンネルコソール T402 血管用 モジュール TS420：Transonic Systemes Inc：USA）につなぎ、血流量を測定した。血流量は、WAVE SHOT!/Win Version 0.02（KEYENCE：大阪）で測定し、インターフェースとして、PCMCIA DATA ACQUISITION CARD（NR-110：KEYENCE：大阪）を用いた。次いで開腹し腹大動脈を露出させた後に、ヘパリン処理した注射器で、筋肉層を通して大腿静脈に刺入して約 0.5 mL 採血し、即座に腹大動脈より 1mL 程度採血し、屠殺した。即座に腓腹筋、長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋を摘出した。血液は、 $3,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で 20 分間遠心分離し、血漿を分離した。血漿は分析するまで  $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### (3) 筋原線維タンパク質分解速度の測定

本研究では、筋原線維タンパク質の分解速度を評価するため、動脈血、静脈血それぞれの血漿中の 3-MeHis 濃度を測定し、動静脈差に血流量を乗じて、筋肉から放出された 3-MeHis の放出速度から分解速度を求めた。血漿中の 3-MeHis 濃度は、*o*-フタルアルデヒド（OPA）誘導体を逆相系カラムで分離する方法を用いた。

## 1. 2. 3. 結果

### (1) 筋重量の変化

体重あたりの筋重量の結果を、図 1-3 に示した。長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋、摘出した全ての筋肉において、ロイシン添加食の摂食により有意に上昇した。

### (2) 筋原線維タンパク質分解速度の変化

3-MeHis の放出速度を、図 1-4 に示した。ロイシン添加食の摂食により、放出速度は有意に減少した。成熟ラットにおいても、ロイシンの継続的な摂取により筋原線維タンパク質の分解が抑制されることが示された。

### (3) 骨格筋タンパク質合成速度の変化

FSR の結果を、図 1-5 に示した。ロイシン添加食の摂食により FSR が変化する傾向はみられなかった。この結果は若齢ラットにおけるロイシン摂取の効果と同様で

あり (図 2-1)、骨格筋タンパク質の合成速度におけるロイシンの効果は週齢の差によらず関与は薄いことが示された。

#### (4) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化

血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の結果を、図 1-6 に示した。バリン、イソロイシン、ロイシン全てにおいて両群間に大きな差はみられなかった。

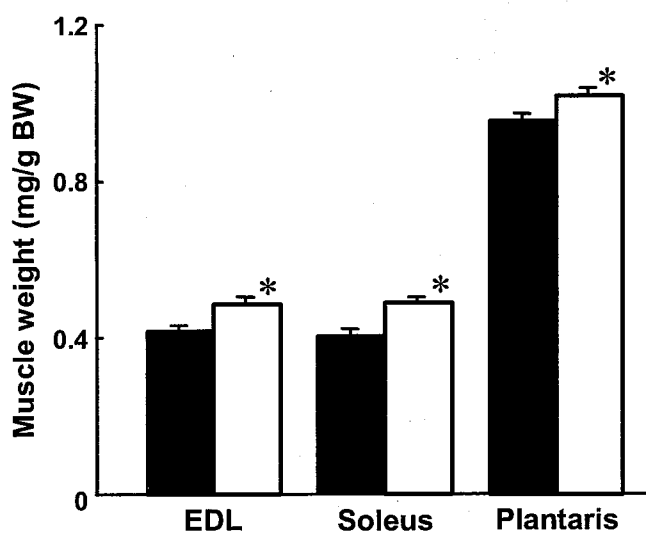


図 1-3 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食における体重あたりの筋重量の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)、PF に対する有意差 \* :  $p < 0.05$

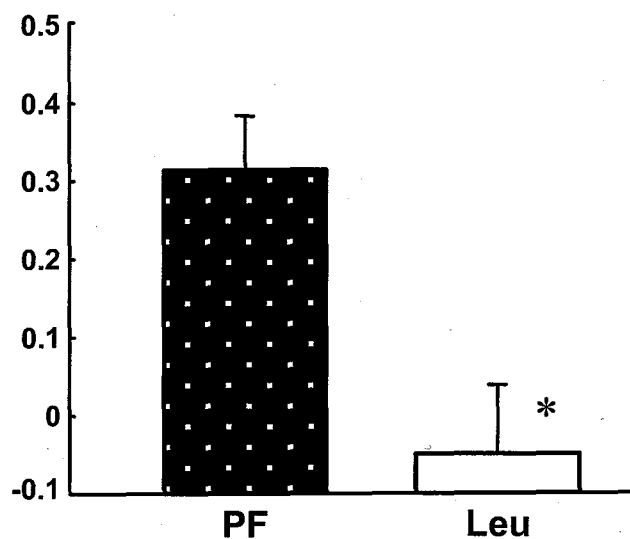


図 1-4 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食における 3-MeHis 放出速度の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)、PF に対する有意差 \* : p<0.05。

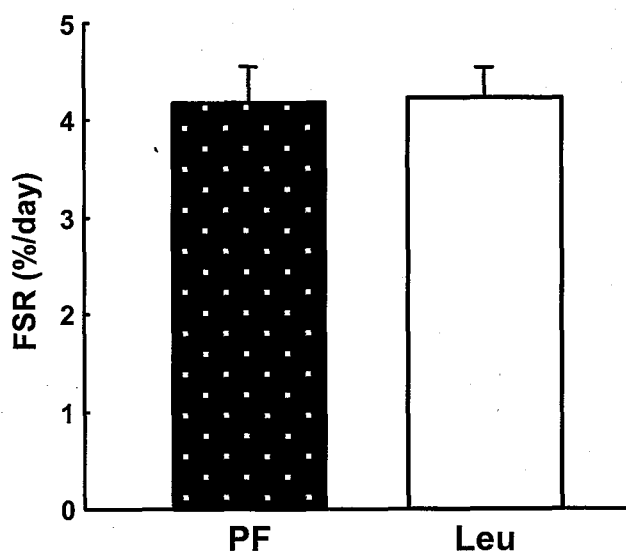


図 1-5 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食における FSR の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)

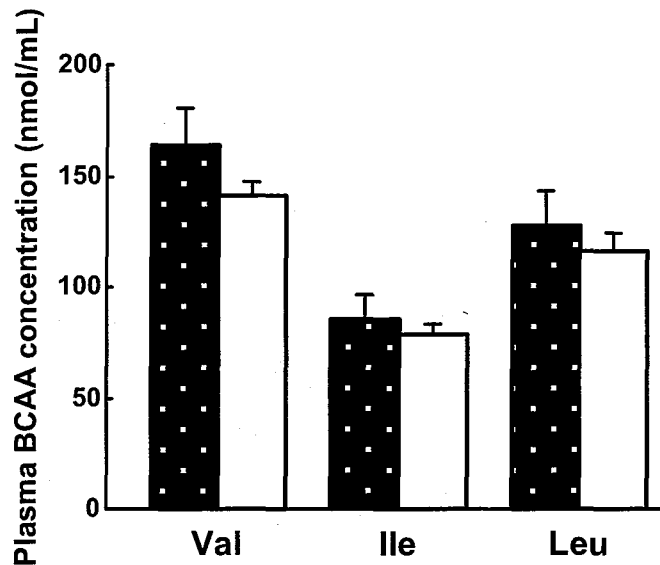


図 1-6 PF (■)、Leu (□) の 1 週間摂食における、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)

#### 1.2.4. 考察

ロイシン添加食の継続摂取により、長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋において有意に体重あたりの筋重量が上昇した。本実験では無タンパク質食を摂食させているため、体重と筋重量が減少していると考えられるので、ロイシンはその減少を抑制したと考えられる。また、FSR が上昇する傾向がみられないことから、骨格筋タンパク質の合成速度は変化していないものと考えられる。一方、分解速度は、ロイシンの継続摂取により顕著に減少した。したがって、ロイシンによる筋萎縮改善効果は合成速度に与える影響よりも、分解速度を顕著に抑制した結果であると考えられる。

一章の実験と同様に、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度に大きな変化はみられなかった。ロイシンの継続的な摂取は、アミノ酸のアンバランスを起さないと考えられ、生理的な条件で筋萎縮改善効果を持つと示唆される。したがって、人間に応用することも十分に可能な実験系であると考えられる。

今回の実験では、動静脈濃度差法を使った実験において、初めてロイシンの摂食による分解抑制効果を示した。動静脈濃度差法はラットが生きた状態で実験を行えるため、単離筋をインキューベーションする系よりも生理的であると考えられ、より個体の栄養条件を反映した分解速度を評価できると考えられる。また、週齢に関係なく実験を行うことができるため、これまでは評価することができなかった老齢ラットにおける分解速度の評価も可能であると考えられる。



### 1.3. ロイシン添加食の継続摂取における筋原線維タンパク質分解抑制のメカニズムの検討

#### 1.3.1. 目的

前章の結果でロイシンの継続摂取により筋萎縮改善効果が得られることが示された。また、この効果は筋原線維タンパク質の分解を、顕著に抑制することが強く関わっていると示唆された。本章ではそのメカニズムについて検討した。

筋原線維タンパク質の分解は、カルパイン、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系により制御されていると考えられている。Hamel ら [Metabolism 52 2003 805-809] は、ロイシンを含むいくつかのアミノ酸がプロテアソームの活性を阻害することを示している。また、Nakashima ら [BBRC 336 2005 660-666] は、20S プロテアソーム、C2 サブユニットの mRNA の発現がロイシンの経口投与により減少することを示している。このようにユビキチン-プロテアソーム系の制御が関与する報告はいくつかなされている。一方で、オートファジー-リソソーム系については、Mordier ら [JBC 275 2000 29900-29906] により、ロイシン制限によりリソソームが関わるタンパク質分解が促進することを示している。

本章では、カルパイン、プロテアソームの酵素活性、ユビキチンリガーゼの遺伝子発現、オートファジーの関与を調べ、各タンパク質分解系の変化を検討した。

#### 1.3.2. 方法

##### (1) 実験動物

実験動物は、4週齢の Wistar 系雄ラット (60~80g: 日本エスエルシー株式会社: 浜松) 10匹を用いた。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時間の明暗サイクルで飼育した。予備飼育期間中は、1,2日に固形飼料 (CE-2: 日本クレア株式会社: 東京) を、その後は体重が95~100g程度になるまで AIN-93G に準じた20%カゼイン飼料を自由摂食させた。水は水道水を自由摂取させた。予備飼育終了後、体重がほぼ等しくなるように2群にわけ、一方は無タンパク質食 (PF)、もう一方は PF にロイシンを1.5% (20%カゼイン飼料中のロイシンに等しい) 添加した食餌を1週間させ腓腹筋を摘出した。

LC3 の測定に関しては、摘出後即座にサンプル調製を行い、他の実験は分析するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

## (2) カルパインの酵素活性

カルパインはカルシウム依存性のプロテアーゼである。本実験では、カルシウム存在、非存在下における基質の分解の差をカルパイン活性とした。カルパイン活性は、基質としてアゾカゼインを用いて測定した []。酵素溶液は、腓腹筋 100 mg に 40 倍量のホモジネートバッファ (EDTA 1mM を含む 100mM トリス塩酸緩衝液 EDTA 0.372g/L (pH 7.5)) を加えて、氷冷しながら 30 秒間ホモジナイズし調製した。

## (3) プロテアソームの酵素活性

プロテアソームの代表的な酵素活性である、キモトリプシン様活性 Aki ら [] の方法を改良して測定した。基質は、Succinyl -L- Leucyl - L -Leucyl -L- Valyl - L- Tyrosine4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (株式会社ペプチド研究所：大阪) を用いた。酵素溶液は、腓腹筋約 100 mg に 30 倍量の 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4 ) を加え、氷冷しながらポリトロンホモジナイザー (Kinematika GmbH Steinhofhalde, Switzerland) で 30 秒間ホモジナイズし、超音波ホモジナイザー (GSD - 50 型、株式会社エスエムテ、東京) で 10 秒間の破碎 (Tuning 6) を 3 回行い、調製した。

## (4) ユビキチンリガーゼの遺伝子発現

Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA の発現をノーザンブロットにより測定した。AGPC 法により全 RNA を抽出し、cDNA プローブは以下のオリゴヌクレオチドより合成したものを用いた。結果は、GAPDH mRNA の発現で標準化して評価した。

Atrogin-1 5'-ATCCCTGAGTGGCATCGC-3'  
5'-CTCTTCCACAGTAGCCGGT-3'  
MuRF1 5'-GGACGGAATGCTATGGAGA-3'  
5'-AACGACCTCCAGACATGGAC-3'  
GAPDH 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'  
5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

## (5) オートファジーの評価

オートファジー-リソソーム系は、リソソーム内酵素のカテプシンにより制御されておらず、オートファゴソームの形成が律速であると考えられている。そこで、オートファジーのマーカータンパク質である LC3 発現の変化をウェスタンブロット

により解析した。LC3 は不活性型の I から活性型の II への移行により、オートファゴソームの形成に関わると考えられており、オートファゴソームの形成を定量的に追えるタンパクであるとされている。

サンプルは腓腹筋をホモジナイズして筋原線維画分を分画した。15%ポリアクリルアミドゲルで泳動後、PVDF 膜（アマシャムバイオサイエンス、東京）に転写した。抗体は anti-LC3B ポリクローナル抗体（Cell Signaling Technology, MA, USA）を用いた。18kDa のバンドを LC3-I、16kDa のバンドを LC3-II として定量した。

### 1.3.3. 結果

#### (1) カルパインの酵素活性

カルパインの酵素活性の結果を、図 1-7 に示した。両群間で大きな差はみられず、ロイシンの継続摂取により、カルパインの酵素活性は変化しないと考えられる。

#### (2) プロテアソームの酵素活性

プロテアソームの酵素活性（キモトリプシン様活性）の結果を、図 1-8 に示した。両群間で差はみられず、ロイシンの継続摂取により、プロテアソーム活性は変化しないと考えられる。

#### (3) ユビキチンリガーゼの遺伝子発現

Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 発現を定量化した結果を、図 1-9 に示した。Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 発現はロイシンの継続摂取により減少せず、むしろ Atrogin-1 では発現が有意に上昇し、MuRF1 でも有意な差ではなかったものの上昇する傾向がみられた。

#### (4) LC3 の発現

LC3-II の発現量を LC3-I の量で除した結果を図 1-10 に示した。ロイシン添加食の摂食により LC3 の発現割合が減少しており、ロイシンの継続摂取によりオートファジーが阻害されていると考えられる。

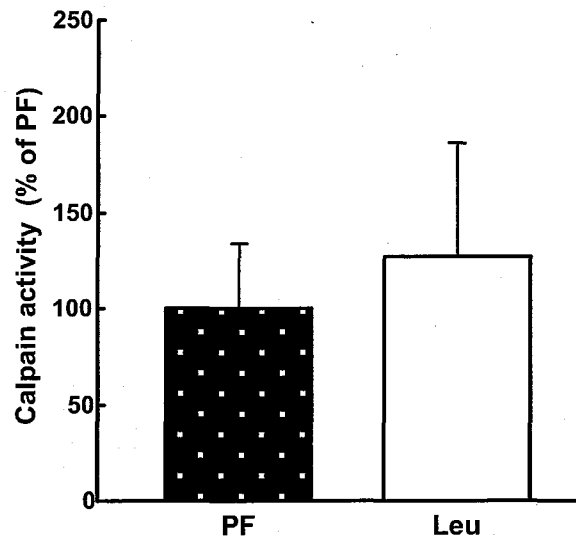


図 1-7 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食におけるカルパイン活性の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)。

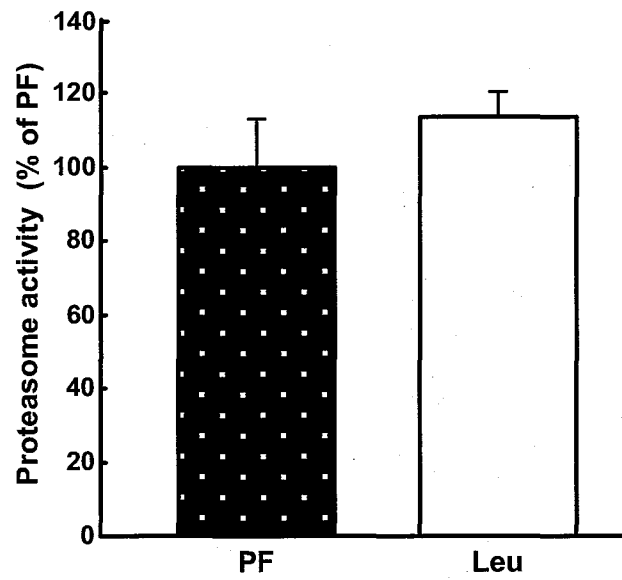


図 1-8 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食におけるプロテアソーム酵素活性の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)。

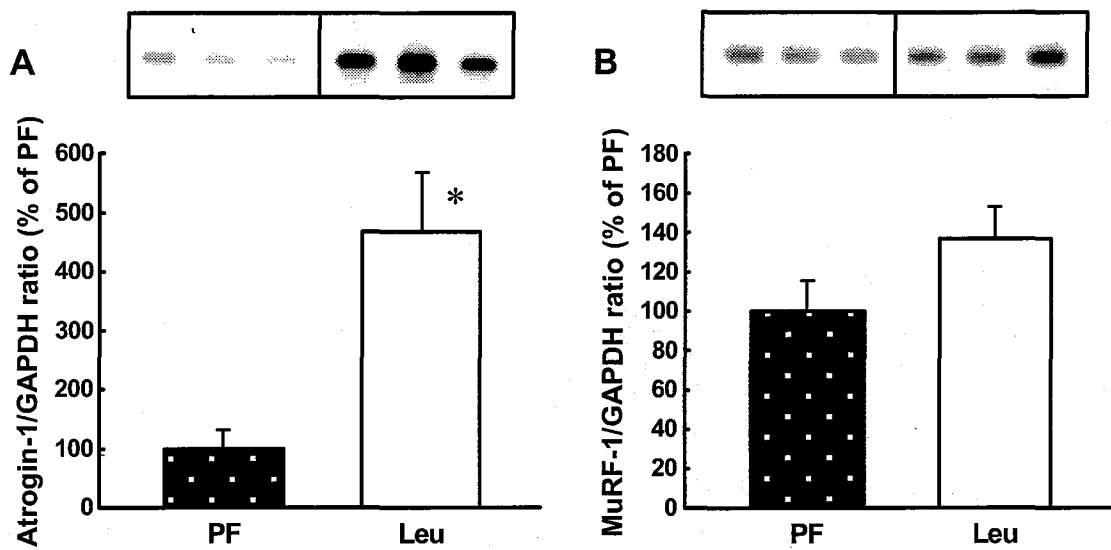


図 1-9 PF (■)、あるいは Leu (□) の 1 週間摂食における、Atrogin-1 (A)、MuRF1 (B) の遺伝子発現の変化。値は、平均±標準誤差 (n=5)。PF に対する有意差 \* : p<0.05。

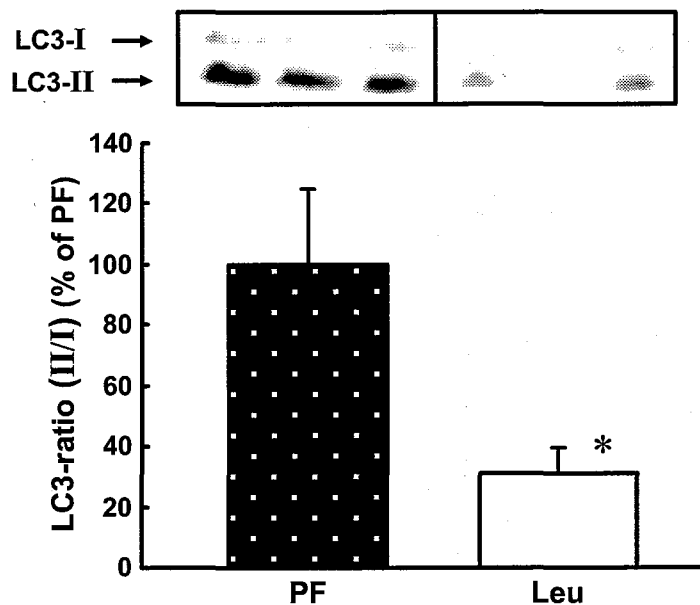


図 1-10 PF (■)、Leu (□) の 1 週間摂食における LC3 発現量の変化。値は、LC3-II/LC3-I で表し、平均±標準誤差 (n=5) で示した。PF に対する有意差 \* : p<0.05。

#### 1.3.4. 考察

本章では、ロイシンの継続摂取による骨格筋タンパク質分解抑制のメカニズムを検討するため実験を行った。カルパインとプロテアソームの活性には大きな変化はみられず、ロイシンの継続摂取により酵素活性が減少することはなかった。しかし、ユビキチン-プロテアソーム系においては、ユビキチンが結合する段階が律速であると考えられている。そこで、代表的なユビキチンリガーゼである MuRF-1、Atrogin-1 の mRNA 発現の変化について検討した所、どちらの発現においても、ロイシンの継続摂取において減少する傾向はみられなかった。むしろ反対に、ロイシンの摂取により上昇する傾向がみられ、特に Atrogin-1 では顕著にかつ有意に上昇しており、予想とは反する結果となった。したがって、ユビキチンリガーゼの遺伝子発現が上昇しているのにも関わらず、骨格筋タンパク質の分解速度は抑制されていることから、前章でみられたロイシン継続摂取による分解抑制には、ユビキチン-プロテアソーム系の関与は低いと考えられる。ユビキチンリガーゼの mRNA 発現が上昇した理由については不明であり、今後の課題である。

オートファジー-リソソーム系については、無タンパク質食 (PF) の摂取により上昇した LC3-II の発現がロイシンの摂取により減少し、さらに LC3-I に対する LC3-II の量も有意に減少しており、ロイシンの継続摂取により、オートファジーが顕著に阻害されていると示唆される。したがって、前章でみられた、ロイシンの継続摂取による骨格筋タンパク質の分解抑制は、オートファジー-リソソーム系の制御が、強く関わっていると考えられる。

## 2. 6時間ごとのロイシンの摂食が合成と分解に及ぼす影響

我々の研究 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 1932-1937, 1998) によりタンパク質を含む食餌を摂食した後、3時間から4時間で筋原線維タンパク質の分解が抑制され、6時間までこれが維持されることを示した。そこで本研究では、骨格筋タンパク質の合成を促進し分解を抑制するロイシンを用いて、ロイシン単独でタンパク質の摂取同様に、骨格筋タンパク質の合成と分解を制御できるか、検討した。

我々は18時間絶食させたラットに体重100gあたり135mgのロイシン量を経口投与にすることにより、投与3時間後に筋原線維タンパク質の分解が顕著に抑制され、投与6時間後には投与前のレベルに戻ることを示した (*J. Nutr. Biochem.*, **13**: 121-127, 2002)。そのため、ロイシン単独の複数回投与により、タンパク質の摂取同様に分解抑制を長時間維持できることが予測される。一方、Yoshizawaらはラットを用いて、絶食後に135mg/100g体重のロイシン量を経口投与することにより、投与1時間後に4E-BP1と、S6K1の活性化が顕著に起こり、投与3時間後には減少することを示している。このように、ロイシンには骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制効果があると考えられる。そこで本研究では、6時間間隔のロイシン単独投与で骨格筋タンパク質の合成と分解を制御できるか検討した

### 2.1. 方法

#### (1) 動物実験

実験動物として3週齢のWistar系雄ラット(30~50g、日本エスエルシー株式会社:浜松)35匹を用いた。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飼育した。水は水道水を自由飲水させた。絶食のまま屠殺する群、1回目のロイシン経口投与1、3、6時間後、2回目のロイシン投与1、3、6時間後に屠殺する群に分け動物実験を行った

飼育13日目の10:00に1群は絶食のまま屠殺した。また、10:00に残りのラットに、ロイシン懸濁液を体重100gあたり2.5mL(ロイシンとして135mg/100g体重)を経口的にフィーディングチューブ(2孔式、長さ40cm、テルモ株式会社、東京)で胃内強制投与し、投与1時間後、3時間後、6時間後に屠殺した。

さらに1回目のロイシン投与6時間後に、2回目のロイシン投与を1回目のロイシン投与と同様の条件で行い、2回目の投与1、3、6時間後に屠殺した。

ラットは、ジエチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈から採血した後に屠殺し

た。屠殺後速やかに右足の長指伸筋とヒラメ筋を単離し、筋原線維タンパク質分解速度の測定に使用した。血液は、ヘパリン入りの試験管に入れ、3,000g、4°Cで15分間遠心分離し、血漿を分離した。血漿は、分析するまで-80°Cで保存した。

#### (2) 骨格筋タンパク質の分解測定方法

単離筋肉切片からの MeHis 放出速度は、屠殺後速やかに摘出した右足の長指伸筋、ヒラメ筋を KRB 緩衝液中で一定時間 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 通気下 37°C でインキュベーションし測定した。

チロシン放出速度の測定は、蛍光法で行った。

#### (3) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の測定

除タンパク質した血漿を適宜水で希釈し、o-フタルアルデヒドによる誘導体化の後、HPLC で分岐鎖アミノ酸を測定した。

#### (4) プロテアーゼ活性の測定

プロテアソーム活性は低分子ペプチド蛍光基質を用いて測定した。

カルパイン活性はカルシウムの存在の有無でアゾカゼインの分解活性から測定した。

#### (5) S6K1 の検出

試料の調製中に S6K1 がプロテアーゼにより分解されてしまわないように、ホモジナイズ用緩衝液中にプロテアーゼの阻害剤であるフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を加えてホモジナイズした。この懸濁液を 10,000×g、4°C で10分間遠心分離し、SDS-PAGE の試料とした。

試料は 7.5% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE により分離を行った。S6K1 の免疫検出は、PVDF 膜に転写後、一次抗体として抗 S6K1 ポリクローナル抗体 (Stressgen, Canada) を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗体 Rabbit IgG (Stressgen, Canada) で行った。検出は ECL 試薬を用いて ECL 専用感光フィルム (Hyperfilm; ECL, Amersham Biosciences) で行った。

#### (6) 4E-BP1 の検出

S6K1 の調製法と同様に、ホモジナイズ用緩衝液中に PMSF を加えてホモジナイズし、遠心分離により試料を調製した。



SDS-PAGE は分離ゲルが 15%となるようにして分離を行い、PVDF 膜に転写後、抗 4E-BP1 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biochem、USA) とペルオキシダーゼ標識抗体 Rabbit IgG を用いて免疫染色した。

## 2.2. 結果

### (1) 骨格筋タンパク質の分解速度

図 2-1 にロイシン投与に伴う長指伸筋およびヒラメ筋からの MeHis 放出速度の経時変化を示す。

長指伸筋からの MeHis 放出速度は、1 回目のロイシン投与 1 時間後から減少が見られ、投与 3 時間後から絶食時 (0 時) よりも有意に減少しはじめた。また、投与 3 時間後から投与 6 時間後まで一定の値を維持し、絶食時と比較して 30%程減少した。2 回目のロイシン投与 1 時間後 (7 時) にも減少が見られ、2 回目の投与 3 時間後 (9 時) から 6 時間後 (12 時) に最低速度を示し、絶食時よりも約 40%減少していた。

ヒラメ筋からの MeHis 放出速度も、長指伸筋と同様に、ロイシン投与 1 時間後から減少が見られ、投与 3 時間後から投与 6 時間後まで一定値を維持し、絶食時と比較して 40%程度減少していた。2 回目のロイシン投与後も減少が見られ、2 回目の投与 1 時間後から 6 時間後まで最低速度を示した。

以上の結果より、筋肉からの MeHis 放出速度はロイシン投与 1 時間後から減少し始め、投与 3 時間後から 6 時間後にかけて一旦減少は一定になり、6 時間後に再度ロイシンを投与することによりさらに減少し、1 回目の投与 12 時間後まで絶食時よりも有意に低いレベルを示すことが明らかになった。

長指伸筋およびヒラメ筋からのチロシン放出速度は、ロイシン投与、再投与に伴う有意差はなかったが、ロイシン 1 回目投与と 2 回目投与 1 時間後に減少が見られ、その後時間の経過と共に上昇した (図 2-2)。

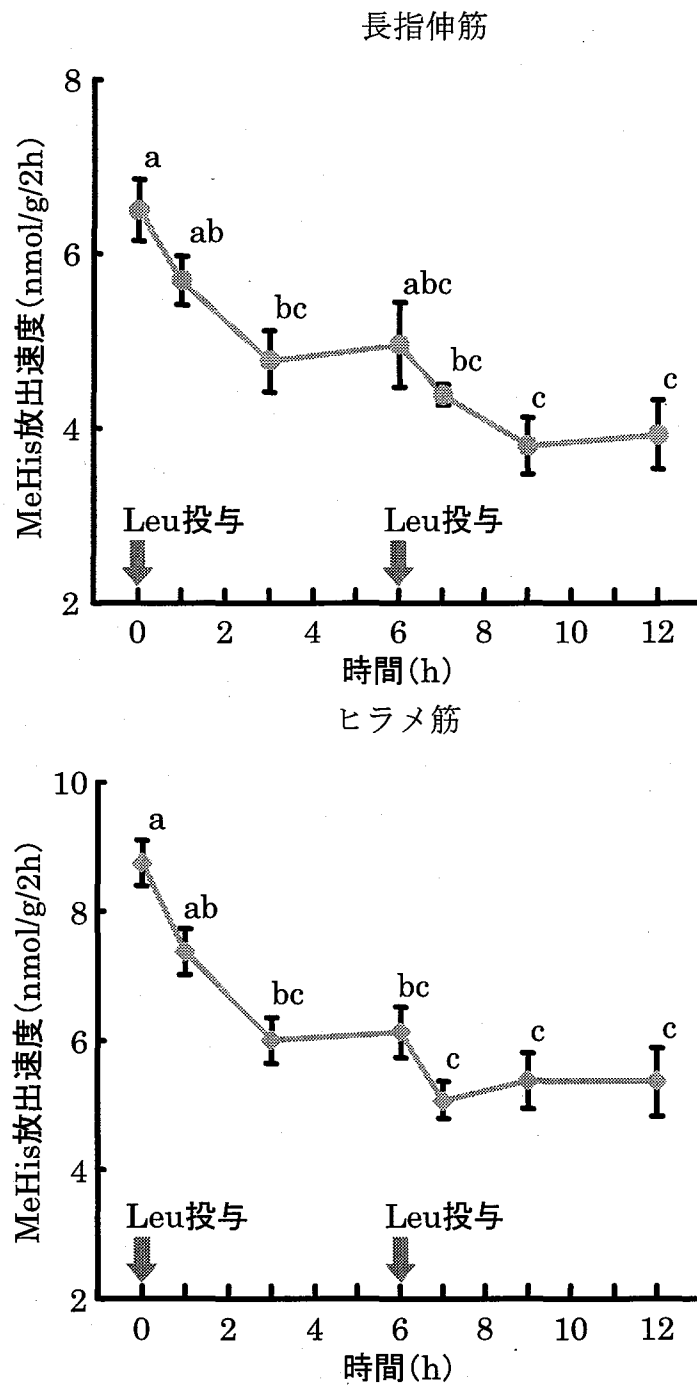


図 2-1 ロイシン投与、再投与に伴う長指伸筋およびヒラメ筋からの MeHis 放出速度の経時変化

値は、平均±標準誤差 (n=5)、異なる記号間には有意差あり :  $p < 0.05$

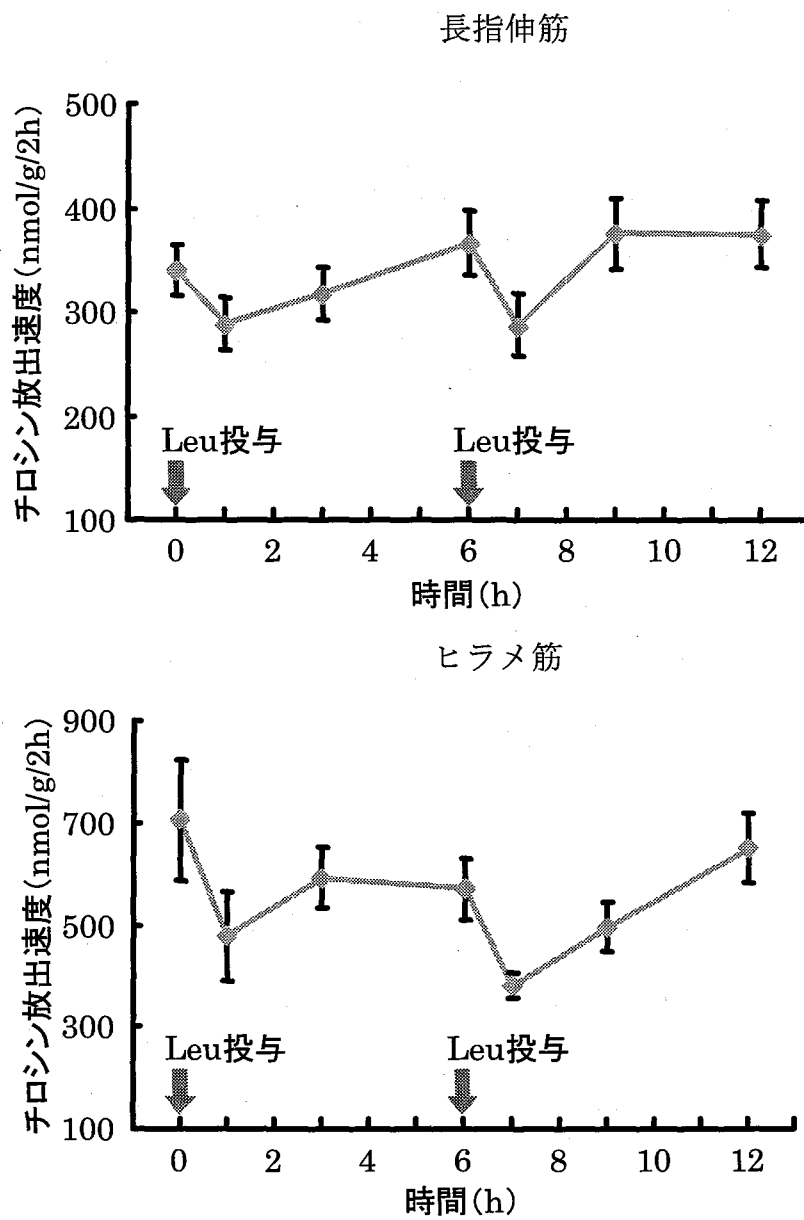


図 2-2 ロイシン投与、再投与に伴う長指伸筋およびヒラメ筋からのチロシン放出速度の経時変化

値は、平均±標準誤差 (n=5)、異なる記号間には有意差あり :  $p < 0.05$

### (3) 血漿中アミノ酸濃度

ロイシン投与による血漿中のアミノ酸濃度の経時変化を図 2-3 に示す。

血漿中のロイシン濃度は、1 回目の投与 1 時間後に顕著に増加し、投与 3 時間後から急激に減少し投与 6 時間後には絶食時 (0 時) の濃度まで減少した。再投与後も同様に再投与 1 時間後 (7 時) に急激に上昇し、再投与 3 時間後 (9 時) には急激に減少し絶食時の濃度まで戻っていた。

血漿中のバリン濃度とイソロイシン濃度は、1 回目のロイシン投与 1 時間後に急激に減少し、その後、時間の経過と共に上昇し投与 6 時間後には、絶食時 (0 時) の濃度まで戻った。2 回目のロイシン投与後も投与 1 時間後に急激に減少し、その後、上昇して 2 回目の投与 6 時間後 (12 時) には、絶食時の濃度まで戻った。

### (4) プロテアソーム活性

図 2-4 にロイシン投与、再投与に伴う骨格筋タンパク質のプロテアソーム活性の経時変化を示す。トリプシン様ペプチダーゼ活性、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性、ペプチジルグルタミルペプチダーゼ活性の全てにおいてロイシン投与および再再投与に伴う差は認められなかった。

### (5) カルパイン活性

図 2-5 にロイシン投与、再投与におけるカルパイン活性の経時変化を示す。カルパイン活性は、絶食時 (0 時) の値を 1 として相対値で示した。ロイシン投与、再投与による有意な差はなかった。

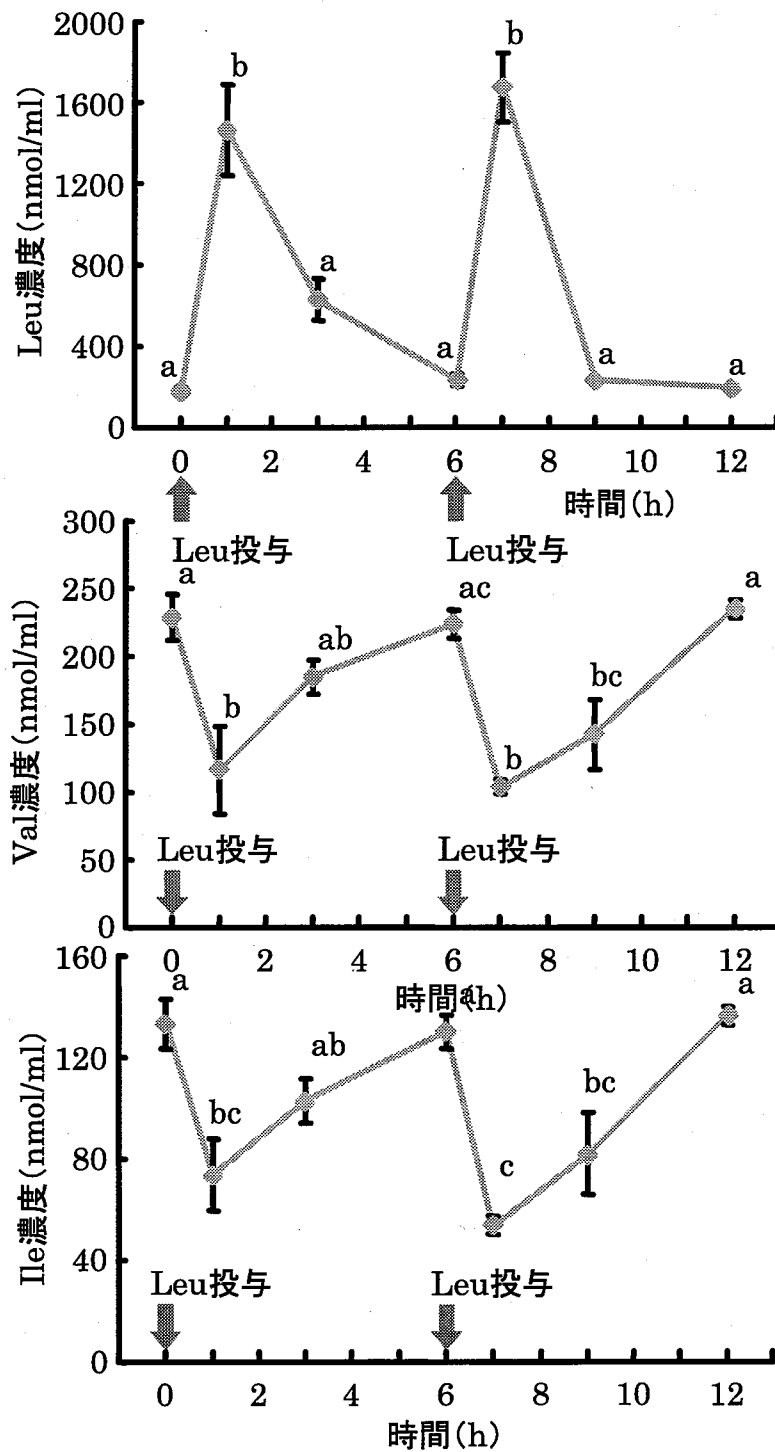
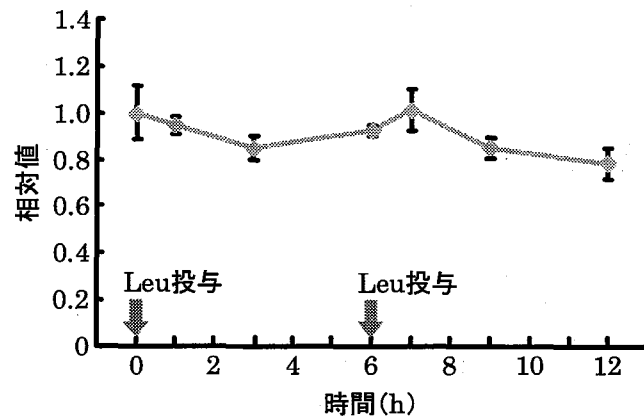
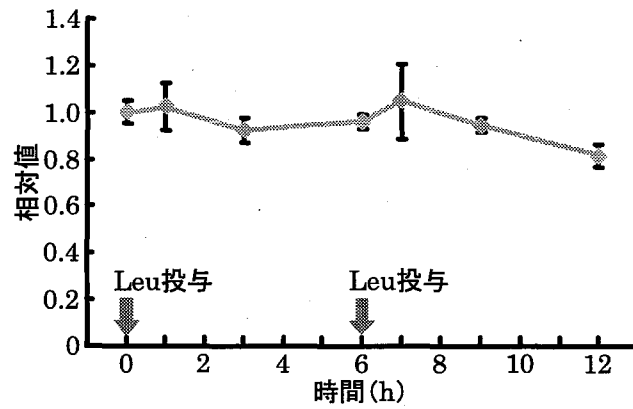


図 2-3 ロイシン投与、再投与に伴う血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の経時変化値は、平均±標準誤差 (n=4-5)、異なる記号間には有意差あり : p<0.05

トリプシン様ペプチダーゼ



キモトリプシン様ペプチダーゼ



ペプチジルグルタルミルペプチダーゼ

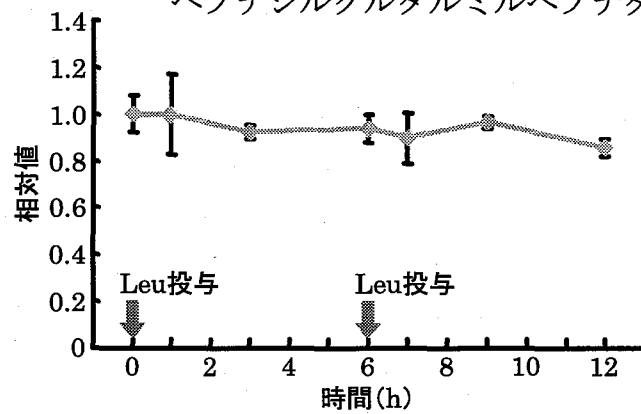


図 2-4 ロイシン投与、再投与に伴うプロテアソーム活性の経時変化値は、平均±標準誤差 (n=4~5)

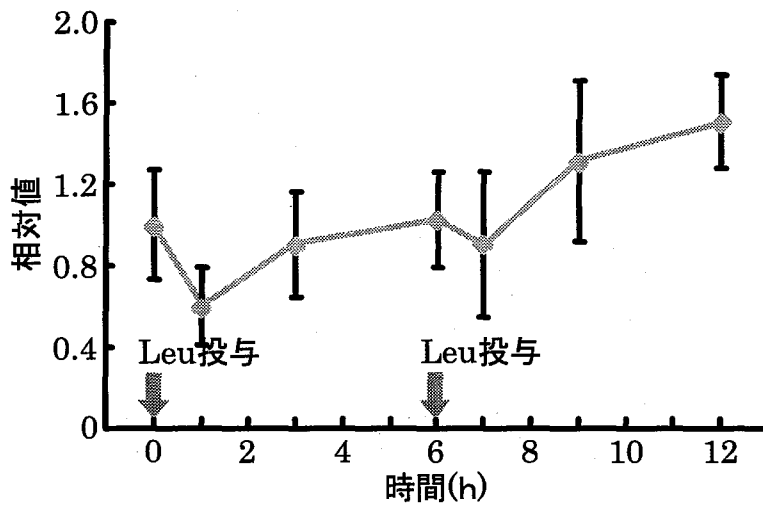


図 2-5 ロイシン投与、再投与に伴うカルパイン活性の経時変化値は、平均±標準誤差 (n=4~5)

#### (6) S6K1 の活性

S6K1 の活性化は、S6K1 タンパク質がリン酸化されることにより活性化する。S6K1 は結合したリン酸基の数の違いにより 3 本のバンドに分離され、リン酸化が進むほどバンドは上部にシフトする。そこで、リン酸化の低い低分子から順に I、II、III と番号を付け、全てのバンドを数値化した後、全バンドに対するリン酸化したバンド II、III の相対的な値を求め、図 2-6 に示した。

S6K1 のリン酸化は、ロイシン投与 1 時間後に顕著に上昇したが、投与 3 時間後に絶食時 (0 時) のレベルに戻り、投与 6 時間後も絶食時の状態と等しかった。その後、2 回目の投与により、再び投与 1 時間後に急激に増加したが、その後、再投与 3 時間後に絶食時のレベルに戻った。また、2 回目の投与 1 時間後よりも、1 回目の投与 1 時間後の活性の方が有意差はないが強かった。このことから、S6K1 はロイシン投与後、短時間のみ活性化されることが示された。S6K1 の活性化の経時変化は、血漿中のロイシン濃度の経時変化と相関していた。

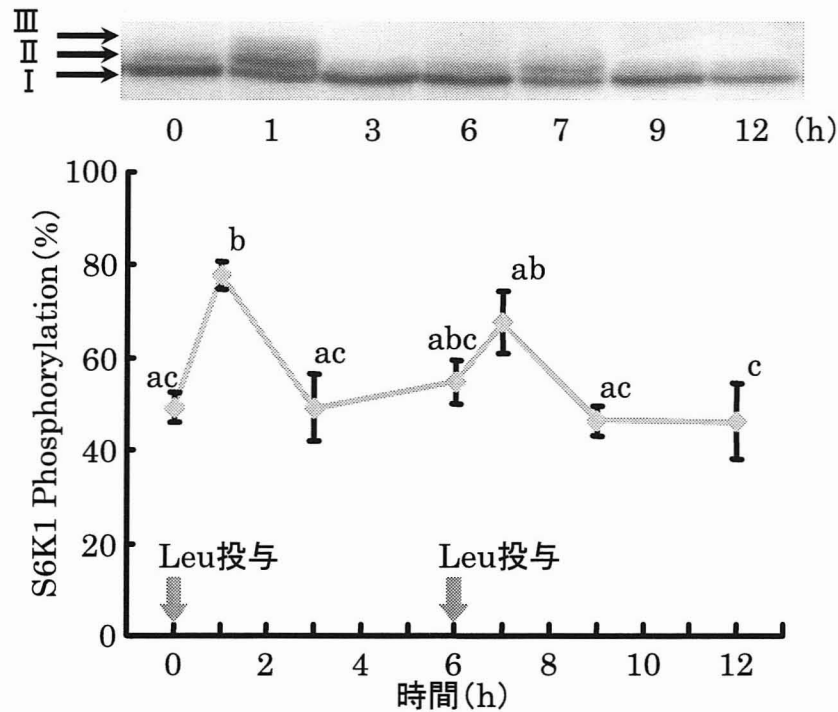


図 2-6 ロイシン投与、再投与に伴う S6K1 のリン酸化の経時変化値は、平均±標準誤差 (n=4~5)

#### (7) 4E-BP1 の活性

4E-BP1 の活性は、4E-BP1 のタンパク質がリン酸化されることによる。最もリン酸化が低い状態を $\alpha$ 形態、ひとつリン酸化された状態を $\beta$ 形態、さらにリン酸化が進んだ状態を $\gamma$ 形態と呼び、3本のバンドのうち下から $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 形態となる。 $\gamma$ 形態となった4E-BP1は、eIF-4Eと解離し、遊離したeIF-4Eはタンパク質合成を活性化することができるようになる。そこで、全バンドを数値化した後、全バンドに対する $\gamma$ 形態の値を求め、図2-7に示した。

4E-BP1 のリン酸化は、ロイシン投与1時間後に顕著に上昇し最大値を示したが、投与3時間後には急激に減少して絶食時(0時)のレベルまで戻った。その後、再投与により、再び投与1時間後のみに顕著に増加した。したがって、4E-BP1の活性化は、ロイシン投与、再投与1時間後のみに急激に活性化され、投与3時間には絶食時のレベルに戻ることが示された。また、S6K1の活性化と同様に4E-BP1の活



性化の経時変化も、血漿中のロイシン濃度の変化と相関していた。

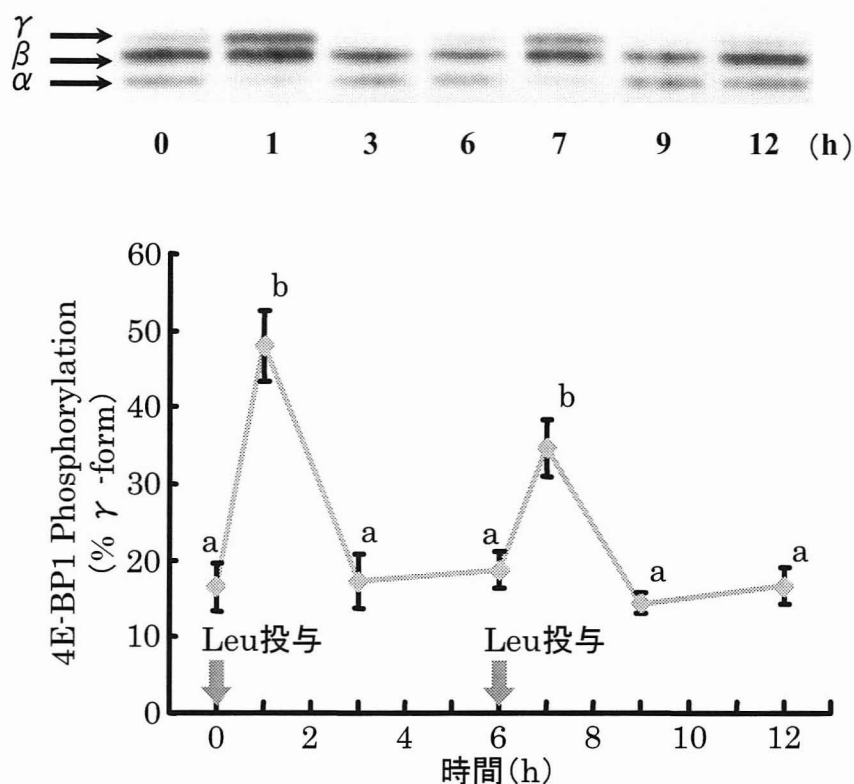


図 2-7 ロイシン投与、再投与に伴う 4E-BP1 のリン酸化の経時変化値は、平均±標準誤差 (n=4~5)

### 2.3. 考察

本研究では、ロイシンの複数回投与でも骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制の制御が可能か検討した。ロイシンの投与量は、ラットの体重 100g あたり 135mg である。この量は、骨格筋タンパク質の合成促進と筋原線維タンパク質の分解抑制が認められる 20%カゼイン飼料を、一日に摂取する量に含まれるロイシン量に相当する。ロイシンの投与間隔は、第 2 章の 20%カゼイン飼料の摂食と同様に絶食後に 6 時間間隔で、2 回、それぞれ 135mg/100g 体重を投与した。

本実験では、6 時間間隔で 2 回ロイシンだけを投与することにより、筋原線維タンパク質の分解抑制を長時間維持できることを初めて示した。したがって、ロイシンの単独経口投与により筋原線維タンパク質の分解抑制を制御できることが示唆された。

近年、栄養摂取による骨格筋タンパク質の合成機構が明らかにされている。栄養摂取後のアミノ酸（特にロイシン）が骨格筋タンパク質の翻訳段階を介して、タンパク質合成を促進することが明らかになってきている。ロイシンによるタンパク質合成の促進は、タンパク質の翻訳段階の開始活性の上昇がその一因である。なかでも開始因子 4E (eIF4E : eukaryotic initiation factor 4E) とその関連因子が介する mRNA のリボソーム 40S サブユニットへの結合ステップは重要な調節部位である。eIF4E は、RNA ヘリカーゼ活性をもつ eIF4A (eukaryotic initiation factor 4A) と eIF4G (eukaryotic initiation factor 4G) とともに eIF4F 複合体 (eukaryotic initiation factor 4F) を形成し、リボソームの 40S サブユニットを mRNA に結合させる最初のステップで、mRNA の 5'末端の m7GTP キャップ構造を認識して機能する因子である。eIF4E は、eIF4E 結合タンパク質 4E-BP1 (eIF-4E-binding protein-1) と結合すると、eIF4F を形成できなくなる。ロイシンは 4E-BP1 をリン酸化し、リン酸化された 4E-BP1 は結果として eIF4E から離れ、eIF4F の形成を促進する。また、ロイシンは TOP (terminal oligo pyrimidine tract) を持つ mRNA の翻訳促進に関与するリボソームタンパク質 S6 キナーゼ (S6K1 : p70 S6 kinase-1) をリン酸化して活性化することが知られている。4E-BP1 と S6K1 は両方とも mTOR (mammalian target of rapamycin) が関係するシグナル伝達経路の下流に位置している。ロイシンはこの 4E-BP1 と S6K1、mTOR をリン酸化してタンパク質の翻訳段階を促進していると考えられている。Yoshizawa らは、18 時間絶食させたラットに、135mg/100g 体重のロイシン量を経口投与することにより、投与 1 時間後に 4E-BP1 と、S6K1 の活性化が顕著に起こり、投与 3 時間後には減少することを示した。本実験で、4E-BP1 と S6K1 は 1 回目のロイシン投与 1 時間後に活性化され、3 時間後には減少した結果は Yoshizawa らの結果と一致しており、絶食後にロイシンを投与することで骨格筋タンパク質の翻訳段階が投与 1 時間後に活性化することが示された。本実験では、1 回目の投与 6 時間後に再度ロイシンを投与することで、4E-BP1 と S6K1 が再投与 1 時間後に絶食時よりも、活性化することを初めて示した。以上のことから、ロイシンの単独経口投与により骨格筋タンパク質の合成促進を制御できる可能性が考えられる。

血漿中のロイシン濃度は投与 1 時間後と投与 7 時間後のみに上昇した。これは、経口投与したロイシンが吸収され、血漿中に反映したためだと考えられる。血漿中のロイシン濃度の経時変化と 4E-BP1 と S6K1 の経時変化は一致しており、血漿中のロイシン濃度が増加した時間で 4E-BP1 と S6K1 は活性化している。血漿中のロイシン濃度は 1 回目と 2 回目の投与後、ほぼ同濃度まで上昇しているが、4E-BP1 と S6K1 の活性化は 2 回目の方で低下している。1 回目のロイシン投与は 24 時間の

絶食後に投与し、2回目のロイシン投与は1回目の投与から6時間後に投与している。この時間の間隔が関与していると思われるが、本実験のように、ロイシンの複数回投与による実験報告はなく、今後、さらに検討する必要がある。

本実験で、骨格筋タンパク質合成は血漿中のロイシン濃度と相関性を示し、投与後すぐに劇的に活性化されるがその効果は短時間であった。すなわち、合成を常に活性化させるためには、投与1時間後以内にロイシンを再投与する必要があると予測される。一方、筋原線維タンパク質分解は、血漿中のロイシン濃度が低下した、3時間後から6時間後に抑制され、分解はロイシンの投与後、緩やかに長く抑制される。すなわち、本実験で示したように、分解抑制を常に保つためには、分解抑制が維持されている6時間後にロイシンを再投与すれば良い。以上のことから、ロイシン投与による骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制の制御は可能であり、かつ合成よりも分解の方がより効率よく制御できることが示唆された。

インスリンは骨格筋タンパク質合成を促進する。最近、栄養摂取後のインスリンが、mTORの上流に位置するPi3K(phosphatidylinositol 3 kinase)やPKB(protein kinase B)を介して4E-BP1とS6K1を刺激してタンパク質の翻訳を活性化することが明らかにされている。ロイシンにはインスリンを刺激する作用がある。本実験と同様の手法で行なったNagasawaら(J.Nutr.Biochem. 13: 121-127, 2002)の報告では、ロイシンの経口投与により、若干血漿中のインスリン濃度が上昇するが投与前と比べて有意な差がないことを示した。また、Anthonyら(J Nutr. 130: 139-145, 2000)は、18時間の絶食ラットにロイシンを135mg/100g体重を経口投与しても血漿中のインスリン濃度が変化しないことを示した。しかし、Doiら(Am J Physiol Endocrinol.Metab. 292: E1683-E1693, 2007)は、絶食させたラットにロイシンを経口投与することにより、血中のインスリン濃度が投与直後から投与30分までは上昇するが投与60分には投与前まで減少することを示した。おそらく、ロイシンの経口投与による血漿中のインスリン濃度の上昇は投与直後から投与30分後くらいの短時間の間に起こると思われる。本実験では、血漿中のインスリン濃度を測定していない。また、投与1時間後の4E-BP1とS6K1を測定しているが、Doiらが示したインスリン濃度の上昇が見られる時間での4E-BP1とS6K1の測定はしていない。そのため、ロイシン投与によるインスリン濃度の上昇が骨格タンパク質の合成に与える影響について検討するためには、投与数十分後短時間での合成を測定する必要があると思われる。しかし、本実験ではインスリン濃度が低下した投与60分後(投与1時間後)でもタンパク質合成の活性化が見られ、血漿中のロイシン濃度と相関性を示した。そのため、本実験で見られたロイシン投与1時間後の骨格筋タンパク

質合成の活性化は、ロイシン単独による可能性が高いと思われる。また、ロイシンによるタンパク質合成促進とインスリンに関する研究は盛んに行われており、ロイシン単独でもタンパク質合成を活性化することができるが、インスリン存在下では、その活性はさらに強くなることが報告されている (Anthony et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**: E1092-E1101, 2002, Crozier et al., *J Nutr.* **135**: 376-382, 2005) 以上のことから、ロイシン投与による骨格筋タンパク質の合成は、ロイシン投与直後から数十分間の間は、ロイシンとロイシン投与により生じたインスリンの相乗効果により活性化され、それ以降はロイシンにより活性化されると考えられる。

インスリンが骨格筋タンパク質分解に及ぼす影響については、はっきりとした見解に達していない。Anthony らは、ロイシンの経口投与 1 時間後に、血漿中のインスリン濃度が変化しないことを示した。しかし、Doi らは、絶食させたラットにロイシンを経口投与することにより、血中のインスリン濃度が投与直後から投与 30 分までは上昇するが投与 60 分には投与前まで減少することを示した。おそらく、ロイシンの経口投与による血漿中のインスリン濃度の上昇は投与直後から投与 30 分後くらいの短時間のみに起こると思われる。本実験では、血漿中のインスリン濃度を測定していないが、Doi らの血中インスリン濃度の上昇と本実験で見られた筋原線維タンパク質分解抑制には、かなりの時間の差がある。そのため、本実験のようなロイシン投与による筋原線維タンパク質の分解抑制には、ロイシン投与により生じたインスリンの関与は薄く、ロイシン単独によるものだと考えられる。

本実験では、ロイシンの投与により、筋原線維タンパク質の分解抑制効果が認められた。そこで、ロイシン投与による筋原線維タンパク質の分解抑制機構を調べるために、プロテアソーム系の酵素活性とカルパイン活性について検討した。プロテアソーム系の代表的な 3 つの酵素活性には、ロイシン投与による影響は認められなかった。また、カルパイン活性もロイシン投与による影響は認められなかった。Combraret ら (*J Physiol.* **569**: 489-499, 2005) は、ロイシンの添加食により、ユビキチン-プロテアソーム系の酵素活性 (トリプシン様ペプチダーゼ活性、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性) は変化しないが、ユビキチン化酵素 (E3) とプロテアソームサブユニットの C2 の遺伝子発現量を抑制することを示した。一方、Kadowaki ら (*J Nutr.* **133**: 2052S-2056S, 2003) は、ロイシンがリソソーム系のオートファゴソームの形成を調節し、タンパク質の分解を抑制することを示した。このように、ロイシンによる分解抑制機構については、まだ明確な答えが出されていない。本実験では少なくともプロテアソーム系の酵素活性とカルパイン活性は変化しない可能性を示唆したが、ロイシンによる分解抑制機構については、より詳細に検討する必要

がある。

本実験では、ロイシンの6時間間隔の投与により骨格筋タンパク質の合成が投与、再投与1時間後のみに促進され、筋原線維タンパク質の分解は投与3時間後から6時間後まで抑制され、再投与することにより、この分解抑制が長期に維持されることを示した。ロイシン投与による骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制には、血漿中のロイシン濃度が関与しており、合成促進は血漿中のロイシン濃度の経時変化と相関性を示し、分解抑制は血漿中のロイシン濃度が低下した3時間後から6時間後に見られた。

以上のことから、ロイシンの複数回投与により、骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制が可能であることが示された。ロイシン投与による合成は投与後すぐに劇的に活性化されその効果は短時間であった。一方、分解は投与後、徐々に長く抑制された。すなわち、合成を常に活性化するためには短時間の間にロイシンを再投与する必要がある。しかし、分解は1回の分解抑制効果が長いため、長時間の間に再投与すれば良い。よって、ロイシン投与による骨格筋タンパク質の合成促進と分解抑制の制御は、合成よりも分解抑制の方がより効率よく効果的に制御できることが明らかとなった。

### 3. 廃用性筋萎縮モデルにおけるロイシンの効果

加齢に伴う筋肉量の減少は、日常生活での活動力の低下や疾病治癒の遅延化を招く。また、疾病により長期間ベッドなどで横臥（いわゆる寝たきり）していると筋肉量が著しく減少する。これは収縮を行わない筋肉が萎縮する減少で「廃用性筋萎縮」と呼ばれている。廃用性筋萎縮によっても活動力低下、疾病治癒の遅延化が起こる。高齢社会ではこの廃用性筋萎縮が大きな問題となっており、その防止が急務となっている。したがってアミノ酸による筋肉タンパク質の分解抑制の応用を考える上で、廃用性筋萎縮モデルを使い、アミノ酸、特にロイシンの効果を、タンパク質分解を中心に検討を行った。

#### 3.1. 方法

##### (1) 動物の飼育方法とギプス固定、解剖

実験動物として8週齢のFischer344系雌ラット(110~130g、日本クレア株式会社：東京)24匹を用いた。ラットは個別のステンレスケージに入れ、室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 1\%$ 、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た。飼料は飼育1、2日目に固形飼料(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)を、3、4日目にAIN-93M組成〔64〕20%カゼイン飼料を、5、6日目にAIN-93M組成10%カゼイン飼料を自由摂取させた。飼育7日目、平均体重がほぼ等しくなるように12匹ずつControl群およびLeucine群の2群に分けた。さらに、解剖時に単離するヒラメ筋をインキュベーターする緩衝液中に、リソソーム系阻害剤であるメチルアミンを添加しない群(-)と添加する群(+))とに分け、各群6匹、計4群とし、実験飼料(Table 2-1)を自由摂取させた。Control群には実験飼料としてAIN-93M組成10%カゼイン飼料を与え、Leucine群にはAIN-93M組成10%カゼイン飼料にロイシンを1%添加した飼料を与えた。

実験飼料に切り替えた翌日にラットの右後肢にギプス固定を施した。ギプス固定は次のように行った。ケタラール(三共エール薬品株式会社：東京)とセラクター(Bayer：ドイツ)を100：16の割合で混合した麻酔を、ラットの体重100gあたり1.3mL腹腔内投与し、全ラットの右後肢をプラスランギプス(ALCARE：東京)およびスコッチキャストプラスJ(スリーエムヘルスケア株式会社：東京)で固定し

た (図 3-1)。ギプスで固定する肢は HAIR CLIPPER MODEL 2000 AD(大東電機工業株式会社：大阪)で体毛を剃った。プラスランギプスを 1.5~2cm×25~30cm 程度に切り、使用直前に水に数秒浸した。ラットの右後肢の足首の甲が伸びるような状態で固定しながら、膝が 90 度になるようにしてプラスランギプスで太腿の付け根を巻いた。プラスランギプスを 3 つに折りたたんだものを膝から脛にかけて置き、その上からさらにプラスランギプスを巻きつけた。さらにもう一度プラスランギプスで太腿をしっかりと固定し、ふくらはぎから足底 3 分の 1 辺りにかけて巻いた。この時足首がきつくと浮腫を起こすので、足首の部分はゆるめに巻き、ふくらはぎ上部、太腿をきつく巻くように注意して固定した。次にプラスランギプスの上から 1.5~2cm×25~30cm 程度に切ったコッチキャストプラス J を 2、3 本分巻き、さらにその上からプラスランギプスを 4、5 本分巻き、指に水をつけてギプスを擦り石膏が滑らかになるようにした。その後 1 時間ほど放置し、乾かした。固定期間中はギプスが外れやすいので、ギプス固定 2 日目に太腿の付け根をさらにプラスランギプスで固定し、薄くなった部分にもプラスランギプスを巻き足した。また、足首に浮腫が起きた場合は足首までギプスを外し、再度プラスランギプスを用いてゆるく巻いた。

ギプスを巻いてから 6 日間飼育し、飼育 13 日目に屠殺した。解剖の手順は次の通りである。ギプス固定時と同様に、麻酔はケタラール (三共エール薬品株式会社：東京) とセラクター (Bayer：ドイツ) を 100：16 の割合で混合したものを用了。ラットの体重 100g あたり 1.3mL 腹腔内投与し、麻酔が効いたところでハサミを用いて外側から徐々にギプスを外した。その後体重を測定し、開腹後に下大静脈から採血した後に屠殺した。屠殺後速やかに左右のヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を単離し、筋湿重量を測定した。

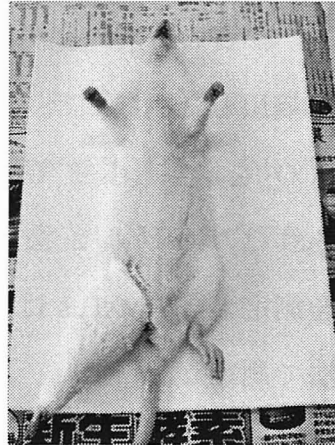
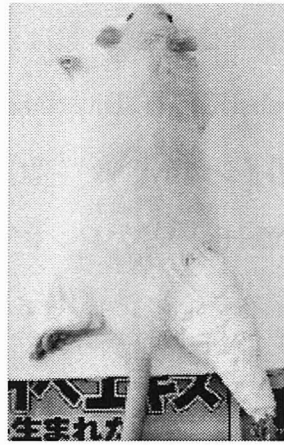


図 3-1 右後肢にギプス固定を行った Fischer 344 系 8 週齢 雌ラット

表 3-1 実験 1 の飼料組成 (g/kg)

	Control 群	Leucine 群
カゼイン <sup>1</sup>	100	100
シスチン <sup>2</sup>	1.8	1.8
重酒石酸コリン <sup>3</sup>	2.5	2.5
AIN-93 ビタミン混合	10	10
AIN-93 ミネラル混合	35	35
セルロース <sup>1</sup>	50	50
大豆油 <sup>3</sup>	40	40
ショ糖 <sup>4</sup>	100	100
コーンスターチ <sup>1</sup>	660.7	650.7
ロイシン <sup>2</sup>	0	10

<sup>1</sup>オリエンタル酵母工業株式会社：千葉、<sup>2</sup>味の素株式会社：東京、

<sup>3</sup>和光純薬株式会社：大阪、<sup>4</sup>東洋精糖株式会社：東京、



## (2) 骨格筋タンパク質の分解速度測定方法

屠殺後速やかに摘出した両肢ヒラメ筋は Krebs-Ringer Bicarbonate(KRB)緩衝液に浸し、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>を通気して 37°Cで 2 時間インキュベーションを行った。KRB 緩衝液中に放出された N<sup>m</sup>-メチルヒスチジン (MeHis) とチロシンから骨格筋タンパク質の分解速度を測定した。MeHis はフルオレスカミン誘導体を用いた HPLC で、チロシンは蛍光法で測定した。

## (3) 骨格筋のユビキチン化タンパク質の検出

足底筋約 100mg に 25 倍量のホモジネート用緩衝液を加え、氷冷しながらポリトロンホモジナイザーで 30 秒間ホモジナイズした。タンパク質濃度を 4~5mg/mL になるようにホモジネート溶液で希釈し SDS-PAGE の試料とした。

10%アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行い、さらにニトロセルロース膜へ転写した後、一次抗体として抗ユビキチン抗血清 rabbit polyclonal IgG (Sigma Chemical Co. : USA) を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 Rabbit IgG (ICN Pharmaceuticals, Inc. : Cappel Research : USA) を用いて免疫染色し、ECL 試薬で発色させ、X 線フィルムに感光させた。

## (4) 骨格筋中のカルボニル基の検出

タンパク質が酸化修飾を受けると、タンパク質のリジン、アルギニン、プロリンなどのアミノ酸残基側鎖の酸化やペプチド結合の切断などによりカルボニル基の増加が起こる。したがって、タンパク質中のカルボニル基量を測定することで、タンパク質の酸化修飾を評価することができる。そこでタンパク質と結合したジニトロフェニル基を認識する anti-DNP 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

## (5) グルタチオンの定量

還元型グルタチオン(GSH)の SH 基が 5,5'-ジチオビス-2-安息香酸 (DTNB) の SS

基と反応することにより生じたチオニトロフェノレートアニオンがキノイド型をとり、412nmに強い吸収を持つようになることを利用した測定方法である。総グルタチオン及び酸化型グルタチオン(GSSG)を測定するときは、サンプル中に存在するGSSGをグルタチオンレダクターゼによって還元し、GSHに変化させて測定を行った。

#### (6) 骨格筋中の過酸化脂質 (TBARS) の測定

過酸化脂質の分解によって生成されるマロンジアルデヒド (MDA) をチオバルビツール酸 (TBA) と反応させ、チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) として定量する方法である。BHT 存在下、骨格筋ホモジネートと TBA を 100°C、1 時間反応させ、n-ブタノールで抽出後、535nm と 520nm の 2 波長の吸光度の差からテトラエトキシプロパンを標準として MDA 量を計算し、筋肉 1g あたりで表した。

#### (7) ユビキチンリガーゼ (Atrogin-1、MuRF1) の検出

Atrogin-1、MuRF1 の mRNA 発現量をノーザンブロットィング法により検出した。詳細は 1 で述べた。

### 3.2. 結果

#### (1) 解剖当日の動物の体重、ギプス固定期間中の飼料総摂取量

実験 1 における解剖当日の動物の体重、ギプス固定期間中の飼料総摂取量を表 3-2 に示す。解剖当日の体重、ギプス固定期間中の飼料摂取量で 4 群間に有意差はなく、以降の実験結果が体重や飼料摂取量の違いによるものではないと考えられる。

表 3-2 解剖当日のラットの体重とギプス固定期間中の飼料総摂取量

群	体重	飼料総摂取量	個体数
	g	g	n
Control(-)群	113.4±7.0	48.2±0.7	6
Control(+ )群	113.6±4.5	49.4±5.9	6
Leucine(-)群	117.1±5.5	51.3±3.5	6
Leucine(+ )群	116.7±3.4	51.4±2.7	6

値は平均±標準誤差

## (2) ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋の筋湿重量

実験 1 における解剖当日のヒラメ筋、腓腹筋、足底筋の体重あたりの筋湿重量を図 3-1 に示す。6 日間のギプス固定により、Control 群のギプス固定を行った右後肢の体重あたりの筋湿重量が非固定の左後肢と比較してヒラメ筋で 24%、腓腹筋で 16%、足底筋で 21%有意に減少した。このことからギプスで固定した右後肢において廃用性筋萎縮が起こっていることが示された。

Leucine 群ではギプス固定による体重あたりの筋湿重量の減少がヒラメ筋で 20%、腓腹筋で 13%、足底筋で 17%と有意に減少したが、Control 群よりも減少が小さく、ギプス固定による体重あたりの筋湿重量の減少が抑制された。

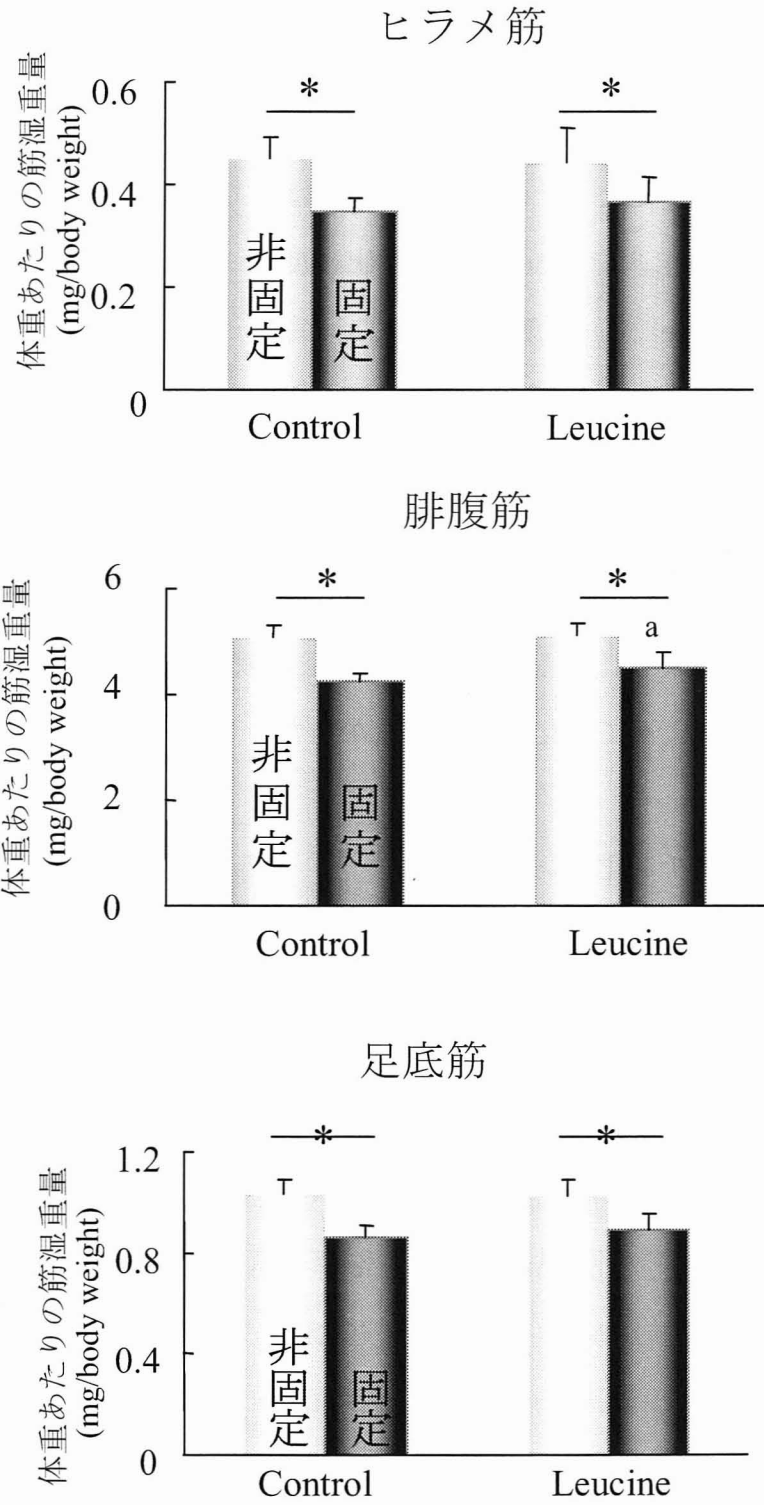


図 3-1 ヒラメ筋、腓腹筋、足底筋の体重あたりの筋湿重量

### (3) 骨格筋タンパク質の分解速度

Control 群、Leucine 群におけるギプス固定した右後肢および非固定の左後肢ヒラメ筋からの KRB 緩衝液中への MeHis 放出速度、および Tyr 放出速度を図 3-2 に示す。6 日間のギプス固定により、Control(-)群ではギプス固定を行った右後肢のヒラメ筋からの MeHis 放出速度が 56%、Tyr 放出速度が 21%、非固定の左後肢と比較して有意に増加した。Leucine(-)群ではギプス固定を行った右後肢のヒラメ筋からの MeHis 放出速度が非固定の左後肢と比較して 9%増加したが、有意差は見られなかった。また、筋肉切片をインキュベートする緩衝液中にリソソーム阻害剤であるメチルアミンを添加したことで、Control(+)群の MeHis 放出速度が Control(-)群と比較して固定肢、非固定肢ともに 28~31%有意に減少した。Leucine(+)群の MeHis 放出速度は Leucine(-)群と比較して 27~29%有意に減少した。しかし Tyr 放出速度はメチルアミン添加によって変化は見られなかった。

### (4) 骨格筋のユビキチン化タンパク質量

ユビキチン化タンパク質を抗ユビキチン化抗体で検出した結果 Control 群において固定肢、非固定肢間でバンドの濃さに違いが見られた。Leucine 群では固定肢、非固定肢間でバンドの濃さに差は認められず、Control 群と比較してバンドが薄かった。Control 群における 200kDa 付近のバンドに特に固定、非固定間の違いが見られたため、200kDa 付近のバンドを定量化したものを図 3-3 に示す。Control 群の非固定肢を 100 として表した。Control 群、Leucine 群ともに固定肢、非固定肢間に有意差は見られなかった。

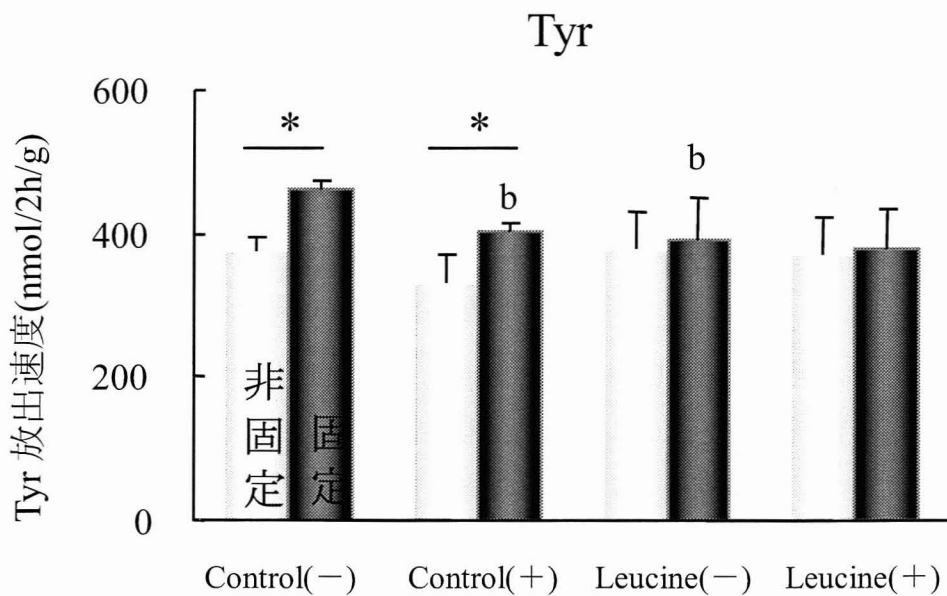
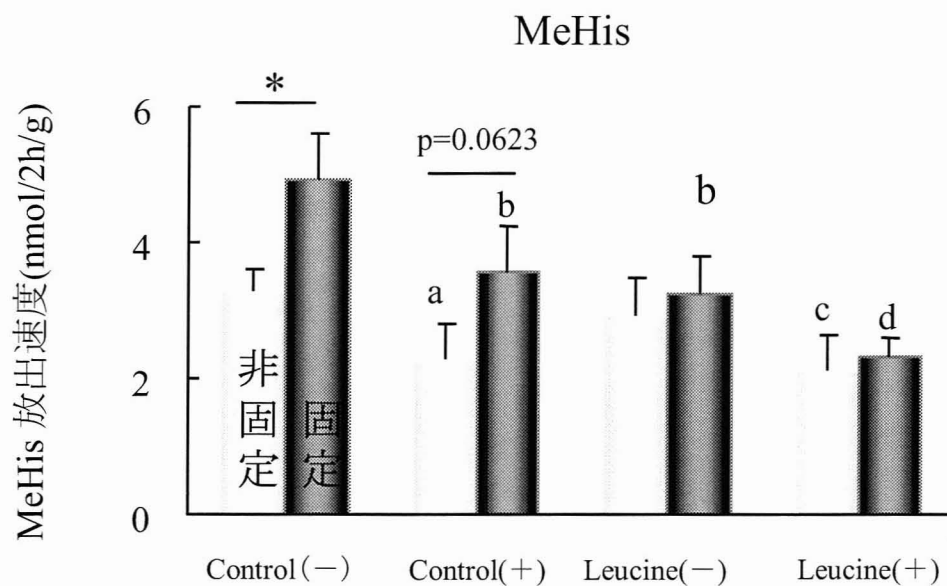


図 3-2 ヒラメ筋からの KRB 緩衝液中への MeHis、Tyr 放出速度

値は、平均±標準誤差 (各群 n=6)、(-) : リソソーム系阻害なし、(+): リソソーム系阻害あり \* : 同群における固定肢、非固定肢間で有意差あり ( $p < 0.05$ ) a : Control(-) 非固定に対して有意差あり ( $p < 0.05$ ) b : Control(-)の固定肢に対して有意差あり ( $p < 0.05$ ) c : Leucine(-)の非固定肢に対して  $p = 0.0657$  d : Control(+ )の固定肢、Leucine(-)の固定肢に対して有意差あり ( $p < 0.05$ )

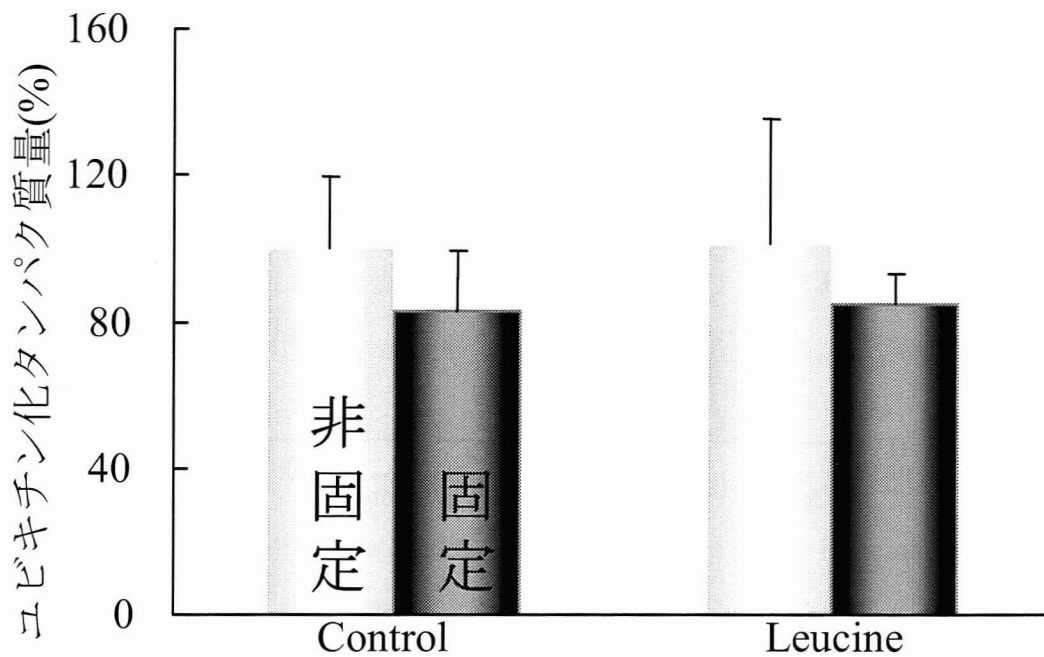


図 3-3 足底筋中ユビキチン化タンパク質量

値は、平均±標準誤差(各群 n=6) Control 群の非固定肢を 100%として表した

(5) 骨格筋タンパク質カルボニル基含量のウエスタンブロットによる解析

113.6kDa と 96.4kDa 付近のバンドを定量化した結果を図 3-4 に示す。Control 群の非固定肢を 100 として表した。Control 群ではギプス固定を行った右後肢で腓腹筋中タンパク質のカルボニル基量が 1.5 倍に有意に増加した。Leucine 群では Control 群よりも固定肢、非固定肢共に 30%程有意に腓腹筋中タンパク質のカルボニル基量が減少していた。さらに、固定肢、非固定肢におけるカルボニル基量に差は見られなかった。

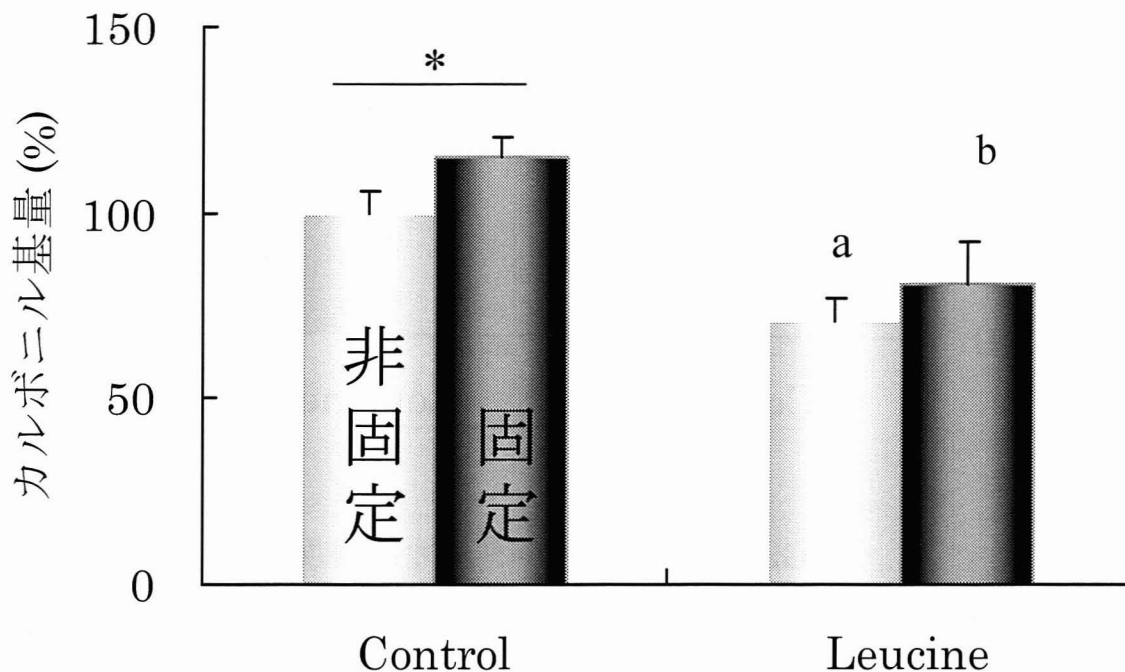


図 3-4 腓腹筋中タンパク質カルボニル基量

値は、平均±標準誤差（各群 n=6）Control 群の非固定肢を 100%として表した

\* : 同群における固定肢、非固定肢間で有意差あり ( $p < 0.05$ ) a : Control 群の非固定肢に対して有意差あり ( $p < 0.05$ ) b : Control 群の固定肢に対して有意差あり ( $p < 0.05$ )

#### (6) 骨格筋中のグルタチオン濃度

6日間固定を行ったことにより、総グルタチオン濃度が Control 群、Leucine 群ともにそれぞれの非固定肢と比較して 50%有意に増加した。酸化ストレスの指標となる総グルタチオン濃度に対する GSSG 濃度は Control 群においては固定、非固定肢間に差は見られなかった。対照的に、Leucine 群では固定を行った右後肢において 49%有意に減少した (図 3-5)。



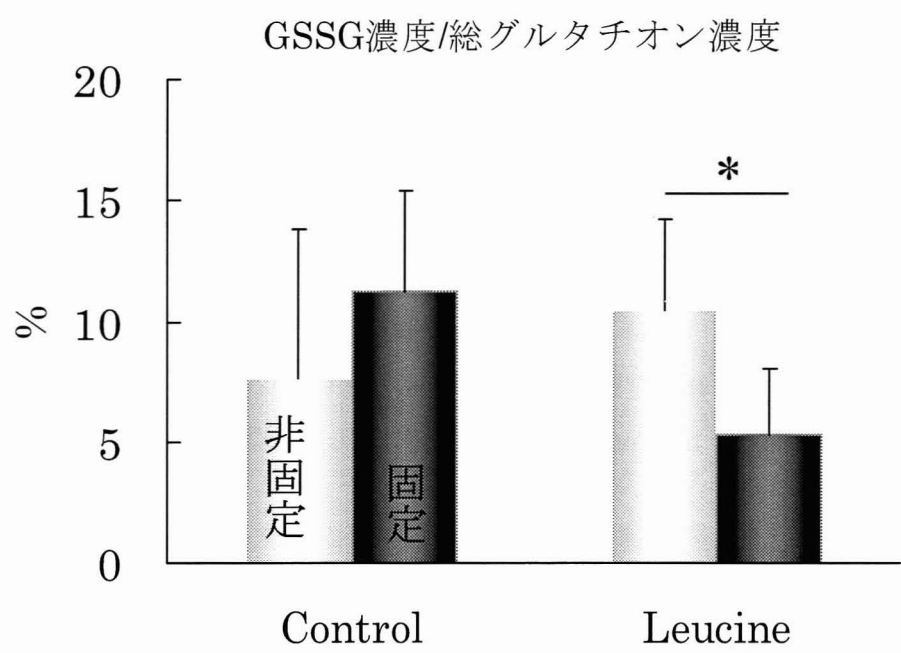
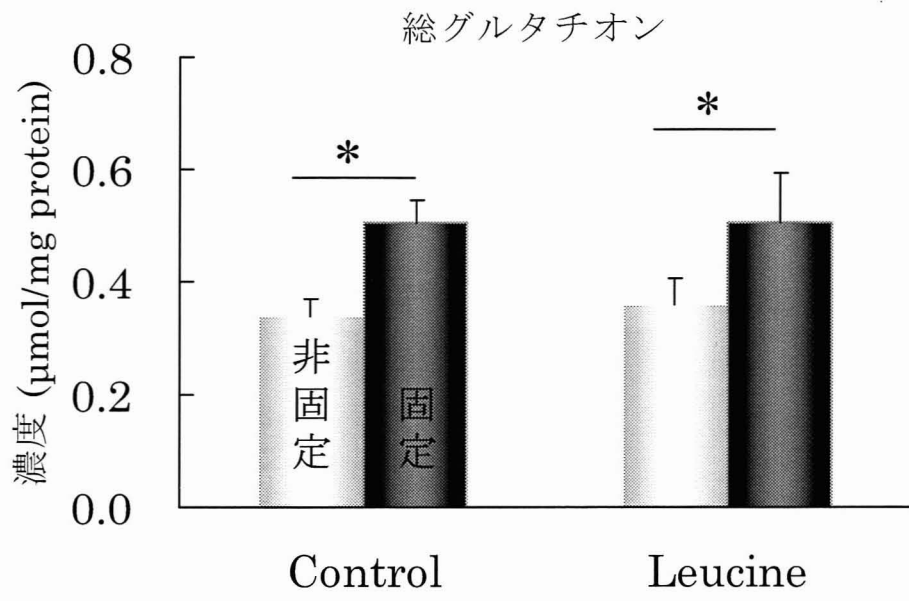


図3-5 腓腹筋中総グルタチオン濃度および総グルタチオン濃度に対するGSSG濃度の割合

値は、平均±標準誤差(各群 n=6) \* : 同群における固定肢、非固定肢間で有意差あり(p < 0.05)

(7) 骨格筋中の過酸化脂質(TBARS)量

実験1におけるギプスで固定した右後肢と非固定の左後肢の腓腹筋中の過酸化脂質(TBARS)量を図3-6に示す。Control群のギプスで固定した右後肢においてTBARS量が33%有意に増加した。Leucine群では固定肢、非固定肢間に差はなかったが、Control群と比較して固定肢、非固定肢ともに20~40%程有意にTBARS量が減少した。

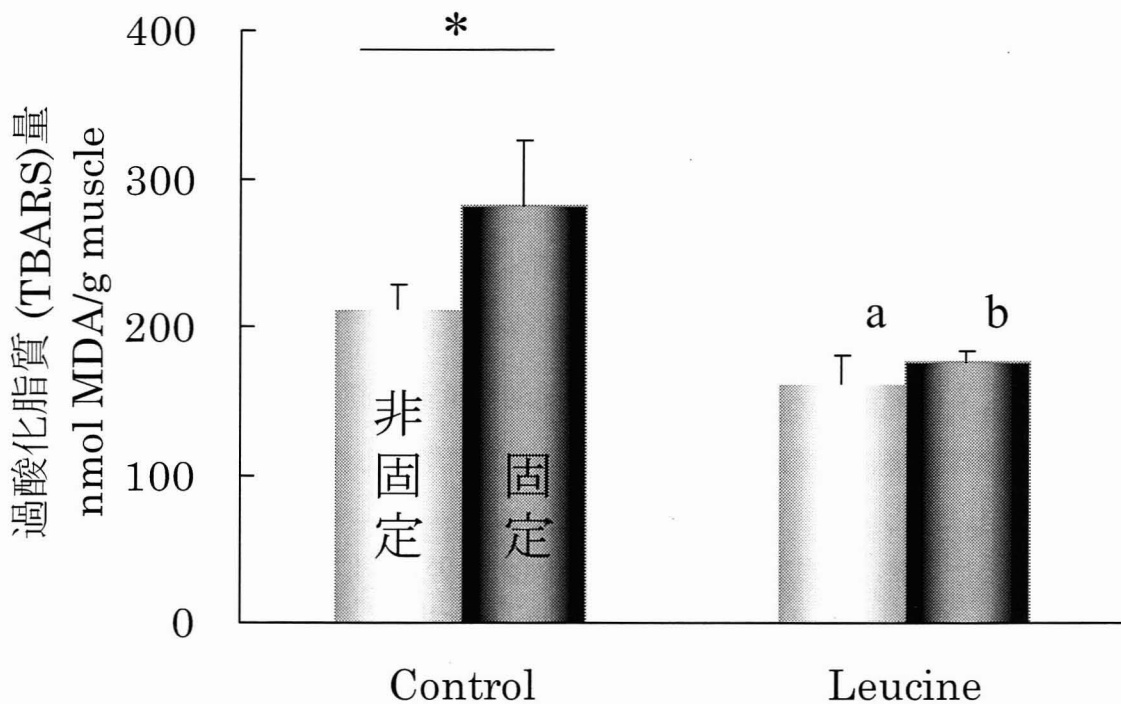


図3-6 腓腹筋中過酸化脂質(TBARS)量

値は、平均±標準誤差(各群 n=6) \* : 同群における固定肢、非固定肢間で有意差あり(p<0.05) a : Control群の非固定肢と比較して有意差あり(p<0.05) b : Control群の固定肢と比較して有意差あり(p<0.05)

(8) Atrogin-1 と MuRF1 の mRNA 発現

非固定肢における Atrogin-1 の mRNA 発現は Normal 群と比較して Leucine 群で 2.3 倍有意に増加した。MuRF1 の mRNA 発現は Normal 群、Control 群、Leucine で差は見られなかった。固定肢における Atrogin-1 の mRNA 発現は Normal 群と比較して Control 群で 9.9 倍有意に増加した。MuRF1 の mRNA 発現は Normal 群、Control 群、Leucine 群で差は見られなかった (図 3-7)。

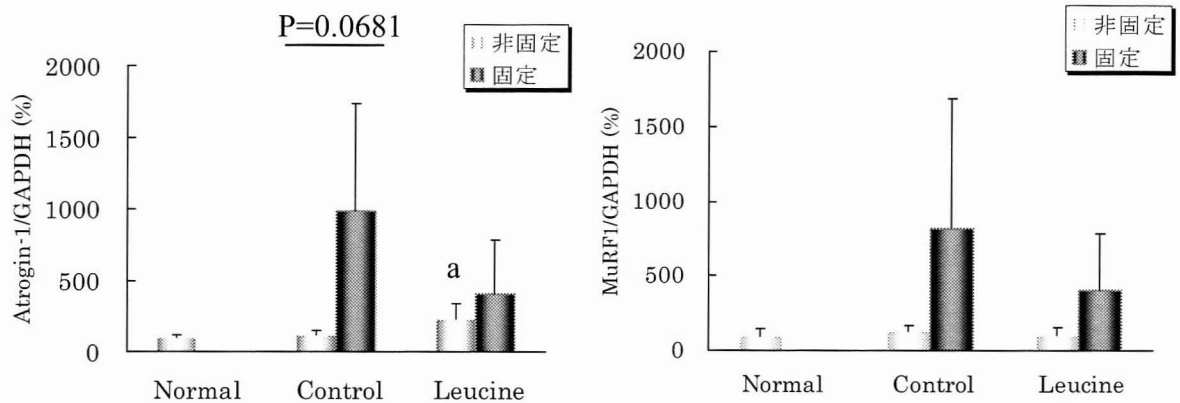


図 3-7 Atrogin-1、MuRF1 の発現

値は、平均±標準誤差(各群 n=5) GAPDH を内部標準として補正し、Normal 群を 100%として表した

\* : 同群における固定肢、非固定肢間で有意差あり ( $p < 0.05$ ) a : Normal 群、Control 群の非固定肢と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ ) b : Normal 群と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ )

### 3.3. 考察

本研究ではラットの右後肢にギプス固定を行うことで廃用性筋萎縮を誘導した。ギプス固定は1個体間で固定、非固定を比較することができ、個体差を無視することができる。本実験では Fischer 344 系の8週齢雌ラットを用いた。これは筋肉単離切片から MeHis を放出させるインキュベーションにおいて、小さすぎる、または大きすぎるラットでは筋肉単離切片から十分に MeHis を放出させることができないためである。また、ある程度の週齢でないとギプス固定による廃用性筋萎縮が顕著に見ることができないこともあり、成長の遅い Fischer 344 系の雌ラットを用いて実験を行った。

Leucine 群の飼料へのロイシン添加量は1%とした。もともと 1kg の AIN-93 M 組成 10%カゼイン飼料は 11g のロイシンを含有している。今回飼料に 1%ロイシンを添加したことで、Leucine 群の飼料は Control 群の飼料と比較して約2倍のロイシンを含有している。これ以上ロイシン添加量を多くした場合アミノ酸のインバランスを起こしてしまう可能性があるため、ロイシン添加量を1%として実験を行った。

ギプス固定によって筋湿重量が減少した原因としては、骨格筋タンパク質合成が低下し、分解が促進されたということが考えられる。骨格筋タンパク質合成については別の実験からギプス固定においては増加も減少もしないことが示されている。骨格筋タンパク質分解については、筋原繊維タンパク質分解の指標である MeHis 放出速度と骨格筋タンパク質分解の指標である Tyr 放出速度が固定を行った右後肢において有意に増加していた。このことから骨格筋タンパク質分解の増加が廃用性筋萎縮の一因であることが示唆される。

単離したヒラメ筋をリソソーム系阻害剤の入った緩衝液中でインキュベートし、MeHis 放出速度、Tyr 放出速度を測定したところ、リソソーム系阻害剤を添加したことで MeHis 放出速度が有意に減少した。Tyr 放出速度も Control 群においてはリソソーム系阻害剤を添加したことで有意に減少したが、MeHis 放出速度と比べ減少が少なかった。このことからギプス固定における骨格筋タンパク質分解にはユビキ

チン-プロテアソーム系だけではなくリソソーム系の関与もあると示唆される。しかし本実験においてリソソーム系が関与しているのは約 30%であることから、ギプス固定による筋萎縮には主にユビキチン-プロテアソーム系が働いていると示唆される。Atrogin-1 および MuRF-1 の発現もギプス固定により増加しているため、この系においてはユビキチン-プロテアソーム系が主に働いていると考えるのが妥当であろう。

しかし、本実験ではギプス固定により骨格筋中のユビキチン化タンパク質量は変化しなかった。しかし Ogawa ら (Muscle Nerve 34:463-469, 2006) が 20 日間健常者を寝たきりにさせることで廃用性筋萎縮を誘導した実験や、Ikemoto ら (Biol Chem 383:715-721, 2002) がラットに 3 週間宙吊りを施した実験においてはユビキチン化タンパク質の蓄積が増加することが示されており、本実験の結果とは異なる。この理由として考えられることは、本実験では 6 日間と短期間なためタンパク質のユビキチン化がそれほど促進されていない可能性があるということがあげられる。さらに廃用性筋萎縮のモデルの違いもあり、ギプス固定と宙吊りや寝たきり状態ではレスポンスの違いがある可能性も考えられる。

廃用性筋萎縮には酸化ストレスが関わっているということが知られている。Kondo ら (FEBS Lett 326:189-191, 1993) はラットに 1 週間ギプス固定を行うことで廃用性筋萎縮を誘導した。このとき抗酸化成分であるビタミン E を投与することで、酸化ストレスの指標である酸化型グルタチオン量が減少し、筋線維量が増加した。本実験においても 6 日間のギプス固定により酸化ストレスの指標となるタンパク質のカルボニル基量、酸化型グルタチオン濃度、TBARS が増加したことから、ギプス固定による廃用性筋萎縮には酸化ストレスが関与していることが示唆された。酸化ストレスが増加した原因のひとつとして、ギプス固定という行為自体がストレスとなったということが考えられる。

生物がストレスを受けると DNA が損傷する。さらに炎症性サイトカインや接着因子などに関する遺伝子の発現を調節する転写因子である NF- $\kappa$ B の生体内での増

加や、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、インターロイキン-6(IL-6)が産出し、アポトーシスの誘導に関する p38 MAPK や JNK が活性化されてアポトーシスが起ることが知られている。また、NF- $\kappa$ B が増加するとユビキチンリガーゼの発現が増加し、ユビキチン-プロテアソーム系が活性化されて筋萎縮が促進することも知られている。本実験においてもギプス固定自体がストレスとなり、炎症性サイトカインが体内で増加したことで酸化ストレスが増加した可能性がある。この酸化ストレスの増加によって筋萎縮がさらに促進されたとも考えられる。

本実験ではロイシンが酸化ストレスも抑制することが示されたが、ロイシン自体には抗酸化性はないので、直接、固定による酸化ストレスをロイシンが抑制したとは考えにくい。抗酸化成分（カテキンやビタミンE）に廃用性筋萎縮を低減させることが知られているが、ロイシンの効果はそれとは異なると考えられる。ロイシンにより抗酸化酵素の合成が促進され、その結果酸化ストレスが低減化した可能性もあるが、詳細な検討が必要である。

終わりに

本研究から、食餌タンパク質が不足しているような低栄養状態において、ロイシンの摂取が骨格筋タンパク質の分解を抑制することで、筋萎縮を減少させることが示された。低栄養状態では合成も低下しているが、ロイシンは合成速度そのものを増加させることはできなかった。Kimball や Yoshizawa のグループは数多くのロイシンを投与した実験から、ロイシンが翻訳段階の活性を増加させることで合成を促進することを示している。この結果は本研究と矛盾する。合成には翻訳段階の活性化が必要であるが、同時に素材となるアミノ酸の存在が必要である。このアミノ酸は食事から供給されるものと骨格筋タンパク質の分解によって供給されるものがある。食事からアミノ酸が供給されない場合は、骨格筋タンパク質の分解に依存することになるが、これだけでは十分な合成を確保することはできない。したがって、低タンパク質栄養条件下では分解速度が増加し、合成速度が低下する。ロイシンの投与は分解を、主にオートファジー-リソソーム系を抑制する。一方、合成もロイシンにより翻訳段階では促進されるが、ロイシンだけでは素材の供給は不十分であるので合成速度としては増加しないと考えられる。このような点から考えると、低栄養状態ではロイシンの効果は主として分解抑制により筋萎縮を防ぐというものである。また、低栄養状態でバランスの良いアミノ酸の投与ができれば合成速度も促進されると考えられる。

以上の結果からロイシンの骨格筋タンパク質の分解抑制が示されたが、この抑制効果の経時変化について検討を行った。ロイシンを6時間ごとにラットに投与すると、筋原線維タンパク質の分解は低レベルで維持された。一方、合成の指標として翻訳活性 (S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化) を測定すると、ロイシン投与直後の一過性の活性増加が6時間ごとに見られた。以上より、通常の食事の間隔である6時間ごとのロイシンの投与は、分解を持続的に低下させることで骨格筋の萎縮を抑制できる可能性が示唆された。また、このような系においても合成と分解の異なるレスポンスが萎縮の抑制に関与していることが明らかになった。

骨格筋の萎縮は低栄養だけではなく、加齢や非運動 (廃用性) の萎縮があり、疾病とも関係して重要な問題である。本研究からギプス固定モデルによる廃用性筋萎縮において、ロイシンの投与が効果的であることが示され、この場合も分解による制御が重要であることが明らかになった。また、このモデルではオートファジー-リソソーム系よりむしろユビキチン-プロテアソーム系にロイシンが作用したと考えられ、ストレスの違いでロイシンの作用部位が異なることが示唆された。

以上の研究結果から、ストレスに対するロイシンの骨格筋タンパク質の合成と分解のレスポンスは異なり、今まで考えられてきた以上に分解の制御が重要であることが明らかになった。また、ロイシンの分解系への作用もストレスにより異なり、画一的なメカニズムではないことが示唆された。このような観点から、ロイシンなどのアミノ酸のサプリメントは加齢、疾病、非運動などのストレス時に筋萎縮抑制を可能にすると考えられ、今後臨床的な確認が必要であろう。