

食餌アミノ酸による骨格筋タンパク質の
合成と分解の制御に関する研究

2009

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)

菅原 貴征

目次

第1章 緒論	— 1
第2章 骨格筋タンパク質の合成速度測定法の検討	
第1節 目的	— 10
第2節 方法	— 12
1. 精製法の検討	
2. 測定方法の検討	
3. 統計処理	
第3節 結果	— 17
1. 精製法の確認	
2. GC-MSによる検出結果	
3. 合成速度測定法の検討	
第4節 考察	— 23
第3章 ロイシンの継続摂取による、若齢ラットと成熟ラットの骨格筋タンパク質の合成速度と分解速度の変化	
第1節 目的	— 24
第2節 方法	— 26
1 動物実験	
実験 1. 若齢ラットにおけるロイシンの継続摂取の効果	

実験 2. 成熟ラットにおけるロイシンの継続摂取の効果

2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法
3. 骨格筋タンパク質の合成速度測定方法
4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度測定方法
5. 血漿中のインスリン濃度
6. 統計処理

第 3 節 結果

— 36

実験 1 若齢ラットにおけるロイシンの効果

1. 筋重量の変化
2. 筋原線維タンパク質の分解速度
3. 骨格筋タンパク質の合成速度
4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度
5. 血漿中のインスリン濃度

実験 2. 成熟ラットにおけるロイシンの効果

1. 筋重量の変化
2. 筋原線維タンパク質の分解速度
3. 骨格筋タンパク質の合成速度
4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

第 4 節 考察

— 42

第 4 章 低タンパク質食の摂食における筋原線維タンパク質
分解への影響

第 1 節 目的

— 45

第 2 節 方法

— 46

1. 動物実験

実験 1. 若齢ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

実験 2. 成熟ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法

3. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の測定方法

4. 統計処理

第 3 節 結果

— 49

実験 1. 若齢ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

1. 筋原線維タンパク質の分解速度

2. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

実験 2. 成熟ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

1. 筋原線維タンパク質の分解速度

2. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

第 4 節 考察

— 52

第 5 章 ロイシンの摂食による筋原線維タンパク質分解抑制
メカニズムの検討

第 1 節 目的

— 54

第 2 節 方法

— 56

1. 動物実験

2. カルパイン活性の測定方法

3. プロテアソーム活性の測定方法

4. ユビキチンリガーゼの遺伝子発現の検出

5. LC3 の検出方法

6. 統計処理

第3節 結果 — 72

- 1 カルパイン活性
- 2 プロテアソーム活性
- 3 ユビキチンリガーゼの遺伝子発現
- 4 LC3 の発現

第4節 考察 — 78

第6章 低温状態における骨格筋タンパク質の合成と分解の
変化

第1節 目的 — 83

第2節 方法 — 86

1. 動物実験
2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法
3. 骨格筋タンパク質の合成速度測定方法
4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の測定方法
5. 血漿中のインスリン濃度の測定方法
6. ユビキチンリガーゼの遺伝子発現の検出
7. S6K1 の検出方法
8. 4E-BP1 の検出方法
9. 統計処理

第3節 結果 — 93

1. 体重と筋重量の変化

2. 筋原線維タンパク質の分解速度	
3. 骨格筋タンパク質の合成速度	
4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度	
5. 血漿中のインスリン濃度	
6. ユビキチンリガーゼ遺伝子発現	
7. S6K1 の発現	
8. 4E-BP1 の発現	
第4節 考察	— 101
第7章 敗血症におけるロイシンの筋萎縮改善効果	
第1節 目的	— 103
第2節 方法	— 104
1. 動物実験	
2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法	
3. 統計処理	
第3節 結果	— 106
・筋原線維タンパク質の分解速度	
第4節 考察	— 107
第8章 総合考察	— 109
要約	— 119

謝辞

— 121

引用文献

— 122

第1章 緒論

長生きをすることは人類の永遠の願いである。ただしそれは「健康な状態である」ということが絶対条件にあり、不健康なまま長生きすることを願う者はいない。寝たきりのままで生きていくことは、本人はもちろん苦しいだろうが、周りで介護する人間にも負担がかかり、さらに医療費高騰の原因ともなるため社会的な問題になる。医学医術の進歩や公衆衛生の向上などにより、人間の平均寿命は急速に高くなった。現在の日本人の平均寿命は世界第一位で男性は78歳、女性は85歳である。現在も高齢者数は年々増加しており、2015年には65歳以上の人口が3188万人、高齢化率が25.2%となり、人口の4分の1を占めると予想されている。国際的に見ても、わが国の高齢化率は2025年にかけて世界最高の水準に達すると予測されている [1]。

高齢化社会を向かえるにあたって、日常生活に介護を必要としない、自立した活動的な状態である期間として、健康寿命という概念が考えられている。生活の質 (Quality of life、QOL) の観点から考えれば、心身に障害のない自立した人生を送るか、あるいは疾病や障害を抱え介護を必要とする人生を送るかは、大きく異なる。したがって、健康で自立して長生きできれば、より充実した人生を送ることができると考えられる。健康であり続けるためには福祉などの充実が重要ではあるが、健康な状態を自分自身で作りあげる必要がある。そのためには日々の食事や運動に留意することが重要であると考えられる。加齢にともない疾病が増加するが、「第六次改定日本人の栄養所要量」にも示されているとおり、生活習慣病にならないような食生活と習慣の実践が必要である [2]。

高いQOLを維持し健康寿命を延ばしていくためには、寝たきりにならずに活動し、体を満足に動かせることが重要であり、十分な社会活動が可能であることが必要である。そのためには筋肉量を高く維持することが重要であり、日々の食事や運動に気をつける必要がある。しかし、老化は体力や、筋肉の量と強さの低下をもたらすことが知られており、歩行困難、慢性的な腰痛、あるいは骨折の危険性など問題を引き起こすきっかけとなりやすい [3, 4]。したがって、筋肉量を増やすような

運動を高齢者に強いることは極めて難しいと考えられる。そこで、高齢者にとっては、食事の内容や習慣を見直すことによる食餌療法を考えた方がよいと考えられる。食餌療法は投薬療法に比べ副作用が少なく、経済的にも高齢者に負担のかからない治療法であると考えられる。さらに最近では、生活習慣病患者数は増加する傾向にあり [5]、その予防や改善が重要となっている。昨今の健康ブームの中、食品の一次機能（栄養）、二次機能（嗜好性）よりも三次機能（体調調節）に関心が集まっており、生活習慣病の予防や改善に注目した特定保健用食品が注目されている。食事は特別な疾病を持っている場合を除いて、毎日の生活の中で必ずと言ってよいほど行われている習慣である。したがって、食品やその食品成分によって疾病の予防や改善が可能であれば日々の生活の中で健康を保つことができると考えられる。特に高齢者は活動が低下し食事量も少なくなるため低栄養状態になりやすく、食事内容に特に注意する必要があると示唆される。

老化は、神経や筋肉の変質や、成長ホルモン、インスリンなどのような同化ホルモンの分泌の減少により、骨格筋タンパク質の代謝回転が遅くなり、かつ骨格筋タンパク質の合成よりも分解が上回ることから、筋肉の量と強さの低下をもたらすと考えられている [6, 7]。骨格筋は体重の約 40%を占める最大の組織であり [8]、運動組織としての役割はもちろん、その量の多さから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ち、活発な代謝を行っていると考えられる [9]。

筋肉量の減少、虚弱化（サルコペニア）は、いくつかの疾病によっても起こることも知られている [10]。骨格筋タンパク質の量を低下させる原因として、ガン [11, 12]、糖尿病 [13-16]、敗血症 [17-19]、腎臓病 [20, 21]、外傷 [22]、アシドーシス [23, 24]、火傷 [25, 26] などの疾病や、無重力状態 [27-29] がある。また、低栄養状態においても減少することが知られており、絶食、低タンパク質、無タンパク質食の摂食 [30-34]、アミノ酸スコアが低いタンパク質の摂食 [35] によっても減少する。老化や疾病と骨格筋タンパク質の減少の関係は明らかになりつつあるものの、骨格筋量を維持、増加するための対策は研究が十分ではない。骨格筋タンパク質の減少を日常の食事ですべて予防できれば、自然で生理的な治療法と考えられる。したがって、より効率的に骨格筋量の維持を目指すため、食品中のどの栄養素に改善効

果があるのか、また体内でどのような作用を示すのかを明らかにすることが重要である。寝たきりにならないためにも骨格筋量の維持というのは必須の条件であり、筋肉量を維持することは QOL を向上させるためにも非常に重要なことである。

筋肉量、筋力を維持するためには骨格筋タンパク質の量の維持が重要である。骨格筋タンパク質量は、タンパク質の合成と分解とのバランスで決まっているので [36]、骨格筋量を維持、増加させるためには、骨格筋タンパク質の合成を促進させることと、分解を抑制することの両方が重要である。タンパク質の合成を促進するものとしては運動 [37, 38]、成長ホルモン [39] やインスリン [40, 41]、Insulin like growth factor- I (IGF- I) [39, 42] がある。また、食餌タンパク質の摂取 [43]、いくつかのアミノ酸 [44-47] によっても促進することが知られており、そのメカニズムについても多くの研究が報告されている。一方、骨格筋タンパク質の分解については研究報告が少ない。

食餌摂取による骨格筋タンパク質分解抑制機構の解明が、合成に比べて遅れている原因の一つとして測定法の問題がある。骨格筋タンパク質分解速度の測定の場合、ラベルしたアミノ酸を取り込んだタンパク質からの、ラベルアミノ酸の放出速度から分解速度を求める方法がある。また、生体の各臓器を 1 つの箱と考えた数学的解析モデル (コンパートメントモデル) から分解速度を評価する方法がある。しかし、ラベルしたアミノ酸はタンパク質合成に再利用されるため、分解速度は過小評価されてしまうことから、正確な分解速度は評価できない。また、コンパートメントモデルは仮定に基づく式が多いため、誤差が大きくなると考えられる。さらに、これらの方法は簡便な方法ではなく、一定期間内の平均分解速度しか評価できないため、短時間におけるタンパク質分解を評価できない。ラベルアミノ酸を利用しない骨格筋タンパク質分解の測定方法として、 N^{ϵ} -メチルヒスチジン (3-メチルヒスチジン: 以下 MeHis と略す) を利用した方法がある。MeHis は骨格筋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ているアミノ酸である。MeHis は、タンパク質合成されたあとのミオシン、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て生成する物質である。ミオシン、アクチンの分解後は対応する tRNA が存在しないため、タンパク

質の合成に再利用されず、一部がアセチル化の反応を受け、ヒトやラットでは定量的に尿中に排泄される [2, 48]。Nishizawa ら [49, 50] は、ラット体内の 90%の MeHis が骨格筋に、5%は皮膚、2%は消化管の平滑筋に存在することを示し、尿中に排泄される 3-MeHis の少なくとも 16.6%が、骨格筋以外の MeHis 由来であることを明らかにした。Nagasawa and Funabiki [51] は、ラットの MeHis の存在量と分解比速度の積から、尿中の MeHis の 75.6%が骨格筋に由来し、24.4%は、別の組織に由来するものであることを示した。したがってラットでは、尿中の MeHis には消化管の平滑筋や皮膚など筋原線維以外のタンパク質由来のものが若干存在するものの、75%以上が筋原線維タンパク質由来のものであり、筋原線維タンパク質分解速度を反映していることが示唆された。しかし、尿中の MeHis を使った方法では短い時間単位での分解速度を測定することは難しい。Nagasawa ら [31] は血漿中の MeHis、単離筋肉から放出された MeHis も筋原線維タンパク質分解速度の指標となることを示し、短時間での分解速度の変化を測定することを可能にした。

骨格筋タンパク質の分解経路については主に 3 つの系が考えられており、カルパイン [52]、プロテアソーム系 [53]、そしてリソソーム系 [54] が考えられている。筋萎縮改善効果を持つ栄養素を人間に実際に摂食させることを考えた場合、その栄養素の安全性を確認することが必須である。そのためには、骨格筋タンパク質の分解経路をより詳細に解明し、どのようなメカニズムで抑制効果を示すのかを調べる必要があると考えられる。

リソソーム系は、細胞内の小器官であるリソソーム内の酵素、カテプシンによって分解される系であり、小胞体に由来する二重膜が、細胞構成成分を取り込み、オートファゴソームを形成し、次いでオートファゴソーム内の酸性化が起こり、さらに、加水分解酵素、カテプシンなどを含むリソソームがオートファゴソームと融合し、オートリソソームとなり、タンパク質が分解される系である [54] (Fig. 1-1)。長寿命タンパク質はリソソーム系の分解経路で分解されるといわれており [55]、筋原線維タンパク質のように代謝速度の遅いタンパク質はリソソーム系により分解される可能性がある。

カルパインは、カルシウムにより活性化され、カルシウムの濃度によってそれぞれ

れ感受性が異なる μ -カルパインと m -カルパインが存在する [56]。また、細胞内にはカルパインの内因性のインヒビターであるカルパスタチンが存在し、カルパインはカルシウムイオンとカルパスタチンにより活性が調節されている [57]。カルパインの基質特異性は非常に高く、カゼインの他、細胞骨格タンパク質、膜タンパク質を主に分解すると考えられている [58]。骨格筋に関しては、筋原線維タンパク質を構成する、サルコメアを区切っている Z 帯のタイチンの分解に関与していることが知られている [59-61]。

ユビキチン-プロテアソーム系は、ATP 依存的にユビキチン化したタンパク質を分解する 26S プロテアソームによる分解と、ATP 非依存的に分解する 20S プロテアソームによる分解に分けられる。26S プロテアソームは、20S プロテアソームの両端に制御サブユニットが結合したもので、この結合には ATP を必要とする。この経路の第 1 段階は、基質になるタンパク質にユビキチンが結合することから始まる。次に、タンパク質と結合したユビキチンがポリユビキチン化し、このポリユビキチンを 26S プロテアソームの制御サブユニットが認識して、ATP 依存的に分解する。このとき、ユビキチン化に必要であるユビキチン活性化酵素 (ubiquitin-activating enzyme E1)、ユビキチン結合酵素 (ubiquitin-conjugating enzyme E2)、ユビキチンリガーゼ (ubiquitin ligase E3) が働き、タンパク質と結合したユビキチンがポリユビキチン化する [62] (Fig. 1-2)。

Nagasawa ら [63] は、18 時間絶食させたラットに、アミノ酸 (ロイシン、リジン、メチオニン) を投与し、単離筋肉切片をインキュベーションした緩衝液中にリソソーム系またはカルパインの阻害剤を加えて行った実験より、アミノ酸による筋原線維タンパク質の分解抑制において、プロテアソーム系の関与が薄いことを示唆した。また、腓腹筋中の遊離ミオシン重鎖量に変化がなかったことから、カルパインの関与も低いことを示唆した。以上より、食餌タンパク質あるいはアミノ酸による分解抑制効果は、リソソーム系が阻害されることによるものであると考えられる。しかし、Nakashima ら [64] は、ロイシンによる分解抑制効果は、プロテアソーム系の関与が強いことが示唆し、Hamel [65] らも、いくつかのアミノ酸がプロテアソーム系を阻害すると報告している。このように、栄養成分による、筋原線維タン

パク質分解抑制効果のメカニズムは、未だに不明な点が多い。

筋肉量は骨格筋タンパク質の合成と分解のバランスで決まっているため、筋萎縮を予防するためには、分解だけでなく合成についても検討する必要がある。Yoshizawa ら [45, 46] は、食餌タンパク質やロイシンの摂取により、骨格筋タンパク質の合成が促進することを示唆している。また、Kimball ら [66] も、ロイシンを摂取することにより、骨格筋タンパク質の合成が活性化されることを示している。しかしこれらの効果は、長時間の絶食の後に食餌タンパク質やロイシンを大量摂取したことによる結果であり、自由摂食における効果は不明である。菅原 [67] は、無タンパク質食に 1.5% のロイシンを添加した飼料を摂食させ、翻訳活性因子である S6K1 と 4E-BP1 のリン酸化に差がないことから、ロイシンの自由摂食では合成の促進は生じないことを示唆した。しかし、翻訳活性因子が変化していなくても合成の速度が変化している可能性が考えられ、より詳細に検討する必要がある。

そこで本研究では、上記に示したさまざまな問題を解決することを目的とし、研究を進めた。

まず第2章では、骨格筋タンパク質の合成速度の測定法を検討した。骨格筋タンパク質の量は、タンパク質の合成と分解のバランスで決まっているので、骨格筋タンパク質の量の変化を正確に把握するためには、骨格筋タンパク質の分解と合成の速度の変化を測定する必要がある。体タンパク質の合成速度を測定する方法として、コンパートメントモデルを応用した測定法と、ラベルしたアミノ酸を投与して、その取り込みから評価する方法があるが、本研究に相応しい合成速度の測定法の確立を目的とした。

第3章では、ロイシンの継続摂取による、骨格筋タンパク質の合成速度と分解速度の変化を調べた。ロイシンは、分解速度に関しては顕著に抑制されることが報告されているが、合成速度を合わせて測定した報告は少ない。そこで、第2章で確立した合成速度測定法を利用して、ロイシンによる筋萎縮改善効果を分解速度と合成速度の両者の変化から検討した。

第4章では、食餌タンパク質の含有量が異なる飼料の継続摂取による、骨格筋タ

ンパク質の分解速度の変化を調べた。第3章では無タンパク質食にロイシンを与えて実験を行っているので窒素含有量が異なっている。そのため、ロイシンの効果なのか窒素量の違いによる効果なのかは不明である。また、週齢の違いによって、タンパク質栄養における代謝応答が異なるかどうかを検討するため、低タンパク質食として5%カゼイン食（窒素含有量が3章で用いたロイシン食よりも多い）を動物に与え、筋原線維タンパク質分解速度の変化について検討した。

第5章では、ロイシンの摂食による筋原線維タンパク質の分解抑制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には主に、カルパイン、プロテアソーム系、リソソーム系が関わっていると考えられおり、カルパインとプロテアソームの酵素活性、代表的なユビキチンリガーゼである、Atrogin-1 と MuRF1 の遺伝子発現、さらにオートファジーのマーカータンパクである LC3 の発現の変化を調べ、ロイシンの摂取による各種タンパク質分解系の変化を検討した。

第6章では栄養条件以外で骨格筋量の変化に関与するものを検討し、低温に注目して骨格筋タンパク質の代謝の変化を調べた。なお、低温による骨格筋タンパク質代謝の変化の研究は、岩手大学 21 世紀 COE プログラム「熱-生命システム相関学拠点創生」の一環として行ったものである。

第7章では疾病モデルとして敗血症を動物に誘導し、ロイシンによる分解抑制効果がみられるかを検討した。細菌内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) をラットに投与して敗血症を誘導させ、ロイシン添加食の継続的な摂取により筋原線維タンパク質の分解を抑制できるかを検討した。

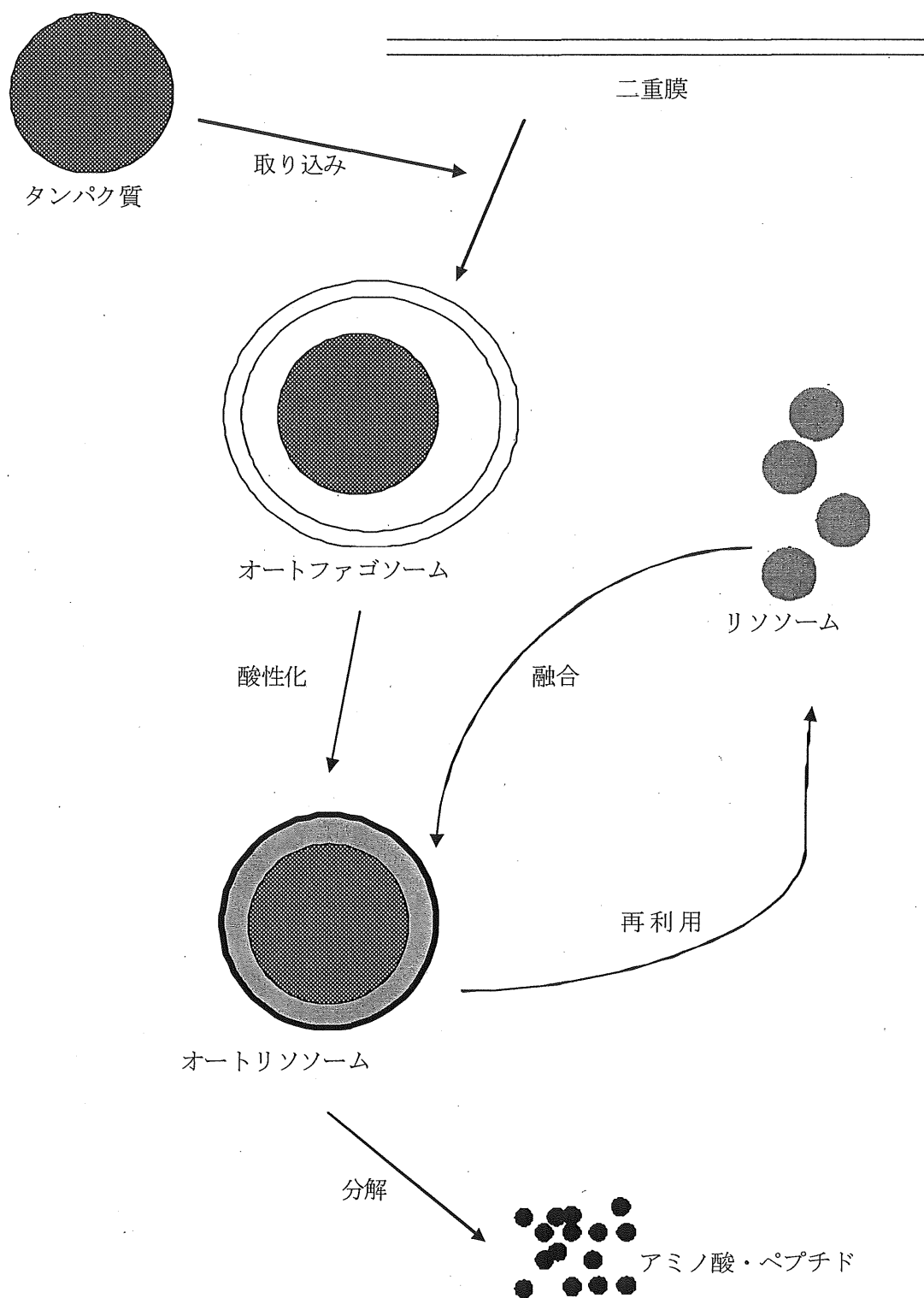


Fig. 1-1 オートファジー・リソソーム系の概略図

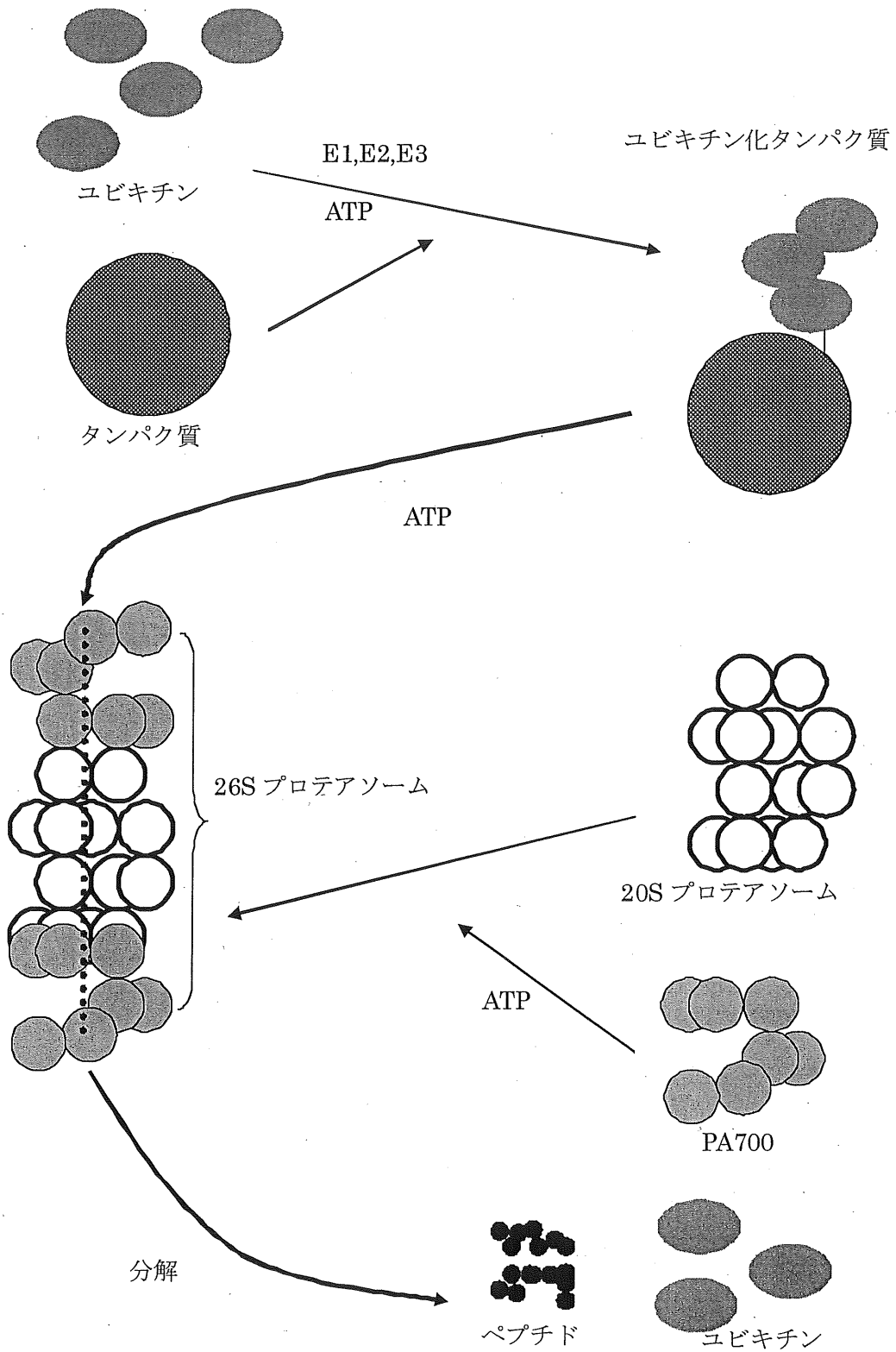


Fig. 1-2 ユビキチン・プロテアソーム系の概略図

第2章 骨格筋タンパク質の合成速度測定法の検討

第1節 目的

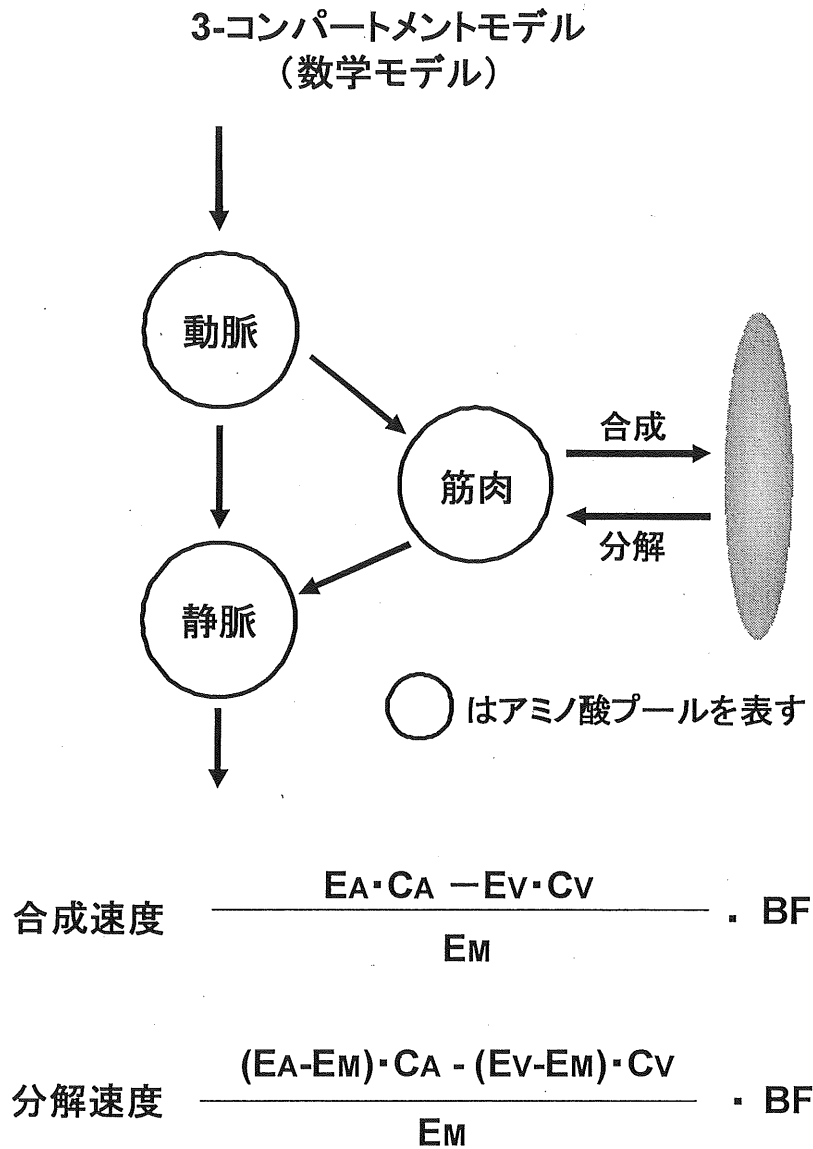
骨格筋タンパク質の量は、タンパク質の合成と分解のバランスで決まっている。筋萎縮を予防、改善するためには、骨格筋タンパク質の合成を促進することと、分解を抑制することの両方が重要である。骨格筋タンパク質の増減を正確に把握するためには、分解速度だけでなく合成速度を測定する必要があると考えられる。

体タンパク質の合成速度を測定する方法として、コンパートメントモデルを応用した測定法と、ラベルしたアミノ酸を投与して、その取り込みから評価する方法がある。コンパートメントとは、移動や代謝の速度論的行動を等しくする物質の集合であり、合成の場における物質の移動は、各コンパートメントのアミノ酸プール(タンパク質合成の前駆体となる)の数学的モデルから評価することができる [68]。コンパートメントモデルのうち、3-コンパートメントモデル法は、同じパラメータで合成速度だけでなく、分解速度も同時に測定することができるという利点がある (Fig. 2-1)。したがって、3-コンパートメントモデル法は、同条件で両者の速度を測定することができるので、合成と分解のバランスの変化を評価する方法としては優れた方法であると考えられる。

ラベルアミノ酸を投与する方法には、大量投与法と定速注入法がある。大量投与法は短時間でのタンパク質合成の変化をみることができるという利点があるが、一度に大量のアミノ酸を投与することにより、そのアミノ酸が合成速度に影響を与える可能性を否定できないという欠点がある。また、定速注入法は大量投与法とは違い、投与したアミノ酸が合成速度に与える影響は少ないが、短時間での合成速度の変化をみることができないという欠点がある [69]。

前章で説明したように MeHis を用いたいくつかの方法では、短時間での分解速度の変化を測定することが可能である。そこで、合成も同様に短時間での速度の変化を測定するため、大量投与法を用いて合成速度を評価することにした。一般的に3-コンパートメントモデル法は、定速注入法でラベルアミノ酸を投与するが、本章

では、大量投与法が3-コンパートメントモデル法に応用できるかを確認し、合成速度の測定法の確立を目的とした。



NB : net balance **C** : concentration
E : enrichment (tracer-tracee ratio) **BF** : blood flow
A : artery **V** : vein **M** : muscle

Fig. 2-1 3-コンパートメントモデルによる、骨格筋タンパク質の合成速度と分解速度の計算方法 [70]

第2節 方法

1. 精製法の検討

(1) サンプルの精製方法

【試薬】

- ・ 3.5% 過塩素酸水溶液：
- ・ 4M アンモニア：25%アンモニア水を3倍に希釈した。
(25%アンモニア水の規定は約13である。アンモニア水は吸水しやすいことを考慮し、実際には少し濃いものを用いている)
- ・ *N*-tert-Butyl-dimethyl-silyl-Trifluoro-acetamide (MTBSTFA 試薬)
(PIERCE、USA)

【方法】

カラムにゲルを0.5 mL入れて、十分にカラムを純水で洗浄したあと、サンプルを100 μ L入れ、5 mLの純水で洗浄した。その後、4Mアンモニアを2 mL、さらに純水1 mLを加えて、溶出液を回収した。そのうち600 μ Lを、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回収率の確認、あるいはGC-MS測定用のサンプルとした。

上記の方法で検出できるかを確認するため、フェニルアラニンを用いて、カラムを通したサンプルと通していないサンプルを用意し、トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法とHPLCを用いて測定を行い、カラム精製による回収率を確認した。

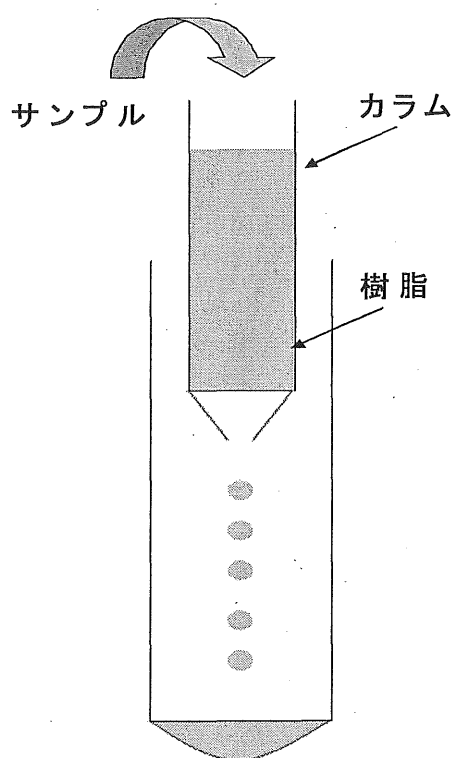


Fig. 2-2 GC-MS による、フェニルアラニンの検出

(2) TNBS 法

【試薬】

- ・ TNBS溶液：亜硫酸ナトリウム25.2 mg、トリニトロベンゼンスルホン酸を20 mg を純水に溶解し、40 mLにした。
- ・ 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5)

【方法】

サンプル 0.5 mL に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 2 mL と TNBS 溶液 1 mL を加え、37°C で 2h 保温し、420 nm の光吸度を測定した。

(3) HPLC 法

【試薬】

- ・ 70 %過塩素酸
- ・ OPA試薬： *o*-フタルアルデヒド 25 mgを試験管にとり、メタノール0.5 mLを加え溶解し、これに、1.5 mLの0.2 Mホウ酸緩衝液 (pH 12.0) と2-メルカプトエタノール25 μ Lを加え攪拌し、アルミホイルで遮光保存した。
- ・ 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.0)
- ・ 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)
- ・ 80% (8:2) アセトニトリル溶液

【方法】

フェニルアラニンの定量には、アミノ酸の *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。

調製した試料100 μ LにOPA試薬25 μ Lを素早く加え攪拌し、HPLCに5 μ L注入した。ポンプはPU-2089 (日本分光株式会社、東京) 検出はFP-920 (日本分光株式会社、東京) を使用した。カラムはLiChrospher 100RP-18e4 \times 250mm (5 μ m) (Merck, Germany) を使用した。カラム温度は40 $^{\circ}$ C、検出波長は励起波長340nm、蛍光波長455nmとした。移動相の流速は1.5 mL/min、80%アセトニトリル溶液と50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を、測定開始時は6.3 : 93.7で送液し、5分までに30 : 70の割合まで、20分までの間に46 : 54まで80%アセトニトリル溶液の割合を増加させた。標準液はL-フェニルアラニン (特級、和光純薬工業、大阪) を2.05 nmol/mLになるように溶解したものをを用いた。

2. 測定方法の検討

(1) 動物実験

血漿、筋肉中の遊離フェニルアラニン、あるいは同位体の enrichment を GC-MS で検出できるか確認するため、フェニルアラニンの同位体を動物に大量投与して検

討した。

実験動物として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。ケタラル(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188 μ L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 μ molのL-[²H₅]-フェニルアラニン(28.4 mg/mL)(Cambridge Isotope Lab、USA)を尾静脈より投与した。L-[²H₅]-フェニルアラニンの投与30~40分後、静脈血を大腿静脈から、動脈血を腹大動脈から採血し屠殺した。その後、即座に腓腹筋を摘出した。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。

(2) 3-コンパートメントモデル法の検討

3-コンパートメントモデル法で合成速度を評価するためには、動脈血、静脈血、筋肉中の遊離のフェニルアラニンの濃度、enrichmentの値が必要であるので、これらの測定が可能であるかを確認した。

【試薬】

- ・ 70% 過塩素酸
- ・ アセトニトリル (LC/MS 用)

【方法】

血漿100 μ Lに70%過塩素酸を5 μ L加えてよく混合し、4 $^{\circ}$ Cで1時間放置した。8,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで20分間遠心分離し、上清全てをサンプルとした。また、腓腹筋100mgに10倍量の純水を加え、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、70%過塩素酸を50 μ L加え4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。8,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで20分遠心分離し、上清全てをサンプルとした。

陽イオン交換樹脂(200-400 mesh DOWEX 50W-X8、Bio-Rad、USA)をイオン交

換用カラム（ムロマックカラム、室町工業(株)、東京）に 0.5 mL 入れ、10 mL 程度の純水で洗浄後、サンプルを入れて 5 mL の純水で洗浄した。その後、4M アンモニア 1 mL×2、純水 1 mL×1 で溶出した。溶出したサンプルのうち 600 μ L を、濃硫酸と五酸化二リンが入ったデシケータ内で一晚乾燥させた。乾燥したサンプルを 25 μ L のアセトニトリル (LC/MS 用) で溶解し、MTBSTFA 試薬を 25 μ L 加え 80°C で 20 分間加熱し、誘導体化した。

測定は GC-MS (QP2010 : 島津製作所 : 京都) で行った。GC の条件は 150 °C で 6 分保持後、1 分ごとに 35 °C 上昇させた。L-フェニルアラニンは $m/z = 336$ 、L-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニンは $m/z = 341$ のピークを解析した [71]。

3. 統計処理

本実験で測定して得られたデータの計算および整理には、Microsoft の Excel 2003 を使用した。

第3節 結果

1. 精製法の確認

TNBS法で検討したところ、フェニルアラニンの回収率が110%となっており、カラムから何かアミノ基を含む物質が溶出していると考えられたので、HPLCを用いてフェニルアラニンの回収率を算出することにした。また、カラムにサンプルを加えずに、同様の行程で得られた溶出液をHPLCで測定したところ、フェニルアラニンは検出されなかった。実際の血中のフェニルアラニンの濃度は1 μM 以下であるので問題なく測定できると考えられる (Fig. 2-3)。

HPLCを用いて算出した回収率は96%程度で、ほぼ全て回収することができた。また、4Mアンモニアの量を2 mLから3 mLに増やしても回収率は上昇しなかった。

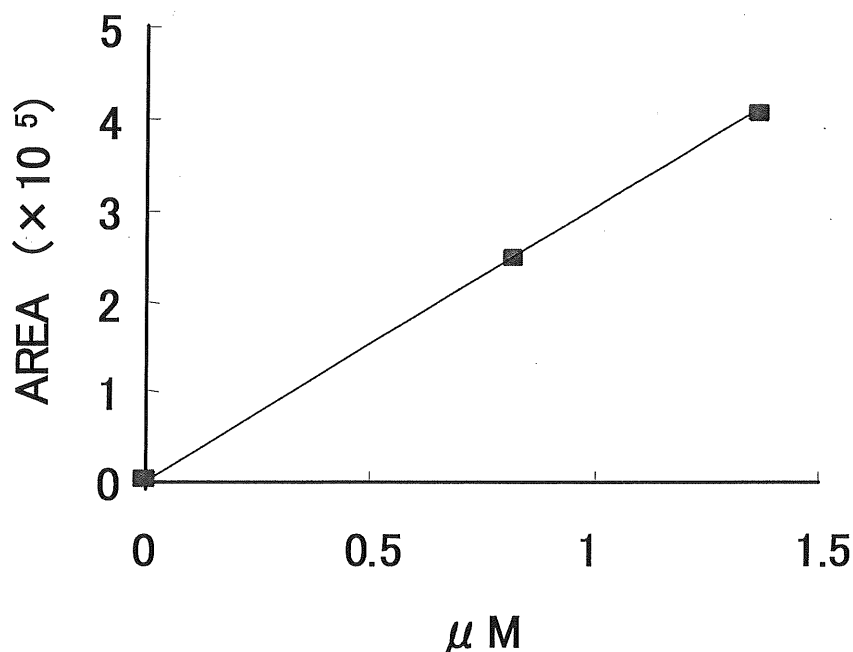


Fig. 2-3 HPLCによる、フェニルアラニンの検出

2. GC-MS による検出結果

(1) L-フェニルアラニンの検出結果

L-フェニルアラニンの誘導体を GC-MS により検出した。L-フェニルアラニンの誘導体は 10 分程度で検出された。MS で $m/z = 336$ のピークが確認され (Fig. 2-4 上)、ピーク周辺に $m/z = 336$ の物質は他に検出されず、測定を妨げるようなことはなかった (Fig. 2-4 下)。

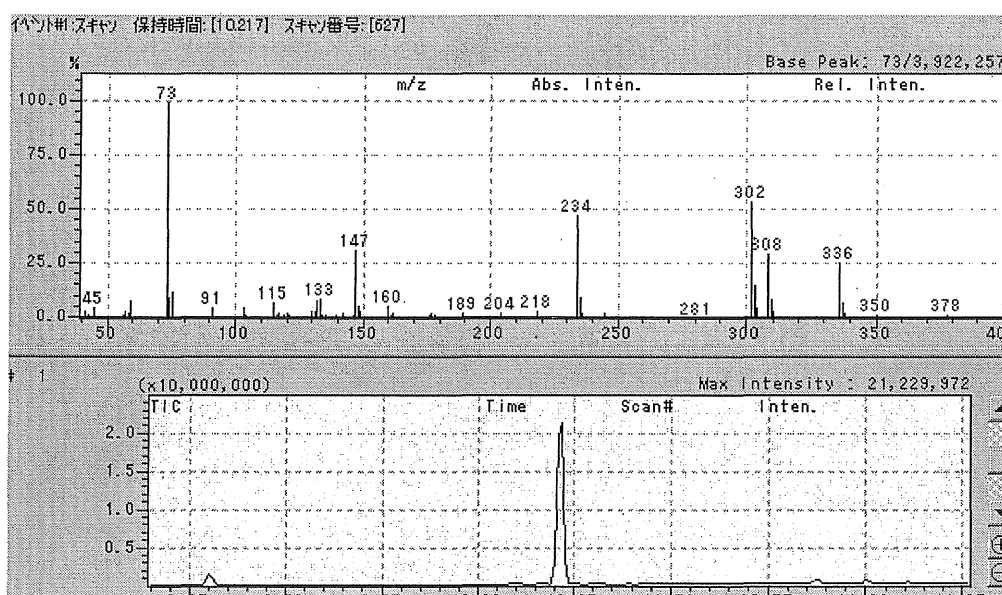


Fig. 2-4 GC-MS による、フェニルアラニンの検出

(2) L-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニンの検出結果

L-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニンの誘導体を GC-MS により検出した。L-フェニルアラニンと同様に 10 分程度で検出された (L-フェニルアラニンよりも少し遅れて検出された)。MS で $m/z = 341$ (Fig. 2-5 上) のピークが確認され、ピーク周辺に $m/z = 341$ の物質は他に検出されなかった (Fig. 2-5 下)。

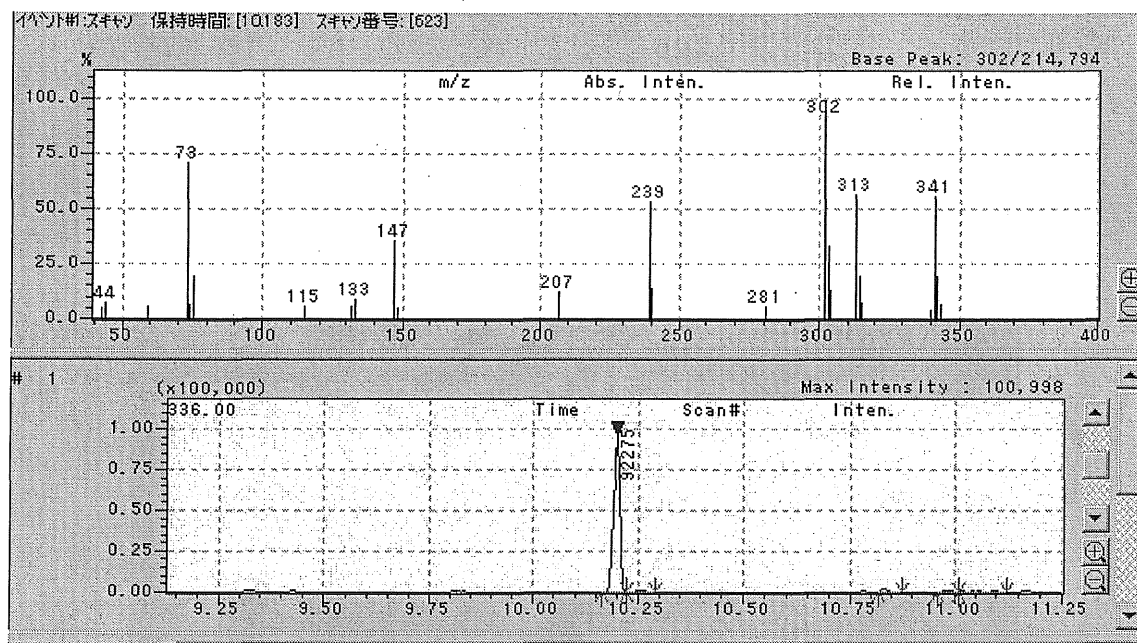


Fig. 2-5 GC-MS による、L-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニンの検出

(3) 血漿中のL-フェニルアラニンの検出結果

血漿中には検出目的とする物質以外にも様々な物質が含まれている。L-フェニルアラニンを検出するために、カラムの精製条件、GC-MS の条件に問題が無いかを確認した。L-フェニルアラニンの誘導体は10分程度で検出された。GCでの分離状態も問題なかった (Fig. 2-6 上)。また、MSで $m/z = 336$ のピークが確認され (Fig. 2-6 中)、ピーク周辺に $m/z = 336$ である物質は他に検出されなかった (Fig. 2-6 下)。

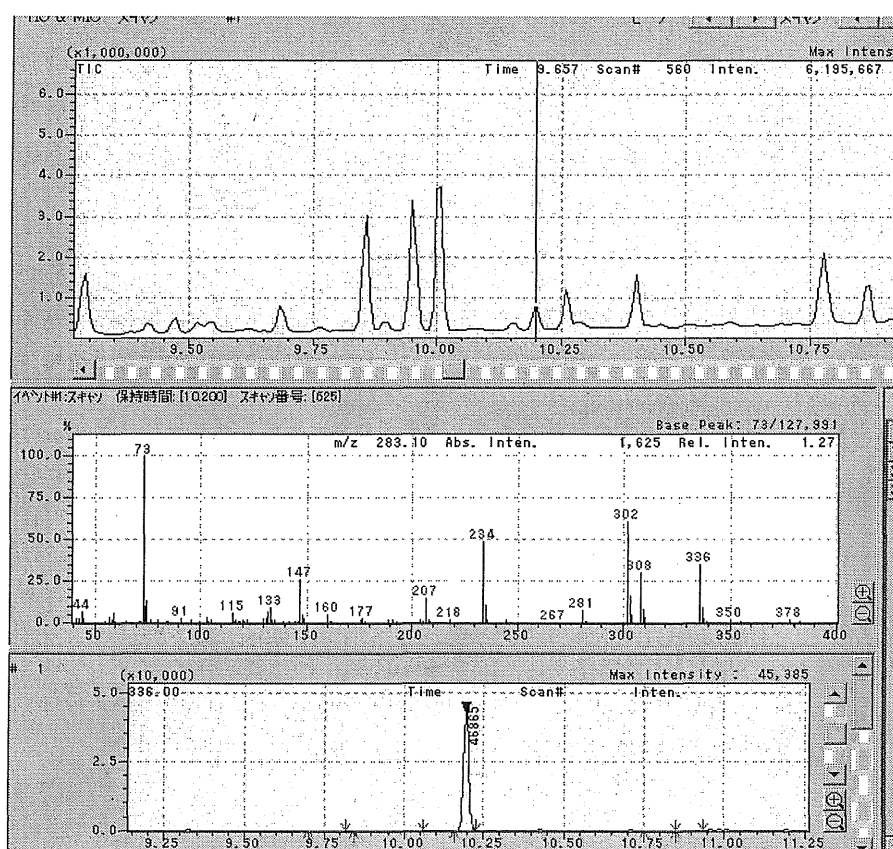


Fig. 2-6 GC-MSによる、血漿中のL-フェニルアラニンの検出

(4) 筋肉中の遊離 L-フェニルアラニンの検出結果

筋肉中には検出目的とする物質以外にも様々な物質が含まれている。L-フェニルアラニンを検出するために、カラムの精製条件、GC-MS の条件に問題が無いかを確認した。

L-フェニルアラニンの誘導体は 10 分程度で検出された。血漿に比べてやや分離が悪かったが GC での検出は問題なかった (Fig. 2-7 上)。また、MS で $m/z = 336$ のピークが確認され (Fig. 2-7 中)、ピーク周辺に $m/z = 336$ である物質は他に検出されなかった (Fig. 2-7 下)。したがって、GC において多少分離が悪いのは問題ないと考えられる。

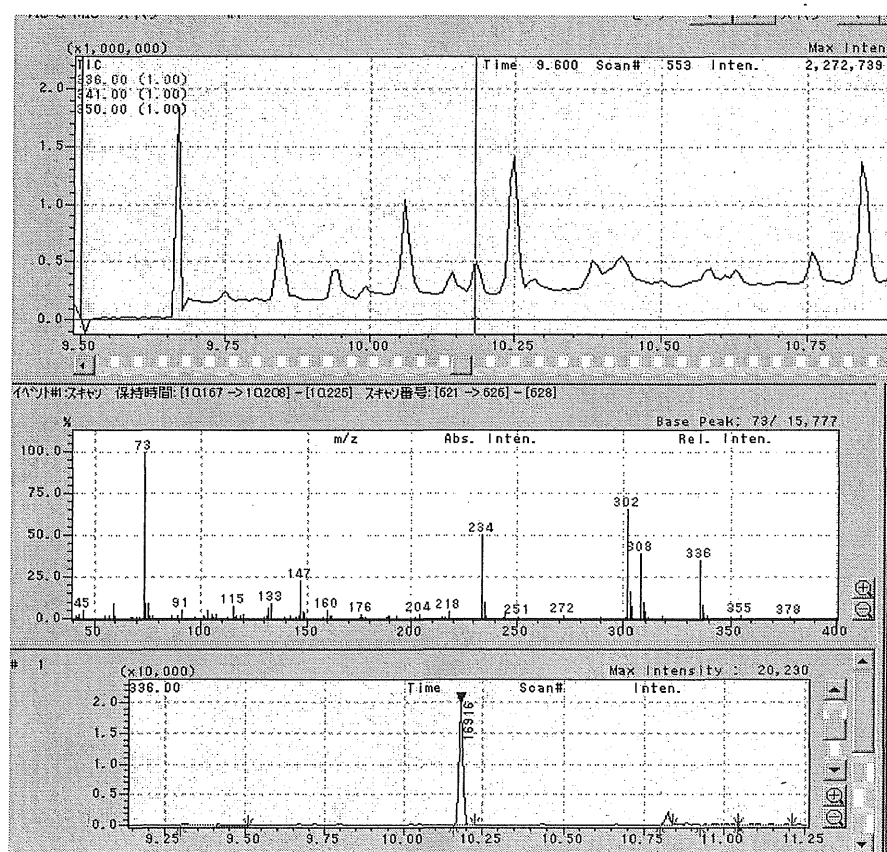


Fig. 2-7 GC-MS による、腓腹筋中の遊離 L-フェニルアラニンの検出

3. 合成速度測定法の検討

動脈、静脈血を測定した段階で、10匹中全てのラットにおいて、 $EA \cdot CA - EV \cdot CV$ の値が負になってしまい (-0.59 ± 0.18)、合成速度を評価することが不可能であることが確認された。したがって、本実験系では大量投与法を3-コンパートメントモデル法に応用できないと示唆された。したがって、以後の実験ではFSRを用いて合成速度を評価することにした。

第4節 考察

本章では骨格筋タンパク質の合成速度の測定法を検討するため、大量投与法を3-コンパートメントモデル法に応用できるかを確認した。3-コンパートメントモデル法は、合成速度だけでなく分解速度も同じパラメータ (Fig. 2-1) で測定できるため、両者のバランスを評価する方法として優れている方法だと考えられている。私は、まず合成速度を測定する方法として、3-コンパートメントモデル法を利用しようと考えた。

本章において、大量投与法で3-コンパートメントモデル法を検討した結果、フェニルアラニンの濃度と enrichment が、動脈よりも静脈の値の方が高くなってしまった。この結果を3-コンパートメントモデル法の合成速度算出のための式 (Fig. 2-1) に当てはめると合成速度が負になってしまい、合成速度を正しく評価できないことが示された。この原因は、尾静脈から投与した安定同位体が、動脈に十分に循環していなかったためであると考えられる。今回の実験では、投与後30-40分で血液と筋肉を採取したが、たとえば投与後1、2時間後に採取をしていれば動脈に十分に循環していた可能性がある。しかし、投与後1時間以上時間が経ってしまうと同位体の tracer:tracee ratio が一定で無くなってしまおうと考えられ [72]、動脈に十分に同位体が循環するころには、合成速度を正しく評価できなくなってしまうと示唆される。したがって、大量投与法では3-コンパートメントモデル法への応用が不可能であると考えられた。

本研究の以後の実験では、合成速度は、大量投与法により Fractional synthesis rate (FSR) を測定して評価することにした。FSRは、合成速度の指標としてよく測定されているものである。分解速度は従来どおり MeHis を用いた方法で測定することにした。

第3章 ロイシンの継続摂取による、若齢ラットと成熟ラットの骨格筋タンパク質の合成速度と分解速度の変化

第1節 目的

加齢や疾病により、筋肉の萎縮が進行することが知られている。また、アレルギーや腎臓病などのように、タンパク質を多く摂食できないような場合、低栄養状態となるため筋萎縮が亢進する。

筋萎縮を抑制するためには、骨格筋タンパク質の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。いくつかのアミノ酸はタンパク質合成を促進することが知られており、特にロイシンの摂取はタンパク質の翻訳段階に関わる因子である mTOR や 4E-BP1、S6K1 を活性化させ、骨格筋タンパク質の合成を促進させることが示唆されている [73]。しかし、菅原 [67] は、無タンパク質食の摂食時に、ロイシンを 1.5% 添加した食餌の摂取により S6K1、4E-BP1 のリン酸化には変化が無いことから、骨格筋タンパク質合成の活性が起こっていないことを示唆した。しかし、タンパク質の翻訳段階で活性がみられなかったとしても、合成の速度自体は上昇している可能性があり、より詳細に合成を評価するためには、その速度を測定する必要があると考えられる。

一方、分解に関しては、合成のように材料（タンパク質構成成分としてのアミノ酸）を必要としないので、タンパク質の材料となる 20 種類のアミノ酸全てを摂取しなくても、特定のアミノ酸を摂食することで骨格筋タンパク質の分解を抑えることができ、実際に筋肉量の減少を防ぐことができ、筋萎縮を改善できると考えられる。もし、単独のアミノ酸を添加した食餌の摂取を続けることによって、十分なタンパク質を含む食餌と同程度の筋萎縮抑制効果があるならば、タンパク質を多く摂食できないような状態であっても、筋肉量の増加はないにしろ、少なくとも減少だけは抑えられると考えられる。

本章では、無タンパク質食摂食時におけるロイシンの継続摂取による効果を、骨格筋タンパク質の合成と分解の両方の側面から速度を測定して検討した。また、週

齢の差異によってロイシンの効果が異なるかどうかを検討した。

合成速度は前章で検討した腓腹筋の FSR を測定して評価した。合成速度の測定は週齢の違いに関わらず測定が可能である。しかし、分解速度の測定法においては、成熟ラットにおいて問題点が存在する。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 MeHis の放出速度を測定する方法があるが [74]、この方法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、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という特徴がある。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 MeHis からは評価できない。そこで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 [75]。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。

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

成熟ラットにおける分解速度は、この動静脈濃度差法を MeHis に応用して測定した。

第2節 方法

1. 動物実験

実験1. 若齢ラットにおけるロイシンの継続摂取の効果

実験動物として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1、2日目に固形飼料(日本クレア株式会社)、を与え、その後、AIN-93G組成に基づいた20%カゼイン飼料(20C)を7日間自由摂取させた。

平均体重がほぼ等しくなるように2群に分け、1群には無タンパク質飼料(PF)を、もう1群には無タンパク質飼料に1.5%のロイシンを添加した飼料(Leu)(Table 3-1)を摂食させた。添加したロイシンの量は、20Cに含まれるロイシン量に相当するようにした。群分け後7日間自由摂食させ、屠殺した。ロイシン添加食の摂食量は無タンパク質食よりも減少してしまうため、ペアフェッドを行った。

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 $188\ \mu\text{L}$ 腹腔内投与してラットを麻酔した。麻酔が効いてきたら、骨格筋タンパク質の合成速度を測定するために、体重100gあたり $50\ \mu\text{mol}$ のL-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニン($28.4\ \text{mg}/\text{mL}$)を尾静脈より投与した。L-[$^2\text{H}_5$]-フェニルアラニンの投与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。即座に長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を摘出した。長指伸筋は骨格筋タンパク質の分解速度の測定に、腓腹筋は合成速度の測定に使用した。血液は、 $3,000\times\text{g}$ 、 4°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°C で保存した。

実験2. 成熟ラットにおけるロイシンの継続摂取の効果

実験動物として9週齢のWistar系雄ラット(約200g、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±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。飼料は 2 日間、固形飼料（日本クレア株式会社）を与え、その後、20C を 5 日間自由摂取させた。

平均体重がほぼ等しくなるように 2 群に分け、1 群には無タンパク質飼料（PF）を、もう 1 群には無タンパク質飼料に 1.5%のロイシンを添加した飼料（Leu）（Table 3-1）を摂食させた。添加したロイシンの量は、20C に含まれるロイシン量に相当するようにした。群分け後 7 日間自由摂食させ、屠殺した。

解剖日は、ケタラル（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、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、骨格筋タンパク質の合成速度を測定するために、体重 100 g あたり 50 μ mol の L-[²H₅]-フェニルアラニン（28.4 mg / mL）を尾静脈より投与した。また、筋原線維タンパク質の分解速度を測定するため、L-[²H₅]-フェニルアラニンの投与から約 20 分後に、動静脈濃度差法による手術を行った。動静脈濃度差法については、以下の「2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法 (2) 成熟ラットにおける分解速度測定法（実験 2）」で詳しく述べる。L-[²H₅]-フェニルアラニンの投与 30~40 分後、ラットを屠殺し、即座に長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を摘出した。腓腹筋は合成速度の測定に使用した。血液は、3,000 ×g、4 °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°C で保存した。

2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法

(1) 若齢ラットにおける分解速度測定法（実験 1）

筋原線維タンパク質分解速度を測定するため、長指伸筋をインキュベーションした緩衝液中の MeHis 濃度を測定した。インキュベーションに多く用いられる単離筋肉切片には赤筋であるヒラメ筋と、白筋である長指伸筋の 2 種類がある。これまでの研究により長指伸筋は、ヒラメ筋に比べ食餌摂取によるタンパク質分解抑制応答がより顕著にあらわれること [76] が示されており、本実験では長指伸筋を筋原線維タンパク質分解速度の評価に用いた。MeHis は筋原線維の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、筋原線維タンパク質が分解された後、タンパク質の生合成に再利用されず、筋肉から放出されるため、筋原線維タンパク質分解の指標となっている。長指伸筋のインキュベーションは次のようにして行った。

摘出した右足の長指伸筋を恒温槽 (タイテック、埼玉) を用いて37°Cに保温しておいたKRB緩衝液 (Table 3-2) 2 mLに素早く浸し、MeHis放出が安定するまで30分間のプレインキュベーションを行った。プレインキュベーション開始15分後に95% O₂ - 5% CO₂を通気し、30分後に筋肉を新たな緩衝液2 mLに即座に移し変え95% O₂ - 5% CO₂を通気し、さらに2時間のインキュベーションを行なった。インキュベーションの間、緩衝液中には15分おきに95% O₂ - 5% CO₂を通気した。2時間のインキュベーション終了後、筋肉を緩衝液中から取り出し、重量を測定した。緩衝液は分析するまで - 80°Cで凍結保存した。筋原線維タンパク質分解速度を測定するため、長指伸筋をインキュベーションした緩衝液中のMeHis濃度を測定した。MeHisの定量は、MeHisの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 [77] により行った。

【試薬】

- ・ 70%過塩素酸
- ・ 0.4Mホウ酸緩衝液 (pH 12.2)
- ・ 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 をアセトニトリル1 mLに素早く溶解した。
- ・ 0.5M 3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS、同仁化学研究所株式会社、熊本) / 3M水酸化ナトリウム
- ・ 20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)
- ・ 80% (8:2) アセトニトリル溶液
- ・ 5.53 μMヒスチジノール (Sigma, USA) 溶液

【方法】

長指伸筋をインキュベーションした緩衝液140 μL に5.53 μM ヒスチジノール溶液を8 μL と70%過塩素酸を4 μL 加え、よく混合した後、8,000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ で15分間遠心分離した。その上清100 μL をフタ付き試験管 (16 \times 100m/m) にとり、0.4 Mホウ酸緩衝液125 μL を加え、フルオレスカミン溶液100 μL をボルテックスミキサーで攪拌しながら加えた。5分間暗所で放置した後、70%過塩素酸10 μL を加え、80 $^{\circ}\text{C}$ で1時間加熱した。加熱後、室温まで冷却し、0.5 M MOPS / 3 M水酸化ナトリウム50 μL を加え、HPLCに10 μL 注入した。

ポンプはLC10ATV、オートサンプラーはSIL-10ADVP、検出は分光蛍光検出器FP-10AXL (以上、島津製作所、京都) を使用した。標準液は、3-メチル-L-ヒスチジン (Sigma) を322 pmol/mLに溶解したものをを用い、MeHisとヒスチジノールそれぞれのピーク面積の比から試料中のMeHis濃度を算出した。クロマトグラムのデータ解析にはCLASS 10 (島津製作所) を用いた。カラムはMightysil RP-18 GP 250 \times 4.6 mm (5 μm) を、ガードカラムはMightysil RP-18 GP 5 \times 4.6 mm (5 μm) (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。

(2) 成熟ラットにおける分解速度測定法 (実験 2)

体重 100g を越した大きいラットの単離筋では、緩衝液に触れる面積が小さくなってしまうため、インキュベーションを用いた分解速度測定法は利用することができない。そこで実験 2 では、動静脈濃度差法により筋原線維タンパク質の分解速度を評価した。解剖手順を以下に説明する。

・ 動静脈濃度差法

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 1.88 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、腹壁動静脈を縫合糸 (絹製縫合糸、夏目製作所、東京) で上下 2 箇所を結紮し、切断した。次に大腿動静脈を露出させ、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 26G の針で、筋肉層を通して大腿静脈に刺入し、約 0.5 mL 採血し、即座にヘパリン処理した 22G の針を用いて、腹大動脈より 1mL 程度採血した。

筋原線維タンパク質の分解速度を評価するため、動脈血、静脈血のそれぞれの血漿中の MeHis 濃度を測定し、静脈血と動脈血の差 (動静脈差、静脈-動脈) に血流量を乗じ、筋肉の MeHis の動態をみた。血漿中の 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。試薬として次のものを用いた。

【試薬】

- 20 % (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA、生化学用)
- ジエチルエーテル
- 濃塩酸
- 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.0)
- OPA 試薬 : *o*-フタルアルデヒド (生化学用) 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 (pH 12.0) を1.5 mL、2-メルカプトエタノール 25 μ Lを加えて攪拌し、アルミホイルで試験管を包んで遮光保存した。

- 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)

【方法】

血漿 100 μ Lに、氷冷した 20 % TCA 100 μ Lを加えてよく混合し、4 $^{\circ}$ Cで1晩放置した。翌日、8,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離し、上清 100 μ Lをフタ付試験管 (16 \times 100m/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、振とう機 (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 \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、上層のジエチルエーテルをパスツールピペットで除いた。このジエチルエーテルを用いた TCA 抽出は3回行い、最終的に残った微量のジエチルエーテルデシケーターにかけて気化させ、五酸化二リン(和光一級、和光純薬工業、大阪)の入ったデシケーター内で一晩減圧乾燥させた。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 [76]、乾燥した試料に純水 100 μ Lと濃塩酸 100 μ Lを加え、110 $^{\circ}$ Cで2時間加水分解し、脱アセチル化した。最後に、試料を五酸化二リンと水酸化ナトリウム (特級、和光純薬工業、大阪) の入ったデシケーター内で減圧乾燥させた。

乾燥した試料に純水 100 μ Lを加えて溶解し、その溶液 50 μ Lに OPA 試薬 25 μ Lを加え、HPLCに5 μ L注入した。ポンプは PU-2089 (日本分光株式会社、東京)、カラムは LiChrospher 100RP-18e4 \times 250mm (5 μ m) (Merck、Germany) を使用した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、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 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 (pH 5.0) を 11.2 : 88.8 の比率で混合したものを用い 15分送液し、15.1分から23分まで 80% アセトニトリル溶液を送液した。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。

Table 3-1 飼料組成

	PF	Leu	20C
α-コーンスターチ	732.5	717.5	529.5
カゼイン	0	0	200
ショ糖	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

Table 3-2 Krebs - Ringer 重炭酸緩衝液の作り方 (KRB緩衝液) : pH 7.4

1.	310mM NaCl	50 mL
2.	26mM Glucose	50 mL
3.	155mM KCl	4 mL
4.	110mM CaCl ₂ · 2H ₂ O	3 mL
5.	155mM MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL
6.	155mM KH ₂ PO ₄	1 mL
7.	155mM NaHCO ₃	21 mL

1~7を順番に混合し、シクロヘキシミド (SIGMA, USA) を、0.5mM (18.3mg) になるように直接加えた後、95%O₂-5%CO₂を30分間通気し、pHを7.4に調整した。

3. 骨格筋タンパク質の合成速度測定方法

本研究では、無タンパク質摂食時におけるロイシンの継続摂食が、骨格筋タンパク質の合成速度に影響を与えるかを検討するため、ラベルしたフェニルアラニンの大量投与法により Fractional synthesis rate (FSR) を測定した。

用いた試薬は、第2章-第2節-(1)と同様である。

【方法】

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×g、4 °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 1 mL 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（上清は捨てた）。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、濃塩酸 300 μL、純水 300 μL を加え 110 °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 1 mL 加え溶解した。上清サンプルは全量を、沈殿サンプルは 100 μL を、陽イオン交換樹脂 (200-400 mesh DOWEX 50W-X8、Bio-Rad、USA) で精製した。

陽イオン交換樹脂をイオン交換用カラム（ムロマックカラム、室町工業㈱、東京）に 0.5 mL 入れ、10 mL 程度の純水で洗浄後、サンプルを入れ、5 mL の純水で洗浄した。その後、4M のアンモニアを 1 mL×2、純水 1 mL×1 で溶出した。溶出したサンプルの内 600 μL を、濃硫酸と五酸化二リンが入ったデシケータ内で一晩乾燥させた。乾燥したサンプルを 25 μL のアセトニトリルで溶解し、MTBSTFA 試薬（PIERCE、USA）を 25 μL 加え 80°C で 20 分間加熱し、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-[$^2\text{H}_5$]-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。グラフのデータは1日あたりの値で表した。

4. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度測定方法

無タンパク質摂食時におけるロイシンの継続摂取により、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。血漿中の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。

【試薬】

- ・ 70 %過塩素酸
- ・ OPA試薬： o-フタルアルデヒド 25 mgを試験管にとり、メタノール0.5 mLを加え溶解し、これに、1.5 mLの0.2 Mホウ酸緩衝液 (pH 12.0) と2-メルカプトエタノール25 μL を加え攪拌し、アルミホイルで遮光保存した。
- ・ 0.2 Mホウ酸緩衝液 (pH 12.0)
- ・ 50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)
- ・ 80% (8:2) アセトニトリル溶液

【方法】

血清100 μL に70%過塩素酸 5 μL を加えよく攪拌した。4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間放置した後、8,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で15分間遠心分離した。上清はこの状態では分岐鎖アミノ酸濃度が高すぎるため、純水で200倍希釈したものを試料とした。調製した試料100 μL にOPA試薬25 μL を素早く加え攪拌し、HPLCに5 μL 注入した。ポンプはPU-2089 (日本分光株式会社、東京) 検出はFP-920 (日本分光株式会社、東京) を使用した。カラムはLiChrospher 100RP-18e4 \times 250 mm (5 μm) (Merck, Germany) を使用した。カラム温度は40 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長は励起波長340 nm、蛍光波長455 nmとした。移動相の流速は1.5 mL/min、80%アセトニトリル溶液と50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を、測定開始時は6.3 : 93.7で送液し、5分までに31.3 : 68.7の割合まで、20分までの

間に43.8 : 56.2まで80%アセトニトリル溶液の割合を増加させた。標準液は、ロイシン（試薬特級、ナカライテスク、京都）、イソロイシン（試薬特級、ナカライテスク、京都）、バリン（試薬特級、ナカライテスク、京都）をそれぞれ0.625 nmol/mLになるように溶解したものをを用いた。

5. 血漿中のインスリン濃度

無タンパク質摂食時におけるロイシンの継続摂取において、血漿インスリン濃度がどのように変化するかを検討した。なお、インスリン濃度の測定は、実験1の若齢ラットにおいてのみ測定した。

血漿インスリン濃度の変化を検討するため、酵素標識抗体測定法（ELISA法）を用いた、モリナガインスリン測定キット（株式会社森永生科学研究所、横浜）により測定した。

6. 統計処理

本実験で測定して得られたデータの計算および整理には、Microsoft の Excel 2003 を使用した。また、結果は平均値と標準誤差で示した。異なる群間で有意差があるかどうかを検討するために、GraphPad InStat Software Ver.2.03 (USA)を使用し、Student *t* test によって有意差判定をした。

第3節 結果

実験1. 若齢ラットにおけるロイシンの効果

(1) 筋重量の変化

ロイシン添加食 (Leu) の摂食により、無タンパク質食 (PF) の摂食と比較して、長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋において、体重あたりの筋重量が有意に上昇した。したがって、無タンパク質摂食による筋重量の減少が、ロイシンの添加により抑制されていると考えられる (Fig. 3-1)。

(2) 筋原線維タンパク質の分解速度

ロイシン添加食 (Leu) の摂食により、無タンパク質食 (PF) の摂食と比較して。長指伸筋の KRB 緩衝液への MeHis の放出速度が 25%程度有意に減少した。したがって、ロイシンの添加により、筋原線維タンパク質の分解速度が減少していることが示唆された (Fig. 3-2 (A))。

(3) 骨格筋タンパク質の合成速度

腓腹筋の FSR は 2 群間で変化はみられなかった。したがって、ロイシンの添加による合成速度の上昇は起こらなかったと考えられる (Fig. 3-2 (B))。

(4) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度は、バリンの濃度がロイシン添加食 (Leu) の摂食により、無タンパク質摂食群 (PF) と比較して若干減少する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。イソロイシン、ロイシンにも大きな変化はみられなかった。(Fig. 3-3)

(5) 血漿中のインスリン濃度

血漿中のインスリン濃度は、2 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 3-4)。

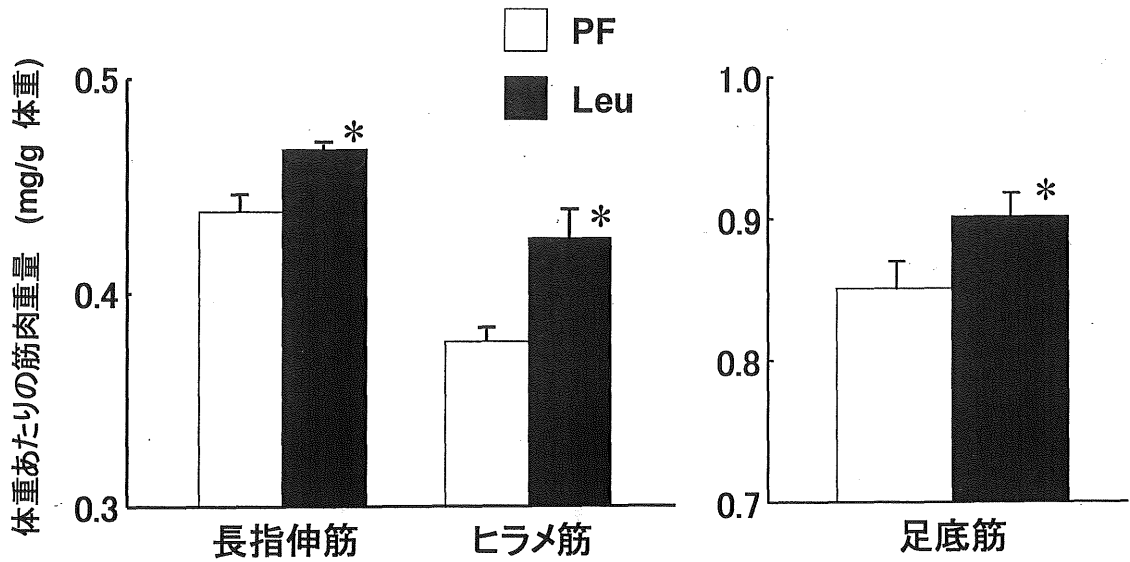


Fig. 3-1 若齢ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、体重あたりの筋重量の変化
値は、平均±標準誤差 (n=5)。PF群に対する有意差 * : $p < 0.05$

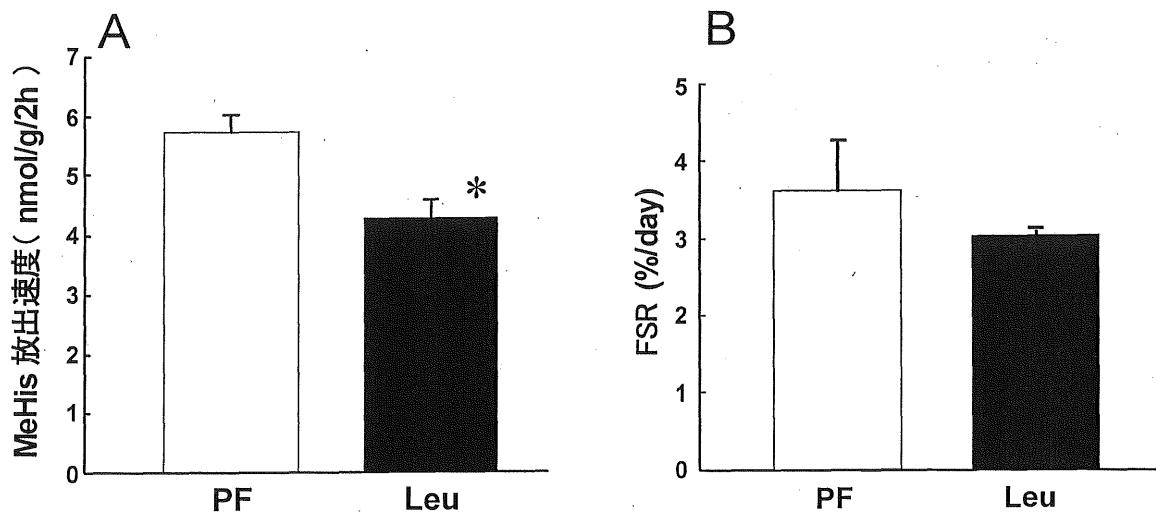


Fig. 3-2 若齢ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、長指伸筋からの MeHis 放出速度 (A) と FSR (B) の変化
値は、平均±標準誤差 (n=5)。PF群に対する有意差 * : $p < 0.05$

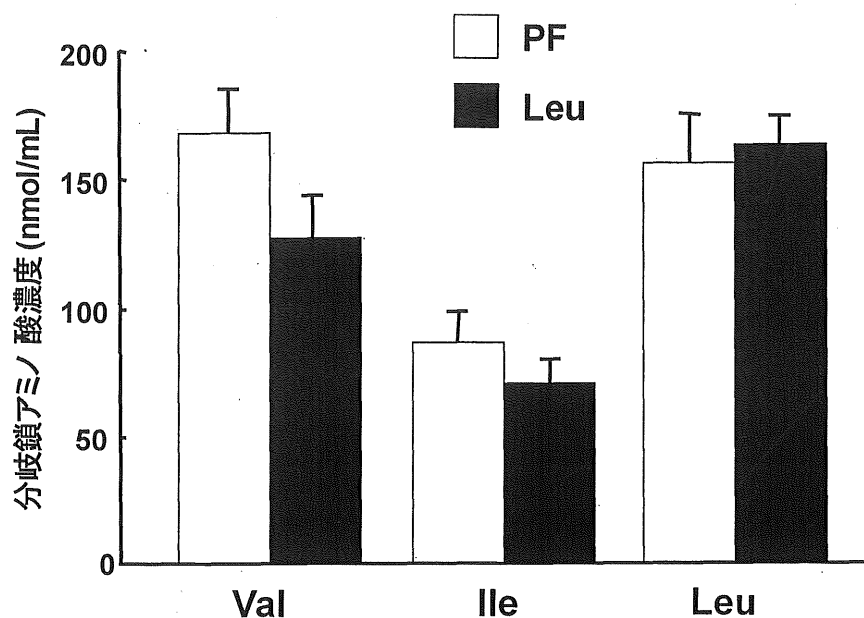


Fig. 3-3 若齢ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化値は、平均±標準誤差 (n=5)。

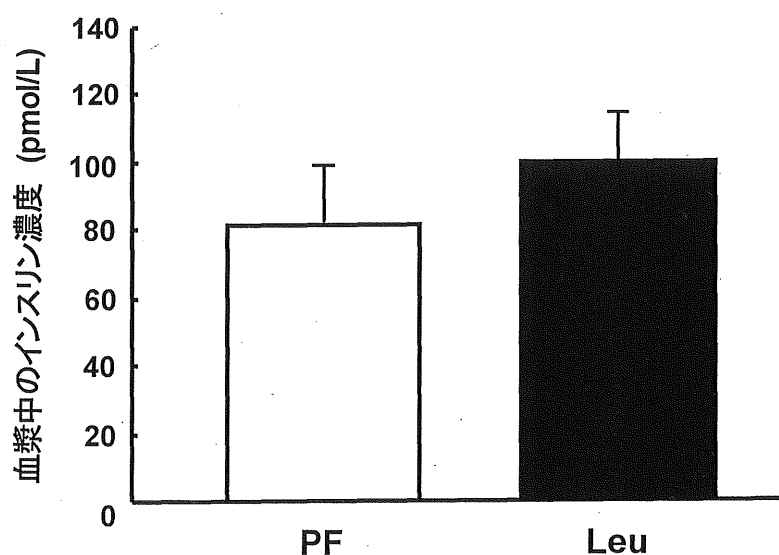


Fig. 3-4 若齢ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、血漿中のインスリン濃度の変化値は、平均±標準誤差 (n=5)。

実験 2. 成熟ラットにおけるロイシンの効果

(1) 筋重量の変化

ロイシン添加食 (Leu) の摂食により、無タンパク質食 (PF) の摂食と比較して、長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋において、体重あたりの筋重量が有意に上昇した。したがって、無タンパク質摂食により減少した筋重量が、ロイシンの添加により抑制されていると考えられる (Fig. 3-5)。

(2) 筋原線維タンパク質の分解速度

動静脈濃度差とは、ある器官に流入する動脈血中の物質の濃度と、そこから出てゆく静脈血中の物質の濃度との差のことであり、この差が正であれば、その器官に物質が取り込まれたことになり、負であれば放出されたことになる。MeHis は筋原線維タンパク質が分解された後、タンパク質の再合成に利用されることはないことから、静脈中に新たに放出された MeHis はそのまま筋肉の分解を反映するものと考えられる。MeHis 放出速度の結果は、MeHis の静脈濃度から動脈濃度を差し引き、それに血流量を乗じて表した。

ロイシン添加食 (Leu) の摂食により、無タンパク質食 (PF) の摂食と比較して、静脈中への MeHis 放出速度は顕著に減少した。したがって、ロイシンの添加により、筋原線維タンパク質の分解速度が減少していることが示唆される (Fig. 3-6 (A))。

(3) 骨格筋タンパク質の合成速度

腓腹筋の FSR は 2 群間で変化はみられなかった。したがって、ロイシンの添加による合成速度の上昇は起こらなかったと考えられる (Fig. 3-6 (B))。

(4) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度は、2 群間で変化はみられなかった。(Fig. 3-7)

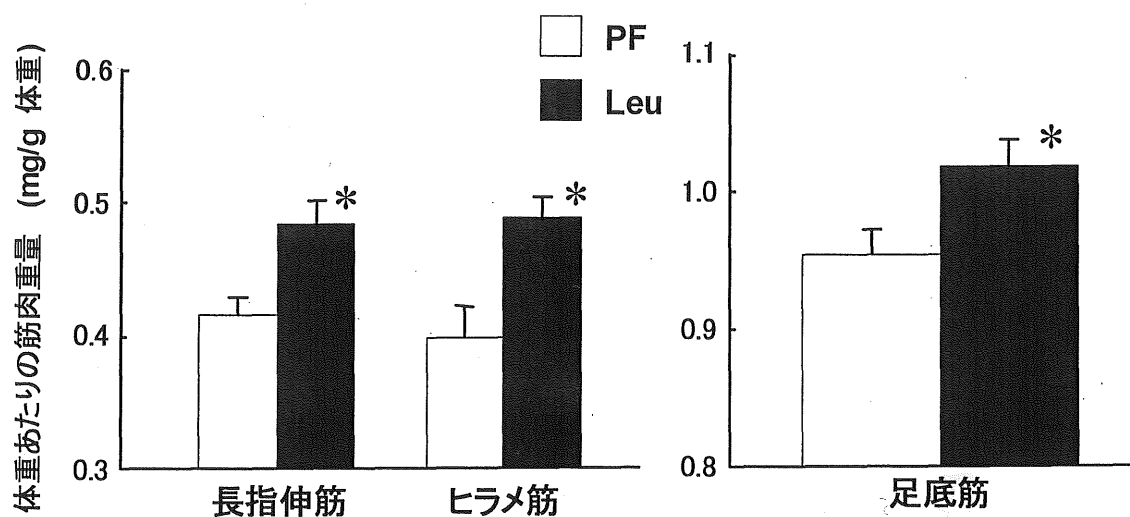


Fig. 3-5 成熟ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、体重あたりの筋重量の変化
値は、平均±標準誤差 (n=5)。PF 群に対する有意差 * : $p < 0.05$

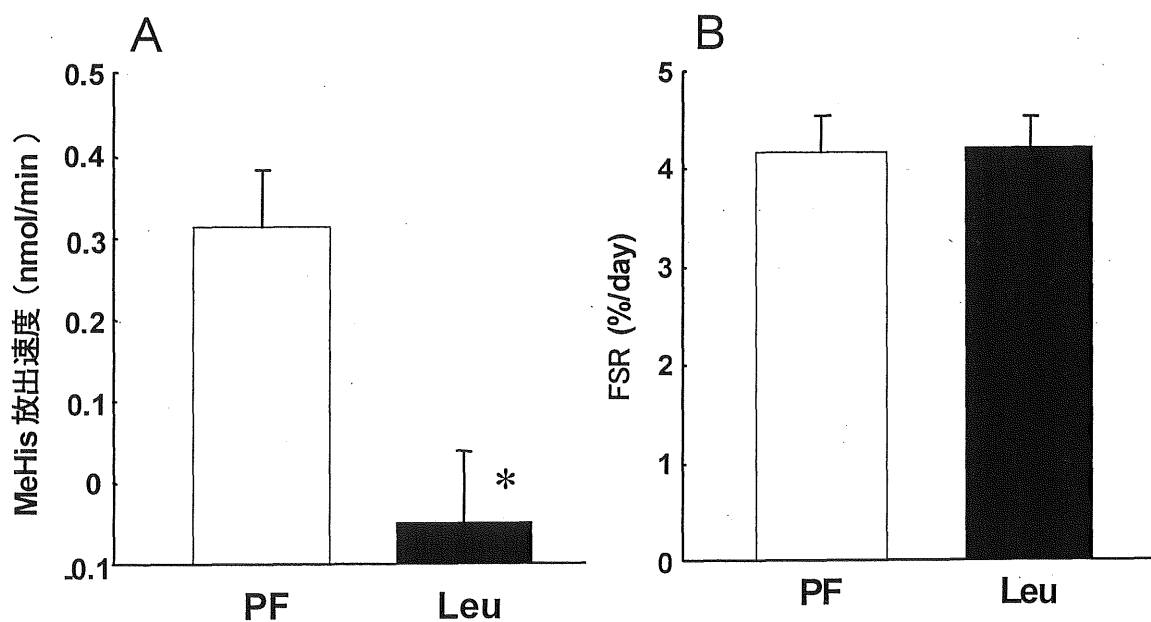


Fig. 3-6 成熟ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、静脈への MeHis 放出速度 (A) と FSR (B) の変化

値は、平均±標準誤差 (n=5)。PF 群に対する有意差 * : $p < 0.05$

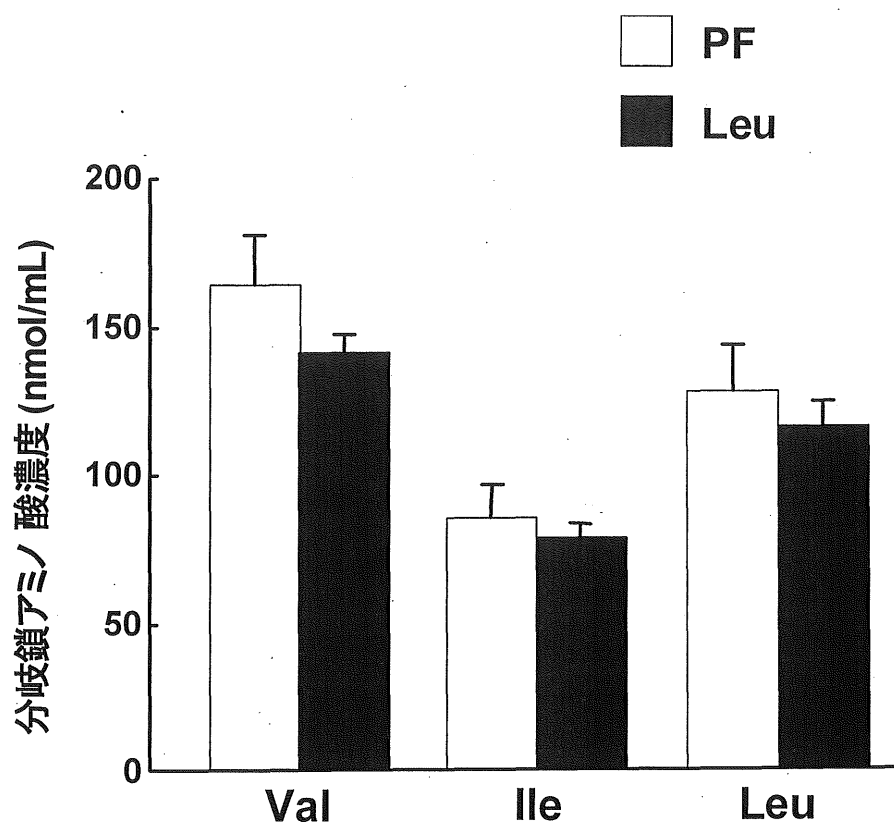


Fig. 3-7 成熟ラットにおける、無タンパク質食 (PF)、あるいはロイシン添加食 (Leu) を1週間摂食させたときの、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化値は、平均±標準誤差 (n=5)。

第4節 考察

本実験では、ロイシンの継続的な摂取が、骨格筋タンパク質の分解と合成に与える影響について検討し、若齢、成熟ラットともに、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、長指伸筋、ヒラメ筋、足底筋の体重あたりの筋肉重量が上昇する結果が得られた。

本実験ではロイシン添加食の摂食により、骨格筋タンパク質の合成速度が上昇する傾向はみられなかった。しかし、ロイシンの摂食が骨格筋タンパク質の合成を促進するという報告は多い。Rieuら [78] は、ラットにロイシン添加食を10日間摂食させ、骨格筋タンパク質の合成が促進することを示している。また、Kimballら [79] は、ラットに体重100gあたり135mgのロイシンを経口投与し、骨格筋タンパク質合成が促進することを示しており、本実験の結果とは異なっている。これらの実験は、本実験のように食餌タンパク質が不足している条件ではなく、十分なタンパク質を摂取した状態の動物にロイシンを与えている。したがって、タンパク質合成の材料となるアミノ酸が十分にある状態であり、本実験の条件とは異なっていると考えられる。ロイシンの摂食は、タンパク質翻訳段階の活性因子である4E-BP1やS6K1のリン酸化を促し、タンパク質合成を促進することが知られている [80]。しかし、単独のアミノ酸を与えてタンパク質翻訳因子を活性化させて合成を促したとしても、実際のタンパク質量は増加しないと予想される。なぜなら、タンパク質は単独のアミノ酸だけでできているわけではなく、20種類全てのアミノ酸が必要であり、ロイシン以外の19種類のアミノ酸の供給がない限り、実際にタンパク質を合成することはできないからである。本章で、タンパク質の合成速度が上昇する傾向がみられなかった理由は、そのためであると考えられる。菅原 [67] は、本実験と同じ条件でラットにロイシン添加食を摂食させたがS6K1、4E-BP1のリン酸化には変化が無いことを示している。本実験では、これらの因子は測定していないが、おそらく同様の結果であると考えられる。また、本実験では、自由摂食で飼料を与えているため、ラットがいつ飼料を摂食したかは不明であり、摂食直後であれば、翻訳因子のリン酸化がみられた可能性がある。しかし、たとえリン酸化が上昇して

いたとしても、やはり材料となるアミノ酸が不足しているため、実際のタンパク質合成は促進しないと考えられる。

一方、分解に関しては、全てのアミノ酸が必要というわけではなく、単独のアミノ酸で骨格筋タンパク質の分解速度を減少させる効果があるのであれば、実際に筋肉量の減少を抑制することが可能であると考えられる。本実験の、MeHisの放出速度から評価した分解速度の結果は、ロイシンの継続摂取により顕著に抑制されており、筋重量の減少も抑えられた。したがって、無タンパク質摂食時におけるロイシンの効果は、合成よりも分解に与える影響の方が、はるかに強いことが示唆される。本実験でみられた筋肉量減少の抑制は、骨格筋タンパク質の分解を顕著に抑制したためであると考えられ、骨格筋タンパク質量の調節において、分解を制御することの重要性が示された。

畠山 [81] は、ラットに様々なロイシン濃度の懸濁液を胃内に強制経口投与して、筋原線維タンパク質分解速度と静脈中のロイシン濃度を測定し、その関係を検討した。その結果、静脈中の濃度が 200 nmol/mL 以上のときには、筋原線維タンパク質の分解抑制効果がみられることを示唆した。しかし本実験では、ロイシン添加食の摂食により、血中のロイシン濃度は上昇しなかったのにも関わらず、筋原線維タンパク質分解速度の減少がみられた。Nagasawa ら [82] は、ラットに体重 100g あたり 135mg のロイシンを経口投与し、投与 1 時間後に血中のロイシン濃度がピークを示し、その後、急激に濃度が減少することを示している。これは、ロイシンの代謝が速いためであると考えられる [83]。したがって、本実験においてもロイシン添加食の摂食直後では、血中ロイシン濃度が上昇していたが、屠殺解剖したときには既に濃度が下がっていたと考えられ、分解の抑制にはロイシン濃度の上昇が必要であると示唆される。

ロイシンはインスリンの分泌を促進する物質として知られている [84]。しかし、本実験ではロイシン摂食群で血中インスリン濃度の上昇はみられなかった。これもおそらくロイシンの血中濃度と同様に、摂食直後では上昇し屠殺解剖時には濃度が低下していた可能性が考えられるが、ラットが一度に摂取する飼料はわずかであり、血中インスリン濃度の上昇はおそらく短時間であると考えられる。さらに、対照群

である無タンパク質食にも、ロイシン添加食にも糖質 (α -コーンスターチ、ショ糖) が含まれており、ロイシンが糖質以上のインスリン分泌を促すとは考えにくい。したがって、インスリンは分解速度に影響を与えるほどは関与していないと考えられ、筋重量減少の抑制や分解速度の減少は、インスリンの関与とは独立している可能性が高いと示唆される。本実験の実験結果には、インスリン以外にもグルココルチコイドや IGF-1 などの他のホルモンが関与している可能性があり、ホルモンバランスと筋肉代謝の変化についてはさらに研究を進める必要があると考えられる。

分岐鎖アミノ酸の代謝の最初のステップは同じ酵素が関与しているため、それぞれの単独投与は酵素の活性を引き起こし、他の分岐鎖アミノ酸の濃度を減少させると考えられる [85]。したがって、ロイシンの単独摂取はアミノ酸のアンバランスを引き起こし、インバランスを起す可能性がある。しかし、本実験での 1.5% というロイシン量では、血中の分岐鎖アミノ酸濃度に大きな変化はみられず、生理的な条件に近い形で筋萎縮改善効果が得られたと考えられる。したがって、この実験結果を人間に応用することは、十分可能であると考えられる。

本章では、無タンパク質摂食時において、ロイシンを添加した食餌を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、筋萎縮が予防できることを示した。また、合成の促進なしに分解の抑制だけで筋重量の維持が可能であることから、筋萎縮の予防、改善における分解を抑制することの重要性が確認された。ロイシンの摂取により、骨格筋タンパク質合成の促進効果が得られなかったことから、ロイシンの摂取は筋肉量を増加させることはできないかもしれないが、少なくとも減少を抑えることにより、筋萎縮を防ぐことが可能であると考えられる。アレルギーや腎傷害など、タンパク質を摂食できない、あるいは、多く摂食できない状態であっても、ロイシンを多く摂食することにより、筋肉量の維持が可能であると考えられる。

第4章 低タンパク質食の摂食における筋原線維タンパク質分解への影響

第1節 目的

前章では、若齢ラットと成熟ラットにおいて、無タンパク質食の摂食と1.5%のロイシンを添加した食餌の摂食とを比較し、どちらのラットにおいてもロイシン添加食の摂食により、筋原線維タンパク質の分解が抑制され、筋萎縮が改善する可能性を示唆した。しかし、この効果はロイシンに特異的なものでない可能性がある。なぜなら、対象群が無タンパク質食の摂食であり、ビタミンなどを除けば窒素源が0であるためである。したがって、ロイシンでなくても窒素源さえ供給できれば分解を抑えられる可能性がある。

また、週齢によりタンパク質栄養による骨格筋タンパク質代謝の応答が異なる可能性がある。前章では無タンパク質食の摂食により、どちらの週齢でも分解速度が上昇したが、低タンパク質食の効果については、若齢と成熟では異なる可能性がある。なぜなら、若齢ラットは成長期であるため、成熟ラットよりも大量のタンパク質が必要である可能性がある。したがって、低タンパク質ではより重度の低栄養状態となり、分解速度が上昇すると予想される。しかし、成熟ラットは若齢ラットよりも筋肉が多いことから、タンパク質栄養が不足しているときでも、若齢ラットほど筋肉を減らす必要がないため、ある程度の窒素源の供給さえあれば分解速度は上昇しない可能性がある。

そこで本章では、前章で用いた1.5%ロイシン添加食の窒素源よりも、あきらかに多い5%カゼイン食を低タンパク質食とし、若齢ラットと成熟ラットを用いて、低タンパク質食(5%カゼイン食)の摂食による、筋原線維タンパク質分解の変化について検討し、前章でみられた分解抑制効果が、ロイシンの特異的な効果であるかどうかを確認した。さらに、週齢の違いによって、タンパク質栄養における代謝応答が異なるかどうかを検討した。

第2節 方法

1. 動物実験

実験1. 若齢ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

実験動物として4週齢のWistar系雄ラット(60~70g、日本エスエルシー株式会社:浜松)20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12日間飼育した。水は水道水を自由飲水させた。飼料は1日目は固形飼料(日本クレア株式会社)、2、3日目はAIN-93G組成の20%カゼイン飼料(Table 4-1)を自由摂取させた。

4日目に各群の体重がほぼ等しくなるように、無タンパク質飼料(PF)、5%カゼイン飼料(5C) 5%カゼインにロイシンを1.15%添加した飼料(5C+L)、20%カゼイン飼料(20C)(Table 4-1)を摂食させる4群に分け1週間摂食させ、屠殺解剖した。5C+Lに含まれるロイシン量は、20%カゼイン飼料中に含まれるロイシン量に相当するようにした。無タンパク質飼料の摂食量は少ないため、他の3群の摂食量は無タンパク質群と同量となるように摂食させた(ペアフェッド)。

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。血液は、 $3,000\times\text{g}$ 、 4°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°C で保存した。さらに、屠殺後速やかに長指伸筋を単離し、筋原線維タンパク質分解速度の測定に使用した。

実験2. 成熟ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

実験動物として12週齢のWistar系雄ラット(日本エスエルシー株式会社)18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。飼料は1,2日目に固形飼料(日本クレア株式会社)、その後は、20%カゼイン飼料(Table 4-1)で、体重が300g程度になるまで2週間程度予備飼育した。

体重がほぼ等しくなるように、20%カゼイン飼料(20C)、5%カゼイン飼料(5C)、

無タンパク質飼料 (PF) (Table 4-1) を摂食させる 3 群に分け、1 週間摂食させ、屠殺解剖した。無タンパク質飼料の摂食量は少ないため、20%カゼイン群と 5%カゼイン群の摂食量は無タンパク質群と同量となるように摂食させた(ペアフェッド)。

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 188 μ L 腹腔内投与してラットを麻酔した。麻酔が効いてきたら、筋原線維タンパク質の分解速度を測定するため、動静脈濃度差法による手術を行った (3 章-2 節-2 実験 2)。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。

2. 筋原線維タンパク質の分解速度測定方法

飼料の違いにより、筋原線維タンパク質の分解速度に変化があるかを検討した。本章における筋原線維タンパク質の分解速度の測定は、第 3 章 - 第 2 節 - 2 と同様に行った。

3. 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の測定方法

飼料の違いにより、分岐鎖アミノ酸濃度がどのように変化しているか確認するため、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度を HPLC で測定した。血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の定量は、第 3 章-第 2 節-4 と同様の方法で行った。

4. 統計処理

本実験で測定して得られたデータの計算および整理には、Microsoft の Excel 2003 を使用した。また、結果は平均値と標準誤差で示した。異なる群間で有意差があるかどうかを検討するために、GraphPad Instat Software Ver.2.03 (USA) を使用し、20C を摂食させた群と他の群とを比較し、Student *t*-test によって有意差判定をした。

Table 4-1 飼料組成 (g/kg)

	PF	5C	5C+L	20C
カゼイン ¹	0	50	50	200
シスチン ²	0	0	0	3
α -コーンスターチ ¹	732.5	682.5	671	529.5
ショ糖 ³	100	100	100	100
大豆油 ⁴	70	70	70	70
AIN-93 塩混合 ⁵	35	35	35	35
AIN-93 ビタミン混合 ⁵	10	10	10	10
コリン重酒石酸塩 ⁴	2.5	2.5	2.5	2.5
セルロース粉末 ¹	50	50	50	50
ロイシン ²	0	0	11.5	0

1, オリエンタル酵母工業株式会社, 千葉、2, 味の素株式会社, 東京
 3, 東洋精糖株式会社, 東京、4, 和光純薬工業株式会社, 大阪
 5, 日本クレア株式会社, 東京

第3節 結果

実験1. 若齢ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

(1) 筋原線維タンパク質の分解速度

筋原線維タンパク質の分解速度は、20%カゼイン食摂食群 (20C) と比較して無タンパク質食摂食群 (PF) と5%カゼイン摂食群 (5C) で有意に上昇し、ロイシン添加食摂食群 (5C+L) では有意な差はみられなかった。5CはPFとほぼ同程度の値となり、5%カゼイン食には分解抑制効果がないと考えられる (Fig. 4-1)。

(2) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

血漿中のバリン濃度は、無タンパク質食摂食群 (PF) で、20%カゼイン食摂食群 (20C) と比較して、有意に減少した。他の分岐鎖アミノ酸濃度には変化がみられなかった (Fig. 4-2)。

実験2. 成熟ラットにおける低タンパク質食摂食の効果

(1) 筋原線維タンパク質の分解速度

筋原線維タンパク質の分解速度は、無タンパク質食摂食群 (PF) では、有意な差はないものの十分に上昇する傾向を示した ($p=0.065$)。また、5%カゼイン食摂食群 (5C) は有意に分解速度が上昇し、その値はPFとほぼ同程度の値となった。(Fig. 4-3)。

(2) 血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度

動脈血漿中のバリン濃度は、無タンパク質食摂食群 (PF) で、20%カゼイン食摂食群 (20C) と比較して、有意に減少した。他の分岐鎖アミノ酸濃度には変化がみられなかった。また、静脈血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度は、全ての分岐鎖アミノ酸で、3群間で有意な差はみられなかった (Fig. 4-4)。

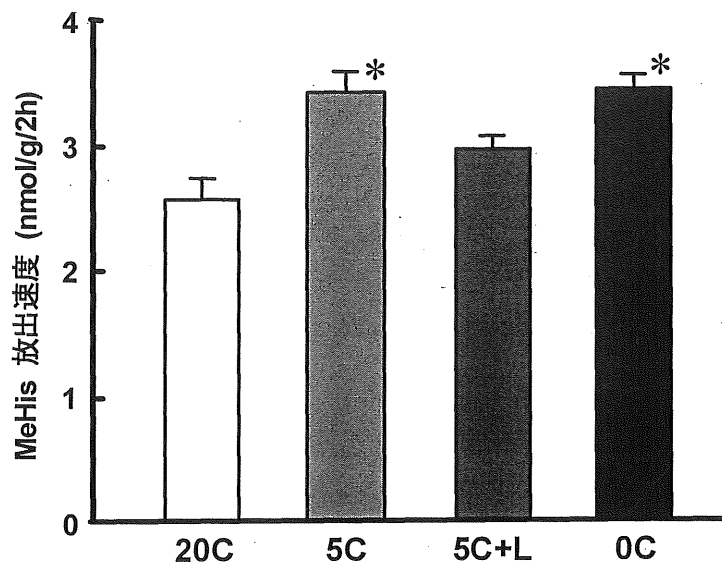


Fig. 4-1 若齢ラットにおける20%カゼイン食(20C)、5%カゼイン食(5C)、5Cにロイシンを添加した飼料(5C+L)、無タンパク質食(PF)の摂食による、長指伸筋から放出されたMeHisの放出速度

値は、平均±標準誤差(n=5)。20Cに対する有意差 * : $p < 0.05$

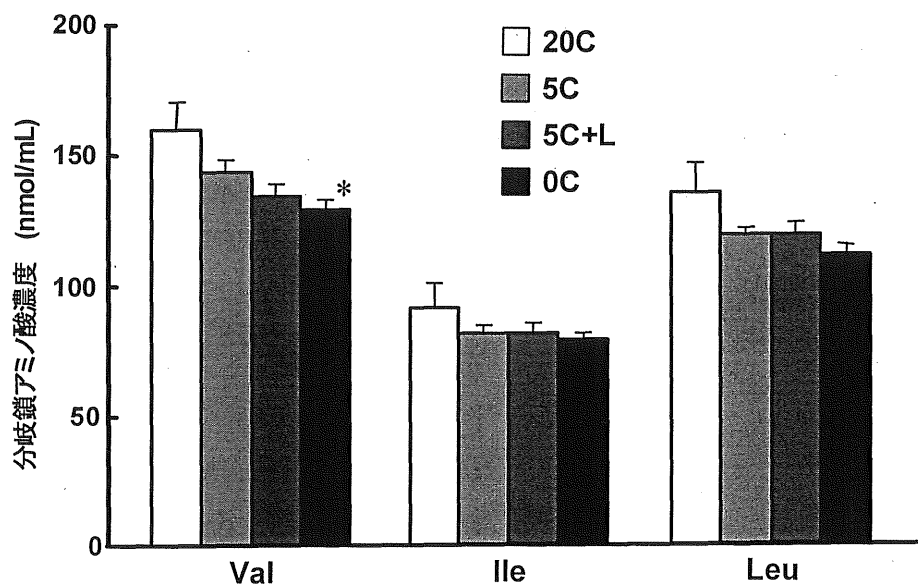


Fig. 4-2 若齢ラットにおける20%カゼイン食(20C)、5%カゼイン食(5C)、5Cにロイシンを添加した飼料(5C+L)、無タンパク質食(PF)の摂食による、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度の変化

値は、平均±標準誤差(n=5)。20Cに対する有意差 * : $p < 0.05$

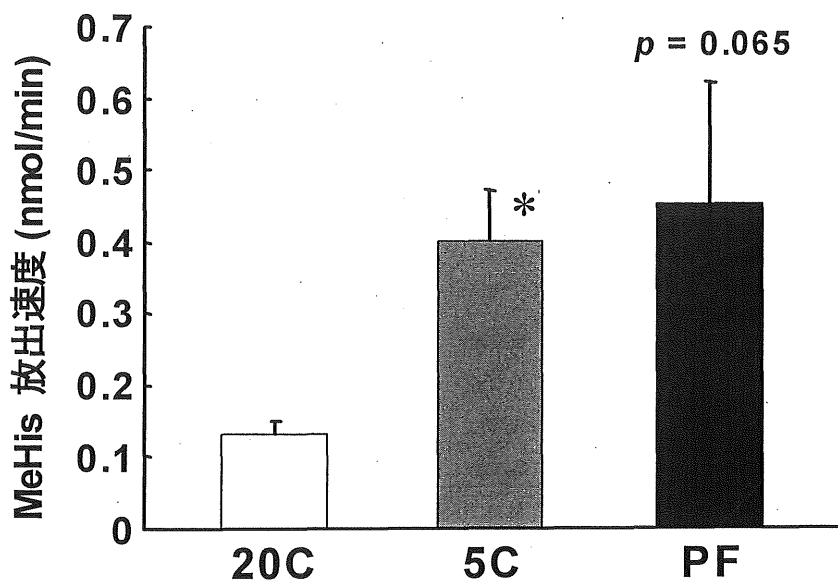


Fig. 4-3 成熟ラットにおける20%カゼイン食(20C)、5%カゼイン食(5C)、無タンパク質食(PF)の摂食による、静脈へのMeHis放出速度の変化
値は、平均±標準誤差(n=5~6)。20Cに対する有意差 * : p<0.05

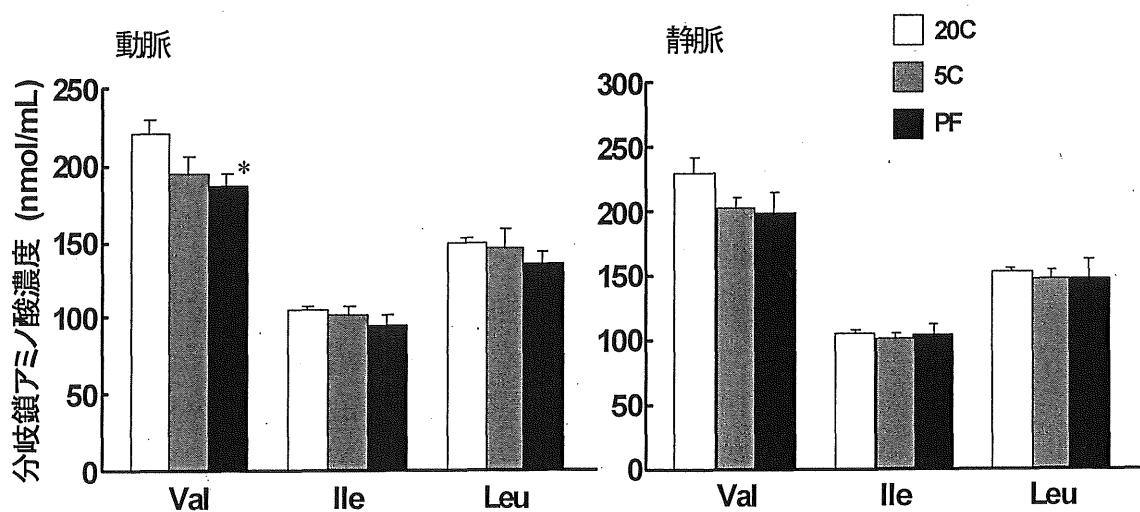


Fig. 4-4 成熟ラットにおける20%カゼイン食(20C)、5%カゼイン食(5C)、無タンパク質食(PF)の摂食による、血漿中の分岐鎖アミノ酸濃度(動脈、静脈)の変化
値は、平均±標準誤差(n=6)。20Cに対する有意差 * : p<0.05

第4節 考察

本章では、低タンパク質食（5%カゼイン食）の摂食による筋原線維タンパク質の分解速度の変化を検討し、低タンパク質食の摂食によって分解速度が上昇することを示した。また、その分解速度は無タンパク質食の摂食時と、同程度の分解速度となることが示され、無タンパク質食の摂食による分解速度の上昇は、低タンパク質食の摂食では抑制されないことを示唆した。さらに、若齢ラットだけでなく成熟ラットも、低タンパク質食の摂食により分解速度が上昇したことから、筋肉タンパク質の分解抑制のためには、週齢に関わらず、十分なタンパク質を摂取することが重要であると考えられる。したがって、筋萎縮を予防するためには、成長期だけでなく一生涯にわたり、食餌タンパク質を十分に取って行く必要があると考えられる。

前章では、無タンパク質食にロイシンを添加することにより、筋原線維タンパク質の分解速度が減少することを示した。この実験条件では窒素源がロイシン添加食の方が多いため、ロイシンそのものに特別な分解抑制効果があるわけではなく、単に窒素源さえ補えば分解抑制効果が得られる可能性が考えられた。本章で用いた飼料は、ビタミンに含まれる窒素量を除けば、5%カゼイン食の中には約4.3%の窒素源が含まれている [86]。一方、前章で用いたロイシン添加食の窒素量は飼料中の1.5%であるので、本章で用いた5%カゼイン食の方が含有窒素量はあきらかに多い。しかし、窒素源が多いにも関わらず、本章の結果では5%カゼイン食に分解抑制効果はみられなかった。したがって、前章で示されたロイシン添加食の分解抑制効果は、単に窒素源が多かったからではなく、ロイシンの特異的な効果であると考えられる。

若齢ラットのみでの検討ではあるが、低タンパク質食にロイシンを添加して分解速度を測定した結果、20%カゼイン食を摂食したときと同程度の分解速度となった。さらに無タンパク質食の摂食と比較して有意に分解速度が減少した。この実験でのロイシンの添加量は1.15gで、5%カゼイン中に含まれるロイシン量と添加したロイシン量の和が、20%カゼイン中に含まれるロイシン量に相当するようにしている。

また、前章のロイシン添加食のロイシン量も20%カゼイン中に含まれるロイシン量に相当している。したがって、分解速度を抑制するためには、20%カゼイン食に含まれるロイシン量が必要であると考えられる。

Nagasawaら [87] は、8週齢、および8ヶ月齢のマウスを用いて、18時間の絶食後に、5, 10, 20%のカゼイン食を摂食させ、筋原線維タンパク質の分解速度を測定した。その結果、5%カゼイン食では8週齢、8ヶ月齢ともに分解抑制効果がないことを示しており、本章と同様の結果を示している。一方、10%カゼイン食の摂食では、8週齢のマウスでは分解抑制効果がないのに対し、8ヶ月齢のマウスでは、20%カゼイン食と同程度の分解抑制効果があったことを示した。本章で用いている成熟ラットは14週齢で、Nagasawaらが用いている8ヶ月齢のマウスよりも若い。8ヶ月齢のマウスは成長期を過ぎており、筋肉量は十分に存在すると考えられる。したがって、本章の目的で述べたように筋肉量が十分であれば、ある程度の食餌タンパク質を摂取すれば分解は抑制されるのかもしれない。Hayaseら [88] は、30週齢のラットを用いて、5, 20%カゼイン食を10日間摂取させ、脳、肝臓、腎臓のタンパク質合成の変化を検討している。その結果、5%カゼイン食の摂食では合成速度が減少することを示しており、老齢において十分な食餌タンパク質を摂取することの重要性を示唆している。本章では筋肉のみの検討であったが、筋肉組織以外の体タンパク質量の維持にも、食餌タンパク質を多く摂ることが必要であると考えられる。

本章では低タンパク質食として5%のカゼイン食を設定したが、他のタンパク質含量でも検討する必要があると考えられる。たとえば、Nagasawaらが用いた10%のカゼイン食で実験を行えば、若齢と成熟で差がでる可能性もあり、今後、研究される必要がある。